

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

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.

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 abstêmias. 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 abstinentes (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^a-16^a 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.

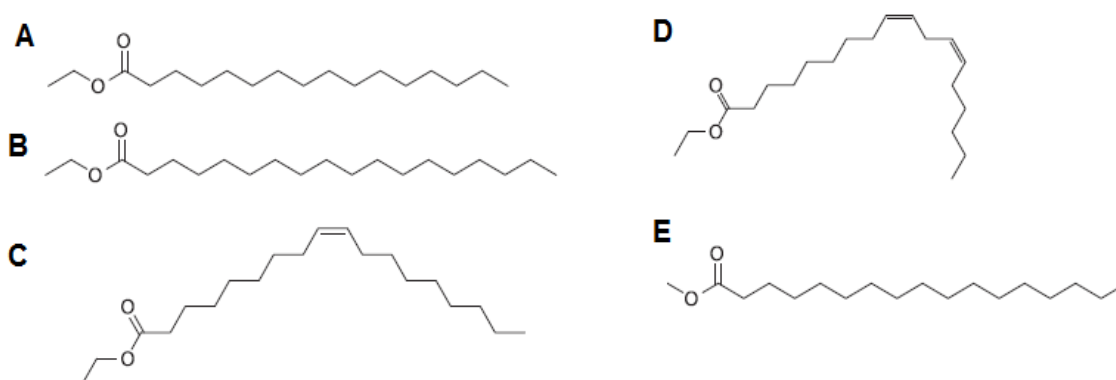


Figura 2 - Estrutura química dos analitos em estudo: (A) Palmitato de etila –E16; (B) Estearato de etila – E18; (C) Oleato de etila – E18:1; (D) Linoleato de etila – E18:2; (E) Heptadecanoato de metila – M17. (Figura adaptada de ROEHSIG et al., 2010).

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
1. Seletividade	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
2. Efeito residual (carryover)	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.
3. Efeito matriz	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%.
4. Curva de calibração	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.
5. Precisão	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%.
6. Exatidão	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.
7. Estabilidade do analito na matriz biológica	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.
8. Estabilidade do analito e do padrão interno em solução	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 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 3- 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 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> 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>. 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 Psicotrópicas), 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**. 3rd 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.; GROPPPI, 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.; GROPPPI, 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
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.
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. 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.; LUM, 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.; LUM, 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.