

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Diagnóstico da exposição fetal ao álcool através de biomarcadores em  
mecônio

Fabiana Spinetti dos Santos

Ribeirão Preto  
2016

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

**Diagnóstico da exposição fetal ao álcool através de biomarcadores em  
mecônio**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Toxicologia para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Fabiana Spinetti dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Erikson Felipe Furtado

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 24/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

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.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Fabiana Spinetti dos

Diagnóstico da exposição fetal ao álcool através de biomarcadores em mecônio. Ribeirão Preto, 2016.

p. 145: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Furtado, Erikson Felipe.

1. Ésteres etílicos de ácidos graxos. 2. Cromatografia em fase gasosa. 3. Espectrometria de massas. 4. Gestação. 5. Exposição fetal ao  lcool.

Fabiana Spinetti dos Santos

Diagnóstico da exposição fetal ao álcool através de biomarcadores em mecônio

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Toxicologia para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Erikson Felipe  
Furtado

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho, com muito amor e gratidão, aos meus pais, Francisco e Silvia, por tudo que fizeram para que eu chegasse até aqui e ao meu noivo Elder por me incentivar e acreditar nos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Erikson Felipe Furtado, por todos ensinamentos, dedicação e incentivo ao longo desses anos;

Aos meus amados pais, Francisco e Silvia, que sempre lutaram para me proporcionar um ensino de qualidade, mesmo quando não tinham recursos para tal, e me incentivaram a concluir mais essa etapa importante da minha vida;

Ao meu querido noivo, Elder, que me incentivou e me apoiou em todos os momentos; mesmo estando a quilômetros de distância;

A minha inestimável família, em especial minha irmã Francine, meu avô José, meus tios Márcia, Cristiana, Silvio e Milton, e meus primos Tatiane, Thaisa, Murilo e Guilherme que souberam entender a minha ausência e me acolheram sempre com carinho;

Aos meus colegas de laboratório, Carol, Dayanne, Eduardo, Fernandas; Marcela, Mariana, Nayna, Nathália, Laís, Lidiane, Thiago e Ricardo, por toda ajuda e companheirismo;

Ao Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, pelos ensinamentos cromatográficos e pela disponibilização do Laboratório de Análises Toxicológicas Forenses para realização da etapa laboratorial deste projeto;

Aos integrantes do PAI-PAD, em especial, a Lia e a Elisandra, pela ajuda com assuntos administrativos e aos integrantes do GESTA-INTERVBREV: Joseane, Larissa, Patrícia, Poliana e Vanessa que me auxiliaram na coleta de dados e amostras do projeto piloto;

Às minhas amigas de Ribeirão: Cíntia, Simone, Mey, Paola, Nanda e Laíz pela distração e acolhimento nos momentos que eu mais precisava;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia pela oportunidade da realização do curso de doutorado direto;

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado (Processo FAPESP Nº 2012/17063-2); à CAPES, pela concessão da bolsa no início do curso e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP, pela concessão do auxílio para participação em evento no exterior;

À MATER, ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e às Unidades Básicas de Saúde que abriram as portas dos seus serviços e permitiram a coleta de dados e amostras;

Às mães e às crianças participantes da pesquisa;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

## RESUMO

SANTOS, F. S. **Diagnóstico da exposição fetal ao álcool através de biomarcadores em mecônio**. 2016. 145 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A grande prevalência do consumo de álcool por mulheres em idade reprodutiva aliada à gravidez não planejada expõe a gestante a um elevado risco de se alcoolizar em algum momento da gestação, principalmente no início do período gestacional em que a maioria delas ainda não tomou ciência do fato. Assim, torna-se extremamente relevante o desenvolvimento de métodos de detecção precoce de recém-nascidos em risco de desenvolvimento de problemas do espectro dos transtornos relacionados à exposição fetal ao álcool. O objetivo desse estudo foi desenvolver, validar e avaliar a eficácia de um método de quantificação de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs) no mecônio de recém-nascidos para avaliação da exposição fetal ao álcool. Os FAEEs avaliados foram: palmitato de etila, estearato de etila, oleato de etila e linoleato de etila. O método consistiu no preparo das amostras pela extração líquido-líquido utilizando água, acetona e hexano, seguida de extração em fase sólida empregando cartuchos de aminopropilsilica. A separação e quantificação dos analitos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os limites de quantificação (LQ) variaram entre 50-100ng/g. A curva de calibração foi linear de LQ até 2000ng/g para todos os analitos. A recuperação variou de 69,79% a 106,57%. Os analitos demonstraram estabilidade no ensaio de pós-processamento e em solução. O método foi aplicado em amostras de mecônio de 160 recém-nascidos recrutados em uma maternidade pública de Ribeirão Preto-SP. O consumo de álcool materno foi reportado utilizando questionários de rastreamento validados T-ACE e AUDIT e relatos retrospectivos da quantidade e frequência de álcool consumida ao longo da gestação. A eficácia do método analítico em identificar os casos positivos foi determinada pela curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC). O consumo alcoólico de risco foi identificado pelo T-ACE em 31,3% das participantes e 50% reportaram o uso de álcool durante a gestação. 51,3% dos recém-nascidos apresentaram FAEEs em seu mecônio, sendo que 33,1% apresentaram altas concentrações para a somatória dos FAEEs (maior que 500ng/g), compatível com um consumo abusivo de álcool. O oleato de etila foi o biomarcador mais prevalente e o linoleato de etila foi o biomarcador que apresentou as maiores concentrações. Houve uma variabilidade no perfil de distribuição dos FAEEs entre os indivíduos, e discordâncias entre a presença de FAEEs e o consumo reportado pela mãe. A concentração total dos FAEEs nos mecônio mostrou-se como melhor indicador da exposição fetal ao álcool quando comparado com o uso de um único biomarcador. O ponto de corte para esta população foi de aproximadamente 600ng/g para uso tipo *binge* (três ou mais doses por ocasião) com sensibilidade de 71,43% e especificidade de 84,37%. Este estudo reforça a importância da utilização de métodos laboratoriais na identificação da exposição fetal ao álcool.

Palavras – chave: ésteres etílicos de ácidos graxos, cromatografia em fase gasosa, espectrometria de massas, gestação, recém-nascido; exposição fetal ao álcool



## ABSTRACT

SANTOS, F. S. **Diagnosis of fetal alcohol exposure through biomarkers in meconium.** 2016. 145 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The high prevalence of alcohol consumption by women of reproductive age combined with unplanned pregnancy exposes the mother to a high risk to intoxicate at some time during pregnancy, especially in the early gestational period in which most of them have not yet become aware of the fact. Therefore, the development of methods for early detection it is extremely relevant for the prevention of fetal alcohol exposure as well for the early assessment of neonates at risk for development of problems of the fetal alcohol spectrum. The aim of this study was to develop, validate and evaluate the effectiveness of a method for quantifying fatty acid ethyl esters (FAEEs) in meconium from newborns for evaluation of fetal alcohol exposure. The evaluated FAEEs were: ethyl palmitate, ethyl stearate, ethyl oleate and linoleate etila. The method consists in preparing the samples by liquid-liquid extraction using water, acetone and hexane, followed by solid phase extraction employing aminopropyl silica cartridges. The separation and quantitation of analytes was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometer. Limits of quantification (LOQ) ranged between 50 and 100 ng/g. The curves calibration were linear from LQ-2000ng / g for all analytes. The recovery ranged from 69.79% to 106.57%. The analytes demonstrated stability in post-processing assay and in stability assay for standard solutions. The method was applied in meconium samples from 160 newborns recruited in a public maternity hospital of Ribeirão Preto. The maternal alcohol consumption was assessed by validated screening questionnaires (T-ACE and AUDIT) and by retrospective self-reports about the amount and frequency of alcohol consumption during pregnancy. The effectiveness of the analytical method in identifying positive cases was determined by receiver operating characteristic curve (ROC). The risk drinking was identified by the T-ACE in 31.3% of participants and 50% of them reported alcohol use during pregnancy. 51.3% of newborns tested positive for FAEEs, and 33.1% had high concentrations for sum of FAEEs (greater than 500 ng/g), compatible with alcohol abuse. The ethyl oleate was the most prevalent biomarker and ethyl linoleate was the biomarker that showed the highest concentrations. There was a variability in the distribution profile of FAEEs between individuals, and there were disagreements between the results of FAEEs and consumption reported by the mother. The cumulative sum of FAEEs was better than individual FAEEs for interpretation of positive cases. A positive cutoff of cumulative FAEE at 600 ng/g for binge drinking was established with 71,43% sensitivity and 84,37% specificity. This study reinforces the importance of using laboratory methods for identifying fetal alcohol exposure.

Keywords: fatty acid ethyl esters, gas chromatography, mass spectrometry, pregnancy, fetal alcohol exposure.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostra de mecônio coletado neste estudo .....	9
Figura 2 - Estrutura química dos analitos em estudo: (A) Palmitato de etila –E16; (B) Estearato de etila – E18; (C) Oleato de etila – E18:1; (D) Linoleato de etila – E18:2; (E) Heptadecanoato de metila – M17. (Figura adaptada de ROEHSIG et al., 2010).	13
Figura 3- Cromatograma obtido pela análise de soluções do padrão interno e dos FAEEs em estudo utilizando a programação de temperatura da coluna proposta por Ostrea et al. (2006). .....	38
Figura 4– Cromatograma obtido na otimização da programação da temperatura da coluna ao analisar a solução do padrão interno e dos FAEEs em estudo. ....	38
Figura 5- Espectro de massas do palmitato de etila.....	40
Figura 6- Espectro de massas do linoleato de etila.....	40
Figura 7- Espectro de massas do oleato de etila. ....	41
Figura 8- Espectro de massas do estearato de etila. ....	41
Figura 9– Espectro de massas do padrão interno heptadecanoato de metila.....	42
Figura 10- Cromatogramas A e B obtidos pela análise do mecônio fortificado com 500 ng de FAEEs e extraído segundo o método de Moore et al. (2003) e Ostrea et al. (2006), respectivamente, empregando cartuchos de sílica. ....	44
Figura 11– Cromatograma obtido pela análise de mecônio fortificado com 500 ng dos padrões FAEEs, submetidos à extração em fase sólida com cartuchos de fase extratora mista (Bond Elut Certify I®), após extração líquido-líquido. ....	45
Figura 12- Cromatograma obtido pela análise de mecônio branco fortificado com 500 ng dos padrões FAEEs, submetidos à extração líquido-liquido seguido de extração em fase sólida com cartuchos de aminopropilsílica. ....	46
Figura 13– Sobreposição dos cromatogramas de uma amostra processada contendo os FAEEs (cor vermelha) e de uma amostra processada contendo os possíveis interferentes utilizados no ensaio de seletividade (cor verde). ....	47
Figura 14– Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de correlação linear (R) do palmitato de etila. ....	49
Figura 15 - Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de correlação linear (R) do linoleato de etila. ....	49

Figura 16 - Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) e coeficiente de correlação linear (R) do oleato de etila.....	50
Figura 17– Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) e coeficiente de correlação linear (R) do esterato de etila .....	50
Figura 18 – Cromatograma obtido pela análise de uma amostra “branco” de mecônio processado.....	51
Figura 19– Cromatograma obtido pela análise de uma amostra zero de mecônio processado.....	51
Figura 20– Distribuição das participantes de acordo com a pontuação obtida no questionário T-ACE.....	72
Figura 21- Distribuição das participantes de acordo com a pontuação obtida no questionário AUDIT. 0 a 7 pontos: categoria uso de baixo risco; 8 a 15 pontos categoria uso de risco; 16 a 19 pontos: categoria uso nocivo; 20-40 pontos: provável dependência.....	73
Figura 22– Gráfico de barras ilustrado pela média e erro (intervalo de confiança de 95%) do número de ocasiões de consumo de álcool no trimestre anterior à gestação e nos três trimestres gestacionais.....	76
Figura 23– Gráfico de barras ilustrado pela média e erro (intervalo de confiança de 95%) do número de doses padrão de álcool consumidas por ocasião no trimestre anterior à gestação e nos três trimestres gestacionais. ....	76
Figura 24– Gráfico de barras ilustrado pela média e erro (intervalo de confiança de 95%) do número total de doses padrão de álcool consumidas no trimestre anterior à gestação e nos três trimestres gestacionais.....	77
Figura 25– Cromatograma de uma amostra positiva (M69) com os íons de quantificação (verde), e de detecção (preto e azul) para o padrão interno heptadecanoato de metila (B) e para os analitos palmitato de etila (A) e linoleato de etila (C).....	81
Figura 26– Cromatograma de uma amostra positiva (M69) com os íons de quantificação (verde), e de detecção (preto e azul) para os analitos: oleato de etila (D) e estearato de etila (E). ....	81
Figura 27- Curva ROC e suas respectivas áreas sob a curva (AUC) para análise dos FAEEs em relação a diferentes critérios de exposição ao álcool: A) AUDIT positivo para consumidoras de risco (pontuação maior que sete); B) consumo em <i>binge</i>	

positivo; C) T-ACE positivo para consumidoras de risco (pontuação maior que dois);  
D) Consumo de qualquer quantidade de álcool durante a gestação.....91

Figura 28 - Curva ROC e suas respectivas áreas sob a curva (AUC) para análise dos  
FAEEs em relação a diferentes critérios de exposição ao álcool: A) Uso de álcool no  
trimestre anterior a gestação; B) Consumo de álcool no primeiro trimestre  
gestacional; C) Consumo de álcool no segundo trimestre gestacional; D) Consumo  
de álcool no terceiro trimestre gestacional. ....92

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1– Estudos que determinaram FAEEs em mecônio, segundo um levantamento no PubMed atualizado em Dezembro de 2015.....	17
Tabela 2- Parâmetros da validação de métodos bioanalíticos de acordo com a Resolução nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ....	20
Tabela 3- Programação das rampas de temperaturas de Ostrea et al. e rampa final utilizada na análise cromatográfica. ....	26
Tabela 4– Padrões de calibração utilizado para construção da curva de calibração de cada analito.....	33
Tabela 5- Íons de identificação e quantificação dos FAEEs e do padrão interno heptadecanoato de metila. ....	39
Tabela 6– Concentrações do LD, LIQ, CQs e do LSQ para cada analito. ....	47
Tabela 7– Valores dos coeficientes de variação dos fatores de matriz normalizados para cada FAEEs nos controles de qualidade baixo e alto. ....	48
Tabela 8– Valores de recuperação expressos em porcentagem para cada analito. .	52
Tabela 9– Valores do coeficiente de variação expressos em porcentagem das concentrações obtidas no ensaio de precisão intra e interdias. ....	52
Tabela 10– Valores de Erro padrão relativo expressos em porcentagem das concentrações obtidas no ensaio de exatidão intra e interdias. ....	53
Tabela 11– Estabilidade dos analitos na matriz biológica dado em porcentagem da variação da concentração com relação à concentração nominal.....	54
Tabela 12– Estabilidade da solução primária e da solução de trabalho dos analitos após trinta dias de armazenamento sob-refrigeração a -20°C. ....	54
Tabela 13- Tabela de associação entre os resultado das análises dos FAEEs no mecônio e a presença de consumo de álcool na gestação.....	62
Tabela 14- Características sociodemográficas das participantes.....	71
Tabela 15- Dados antropométricos ao nascer e índice de Apgar dos neonatos .....	72
Tabela 16– Consumo de álcool pelas gestantes durante o trimestre anterior a gestação e durante a gestação .....	75
Tabela 17– Uso de qualquer quantidade de álcool e uso tipo binge no trimestre anterior a gestação e nos três trimestres gestacionais. ....	77

Tabela 18– Concentração em ng/g dos FAEEs quantificados nas 160 amostras de mecônio.....	79
Tabela 19– Prevalência dos casos em que foram detectados e quantificados os FAEEs. ....	79
Tabela 20– Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre os grupos exposto e não exposto de acordo com o questionário T-ACE.....	82
Tabela 21– Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre os grupos exposto e não exposto de acordo com o questionário AUDIT.....	83
Tabela 22 - Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre os grupos exposto e não exposto de acordo com o relato materno referentes ao uso de qualquer quantidade de álcool durante a gestação.....	84
Tabela 23- Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre os grupos exposto e não exposto de acordo com o relato materno referentes ao uso tipo <i>binge</i> (três ou mais doses em uma única ocasião) durante a gestação.....	84
Tabela 24– Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre quatro categorias de padrão de consumo determinadas pelo questionário AUDIT.....	85
Tabela 25– Associação entre consumo de álcool na gestação e a presença de FAEEs no mecônio.....	86
Tabela 26– Parâmetros da avaliação da eficácia do método de análises de FAEEs em mecônio diante diferentes critérios de exposição.....	87
Tabela 27– Parâmetros da avaliação da eficácia do método de análises de FAEEs em mecônio diante de diferentes critérios de exposição, após exclusão dos casos com resultados inconsistentes. ....	89
Tabela 28– Correlação das concentrações dos analitos com a pontuação total do T-ACE e AUDIT, uso de álcool e tipo <i>binge</i> .....	94
Tabela 29– Correlação das concentrações dos FAEEs com o número de ocasiões, dose por ocasião e total de doses na gestação .....	94
Tabela 30 – Análise de correlação entre os FAEEs e as características gerais e antropométricas dos recém-nascidos.....	95
Tabela 31– Análise de correlação para entre os FAEEs e algumas características sócio demográficas das participantes. ....	95

**LISTA DE SIGLAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUDIT	<i>Alcohol Use Disorders Identification Test</i>
CAGE	<i>Cut down, Annoyed, Guilt, Eye opener</i>
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV	Coefficiente de Variação
EPR	Erro Padrão Relativo
E12:0	Laurato de Etila
E14:0	Miristato de Etila
E17:0	Heptadecanoato de Etila
E16:0	Palmitato de Etila
E16:1	Palmitoleato de Etila
E18:0	Estearato de Etila
E18:1	Oleato de Etila
E18:2	Linoleato de Etila
E18:3	Linolenato de Etila
E20:4	Araquidonato de Etila
FAEEs	<i>Fatty acid ethyl esters</i>
FMN	Fator de Matriz Normalizado
GC-FID	<i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
HS-SPME	<i>Headspace – Solid Phase Microextraction</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i>
LD	Limite de Detecção
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LSQ	Limite Superior de Quantificação
M17:0	Heptadecanoato de Metila
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE SIGLAS .....	xiv
SUMÁRIO.....	xv
APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Prevalência do consumo de álcool por mulheres.....	3
1.2 Efeitos da exposição fetal ao álcool.....	5
1.3 Detecção da exposição fetal ao álcool.....	6
1.4 Mecônio como matriz biológica.....	8
1.5 Biomarcadores FAEEs em mecônio .....	9
CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO ....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1 Participantes .....	22
3.2 Coleta de dados.....	22
3.3 Coleta do mecônio .....	23
3.4 Aspectos éticos.....	24
3.5 Reagentes e soluções .....	24
3.6 Equipamentos e acessórios .....	25
3.7 Desenvolvimento do método.....	25
3.8 Método de análise dos FAEEs no mecônio .....	28
3.9 Validação do método analítico .....	30
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Desenvolvimento do método analítico .....	37
4.2 Validação analítica.....	46
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÕES.....	59



CAPÍTULO III: APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO MÉTODO ANALÍTICO	
60	
1	INTRODUÇÃO..... 61
2	OBJETIVOS..... 63
2.1	Objetivo Geral..... 63
2.2	Objetivos específicos..... 63
3	MATERIAIS E MÉTODOS..... 64
3.1	Delineamento..... 64
3.2	Participantes..... 64
3.3	Coleta de dados..... 65
3.4	Coleta do mecônio..... 67
3.5	Aspectos éticos..... 67
3.6	Análise dos FAEEs no mecônio..... 67
3.7	Análise estatística..... 68
4	RESULTADOS..... 70
4.1	Caracterização da amostra do estudo..... 70
4.2	Avaliação da exposição fetal ao álcool mediante questionários..... 72
4.3	Determinação dos FAEEs no mecônio..... 78
4.4	Comparação das concentrações dos FAEEs entre os grupos exposto e não exposto..... 82
4.5	Avaliação do desempenho das medidas FAEEs como método de identificação dos casos positivos..... 85
4.6	Correlação da concentração dos FAEEs com variáveis sociodemográficas, antropométricas e de consumo de álcool..... 93
5	DISCUSSÃO..... 96
6	CONCLUSÕES..... 103
CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 104	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 106	
APÊNDICE A – Estudo piloto..... 114	
APÊNDICE B – Questionário da Pesquisa..... 123	
APÊNDICE C - Perfil de distribuição dos FAEEs nas amostras coletadas..... 137	
ANEXO A – Aprovação do CEP do HC – FMRP - USP..... 141	
ANEXO B - Aprovação do adendo do CEP do HC-FMRP-USP..... 142	
ANEXO C – Aprovação da Comissão de Pesquisa do CSRM-MATER..... 144	
ANEXO D- Aprovação do CEP da FCRP-USP..... 145	

## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese sugere um método de determinação de biomarcadores do álcool no mecônio para avaliação da exposição fetal ao álcool e avalia a eficácia do método analítico em relação ao uso de questionários validados e relatos maternos referentes ao uso de álcool na gestação.

Para facilitar a compreensão deste trabalho, o mesmo foi dividido em três capítulos. O Capítulo I apresenta uma revisão bibliográfica sobre o tema presente. O Capítulo II apresenta as etapas e os resultados do desenvolvimento e validação do método para quantificação de FAEEs no mecônio. O Capítulo III é referente à aplicação do método em amostras coletadas e à avaliação da eficácia do método analítico em relação ao emprego de questionários e entrevista materna.

**CAPÍTULO I: REVISÃO**  
**BIBLIOGRÁFICA**

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de álcool por gestantes é um fato presente no cenário mundial. Muitas vezes, esse consumo passa despercebido por profissionais da saúde ou, quando questionado, pode ser negado por elas. As consequências dessa exposição fetal ao álcool são inúmeras e, se a identificação de crianças expostas fosse realizada precocemente, as intervenções no âmbito médico e educacional seriam mais eficazes e preveniriam o surgimento de complicações do não acompanhamento.

Nesse contexto, a determinação de biomarcadores do álcool no mecônio dos recém-nascidos para avaliação da exposição fetal ao álcool pode ser uma potencial ferramenta para auxiliar a identificação dessas crianças expostas, principalmente quando o histórico de consumo materno de álcool não está disponível.

Na literatura, apesar de existirem trabalhos sobre desenvolvimento e aplicação de métodos das análises dos FAEEs em mecônio, poucos avaliam a eficácia de tal método. No Brasil, por exemplo, há apenas um trabalho publicado sobre o desenvolvimento e aplicação do método de análise de FAEEs no mecônio (ROEHSIG et al., 2010). Porém, ele não avalia a eficácia do método analítico e não determina um limite de concentração dos FAEEs acima do qual pode ser considerado positivo para a exposição fetal ao álcool.

Assim esse trabalho sugere um método de determinação de biomarcadores do álcool no mecônio para avaliação da exposição fetal ao álcool e avalia a eficácia do método em relação ao uso de questionários validados e relatos maternos referentes ao uso de álcool na gestação.

### 1.1 Prevalência do consumo de álcool por mulheres

O consumo de álcool em mulheres é um hábito presente nos cinco continentes. No relatório da Organização Mundial da Saúde publicado em 2014, a prevalência mundial do consumo de álcool por mulheres (com 15 ou mais anos de idade) é de 28,9%, sendo que dessas 5,7% apresentaram pelo menos um episódio de consumo abusivo denominado de *binge* (consumo de 60 ou mais gramas de álcool puro em uma única ocasião) nos últimos 30 dias. Os dois continentes que

detém a maior prevalência de consumo entre as mulheres são o Europeu (59,9%) seguido do Americano (52,8%) (WHO, 2014a).

No Brasil a prevalência de álcool entre as mulheres é alta e crescente. Ao comparar os dados de prevalência em dois levantamentos nacionais domiciliares em 2001 e 2005, o uso de álcool na vida entre indivíduos do sexo feminino com mais de 12 anos de idade aumentou de 60,6% para 68,3%, e de dependentes de 5,7% para 6,9%. Sendo que a maior prevalência é encontrada na faixa etária dos 18 aos 34 anos (CARLINI et al., 2006).

Entre os anos de 2006 e 2012, não houve um aumento significativo da prevalência de consumo de álcool entre mulheres, no entanto houve um aumento da quantidade e frequência consumida entre as não abstinências. O uso tipo *binge* (definido, no estudo, pelo consumo de 4 ou mais doses em uma ocasião), por exemplo, aumentou de 36% para 49% das mulheres que declararam não abstinências (LARANJEIRA et al., 2014).

Assim, a grande prevalência do consumo de álcool por mulheres em idade reprodutiva, aliado à gravidez não planejada expõe a gestante a um elevado risco de se alcoolizar em algum momento da gestação, principalmente no início do período gestacional em que a maioria delas ainda não tomou ciência do fato (FABBRI, FURTADO, LAPREGA, 2007). Um estudo brasileiro realizado em uma maternidade pública da cidade de São Paulo, entrevistou 445 puérperas e encontrou que 33,7% delas relataram o consumo de álcool durante a gestação, sendo que 17,8% relataram ter consumido durante toda a gravidez e 15,9% até a confirmação da mesma que ocorreu em média com 9,6 semanas (KAUP, MERIGHI, TSUNECHIRO, 2001)

Outros estudos brasileiros utilizaram instrumentos de rastreamento validados para identificar prevalência do consumo de álcool de risco na gestação e encontraram uma prevalência de 21,9% na cidade do Rio de Janeiro (MORAES, REICHENHEIM, 2007), 31,11% na cidade de São Paulo (MESQUITA, SEGRE, 2009) e 22,1% na cidade de Ribeirão Preto (FABBRI, FURTADO, LAPREGA, 2007)

Ao comparar a prevalência do consumo de álcool entre homens e mulheres, estas apresentam menor prevalência (WHO, 2014a), porém a maior vulnerabilidade do grupo feminino torna esse consumo relevante.

Essa vulnerabilidade pode ser explicada por a mulher apresentar, geralmente, menor peso corporal, menor capacidade de metabolizar o álcool e maior proporção de gordura corporal em relação ao homem. Juntos, esses fatores contribuem com uma maior concentração de álcool no sangue quando comparada com a concentração nos homens para uma mesma quantidade de álcool ingerida (WILSNACK et al., 2014).

Além disso, essa vulnerabilidade se torna mais relevante para o grupo de mulheres gestantes, onde a mãe e o feto podem sofrer consequências severas do consumo de álcool nesse período.

## **1.2 Efeitos da exposição fetal ao álcool**

O álcool presente nas bebidas alcoólicas é denominado de etanol que, quando ingerido pela gestante, é absorvido no trato gastrointestinal, chega a circulação sanguínea, atravessa a placenta por difusão passiva e faz com que o feto fique exposto às mesmas concentrações do sangue materno. Porém, a exposição fetal é maior, devido a sua menor massa corporal e ao metabolismo e eliminação serem mais lentos, fazendo com que o líquido amniótico permaneça impregnado de etanol e acetaldeído, um metabólito tóxico do etanol (CHAUDHURI, 2000; CAVALLI, BARALDI, CUNHA, 2006).

O álcool produz alterações no desenvolvimento fetal, por diversos mecanismos, que podem estar relacionados com a ação direta do álcool sobre os tecidos fetais, principalmente sobre o sistema nervoso central. Alguns exemplos desses mecanismos são: morte celular (por apoptose e necrose); estresse oxidativo; danos à mitocôndria; interferência da atividade dos fatores de crescimento que regulam a proliferação e sobrevivência de células cerebrais; alteração da migração neuronal por afetar as células gliais; interferência na atividade dos neurotransmissores glutamato e serotonina; interferência na regulação de genes que controlam o desenvolvimento cerebral. Além disso, o álcool apresenta ação indireta por interferir com o suporte materno sobre o desenvolvimento fetal, diminuindo o transporte placentário de aminoácidos, glicose e oxigênio (GOODLETT, HORN, 2001).

Em 1973, Jones et al. identificaram um padrão de alterações no crescimento e na morfogênese em oito crianças cujas mães eram alcoolistas crônicas durante a gestação. Todas essas crianças apresentavam um padrão de alterações craniofaciais, de membros, defeitos cardiovasculares, deficiência no crescimento e atraso no desenvolvimento. Esses autores nomearam esse quadro clínico de Síndrome Fetal do Álcool (do inglês *Fetal Alcohol Syndrome*- FAS) que representa o efeito clínico mais grave ocasionado pelo uso do álcool durante a gestação. Ela pode ser manifestada na forma completa, quando todos os sinais estão presentes, ou na forma parcial.

Além das duas formas de manifestação da síndrome fetal do álcool, há outros efeitos ocasionados pelo uso de álcool durante a gestação que são: defeitos congênitos relacionados ao álcool (*alcohol-related birth defects*- ARBD) e transtornos de neurodesenvolvimento relacionadas ao álcool (*alcohol-related neurodevelopmental disorders* – ARND). O termo ARBD descreve alterações físicas decorrentes da exposição pré-natal ao álcool incluindo malformações cardíacas, ósseas, renais, das orelhas e dos olhos; enquanto o termo ARND descreve alterações funcionais ou cognitivas como dificuldades de aprendizado escolar, controle dos impulsos, memória, atenção e/ou de discernimento (MESQUITA, SEGRE, 2009).

Há um termo geral utilizado para descrever o grupo de todos os efeitos ocasionados pelo uso de álcool na gestação denominado: transtornos do espectro alcoólico fetal (do inglês *Fetal Alcohol Spectrum Disorders*-FASD). (MESQUITA, SEGRE, 2009).

Tendo em vista as várias repercussões diretas para o feto, o consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação tem sido amplamente estudado pela comunidade científica (WHO, 2014b). Porém, ainda não foram estabelecidos níveis seguros para seu consumo durante o período gestacional. Assim, o Ministério da Saúde orienta a suspensão do uso de álcool na gestação (BRASIL, 2006).

### **1.3 Detecção da exposição fetal ao álcool**

A identificação da exposição fetal ao álcool pode ser realizada através do relato materno por meio de entrevistas diagnósticas estruturadas ou questionários

(instrumentos de rastreamento) e pela análise toxicológica de biomarcadores do álcool em diferentes matrizes.

As entrevistas diagnósticas estruturadas consomem muito tempo durante o atendimento pré-natal ou mesmo no pré-parto. São necessários profissionais qualificados para sua aplicação, além de não serem adequadas para avaliação do consumo de risco. Por outro lado, os instrumentos de rastreamento, geralmente, são mais sensíveis e de fácil aplicação para identificação de casos suspeitos (FABBRI, FURTADO, LAPREGA, 2007).

O AUDIT (*Alcohol Use Disorder Identification Test*) é um instrumento de rastreamento preconizado pela Organização Mundial da Saúde para rastreamento em serviços de saúde, principalmente em serviços de atenção primária. É composto por dez questões e, de acordo com a pontuação obtida, classifica o usuário em categorias de padrões de consumo de álcool. Para a população em geral as categorias são: uso de baixo risco (0 a 7 pontos), uso de risco (8 a 15 pontos), uso nocivo (16 a 19 pontos) e provável dependência (20 a 40 pontos) e, geralmente, para população em geral, adota-se 8 como ponto de corte para o uso alcoólico de risco (BABOR et al. 2001; MORETTI-PIRES, CORRADI-WEBSTER; 2011). Para gestantes, por ser recomendado abstinência do uso de bebidas alcoólicas durante a gestação, alguns estudos adotaram o ponto de corte para uso de risco como sendo maior ou igual a um (SILVA et al., 2010).

Outro instrumento de rastreamento de uso de álcool é o T-ACE (acrônimo das palavras inglesas: *Tolerance, Cut-down, Annoyed, Eye-opener*), um questionário padronizado desenvolvido por Sokol, Martier e Ager (1989) para a rotina e prática dos serviços de ginecologia e obstetrícia com a finalidade de detectar gestantes com consumo alcoólico de risco. Ele é composto por quatro questões: a primeira levanta informações sobre a tolerância (*Tolerance – T*); a segunda investiga a existência de aborrecimento com relação às críticas de familiares e terceiros sobre o modo de beber da gestante (*Annoyed – A*); a terceira avalia a percepção da necessidade de redução do consumo (*Cut Down – C*); e a quarta informa sobre a persistência do consumo e dependência, por meio de forte desejo e compulsão para beber durante a manhã (*Eye-opener – E*). Cada uma das quatro questões possui uma pontuação que varia de zero a dois pontos para a primeira questão, e de zero a um ponto da segunda à quarta questão e, de acordo com a pontuação total obtida, a gestante é



identificada como negativa (zero ou um ponto) ou positiva para o consumo alcoólico de risco (dois a cinco pontos) (FABBRI, FURTADO, LAPREGA, 2007).

Apesar da existência de questionários e instrumentos de rastreamento, existem dificuldades na identificação do consumo de álcool em gestantes. A confirmação de seu uso na gestação é subdiagnosticada em virtude do constrangimento social da mulher em informá-lo e pela falta de recursos humanos hábeis para investigar e intervir adequadamente no quadro (NOBILE et al., 1984; LISANSKY-GOMBERG, 1993; FURTADO, FABBRI, 1999).

Devido às dificuldades encontradas na identificação da exposição fetal ao álcool pelo relato materno, a determinação de biomarcadores pelas análises toxicológicas torna-se relevante para esse fim. Assim, essas crianças poderiam ser identificadas precocemente e encaminhadas a serviços sociais com ações específicas, como, por exemplo, intervenções no plano educacional, sem contar que as intervenções médicas e psicossociais poderiam ser mais eficazes devido à identificação precoce. Além disso, permitiria uma melhor avaliação dos efeitos dessa substância e facilitaria o reconhecimento das mulheres em risco de uso de álcool durante sua próxima gestação (HUESTIS, CONE, 1998).

#### **1.4 Mecônio como matriz biológica**

O mecônio constitui-se nas primeiras excreções intestinais eliminadas pela criança dentro de 72 horas após o nascimento. Ele consiste em 60 a 80% de água, e é formado pela eliminação do epitélio mucoso, bile, cabelo e por células epiteliais deglutidas com o líquido amniótico pelo feto. (GARERI, KLEIN, KOREN, 2006) Apresenta uma textura viscosa e coloração verde escura, (ver Figura 01). É acumulado no intestino do feto a partir da 12<sup>a</sup>-16<sup>a</sup> semana gestacional (quando o líquido amniótico começa a ser deglutido pelo feto) até o nascimento, o que favorece um amplo período de detecção da exposição ao álcool (BAKDASH et al., 2010; KOREN, HUTSON, GARERI, 2008).



Figura 1 - Amostra de mecônio coletado neste estudo

As análises toxicológicas em mecônio de recém-nascidos são de especial interesse na avaliação da exposição fetal a substâncias psicoativas. A matriz mecônio apresenta como vantagens a facilidade da coleta e o amplo histórico do metabolismo pré-natal quando comparado com outras matrizes. O sangue e a urina, por exemplo, apresentam menor período de detecção gestacional da exposição fetal ao álcool. Além disso, a coleta de sangue é um método invasivo. As unhas e os cabelos, por exemplo, nem sempre estão em quantidades suficientes para os testes (GARERI, KLEIN, KOREN, 2006; RISTIMAA et al., 2010).

Assim, alguns estudos têm proposto a utilização do mecônio como matriz biológica para avaliação da exposição fetal a drogas lícitas e não lícitas (GARERI, KLEIN, KOREN, 2006). E o alvo dessas análises são os biomarcadores de exposição, representados pela própria substância exposta ou seus metabólitos.

### 1.5 Biomarcadores FAEEs em mecônio

A detecção de altas concentrações de substâncias específicas em mecônio, como os biomarcadores denominados ésteres etílicos de ácidos graxos (no inglês *fatty acid ethyl esters* - FAEEs), tem sido proposta como indicativo da exposição fetal ao álcool desde 1999 por KLEIN et al.

Alguns estudos determinaram a prevalência da exposição fetal ao álcool pela análise de FAEEs em mecônio, a qual mostrou-se ser maior quando comparada com a prevalência determinada pelo histórico do uso de álcool. Gareri et al. (2008)

realizou um estudo de prevalência em uma região de Ontário, no Canadá, e encontrou uma prevalência de exposição cinco vezes maior utilizando análises de FAEEs (2,5%) quando comparada com a prevalência pelo questionário (0,5%). Manich et al. (2011) analisou 62 amostras de mecônio de recém-nascidos de uma unidade neonatal em Barcelona cujas mães negaram o uso de álcool mediante aplicação de um questionário estruturado no final da gestação ou nos dias imediatamente após o parto. Como resultado, 10 dos 62 mecônios analisados foram positivos para análise dos FAEEs.

Além da detecção da exposição fetal ao álcool, as análises de FAEEs no mecônio podem servir também como uma ferramenta universal de rastreamento para detecção de recém-nascidos com risco para transtornos do espectro alcoólico fetal. Zelner et al. (2012c) identificou uma criança com altas concentrações de FAEEs no mecônio (52 nmol/g) que apresentou atraso nas habilidades motoras e de linguagens, abaixo das expectativas para idade de 14 meses. Peterson et al. (2008) encontrou uma associação entre aumento nas concentrações dos FAEEs e deficiências no desenvolvimento mental e psicomotor em crianças com dois anos de idade. Min et al. (2015) encontrou uma associação inversa entre concentrações altas de FAEEs no mecônio e baixo desenvolvimento cognitivo durante a infância e adolescência.

Os FAEEs são metabólitos não oxidativos do álcool (etanol) e são provenientes da esterificação do etanol com ácidos graxos livres presentes no sangue e na maioria dos tecidos. Os FAEEs presentes no sangue materno não atravessam a placenta e, portanto, não chegam ao feto. Assim, os FAEEs encontrados no mecônio são provenientes da esterificação do etanol que atravessou a placenta, representando a real exposição fetal ao álcool (BAKDASH et al., 2010; CHAN et al., 2004a; HUTSON et al., 2010).

Os metabólitos FAEEs mais comumente encontrados em humanos são laurato de etila (E12:0), miristato de etila (E14:0), palmitato de etila (E16:0), palmitoleato de etila (E16:1), estearato de etila (E18:0), oleato de etila (E18:1), linoleato de etila (E18:2), linoleneato de etila (E18:3), araquidonato de etila (E20:4) e docosahexanoato de etila (E22:6) (BAKDASH et al., 2010). Essa nomenclatura diz respeito ao nome trivial desses compostos que remete a fonte de origem dos seus ácidos carboxílicos (por exemplo: o palmitato de etila, é derivado do ácido palmítico

que vem do latim *palma*, que significa palmeira, tendo esse vegetal como fonte de origem). A designação abreviada, por exemplo E12:0, é representada pela letra “E” e dois números separados por dois pontos. A letra “E” representa a abreviação do radical etila, proveniente da molécula do etanol, enquanto que o primeiro número especifica o número de carbonos da cadeia proveniente do ácido carboxílico e o número após os dois pontos representa o número de ligações duplas dessa cadeia de carbonos. Assim o E16:0 representa um éster etílico com 16 carbonos na cadeia principal e não apresenta duplas ligações, enquanto o E18:3 representa um éster etílico com 18 carbonos na cadeia principal e três ligações duplas (NELSON, COX, 2011).

Alguns FAEEs são encontrados com maior frequência em mecônios de recém-nascidos expostos ao álcool durante a gestação. Bearer et al. (2003) verificou a presença de E18:2, E16:0 e E18:1 em amostras de mecônio de recém-nascidos cujas mães reportaram um consumo pesado de álcool, e a frequência encontrada desses biomarcadores nas amostras foram de 100%, 96% e 93%, respectivamente. Esses três biomarcadores foram os três mais frequentemente detectados em outros estudos (MOORE et al., 2003; CHAN et al., 2004b; BAKDASH et al., 2010)

Com relação aos FAEEs mais abundantes em mecônios positivos para exposição fetal ao álcool, o E18:2 e o E18:1 foram os FAEEs que apresentaram maiores concentrações (BEARER et al., 1999; MOORE et al. 2003; CHAN et al., 2004b; GOH et al., 2010; ZELNER et al., 2012c).

A relação entre as concentrações de cada FAEEs varia muito de indivíduo para indivíduo (BAKDASH et al., 2010; HASTED et al., 2012; CHAN et al., 2004b) e a causa dessa variabilidade interindivíduos é desconhecida, mas parece estar relacionada com diferenças na concentração endógena de ácidos graxos, diferenças na dieta materna, diferenças na cinética de síntese dos FAEEs e variabilidade na concentração de etanol nesses sítios de síntese (BRIEN et al., 2006). Assim, a determinação para vários FAEEs e o uso da somatória de suas concentrações para interpretação dos casos positivos (CHAN et al., 2003, 2004b; MOORE, LEWIS, 2001; MOORE et al., 2003) provou ser mais eficiente do que o uso de um único éster, tal como o E18:1 (BEARER et al., 2003) ou E18:2 (BEARER et al., 1999; OSTREA et al., 2006).

Os FAEEs de menor cadeia carbônica, como o E12:0 e o E14:0, foram frequentemente detectados em baixas concentrações em mecônio de recém-nascidos de mães que negaram o uso de álcool e, portanto, foram excluídos da somatória dos FAEEs para interpretação dos casos expostos em alguns trabalhos (CHAN et al., 2003; 2004b; MOORE et al., 2003). As baixas concentrações de FAEEs podem ser provenientes da ingestão de alimentos e medicamentos que contém traços de álcool em sua composição ou da formação de etanol endógeno. Chan et al. (2003) discute a formação de etanol endógeno que pode ser proveniente da fermentação anaeróbica de carboidratos via microflora intestinal, de infecções por leveduras (por exemplo *Cândida*) e bactérias fermentadoras anaeróbicas e de condições patológicas como diabetes, hepatite e cirrose. Porém, ainda não se sabe o porquê esses FAEEs de cadeias carbônicas menores são preferencialmente acumulados no mecônio quando os neonatos são expostos a baixas concentrações de álcool.

Já os FAEEs de maior cadeia carbônica, E16:0, E18:0, E18:1, E18:2, parecem ser os ésteres mais informativos para exposição fetal ao álcool. Assim, Chan et al. (2003) propôs a somatória de E16:0, E18:0, E18:1, E18:2 com ponto de corte de 2nmol/g (600 ng/g), e obteve uma sensibilidade do teste de 98,4% e especificidade de 100%. Outros estudos utilizaram a somatória desses quatro FAEEs para determinação da exposição fetal ao álcool (CHAN et al., 2003; HUTSON et al., 2009; BAKDASH et al., 2010; MOLLER et al., 2010; GOH et al., 2010; ZELNER et al., 2010; HUTSON et al., 2011; ZELNER et al., 2012a; ZELNER et al., 2012b; ZELNER et al., 2012c; BRYANTON et al., 2014). Então, E16:0, E18:0, E18:1, E18:2 foram os quatro FAEEs escolhidos neste estudo para a determinação da exposição fetal ao álcool. A Figura 2 ilustra a estrutura química dos quatro FAEEs e do padrão interno heptadecanoato de metila utilizados neste estudo.

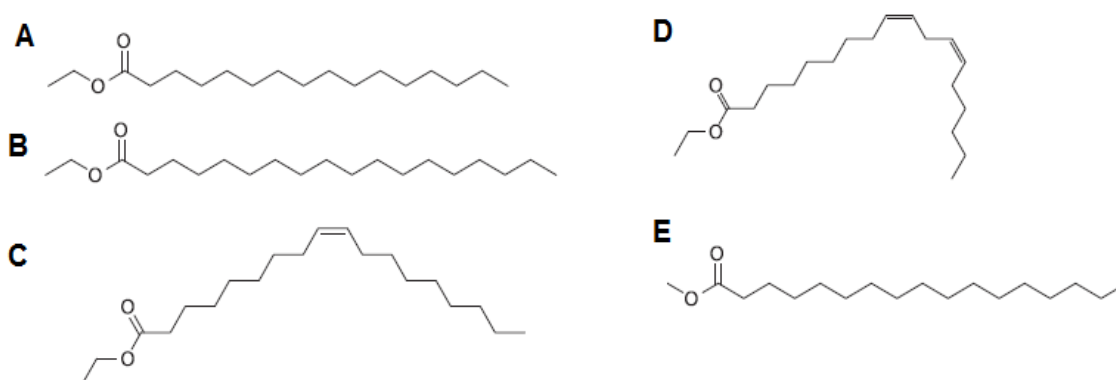


Figura 2 - Estrutura química dos analitos em estudo: (A) Palmitato de etila –E16; (B) Estearato de etila – E18; (C) Oleato de etila – E18:1; (D) Linoleato de etila – E18:2; (E) Heptadecanoato de metila – M17. (Figura adaptada de ROEHSIG et al., 2010).

O ponto de corte de 600 ng/g para a somatória das concentrações dos FAEEs, proposto por Chan et al. (2003) e utilizado em vários estudos, é utilizado para identificar os casos de recém-nascidos expostos ao consumo “pesado” de álcool durante a gestação. Esse ponto de corte não é capaz de distinguir os recém-nascidos provenientes de mães abstinentes e de mães que apresentaram um consumo leve ou moderado, que também podem ter um desfecho prejudicial para a criança (CHAN et al., 2004a). Assim, mais estudos são necessários para estabelecer um ponto de corte com maior sensibilidade para identificar qualquer recém-nascido exposto ao álcool durante a gestação.

As concentrações dos FAEEs parecem estar relacionadas com diferentes padrões de consumo (uso leve, moderado e pesado e episódios de *binge*) tempo e duração de exposição (primeiro, segundo e terceiro trimestre, durante toda gestação) extensão da exposição (número de doses consumidas por ocasião) (CHAN et al., 2004a). As melhores correlações entre as concentrações dos FAEEs no mecônio e o relato materno de consumo de álcool foram encontradas ao utilizar a quantidade de álcool consumido por ocasião (BEARER et al., 2003).

Porém, não há na literatura um valor limite de quantidade de álcool ingerido que produza resultados positivos de FAEEs no mecônio e o consumo de uma mesma quantidade de álcool por diferentes indivíduos pode resultar em diferentes concentrações dos FAEEs no mecônio. Essa variabilidade entre indivíduos pode ser atribuída a diversos fatores que podem afetar a produção de FAEEs como

mencionado anteriormente (concentração endógena de ácidos graxos, diferenças na dieta materna, diferenças na cinética de síntese dos FAEEs e diferentes concentrações de etanol nesses sítios de síntese) (BRIEN et al., 2006). Assim, a determinação de valores de referência para uma população específica contribui com interpretações mais fidedignas.

**CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO**  
**E VALIDAÇÃO DO MÉTODO**  
**ANALÍTICO**



## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação da exposição fetal ao álcool é de grande relevância para identificar os recém-nascidos potencialmente expostos e encaminhá-los a serviços especializados para que as intervenções sejam realizadas. Nesse contexto, a determinação dos biomarcadores FAEEs no mecônio tem sido proposta em muitos estudos como método de avaliação dessa exposição.

Neste estudo, um método de determinação de FAEEs no mecônio foi desenvolvido a partir de métodos descritos na literatura, uma vez que o objetivo desse trabalho não é desenvolver um método analítico inovador, mais sim um método simples que possa ser utilizado na prática clínica. Para determinar o método a ser utilizado, foi realizada uma revisão bibliográfica de trabalhos que empregaram análise de FAEEs no mecônio. Na Tabela 1, estão descritos o levantamento realizado no banco de dados do PubMed com os descritores “*meconium*” e “*fatty acid ethyl ester*”.

A análise dos FAEEs em mecônio consiste na identificação e quantificação dos biomarcadores presentes no mecônio. Para isso, é necessário que a matriz mecônio passe, primeiramente, por uma etapa denominada de preparo de amostra, a fim de isolar os analitos de interesse (FAEEs) dos interferentes da matriz biológica.

O principal método de preparo de amostra empregado em estudos que determinaram de FAEEs em mecônio é baseado no método de preparo dos FAEEs em soro descrito por Bernhardt et al. (1996), que consiste na utilização de dois procedimentos de extração: extração líquido-líquido (LLE – *Liquid-Liquid Extraction*) utilizando hexano, seguida de extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) com cartuchos de aminopropilsilica. Na LLE os FAEEs presentes no mecônio, por serem compostos apolares, são extraídos pelo hexano por mecanismo de partição e submetidos a etapa de limpeza do extrato (*clean up*) por SPE. Ao utilizar cartuchos de extração aminopropilsilica, os interferentes, como monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, ácidos graxos livres e fosfolípidos, ficam retidos na fase estacionária e os FAEEs são eluídos juntamente com o solvente apolar (hexano) (KALUZNY et al., 1985).

Tabela 1– Estudos que determinaram FAEEs em mecônio, segundo um levantamento no PubMed atualizado em Dezembro de 2015

Autor	Método de análise	Método de extração	FAEEs analisados	Ponto de corte	Padrão interno	Meconio (mg)
1. JOYA et al., 2015	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	–	500
2. MEEYOUNG et al., 2015	GC-FID	LLE seguido de SPE	E14, E16, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	–	–	–
3. HIMES et al., 2015	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	–	100
4. CABARCOS, 2014	GC-MS	MAE	E14, E16, E18	600ng/g	D5-FAEEs	500
5 BRYANTON, 2014	GC-MS	LLE e HS-SPME	E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	500
6. GOECKE, 2014	GC-MS	HS-SPME	E14, E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	50
7. KWAK, 2014	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2; 10; 20nmol/g	E17	500
8. PICHINI, 2014	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	–
9. HIMES, 2014	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	–	D5-FAEEs	100
10. MCGLONE, 20013	LC-MS/MS e GC-MS	LLE seguido de SPE	-	10000 ng/g	–	–
11. MORINI, 2013	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	1000
12. HASTEDT, 2012	GC-MS	LLE e HS-SPME	E14, E16, E18:1, E18, E18:2, E18,3	0,5 ng/mg	D5-FAEEs	50
13. CABARCOS, 2012	GC-MS	MAE	E14, E16, E18	600ng/g	D5-FAEEs	500
14. ZELNER, 2012 a	GC-MS	LLE e HS-SPME	E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	50
15. ZELNER, 2012 b	GC-MS	LLE e HS-SPME	E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	50
16. ZELNER, 2012 c	GC-MS	HS-SPME	E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	50
17. PICHINI, 2011	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2 nmol/g	E17	1000
18. MANICH, 2011	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	1000
19. HUTSON, 2011	GC-MS	LLE e HS-SPME	E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	500
20. KWAK, 2010	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	-	E17	500
21. GOH , 2010	GC-MS	HS-SPME	E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	50

LC-MS/MS= cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; GC-FID= cromatografia gasosa acoplado ao detector de ionização de chamás; GC-MS= cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; LLE= extração líquido-líquido, SPE= extração em fase sólida; MAE= extração por microondas; HS-SPME= microextração em fase sólida por *headspace*, E12= laurato de etila; E14= miristato de etila; E16= palmitato de etila; E16:1palmitoleato de etila; E17= heptadecanoato de etila; E18= estearato de etila; E18:1= oleto de etila, E18:2= linoleato de etila; E18:3 linolenato de etila; E20:4= araquidonato de etila; D5-FAEEs= ésteres etílicos de ácidos graxos pentadeuterados.

Continua na próxima página...

Continuação da Tabela 1

Autor	Método de análise	Método de extração	FAEEs analisados	Ponto de corte	Padrão interno	Meconio (mg)
22. ROEHSIG, 2010	GC-MS	HS-SPME	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E20:4	600 ng/g	D5-FAEEs	100
23. ZELNER, 2010	GC-MS	HS-SPME	E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	50
24. HUTSON, 2010	GC-FID e GC-MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	500
25. MOLLER, 2010	GC-MS	HS-SPME	E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	50
26. MORINI, 2010 a	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	1000
27. BAKDASH, 2010	GC-MS	HS-SPME	E14, E16, E18, E18:1, E18:2	500 ng/g	D5-FAEEs	50
28. MORINI, 2010 b	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	1000
29. PICHINI, 2009	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	1000
30. HUTSON, 2009	GC-MS	HS-SPME	E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	D5-FAEEs	50
31. PICHINI, 2008	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	1000
32. PETERSON, 2008	GC-FID	LLE seguido de SPE	E14, E16, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	-	E17	1000
33. GARCIA-ALGAR, 2008	LC-MS/MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	1000
34. GARERI, 2008	GC-FID e GC-MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1 E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	500-1000
35. OSTREA, 2006	GC-MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	-	E17	500
36. BEARER, 2005	GC-FID e GC-MS	LLE seguido de SPE	E14, E16, E16:1, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	-	E17	1000
37. CHAN, 2004	GC-FID e GC-MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	2nmol/g	E17	500
38. BEARER, 2003	GC-FID e GC-MS/MS	-	E16, E18:1, E18:2	-	-	-
39. DERAUF, 2003	GC-MS	-	-	50 ng/g	-	1000
40. CHAN, 2003	GC-FID	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E18, E18:1, E18:2	2nmol/g	E17	500
41. MOORE, 2003	GC-MS	LLE seguido de SPE	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E20:4	50ng/g	E17	500-1000
42. KLEIN, 1999	GC-FID	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:2	-	E17	-
43. BEARER, 1999	GC-FID e GC-MS	LLE seguido de SPE	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	-	E17	1000

LC-MS/MS= cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; GC-FID= cromatografia gasosa acoplado ao detector de ionização de chamas; GC-MS= cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; LLE= extração líquido-líquido, SPE= extração em fase sólida; MAE= extração por microondas; HS-SPME= microextração em fase sólida por *headspace*, E12= laurato de etila; E14= miristato de etila; E16= palmitato de etila; E16:1palmitoleato de etila; E17= heptadecanoato de etila; E18= estearato de etila; E18:1= oleto de etila, E18:2= linoleato de etila; E18:3 linolenato de etila; E20:4= araquidonato de etila; D5-FAEEs= ésteres etílicos de ácidos graxos pentadeuterados.

Após o preparo da amostra, os FAEEs podem ser separados entre si, identificados e quantificados. A técnica mais empregada para esses fins é a Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (GC-MS – do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Na cromatografia em fase gasosa a amostra processada é vaporizada e introduzida dentro da coluna cromatográfica, por meio de um gás de arraste denominado de fase móvel. Ao passar pela coluna cromatográfica, que contém fase estacionária, os analitos separam-se de acordo com sua volatilidade e afinidade pela fase estacionária, saindo da coluna em diferentes tempos (tempo de retenção). Em seguida, os analitos chegam ao espectrômetro de massas, no qual a molécula é ionizada e fragmentada. Os fragmentos gerados são analisados pela razão de sua massa e carga ( $m/z$ ). Cada analito gera um padrão de fragmentação único, o qual é registrado em um espectro (identidade da molécula) através da abundância de cada fragmento gerado. Além do espectro, o analisador de massa gera um cromatograma, o qual consiste no registro da intensidade do sinal gerado pelos íons em relação ao tempo. Essa informação é registrada na forma de picos cuja área é proporcional a quantidade de analito na amostra (McNAIR & MILLER; 1997).

Assim o método analítico desenvolvido consistiu na utilização de extração-líquido-líquido, seguida de extração em fase sólida com separação e quantificação por cromatografia em fase gasosa acoplado ao detector de massas.

Depois de desenvolvido o método analítico, este deve ser validado a fim de demonstrar que seus resultados são confiáveis e reprodutíveis. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é um órgão regulador que estabelece os requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos. A resolução que encontra-se em vigor é a RDC N°27 de 17 de maio de 2012, sendo a resolução seguida para validação do método desenvolvido neste trabalho. Os ensaios exigidos nessa resolução são: precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade, os quais foram definidos na Tabela 2.

Tabela 2- Parâmetros da validação de métodos bioanalíticos de acordo com a Resolução nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Parâmetros	Definição	Crítérios para aprovação
<b>1. Seletividade</b>	É capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e o padrão interno na presença de outros componentes que podem estar presentes em uma amostra real	As respostas de picos interferentes devem ser: - inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do limite inferior de quantificação - inferiores a 5 % da resposta do padrão interno
<b>2. Efeito residual (carryover)</b>	É o efeito produzido pela contaminação proveniente de amostras analisadas previamente gerando o aparecimento ou aumento do sinal dos analitos ou do padrão interno	Idem 1.
<b>3. Efeito matriz</b>	É o efeito gerado por componentes da matriz biológica na resposta do analito ou do padrão interno	O Coeficiente de variação dos Fatores de matriz normalizados pelo padrão interno relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%.
<b>4. Curva de calibração</b>	Através da curva de calibração pode-se avaliar a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida dos analitos na amostra	Os padrões de calibração devem apresentar: - desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para os padrões do limite inferior de quantificação; - desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração. A curva de calibração deve apresentar: - no mínimo 75% dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores; - no mínimo 6 padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o limite inferior e superior de quantificação aprovados conforme os critérios anteriores.
<b>5. Precisão</b>	Avalia a proximidade dos resultados obtidos pela repetição de ensaios de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz	O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação deve ser menor ou igual a 15%; Para o limite inferior de quantificação são admitidos valores menor ou igual a 20%.
<b>6. Exatidão</b>	Avalia o grau de conformidade entre o resultado obtido do ensaio e o valor de referência	O erro padrão relativo deve estar dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o limite inferior de quantificação, para o qual deve estar dentro da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal.
<b>7. Estabilidade do analito na matriz biológica</b>	Avalia a estabilidade do analito na matriz biológica, ou seja, verifica, sob condições específicas, se a concentração do analito permanece dentro de limites estabelecidos	A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.
<i>7.1 Estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento</i>	Avalia a estabilidade do analito em condições de congelamento e descongelamento que as amostras são submetidas	Idem 7.
<i>7.2 Estabilidade de curta duração</i>	Avalia a estabilidade do analito durante o processamento de todas as amostras em temperatura ambiente	Idem 7.
<i>7.3 Estabilidade de longa duração</i>	Avalia a estabilidade do analito durante o período e condições de armazenamento das amostras	Idem 7.
<i>7.4 Estabilidade pós-processamento</i>	Avalia a estabilidade do analito durante o tempo de análise das amostras	Idem 7.
<b>8. Estabilidade do analito e do padrão interno em solução</b>	Avalia a estabilidade do analito na solução primária e na solução de trabalho por um tempo superior ao período de uso e armazenamento	As soluções são consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Desenvolver e validar um método para quantificação de FAEEs em mecônio.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Coletar amostras de mecônio de recém-nascidos não expostos ao álcool durante a gestação para desenvolvimento do método;
- Determinar as condições do procedimento de preparo de amostra e da análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
- Validar o método de quantificação de FAEEs em mecônio segundo os critérios estabelecidos pela Resolução nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Participantes

No desenvolvimento do método analítico, foram necessárias amostras de mecônio de recém-nascidos não expostos ao álcool durante a gestação. Para isso, foram recrutados 30 pares de mãe/recém-nascido em atendimento hospitalar pós-parto, no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto que negaram consumo nos últimos 12 meses e que pontuaram zero no questionário de rastreamento T-ACE. Elas foram recrutadas de forma sequencial e por conveniência em até 24 horas após parto quando o recém-nascido não tivesse excretado o mecônio.

#### 3.2 Coleta de dados

Nesta etapa, a coleta de dados teve como objetivo principal auxiliar na identificação e recrutamento de mães abstinentes de álcool para obtenção dos mecônios dos seus recém-nascidos. Assim, foi aplicado apenas a seção I e V do questionário estruturado (APÊNDICE B), para coleta de informações gerais de identificação da participante (nome, data de nascimento, endereço e contato) e rastreamento pelo instrumento T-ACE.

##### 3.2.1 Instrumento T-ACE

O T-ACE (acrônimo das palavras inglesas: *Tolerance, Cut-down, Annoyed, Eye-opener*) consiste em um questionário breve de rastreamento para identificar gestantes com consumo de risco para desenvolvimento de problemas relacionados ao álcool no feto. Esse instrumento foi desenvolvido por Sokol, Martier e Ager (1989) a partir de outro instrumento de rastreamento CAGE (C = cut down, A = annoyed, G = guilt, E = eye opener) com a finalidade de aplicação na rotina e prática dos serviços de ginecologia e obstetrícia.

Ele é composto por quatro questões: a primeira levanta informações sobre a tolerância (*Tolerance – T*) ao questionar a quantidade necessária para se sentir desinibida ou mais “alegre”. A segunda questão investiga a existência de

aborrecimento com relação às críticas de familiares e terceiros sobre o modo de beber da gestante (*Annoyed – A*). A terceira avalia a percepção da necessidade de redução do consumo (*Cut Down – C*). A quarta informa sobre a persistência do consumo e dependência, avaliada por meio de forte desejo e compulsão para beber durante a manhã (*Eye-opener – E*). Cada uma das quatro questões possui uma pontuação que varia de zero a dois pontos para a primeira questão, e de zero a um ponto da segunda à quarta questão e, de acordo com a pontuação total obtida, a gestante é identificada com negativa (zero ou um ponto) ou positiva (dois a cinco pontos) para o consumo alcoólico de risco.

Esse questionário sofreu algumas adaptações e foi validado no Brasil, em 2001, para uma população de gestantes do sistema único de saúde de Ribeirão Preto-SP (FABBRI, FURTADO, LAPREGA, 2007). Nessa versão brasileira, as questões originais foram intercaladas com outras questões que tratam sobre comportamentos relacionados com alimentação e que não interferiram no resultado. O instrumento alcançou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 85,6% em relação aos critérios da CID-10 (Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde).

### **3.3 Coleta do mecônio**

As amostras de mecônio foram recolhidas pela pesquisadora em visitas às mães após o parto, no ambiente hospitalar, com intervalos a cada uma hora para acompanhamento do momento mais próximo de excreção do mecônio pelo bebê. Foi coletado somente o primeiro mecônio excretado dentro de um período de 24 horas após o parto, a fim de evitar a contaminação com as fezes de transição (composta por mecônio e fezes proveniente da amamentação). A razão de evitar essa contaminação é que as fezes de transição, além de não representarem o material acumulado durante a gestação, podem apresentar carboidratos e microorganismos capazes de fermentar a glicose, produzindo etanol. O etanol por sua vez pode conjugar com ácidos graxos, formando os FAEEs (ZELNER et al., 2012b)



Os mecônios foram colocados em frasco coletor universal sem conservantes e transportados até o laboratório onde ficaram armazenados a -20°C até o momento das análises.

### **3.4 Aspectos éticos**

A etapa referente ao rastreamento pelo instrumento T-ACE de gestação positiva e negativa para o consumo de risco de álcool durante a gestação fez parte do projeto temático denominado GESTA-INTERVBREV (Fatores associados à eficácia de um modelo de intervenções breves para redução do consumo de álcool na gestação), que teve sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - (ver ANEXO A). As etapas referentes às coletas e análises de mecônio foram encaminhadas como adendo ao mesmo comitê de ética em pesquisa que analisou e aprovou a solicitação do adendo - (ver ANEXO B).

### **3.5 Reagentes e soluções**

Os padrões certificados FAEEs (palmitato de etila, estearato de etila, oleato de etila e linoleato de etila) e o padrão interno heptadecanoato de metila foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

Os solventes utilizados foram: hexano, acetona, metanol e diclorometano adquiridos da JT Baker (EUA) e acetato de etila da Sigma-Aldrich (EUA). Todos os solventes utilizados foram de alto grau de pureza (grau HPLC).

#### **3.5.1 Preparo de soluções padrão**

Para todas as soluções de padrão e do padrão interno foram preparadas soluções estoque em hexano na concentração de 1 mg/mL para o palmitato de etila, estearato de etila e heptadecanoato de metila e na concentração de 10 mg/mL para o linoleato e oleato de etila. As soluções de concentração de 1 mg/mL foram preparadas dissolvendo 10 mg do conteúdo do padrão certificado puro em hexano em um balão volumétrico de 10 mL. Enquanto as soluções estoque de concentração

de 10 mg/mL foram preparadas diluindo 115 uL (100 mg) do conteúdo do padrão certificado puro em hexano em um balão volumétrico de 10mL.

A partir das soluções estoques, foram realizadas diluições sucessivas 1:10 em hexano a fim de obter as soluções de trabalho nas concentrações de 10 e 1 ug/mL.

As soluções estoques e de trabalho foram armazenadas em frascos de vidro com rosca, envoltos por papel alumínio e sob refrigeração a -20°C.

### **3.6 Equipamentos e acessórios**

As análises de FAEEs no mecônio foram realizadas utilizando o equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo CP 3800 acoplado a um espectrômetro de massas modelo Saturn 2000, ambos da Varian (EUA), equipados com um amostrador automático CombiPal da CTC Analytics (Suíça); coluna capilar de sílica fundida HP – 5MS (30 m de comprimento x 0,25 de mm de diâmetro x 0,25µm de espessura de filme) da Agilent; cilindro de gás hélio de grau analítico 5.0 da White Martins (Brasil); e seringa de injeção cromatográfica Hamilton (EUA).

Para preparo das amostras foram utilizados os cartuchos de extração em fase sólida da marca DISCOVERY DSC-NH2 da Supelco (EUA) de 500 mg da fase estacionária aminopropilsilica com capacidade para 3 mL, suporte para extração em fase sólida Visiprep SPE Vacuum Manifold da Supelco (EUA) acoplado a uma bomba vácuo TE-058 da Tecnal (Brasil), centrífuga universal 32 Hettich (Alemanha), concentrador de amostras Caliper LifeScience Turbo Vap LP (EUA), agitador TE – 140, Tecnal (Brasil), vórtex AP – 56 da Phoenix (Brasil), deionizador de água Simplicity da Millipore (EUA) e balança analítica BP211D da Sartorius (Alemanha).

### **3.7 Desenvolvimento do método**

Para realização dessa etapa e das demais etapas laboratoriais, contamos com a colaboração do Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-FFCLRP-USP, que disponibilizou o Laboratório de Análises Toxicológicas Forenses. Nesse laboratório são realizados estudos de desenvolvimentos de métodos analíticos para investigação de drogas de

abuso (lícitas e ilícitas) com enfoque na utilização de amostras biológicas não convencionais (como mecônio, cabelo, saliva, suor) e *postmortem* (sangue, humor vítreo), empregando métodos de extração e análise por cromatografia em fase gasosa.

### 3.7.1 Determinação das condições de análise por GC-MS

O desenvolvimento do método iniciou-se com a análise de soluções dos padrões FAEEs por GC-MS para estabelecer as condições dessa análise.

Inicialmente, foram utilizadas as condições descritas por Ostrea et al. (2006), as quais sofreram modificações na rampa de temperatura do forno para melhorar a separação entre os analitos. Na tabela 3 estão descritas as rampas de temperaturas de Ostrea et al. e a rampa final utilizado no estudo.

Tabela 3- Programação das rampas de temperaturas de Ostrea et al. e rampa final utilizada na análise cromatográfica.

Rampas	Temperatura	Taxa de aquecimento	Hold	Tempo
Ostrea et al.	100°C	-	-	-
	200°C	25°C/minuto	-	4 minutos
	300°C	5 °C/minuto	5 minutos	29 minutos
Rampa final	100°C	-	-	-
	175°C	25°C/minuto	-	3 minutos
	200°C	5°C/minuto	-	8 minutos
	215°C	2°C/minuto	-	15,50 minutos
	300°C	25 °C/minuto	2 minutos	20,90 minutos

*Hold*= tempo pelo qual a temperatura fica constante

### 3.7.2 Determinação das condições do preparo de amostra

Inicialmente, foram testadas duas extrações proposta por Moore et al. (2003) e Ostrea et al. (2006). Ambos os métodos empregavam extração em fase sólida em modo normal, com emprego de cartuchos com fase estacionária polar (aminopropilsílica) e eluição com solvente apolar (hexano ou hexano e diclorometano). Porém, foram testados, inicialmente, cartuchos de extração com fase estacionária de sílica (fase normal), por ser um cartucho com características próximas ao anterior e por estar disponível no laboratório. Assim, foram testados os métodos abaixo:

- Método de Moore et al. (2003) utilizando cartuchos de sílica: 500 mg de mecônio foram fortificados com 500 ng (1000ng/g) de cada padrão FAEEs e solubilizados por agitação em vórtex com 1 mL de água deionizada, em seguida com 5 mL de acetona. Depois, foram centrifugados a 2660 rpm (1125 x g) por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e submetidos à agitação com 5 mL de hexano em mesa agitadora por 30 minutos. A fração hexânica foi coletada e submetida à extração em fase sólida utilizando cartucho de sílica (Discovery DSC-Si). O cartucho foi pré-condicionado com 4 mL de hexano e eluídos com 3mL de hexano. O eluato foi evaporado e reconstituído com 60 µL de hexano e submetido análise por GC-MS.
- Método adaptado de Ostrea et al. (2006) utilizando cartuchos de sílica: 500 mg de mecônio foram fortificados com 500 ng (1000ng/g) de cada padrão, e solubilizados por agitação em vórtex com 3,5 mL de água deionizada. Em seguida, 3,5 mL de hexano foram adicionados e agitados em mesa agitadora por 30 minutos, centrifugados a 3170 rpm (1600 x g) por 30 minutos, e submetidos à refrigeração por 4 horas. A fração hexânica foi coletada e submetida a extração em fase sólida utilizando cartuchos de sílica (Discovery DSC-Si). O cartucho foi pré-condicionado com 4 mL de hexano e 4 mL de diclorometano. O cartucho foi eluído duas vezes com 4 mL de hexano e 4 mL de diclorometano. O eluato foi evaporado e reconstituído em 100 µL de hexano e submetido análise por GC-MS.

Além dos cartuchos de sílica utilizados nos experimentos acima, foram testados os cartuchos com fase estacionária mista, formada por grupamentos octil (8 carbonos) e grupamentos de ácido benzenosulfônicos empregados no modo reverso.

- Método de Moore et al. (2003) utilizando cartuchos com fase estacionária mista: 500 mg de mecônio foram fortificados com 500 ng (1000ng/g) de cada padrão FAEEs e solubilizados por agitação em vórtex com 1 mL de água deionizada, em seguida com 5 mL de acetona. Depois, foram centrifugados a 2660 rpm (1125 x g) por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e submetidos à agitação com 5 mL de hexano em mesa agitadora por 30 minutos. A fração hexânica foi coletada, evaporada e reconstituída em 500 µL de metanol e submetida à extração em fase sólida utilizando cartucho com

fase estacionária mista (Bond Elut Certify I). No condicionamento dos cartuchos foram utilizados 4 mL de metanol e, na lavagem, 2 mL de metanol, e para eluição 3 mL de hexano. O eluato foi evaporado e reconstituído com 60 µL de hexano e submetido análise por GC-MS.

Por fim, foram testados os cartuchos com fase estacionária de aminopropilsilica, empregados em fase normal utilizando o método de Moore et al (2003).

- Método de Moore et al. (2003) utilizando cartuchos com fase estacionária de aminopropilsilica: 500 mg de mecônio foram fortificados com 500 ng (1000ng/g) de cada padrão FAEEs e solubilizados por agitação em vórtex com 1 mL de água deionizada, em seguida com 5 mL de acetona. Depois, foram centrifugados a 2660 rpm (1125 x g) por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e submetidos a agitação com 5 mL de hexano em mesa agitadora por 30 minutos. A fração hexânica foi coletada e submetida à extração em fase sólida utilizando cartucho de aminopropilsilica (DISCOVERY DSC-NH<sub>2</sub>). O cartucho foi pré-condicionado com 4 mL de hexano e eluídos com 3mL de hexano. O eluato foi evaporado e reconstituído com 60 µL de hexano e submetido análise por GC-MS.

Após esse teste, foram realizadas algumas modificações no método de Moore et al. (2003) como redução do volume de solventes e do tempo de agitação, e inclusão de uma etapa de centrifugação antes da análise no CG-MS. O método final de preparo da amostra está descrito no item a seguir.

### **3.8 Método de análise dos FAEEs no mecônio**

O procedimento de extração dos FAEEs do mecônio baseou-se no método de extração de FAEEs do soro, proposto por Bernhardt et al. (1996) com adaptações para extração de FAEEs em mecônio descritas por Moore et al. (2003). A metodologia final, após as adequações necessárias, está descrita no próximo parágrafo.

Em um tubo de vidro cônico, 500 mg de mecônio foram pesados e 500 ng (1000ng/g) de padrão interno (heptadecanoato de metila) foram adicionados. O tubo foi agitado no vórtex para homogeneização dos analitos com o mecônio.

Posteriormente, foram adicionados 800 µL de água deionizada e o tubo foi agitado no vórtex, durante um minuto, para homogeneização do mecônio. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de acetona e agitado por 30 segundos no vórtex e então foram adicionados 3 mL de hexano e agitados a 200 rpm por 10 minutos na mesa de agitação e centrifugados a 2660 rpm (1125 x g) por 10 minutos. A fase hexânica foi coletada e submetida à extração em fase sólida utilizando cartuchos de aminopropilsilica (DISCOVERY DSC-NH<sub>2</sub>), acoplados a um *manifold* ligado a uma bomba de vácuo. Antes da adição da fase hexânica nos cartuchos, estes foram condicionados com 2 mL de hexano. Após adição da fase orgânica contendo os FAEEs e eluição a 1 mL por minuto, os FAEEs foram eluídos com 3 mL de hexano. O eluato obtido foi evaporado a 30°C no concentrador de amostras, ressuspenso em 100µL de hexano, agitado em vórtex por 30 segundos, centrifugado 2660 rpm (1125 x g) por 5 minutos e transferidos para o *vial*, para injeção no equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas.

Para separação, detecção e quantificação dos FAEEs por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foi utilizado o método proposto por Ostrea et al. (2006) com modificações. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida HP – 5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura de filme). O injetor foi operado a 250°C no modo *splitless* e o volume de injeção foi de 1 µL. Hélio foi utilizado como gás de arraste num fluxo constante de 1 mL por minuto. A programação da temperatura da coluna utilizada foi: temperatura inicial de 100°C, com aquecimento a 25°C/minuto até 175°C, seguida de aquecimento a 5°C/minuto até 200°C, seguida de aquecimento a 2°C/minuto até 215°C e por fim, aquecimento de 25°C/minuto até 300°C. A coluna foi mantida nessa mesma temperatura por 2 minutos. Totalizando 20,90 minutos de tempo de análise.

O espectrômetro de massas com analisador de massa *ion trap* foi utilizado no modo de operação *full scan*, com seleção de massas de 50 a 320 m/z. O modo de ionização utilizado foi por impacto de elétrons. A temperatura utilizada no *trap* foi de 200°C, no *transfer line* 230°C e no *manifold* 40°C.

### 3.9 Validação do método analítico

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, por meio de estudos experimentais e atendimento de requisitos específicos (ANVISA, 2012).

Para validação foram seguidos os critérios publicados na Resolução nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõem sobre os requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos (ANVISA, 2012). Os ensaios de validação realizados foram: seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão e estabilidade.

#### 3.11.1 Determinação e preparo dos controles de qualidades e dos limites de detecção e quantificação

Para realização dos ensaios de validação são necessários a determinação e o preparo dos controles de qualidades e dos limites de detecção e quantificação.

As amostras dos controles de qualidade e dos limites de detecção e quantificação foram preparadas utilizando mecônio “branco” fortificado com soluções de padrão FAEEs nas concentrações determinada para cada controle e limite. O mecônio “branco” consiste em amostras de mecônio de recém-nascidos não expostos ao álcool durante a gestação, segundo relato materno e que os FAEEs não foram detectados na análise por GC-MS. Os procedimentos de preparo dos controles e dos limites estão descritos a seguir:

- Limite de detecção (LD), as amostras foram fortificadas com concentrações decrescentes até o menor nível detectado com uma relação sinal/ ruído igual a três em relação à linha de base.
- Limite inferior de quantificação (LIQ), as amostras foram fortificadas com concentrações decrescentes até o menor nível detectado com uma relação sinal/ruído igual a cinco em relação à linha de base. O pico da resposta do analito deve ser identificável e reproduzível com precisão de 20% e exatidão de 80-120%.

- Controle de qualidade de baixa concentração (CQB): a amostra foi fortificada com concentração de três vezes superior a concentração do limite inferior de quantificação.
- Controle de qualidade de média concentração (CQM): a amostra foi fortificada com concentração obtida pela média entre os limites inferior de e superior de quantificação
- Controle de qualidade de alta concentração (CQA): a amostra foi fortificada com 75% da maior concentração da curva de calibração.
- Limite superior de quantificação (LSQ): a amostra foi fortificada com a maior concentração do analito da curva de calibração

### 3.11.2 Seletividade

Este parâmetro foi determinado pela análise de seis amostras de mecônio “branco” de diferentes indivíduos (sem adição de padrões), comparadas com a análise de seis amostras de mecônio “branco” fortificados com uma concentração elevada (2000ng/g) dos possíveis interferentes. Os interferentes analisados foram medicamentos e drogas mais comumente utilizadas pela população em estudo: ácido acetil salicílico, cafeína, dipirona, sulfato ferroso, nicotina e seu metabólito cotinina, tetraidocannabinol e canabidiol, cocaína e cocaetileno, fluoxetina, sertralina, clonazepam, diazepam, lorazepam e alprazolam. As respostas dos picos com tempos de retenção iguais aos dos analitos e ao do padrão interno devem ser comparadas, respectivamente, com a resposta do analito e do padrão interno na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ). As respostas dos picos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos e 5% da resposta do padrão interno.

### 3.11.3 Efeito residual (*carryover*)

Este parâmetro foi determinado por três injeções de uma amostra “branco”, sendo uma injeção no início da curva de calibração e duas logo após a injeção de uma amostra processada no limite superior de quantificação dos analitos.



Para avaliar esse parâmetro, as respostas dos picos com tempos de retenção iguais aos dos analitos e ao do padrão interno devem comparadas, respectivamente, com a resposta do analito e do padrão interno na concentração do LIQ. As respostas dos picos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos e 5% da resposta do padrão interno.

#### 3.11.4 Efeito matriz

Este parâmetro foi determinado pela análise de seis amostras processadas de mecônio “branco” de indivíduos diferentes, adicionadas posteriormente dos analitos nas concentrações do CQB e CQA e do padrão interno. Foram analisadas também soluções dos analitos nas concentrações do CQB e CQA. Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado pelo padrão interno (FMN), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do padrão interno em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do padrão interno em solução}}$$

O coeficiente de variação dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%.

#### 3.11.5 Curva de calibração (linearidade)

A linearidade foi determinada pela análise em quintuplicata de amostras de mecônio “branco” fortificadas com o padrão interno na concentração de 1000ng/g e com os analitos, no mínimo, em seis concentrações diferentes. A faixa de concentração dos analitos da curva analítica contemplou as concentrações esperadas no mecônio da população em estudo. As amostras foram processadas de acordo com método analítico desenvolvido neste estudo. Também foram analisadas uma amostra “branco” (isenta de analitos e padrão interno) e uma amostra “zero” (fortificada apenas com padrão interno) para cada curva de calibração. Foram construídas e avaliadas três curvas de calibração para cada analito.

As curvas de calibração foram obtidas plotando no eixo “y” a razão entre as áreas do pico do íon de quantificação do analito e do padrão interno e no eixo “x” o valor de concentração na qual as amostras foram fortificadas. Os resultados da amostra branco e zero não foram utilizados para construção da equação da curva de calibração.

Em seguida, foi verificado se houve uma relação linear na faixa de concentração proposta, através da regressão linear e cálculo do coeficiente de correlação linear (r) que deve ser maior ou igual a 0,99.

Para aprovação da curva de calibração, no mínimo 75% dos padrões de calibração devem ser aprovados, ou seja, o LIQ deve apresentar desvio inferior ou igual a 20% da concentração nominal e os outros padrões devem apresentar desvio inferior ou igual a 15% e, no mínimo, seis padrões de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e LSQ, devem ser aprovados.

Tabela 4– Padrões de calibração utilizado para construção da curva de calibração de cada analito

Analitos	Padrões de calibração
E16:0	LQ= 50 ng/g; 100 ng/g; CQB= 150 ng/g; 300 ng/g; 500 ng/g; CQM= 1000 ng/g; CQA= 1500 ng/g; LSQ= 2000 ng/g
E18:0	LQ= 50 ng/g; 100 ng/g; CQB= 150ng/g; 300 ng/g; 500 ng/g; CQM= 1000 ng/g; CQA=1500 ng/g; LSQ=2000 ng/g
E18:1	LQ= 100 ng/g; 150 ng/g; CQB= 300 ng/g; 500 ng/g; CQM= 1000 ng/g; CQA= 1500 ng/g; LSQ= 2000 ng/g
E18:2	LQ= 100 ng/g; 150 ng/g; CQB= 300 ng/g; CQM= 1000 ng/g; CQA= 1500 ng/g; LSQ= 2000 ng/g

E16:0= palmitato de etila; E18:0= estearato de etila; E18:1 oelato de etila; E18:2= linoleato de etila; LQ= limite de quantificação; CQB= controle de qualidade baixo; CQM= controle de qualidade médio; CQA= controle de qualidade alto; LSQ= limite superior de quantificação.

### 3.11.6 Recuperação

O ensaio de recuperação não está previsto na resolução 27/2012 da ANVISA, mas foi determinada, pois é um parâmetro essencial para avaliar a eficiência de extração durante o desenvolvimento do método. Este parâmetro foi determinado comparando-se os resultados das análises de seis amostras extraídas e fortificadas previamente com as concentrações de CQB, CQM e CQA, com os resultados das

análises de seis amostras extraídas e fortificadas posteriormente. O cálculo da recuperação foi obtido pela relação percentual das concentrações das amostras fortificada antes e depois da extração. O padrão interno foi adicionado antes da extração em ambos os casos.

### 3.11.7 Precisão

Foram avaliadas a precisão intracorrída (determinada em uma mesma corrida) e a precisão intercorridas (determinada, em três corridas provenientes de dias diferentes). Cada corrida foi realizada em cinco replicatas e nas seguintes concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA.

A precisão intracorrída foi calculada pelo Coeficiente de Variação (CV) baseado nas cinco replicatas e a intercorrida nas cinco replicatas dos três dias, de acordo com a seguinte fórmula:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

O coeficiente de variação deve ser inferior ou igual a 20% para o LIQ e inferior ou igual a 15% para os outros padrões de calibração.

### 3.11.8 Exatidão

Foram avaliadas a exatidão intracorrída (determinada em uma mesma corrida analítica) e a exatidão intercorridas (determinada em três corridas provenientes de dias diferentes). Cada corrida foi realizada em cinco replicatas nas seguintes concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA.

A exatidão intracorrída foi calculada pelo Erro Padrão Relativo (EPR) baseado nas cinco replicatas e a intercorrida nas cinco replicatas dos três dias, de acordo com a seguinte fórmula:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

Os EPRs devem estar dentro da faixa de  $\pm 20\%$  do valor nominal para o LIQ e de  $\pm 15\%$  do valor nominal para os demais padrões de calibração.

### 3.11.9 Estabilidade dos analitos na matriz biológica

Para determinação da estabilidade dos analitos na matriz biológica, foram fortificadas três amostras nas concentrações de CQB e CQA, as quais foram analisadas imediatamente após sua preparação e comparadas com as análises de três amostras fortificadas com CQB e CQA após serem submetidas às condições descritas a seguir:

- *I - estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento:* as amostras foram congeladas à  $-20^{\circ}\text{C}$  e mantidas por no mínimo 12 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. No total, as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento e então submetidas a quantificação do analito.
- *II - estabilidade de curta duração:* as amostras foram mantidas a temperatura ambiente até o processamento da última amostra (12 horas), quando então foram processadas e analisadas.
- *III- estabilidade de longa duração:* as amostras foram processadas e analisadas após serem armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 13 meses.
- *IV- estabilidade pós-processamento:* essa estabilidade foi obtida pela reinjeção das amostras processadas após 24 horas da primeira injeção.

O padrão interno foi adicionado após as amostras passarem pelas condições descritas anteriormente.

A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

### 3.11.10 Estabilidade dos analitos em solução

Para determinar a estabilidade dos analitos em solução, três amostras da solução primária de maior concentração (1 mg/mL para palmitato e estearato de etila e 10 mg/ml para linoleato e oleato de etila) e da solução de trabalho de menor

concentração (1 µg/mL para todos analitos) armazenadas a -20°C durante um mês e submetidas a análises e comparadas com a resposta de soluções recém-preparadas. As soluções consideradas estáveis não devem apresentar desvio superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém-preparadas.

## 4 RESULTADOS

Os resultados apresentados nessa seção são referentes ao desenvolvimento e validação do método analítico.

### 4.1 Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento do método de análise dos FAEEs no mecônio consistiu na determinação das condições de análise por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas bem como na otimização dos métodos de extração dos FAEEs no mecônio.

#### 4.1.1 Determinação das condições de análise por GC-MS

O desenvolvimento do método iniciou-se com a análise de soluções dos padrões FAEEs por GC-MS para estabelecer as condições dessa análise.

Inicialmente, foram utilizadas as condições descritas por Ostrea et al. (2006), a qual resultou em um cromatograma em que analitos linoleato e oleato de etila eluíram em tempo muito próximos, apesar do software conseguir detectá-los e quantificá-los isoladamente. O cromatograma obtido está ilustrado na Figura 3.

Foram realizadas várias tentativas a fim de melhorar a separação desses dois analitos. Modificações como alteração no fluxo do gás de arraste, eluição com temperatura do forno constante (eluição isotérmica) e alterações na rampa de temperatura do forno foram realizadas, mas a melhor separação obtida foi com a alteração na rampa de temperatura ao diminuir a taxa de aquecimento de 5°C/minuto para 2°C/minuto entre as temperaturas de 200 a 215°C. O cromatograma obtido está ilustrado na Figura 4.

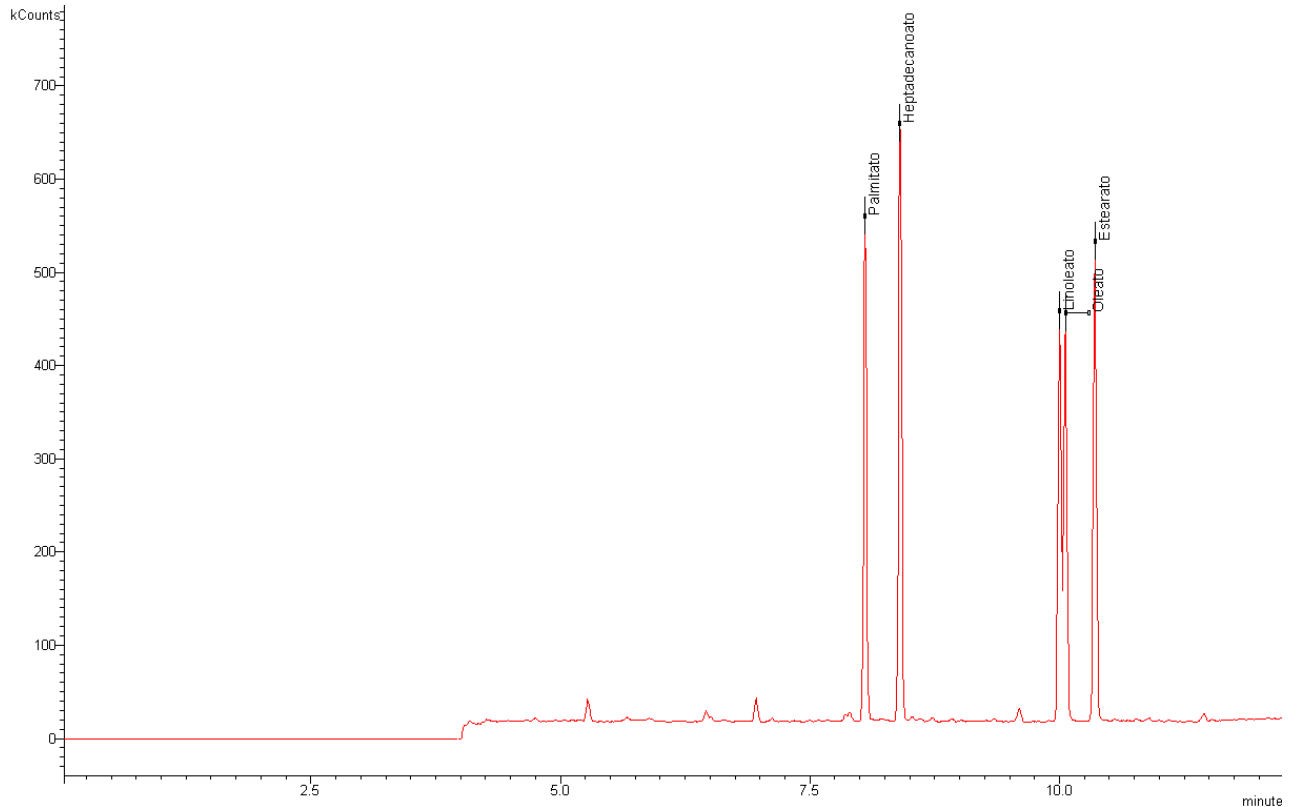


Figura 3- Cromatograma obtido pela análise de soluções do padrão interno e dos FAEEs em estudo utilizando a programação de temperatura da coluna proposta por Ostrea et al. (2006).

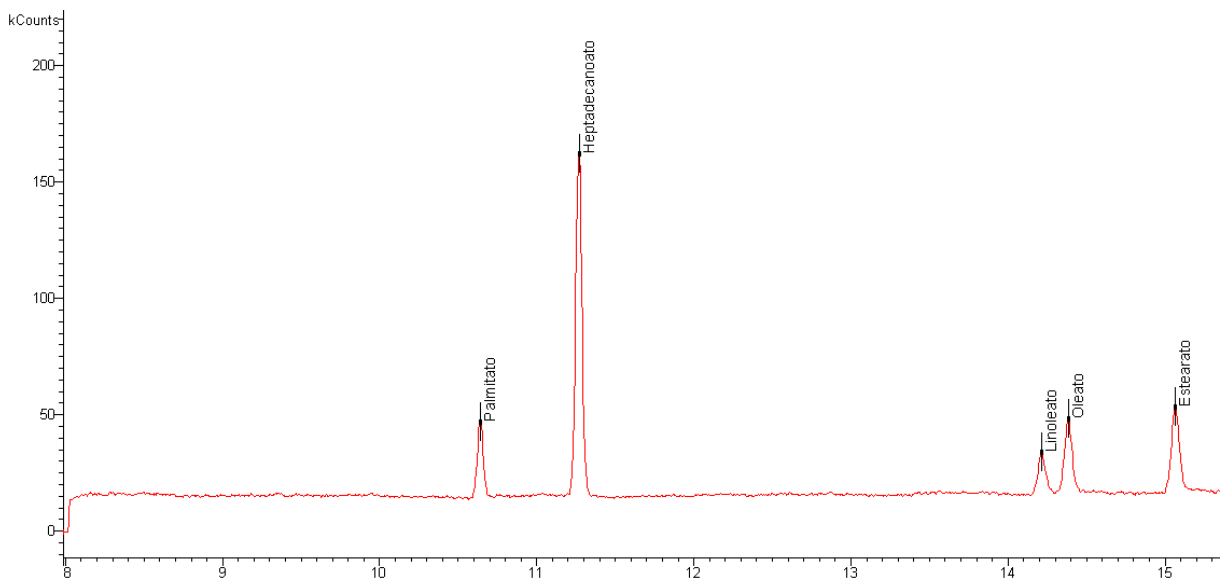


Figura 4– Cromatograma obtido na otimização da programação da temperatura da coluna ao analisar a solução do padrão interno e dos FAEEs em estudo.

Na Tabela 5 estão descritos os íons de quantificação e detecção monitorados para cada analito e padrão interno e nas figuras 5, 6, 7, 8, 9 estão ilustrados os espectros de massas obtidos da análise de solução dos padrões em hexano.

Tabela 5- Íons de identificação e quantificação dos FAEEs e do padrão interno heptadecanoato de metila.

<b>FAEEs e padrão interno</b>	<b>Íon de quantificação (m/z)</b>	<b>Íons de identificação (m/z)</b>	<b>Tempo de retenção (Minutos)</b>
Palmitato de etila	101	88, 284	10,641
Heptadecanoato de metila	74	87, 284	11,270
Linoleato de etila	67	81, 95	14,213
Oleato de etila	264	310, 222	14,385
Estearato de etila	101	88, 312	15,062



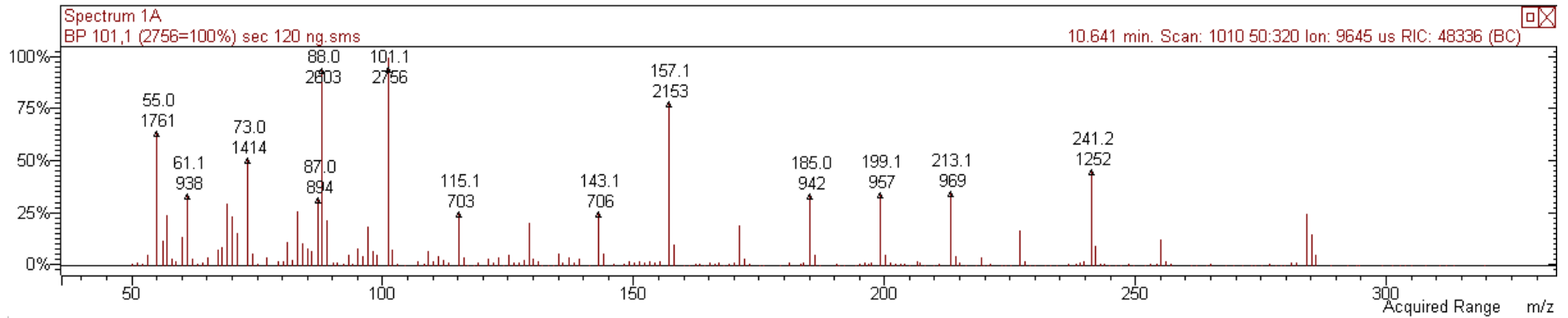


Figura 5- Espectro de massas do palmitato de etila.

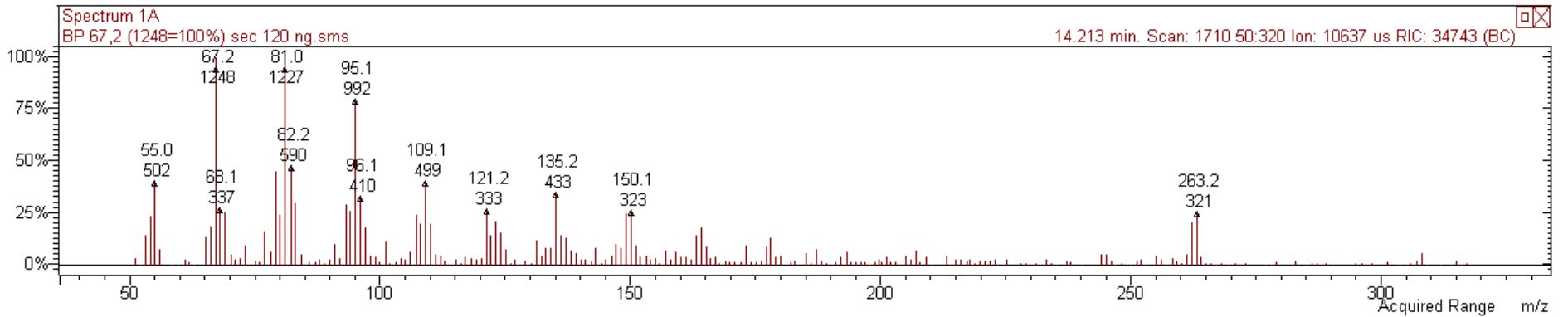


Figura 6- Espectro de massas do linoleato de etila

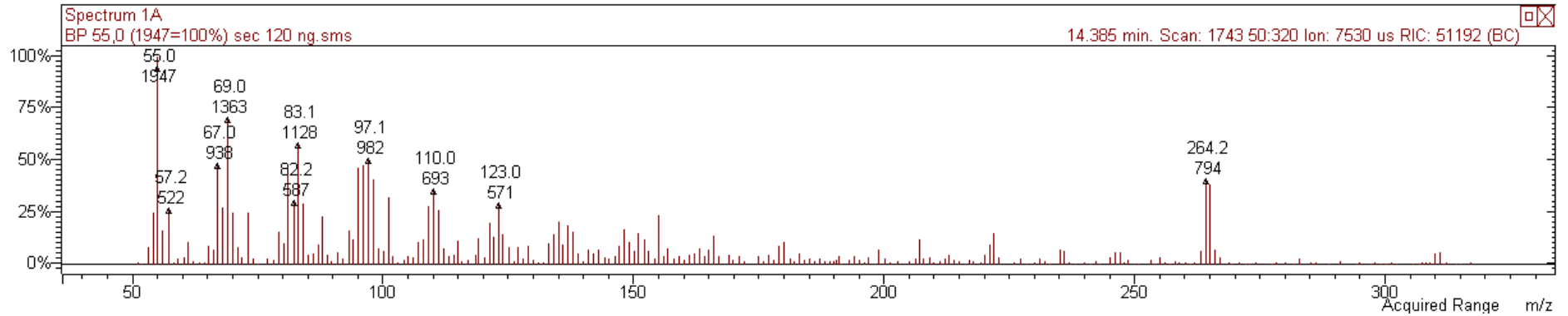


Figura 7- Espectro de massas do oleato de etila.

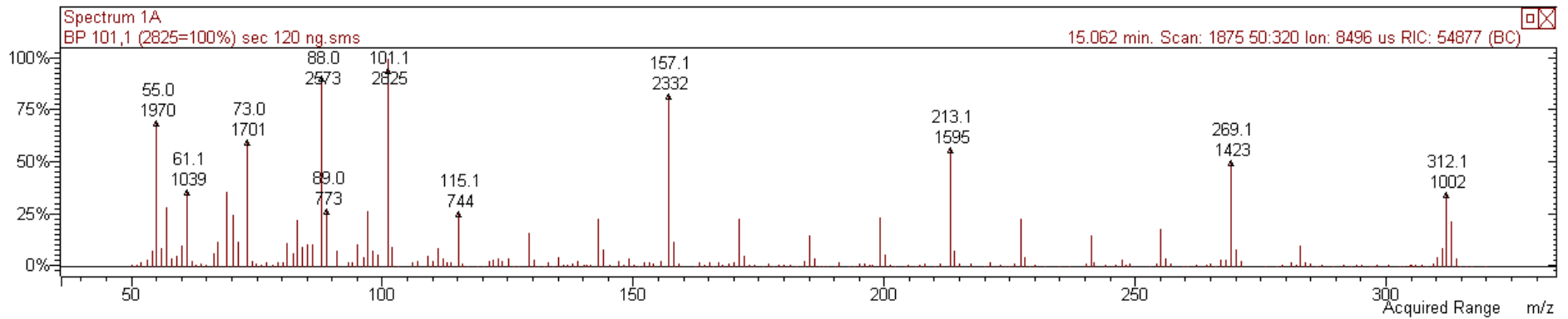


Figura 8- Espectro de massas do estearato de etila.

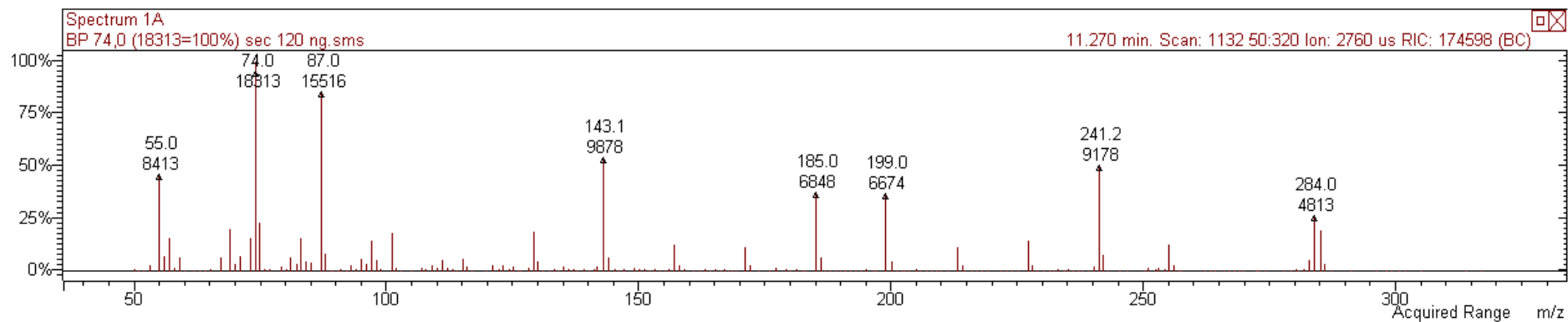


Figura 9– Espectro de massas do padrão interno heptadecanoato de metila

#### 4.1.2 Determinação das condições de preparo de amostras

Inicialmente, foram testados os dois procedimentos de preparo de amostra descritos por Moore et al. (2003) e Ostrea et al. (2006), ambos utilizaram extração líquido-líquido seguido de extração em fase sólida. Foram empregados cartuchos de sílica na extração em fase sólida.

Pelo método de Moore, o resultado obtido foi a detecção de todos os FAEEs analisados e do padrão interno (Figura 10- cromatograma A), enquanto pelo método de Ostrea, o resultado obtido foi a detecção de três dos quatro FAEEs analisados e do padrão interno. O oleato de etila não foi identificado (Figura 10- cromatograma B).

Em razão da detecção de todos os FAEEs e maior recuperação dos analitos na metodologia de Moore et al., esta foi escolhida para dar continuidade no desenvolvimento do método.

Além dos cartuchos de sílica (Discovery DSC-Si®), o método de Moore foi testado empregando o cartucho com fase extratora mista (Bond Elut Certify I®), formada por grupamentos octil (8 carbonos) e grupamentos de ácido benzenosulfônicos. Porém, o resultado não foi satisfatório, uma vez que apenas o palmitato de etila foi detectado (Figura 11).

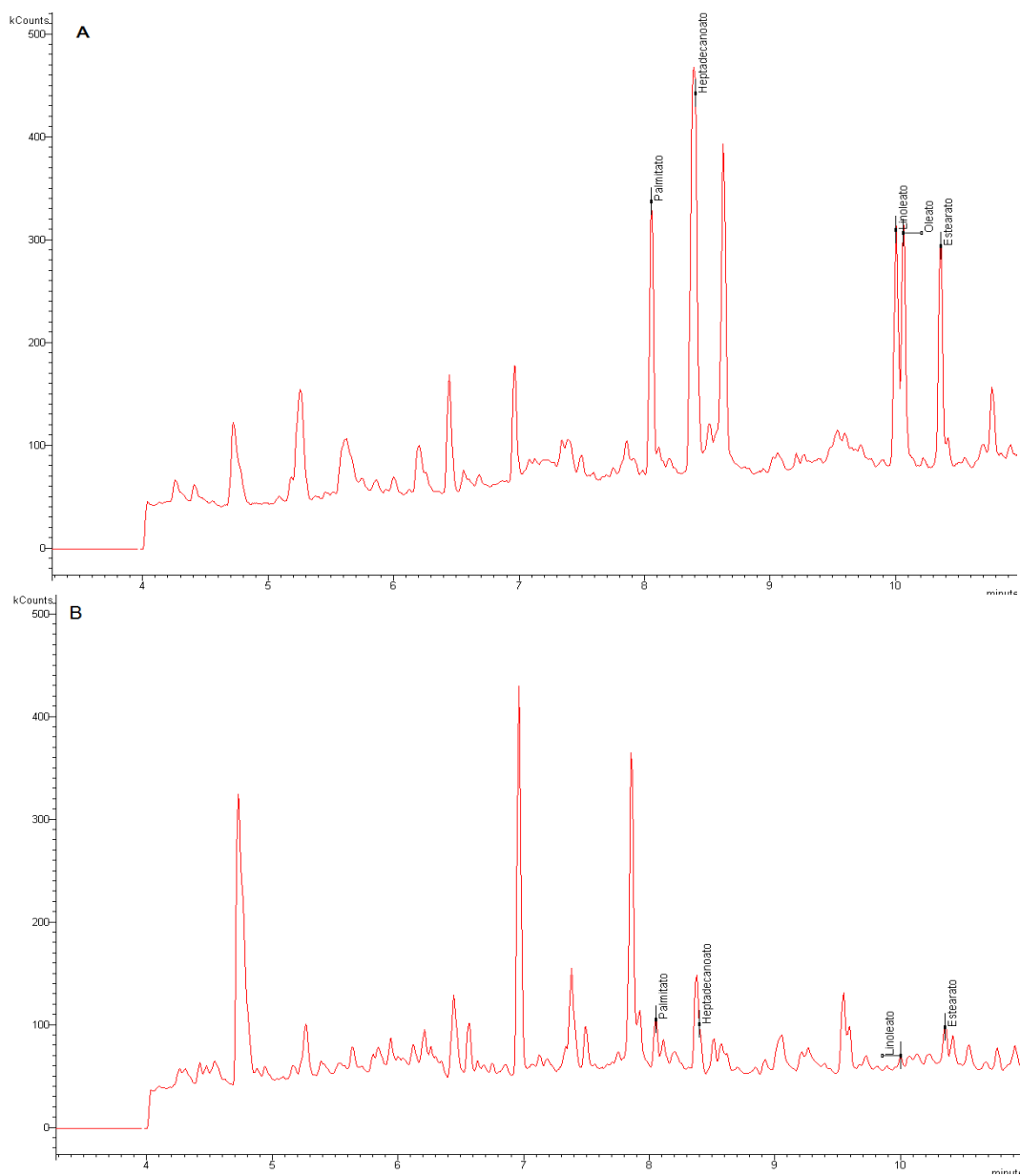


Figura 10- Cromatogramas A e B obtidos pela análise do mecônio fortificado com 500 ng de FAAEs e extraído segundo o método de Moore et al. (2003) e Ostrea et al. (2006), respectivamente, empregando cartuchos de sílica.

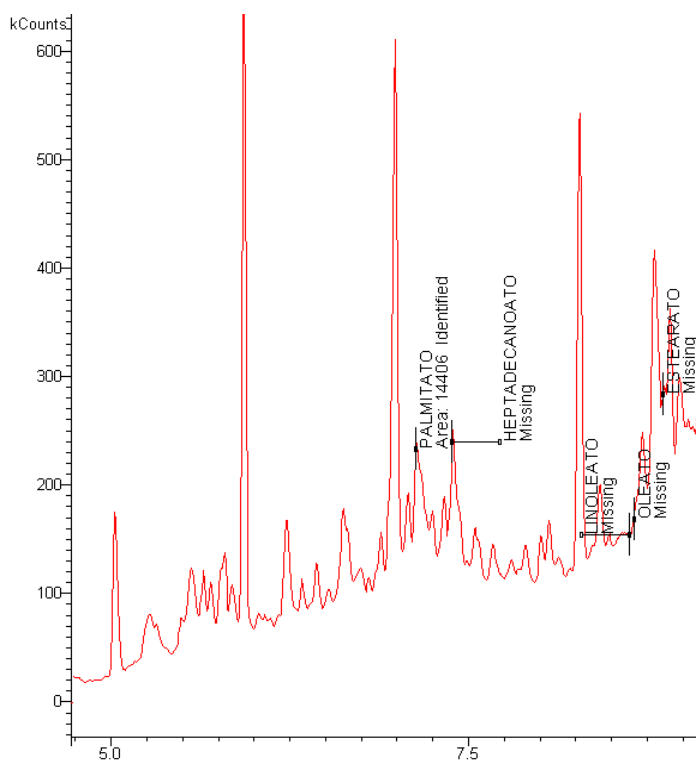


Figura 11– Cromatograma obtido pela análise de mecônio fortificado com 500 ng dos padrões FAEEs, submetidos à extração em fase sólida com cartuchos de fase extratora mista (Bond Elut Certify I®), após extração líquido-líquido.

Por fim, foram testados os cartuchos de aminopropilsílica (DISCOVERY® DSC-NH<sub>2</sub>), formados por sílica ligada a grupamentos aminopropil. O resultado obtido foi a detecção de todos os FAEEs em estudo, e apresentou melhor eficiência na extração dos FAEEs quando comparados com os demais cartuchos (sílica normal e fase extratora mista) (Figura 12). Assim, optou-se em empregar esses cartuchos na extração em fase sólida, precedida da extração líquido-líquido como método de preparo das amostras de mecônio.

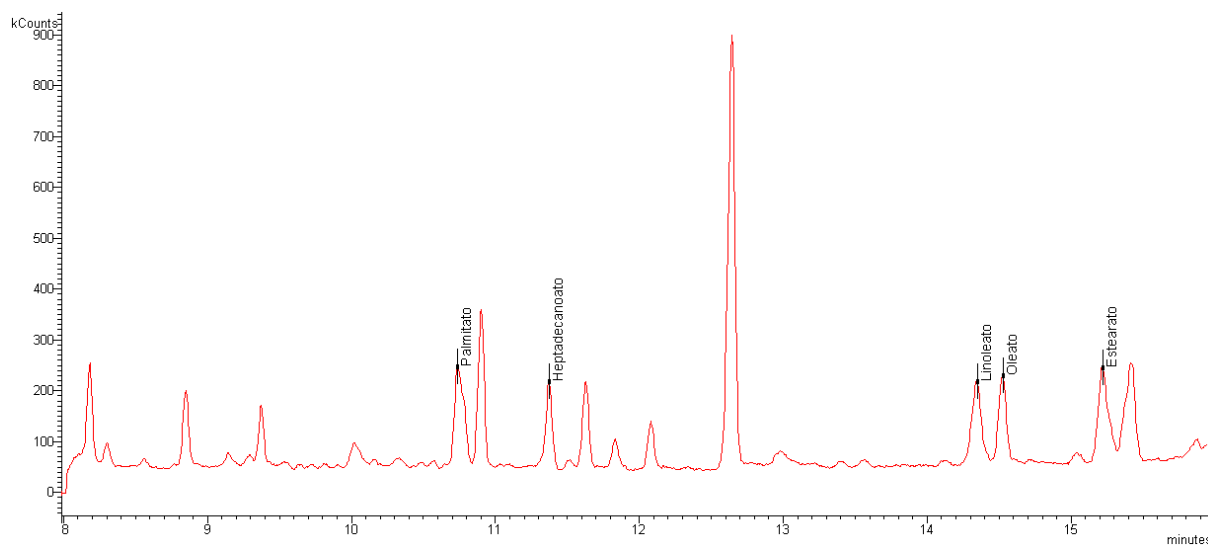


Figura 12- Cromatograma obtido pela análise de mecônio branco fortificado com 500 ng dos padrões FAEEs, submetidos à extração líquido-líquido seguido de extração em fase sólida com cartuchos de aminopropilsilica.

## 4.2 Validação analítica

A validação de um método analítico garante a confiabilidade dos resultados analíticos, quesito este essencial para uma interpretação correta dos resultados e, conseqüentemente, proporcionando intervenções clínicas adequadas. Os resultados dos ensaios da validação analítica estão apresentados a seguir.

### 4.2.1 Determinação dos controles de qualidades e dos limites de detecção e quantificação

Os valores obtidos para os limites de detecção variaram para cada analito, sendo 20 ng/g para o palmitato e estearato de etila e 40 ng/g para o linoleato e o oleato de etila, enquanto os valores do limite de inferior de quantificação foram 50 ng/g para o palmitato e estearato de etila e 100ng/g para o linoleato e o oleato de etila.

Os valores do limite superior de quantificação foi 2000 ng/g para todos os analitos. A partir desses valores, foram estabelecidos os valores dos controles de qualidade baixo, médio e alto. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6– Concentrações do LD, LIQ, CQs e do LSQ para cada analito.

Analito	LD ng/g	LIQ ng/g	CQB ng/g	CQM ng/g	CQA ng/g	LSQ ng/g
E16:0	20	50	150	1000	1500	2000
E18:0	20	50	150	1000	1500	2000
E18:1	40	100	300	1000	1500	2000
E18:2	40	100	300	1000	1500	2000

LD= limite de detecção, LIQ= limite inferior de quantificação, CQB= controle de qualidade de baixa concentração, CQM= controle de qualidade de média concentração, CQA= controle de qualidade de alta concentração, LSQ= limite superior de quantificação, E16:0= palmitato de etila, E18:0= estearato de etila, E18:1= oleato de etila, E18:2= linoleato de etila.

#### 4.2.2 Seletividade

Os 16 potenciais interferentes analisados na concentração de 2000 ng/g (ácido acetil salicílico, cafeína, dipirona, sulfato ferroso, nicotina e seu metabólito cotinina, tetraidocannabinol e canabidiol, cocaína e cocaetileno, fluoxetina, sertralina, clonazepam, diazepam, lorazepam e alprazolam) não interferiram na identificação e na quantificação dos analitos e do padrão interno, apesar da presença de alguns picos próximos ao tempo de retenção dos analitos. Para comparar os tempos de eluição dos analitos com os possíveis interferentes foi realizado uma sobreposição dos cromatogramas de uma amostra processada contendo os FAEEs e de uma amostra processada contendo os interferentes (2000ng/g) (Figura 13).

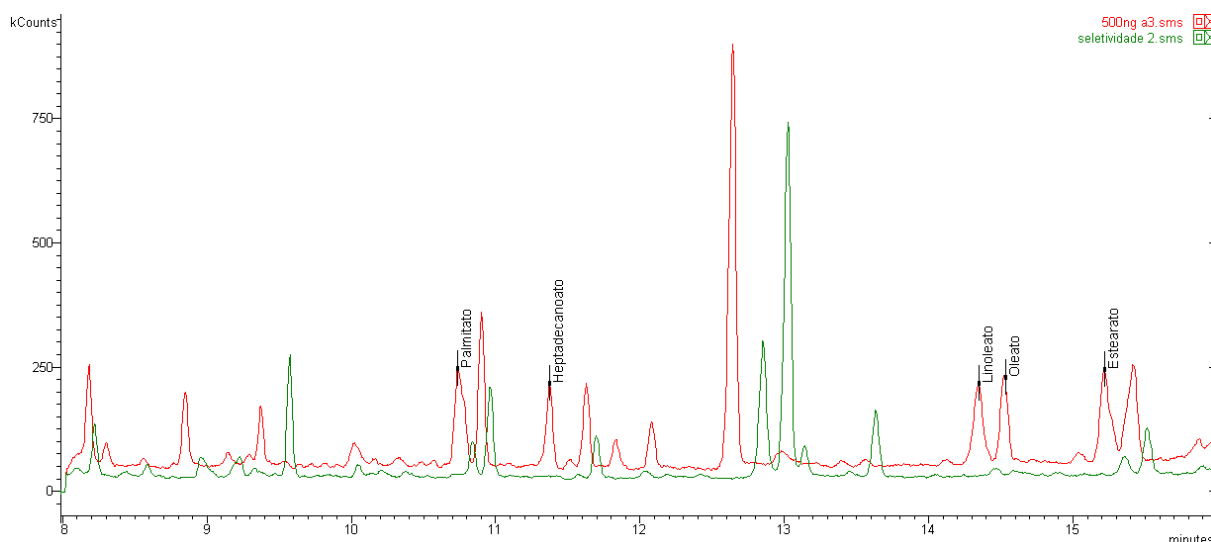


Figura 13– Sobreposição dos cromatogramas de uma amostra processada contendo os FAEEs (cor vermelha) e de uma amostra processada contendo os possíveis interferentes utilizados no ensaio de seletividade (cor verde).



### 4.2.3 Efeito residual (*carryover*)

Não foi observado o efeito residual, ou seja, os analitos não foram detectados nas amostras branco analisadas imediatamente após o maior ponto da curva analítica.

### 4.2.4 Efeito matriz

O efeito matriz avalia o efeito dos componentes da matriz biológica na resposta dos analitos e do padrão interno. Para avaliação desse efeito, foi calculado para cada amostra o fator de matriz normalizado pelo padrão interno. O coeficiente de variação do FMN para as amostras nos CQB e CQA foram menores que 15% e estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7– Valores dos coeficientes de variação dos fatores de matriz normalizados para cada FAEEs nos controles de qualidade baixo e alto.

Analito	Coeficiente de Variação(%) dos FMN	
	CQB	CQA
Palmitato de etila	7,77	6,33
Linoleato de etila	14,95	6,34
Oleato de etila	11,25	8,87
Estearato de etila	8,43	8,22

CQB = controle de qualidade baixo, CQA = controle de qualidade alto, FMN = fator de matriz normalizado.

### 4.2.5 Curva de calibração (linearidade)

O método é considerado linear na faixa de concentração de 25 a 1000 ng/0,5g (50-2000ng/g) para o palmitato e estearato de etila e, de 50 a 1000ng/0,5g (100-2000ng/g). Os coeficientes de correlação linear variaram de 0,9967 a 0,9990.

As Figuras de 14 a 17 ilustram a curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação linear para cada analito. O eixo “x” representa a concentração dos analitos em ng / 0,5 g de mecônio e o eixo “y” a razão entre as áreas do analito e do padrão interno.

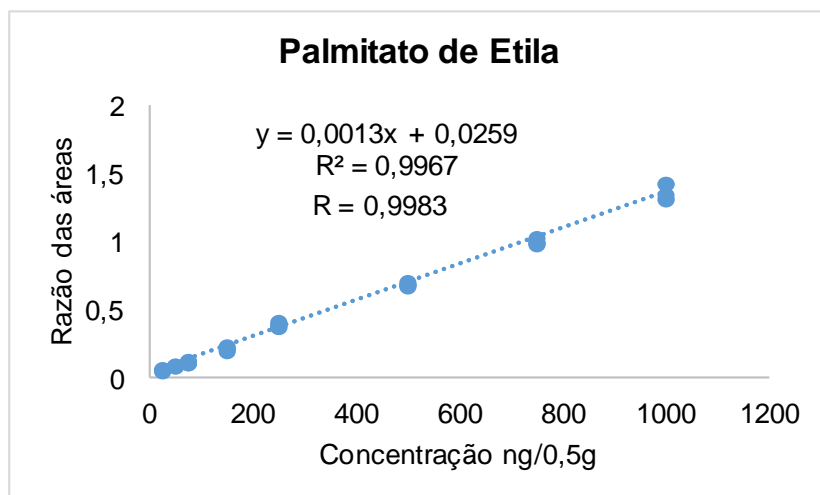


Figura 14– Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de correlação linear ( $R$ ) do palmitato de etila.

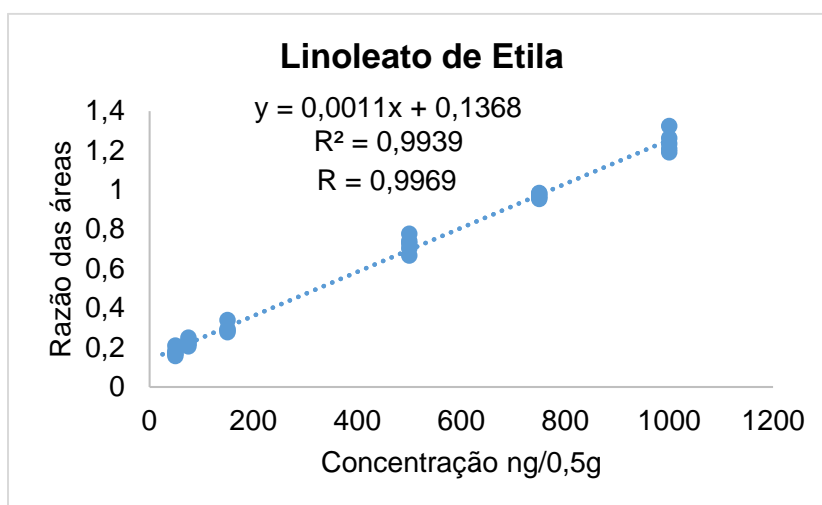


Figura 15 - Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de correlação linear ( $R$ ) do linoleato de etila.

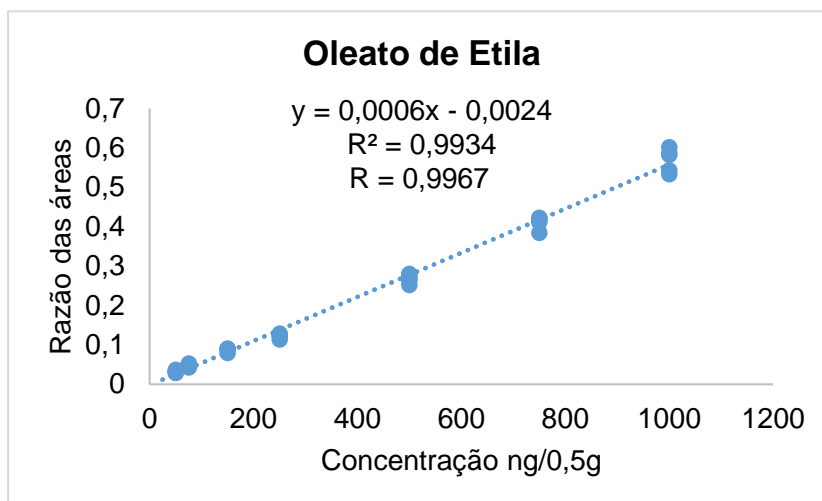


Figura 16 - Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e coeficiente de correlação linear (R) do oleato de etila

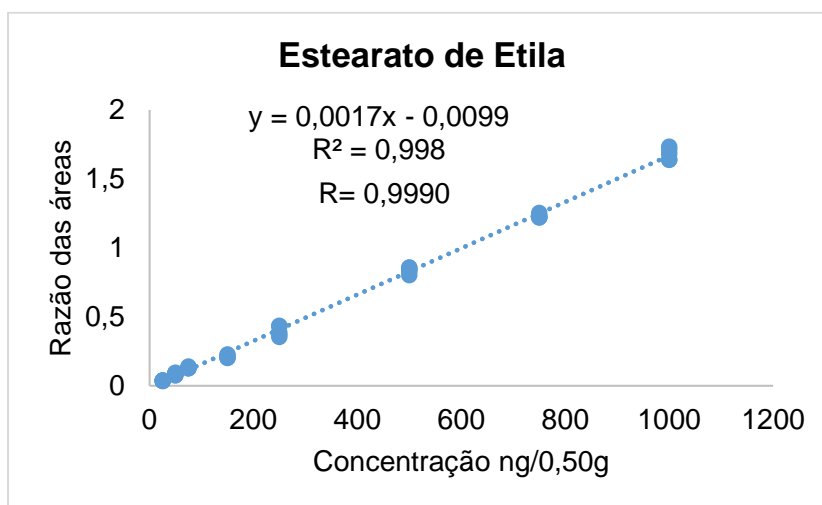


Figura 17– Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e coeficiente de correlação linear (R) do esterato de etila

Durante as análises dos padrões de calibração para construção da curva de calibração, foram analisadas uma amostra “branco” (isenta de analitos e do padrão interno) e uma amostra “zero” (isenta de analitos mas com de adicionado padrão interno), mas estas não foram incluídas na construção da curva de calibração. Os cromatogramas obtidos na análise da amostra branco e na amostra zero estão ilustrados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

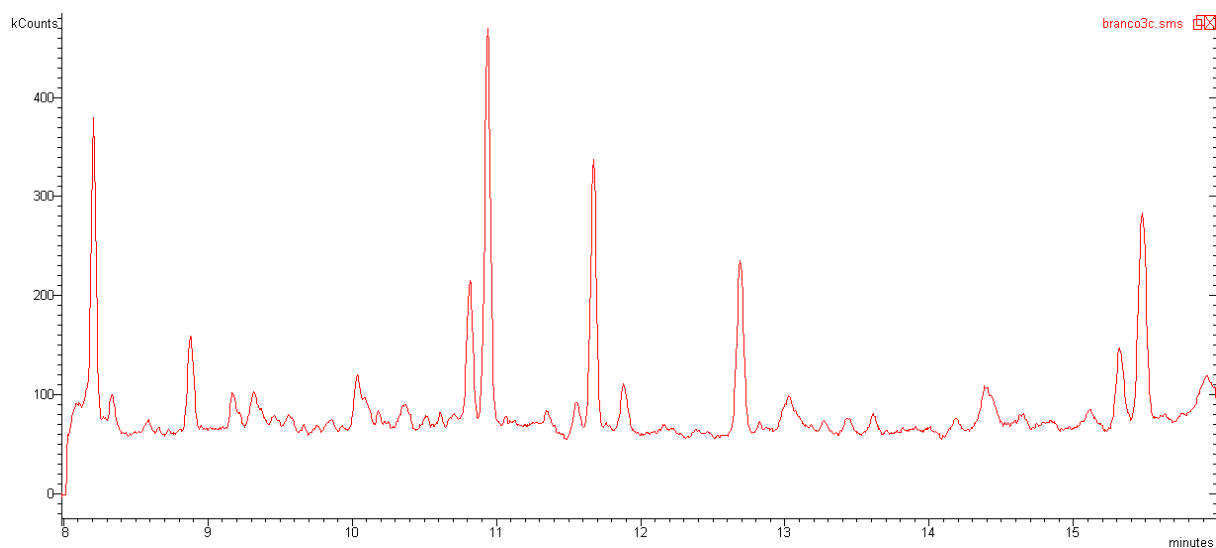


Figura 18 – Cromatograma obtido pela análise de uma amostra “branco” de mecônio processado.

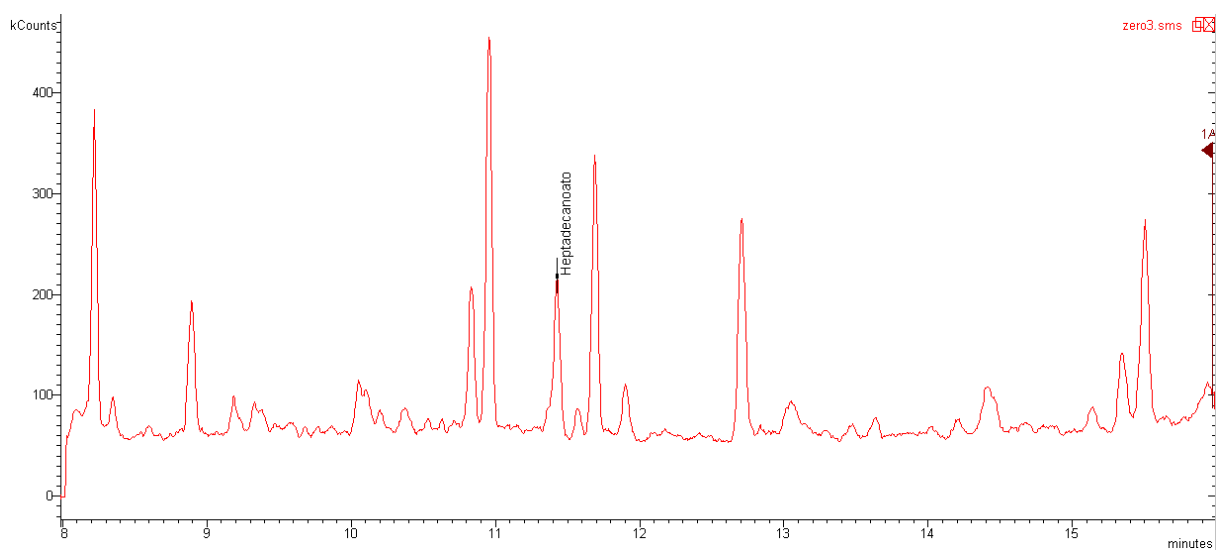


Figura 19– Cromatograma obtido pela análise de uma amostra zero de mecônio processado.

Na amostra “branco”, nenhum dos analitos FAEEs e o padrão interno foram identificados. E na amostra zero, somente o padrão interno foi detectado.

#### 4.2.6 Recuperação

Os valores de recuperação dos analitos variaram de 69,79% a 106,57%, conforme os valores descritos na Tabela 8. O analito que apresentou maiores valores de recuperação foi o estearato de etila (valor médio 102,09%), enquanto que o oleato de etila foi analito que apresentou menores valores de recuperação (valor médio 72,32%).

Tabela 8– Valores de recuperação expressos em porcentagem para cada analito.

Analito	Recuperação (%)			Média
	CQB	CQM	CQA	
Palmitato de etila	90,86	81,83	76,17	82,95
Linoleato de etila	94,89	80,97	76,49	84,12
Oleato de etila	76,90	70,27	69,79	72,32
Estearato de etila	106,57	98,57	101,13	102,09

CQB = controle de qualidade baixo, CQM = controle de qualidade médio, CQA = controle de qualidade alto.

#### 4.2.7 Precisão

Os valores do coeficiente de variação dos limites inferiores de quantificação e dos controles de qualidade baixo, médio e alto para todos os analitos estavam dentro dos critérios estabelecidos pela ANVISA, tanto no ensaio intradia quanto no ensaio interdia. Os resultados estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9– Valores do coeficiente de variação expressos em porcentagem das concentrações obtidas no ensaio de precisão intra e interdias.

Analito	Precisão intradia				Precisão interdia			
	Coeficiente de variação (%)				Coeficiente de variação (%)			
	LIQ	CQB	CQM	CQA	LIQ	CQB	CQM	CQA
Palmitato de etila	15,41	5,75	4,07	0,84	14,18	8,53	4,16	2,47
Linoleato de etila	14,45	9,64	4,46	1,71	16,63	8,09	6,46	3,05
Oleato de etila	10,58	4,41	5,19	0,54	9,84	8,61	4,16	2,90
Estearato de etila	7,80	5,93	7,39	1,56	16,99	6,25	4,84	2,69

LIQ = limite inferior de qualificação, CQB = controle de qualidade baixo, CQM = controle de qualidade médio, CQA = controle de qualidade alto.

#### 4.2.8 Exatidão

Os valores de erro padrão relativo dos limites inferiores de quantificação e dos controles de qualidade baixo, médio e alto para todos os analitos estavam dentro dos critérios estabelecidos pela ANVISA, tanto no ensaio intradia quanto no ensaio interdía. Os resultados estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10– Valores de Erro padrão relativo expressos em porcentagem das concentrações obtidas no ensaio de exatidão intra e interdías.

Analito	Exatidão intradia				Exatidão interdía			
	Erro Padrão Realtivo (%)				Erro Padrão Relativo (%)			
	LIQ	CQB	CQM	CQA	LIQ	CQB	CQM	CQA
Palmitato de etila	7,22	-2,34	-4,90	-2,32	6,48	-0,48	-0,78	0,29
Linoleato de etila	-0,81	-2,78	2,72	-0,71	3,68	-0,47	3,73	2,10
Oleato de etila	18,87	10,53	1,94	9,67	13,77	5,09	4,21	9,08
Estearato de etila	5,21	-1,46	1,97	1,16	-9,24	1,18	1,87	0,15

LIQ = limite inferior de qualificação, CQB = controle de qualidade baixo, CQM = controle de qualidade médio, CQA = controle de qualidade alto.

#### 4.2.9 Estabilidade dos analitos na matriz biológica

A estabilidade é demonstrada quando não houver variação superior a 15% em relação da concentração nominal. Sendo assim, os analitos mostraram-se estáveis apenas no ensaio de pós-processamento, quando as amostras foram reanalisadas no GC-MS após 24 horas da primeira análise (Tabela 11).

Os ensaios que demonstraram maiores valores de instabilidade foram o de curta duração e o de longa duração, sendo que o linoleato e o estearato de etila foram os analitos que apresentaram maior variação da concentração.

Tabela 11– Estabilidade dos analitos na matriz biológica dado em porcentagem da variação da concentração com relação à concentração nominal.

Ensaio estabilidade	Concentração	Variação da concentração dos analitos (%)			
		E16:0	E18:2	E18:1	E18:0
Pós três ciclos de congelamento e descongelamento	CQB	-15,21	-32,81	-32,58	-26,75
	CQA	-17,16	-25,10	-29,44	-12,51
Curta duração	CQB	-27,38	-33,09	-26,59	-52,38
	CQA	-21,01	-18,32	-12,59	-33,40
Longa duração	CQB	-27,44	-39,44	-23,43	-24,19
	CQA	-37,40	-54,02	-41,38	-41,12
Pós-processamento	CQB	-10,76	-16,96	-5,82	-13,40
	CQA	-0,90	-2,70	4,14	-12,32

CQB = controle de qualidade baixo, CQA = controle de qualidade alto. E16:0 = palmitato de etila; E18:2 = linoleato de etila; E18:1 = oleato de etila; E18:0 = estearato de etila.

#### 4.2.10 Estabilidade dos analitos em solução

Todos os analitos mostraram-se estáveis em solução em hexano após 30 dias de armazenamento sob refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$ , com variação das concentrações menor que 11,31 % (Tabela 12).

Tabela 12– Estabilidade da solução primária e da solução de trabalho dos analitos após trinta dias de armazenamento sob-refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Estabilidade	Solução	Variação da concentração dos analitos (%)			
		E16:0	E18:2	E18:1	E18:0
Estabilidade dos analitos em solução	Solução primária	-11,31	-9,21	-3,93	-7,26
	Solução de trabalho	-6,24	-9,36	-0,95	-9,46

E16:0 = palmitato de etila; E18:2 = linoleato de etila; E18:1 = oleato de etila; E18:0 = estearato de etila

## 5 DISCUSSÃO

O método desenvolvido nesse estudo permite a detecção e quantificação de quatro de FAEEs (palmitato, linoleato, oleato e estearato de etila) para avaliação da exposição fetal ao álcool, utilizando como método de preparo de amostra a extração líquido-líquido seguido de extração em fase sólida e como técnica de separação, identificação e quantificação a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

As condições da análise por GC-MS foram estabelecidas a partir das modificações do método de Ostrea et al. (2006). O método cromatográfico otimizado apresentou melhor separação entre os analitos linoleato e oleato de etila e menor tempo da análise cromatográfica. O modo de ionização das moléculas empregado foi o impacto de elétrons em vez da ionização química, como proposto por Ostrea et al. (2006), uma vez que o equipamento utilizado não apresentava o recurso para esse modo de operação. Alguns autores preferem a utilização da ionização química, por preservar os íons de alto peso molecular, facilitando a identificação dos FAEEs (MOORE et al., 2003; OSTREA et al., 2006; PICHINI et al., 2008). No entanto, nesse estudo, foi possível identificar íons específicos com abundância razoável.

O mecônio, por ser uma matriz complexa, necessita que o preparo de amostra seja mais criterioso, a fim de eliminar o máximo de interferentes e, ao mesmo tempo, garantir uma boa recuperação dos analitos. Assim, utilizou-se a extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida, dois procedimentos que muitas vezes são empregados isoladamente como método de preparo em outras matrizes biológicas.

Na extração líquido-líquido, ao comparar o método de Moore et al. (2003) com o método de Ostrea et al. (2006), observou-se que o primeiro método proporcionou maior recuperação dos analitos quando comparado com o segundo. Esse melhor desempenho pode ser atribuído pelo uso da acetona como solvente para precipitação de lipídios polares, como fosfolípídeos e glicolípídeos, e proteínas. Além disso, no método de Ostrea et al. (2006), o extrato hexânico é submetido a refrigeração a -20°C para eliminar os lipídeos livres. Esse procedimento poderia ter contribuído com a diminuição da recuperação dos FAEEs, uma vez que esses



podem sofrer o processo de cristalização e precipitarem ao serem submetidos a resfriamento (PIEREZAN et al., 2015)

As extrações em fase sólida utilizando cartuchos de extração em fase normal (sílica e aminopropilsílica) apresentaram maior recuperação dos analitos quando comparado com o cartucho de fase reversa (grupamentos octil). Nos cartuchos em fase normal, os FAEEs não interagem com a fase sólida e são eluídos diretamente com o solvente apolar. Já no cartucho em fase reversa, os FAEEs dependem da interação com a fase estacionária para ser recuperados e posteriormente são eluídos com solvente apolar. Assim, alguns FAEEs podem não ser recuperados ou apresentar baixa recuperação, explicando os resultados encontrados.

O método desenvolvido foi validado seguindo as diretrizes vigentes da ANVISA (resolução 27/2012). O método mostrou-se preciso e exato para quantificar os FAEEs no mecônio na faixa de concentração de 50-2000ng/g para o palmitato e estearato de etila e de 100 – 2000 ng/g para o linoleato e oleato de etila. Os limites de detecção e quantificação encontrados neste estudo são menores quando comparados com o estudo de Cabarcos et al., 2012 e maiores quando comparados com outros estudos (HIMES et al., 2014; HASTED et al., 2012, HUTSON et al., 2011), porém com sensibilidade suficiente, uma vez que o ponto de corte da somatória dos FAEEs adotado na maioria dos estudos é 600ng/g (CABARCOS et al., 2012; HUTSON et al., 2011; ROEHSIG et al., 2010, PICHINI et al., 2008).

No ensaio de seletividade pode-se dizer que o método foi seletivo em relação aos 16 possíveis interferentes avaliados, ou seja, foi capaz de diferenciar e quantificar os analitos na presença desses interferentes. Os interferentes devem ser sempre escolhidos baseado na probabilidade de serem encontrados em uma amostra real. Nesse estudo, todas as participantes foram recrutadas em serviço de atendimento de gestação de baixo risco, assim os interferentes escolhidos foram alguns medicamentos e drogas mais comumente utilizados por essa população.

Nos ensaios do efeito residual, nenhum analito FAEEs, padrão interno e interferentes foram identificados nas análises da amostra branco, indicando que o método cromatográfico foi adequado. Além disso, a ausência de detecção dos analitos na amostra “branco” é necessário para que essas amostras “branco” sejam utilizadas no preparo dos controles de qualidades dos ensaios de validação. Na análise da amostra zero (amostra branco fortificada com padrão interno), os FAEEs

não foram detectados, indicando que esse padrão interno não interfere na análise dos analitos em estudo.

Apesar do mecônio ser uma matriz complexa, não foi observado o efeito matriz, que avalia a influência dos componentes da matriz no aumento ou supressão dos íons. A utilização da extração líquido-líquido seguido da extração em fase sólida, contribuiu com esse resultado.

O ensaio de recuperação não está previsto na resolução 27/2012 da ANVISA, mas foi determinada, pois é um parâmetro essencial para avaliar a eficiência de extração durante o desenvolvimento do método. Os valores de recuperação dos analitos variaram de 69,79% (para o oleato de etila) a 106,57% (para o estearato de etila), condizentes com outros estudos que utilizaram extração líquido-líquido seguido de extração em fase sólida (OSTREA et al., 2006; PICHINI et al., 2008; KWAK et al., 2010). Esses valores obtidos de recuperação são superiores aos valores encontrados em estudos que utilizaram, como técnica de preparo, a microextração em fase sólida utilizando *headspace* (HS-SPME). Nesses estudos a porcentagem de recuperação não ultrapassou os 35% (HUTSON et al., 2009; ROEHSIG et al., 2010; HUTSON et al., 2011).

Em relação ao ensaio de estabilidade dos analitos em matriz, todos os FAEEs demonstraram-se estáveis apenas no ensaio pós-processamento, no qual a amostra processada foi reinjetada no GC-MS após 24 horas da primeira injeção. Os estudos têm mostrado resultados contraditórios de estabilidade. Pichini et al. (2008) demonstrou estabilidade dos analitos (variação menor que 10% da concentração) nos ensaios: pós-processamento por 24 horas à temperatura ambiente; após 3 ciclos de congelamento a -20°C; estabilidade da amostra positiva real armazenada por 12 meses a -20°C. GARCIA-ALGAR et al. (2008) também encontrou uma variação menor que 10% da concentração ao realizar o ensaio de 3 ciclos de congelamento e reanalisar as amostras após 6 a 24 meses armazenadas sob refrigeração a -20°C.

Por outro lado, há estudos demonstrando a instabilidade desses analitos à luz e temperatura ambiente. Moore et al. (2003) observou que, durante os ensaios de 24 horas, houve uma redução de 86% da concentração dos analitos quando as amostras foram expostas à luz e temperatura ambiente e uma redução de 60% quando expostas somente a temperatura ambiente e de 10% quando foram

armazenadas sob refrigeração a 4°C. Ao armazenar as amostras sob refrigeração a -20°C durante 6 dias, observou-se uma redução de 11% e durante um período acima de 43 dias essa variação permaneceu a 50%. Hasted et al. (2012) e Himes et al. (2014) observaram instabilidade dos analitos somente em amostras positivas reais (sem fortificar) e observaram uma variabilidade da variação da concentração interindivíduos.

Em relação a estabilidade dos analitos em solução de hexano, todos apresentaram-se estáveis com variação na concentração menor que 12% quando armazenados sob refrigeração a -20°C por 30 dias. Roehsig et al. (2010) também observou que os analitos são estáveis nessas condições

Assim, os analitos demonstraram-se estáveis quando em soluções ou após o processamento da amostra, sugerindo que algo presente no mecônio poderia interferir na estabilidade dos analitos. Porém, essa instabilidade parece atuar após o nascimento, uma vez que os FAEEs são acumulados a partir do segundo trimestre gestacional e são detectados no nascimento, (seis meses após o início da deposição no mecônio). Hasted et al. (2012) até sugere que esses FAEEs podem ser degradados por bactérias que apresentam crescimento dependente de temperatura. E isso poderia explicar a variabilidade dos resultados de estabilidade encontrada nos estudos.

As limitações desse método analítico desenvolvido consistem na quantificação de FAEEs acima do limite inferior de quantificação (50 ng/g para o palmitato e estearato de etila e 100 ng/g para linoleato e oleato de etila). Valores obtidos abaixo do LIQ não são confiáveis e são reportados como concentração inferior ao LIQ. Devido à complexidade da matriz biológica mecônio, foi necessário o emprego de duas técnicas de extração (extração líquido-líquido e extração em fase sólida) que utilizam solventes orgânicos durante o procedimento. O teste de seletividade contemplou apenas 16 possíveis interferentes, mas deve-se sempre levar em consideração o perfil das participantes em estudo. Os analitos mostraram-se instáveis em algumas condições testadas, porém não foram investigados a origem dessa instabilidade.

## 6 CONCLUSÕES

- O método desenvolvido consistiu no preparo de amostra por líquido-líquido utilizando água, acetona e hexano, seguida de extração em fase sólida empregando cartuchos de aminopropilsilica. A separação e quantificação dos analitos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas;
- O método analítico atendeu os critérios exigidos pela resolução 27/2012 da ANVISA, sendo compatível com a finalidade pretendida: detectar e quantificar FAEEs em amostras de mecônio.

**CAPÍTULO III: APLICAÇÃO E**  
**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO**  
**MÉTODO ANALÍTICO**

## 1 INTRODUÇÃO

As análises de biomarcadores FAEEs no mecônio têm sido propostas como ferramentas no diagnóstico da exposição fetal ao álcool, auxiliando na identificação e intervenção precoce de crianças expostas e, conseqüentemente, na prevenção de deficiências secundárias.

Porém, antes de utilizar as determinações de FAEEs como ferramenta no diagnóstico clínico deve-se, primeiramente, avaliar a eficácia desse método em relação às informações de consumo materno de álcool.

Uma das formas mais utilizadas para avaliar a eficácia do método analítico é por meio da construção da curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*), uma ferramenta que avalia quantitativamente o desempenho do teste diagnóstico, pelas medidas de sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo.

A sensibilidade da análise dos FAEEs consiste na probabilidade do teste ser positivo para um indivíduo, quando ele realmente foi exposto ao álcool (verdadeiros positivos / expostos). Enquanto a especificidade é a probabilidade de um indivíduo ser negativo no teste dos FAEEs, quando ele realmente não foi exposto (verdadeiros negativos/ não expostos). Já os valores preditivos são calculados em relação ao resultado do teste e não em relação à exposição do consumo. Assim, o valor preditivo positivo consiste na proporção de indivíduos verdadeiramente expostos entre os positivos para os FAEEs (verdadeiros positivo/ teste positivo) e o valor preditivo negativo consiste na proporção de indivíduos verdadeiramente não expostos entre os negativos para FAEEs (verdadeiros negativo/teste negativo) (MARTINEZ, LOUZADA-NETO, PEREIRA, 2003). Para melhor compreender essas definições foi construída a Tabela 13, que associa o resultado do teste (análise das FAEEs no mecônio) com a presença de exposição ao consumo de álcool na gestação.

A curva ROC é empregada quando o resultado do teste é expresso em valores e necessita-se a determinação de um ponto de corte, ou seja, necessita de um valor de concentração de FAEEs que abaixo dele os resultados são considerados negativo para exposição e acima dele, como positivo. Cada ponto de corte está associado a um valor de sensibilidade e especificidade, sendo que a

escolha do ponto de corte pode ser arbitrária, de acordo com a finalidade clínica do teste. Ela é obtida pela plotagem da sensibilidade (verdadeiros positivos) versus 1-especificidade (falsos positivos) do teste, e pode-se calcular a área sob a curva (AUC, do inglês *Area Under the Curve*) que quanto mais próximo de 1, maior a capacidade do teste em discriminar indivíduos entre o grupo exposto e não exposto (MARTINEZ, LOUZADA-NETO, PEREIRA, 2003).

Tabela 13- Tabela de associação entre os resultado das análises dos FAEEs no mecônio e a presença de consumo de álcool na gestação

	Consumo de álcool		TOTAL	
	+	-		
Análise dos FAEEs no mecônio	+	Verdadeiros Positivos (VP)	Falso Positivo (FP)	Teste + (VP+FP)
	-	Falso Negativo (FN)	Verdadeiros Negativos (VN)	Teste - (FN+VN)
TOTAL	Expostos (VP +FN)	Não expostos (FP + VN)		

Há poucos estudos que avaliam a eficácia desse método analítico em identificar os casos positivos de exposição e mais estudos são necessários para estabelecer os pontos de corte para uma população. Assim, esse estudo tem como objetivo avaliar a exposição fetal ao álcool mediante comparação do consumo alcoólico materno e das análises dos FAEEs no mecônio, e contribuir com valores de referência para pontos de corte para esta população.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a eficácia de um método de quantificação de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs) no mecônio de recém-nascidos para avaliação da exposição fetal ao álcool.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar a amostra (mães e recém-nascidos) quanto ao perfil sociodemográfico e quanto aos parâmetros antropométricos do recém-nascido.
- Avaliar a exposição fetal ao álcool por meio de entrevistas e questionários validados (T-ACE e AUDIT);
- Aplicar um método de determinação de FAEEs em mecônio de recém-nascidos não expostos e expostos ao álcool durante a gestação;
- Avaliar comparativamente as concentrações de FAEEs em mecônio de recém-nascidos não expostos e expostos ao álcool durante a gestação: e verificar se há diferenças nas concentrações de FAEEs nos quatro tipos de padrões de consumo determinados pela pontuação no AUDIT;
- Avaliar o desempenho das medidas de FAEEs como método de identificação dos casos positivos para exposição fetal ao álcool, diante do método de referência de questionários e entrevistas;
- Correlacionar dados antropométricos dos recém-nascidos, fatores sociodemográficos e consumo de álcool da participante com a concentração de FAEEs em mecônio.



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Delineamento**

Inicialmente, optou-se por um estudo coorte de gestantes com consumo alcoólico de risco acompanhadas desde o primeiro trimestre gestacional em serviços de atendimento pré-natal. Porém, esse tipo de estudo resultou em uma coleta lenta e dificuldades no momento da coleta do mecônio, devido à imprevisibilidade da data do parto, uma vez que a maior parte dos partos foram normais. Sendo assim, esse estudo foi considerado como estudo piloto (APÊNDICE A) e delineou-se um tipo de estudo que permitia um maior controle na coleta das amostras de mecônio.

Então, o delineamento final consistiu em um estudo epidemiológico analítico observacional e transversal de uma amostra de recém-puérperas proveniente de uma maternidade da cidade de Ribeirão Preto do Estado de São Paulo.

#### **3.2 Participantes**

As participantes foram 160 recém-puérperas do Centro de Referência em Saúde da Mulher (CRSM-Mater), que atende gestantes de baixo risco do Sistema Único de Saúde, em Ribeirão Preto – SP. Somente as mães dos recém-nascidos cujo primeiro mecônio ainda não havia sido excretado, foram convidadas para participar da pesquisa. Elas foram recrutadas no leito de forma sequencial e por conveniência em até 24 horas após o parto.

Para participação na pesquisa, as puérperas tinham que atender os seguintes critérios de inclusão: puérperas em condições gerais de saúde física e mental que lhes permitiram fornecer sem embaraço, e que forneçam seu consentimento com plena clareza dos objetivos da pesquisa e seus direitos.

### **3.3 Coleta de dados**

As coletas de dados nessa instituição iniciaram em 15/01/2014, estendendo-se até 07/05/2014, sendo realizadas diariamente de segunda a sexta-feira, exceto feriados, no período das oito às 18 horas.

Para coleta de dados foi utilizado o questionário (APÊNDICE B) com 97 questões, divididas em sete seções. O questionário foi aplicado em forma de entrevista pela pesquisadora nos leitos, respeitando os horários da amamentação, refeição, avaliação da equipe de enfermagem e médica. O tempo médio de duração da entrevista variou de 20 a 30 minutos.

As respostas dos questionários foram digitadas em uma planilha do Excel para compor o banco de dados e depois exportadas para o programa estatístico MedCalc.

Neste estudo, fizeram parte das análises: a avaliação sociodemográfica, avaliação pelos instrumentos T-ACE e AUDIT, avaliação do consumo de álcool trimestral, avaliação dos dados antropométricos, descritos a seguir.

#### **3.3.1 Avaliação sociodemográfica**

Os dados sociodemográficos foram avaliados pela idade da mãe em anos, estado civil, escolaridade, cor de pele (segundo a classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), se exerce atividade remunerada, renda familiar em reais, se houve planejamento da gestação, idade gestacional em semanas, modo de parto, sexo do recém-nascido, número de consultas e ultrassonografias pré-natais.

#### **3.3.2 Instrumento T-ACE**

O instrumento T-ACE também foi aplicado nesta etapa do estudo e está descrito na seção 3.2.1. do capítulo anterior.

### 3.3.3 Instrumento AUDIT

O AUDIT (*Alcohol Use Disorder Identification Test*) é um instrumento de rastreamento preconizado pela Organização Mundial da Saúde para rastreamento em serviços de saúde, principalmente em serviços de atenção primária. É composto por dez questões: as três primeiras questões avaliam a quantidade e frequência do consumo; as três seguintes avaliam sintomas da dependência alcoólica e as quatro últimas avaliam o risco nocivo ao usuário.

A pontuação do AUDIT pode variar de 0 a 40 e, de acordo com a pontuação obtida, classifica o usuário em categorias de padrões de consumo de álcool. São elas: uso de baixo risco (0 a 7 pontos) no qual o indivíduo apresenta um consumo de baixo risco para consequências perigosas para si próprio como pra outrem; uso de risco (8 a 15 pontos) no qual o indivíduo apresenta um consumo que aumenta o risco para consequências perigosas para si próprio como para outrem, apesar de não ter sofrido ainda nenhum dano; uso nocivo (16 a 19 pontos) no qual o indivíduo apresenta um consumo que ocasiona danos a sua saúde; e provável dependência (20 a 40 pontos) onde o indivíduos apresenta sintomas da dependência alcoólica e deverá ser encaminhado para uma avaliação médica para confirmar o diagnóstico da dependência alcoólica (BABOR et al. 2001; MORETTI-PIRES, CORRADI-WEBSTER; 2011).

### 3.3.4 Avaliação do consumo trimestral

Nessa avaliação foi utilizado o método “*Alcohol timeline followback*” desenvolvido por Sobell e Sobell (1992) que estima retrospectivamente o uso de álcool, em uma linha de tempo com intervalos definidos. Neste estudo, os dados de consumo de álcool avaliados foram a quantidade (número de doses por ocasião e número total de doses) e frequência (número de ocasiões) do consumo de álcool durante o trimestre anterior a gestação e no 1º, 2º e 3º trimestre gestacional.

O padrão de consumo denominado tipo *binge* foi avaliado pelo consumo de três ou mais doses de álcool consumidas em uma única ocasião. Esse número foi adotado levando-se em consideração o limite de dose considerado de risco para o

desenvolvimento de problemas relacionados com a Síndrome Fetal do Álcool (SOKOL, MARTIER, AGER, 1989).

O número de doses, nesse estudo, refere-se ao número de doses padrão, sendo que cada dose padrão contém aproximadamente 12 gramas de etanol absoluto (WHO, 2010).

### **3.3.5 Avaliação dos dados antropométricos**

Os dados antropométricos e as condições dos recém-nascidos foram avaliadas pelas variáveis: peso, estatura, perímetro cefálico, perímetro torácico, escores de Apgar no 1º e 5º minuto. Esses dados foram retirados do prontuário médico.

### **3.4 Coleta do mecônio**

A coleta procedeu conforme as descrições no capítulo II e item 3.3.

### **3.5 Aspectos éticos**

Para coleta de dados e amostras no Centro de Referência da Saúde e da Mulher de Ribeirão Preto – Mater (CRSM - Mater), o projeto foi primeiramente aprovado pela Comissão de Pesquisa da CRSM - Mater para realização do projeto na Instituição (ver ANEXO C) e, em seguida, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (ver ANEXO D).

### **3.6 Análise dos FAEEs no mecônio**

Para determinação dos FAEEs nas 160 amostras de mecônio coletado, foi aplicado o método desenvolvido e validado descrito no capítulo anterior.

A quantificação dos analitos foi obtida pelo método de padronização interna, ou seja, a concentração é calculada baseada na razão das áreas dos picos cromatográficos (área do analito/área do padrão interno). Considerando-se a razão

das áreas igual a “y” na equação da reta da curva analítica recém preparada, obtém-se o valor de concentração que, em seguida, é corrigida pela quantidade em gramas de mecônio processado. Assim, os resultados foram expressos em nanogramas do analito por grama de mecônio. Quando as concentrações apresentassem valor abaixo do limite inferior de quantificação (LIQ) eram expressas como <LIQ.

Algumas amostras foram reanalisadas quando apresentaram valores acima do LIQ (no caso de amostras consideradas não expostas pelo relato materno). Também foram reanalisadas amostras que apresentaram valores acima do LSQ. Nesse caso, foi utilizado, inicialmente, o procedimento de diluição de amostras. Porém, devido à dificuldade de diluição desse tipo de amostra, optou-se por construir uma curva analítica que contemplasse o valor da amostra a ser analisado.

### 3.7 Análise estatística

As variáveis dependentes obtidas neste estudo foram as concentrações de FAEEs no mecônio, definidas pelas concentrações individuais dos quatro FAEEs e, bem como, pela somatória de suas concentrações. As variáveis independentes avaliadas foram: dados de consumo de álcool durante a gestação, dados sociodemográficos e dados antropométricos do recém-nascido.

Primeiramente, foram realizadas as análises exploratórias das variáveis por meio da estatística descritiva. As variáveis categóricas foram descritas pela frequência absoluta e relativa e as variáveis contínuas foram descritas por medidas de tendência central (média, mediana) e por medidas dispersivas (desvio-padrão, mínimo e máximo).

Em seguida, foram realizadas as análises inferenciais. Na comparação das concentrações de FAEEs entre dois grupos (grupo exposto e não exposto) foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. E, para comparação entre três ou mais grupos (entre as quatro categorias de consumo definida pelo AUDIT), foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal –Wallis. Quando o teste de Kruskal –Wallis apresentasse  $p < 0,05$ , foi realizado o teste de comparação pareada de acordo com Conover (1999).

Na comparação entre a frequência e a quantidade de álcool consumido nos quatro trimestres avaliados, foi realizado o teste não paramétrico de Friedman.

Quando o teste de Friedman apresentasse  $p < 0,05$ , foi realizado o teste de comparações múltiplas.

Na avaliação da eficácia da análise dos FAEEs em identificar os casos positivos, considerou-se como referência o relato retrospectivo do consumo materno de álcool. Nessa avaliação foi construída a curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) e determinada a área sob a curva (AUC, do inglês *Area Under the Curve*) que avalia o desempenho do teste, ou seja, quanto mais próximo de 1, maior a capacidade do teste em discriminar indivíduos entre o grupo exposto e não exposto.

Por meio da curva ROC, foi determinado um ponto de corte para a concentração dos FAEEs de modo a priorizar a sensibilidade do método. Cada ponto de corte está associado um valor de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade da análise dos FAEEs consiste na probabilidade do teste ser positivo para um indivíduo, quando ele realmente foi exposto ao álcool. Já a especificidade é a probabilidade de um indivíduo ser negativo no teste dos FAEEs, quando ele realmente é negativo. Também foram calculados o valor preditivo positivo (proporção de indivíduos verdadeiramente expostos entre os positivos para os FAEEs) e preditivo negativo (proporção de indivíduos verdadeiramente não expostos entre os negativos para FAEEs).

Na avaliação da eficácia do método pela curva ROC, foram realizadas duas análises: uma utilizando a amostra total e a outra análise excluindo alguns casos que apresentaram resultados inconsistentes, ou seja, quando o resultado das análises fosse positivo para FAEEs e negativo para o consumo, ou positivo para consumo e negativo para os FAEEs. Essa segunda análise foi realizada com o intuito de analisar somente os casos consistentes, e obter valores de ponto de corte condizentes com a exposição.

As análises de correlações entre as concentrações dos FAEEs e as variáveis de contínuas e ordinais foram realizadas pelo teste de Spearman, com determinação do coeficiente rho.

Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 0,05. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico MedCalc Versão 15.11.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da amostra do estudo

A amostra foi composta por 160 pares de mães e recém-nascidos.

Em relação às características sociodemográficas, apresentadas na Tabela 14, as participantes apresentaram idade média de 26 anos ( $M=26,2$ ;  $DP=6,0$ ), sendo a maioria casada ou moram junto com o companheiro (84,2%), e tendo alcançado nível de escolaridade do ensino fundamental completo ou acima deste (76,9%).

De acordo com a classificação da cor de pele, que seguiu os critérios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 48,8% das participantes declararam-se pardas. A maioria não exercia atividade remunerada no momento da entrevista (60,6%), e apresentaram uma média de renda familiar de 1448 reais ( $DP=917,78$  reais).

Em relação ao gênero dos recém-nascidos, 51,9% são do sexo masculino e 48,1% do sexo feminino. A maioria nasceu de parto normal (70%), com média aproximada de 39,4 semanas. O número médio de consultas pré-natais e ultrassonografias realizadas pelas participantes foi de 8,3 consultas ( $DP=2,4$ ) e 5,0 ultrassonografias ( $DP=1,3$ ). E a maior parte da gestação não foi planejada (68,9%).

As características antropométricas e os índices de Apgar dos recém-nascidos foram apresentados por medidas de tendência central (média, mediana) seguidas de medidas de dispersão (desvio padrão, mínimo e máximo), descritos Tabela 15.

Em geral, os recém-nascidos do estudo apresentaram uma média de peso de 3209,5 gramas ( $DP=469,3$ ), estatura de 48,7 centímetros ( $DP=2,1$ ), perímetro cefálico de 34 centímetros ( $DP=1,4$ ) e perímetro torácico de 32,6 centímetros ( $DP=1,8$ ). A média do índice de Apgar foi de 8,5 ( $DP=1,5$ ) no primeiro minuto de vida, e de 9,5 ( $DP=1,0$ ) no quinto minuto.

Tabela 14- Características sociodemográficas das participantes

<b>Variáveis categóricas</b>	<b>Categorias</b>	<b>N=160</b>	<b>Porcentagem (%)</b>			
Estado civil	Casada	48	30,0			
	Vive junto	85	53,1			
	Solteira	24	15,0			
	Divorciada	1	0,6			
	Viúva	0	0,0			
	Não informaram	2				
Escolaridade	Nenhuma	0	0,0			
	Fundamental Incompleto	37	23,1			
	Fundamental Completo	12	7,5			
	Médio Incompleto	46	28,8			
	Médio Completo	54	33,8			
	Superior Incompleto	8	5,0			
	Superior Completo	3	1,9			
Cor de pele	Branca	48	30,0			
	Parda	78	48,8			
	Preta	15	9,4			
	Amarela	16	10,0			
	Indígena	3	1,9			
Atividade remunerada	Sim	97	60,6			
	Não	63	39,4			
Parto	Normal	112	70,0			
	Césarea	48	30,0			
Gênero do RN	Feminino	77	48,1			
	Masculino	83	51,9			
Gestação planejada	Sim	53	33,1			
	Não	107	66,9			
<b>Variáveis contínuas</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Idade da mãe (anos)	160	26,2	6,0	26	18	41
Renda familiar (reais)	160	1448,00	917,78	1800,00	400,00	5000,00
Idade gestacional (semanas)	160	39,4	1,4	39	35	42
Consultas pré-natais	160	8,3	2,4	8	0	15
Ultrassonografias gestacionais	160	5,0	1,3	3	0	7



Tabela 15- Dados antropométricos ao nascer e índice de Apgar dos neonatos

Variável	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máxima
Peso (g)	160	3209,5	469,3	3160	2225	4795
Estatura (cm)	160	48,7	2,1	48,5	44,5	54,0
Perímetro Ceflico (cm)	160	34,0	1,4	34	30,5	38,5
Perímetro Torácico (cm)	160	32,6	1,8	33	28	38
Apgar 1º minuto	160	8,5	1,5	9	1	10
Apgar 5ºminuto	160	9,5	1,0	10	0	10

#### 4.2 Avaliação da exposição fetal ao álcool mediante questionários

As 160 mães participantes foram rastreadas pelo questionário T-ACE, quanto ao consumo alcoólico de risco. Na Figura 20, está ilustrado a distribuição das pontuações dessas participantes, que variou de zero a quatro pontos.

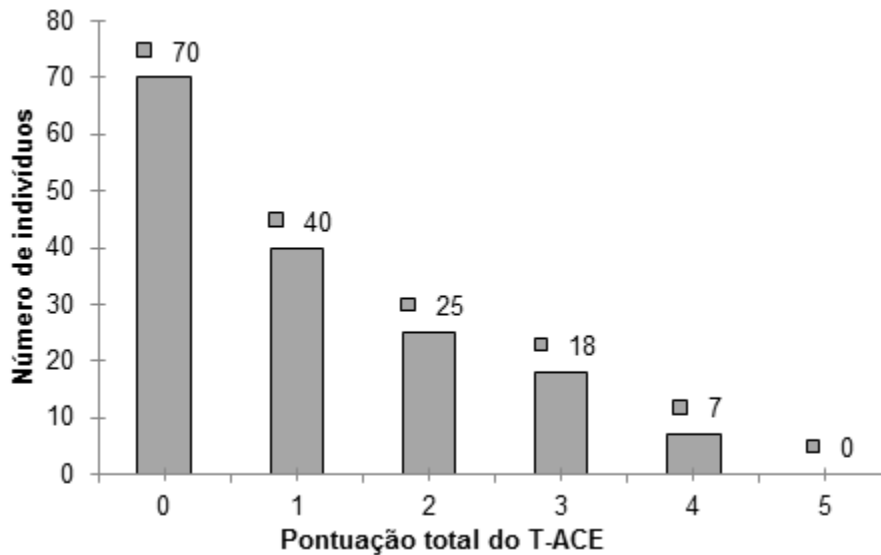


Figura 20– Distribuição das participantes de acordo com a pontuação obtida no questionário T-ACE.

De acordo com a pontuação no questionário T-ACE, 68,75% (110/160) das participantes foram classificadas com um padrão de consumo de álcool de baixo risco (grupo T-ACE negativo) e 31,3% (50/160) classificadas com um padrão de consumo de álcool de risco (grupo T-ACE positivo).

Quanto ao resultado obtido pelo questionário AUDIT, a distribuição das pontuações variou de 0 a 28 pontos. Em relação à classificação em categorias de padrão de consumo de álcool, 78,8% (126/160) das participantes pertenciam à categoria uso de baixo risco, 12,5% (20/160) à categoria uso de risco, 4,4% (7/160) à categoria de uso nocivo e 4,4% (7/160) à categoria de provável dependente (Figura 21).

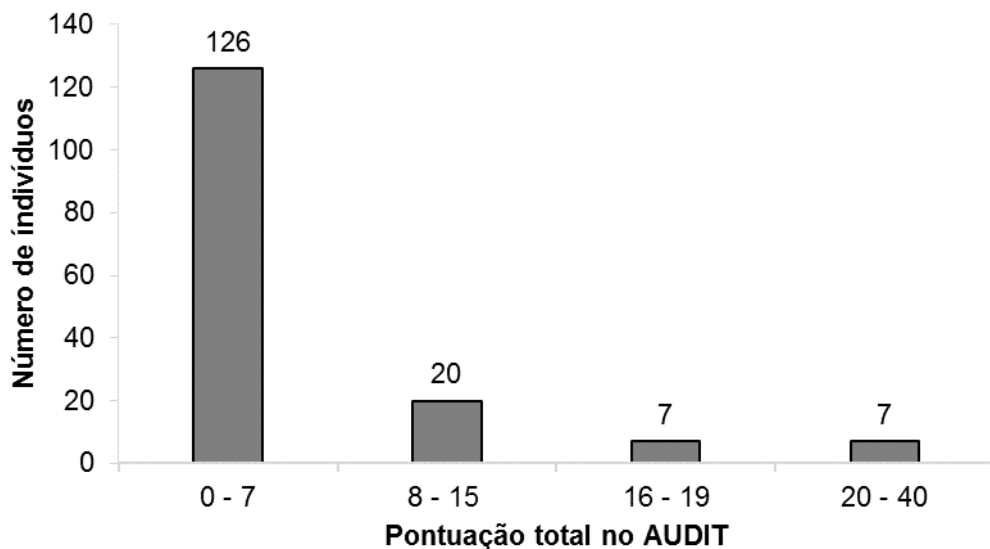


Figura 21- Distribuição das participantes de acordo com a pontuação obtida no questionário AUDIT. 0 a 7 pontos: categoria uso de baixo risco; 8 a 15 pontos categoria uso de risco; 16 a 19 pontos: categoria uso nocivo; 20-40 pontos: provável dependência.

De acordo com a Figura 21, 21,3% (34/160) das participantes apresentaram no mínimo um consumo alcoólico de risco. Essa classificação é utilizada para mulheres não gestantes. Porém, deve-se ressaltar que as participantes são recém-puerperas e seu consumo alcoólico habitual diz respeito ao período gestacional. Assim, ao considerar que o consumo de qualquer quantidade de álcool ao longo da gestação pode ser considerado como de risco para a saúde do feto, a porcentagem de participantes classificadas como no mínimo consumidoras de risco sobe de 21,3% para 56,3%.

As participantes também tiveram seu consumo alcoólico categorizado pelo cálculo do número de doses por ocasião, número de ocasiões e número de doses no total consumidas nos últimos 12 meses, subdivididos em trimestres: no trimestre anterior a gestação e no primeiro, segundo e terceiro trimestres gestacionais. Os resultados estão apresentados na Tabela 16 e Figuras 22, 23 e 24.

A média de ocasiões em que as participantes fizeram uso de álcool diminuiu de 7,6 (DP=14,5) no trimestre anterior a gestação, para 4,2 (DP=10,0) no primeiro trimestre, 2,1 (DP=5,6) no segundo trimestre, e 1,7 (DP=4,4) no terceiro trimestre. O mesmo ocorreu com a média de doses consumidas por ocasião, que diminuiu de 2,4 (DP=4,8) no trimestre anterior a gestação para 1,9 (DP=4,7) no primeiro trimestre, 1,0 (DP=3,4) no segundo trimestre e 0,8 (DP=1,8) no terceiro trimestre. A diminuição da média do número de ocasiões de uso de álcool bem como da média do número de doses por ocasião, refletiu na diminuição da média do número total de doses consumido por trimestre, que foi de 60,5 (DP=191,5) no trimestre anterior a gestação para 38,4 (DP=167,7) no primeiro trimestre, 12,3 (DP=55,2) no segundo trimestre e 5,1 (DP=17,8) no terceiro trimestre.

Tabela 16– Consumo de álcool pelas gestantes durante o trimestre anterior a gestação e durante a gestação

Variáveis	Período	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Teste de Friedman		Comparações múltiplas		
							F	p	Pares	Rank médio	p
Número de ocasiões que bebeu	Antes gestação	7,6	14,5	0	0	84	26,9662	<0,00001	a -b, c, d	2,9281	<0,05
	1º trimestre	4,2	10	0	0	84			b-a, c, d	2,5156	<0,05
	2º trimestre	2,1	5,6	0	0	28			c-a, b	2,2313	<0,05
	3º trimestre	1,7	4,4	0	0	24			d-a, b	2,3250	<0,05
Número de doses por ocasião	Antes gestação	2,4	4,8	0	0	32	24,9451	<0,00001	a -b, c, d	2,8906	<0,05
	1º trimestre	1,9	4,7	0	0	32			b-a, c, d	2,5375	<0,05
	2º trimestre	1	3,4	0	0	32			c-a, b	2,2219	<0,05
	3º trimestre	0,8	1,8	0	0	12			d-a, b	2,3500	<0,05
Número total de doses que bebeu	Antes gestação	60,5	191,5	0	0	1680	32,3433	<0,00001	a -b, c, d	2,9813	<0,05
	1º trimestre	38,4	167,7	0	0	1680			b-a, c, d	2,5000	<0,05
	2º trimestre	12,3	55,2	0	0	560			c-a, b	2,2219	<0,05
	3º trimestre	5,1	17,8	0	0	144			d-a, b	2,2969	<0,05

F

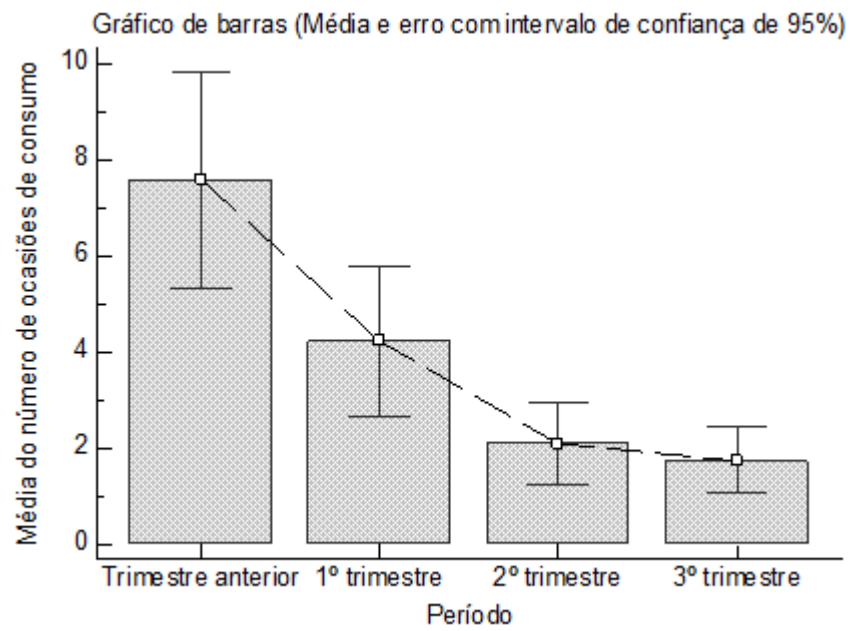


Figura 22– Gráfico de barras ilustrado pela média e erro (intervalo de confiança de 95%) do número de ocasiões de consumo de álcool no trimestre anterior à gestação e nos três trimestres gestacionais.

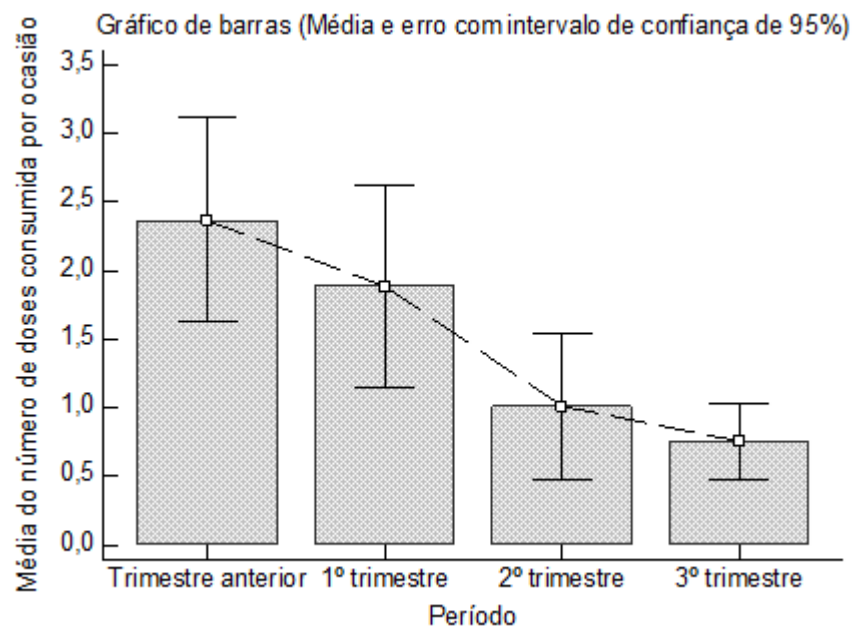


Figura 23– Gráfico de barras ilustrado pela média e erro (intervalo de confiança de 95%) do número de doses padrão de álcool consumidas por ocasião no trimestre anterior à gestação e nos três trimestres gestacionais.

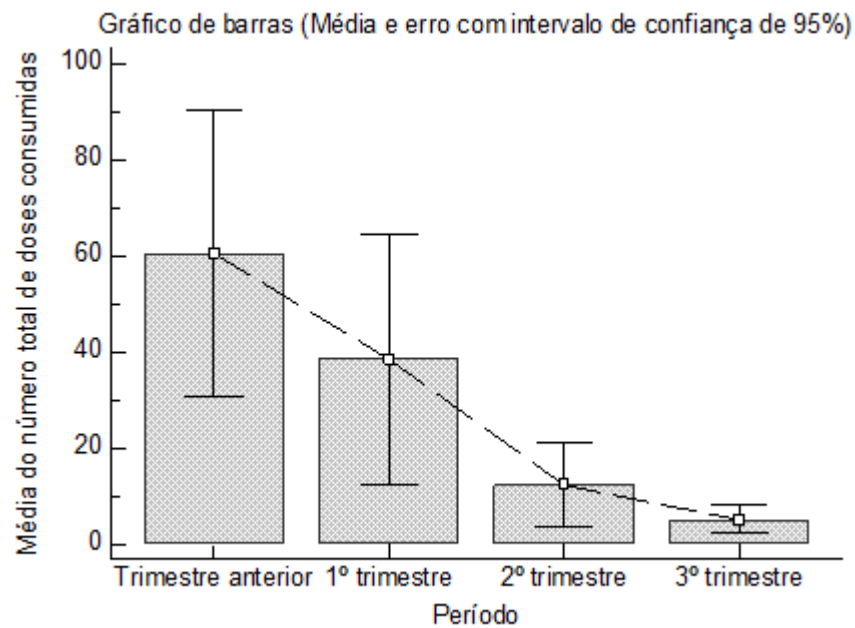


Figura 24– Gráfico de barras ilustrado pela média e erro (intervalo de confiança de 95%) do número total de doses padrão de álcool consumidas no trimestre anterior à gestação e nos três trimestres gestacionais.

Também foram avaliados o uso de qualquer quantidade de álcool e o uso tipo *binge* (consumo três ou mais doses em uma única ocasião) no trimestre anterior à gestação e nos três trimestres gestacionais. Os resultados estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17– Uso de qualquer quantidade de álcool e uso tipo *binge* no trimestre anterior a gestação e nos três trimestres gestacionais.

Período de uso	Qualquer uso de álcool		Uso tipo <i>binge</i>	
	N	Porcentagem (%)	N	Porcentagem (%)
Antes gestação	71	44,4	45	28,1
1º trimestre	56	35,0	30	18,8
2º trimestre	39	24,4	18	11,3
3º trimestre	54	33,8	13	8,1
1º ou 2º ou 3º trimestre	80	50,0	34	21,3
1º e 2º e 3º trimestre	24	15,0	10	6,3
Apenas no 1º trimestre	15	9,4	15	9,4

50% (80/160) das participantes fizeram uso de álcool pelo menos uma vez durante a gestação, 15% (24/160) fizeram uso nos três trimestres gestacionais e

9,4% (15/160) consumiram apenas no primeiro trimestre gestacional. A porcentagem de participantes que fizeram uso de álcool no trimestre anterior a gestação foi 44,4% (71/160). No primeiro trimestre gestacional, essa porcentagem diminuiu para 35% (56/160) e no segundo trimestre chegou a 24,4% (39/160). No último trimestre gestacional, houve um aumento para 33,8% (54/160).

Em relação ao uso tipo *binge* (consumo três ou mais doses em uma única ocasião) 21,3% (34/160) das participantes fizeram o uso desse tipo pelo menos uma vez durante a gestação, 6,3% (10/160) fizeram uso nos três trimestres gestacionais e 9,4% (15/160) consumiram apenas no primeiro trimestre gestacional. O número de participantes que fizeram uso tipo *binge* também diminuiu ao longo dos quatro trimestres, sendo que 28,1% (45/160) fizeram uso no trimestre anterior a gestação, 18,8% (30/160) no primeiro trimestre, 11,3% (18/160) no segundo trimestre e 8,1% (13/160) no terceiro trimestre gestacional.

### 4.3 Determinação dos FAEEs no mecônio

O método analítico desenvolvido e validado foi aplicado nas 160 amostras de mecônio dos recém-nascidos do estudo. Os FAEEs determinados foram o palmitato, linoleato, oleato e estearato de etila. A concentração individual dos FAEEs foi determinada bem como a somatória das concentrações. Os resultados foram expressos em nanogramas do analito por grama de mecônio (ng/g). Na Tabela 18 estão expressos os valores de média, desvio padrão, mediana e valores mínimo e máximo para cada analito e para a somatória dos FAEEs e na Tabela 19 estão apresentados os números de indivíduos no qual os analitos FAEEs foram detectados e quantificados no mecônio. No Apêndice C está ilustrado o perfil de distribuição dos FAEEs quantificados no mecônio desses recém-nascidos.

O analito que apresentou a maior média de concentração foi o linoleato de etila (506,0 ng/g), seguido do oleato de etila (340,2 ng/g), palmitato de etila (112,8 ng/g) e estearato de etila (21,8 ng/g). A média da somatória das concentrações dos quatro FAEEs resultou em 980,9 ng/g.

Tabela 18– Concentração em ng/g dos FAEEs quantificados nas 160 amostras de mecônio

FAEEs	Concentração dos FAEEs (ng/g)				
	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Palmitato de etila	112,8	372,4	0,0	0,0	3368,1
Linoleato de etila	506,0	1416,4	0,0	0,0	10002,6
Oleato de etila	340,2	946,4	0,0	0,0	7020,8
Estearato de etila	21,8	67,6	0,0	0,0	389,5
Total FAEEs	980,9	2494,4	118,2	0,0	20127,2

O analito que apresentou maior prevalência foi o oleato de etila, sendo detectado em 56,9% dos casos e quantificado em 48,2%. O segundo analito mais prevalente foi o linoleato de etila, seguido do palmitato de etila e do estearato de etila sendo detectados em 36,9%, 35,6% e 26,3% dos casos, respectivamente e quantificados em 35,6%, 28,8% e 16,3%, respectivamente. Em relação a somatória das concentrações dos FAEEs, 58,8% dos casos apresentaram, no mínimo, um FAEEs detectado e em 51,3% dos casos pelo menos um FAEEs quantificado.

Tabela 19– Prevalência dos casos em que foram detectados e quantificados os FAEEs.

FAEEs	Detecção dos FAEEs		Quantificação dos FAEEs	
	N	%	N	%
Palmitato de etila	57	35,6	46	28,8
Linoleato de etila	59	36,9	57	35,6
Oleato de etila	91	56,9	77	48,1
Estearato de etila	42	26,3	26	16,3
Total FAEEs	94	58,8	82	51,3



Nas Figuras 25 e 26 está ilustrado o cromatograma obtido pela análise uma amostra positiva, segundo o relato materno, e que apresentou concentração acumulativa dos FAEEs de 873 ng/g.

.

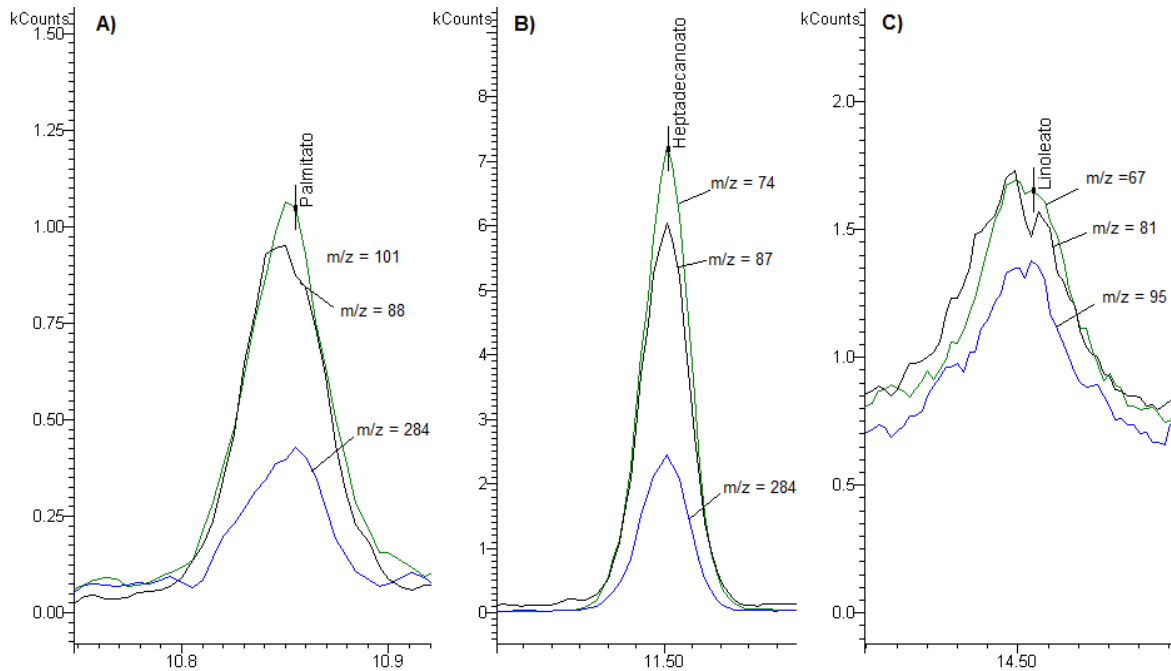


Figura 25– Cromatograma de uma amostra positiva (M69) com os íons de quantificação (verde), e de detecção (preto e azul) para o padrão interno heptadecanoato de metila (B) e para os analitos palmitato de etila (A) e linoleato de etila (C).

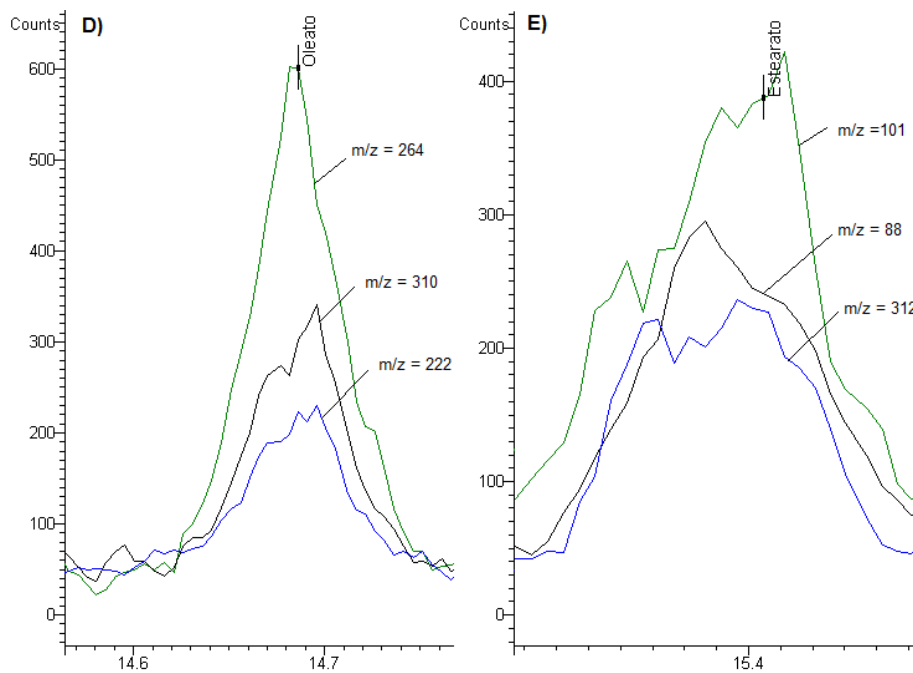


Figura 26– Cromatograma de uma amostra positiva (M69) com os íons de quantificação (verde), e de detecção (preto e azul) para os analitos: oleato de etila (D) e estearato de etila (E).

#### 4.4 Comparação das concentrações dos FAEEs entre os grupos exposto e não exposto

Para fins de comparação das concentrações dos FAEEs entre os grupos denominados exposto e não exposto ao álcool durante a gestação, foram realizadas diversas comparações de acordo com diferentes classificações baseadas em questionários validados e no relato materno. Os resultados foram expressos em medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio padrão, mínimo e máximo) das concentrações individuais e totais dos analitos para cada grupo. Na análise inferencial foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A primeira comparação foi realizada de acordo com a classificação da pontuação do questionário T-ACE que identifica as participantes como consumidoras de álcool de baixo risco (T-ACE negativo) e de alto risco (T-ACE positivo).

Pode-se observar, na Tabela 20, uma diferença na concentração entre os dois grupos para os quatros analitos bem como a somatória de suas concentrações. O linoleato de etila foi o analito que apresentou um menor valor de “p” (<0,0001).

Tabela 20– Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre os grupos exposto e não exposto de acordo com o questionário T-ACE.

FAEEs (ng/g)	Pontuação T-ACE	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Análise inferencial U	p
Palmitato de etila	T-ACE -	110	85,7	278,6	0,0	0	1958,7	2060	0,0016*
	T-ACE +	50	172,5	521,7	0,0	0	3368,1		
Linoleato de etila	T-ACE -	110	219,9	993,0	0,0	0	10002,6	1620	<0,0001*
	T-ACE +	50	1135,2	1931,0	265,7	0	9435,0		
Oleato de etila	T-ACE -	110	305,4	876,8	0,0	0	5929,7	2166,5	0,0209*
	T-ACE +	50	416,9	1089,7	126,8	0	7020,8		
Estearato de etila	T-ACE -	110	12,5	53,8	0,0	0	346,3	2054,5	0,0001*
	T-ACE +	50	42,3	88,3	0,0	0	389,5		
Total FAEEs	T-ACE -	110	623,7	1938,2	0,0	0	15885,3	1675	<0,0001*
	T-ACE +	50	1766,8	3303,9	642,5	0	20127,2		

A segunda comparação das concentrações dos FAEEs entre os grupos utilizou a classificação segundo da pontuação do questionário AUDIT, que identifica

as usuárias com consumo de baixo de risco (AUDIT negativo) e usuárias com no mínimo um consumo risco ou nocivo ou prováveis dependentes (AUDIT positivo).

Na Tabela 21, observou-se uma diferença na concentração entre os dois grupos para os analitos, exceto para o estearato de etila. E, mais uma vez, o linoleato de etila foi o analito que apresentou um menor valor de “p” (<0,0001).

Tabela 21– Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre os grupos exposto e não exposto de acordo com o questionário AUDIT.

FAEEs (ng/g)	Pontuação AUDIT	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Análise inferencial	
								U	p
Palmitato de etila	AUDIT -	126	85,9	269,2	0,0	0,0	1959,0	1551	0,0022*
	AUDIT +	34	212,8	617,0	40,0	0,0	3368,0		
Linoleato de etila	AUDIT -	126	308,8	1149,0	0,0	0,0	10003,0	1222	<0,0001*
	AUDIT +	34	1236,5	1991,6	404,5	0,0	9435,0		
Oleato de etila	AUDIT -	126	314,2	859,3	0,0	0,0	5930,0	1683	0,0396*
	AUDIT +	34	436,5	1227,5	133,5	0,0	7021,0		
Estearato de etila	AUDIT -	126	19,9	66,5	0,0	0,0	390,0	1883,5	0,0984
	AUDIT +	34	28,8	72,3	0,0	0,0	303,0		
Total FAEEs	AUDIT -	126	729,0	2002,9	0,0	0,0	15885,0	1343,5	0,0004*
	AUDIT +	34	1914,6	3693,4	693,5	0,0	20127,0		

Na terceira comparação das concentrações dos FAEEs entre os grupos foi utilizado a classificação segundo o relato materno do uso ou não uso de qualquer quantidade de álcool durante a gestação. E como resultado, observou-se, novamente, uma diferença na concentração entre os dois grupos para três dos quatros analitos bem como para somatória de suas concentrações. E linoleato de etila foi o analito que apresentou um menor valor de “p” (<0,0001) (Tabela 22).

Tabela 22 - Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre os grupos exposto e não exposto de acordo com o relato materno referentes ao uso de qualquer quantidade de álcool durante a gestação.

FAEEs (ng/g)	Uso de álcool	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Análise inferencial	
								U	p
Palmitato de etila	Não	80	49,8	180,0	0,0	0,0	1294,0	2470	0,002*
	Sim	80	175,9	488,5	0,0	0,0	3368,0		
Linoleato de etila	Não	80	141,1	357,6	0,0	0,0	2217,0	2327	0,0005*
	Sim	80	870,8	1907,9	0,0	0,0	10003,0		
Oleato de etila	Não	80	172,2	333,7	0,0	0,0	1959,0	2719	0,0776
	Sim	80	508,2	1278,4	90,5	0,0	7021,0		
Estearato de etila	Não	80	12,8	58,7	0,0	0,0	390,0	2655,5	0,0044*
	Sim	80	30,9	74,8	0,0	0,0	346,0		
Total FAEEs	Não	80	376,0	717,8	0,0	0,0	3431,0	2442,5	0,0061*
	Sim	80	1585,8	3356,5	278,0	0,0	20127,0		

A quarta comparação das concentrações de FAEEs utilizou a classificação dos grupos baseada no uso e não uso do tipo *binge* (três ou mais doses em uma única ocasião) durante qualquer período gestacional. Como resultado, observou-se uma diferença na concentração entre os dois grupos para os analitos, exceto, para o oleato de etila. E, mais uma vez, o linoleato de etila foi o analito que apresentou um menor valor de “p” (<0,0001) (Tabela 23).

Tabela 23- Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre os grupos exposto e não exposto de acordo com o relato materno referentes ao uso tipo *binge* (três ou mais doses em uma única ocasião) durante a gestação.

FAEEs (ng/g)	Uso <i>Binge</i>	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Análise inferencial	
								U	p
Palmitato de etila	Não	123	90,2	284,8	0,0	0,0	1959,0	1532	0,0002*
	Sim	37	188,1	574,5	45,0	0,0	3368,0		
Linoleato de etila	Não	123	308,0	1057,2	0,0	0,0	10003,0	1361	<0,0001*
	Sim	37	1164,2	2119,8	290,0	0,0	9435,0		
Oleato de etila	Não	123	329,8	883,8	0,0	0,0	5930,0	1842	0,0593
	Sim	37	374,9	1143,6	133,0	0,0	7021,0		
Estearato de etila	Não	123	15,6	62,1	0,0	0,0	390,0	1656,5	0,0001*
	Sim	37	42,5	81,0	0,0	0,0	303,0		
Total FAEEs	Não	123	743,7	2016,9	0,0	0,0	15885,0	1421	0,0002*
	Sim	37	1769,5	3586,5	657,0	0,0	20127,0		

A última comparação das concentrações FAEEs foi entre as quatro categorias de padrão de consumo determinadas pelo questionário AUDIT. Houve uma diferença nas concentrações entre a primeira e segunda categoria, e entre a primeira e terceira categoria para os analitos palmitato e linoleato e para a concentração total de FAEEs (Tabela 24).

Tabela 24– Comparação das concentrações dos FAEEs no mecônio entre quatro categorias de padrão de consumo determinadas pelo questionário AUDIT.

FAEEs (ng/g)	Categorias AUDIT	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Análise inferencial Grupos	p
Palmitato de etila	Baixo risco <sup>a</sup>	126	85,9	269,2	0,0	0,0	1959,0	a-b,c	0,0039*
	Uso de risco <sup>b</sup>	20	162,8	336,7	44,5	0,0	1171,0	b-a	
	Uso nocivo <sup>c</sup>	7	548,4	1245,1	97,0	0,0	3368,0	c-a	
	Provável dependência <sup>d</sup>	7	20,0	39,1	0,0	0,0	103,0		
Linoleato de etila	Baixo risco <sup>a</sup>	126	308,8	1149,0	0,0	0,0	10003,0	a-b,c	0,0001*
	Uso de risco <sup>b</sup>	20	1034,8	1445,8	404,5	0,0	4872,0	b-a	
	Uso nocivo <sup>c</sup>	7	2660,7	3405,2	2163,0	0,0	9435,0	c-a	
	Provável dependência <sup>d</sup>	7	388,7	511,2	86,0	0,0	1323,0		
Oleato de etila	Baixo risco <sup>a</sup>	126	314,2	859,3	0,0	0,0	5930,0		0,2225
	Uso de risco <sup>b</sup>	20	291,3	497,8	141,0	0,0	2168,0		
	Uso nocivo <sup>c</sup>	7	1120,4	2604,6	134,0	0,0	7021,0		
	Provável dependência <sup>d</sup>	7	167,6	135,1	133,0	0,0	353,0		
Estearato de etila	Baixo risco <sup>a</sup>	126	19,9	66,5	0,0	0,0	390,0		0,1558
	Uso de risco <sup>b</sup>	20	25,5	67,2	0,0	0,0	286,0		
	Uso nocivo <sup>c</sup>	7	61,3	111,1	0,0	0,0	303,0		
	Provável dependência <sup>d</sup>	7	5,9	15,5	0,0	0,0	41,0		
Total FAEEs	Baixo risco <sup>a</sup>	126	729,0	2002,9	0,0	0,0	15885,0	a-b,c	<0,05*
	Uso de risco <sup>b</sup>	20	1514,3	2084,2	642,5	0,0	6979,0	b-a	
	Uso nocivo <sup>c</sup>	7	4390,9	7145,9	2434,0	0,0	20127,0	c-a	
	Provável dependência <sup>d</sup>	7	582,0	668,5	183,0	0,0	1819,0		

#### 4.5 Avaliação do desempenho das medidas FAEEs como método de identificação dos casos positivos

Inicialmente, foi construída uma tabela de contingência para todos os casos avaliados (Tabela 25) para avaliar isoladamente as variáveis dicotômicas: uso de

álcool em qualquer momento da gestação e a presença de FAEEs no mecônio (superior ao limite de quantificação do método analítico).

Tabela 25– Associação entre consumo de álcool na gestação e a presença de FAEEs no mecônio.

Análises dos FAEEs	Consumo de álcool na gestação		Total
	Não	Sim	
<b>FAEEs negativo</b> (Concentração < LIQ)	45	33	78
<b>FAEEs positivo</b> (Concentração ≥ LIQ)	35	47	82
<b>Total</b>	80	80	160

Consumo de álcool na gestação: consumo referido pela mãe de qualquer quantidade de álcool em qualquer período gestacional.

Em relação aos resultados concordantes entre a análise dos FAEEs e entrevista materna, 47 casos (29,4%) foram positivos para presença de FAEEs e relato materno, e 45 casos (28,13%) foram negativos para ambos os testes.

Já em relação aos valores discordantes, 35 casos (21,9%) foram positivos para FAEEs e negativo para relato materno, sendo que 20 casos (12,5%) apresentaram FAEEs em altas concentrações (maior que 500 ng/g). Por outro lado, 33 (20,6%) casos foram positivos para relato materno e negativo para FAEEs.

O desempenho das medidas dos FAEEs em identificar os casos positivos, levando como referência as informações obtidas no relato materno, também foram avaliadas através da curva ROC, com a determinação da área sob a curva (AUC) e do ponto de corte da concentração dos analitos para positividade dos casos. A partir desse ponto de corte, foram calculadas a sensibilidade e especificidade do método, bem como os valores preditivo positivo e negativo do teste. Os resultados dessa avaliação estão descritos na Tabela 26.

Em geral, a área sob a curva foi significativamente diferente de 0,5 para todos os FAEEs nos critérios de exposição: uso de qualquer quantidade de álcool no trimestre anterior a gestação e no primeiro trimestre, e consumo tipo *binge* durante a gestação. Para todos os critérios de exposição, a somatória dos FAEEs apresentou melhor sensibilidade para detectar a exposição quando comparada a utilização de um único biomarcador.

Tabela 26– Parâmetros da avaliação da eficácia do método de análises de FAEEs em mecônio diante diferentes critérios de exposição

<b>Crítérios de exposição</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Total FAEEs</b>	<b>Palmitato de etila</b>	<b>Linoleato de etila</b>	<b>Oleato de etila</b>	<b>Estearato de etila</b>
Uso de álcool (em qualquer quantidade e período)	Sensibilidade (%)	55	40	45	41,2	25
	Especificidade (%)	70	82,5	78,7	73,7	92,5
	Ponto de corte (ng/g)	172	0	179	172	0
	Valor preditivo Positivo	64,7	69,6	67,9	61,1	76,9
	Valor preditivo Negativo	60,9	57,9	58,9	55,7	55,2
	AUC	0,618	0,614	0,636	0,575	0,585
	P	0,0046	0,0013	0,0003	0,0737	0,0031
Uso trimestre anterior	Sensibilidade (%)	60,6	42,3	49,3	59,2	23,9
	Especificidade (%)	68,5	82	75,3	60,7	89,9
	Ponto de corte (ng/g)	153	0	0	0	0
	Valor preditivo Positivo	60,6	65,2	61,4	54,5	65,4
	Valor preditivo Negativo	68,5	64	65	65,1	59,7
	AUC	0,642	0,618	0,639	0,594	0,569
	P	0,0007	0,0012	0,0003	0,0266	0,0219
Uso 1º trimestre	Sensibilidade (%)	57,1	46,4	50	42,9	26,8
	Especificidade (%)	72,1	80,8	80,8	76,9	90,4
	Ponto de corte (ng/g)	275	0	238	195	9
	Valor preditivo Positivo	52,5	56,5	58,3	50	60
	Valor preditivo Negativo	75,8	73,7	75	71,4	69,6
	AUC	0,637	0,633	0,671	0,595	0,58
	P	0,0027	0,0008	<0,0001	0,0336	0,0171
Uso 2º trimestre	Sensibilidade (%)	64,1	41	53,8	64,1	28,2
	Especificidade (%)	65,3	75,2	70,2	57	91,7
	Ponto de corte (ng/g)	175	0	0	0	45
	Valor preditivo Positivo	31,7	34,8	36,8	32,5	52,4
	Valor preditivo Negativo	83,3	79,8	82,5	83,1	79,9
	AUC	0,608	0,581	0,616	0,567	0,597
	P	0,02	0,0744	0,0136	0,1597	0,0171
Uso 3º trimestre	Sensibilidade (%)	50	13	46,3	9,3	16,7
	Especificidade (%)	61,3	97,2	69,8	99,1	94,3
	Ponto de corte (ng/g)	172	453	0	1959	76
	Valor preditivo Positivo	39,7	70	43,9	83,3	60
	Valor preditivo Negativo	70,7	68,7	71,8	68,2	69
	AUC	0,548	0,551	0,58	0,517	0,534
	P	0,3036	0,202	0,0578	0,7103	0,307

AUC= área sob a curva ROC; p= nível de significância

Continua na próxima página...



Continuação da Tabela 26...

<b>Critérios de exposição</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Total FAEEs</b>	<b>Palmitato de etila</b>	<b>Linoleato de etila</b>	<b>Oleato de etila</b>	<b>Estearato de etila</b>
T-ACE positivo	Sensibilidade (%)	66	48	60	66	34
	Especificidade (%)	69,1	80	75,5	60	91,8
	Ponto de corte (ng/g)	175	0	0	0	0
	Valor preditivo Positivo	49,3	52,2	52,6	42,9	65,4
	Valor preditivo Negativo	81,7	77,2	80,6	79,5	75,4
	AUC	0,695	0,625	0,705	0,606	0,626
	P	<0,0001	0,0021	<0,0001	0,173	0,0005
AUDIT positivo	Sensibilidade (%)	55,9	52,9	50	70,6	26,5
	Especificidade (%)	77,8	77,8	88,1	57,9	86,5
	Ponto de corte (ng/g)	618	0	447	0	0
	Valor preditivo Positivo	40,4	39,1	53,1	31,2	34,6
	Valor preditivo Negativo	86,7	86	86,7	88	81,3
	AUC	0,686	0,638	0,715	0,607	0,56
	P	0,0003	0,0035	<0,0001	0,0284	0,1386
Binge positivo	Sensibilidade (%)	70,3	56,8	64,9	67,6	37,8
	Especificidade (%)	66,7	79,7	73,2	57,7	90,2
	Ponto de corte (ng/g)	175	0	0	0	0
	Valor preditivo Positivo	38,8	45,7	42,1	32,5	53,8
	Valor preditivo Negativo	88,2	86	87,4	85,5	82,8
	AUC	0,688	0,663	0,701	0,595	0,636
	P	0,0001	0,0003	<0,0001	0,0473	0,0013

AUC= área sob a curva ROC; p= nível de significância

As mesmas análises, por meio da construção da curva ROC, foram repetidas, excluindo os casos discordantes, ou seja, os casos com resultado das análises positivo para FAEs e negativo para o consumo, bem como os casos positivo para consumo e negativo para os FAEs. Essa segunda análise foi realizada com o intuito de analisar somente os casos com resultados consistentes para obter valores de ponto de corte condizentes com a exposição. Os resultados obtidos dessas análises por meio da curva ROC, estão descritos na Tabela 27 e nas Figuras 27 e 28.

Tabela 27– Parâmetros da avaliação da eficácia do método de análises de FAEEs em mecônio diante de diferentes critérios de exposição, após exclusão dos casos com resultados inconsistentes.

<b>Crítérios de exposição</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Total FAEEs</b>	<b>Palmitato de etila</b>	<b>Linoleato de etila</b>	<b>Oleato de etila</b>	<b>Estearato de etila</b>
Uso de álcool (em qualquer quantidade e período)	Sensibilidade (%)	100	68,09	80,85	93,62	42,55
	Especificidade (%)	100	100	100	100	100
	Ponto de corte (ng/g)	>0	>0	>0	>0	>0
	Valor preditivo Positivo	100	100	100	100	100
	Valor preditivo Negativo	100	75	83,3	93,7	62,5
	AUC	1	0,84	0,904	0,968	0,713
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Uso trimestre anterior	Sensibilidade (%)	93,18	65,91	77,27	86,36	36,36
	Especificidade (%)	87,5	93,75	91,67	87,5	91,67
	Ponto de corte (ng/g)	>0	>0	>0	>0	>0
	Valor preditivo Positivo	87,2	90,6	89,5	86,4	80
	Valor preditivo Negativo	93,3	75	81,5	87,5	61,1
	AUC	0,898	0,791	0,839	0,86	0,641
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0008
Uso 1º trimestre	Sensibilidade (%)	91,43	74,29	88,57	94,29	42,86
	Especificidade (%)	85,96	89,47	87,72	82,46	92,98
	Ponto de corte (ng/g)	>275	>0	>0	>81	>9
	Valor preditivo Positivo	80	81,3	81,6	76,7	78,9
	Valor preditivo Negativo	94,2	85	92,6	95,9	72,6
	AUC	0,921	0,809	0,887	0,888	0,672
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002
Uso 2º trimestre	Sensibilidade (%)	96,15	15,38	80,77	96,15	42,31
	Especificidade (%)	72,73	95,45	74,24	71,21	93,94
	Ponto de corte (ng/g)	>175	>506	>0	>0	>45
	Valor preditivo Positivo	58,1	57,1	55,3	56,8	73,3
	Valor preditivo Negativo	98	74,1	90,7	97,9	80,5
	AUC	0,801	0,684	0,744	0,775	0,676
	P	<0,0001	0,0014	<0,0001	<0,0001	0,0013
Uso 3º trimestre	Sensibilidade (%)	100	63,33	83,33	93,33	30
	Especificidade (%)	72,58	79,03	79,03	74,19	95,16
	Ponto de corte (ng/g)	>0	>0	>0	>0	>57
	Valor preditivo Positivo	63,8	59,4	65,8	63,6	75
	Valor preditivo Negativo	100	81,7	90,7	95,8	73,7
	AUC	0,837	0,715	0,784	0,811	0,619
	P	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0204

AUC= área sob a curva ROC; p= nível de significância

Continua na próxima página...

Continuação da tabela27...

<b>Critérios de exposição</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Total FAEs</b>	<b>Palmitato de etila</b>	<b>Linoleato de etila</b>	<b>Oleato de etila</b>	<b>Estearato de etila</b>
T-ACE positivo	Sensibilidade (%)	96,97	66,67	84,85	87,88	48,48
	Especificidade (%)	74,58	83,05	83,05	74,58	93,22
	Ponto de corte (ng/g)	>0	>0	>0	>0	>0
	Valor preditivo Positivo	68,1	68,7	73,7	65,9	80,0
	Valor preditivo Negativo	97,8	81,7	90,7	91,7	76,4
	AUC	0,865	0,724	0,851	0,77	0,703
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
AUDIT positivo	Sensibilidade (%)	78,26	73,91	69,57	95,65	39,13
	Especificidade (%)	82,61	78,26	88,41	68,12	84,06
	Ponto de corte (ng/g)	>606	>0	>0	>0	>0
	Valor preditivo Positivo	60,0	53,1	55,3	50,0	45
	Valor preditivo Negativo	91,9	90,0	96,3	97,9	80,6
	AUC	0,848	0,733	0,851	0,778	0,61
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0513
Binge positivo	Sensibilidade (%)	71,43	75,00	84,85	89,29	46,43
	Especificidade (%)	84,37	82,81	83,05	30,71	92,19
	Ponto de corte (ng/g)	>606	>0	>0	>0	>25
	Valor preditivo Positivo	66,7	65,6	73,7	56,8	72,2
	Valor preditivo Negativo	87,1	88,3	90,7	93,7	79,7
	AUC	0,841	0,755	0,851	0,751	0,7
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001

Em geral, a área sob a curva foi significativamente diferente de 0,5 para todos os FAEs nos critérios de exposição. O ponto de corte para somatória das concentrações de FAEs para os critérios de exposição consumo em *binge* e consumo de risco (AUDIT positivo) foi de aproximadamente 600 ng/g e para os demais critérios de exposição o ponto de corte variou de 0 a 275ng/g.

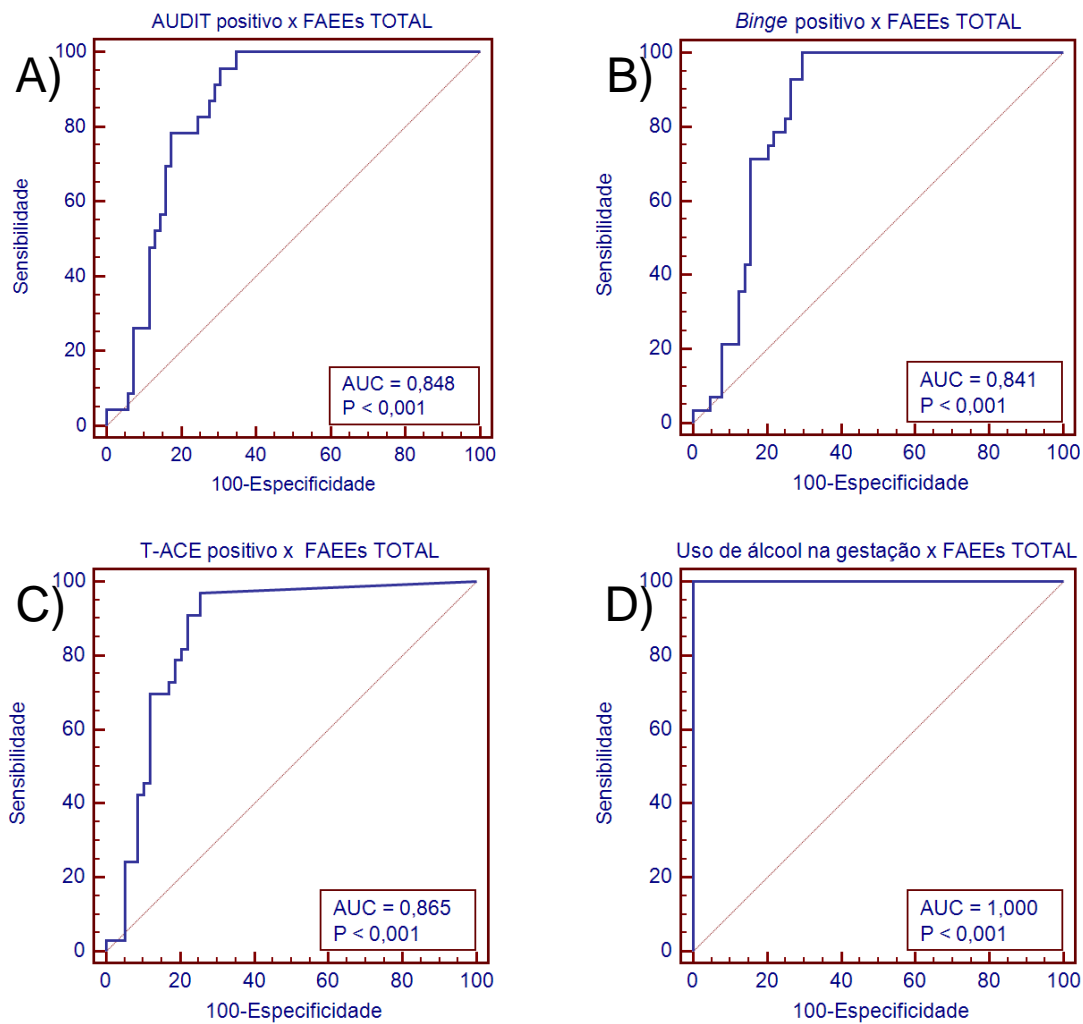


Figura 27- Curva ROC e suas respectivas áreas sob a curva (AUC) para análise dos FAEs em relação a diferentes critérios de exposição ao álcool: A) AUDIT positivo para consumidoras de risco (pontuação maior que sete); B) consumo em *binge* positivo; C) T-ACE positivo para consumidoras de risco (pontuação maior que dois); D) Consumo de qualquer quantidade de álcool durante a gestação.

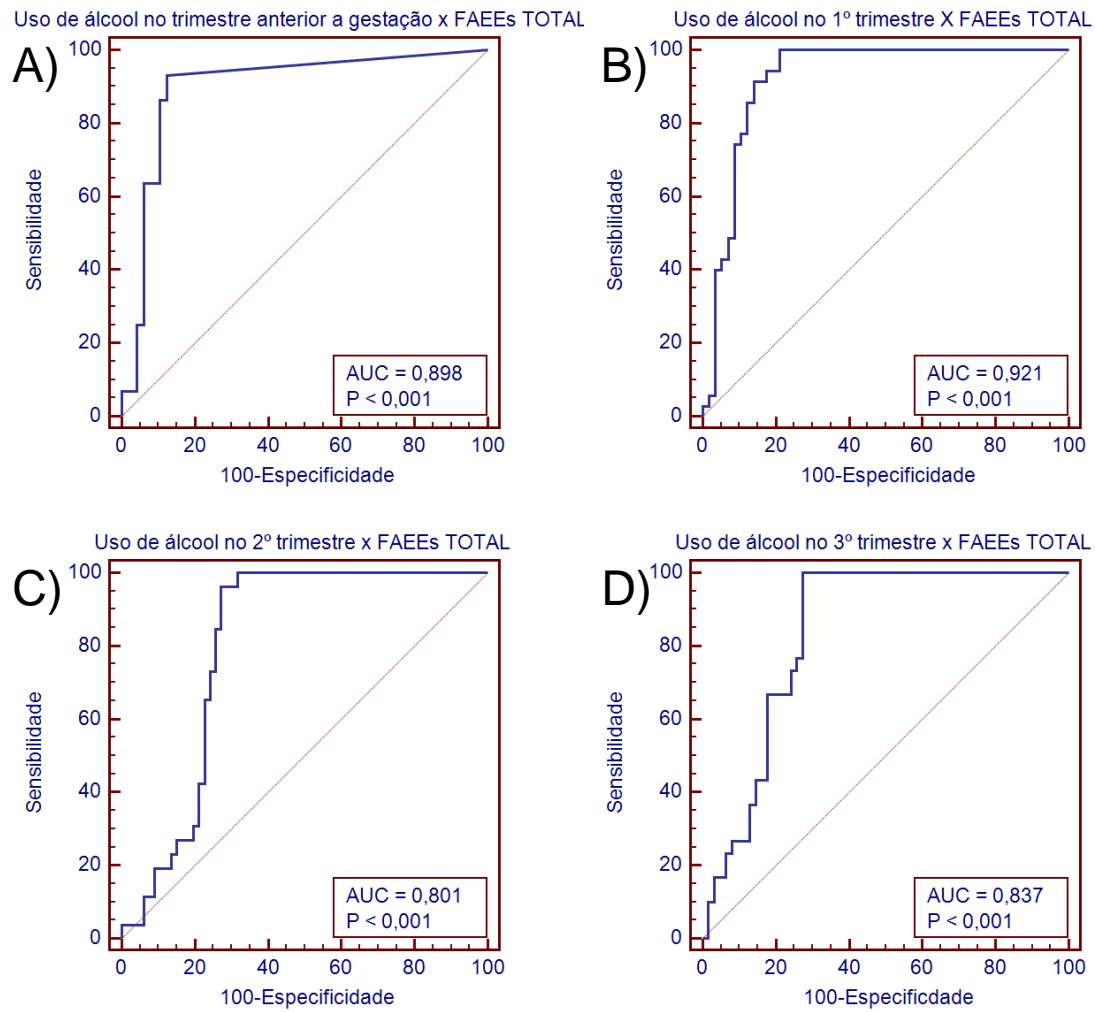


Figura 28 - Curva ROC e suas respectivas áreas sob a curva (AUC) para análise dos FAEs em relação a diferentes critérios de exposição ao álcool: A) Uso de álcool no trimestre anterior a gestação; B) Consumo de álcool no primeiro trimestre gestacional; C) Consumo de álcool no segundo trimestre gestacional; D) Consumo de álcool no terceiro trimestre gestacional.

#### 4.6 Correlação da concentração dos FAEEs com variáveis sociodemográficas, antropométricas e de consumo de álcool

As concentrações individuais de cada FAEEs bem como a somatória das concentrações foram correlacionadas com diferentes variáveis de consumo. Os resultados dessas correlações estão apresentados nas Tabelas 28 e 29.

Todos os analitos, bem como a somatória de suas concentrações, correlacionaram-se positivamente com: pontuação total do T-ACE e do AUDIT; número de dias na gestação de consumo tipo *binge*; número de ocasiões de consumo de qualquer quantidade (no trimestre anterior a gestação e no primeiro trimestre); número de doses por ocasião (no trimestre anterior a gestação e no primeiro trimestre), e número total de doses consumidas (trimestre anterior à gestação e no primeiro trimestre). O analito que apresentou, em geral, maior correlação para essas variáveis foi o linoleato de etila ( $\rho=0,345$  e  $p<0,0001$ ).

Em relação às variáveis antropométricas dos recém-nascidos (Tabela 30), os analitos não apresentaram boas correlações quando significativas ( $\rho < 0,200$ ). Em relação a pontuação de apgar no primeiro minuto, todos os analitos menos o palmitato apresentaram correlações inversas significantes, porém de baixa intensidade.

Algumas variáveis sociodemográficas (Tabela 31), como idade da mãe, idade gestacional, renda familiar, escolaridade e número de ultrassonografias e consultas pré-natais, também foram submetidas análise de correlação com as concentrações dos FAEEs. Todos os analitos, exceto o estearato de etila, correlacionaram positivamente com a idade gestacional. O oleato de etila apresentou uma correlação inversa e fraca com a idade da mãe. As demais variáveis não correlacionaram-se significativamente com as concentrações dos FAEEs.

Tabela 28– Correlação das concentrações dos analitos com a pontuação total do T-ACE e AUDIT, uso de álcool e tipo *binge*.

Concentração FAEEs	Correlação	Total T-ACE	Total AUDIT	Uso <i>binge</i> gestação (dias)
Palmitato de etila	Rho	0,260	0,260	0,287
	P	0,0009*	0,0009*	0,0002*
Linoleato de etila	Rho	0,345	0,345	0,345
	P	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
Oleato de etila	Rho	0,200	0,185	0,155
	P	0,0113*	0,0194*	0,0500*
Estearato de etila	Rho	0,272	0,226	0,297
	P	0,0005*	0,0041*	0,0001*
Total FAEEs	rho	0,311	0,301	0,293
	P	0,0001*	0,0001*	0,0002*

Tabela 29– Correlação das concentrações dos FAEEs com o número de ocasiões, dose por ocasião e total de doses na gestação

Concentração FAEEs	Correlação	Número de ocasiões				Número de doses por ocasião				Total de doses			
		Trimestre anterior	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre	Trimestre anterior	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre	Trimestre anterior	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre
Palmitato de etila	Rho	0,227	0,252	0,144	0,102	0,281	0,278	0,173	0,128	0,258	0,262	0,171	0,122
	p	0,0039*	0,0013*	0,0702	0,2008	0,0003*	0,0004*	0,0285*	0,1055	0,0010*	0,0008*	0,0304*	0,1241
Linoleato de etila	rho	0,289	0,330	0,215	0,147	0,332	0,344	0,225	0,171	0,321	0,333	0,242	0,166
	p	0,0002*	<0,0001*	0,0063*	0,0636	<0,0001*	<0,0001*	0,0042*	0,0306	<0,0001*	<0,0001*	0,0020*	0,0362*
Oleato de etila	rho	0,153	0,163	0,121	0,032	0,204	0,175	0,129	0,045	0,182	0,163	0,142	0,043
	p	0,0535	0,0398*	0,1284	0,6921	0,0098*	0,0272*	0,1048	0,5715	0,0209*	0,0393*	0,0732	0,5901
Estearato de etila	rho	0,161	0,186	0,222	0,106	0,224	0,228	0,246	0,110	0,193	0,206	0,225	0,112
	p	0,0418*	0,0182*	0,0048*	0,1842	0,0043*	0,0037*	0,0017*	0,1657	0,0144*	0,0089*	0,0043*	0,1572
Total FAEEs	rho	0,250	0,242	0,179	0,082	0,309	0,257	0,199	0,107	0,286	0,246	0,206	0,100
	p	0,0014*	0,0020*	0,0236*	0,3056	0,0001*	0,0010*	0,0116*	0,1776	0,0002*	0,0017*	0,0088*	0,2071

Tabela 30 – Análise de correlação entre os FAEEs e as características gerais e antropométricas dos recém-nascidos.

Concentração FAEEs	Correlação	Peso	Estatura	Perímetro cefálico	Perímetro torácico	Apgar 1º minuto	Apgar 5º minuto
Palmitato de etila	Rho	0,174	0,146	0,087	0,177	-0,143	-0,099
	p	0,0275*	0,0660	0,2761	0,0259*	0,0718	0,2140
Linoleato de etila	rho	0,156	0,175	0,133	0,179	-0,244	-0,136
	p	0,0483*	0,0265*	0,0941	0,0246*	0,0019*	0,0877
Oleato de etila	rho	0,096	0,166	0,003	0,161	-0,158	-0,134
	p	0,2262	0,0359*	0,9696	0,0428*	0,0462*	0,0929
Estearato de etila	rho	0,038	0,061	0,022	0,078	-0,178	-0,113
	p	0,6308	0,4430	0,7847	0,3292	0,0244*	0,1561
Total FAEEs	rho	0,084	0,177	0,067	0,186	-0,238	-0,171
	p	0,1370	0,0251*	0,3997	0,0191*	0,0025*	0,0317*

Tabela 31– Análise de correlação para entre os FAEEs e algumas características sócio demográficas das participantes.

Concentração FAEEs	Correlação	Idade da Mãe (anos)	Idade Gestacional (semanas)	Renda familiar (R\$)	Escolaridade	Ultrassonografias (pré-natal)	Consultas (pré-natal)
Palmitato de etila	rho	-0,0349	0,2630	0,0214	-0,0452	0,0996	0,1550
	p	0,6609	0,0008*	0,8067	0,5705	0,2205	0,0518
Linoleato de etila	rho	-0,0595	0,2300	-0,1020	-0,1480	-0,0347	0,0904
	p	0,4546	0,0036*	0,2413	0,0610	0,6698	0,2570
Oleato de etila	rho	-0,1560	0,2060	-0,1000	-0,0932	-0,0015	0,0991
	p	0,0492*	0,0091*	0,2511	0,2412	0,9850	0,2141
Estearato de etila	rho	0,0131	0,0590	0,0326	-0,0289	0,0105	0,0943
	p	0,8695	0,4597	0,7099	0,7172	0,8974	0,2369
Total FAEEs	rho	-0,1130	0,2540	-0,0796	-0,1160	0,0241	0,1070
	p	0,1552	0,0013*	0,3626	0,1428	0,7672	0,1791



## 5 DISCUSSÃO

Os ésteres etílicos de ácidos graxos, metabólitos não oxidativos do álcool, têm sido detectados em mecônios de recém-nascidos e considerados como potenciais biomarcadores da exposição fetal ao álcool (MOORE et al., 2003; OSTREA et al., 2006; ZELNER et al., 2010; KWAK et al., 2014).

Neste estudo, foram utilizados quatro biomarcadores FAEEs (palmitato, linoleato, oleato e estearato de etila), bem como a somatória de suas concentrações para avaliação da exposição fetal ao álcool. Em geral, o oleato, linoleato e palmitato de etila foram os biomarcadores mais frequentes e encontrados em maiores concentrações, assim como foi relatado em outros estudos (BAKADASH et al., 2010; HUTSON et al., 2009; HASTED et al., 2012; CHAN et al., 2004b; BEARER et al., 2003, MOORE et al., 2003). Mais especificamente, o linoleato de etila apresentou maiores concentrações e oleato de etila foi o biomarcador mais frequente nos casos. A predominância desses dois analitos foi relatada por outros autores. No estudo de Hasted et al. (2012), por exemplo, o oleato de etila foi o analito que apresentou maiores concentrações e foi detectado em todos os casos considerados positivos. Nos estudos de Goh et al. (2010) e Gareri et al. (2008), o oleato de etila foi o FAEE que apresentou maiores concentrações, seguido do linoleato de etila. Já no estudo de Bearer et al. (2003) essa ordem inverteu: o FAEE que apresentou maior concentração e prevalência foi o linoleato de etila seguido do oleato de etila.

Apesar da predominância desses dois analitos, observou-se uma variabilidade das concentrações individuais dos FAEEs entre os indivíduos desse estudo, que também foi relatada por outros autores (BAKDASH et al., 2010; HASTED et al., 2012; CHAN et al., 2004b). No estudo de Moore et al. 2003, por exemplo, verificou que, em uma população do Hawaí, o analito que apresentou maiores concentrações foi oleato de etila enquanto, em uma população do estado de Utah, foi o linoleato de etila. A causa da variabilidade das concentrações de FAEEs interindivíduos é desconhecida, mas parece estar relacionada com diferenças na concentração endógena de ácidos graxos, diferenças na dieta materna, diferenças na cinética de síntese dos FAEEs e variabilidade na concentração de etanol nesses sítios de síntese (BRIEN et al., 2006). Sendo assim, o uso da somatória das concentrações dos FAEEs para identificação dos casos positivos parece um critério

melhor para interpretação quando comparado com a utilização de apenas um biomarcador.

A porcentagem de consumidoras alcoólicas de risco nesse estudo, segundo o questionário T-ACE, foi de 31,3%. Essa porcentagem foi maior quando comparada com a porcentagem encontrada em um estudo semelhante (22,1%) realizado em 2001, na mesma maternidade, utilizando a mesma versão do instrumento T-ACE no rastreamento de gestantes no terceiro trimestre (FABBRI, FURTADO, LAPREGA, 2007). Esse incremento na porcentagem pode estar relacionado com o possível aumento do número de consumidoras de bebidas alcoólicas nesta população, visto que o número de mulheres dependentes de álcool no Brasil aumentou de 5,7% em 2001, para 6,9% em 2005 (CARLINI et al., 2006).

Em relação à avaliação da exposição fetal ao álcool através dos biomarcadores, os FAEEs estavam presentes em 51,3% dos casos e 33,1% apresentaram concentrações acima do ponto de corte 500 ng/g, classificando os como expostos a um consumo elevado de álcool.

Alguns casos apresentaram resultados laboratoriais discordantes com o relato materno. As baixas concentrações de FAEEs presente em amostras de mecônio consideradas, segundo o relato materno, como negativo para o consumo durante a gestação podem ser provenientes da formação de etanol endógeno ou da ingestão de alimentos e medicamentos que contém traços de álcool em sua composição. Chan et al. (2003) discute a formação de etanol endógeno que pode ser proveniente da fermentação anaeróbica de carboidratos via microflora intestinal, de infecções por leveduras e bactérias fermentadoras anaeróbicas (por exemplo *Cândida*) e de condições patológicas como diabetes, hepatite e cirrose. No presente estudo, dos quinze casos que apresentaram FAEEs em baixas concentrações no mecônio e consideradas negativo para exposição segundo relato materno, apenas dois casos tinham a histórico materno de infecção (uma candidíase e outra pneumonia) e nenhuma apresentava alguma dessas condições patológicas. Portanto, esses casos discordantes poderiam ser provenientes da formação endógena de etanol ou do consumo de baixas quantidades de etanol, seja este presente em medicamentos, alimentos e bebidas alcoólicas.

Os FAEEs também estavam presentes em altas concentrações (maior que 500ng/g) em mecônio de recém-nascidos considerados como não expostos,

segundo o relato materno. 20 casos apresentaram altas concentrações de FAEEs igual e até mesmo superior às concentrações encontradas nas mães que relataram uso. Parece pouco provável que esses FAEEs sejam provenientes da formação do etanol endógeno, uma vez que a concentração do etanol gerado nessas condições é baixa.

Para distinguir os casos de baixa ou nenhuma exposição da alta exposição, podem-se levar em conta os valores de concentração encontrados e o perfil de distribuição dos FAEEs. Chan et al. (2003) encontrou que a concentração dos FAEEs na população não exposta é significativamente menor (6 vezes) quando comparada com a concentração nos casos confirmados de alta exposição. Além disso, verificou que na população não exposta há predominância de FAEEs como miristato e laurato de etila (cadeias carbônicas menores), enquanto no grupo exposto há uma tendência no acúmulo de FAEEs de cadeia mais longa, como palmitato, linoleato, oleato e estearato de etila (os quatro FAEEs utilizados nesse estudo)

Assim, os FAEEs, encontrados em altas concentrações nesses casos, poderiam ser provenientes do consumo de álcool que não foi relatado pela mãe, visto que muitas têm dificuldades em admitir seu consumo devido ao sentimento de culpa, medo ou constrangimento social (FURTADO, FABRI, 1999). Goecke et al. (2014) sugere em seu estudo que mulheres que apresentam um consumo abusivo de álcool são mais susceptíveis de negar o seu consumo.

Outra possível explicação de altas concentrações de FAEEs em casos não expostos ao álcool durante a gestação poderia ser atribuída à contaminação do mecônio com etanol, uma vez que foi demonstrada a formação de FAEEs quando o mecônio é incubado com etanol (KLEIN et al., 1999). Porém, nesse estudo, foram tomados os devidos cuidados para evitar a contaminação do mecônio com etanol, durante o procedimento de coleta, armazenamento e processamento da amostra. O único momento possível de ter ocorrido a contaminação seria no momento da troca da fralda, quando é realizado também a limpeza do coto umbilical com etanol a 70%. Entretanto, as mães foram alertadas para evitar essa possível contaminação.

Alguns casos em que mãe relatou o uso durante a gestação, os FAEEs não apresentaram concentrações maiores que o limite inferior de quantificação. Esse evento também aconteceu em outros estudos (BAKDASH et al., 2010; BEARER et

al., 2003). Bakdash et al. (2010) utilizou além dos FAEEs, outro biomarcador do álcool no mecônio (etil glucoronídeo) e nenhum deles foram detectados em seis casos positivo para o consumo. Chan et al. (2004) sugere que essa variabilidade pode ser proveniente dos diferentes padrões de consumo (uso leve, moderado e pesado e episódios de *binge*) tempo e duração de exposição (primeiro, segundo e terceiro trimestre, durante toda gestação) extensão da exposição (número de doses consumidas por ocasião). Além disso, pouco se sabe do mecanismo de acúmulo e distribuição dos FAEEs no mecônio. Alguns autores sugerem que os FAEEs não são distribuídos uniformemente no mecônio pois observaram uma alta variabilidade das concentrações dos FAEEs nas reanálises quando o mecônio não foi homogeneizado na amostragem (BAKADASH et al., 2010). No atual estudo, as amostras de mecônio foram homogeneizadas no momento da coleta, porém somente o primeiro mecônio foi coletado, o que não garante a representatividade da amostra gerada ao longo de toda gestação. Por outro lado, a coleta tardia do mecônio aumenta a probabilidade de resultados falsos positivos, uma vez que pode haver produção de etanol endógeno pela fermentação da glicose por bactérias colonizadoras da flora intestinal, que iniciam a colonização após a amamentação (ZELNER et al., 2012 b).

Outro fato observado é a diminuição do consumo de álcool relatado pela mãe após o primeiro trimestre gestacional, quando então o mecônio inicia-se sua formação. Isso poderia justificar ausência de detecção dos FAEEs nas participantes que relataram o consumo somente no primeiro trimestre gestacional.

Essa diminuição do consumo, principalmente no primeiro trimestre gestacional, pode estar relacionada com a descoberta da gravidez. A partir desse momento, 9,4% (15/160) das participantes ficaram abstinentes no 2º e 3º trimestre gestacional e 13,8% (22/160) reduziram seu padrão de consumo nesses trimestres. E o motivo dessa ação pode ser atribuído à percepção de risco do consumo de álcool durante a gestação (preexistente ou adquirida durante os pré-natais pelas informações fornecidas pelos profissionais de saúde) ou pode ser atribuído ao desconforto gastrointestinal devido às náuseas e azias, como relatado por muitas participantes desse estudo durante o questionamento de desconfortos decorrentes da gestação (questão 46 do questionário).

A eficácia das determinações dos FAEEs no mecônio em identificar os casos positivo foi avaliada pela curva ROC. Ao analisar a área sob a curva, as análises dos

FAEEs apresentaram melhor exatidão para diagnosticar os casos expostos ao levar como referência os critérios de exposição: uso no trimestre anterior a gestação, uso no 1º trimestre gestacional e uso tipo *binge* em qualquer período gestacional. Além disso, a somatória dos FAEEs apresentou melhor sensibilidade quando comparado com o emprego de um único biomarcador.

Em relação a determinação do ponto de corte para a somatória das concentrações dos FAEEs, o valor do ponto de corte foi maior para os critérios de exposição AUDIT positivo e *binge* positivo (aproximadamente 600ng/g) e menor para os critérios de exposição T-ACE positivo e uso de álcool antes e durante a gestação. Isso demonstra a maior sensibilidade do questionário T-ACE, quando comparado com o questionário AUDIT.

Na análise de correlação também verificou uma maior correlação entre a concentração dos analitos e o relato de consumo de álcool para os períodos antes da gestação e no 1º trimestre gestacional. Apesar do relato de consumo ser retrospectivo, esses relatos referentes ao período antes da gestação e no 1º trimestre poderiam ser mais fidedignos quando comparados com os dados de consumo referentes ao 2º e 3º trimestre, uma vez que a participante poderia ter facilidade em admitir seu consumo no período que não estava grávida ou quando não sabia da gestação.

O fato dos FAEEs correlacionarem melhor com a dose por ocasião e com o número de dias em que houve consumo tipo de *binge* pode sugerir que quanto maior a quantidade de álcool consumida em um curto período de tempo, maior será concentração máxima de etanol no sangue, que conseqüentemente reflete em maior transferência para o feto, refletindo em maior formação e acúmulo de FAEEs no mecônio. Na literatura há diferenças entre os estudos em relação à presença de correlação entre consumo materno e concentração dos FAEEs no mecônio. Enquanto Derauf et al. (2003) e Hutson et al. (2010) não observaram concordância entre consumo materno e concentrações de FAEEs no mecônio, Bearer et al. (2003) observou uma correlação entre a concentração do oleato de etila com a média de álcool consumida por ocasião em quatro momentos (na concepção e nos três trimestres gestacionais). Ostrea et al. (2006) só encontrou uma correlação significativa quando tricomizou a concentração do linoleato de etila. Nesse último estudo, o biomarcador correlacionou com a quantidade absoluta de álcool

consumida por ocasião, mostrando mais uma vez que a variável de consumo por ocasião tem potencial para influenciar as concentrações de FAEEs no mecônio.

Em relação às variáveis antropométricas dos recém-nascidos os FAEEs não apresentaram boas correlações. Os escores de apgar no 1º minuto correlacionaram inversamente com as concentrações do linoleato, oleato e palmitato de etila. Na literatura não há um consenso sobre a presença ou ausência dessas correlações. Há estudos que correlacionaram negativamente as concentrações do oleato de etila (DERAUF et al.,2003), palmitato de etila (CHAN et al., 2003) e linoleato de etila (HUTSON et al, 2010) com valores de peso ao nascer. Chan et al, 2003 também observou uma correlação inversa da concentração do palmitato de etila com o perímetro cefálico. E Derauf et al. (2003) encontrou uma associação entre a concentração do oleato de etila e escores reduzidos de Apgar no 1ºminuto. Por outro lado, Bearer et al. (1999) e Kwak et al. (2014) não observaram diferenças entre o grupo exposto e não exposto para as variáveis idade gestacional, peso, estatura, perímetro cefálico do recém-nascido e apgar no 1º e 5º minuto. Esses resultados reforçam que outros fatores, além do consumo de álcool, estão envolvidos no desenvolvimento e crescimento intrauterino.

Em relação às variáveis sociodemográficas, todos os analitos, exceto o estearato de etila, correlacionaram positivamente com a idade gestacional, fato também observado por Chan et al. (2003) que observou um aumento da concentração do miristato de etila com idade gestacional O oleato de etila apresentou uma correlação inversa e fraca com a idade da mãe, enquanto no estudo de Chan et al (2003) o palmitato de etila apresentou essa correlação inversa com a idade materna. Pichini et al. (2011) observou que mães de crianças com mecônio positivo para FAEEs são significativamente mais jovens.

Uma das limitações do presente estudo consiste na utilização de um método que, supostamente, é capaz de detectar a exposição fetal ao álcool somente no segundo e terceiro trimestre gestacional, uma vez que o mecônio inicia sua formação após o primeiro trimestre. Outra limitação seria a dificuldade em avaliar a eficácia da determinação dos FAEEs na identificação dos casos positivos para exposição, uma vez que não há um padrão-ouro para tal comparação. Nesse estudo utilizou-se como referência o relato materno retrospectivo de exposição, que pode ser impreciso devido à dificuldade de recordação das informações ou em assumir o

próprio consumo de álcool. Além disso, as concentrações dos FAEEs no mecônio apresentaram, como em outros estudos, uma variabilidade entre indivíduos, que deve ser investigada em futuros estudos, em busca de diferenças metabólicas e nutricionais, e no entendimento de como o hábito de beber pode influenciar as diferentes concentrações encontradas.

## 6 CONCLUSÕES

- O método mostrou ser eficaz na identificação da maioria dos casos positivos, levando-se em consideração diferentes critérios de exposição segundo questionários validados e relato materno.
- Apesar da variabilidade interindividual dos FAEEs, o oleato de etila e o linoleato de etila foram os FAEEs presentes em maiores concentrações e mais frequentemente encontrados no mecônio de crianças expostas
- As concentrações de FAEEs apresentaram melhores correlações com os critérios de exposição dose por ocasião e com o número de dias em que houve consumo tipo de *binge*, o que sugere maior formação e acúmulo de FAEEs no mecônio quando há um consumo alto de álcool em um curto período de tempo. Em relação ao período relatado de exposição ao álcool, as melhores correlações foram encontradas para o trimestre anterior a gestação e no primeiro período gestacional. Isso não diz respeito ao período de maior acúmulo de FAEEs no mecônio, mas pode sugerir uma maior facilidade da participante em admitir seu consumo no período que não estava grávida ou quando não sabia da gestação.
- A concentração total dos FAEEs no mecônio mostrou-se como melhor indicador da exposição fetal ao álcool quando comparado com o uso de um único biomarcador. O ponto de corte para esta população foi de aproximadamente 600ng/g para uso tipo *binge* (três ou mais doses por ocasião) com sensibilidade de 71,43% e especificidade de 84,37%.
- A presença de alguns casos de discordância entre questionários e resultados laboratoriais dos FAEEs aliado a algumas lacunas do conhecimento sobre o mecanismo de formação e deposição desses biomarcadores dificultaram a interpretação clínica dos resultados.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação dos biomarcadores FAEEs em mecônio mostrou ser eficaz na identificação da maioria dos casos classificados como expostos ao álcool de acordo com a entrevista. Além disso, o emprego das análises dos FAEEs poderia ampliar o número de casos identificados como positivos pelos questionários, uma vez que os FAEEs estavam presentes em altas concentrações nos mecônios de recém-nascidos cujas mães negaram consumo de álcool durante a gestação.

Assim, o uso concomitante das análises dos FAEEs e de questionários validados, como T-ACE e AUDIT, poderia aumentar a sensibilidade na identificação dos casos positivos para a exposição fetal ao álcool. Vale ressaltar a importância de investigar, retrospectivamente, o consumo de álcool antes da gestação, pois a participante poderia admitir mais facilmente seu consumo referente a esse período quando comparado com o período gestacional.

Outro fato relevante, observado em outros estudos e confirmado nesse, foi a variabilidade interindividual dos FAEEs, que reforça mais uma vez a necessidade da determinação do perfil de distribuição dos FAEEs e do valor de ponto de corte para cada população, a fim de determinar critérios corretos para o diagnóstico clínico dos casos expostos.

Em relação à proposta inicial deste trabalho em utilizar os biomarcadores FAEEs como ferramenta na prática clínica para identificar a exposição fetal ao álcool, houve algumas limitações nesse estudo que dificultaram a interpretação clínica dos resultados e, conseqüentemente, adiando a recomendação do uso dessas análises. Sendo assim, algumas questões precisam ser elucidadas antes da implantação dessas análises na prática clínica, tal como, por exemplo, questões relacionadas ao mecanismo de formação e deposição dos FAEEs.

As principais contribuições do presente estudo podem ser identificadas no fato de, muito provavelmente, constituir o primeiro estudo brasileiro a determinar um ponto-de-corte da concentração de FAEEs e avaliar sua eficácia através da comparação dos resultados das análises laboratoriais com os resultados obtidos em entrevistas.

As taxas observadas, tanto pelos questionários quanto pela determinação de FAEEs no mecônio indicam prevalências elevadas e que justificam nossa

preocupação quanto à necessidade de estratégias de intervenção para a redução do consumo de álcool na gestação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº27 de 17 de Maio de 2012. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html)> Acesso em 01 jul. 2013.
- BABOR, T.F., BIDDLE-HIGGINS, J.C., SAUNDERS, J.B., MONTEIRO, M.G. AUDIT: The Alcohol Use Disorders Identification Test: Guidelines for Use in Primary Health Care. World Health Organization, Second Edition, 2001. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/who\\_msd\\_msb\\_01.6a.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/who_msd_msb_01.6a.pdf)>. Acesso em: 01 jul. 2013.
- BAKDASH, A.; BURGER, P.; GOECKE, T.W.; FASCHING, P.A.; REULBACH, U.; BLEICH, S.; HASTEDT, M.; ROTHE, M.; BECKMANN, M.W.; PRAGST, F.; KORNHUBER, J. Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2469-2477, 2010.
- BEARER, C.F.; LEE, S.; SALVATOR, A.E.; MINNES, S.; SWICK, A.; YAMASHITA, T.; SINGER, L.T. Ethyl linoleate in meconium: a biomarker for prenatal ethanol exposure. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 23, n.3, p. 487-493, 1999.
- BEARER, C.F.; JACOBSON, J.L.; JACOBSON, S.W.; BARR, D.; CROXFORD, J.; MOLTENO, C.D.; VILJOEN, D.L.; MARAIS, A.S.; CHIODO, L.M.; CWIK, A.S. Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol. **The Journal of Pediatrics**, v. 143, n. 4, p. 463-469, 2003.
- BEARER, C.F.; SANTIAGO, L.M.; O'RIORDAN, M.A.; BUCK, K.; LEE, S.C.; SINGER, L.T. Fatty Acid ethyl esters: quantitative biomarkers for maternal alcohol consumption. **The Journal of Pediatrics**, v. 146, p.824-830, 2005.
- BERNHARDT, T.G.; CANNISTRARO, P.A.; BIRD, D.A.; DOYLE, K.M.; LAPOSATA, M. Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 675, n. 2, 189-196, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Pré-natal e puerpério: atenção qualificada e humanizada** - manual técnico. Brasil: Ministério da Saúde, Brasília, 2006.
- BRIEN, J.F.; CHAN, D.; GREEN, C.R.; IQBAL, U.; GARERI, J.; KOBUS, S.M.; MCLAUGHLIN, B.E.; KLEIN, J.; RAO, C.; REYNOLDS, J.N.; BOCKING, A.D.; KOREN, G. Chronic prenatal ethanol exposure and increased concentration of fatty acid ethyl esters in meconium of term fetal guinea pig. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.28, n.3, p. 345-350, 2006.

BRYANTON J.; GARERI J.; BOSWALL D.; MCCARTHY M.J.; FRASER B.; WALSH D.; FREEMAN B.; KOREN G.; BIGSBY K. Incidence of prenatal alcohol exposure in Prince Edward Island: a population-based descriptive study. **Canadian Medical Association Journal Open**, v. 2, n.2, p. E121-126, 2014.

CABARCOS, P.; TABERNERO, M.J.; Otero J.L.; MÍGUEZ M.; BERMEJO A.M.; MARTELLO S.; GIOVANNI N.D; CHIAROTTI M. Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium for detection of alcohol abuse during pregnancy: Correlation study between both biomarkers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V.100, p. 74–78, 2014.

CABARCOS, P.; TABERNERO, M.J.; ALVAREZ, I.; MIGUEZ, M.; FERNÁNDEZ P.; BERMEJO, A.M. A new method for quantifying prenatal exposure to ethanol by microwave-assisted extraction (MAE) of meconium followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 1, p. 147-155, 2012.

CAVALLI, R.C; BARALDI, C.O.; CUNHA, S.P. Transferência placentária de drogas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.28, n.9, p.557-564, 2006.

CARLINI, E.A. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país 2005. São Paulo, CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicótropicas), 2006. Disponível em: <http://200.144.91.102/sitenovo/conteudo.aspx?cd=644>. Acesso em: 04/08/2014.

CHAN, D.; BAR-OZ, B.; PELLERIN, B.; PACIOREK, C.; KLEIN, J.; KAPUR, B.; FARINE, D.; KORE, G. Population baseline of meconium fatty acid ethyl esters among infants of nondrinking women in Jerusalem and Toronto. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.25, n.3, p.271-278, 2003.

CHAN, D.; KNIE, B.; BOSKOVIC, R.; KOREN, G. Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 75-81, 2004a.

CHAN, D; KLEIN, J.; KARASKOV, T.; KOREN, G. Fetal exposure to alcohol as evidenced by fatty acid ethyl esters in meconium in the absence of maternal drinking history in pregnancy. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.26, n.5, p.478-481, 2004b.

CHAN, D.; CAPRARA D.; BANCHETTE P.; KLEIN J.; KOREN G. Recent development in meconium and hair testing methods for the confirmation of gestational exposures to alcohol and Tabaco smoke. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 429-438, 2004 c.

CHAUDHURI, J.D. Alcohol and developing fetus: a review. **Medical Science Monitor**, v.6, n.5, p.1031-1041, 2000.

Conover, W.J. **Practical nonparametric statistics**. 3<sup>rd</sup> edition. New York: John Wiley & Sons, 1999.

DERAUF, C.; KATZ, A.R.; EASA, D. et al. Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl esters and cotinine. **American Journal of Epidemiology**, v. 158, n.7, p. 705–709, 2003.

FABBRI, C. E.; FURTADO, E. F.; LAPREGA, M. R., Alcohol consumption in pregnancy: performance of the Brazilian version of the questionnaire T-ACE. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 6, p. 979-984, 2007.

FURTADO E.F., FABBRI, C.E. Consumo materno de álcool e outras substâncias psicoativas e seus efeitos sobre o desenvolvimento infantil. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 32(Supl 1), p. 53-58, 1999.

GARCIA-ALGAR, O.; KULAGA, V.; GARERI, J.; KOREN, G.; VALL, O.; ZUCCARO, P.; PACIFI, R.; PICHINI, S. Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 2, p.249–254, 2008.

GARERI, J.; LYNN, H.; HANDLEY, M.; RAO, C.; KOREN, G. Prevalence of fetal ethanol exposure in a regional population-based sample by meconium analysis of fatty acid ethyl esters. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n.2, p.239–245, 2008. GARERI, J.; KLEIN, J.; KOREN, G. Drugs of abuse testing in meconium. **Clinical Chimica Acta**, v.366, p.101-111, 2006.

GOECKE, T. W.; BURGER, P.; FASCHING, P.A; BAKDASH, A.; ENGEL, A.; HÄBERLE, L.; VOIGT, F.; FASCHINGBAUER, F.; RAABE, E.; MAASS, N.; ROTHE, M.; BECKMANN, M.W.; PRAGST, F.; KORNUBER, J. Meconium Indicators of Maternal Alcohol Abuse during Pregnancy and Association with Patient Characteristics. **BioMed Research International**, 2014.

GOH, Y.I.; HUTSON, J.R.; LUM, L.; ROUKEMA, H.; GARERI, J.; LYNN, H.; KOREN, G. Rates of fetal alcohol exposure among newborns in a high-risk obstetric unit. **Alcohol**, v. 44, n. 7-8, p. 629-634, 2010.

GOODLETT, C.R.; HORN, K.H. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. **Alcohol Research & Health: the Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 25, n.3, p. 175-184, 2001.

HASTEDT, M.; KRUMBIEGEL, F.; GAPERT, R.; TSOKOS, M.; HARTWIG, S. Fatty acid ethyl esters (FAEEs) as markers for alcohol in meconium: method validation and implementation of a screening program for prenatal drug exposure. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, 2012.

HIMES, S. K.; CONCHEIRO, M.; SCHEIDWEILER, K.B.; HUESTIS, M.A. Validation of a novel method to identify in utero ethanol exposure: simultaneous meconium extraction of fatty acid ethyl esters, ethyl glucuronide, and ethyl sulfate followed by LC-MS/MS quantification. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.406, p.1945–1955, 2014.

HUESTIS, M.A; CONE, E.J. Alternative testing matrices. In: KARCH, S.B., ed. Drug abuse handbook. Boca Raton: CRC Press, p. 799-857, 1998.

HUTSON, J.R; ALEKSA, K.; PRAGST, F.; KOREN, G. Detection and quantification of fatty acid ethyl esters in meconium by headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.877, n. 1-2, p.8-12, 2009.

HUTSON, J.R; MAGRI, R.; GARERI, J.N.; KOREN, G. The incidence of prenatal alcohol exposure in Montevideo Uruguay as determined by meconium analysis. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.32, n.3, p.311-317, 2010.

HUTSON J.R; RAO, C.; FULGA, N.; ALEKSA, K.; KOREN, G. An improved method for rapidly quantifying fatty acid ethyl esters in meconium suitable for prenatal alcohol screening. **Alcohol**. Canada, v.45, p. 193-199, 2011.

JONES, K. L.; SMITH, D.W.; ULLELAND, C.N.; STREISSGUTH, A.P. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. **Lancet**, v. 1, n. 7815, p. 1267-71, 1973.

KALUZNY, M.A.; DUNCAN, L.A.; MERRITT, M.V.; EPPSE, D.E. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. **Journal of Lipid Research**, v.26, n.1, p.135-140, 1985.

KAUP, Z.O.L.; MERIGHI, M.A.B.; TSUNECHIRO, M.A. Avaliação do consumo de bebida alcoólica durante a gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.23, n.9, p. 575-580, 2001.

KLEIN, J.; KARASKOV, T.; KOREN, G. Fatty acid ethyl esters: a novel biologic marker for heavy in utero ethanol exposure: a case report. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.21, n.6, p.644-646, 1999.

KOREN, G.; HUTSON, J.; GARERI, J. Novel Methods for the Detection of Drug and Alcohol Exposure During Pregnancy: Implications for Maternal and Child Health. **Clinical pharmacology & Therapeutics**, v.83, n.4, p. 631-634, 2008.

KWAK, H.; HAN, J. Y.; CHOI, J.; AHN, H.; KWAK, D.; LEE, Y.; KOH, S.; JEONG, G.; VELÁZQUEZ-ARMENTA, E. Y.; NAVA-OCAMPO, A.A. Dose-response and time-response analysis of total fatty acid ethyl esters in meconium as a biomarker of prenatal alcohol exposure. **Prenatal Diagnosis**, v. 34, p.831–838, 2014.

KWAK, H.; KANG, Y.; HAN, K.; MOON, J.; CHUNG, Y.; CHOI, J.; HAN, J.; KIM, M. VELÁZQUEZ-ARMENTA, NAVA-OCAMPO A. Quantitation of fatty acid ethyl esters in human meconium by an improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, p. 1871–1874, 2010.

LARANJEIRA, R.; MADRUGA, C.S; PINSKY, I.; CAETANO, R.; MITSUHIRO, S.S.; CASTELLO, G. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD)-2012. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014 Acesso em: <http://inpad.org.br/wp-content/uploads/2014/03/Lenad-II-Relat%C3%B3rio.pdf> Acesso em 03/11/2015.

LISANSKY-GOMBERG, E. S. Women and alcohol: Use and abuse, **Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 181, n. 4, p. 211-219, 1993.

MANICH, A.; VELASCO, M.; JOYA, X.; GARCÍA-LARA, N.R.; PICHINI, S.; VALL, O.; GARCÍA-ALGAR, O. Validez del cuestionario de consumo materno de alcohol para detectar la exposición prenatal. **Anales de Pediatría**, v. 76, n.6, p.324-328, 2011.

MARTINEZ, E.Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B.B. A Curva ROC para Testes Diagnósticos. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. XI, n. 1, p. 7-31, 2003.

MCGLONE, L.; MACTIER, H.; HASSAN, H.; COOPER, G. In utero drug and alcohol exposure in infants born to mothers prescribed maintenance methadone. **Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition**. V.98, p.F542–F544, 2013.

McNAIR, H.M.; MILLER, J.M. Basic gas chromatography. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1997. 200p.

MESQUITA, M. A.; SEGRE, C. A. M. Frequência dos efeitos do álcool no feto e padrão de consumo de bebidas alcoólicas pelas gestantes de maternidade pública da cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, v. 19, n. 1, p. 63-67, 2009.

MIN, M.O.; SINGER, L.T.; MINNES, S.; WU, M.; BEARER, C.F. Association of fatty acid ethyl esters in meconium and cognitive development during childhood and adolescence. **The Journal of Pediatrics**, v.166, n. 4, p. 1042-1047, 2015.

MOLLER, M.; KARASKOV, T.; KOREN, G. Opioid detection in maternal and neonatal hair and meconium: characterization of an at-risk population and implications to fetal toxicology. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.32, n.3, p.318–323, 2010.

MOORE C.M.; LEWIS, D. Fatty acid ethyl esters in meconium: biomarkers for the detection of alcohol exposure in neonates. **Clinica Chimica Acta**, v.312, n.1-2, p.235-237, 2001.

MOORE, C.; JONES, J.; LEWIS, D.; BUCHI, K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. **Clinical Chemistry**, v.49, n.1, p. 133-136, 2003.

MORAES, C.L.; REICHENHEIM, M.E. Rastreamento de uso de álcool por gestantes de serviços públicos de saúde do Rio de Janeiro. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.5, p. 695-703,2007.

MORETTI-PIRES, R.O.; CORRADI-WEBSTER, C.M. Adaptação e validação do *Alcohol Use Disorder Identification Test* (AUDIT) para população ribeirinha do interior da Amazônia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.27, n.3, p. 497-509, 2011.

MORINI, L.; MARCHEI, E.; TARANI, L.; TRIVELLI, M.; RAPISARDI, G.; ELICIO, R.R.; RAMIS, J.; GARCIA-ALGAR, O.; MEMO, L.; PACIFICI, R.; GROPPI, A.; DANESINO, P.; PICHINI, S. Testing Ethylglucuronide in Maternal Hair and Nails for

the Assessment of Fetal Exposure to Alcohol: Comparison With Meconium Testing. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 35, n. 3, p. 402-407, 2013.

MORINI, L.; MARCHEI, E.; VAGNARELLI, F.; GARCIA-ALGAR, O.; GROPPA, A.; MASTROBATTISTA, L.; PICHINI, S. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol. **Forensic Science International**, v.136, n 1-3, p. 74-77, 2010a.

MORINI, L.; GROPPA, A.; MARCHEI, E.; VAGNARELLI, F.; ALGAR, O.G.; ZUCCARO, P.; PICHINI, S. Population Baseline of Meconium Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate Concentrations in Newborns of Nondrinking Women in 2 Mediterranean Cohorts. **Therapeutic Drug Monitoring**, 2010-b.

Nelson, D. L.; Cox, M.M. **Princípios de Bioquímica de Leningher**, 5ª ed, Porto Alegre, Artmed, 2011.

NOBILE, L.; MATHIAS, L.; KIN, H. Y.; MARTINS, J. A., Álcool e gravidez - considerações epidemiológicas e efeitos adversos sobre o conceito, **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 33, n. 5, p. 347-351, 1984.

OSTREA, E.M.; HERNADEZ, J.D.; BIELAWSKI, D.M.; KAN, J.M.; LEONARDO, G.M.; ABELA, M.B.; CHURCH, M.W.; HANNIGAN, J.H.; JANISSE, J.J.; AGER, J.W.; SOKOL, R.J. Fatty acid ethyl esters in meconium: are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect? **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.30, n.7, p. 1152-1159, 2006.

PETERSON, J.; KIRCHNER, H.L.; XUE, W.; MINNES, S.; SINGER, S.; BEARER, C.F. Fatty acid ethyl esters in meconium are associated with poorer neurodevelopmental outcomes to two years of age. **The Journal of Pediatrics**, v.152, n.6, p.788-792, 2008.

PICHINI, S.; MORINI, L.; PACIFICI, R.; TUYAY, J.; RODRIGUES, W.; SOLIMINI, R.; GARCIA-ALGAR, O.; RAMIS, J.; MOORE, C. Development of a new immunoassay for the detection of ethyl glucuronide (EtG) in meconium: validation with authentic specimens analyzed using LC-MS/MS. Preliminary results. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.52, n.8, p.1179-1185, 2014.

PICHINI, S.; PELLEGRINI, M.; GARERI, J.; KOREN, G.; ALGAR, O.G.; VALL, O.; VAGNARELLI, F.; ZUCCARO, P.; MARCHEI, E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium: assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 927-933, 2008.

PICHINI, S.; MORINI, L.; MARCHEI, E.; PALMI, I.; ROTOLO, M.C.; VAGNARELLI, F.; GARCIA-ALGAR, O.; VALL, O.; ZUCCARO, P. Ethylglucuronide and ethylsulfate in meconium to assess gestational ethanol exposure: preliminary results in two Mediterranean cohorts. **The Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, v.16, n 2, p. e370-5, 2009.



PICHINI, S.; MARCHEI, E.; VAGNARELLI, F.; TARANI, L.; RAIMONDI, F.; MAFFUCCI, R.; SACHER, B.; BISCEGLIA, M.; RAPISARDI, G.; ELICIO, M.R.; BIBAN, P.; CUCCARO, P.; PACIFICI, R.; PERANTOZZI, A.; MORINI, L. Assessment of Prenatal Exposure to Ethanol by Meconium Analysis: Results of an Italian Multicenter Study. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.38, n.3, p.417-424, 2011.

PIEREZAN, L.; CABRAL, M.R.P; NETO, D.M.; STROPA, J.M.; OLIVEIRA, L.C.S.; SCHARF, D.R.; SIMIONATTO, E.L.; SILVA, R.C.L.; SIMIONATTO, E. Composição química e temperatura de cristalização de ésteres obtidos de quatro óleos vegetais extraídos de sementes de plantas do cerrado. **Química Nova**, v. 38, n3, p.328-332, 2015.

RISTIMAA, J.; GERGOV, M.; PELANDER, A.; HALMESMÄKI, E.; OJANPERÄ, I. Broad-spectrum drug screening of meconium by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.398, n.2, p.925-935, 2010.

ROEHSIG, M.; PAULA, D.M.L. de; MOURA, S.; DINIZ, E.M.A.; YONAMINE, M. Determination of eight fatty acid ethyl esters in meconium samples by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v.33, n. 14, p.2115-2122, 2010.

SILVA, C.S.; RONZANI, T.M, FURTADO, E.F.; ALIANE, P.P.; MOREIRA-ALMEIDA, A. Relação entre prática religiosa, uso de álcool e transtornos psiquiátricos em gestantes. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.37, n.4, p.152-156, 2010.

Sobell, L.C.; Sobell, M.B. Timeline Follow-back: A technique for assessing self-reported ethanol consumption. In: Allen, J.; Litten, R.Z. **Measuring Alcohol Consumption: Psychosocial and Biological Methods**. Totowa: Humana Press, 1992, p. 41-72.

SOKOL, R.J.; MARTIER, S.S.; AGER, J.W. The T-ACE questions: practical prenatal detection of risk-drinking. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.160, n.4, p.863-868, 1989.

WHO (World Health Organization). **Global status report on alcohol and health 2014**. Genebra, 2014a. Disponível em:  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf?ua=1)  
Acesso em 04/012/2015

WHO (World Health Organization). **Guideline for identification and management of substance use and substance use disorders in pregnancy**. Genebra, 2014b. Disponível em:  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/107130/1/9789241548731\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/107130/1/9789241548731_eng.pdf?ua=1).  
Acesso em: 04/08/2014.

WHO (World Health Organization). **Self-help strategies for cutting down or stopping substance use: A guide**. Genebra, 2010. Disponível em.:

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44322/1/9789241599405\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44322/1/9789241599405_eng.pdf). Acesso em: 04/08/2014.

WILSNACK, S.C.; WILSNACK, R.W.; KANTOR, L.W. Focus on: Women and the Costs of Alcohol use. **Alcohol Research: Current Reviews**, v.35, n.2, p.219-228, 2014.

ZELNER, I.; SHOR, S.; GARERI, J.; LYNN, H.; ROUKEMA, H.; LIM, L.; EISINGA, K.; NULMAN, I.; KOREN, G. Universal screening for prenatal alcohol exposure: a progress report of a pilot study in the region of Grey Bruce, Ontario. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.32, n. 3, p.305–310, 2010.

ZELNER, I.; HUTSON, J.R.; KAPUR, B.M.; FEIG, D.S.; KOREN, G. False-positive meconium test results for fatty acid ethyl esters secondary to delayed sample collection. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 36, n. 9, p. 1497-1506, 2012a.

ZELNER, I.; SHOR, S.; LYNN, H.; ROUKEMA, H.; LIM, L.; EISINGA, K.; KOREN, G. Neonatal screening for prenatal alcohol exposure: assessment of voluntary maternal participation in an open meconium screening program. **Alcohol**, v. 46, n. 3, p. 269-276, 2012b.

ZELNER, I.; SHOR, S.; LYNN, H.; ROUKEMA, H.; LIM, L.; EISINGA, K.; KOREN, G. Clinical use of meconium fatty acid ethyl esters for identifying children at risk for alcohol-related disabilities: the first reported case. **Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. e26-31, 2012 c.

## APÊNDICE A – Estudo piloto

### 1. Contexto do estudo

No início desse projeto, estava acontecendo o recrutamento de gestantes com até 16 semanas de gestação para o projeto temático designado GESTA INTERVBREV e intitulado “Fatores associados à eficácia de um modelo de intervenções breves para redução do consumo de álcool na gestação”. Esse projeto temático foi desenvolvido pelo Núcleo de Pesquisa em Psiquiatria Clínica e Psicopatologia (NPCP) e coordenado pelo Professor Doutor Erikson Felipe Furtado.

No recrutamento, as gestantes foram rastreadas pelo questionário T-ACE, para identificar as gestantes com consumo de risco de álcool. Quando pontuaram dois ou mais pontos, as gestantes foram consideradas como positivas para o consumo de risco de álcool e, portanto, incluídas no estudo. No mesmo momento, as gestantes responderam um questionário de pesquisa para avaliação do consumo de álcool e, em seguida, por sorteio, recebiam intervenção breve ou um folheto educativo com orientações sobre os riscos do uso de álcool na gestação.

A partir da 25ª semana gestacional, uma nova avaliação do consumo de álcool dessas participantes foi realizada, a fim de avaliar a eficácia das intervenções breves.

Nesse contexto, optou-se em recrutar essas gestantes para avaliação dos FAEEs nos mecônios dos seus recém-nascidos.

### 2. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo coorte de gestantes com consumo alcoólico de risco acompanhadas desde o primeiro trimestre gestacional em serviços de atendimento pré-natal nas Unidades Básicas de Saúde de Ribeirão Preto e Araraquara e nos ambulatórios do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Elas foram recrutadas para coleta do mecônio durante a entrevista de reavaliação do consumo de álcool (terceiro trimestre gestacional). Nesse momento elas foram orientadas sobre a coleta do mecônio. A partir da 33ª semana gestacional, contatos por telefone foram realizados semanalmente, para verificar se

o nascimento da criança havia ocorrido e instruir sobre o procedimento da coleta do primeiro mecônio excretado. O mecônio foi coletado pelas mães ou pelas enfermeiras nas maternidades, colocado em frasco coletor universal sem conservantes e transportados até o laboratório onde ficou armazenados a -20°C.

Os dados referentes à caracterização sócio demográfica, consumo de álcool da participante foram retirados do banco de dados do projeto temático. Os dados pós-parto como informações de peso e estatura ao nascer, sexo da criança, modo de parto e idade gestacional foram obtidos na entrevista com mãe no momento da coleta do mecônio.

### **3. Análises dos FAEEs nos mecônios**

As amostras de mecônio foram processadas e analisadas de acordo com a metodologia validada e descrita no item 3.8 do capítulo II.

### **4. Dificuldades encontradas**

Esse tipo de delineamento resultou em uma coleta lenta, com dificuldades no momento da coleta da amostra mecônio, resultando em perdas amostrais. A imprevisibilidade da data do parto, uma vez que a maior parte dos partos foram normais, e a realização dos partos em diferentes hospitais e cidades, fizeram com que a coleta do mecônio não fosse realizada pela pesquisadora, dependendo exclusivamente da coleta pelas mães e pela equipe de enfermagem. Além disso, o momento do parto é repleto de emoções e dores, que propiciaram o esquecimento pela mãe da coleta do primeiro mecônio do seu filho.

As dificuldades encontradas não se restringiram somente na obtenção da amostra, mas também no controle da integridade da amostra, ou seja, o controle da temperatura e da exposição a luz e contaminantes não puderam ser garantidos quando a coleta não foi realizada pela pesquisadora.

Sendo assim, esse estudo piloto contribuiu para identificar os problemas potenciais do projeto e revisar e aprimorar o delineamento do estudo. Então, delineou-se um tipo de estudo que permitia a obtenção de um maior número

amostral e um maior controle das condições na coleta das amostras. Esse delineamento está descrito no item 3.1 do capítulo III.

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterização sociodemográfica da amostra

Das 80 participantes do projeto temático GESTA-INTERVBREV, apenas 36 mães tiveram o mecônio dos seus recém-nascidos coletados e incluídos nesse estudo piloto.

Em relação às características sociodemográficas, apresentadas na Tabela 1, as participantes apresentaram idade média de 26 anos ( $M=25,8$ ;  $DP= 4,7$ ), sendo a maioria casada ou moram junto com o companheiro (75%), e tendo alcançado nível de escolaridade do ensino fundamental completo ou acima deste (66,7%).

De acordo com a classificação da cor de branca, 38,9% das participantes declararam-se pardas. A maioria não exercia atividade remunerada no momento da entrevista (58,3%), e apresentaram uma média de renda familiar de 1197,32 reais ( $DP=585,68$  reais).

Em relação ao gênero dos recém-nascidos, 55,6% são do sexo masculino e 44,4% do sexo feminino. A maioria nasceu de parto normal (63,9%), com média aproximada de 39,6 semanas. O número médio de consultas pré-natais e ultrassonografias realizadas pelas participantes foi de 3,1 consultas ( $DP=1,7$ ) e 1,1 ultrassonografias ( $DP=0,3$ ). E a maior parte da gestação não foi planejada (63,9%).

As características antropométricas e foram apresentadas por medidas de tendência central (média, mediana) seguidas de medidas de dispersão (desvio padrão, mínimo e máximo), descritos Tabela 2. Em geral, os recém-nascidos apresentaram uma média de peso de 3378 gramas ( $DP=508,1$ ) e estatura de 49,0 centímetros ( $DP=2,2$ ).

Tabela 1- Características sociodemográficas das participantes

<b>Variáveis categóricas</b>	<b>Categorias</b>	<b>N=36</b>	<b>Porcentagem (%)</b>			
<b>Estado civil</b>	Casada	7	19,4			
	Vive junto	20	55,6			
	Solteira	8	22,2			
	Divorciada	1	2,8			
	Viúva	0	0,0			
<b>Escolaridade</b>	Nenhuma	0	0,0			
	Fundamental Incompleto	12	33,3			
	Fundamental Completo	2	5,6			
	Médio Incompleto	6	16,7			
	Médio Completo	12	33,3			
	Superior Incompleto	4	11,1			
	Superior Completo	0	0,0			
<b>Cor de pele</b>	Branca	14	38,9			
	Parda	12	33,3			
	Preta	9	25,0			
	Amarela	1	2,8			
	Indígena	0	0,0			
<b>Atividade remunerada</b>	Sim	15	41,7			
	Não	21	58,3			
<b>Parto</b>	Normal	23	63,9			
	Césarea	13	36,1			
<b>Gênero do RN</b>	Feminino	16	44,4			
	Masculino	20	55,6			
<b>Gestação planejada</b>	Sim	13	36,1			
	Não	23	63,9			
<b>Variáveis contínuas</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Idade da mãe (anos)</b>	36	25,8	4,7	26	18	37
<b>Renda familiar (reais)</b>	36	1197,32	585,68	1050,00	320,00	3000,00
<b>Idade gestacional (semanas)</b>	36	39,6	1,9	40,0	32,0	42,0
<b>Ultrassonografias gestacionais</b>	36	1,1	0,3	1,0	1,0	2,0
<b>Consultas pré-natais</b>	36	3,1	1,7	3,0	1,0	7,0

Tabela 2 – Dados antropométricos dos recém-nascidos

Variável	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máxima
Peso (g)	36	3,378	0,5081	3,403	2,105	4,450
Estatura (cm)	36	49,0	2,2	49,0	42,0	53,0

## 5.2 Avaliação da exposição fetal ao álcool mediante questionários

O questionário T-ACE foi utilizado no recrutamento das gestantes no início da gestação. Somente as gestantes com consumo de risco de álcool foram incluídas no estudo. Assim a pontuação mínima obtida nesse questionário foi de dois pontos. Na Figura 1, está ilustrada a distribuição das pontuações dessas participantes.

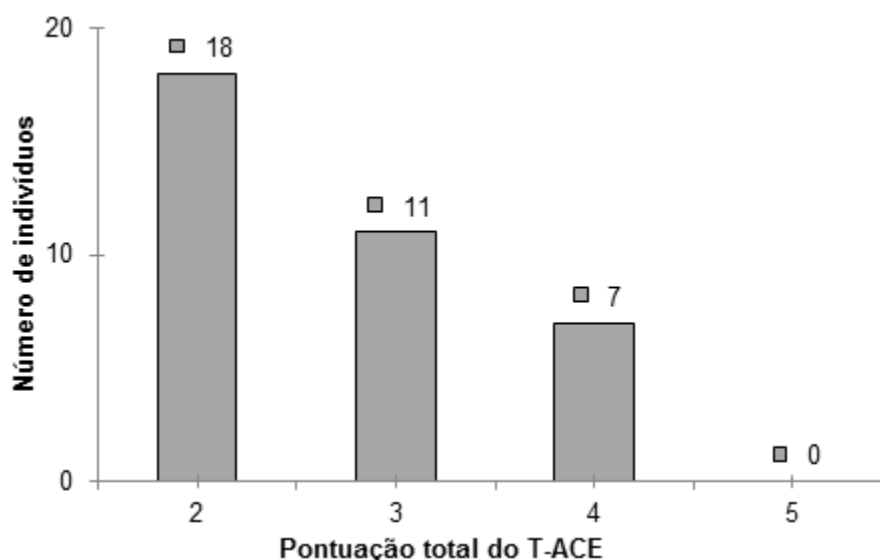


Figura 1– Distribuição das participantes com consumo alcoólico de risco de acordo com a pontuação obtida no questionário T-ACE.

O questionário AUDIT também foi aplicado no início da gestação nas participantes com consumo de álcool de risco. As gestantes que pontuaram 20 ou mais pontos foram classificadas como prováveis dependentes e excluídas do estudo, uma vez que o protocolo de intervenção breve não é indicado para essa população. Assim a classificação em categorias de padrão de consumo de álcool foi 33,3% (12/36) das participantes pertenciam à categoria uso de baixo risco, 63,9% (23/36) à categoria uso de risco, 2,8% (1/36) à categoria de uso nocivo (Figura 2).

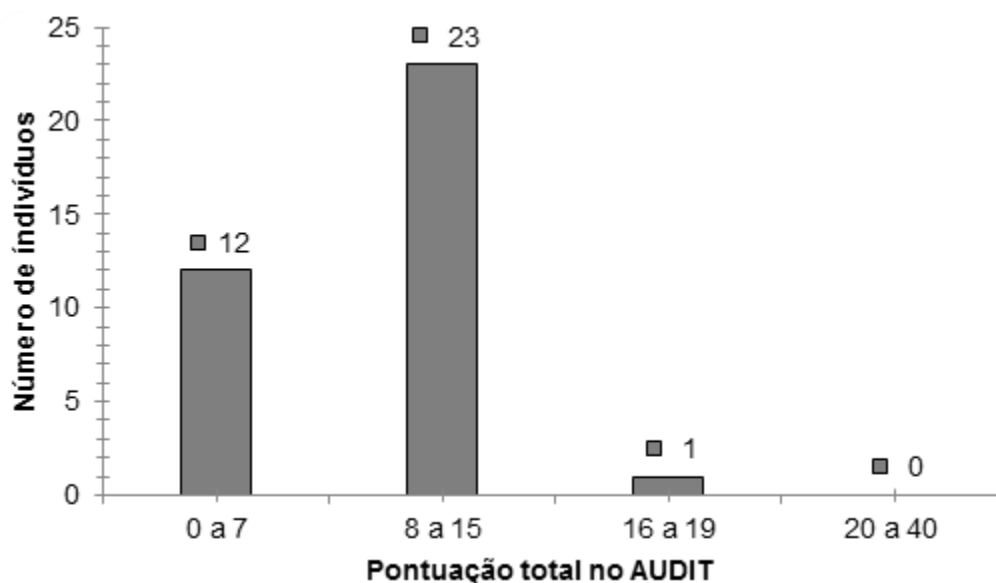


Figura 2- Distribuição das participantes de acordo com a pontuação obtida no questionário AUDIT. 0 a 7 pontos: categoria uso de baixo risco; 8 a 15 pontos categoria uso de risco; 16 a 19 pontos: categoria uso nocivo; 20-40 pontos: provável dependência.

Durante as entrevistas no primeiro e no terceiro trimestre, a gestante foi questionada sobre o número de doses-padrão consumidas por ocasião e do número de dias que ocorreu o consumo tipo *binge*, definido pelo consumo de três ou mais doses-padrão (Tabela 3). A média do número de doses por ocasião consumidas diminuiu de 5,8 (DP=3,2) no primeiro trimestre anterior à gestação para 2,4 (DP=3,0) no primeiro trimestre gestacional e 1,7 (DP=2,3) no terceiro trimestre. A média do número de dias que ocorreu *binge* foi de 15,2 dias (DP=14,8) no trimestre anterior à gestação, 2,2 dias (DP=4,9) no primeiro trimestre gestacional e 2,8 dias (DP=8,9) no terceiro trimestre.



Tabela 3 – Número de doses-padrão (volume de bebida alcoólica que contém 12 gramas de etanol puro) consumidas por ocasião e número de dias em que ocorreu *binge* (consumo de três ou mais doses em uma única ocasião).

	1ºtrimestre antes da gestação		1ºtrimestre da gestação		3ºtrimestre da gestação	
	Dose/ocasião	<i>binge</i> (dias)	Dose/ocasião	<i>binge</i> (dias)	Dose/ocasião	<i>binge</i> (dias)
M	5,8	15,2	2,4	2,2	1,7	2,8
Md	5,5	12,0	1,0	0,0	1,0	0,0
DP	3,2	14,8	3,0	4,9	2,3	8,9
Min	0	0	0	0	0	0
Máx	14,0	64,0	10,0	22,0	10,0	48,0
N	36	36	36	36	35	35

M=média; DP=desvio padrão; Md=mediana; Mín=mínimo; Máx=máximo; N= número amostral.

## 6. Determinação dos FAEEs no mecônio

O método analítico desenvolvido e validado foi aplicado em 31 amostras de mecônio das 36 amostras coletadas, uma vez que quatro amostras não apresentaram características típicas de mecônios e uma amostra não apresentou quantidade suficiente para análise.

. Os FAEEs determinados foram o palmitato, linoleato, oleato e estearato de etila. A concentração individual dos FAEEs foi determinada bem como a somatória das concentrações. Os resultados foram expressos em nanogramas do analito por grama de mecônio (ng/g). Na Tabela 4 estão expressos os valores de média, desvio padrão, mediana e valores mínimo e máximo para cada analito e para a somatória dos FAEEs e na Tabela 5 estão apresentados os números de indivíduos no qual os analitos FAEEs foram detectados e quantificados no mecônio.

O analito que apresentou a maior média de concentração foi o oleato de etila (5764 ng/g), seguido do linoleato de etila (1360 ng/g), palmitato de etila (2437 ng/g) e estearato de etila (291) ng/g). A média da somatória das concentrações dos quatro FAEEs resultou em 5020 ng/g.

Tabela 4 - Concentração em ng/g dos FAEEs quantificados nas 160 amostras de mecônio

FAEEs	Concentração dos FAEEs (ng/g)				
	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Palmitato de etila	1438	2437	230	50	8450
Linoleato de etila	1031	1360	686	112	5344
Oleato de etila	2733	5764	650	137	23960
Estearato de etila	275	291	151	51	899
<b>Total FAEEs</b>	<b>5020</b>	<b>9402</b>	<b>1591</b>	<b>218</b>	<b>38652</b>

O analito que apresentou maior prevalência foi o oleato de etila, sendo detectado em 61,3% dos casos e quantificado em 54,8%. O segundo analito mais prevalente foi o linoleato de etila e palmitato de etila sendo detectados ambos em 54,8% dos casos e quantificados em 41,9%, 51,6%, respectivamente. Por fim, o estearato de etila foi o analito menos prevalente. Em relação a somatória das concentrações dos FAEEs, 61,3% dos casos apresentaram, no mínimo, um FAEEs detectado e em 54,8% dos casos pelo menos um FAEEs quantificado.

Tabela 5 - Prevalência dos casos em que foram detectados e quantificados os FAEEs.

FAEEs	Detecção dos FAEEs		Quantificação dos FAEEs	
	N	%	N	%
Palmitato de etila	17	54,8	16	51,6
Linoleato de etila	17	54,8	13	41,9
Oleato de etila	19	61,3	17	54,8
Estearato de etila	10	32,3	9	29,0
<b>Total FAEEs</b>	<b>19</b>	<b>61,3</b>	<b>17</b>	<b>54,8</b>

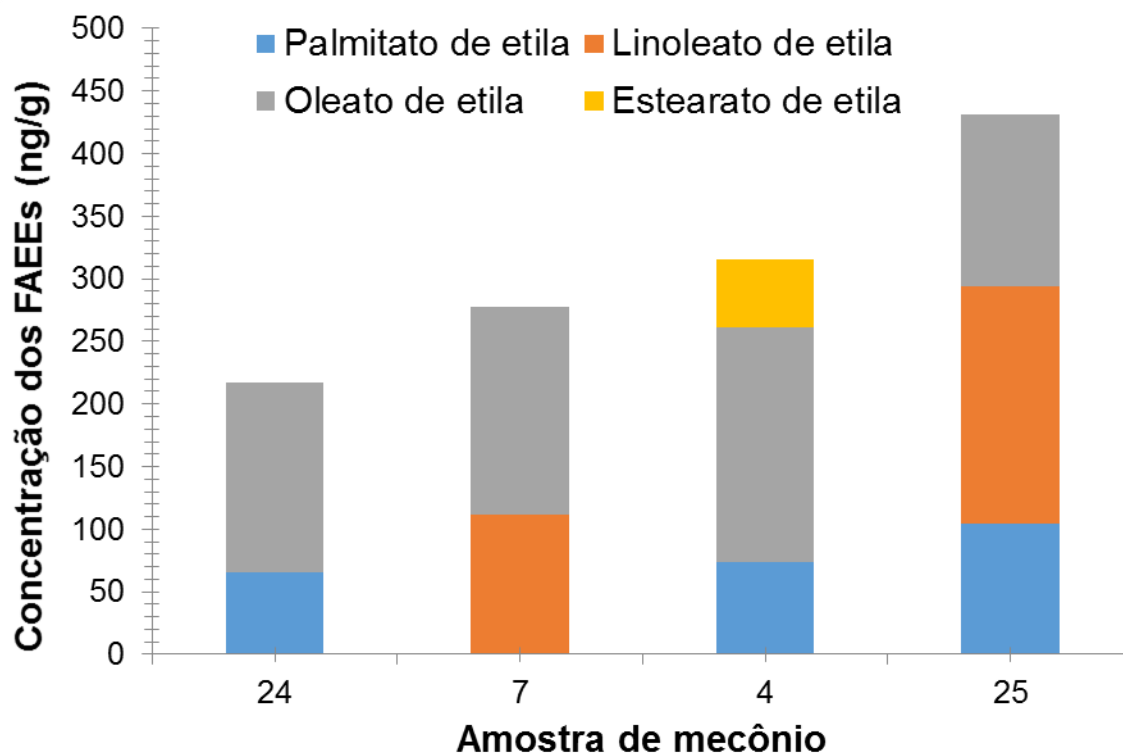


Figura 3 - Perfil de distribuição dos FAEEs nas amostras de mecônio coletadas do estudo piloto com concentrações variando entre limite inferior de quantificação e 600ng/g

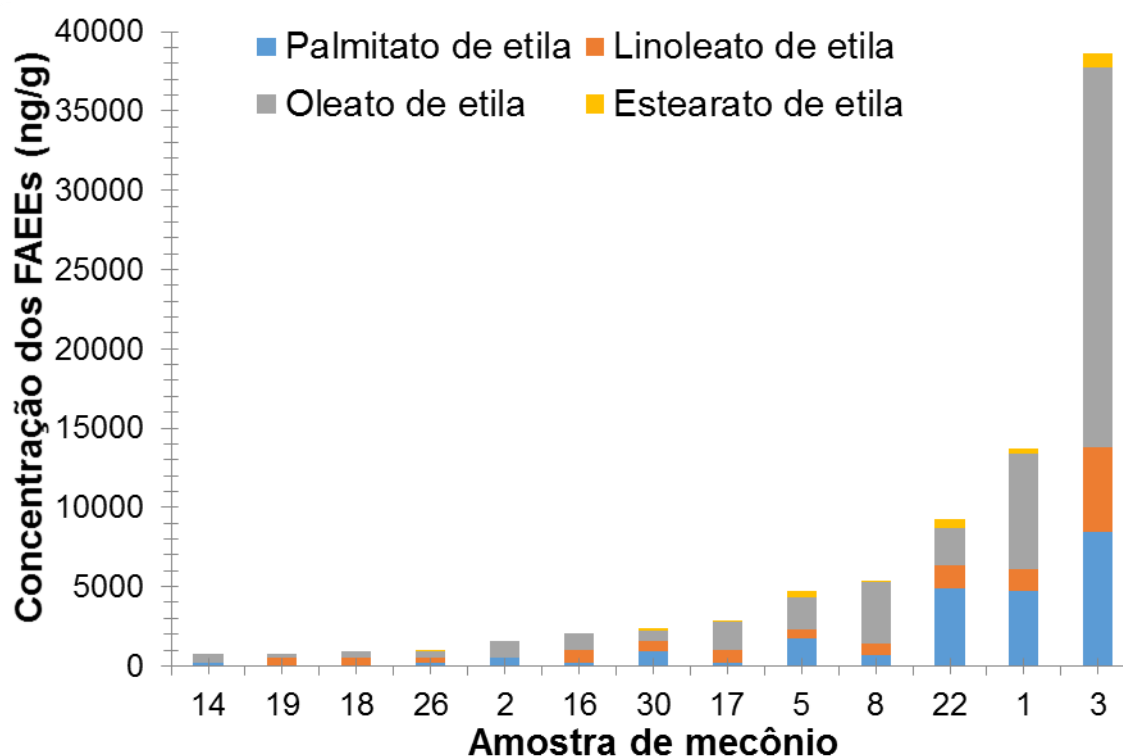


Figura 4 - Perfil de distribuição dos FAEEs nas amostras de mecônio do estudo piloto coletadas com concentrações maiores que 600ng/g













**Seção V – T-ACE – Rastreamento Orientações para o entrevistador**

O T-ACE é um questionário que avalia o uso de risco de álcool na gestação. As questões sublinhadas são para facilitar a conversa. Não é necessário anotar as respostas. Faça as perguntas 9 a 12 exatamente como estão escritas neste questionário. Marque com um X a opção que melhor se encaixa na resposta da gestante. Os valores de cada questão do T-ACE estão ao lado dos quadradinhos. Quando terminar toda a entrevista, por favor, some os números e anote no local indicado a pontuação final.

Você tem bom apetite? O que costuma comer nas refeições principais? Qual a bebida alcoólica de sua preferência?

53. Qual a quantidade que você precisa beber para se sentir desinibida ou mais “alegre”? (*Avaliar conforme nº de doses-padrão*) <sub>0</sub> Não bebo <sub>1</sub> Até duas doses <sub>2</sub> Três ou mais doses

54. Alguém tem lhe incomodado por criticar o seu modo de beber? (Ex: marido, filho, pais) <sub>0</sub> Não <sub>1</sub> Sim

55. Você tem percebido que deve diminuir seu consumo de bebida? <sub>0</sub> Não <sub>1</sub> Sim

56. Você costuma tomar alguma bebida logo pela manhã para manter-se bem ou para se livrar do mal-estar do “dia seguinte” (ressaca)? <sub>0</sub> Não <sub>1</sub> Sim

**Pontuação final:**  pontos

- Se a gestante pontuou 0 a 1 ponto - há um baixo risco para a saúde do bebê
- Se a gestante pontuou 2 a 5 – o uso de álcool da gestante pode trazer risco à saúde do bebê. Encaminhe a gestante para a equipe de pesquisa do PAI-PAD para que possamos fazer a intervenção a

**Seção VI – Avaliação dos Hábitos de Vida**

“Agora, gostaria de saber sobre seu consumo de bebida alcoólica, como cerveja, vinho, batidas, vodca, Martini, etc.”

57. Gostaria que você recordasse com que frequência você consumiu bebida alcoólica:

Trimestre anterior a Gestação	Primeiro trimestre	Segundo Trimestre	Terceiro Trimestre
<input type="checkbox"/> Nenhuma vez	<input type="checkbox"/> Nenhuma vez	<input type="checkbox"/> Nenhuma vez	<input type="checkbox"/> Nenhuma vez
<input type="text"/> <input type="text"/> doses por semana	<input type="text"/> <input type="text"/> doses por semana	<input type="text"/> <input type="text"/> doses por semana	<input type="text"/> <input type="text"/> doses por semana
<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
_____ _ (outra quant/freq)	_____ _ (outra quant/freq)	_____ _ (outra quant/freq)	_____ _ (outra quant/freq)

58. Qual a quantidade, em média, que você bebeu nessas ocasiões no trimestre anterior à gestação?   doses

59. Quantas vezes você consumiu três ou mais doses, no trimestre anterior a gestação?

Nenhuma   vezes

60. Qual a quantidade, em média, que você bebeu nessas ocasiões durante a gestação?

doses

61. Quantas vezes você consumiu três ou mais doses durante a gestação?

Nenhuma   vezes

62. Agora me responda sobre seu consumo de álcool habitual: **AUDIT**- Teste para Identificação de Problemas Relacionados ao Uso de Álcool

	0 Nunca	1 Mensalmente ou menos	2 De 2 a 4 vezes por mês	3 De 2 a 3 vezes por semana	4 4 ou mais vezes por semana
63. Com que frequência você consome bebidas alcoólicas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
64. Quantas doses de bebidas alcoólicas você consome num dia normal?	0 ou 1 <input type="checkbox"/>	2 ou 3 <input type="checkbox"/>	4 ou 5 <input type="checkbox"/>	6 ou 7 <input type="checkbox"/>	8 ou mais <input type="checkbox"/>



75. Atualmente, você costuma fumar cigarro? (*somente tabaco*)?  Não  Sim

76. Em média, quantos cigarros você fuma por dia?   cigarros por dia

77. Na sua vida qual (is) dessa (s) substâncias você já usou?

	Não	Sim
Derivados do tabaco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Maconha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cocaína, crack	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anfetaminas ou êxtase	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inalantes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hipnóticos/ sedativos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alucinógenos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Opióides	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Outras, especificar:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

Se “NÃO” em todos os itens investigue: Nem mesmo quando estava na escola?

Se “NÃO” em todos os itens vá para a seção VII

Se “SIM” para alguma droga continue a entrevista.

78. Durante os três últimos meses com que frequência você utilizou esta substância que você mencionou?

	Nunca	Uma ou duas vezes	Mensalmente	Semanalmente	Diariamente ou quase todos os dias
Derivados do tabaco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Maconha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cocaína, crack	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anfetaminas ou êxtase	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>







83. Alguma vez você já tentou controlar, diminuir ou parar o uso de (primeira droga, depois a segunda droga etc...) e não conseguiu?	Não, nunca	Sim, nos últimos três meses	Sim, mas não nos últimos três meses
Derivados do tabaco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Maconha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cocaína, crack	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anfetaminas ou êxtase	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inalantes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hipnóticos/ sedativos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alucinógenos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Opióides	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Outras, especificar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

84. Alguma vez você já usou drogas por injeção?	Não, nunca	Sim nos últimos 3 meses	Sim, mas não nos últimos 3 meses
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



**Seção VII – Avaliação da percepção de risco, crenças e conhecimento**

“Por fim, gostaria de saber sua opinião sobre alguns assuntos abaixo”.

85. Quão grave você pensa que deve ser para o seu bebê se você consumir álcool durante a gestação?

- <sub>1</sub> Nada grave      <sub>2</sub> Um pouco grave      <sub>3</sub> Grave      <sub>4</sub> Muito grave

86. Você já ouviu falar da Síndrome Fetal do Álcool?

- Não       Sim

“Nas questões abaixo responda “Sim” para as afirmativas que você concorda e “Não” para as afirmativas que você discorda”.

87. É bom para a saúde da gestante beber um pouco de cerveja pois esta bebida é diurética

- Não       Sim

88. O consumo de álcool durante a gestação pode causar aborto espontâneo

- Não       Sim

89. Crianças nascidas de mães que fizeram uso de álcool durante a gestação podem ter dificuldades de aprendizagem

- Não       Sim

90. Quando a mãe consome bebidas alcoólicas durante a gestação o álcool não passa para o bebê

- Não       Sim

91. Quanto mais a gestante bebe maiores as chances de ter um filho com retardo mental

- Não       Sim

92. A cerveja preta ajuda a mãe a produzir mais leite durante a amamentação

- Não       Sim

93. Durante a amamentação o álcool passa para o bebê

- Não       Sim

94. O uso de cigarro durante a gestação pode causar baixo peso e problemas respiratórios ao bebê

- Não       Sim

95. O uso de cigarro durante a amamentação altera o sabor do leite materno

- Não       Sim

96. Mesmo que a mãe fumante não esteja amamentando, se ela fumar próximo a criança poderá causar danos à saúde do seu filho

- Não       Sim

97. O consumo de bebida alcoólica na gestação pode provocar pressão alta

- Não       Sim

OBSERVAÇÕES:

---

**APÊNDICE C - Perfil de distribuição dos FAEEs nas amostras coletadas**

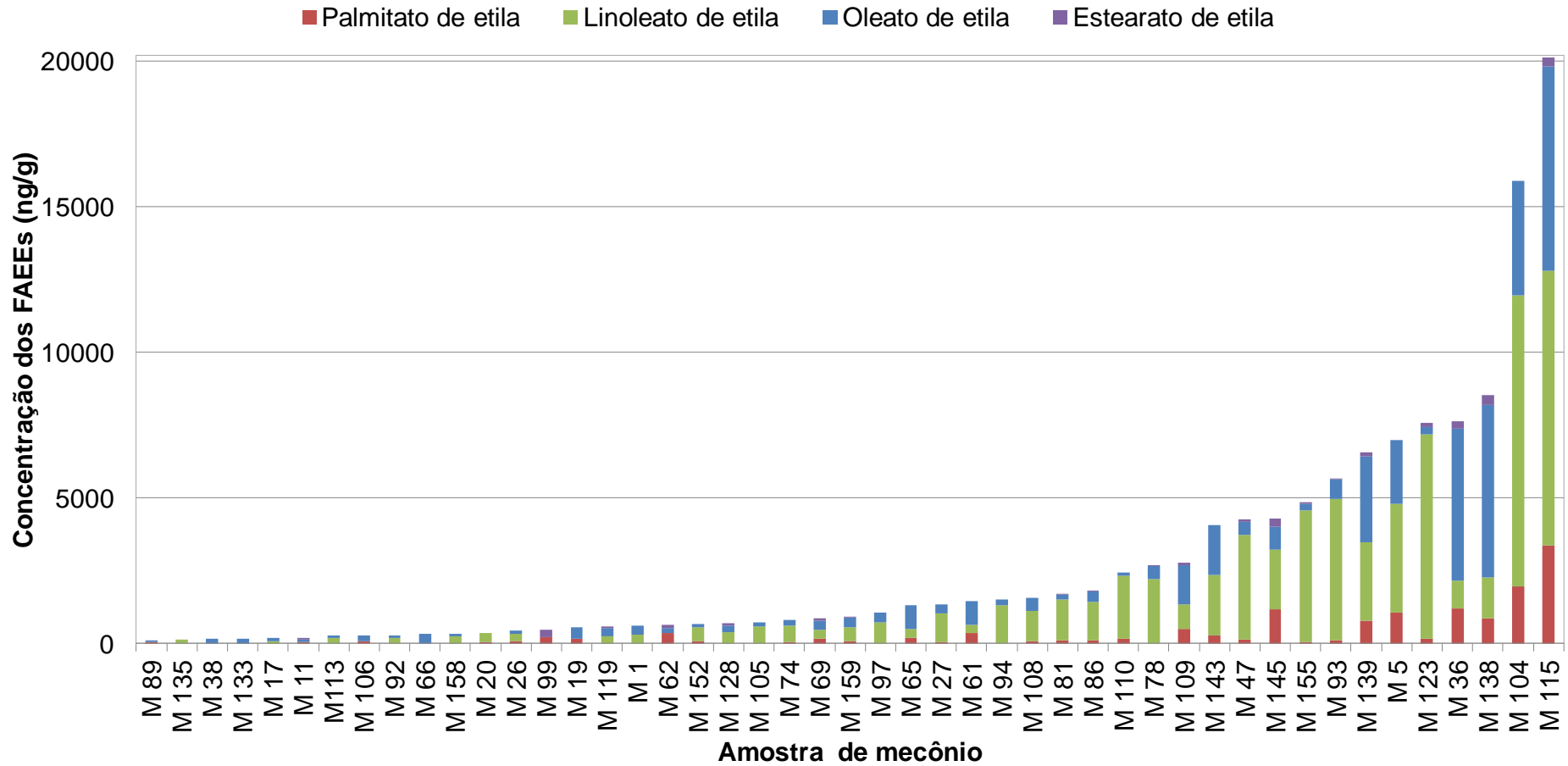


Figura 1 - Perfil de distribuição das concentrações dos FAEEs nas amostras de mecônio dos recém-nascidos cujas mães relataram o consumo de álcool durante a gestação

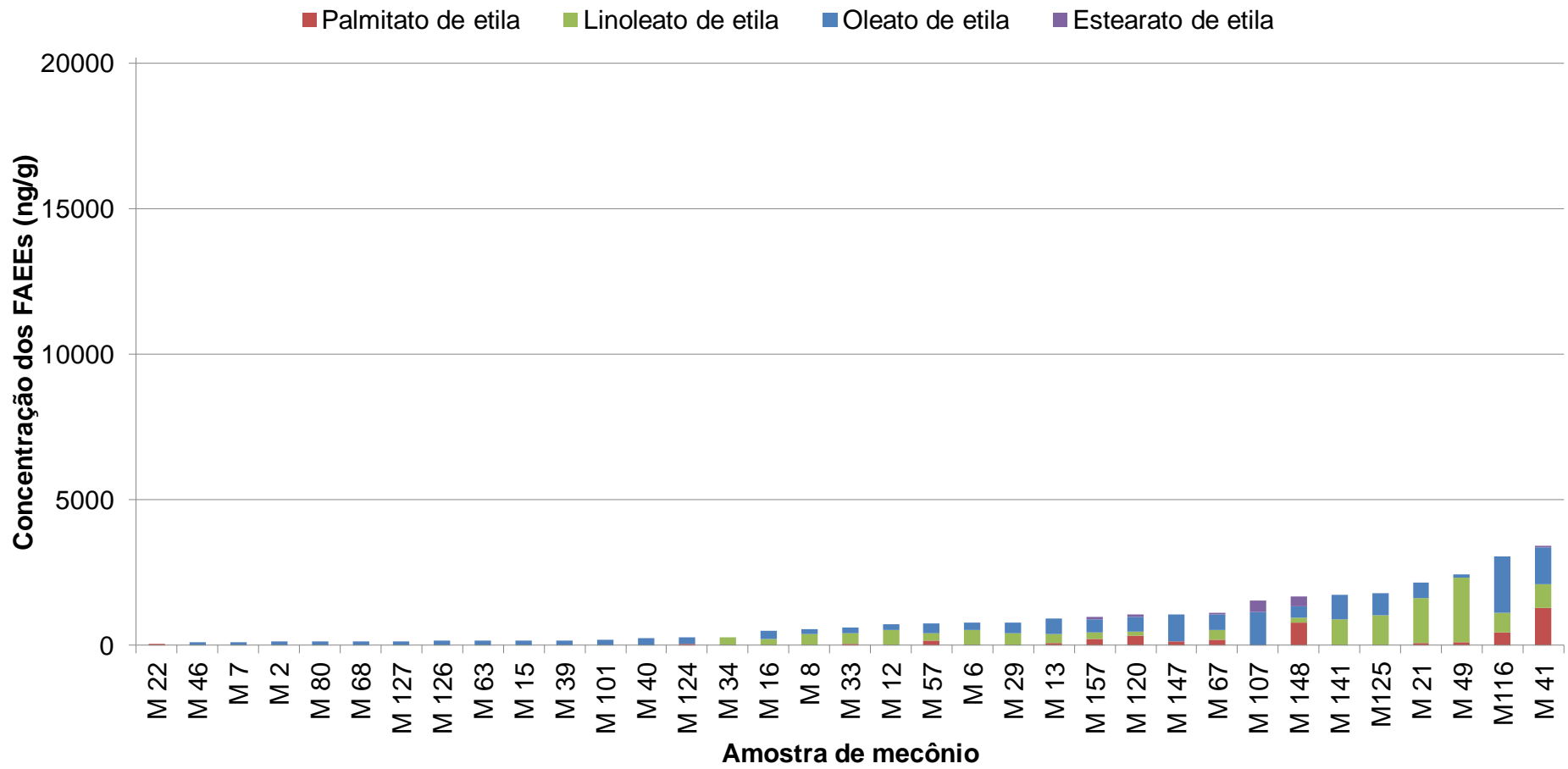


Figura 2 - Perfil de distribuição das concentrações dos FAEEs nas amostras de mecônio dos recém-nascidos cujas mães negaram o consumo de álcool durante a gestação

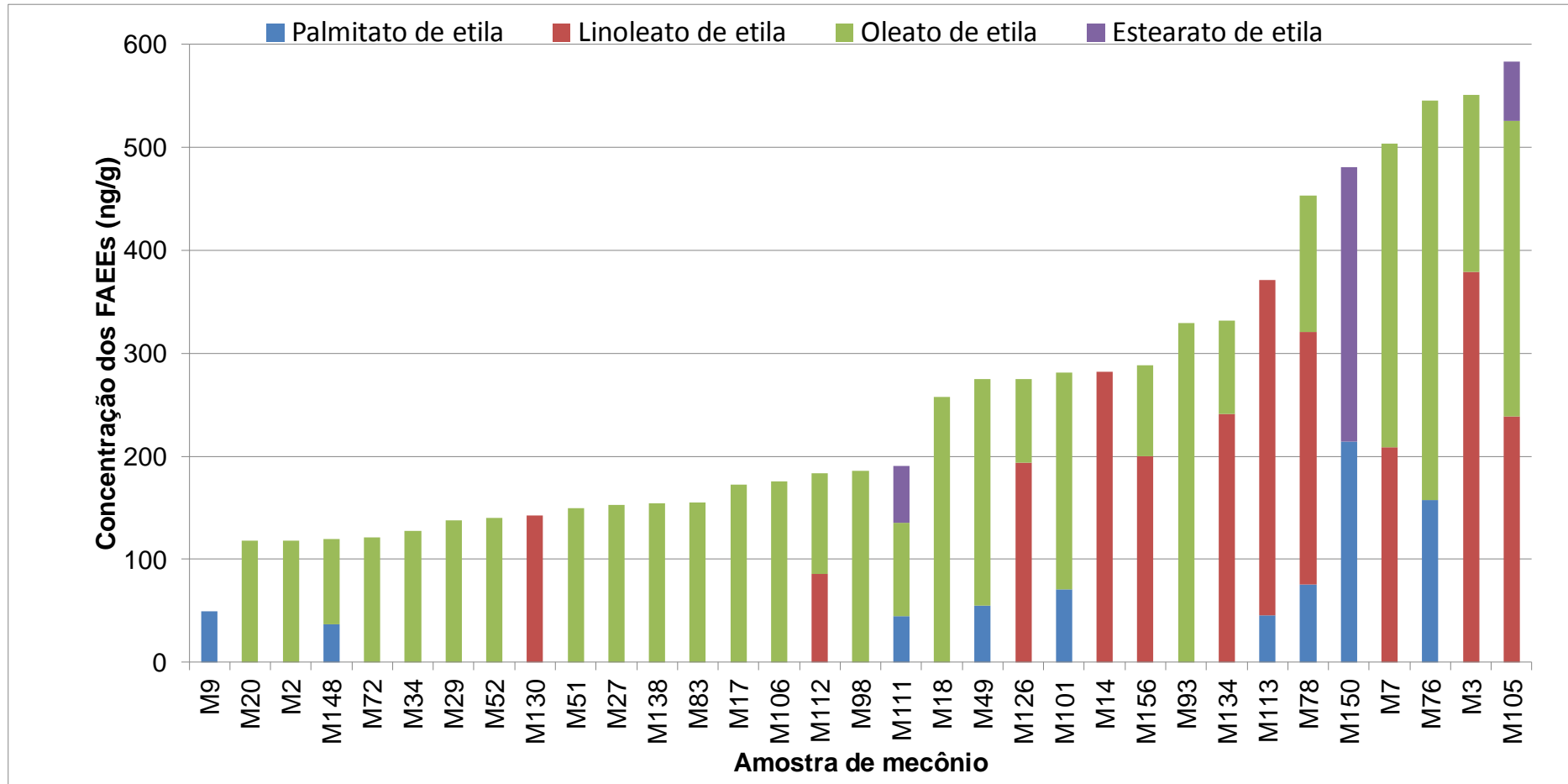


Figura 3 – Perfil de distribuição das concentrações dos FAEEs nas amostras de mecônio coletadas, com concentração variando entre o limite inferior de quantificação e 600 ng/g.

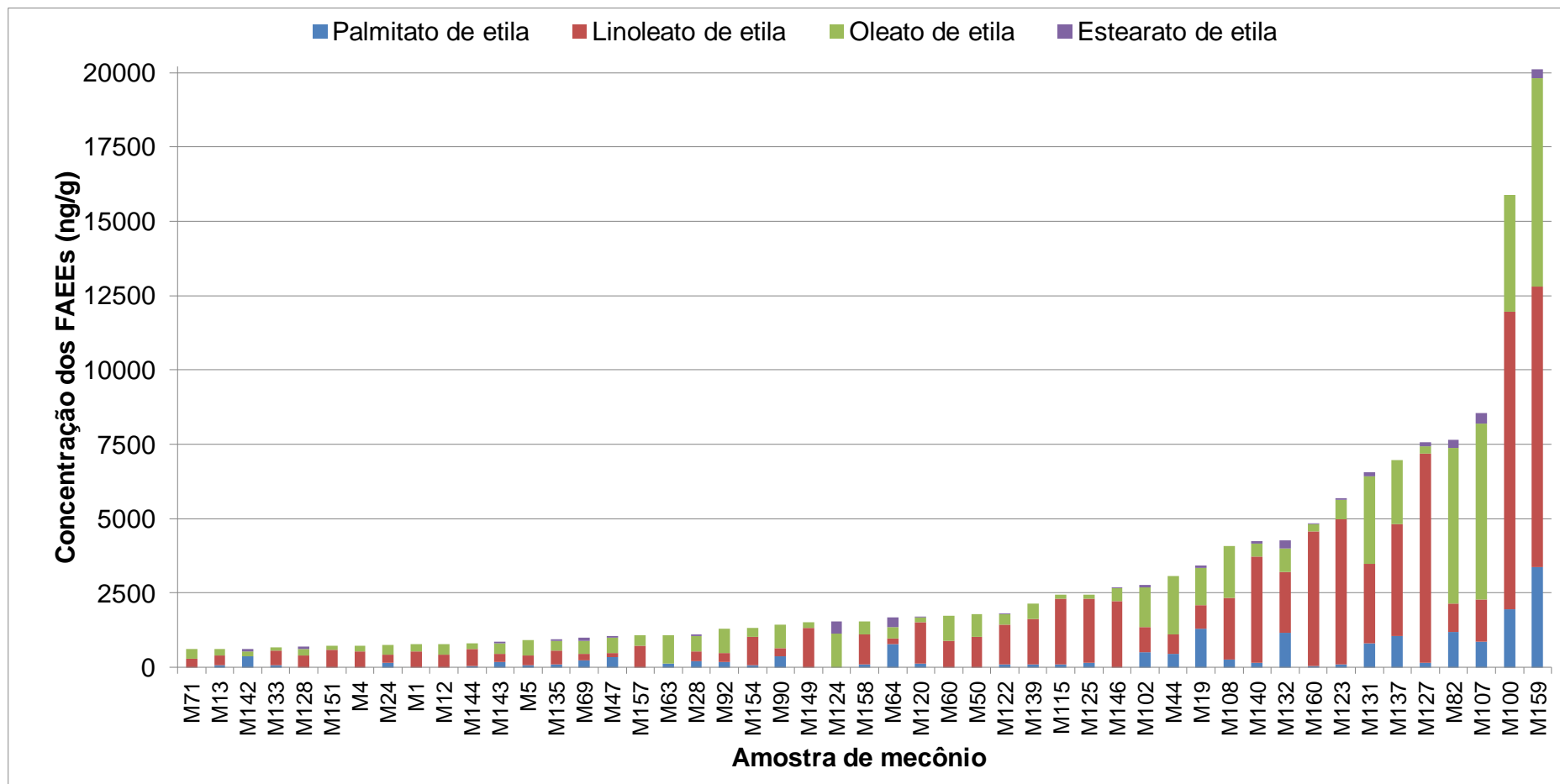


Figura 04 – Perfil de distribuição das concentrações dos FAEEs nas amostras de mecônio coletadas com concentração maior que 600 ng/g.

**ANEXO A – Aprovação do CEP do HC – FMRP - USP**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO[www.hcrp.usp.br](http://www.hcrp.usp.br)

Ribeirão Preto, 19 de janeiro de 2010

Ofício nº 108/2010  
CEP/MGV**Prezado Professor,**

O trabalho intitulado “**FATORES ASSOCIADOS À EFICÁCIA DE UM MODELO DE INTERVENÇÕES BREVES PARA REDUÇÃO DO CONSUMO DE ÁLCOOL NA GESTAÇÃO**” foi analisado “AD REFERENDUM” e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 12627/2009.

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

  
**DR<sup>a</sup> MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
**Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em**  
**Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP**

Ilustríssimo Senhor  
**PROF. DR. ERIKSON FELIPE FURTADO**  
Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

**ANEXO B - Aprovação do adendo do CEP do HC-FMRP-USP**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 26 de outubro de 2011.

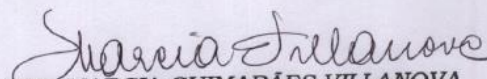
Ofício n.º 3864/2011  
CEP/MGV

**PROCESSO HCRP N.º 12627/2009**

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 317ª Reunião Ordinária, realizada em 07/02/2011, analisou e aprovou a solicitação de adendo (conforme parecer anexo), assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 2.0 de agosto de 2011 da pesquisa: “FATORES ASSOCIADOS À EFICÁCIA DE UM MODELO DE INTERVENÇÕES BREVES PARA REDUÇÃO DO CONSUMO DE ALCOOL NA GESTAÇÃO”. **O CEP aprovou a continuidade da pesquisa.**

Atenciosamente,

  
**DR.ª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
**Coordenadora do Comitê de Ética em**  
**Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP**

**Ilustríssimo Senhor**  
**PROF. DR. ERIKSON FELIPE FURTADO**  
Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento

Campus Universitário – Monte Alegre  
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP  
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4  
(016) 3602-2228  
cep@hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



### **COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

I - Identificação

Processo nº: 12627/2009

CAAE: 0504.1.004.000-09

Pesquisadores: Prof. Dr. Erikson Felipe Furtado

Título do Projeto: Fatores associados a eficácia de um modelo de intervenções breves para redução do consumo de álcool na gestação

Instituição: Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento

Ref. Resposta as pendências do adendo, folhas 73 a 100

### **PARECER**

O pesquisador responsável encaminhou para apreciação do CEP em carta datada de 18/08/2011 um adendo solicitando a inclusão de um procedimento na pesquisa supracitada. Trata-se da inclusão de coleta de meconônio dos neonatos das participantes da pesquisa. Serão coletados meconônio dos neonatos das mulheres identificadas como positivas e negativas para uso de risco de bebidas alcoólicas na gestação. Após análise do CEP, a solicitação foi considerada EM PENDÊNCIA, com a necessidade de adequações no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os pesquisadores encaminharam às respostas as pendências para nova apreciação.

**Parecer:** O CEP analisou e considerou o adendo APROVADO, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão 2.0 de agosto de 2011.



## ANEXO C – Aprovação da Comissão de Pesquisa do CSRM-MATER



CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE  
DA MULHER DE RIBEIRÃO PRETO

### COMISSÃO DE PESQUISA DO CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER DE RIBEIRÃO PRETO - MATER

Ref.: Projeto de Pesquisa: Diagnóstico da exposição fetal ao álcool através de biomarcadores em mecônio.

Nº 005/2013

Fabiana Spinetti dos Santos

Prezado Pesquisador (a)

Informamos que o seu projeto foi avaliado pela Comissão de Pesquisa Clínica do CRSM-Mater no dia 20/06/2013 e considerado **aprovado** para realização nessa instituição.

Lembramos que essa aprovação pressupõe o cumprimento das seguintes necessidades:

- 1- Apresentação do parecer do CEP antes do início da abordagem de potenciais sujeitos para o estudo
- 2- Apresentação de relatórios parciais (Anexo 3), semestralmente, indicando o andamento da pesquisa.
- 3- Apresentação de relatório final de pesquisa (Anexo 3) que deverá ser acompanhado de um resumo estruturado da mesma (uma lauda, contendo introdução, métodos, resultados e conclusões) para a documentação do projeto de pesquisa junto ao CRSM-Mater
- 4- Todos os procedimentos relacionados ao projeto de pesquisa que não estejam dentro da rotina do serviço deverão ser realizados pela equipe do projeto, não se utilizando de funcionários da instituição.

Atenciosamente,

DRª. MARISA MÁRCIA MUSSI-PINHATA

Presidente da Comissão de Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher

**ANEXO D- Aprovação do CEP da FCRP-USP**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 062/2013  
kms

Ribeirão Preto, 17 de dezembro de 2013.

À pós-graduanda  
**Fabiana Spinetti dos Santos**  
Orientador: Prof. Dr. Erikson Felipe Furtado  
FMRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "DIAGNÓSTICO DA EXPOSIÇÃO FETAL AO ÁLCOOL ATRAVÉS DE BIOMARCADORES EM MECÔNIO", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 323, foi analisado e aprovado ad referendum do CEP em 17/12/2013.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO  
Coordenadora do CEP/FCFRP