

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Saliva: uma matriz alternativa para determinação de biomarcadores do
cigarro em gestantes

NAYNA CÂNDIDA GOMES

RIBEIRÃO PRETO
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Saliva: uma matriz alternativa para determinação de biomarcadores do
cigarro em gestantes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia.

Orientada: Nayna Cândida Gomes

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis.

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 07/03/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RIBEIRÃO PRETO

2018

RESUMO

GOMES, N. C. **Saliva: uma matriz alternativa para determinação de biomarcadores do cigarro em gestantes**. 2018. 115f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O tabagismo durante a gravidez é o principal fator de risco previsível associado com complicações tanto no parto quanto na gestação. Estão relacionados, por exemplo, partos prematuros, baixo peso ao nascer, doenças no trato respiratório do feto e, com a morte infantil. A exposição à fumaça do tabaco pode ser avaliada através da presença de nicotina e cotinina nos fluidos biológicos, incluindo plasma, soro, urina, saliva, cabelo e unha. A saliva é uma matriz alternativa que apresenta como vantagens a facilidade de obtenção, não é uma amostra invasiva, a coleta pode ser assistida, é de baixo custo, o risco de contração de infecções durante a coleta e manuseio da amostra é mínimo e pode ser utilizada em situações que é difícil a obtenção de outro tipo de amostra. Como a prevalência de gestantes fumantes de cigarro é relativamente alta, é importante uma confirmação por um laboratório de análise para classificar de forma correta e confiável se a gestante é fumante ou não. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e validar um método para análise de nicotina e cotinina em amostras de saliva de gestantes. Foi utilizada a extração líquido-líquido para o preparo das amostras de saliva e foi realizada a cromatografia em fase gasosa com detector termiônico específico para a separação, identificação e quantificação dos analitos nicotina, cotinina e do padrão interno ketamina. O limite de detecção foi de 10 ng/mL para nicotina e de 6 ng/mL para cotinina. Os limites inferiores de quantificação foram de 40 ng/mL e 20 ng/mL para a nicotina e cotinina, respectivamente. O método foi considerado linear na faixa de concentração de 40 a 2000 ng/mL ($R=0,996$) para a nicotina e de 20 a 2000 ng/mL ($R=0,999$) para a cotinina. Os valores de recuperação dos analitos variaram de 66,1% a 92,2%. A precisão intradia apresentou uma variação de 6,06% a 11,50% e a precisão interdica variou de 6,89% a 10,57%. A exatidão intradia variou de -11,29% a 19,81%, e os valores da exatidão interdica variaram de -11,78% a 13,08%. Ambos os analitos apresentaram estabilidade nas amostras biológicas e em solução. Na primeira avaliação (período gestacional de 1 a 25 semanas), o método foi aplicado em 259 amostras de saliva de gestantes fumantes e não fumantes. E na segunda (período gestacional de 36 a 40 semanas e até 113 dias após o parto), foi aplicado em 45 amostras de gestantes fumantes. Foi observada uma diferença significativa ao comparar o autorrelato das gestantes fumantes e não fumantes, na primeira avaliação, com a concentração de nicotina e cotinina nas amostras de saliva ($p<0,001$). As concentrações de cotinina em amostras de saliva correlacionaram positivamente com o número de cigarros consumidos diariamente pelas gestantes fumantes, na primeira avaliação ($p<0,001$). Não foram obtidas diferenças estaticamente significativas para as variáveis: número de cigarros diários ($p=0,255$), concentração de nicotina ($p=0,949$) e cotinina ($p=0,665$). O ponto de corte da nicotina foi maior que zero, com sensibilidade de 36,8% e especificidade de 97,7%. Para a cotinina, o ponto de corte foi maior que 17,2 ng/mL, com sensibilidade de 94,3% e especificidade de 98,8%. O método analítico desenvolvido e validado atendeu aos critérios exigidos pela resolução 27/2012 e à 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Palavras-chave: Nicotina; Cotinina; Cromatografia gasosa; Gestantes fumantes.

1 INTRODUÇÃO

Linneu, o autor da primeira classificação científica dos vegetais, classificou a planta do tabaco ou fumo, como *Nicotiana tabacum L.* em homenagem ao Jean Nicot, embaixador francês, quem introduziu a planta na corte francesa. Por volta de 1560, ele enviou a primeira planta à rainha Catarina de Médici, com o objetivo de aliviar suas enxaquecas. A partir daí, o hábito de fumar propagou rapidamente por toda a Europa (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

Com a chegada da Revolução Industrial o tabagismo foi difundido na sociedade moderna e teve o seu ápice com o fim das Grandes Guerras (UTAGAWA et al., 2007). O hábito de fumar surgiu entre os homens e somente após o ano de 1950 foi que se tornou comum entre as mulheres (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2008). O consumo deste já foi associado a comportamentos sociais que abrangiam desde o *glamour* até a rebeldia (MARQUES; RIBEIRO, 2002).

Atualmente, estima-se que há 1,3 bilhão de fumantes no mundo e que o consumo médio é de 5,5 cigarros por habitante. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) ocorrem cinco milhões de óbitos associados ao consumo, e um milhão deles ocorre nas Américas (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2008). Calcula-se que no ano de 2030, as mortes pelo uso do tabaco poderão exceder oito milhões ao ano (MALAFATTI; MARTINS, 2009). No Brasil, conforme a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, em 2008, cerca de 24,6 milhões de habitantes acima de 15 anos fumavam derivados do tabaco. Nos últimos nove anos, o número de fumantes no Brasil caiu 30,7% (INCA, 2015). Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde, em 2013, o percentual de tabagismo na população brasileira acima de 18 anos era de 14,7% e destes, 18,9% eram homens e 11,0% eram mulheres (INCA, 2016).

Quanto mais precocemente o indivíduo começa a fumar maior o risco de dependência e de dificuldade para deixar de fumar. Segundo as estatísticas, 80% dos fumantes começaram a fumar com idade inferior a 18 anos (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

O uso do cigarro por mulheres no período gestacional é um sério problema de saúde pública, uma vez que apresenta consequências que vão além dos prejuízos à saúde materna. Há tantos malefícios sobre o feto que se pode dizer que ele é um verdadeiro fumante ativo (KROEFF et al., 2004). Nos últimos anos, várias pesquisas têm alertado para o aumento do consumo de álcool, tabaco, maconha e outras

drogas durante a gestação, porém não se observa mudanças significativas para diminuir este consumo por parte das gestantes, não só no Brasil, mas como também em alguns outros países. Embora haja esse aumento em nosso país, há poucos estudos epidemiológicos e analíticos que correlacionam gestação com consumo de drogas (YAMAGUCHI et al., 2008). No estudo realizado por Kroeff et al. (2004) a frequência de gestantes fumantes, entre os anos de 1991-1995, em São Paulo era de 16,1% e, em Porto Alegre, de 17,5%, e o consumo diário de cigarro era de aproximadamente 8 e 9, respectivamente. No estudo desenvolvido por Levy et al., em 2008, a prevalência do tabagismo entre as mulheres grávidas no Brasil foi de 7,7%.

Na tentativa de diminuir o tabagismo, alguns países possuem legislação que restringe a publicidade do tabaco, e que regulamenta quem pode comprar e usar produtos de tabaco, e onde as pessoas podem fumar (WHO, 2015). A cessação do tabagismo no início gestacional apresenta maiores benefícios para o desenvolvimento do feto, porém caso a interrupção seja em qualquer momento da gravidez ou mesmo no pós-natal, há um impacto significativo na saúde da família (KROEFF et al., 2004).

A avaliação do estado de fumar entre as gestantes é baseada principalmente em autorrelatos. No entanto, apenas uma confirmação por um laboratório de análise pode levar a classificação correta e confiável, uma vez que as mulheres grávidas podem não admitir o consumo do tabaco (BOWKER et al., 2015).

Neste sentido, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos, precisos, rápidos e de menor custo para determinação de biomarcadores de exposição à fumaça do cigarro. Além disso, é de grande importância a seleção de amostras biológicas alternativas que sejam pouco invasivas e tão representativas quanto às convencionais. Assim, a saliva se enquadra nestes requisitos importantes para escolha da matriz.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TABACO E CIGARRO

O tabaco é obtido da planta *Nicotiana* da família *Solanaceae*, que engloba mais de 50 espécies diferentes (DELFIM, 2004). A nicotina, um alcaloide vegetal cuja principal fonte é o tabaco, está presente em matrizes humanas primeiramente devido à exposição à fumaça do tabaco, contudo também pode ser encontrada em uma série de vegetais (ROSEMBERG, 2003; BARROS, 2011). Membros dessa família, tais como batata, tomate, berinjela e pimenta, contém nicotina em sua composição, mas em concentrações baixas o que não gera riscos e efeitos quando consumidos. Considera-se que a presença da nicotina nestas plantas apresenta função de defesa natural contra fungos, bactérias, insetos e animais (BARROS, 2011).

A composição química do tabaco resulta da região de cultivo, do solo, da secagem e do armazenamento (GALVÃO; MOREAU, 1996). Duas principais espécies da família *Solanaceae* – *Nicotiana tabacum* L. e *Nicotiana glauca* L. – produzem grandes quantidades de nicotina que é sintetizada nas raízes, subindo pelo caule até as folhas (ROSEMBERG, 2003; DELFIM, 2004). As áreas mais altas e próximas ao talo armazenam maiores concentrações deste alcaloide (BARROS, 2011). São encontrados na planta do tabaco mais de vinte tipos de alcaloides sendo que a nicotina constitui em média 98,0% do total. Esses alcaloides são os principais componentes ativos dos produtos de tabaco (KATAOKA et al., 2008). Pode-se destacar também a presença da anatabina e anabasina. Além de contribuírem para as propriedades organolépticas da fumaça do cigarro, esses alcaloides também indicam a qualidade do tabaco (CAI et al., 2003).

As modalidades mais comuns do uso do tabaco são sob a forma de tabaco fumado e tabaco não fumado. A forma fumada engloba o cigarro industrializado e de cravo, cachimbo e charuto, já na forma não fumada tem-se o tabaco mascado e o rapé (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

Mundialmente o cigarro é a principal modalidade de uso do tabaco. No entanto, em alguns países ainda predominam outros usos tradicionais, sobretudo nas comunidades rurais e afastadas dos grandes centros. Por volta de 1840 o cigarro começou a ser industrializado e inicialmente era enrolado a mão, e em 1850, essa operação tornou-se mecanizada. Hoje em dia as máquinas de produção

chegam a produzir 16 mil cigarros por minuto (GALVÃO; MOREAU, 1996; GALVÃO; MOREAU, 2003).

O cigarro industrializado apresenta um filtro em uma das extremidades na tentativa de diminuir a inalação de partículas tóxicas presentes na fumaça. A volatilização da nicotina ocorre uma vez que ela apresenta ponto de ebulição de 247°C e na queima do cigarro a temperatura chega a 850°C, permitindo assim a inalação desse alcaloide (WILLS, 2002). Durante a combustão do tabaco, ocorrem três reações simultaneamente devido a essa alta temperatura gerada na brasa do cigarro, sendo estas: pirólise, pirossíntese e destilação. A pirólise, decorrente da decomposição térmica, resulta as substâncias orgânicas em pequenas moléculas fracionadas; na pirossíntese (síntese pelo calor), os elementos fracionados da pirólise se recombinaem em novos componentes originalmente não existentes no tabaco. E devido ao alto aquecimento na ponta do cigarro, algumas substâncias são destiladas, como por exemplo, a nicotina (GALVÃO; MOREAU, 1996; GALVÃO et al., 2003; BARROS, 2011) .

Duas fases fundamentais do cigarro podem ser diferenciadas: a gasosa e a particulada. A fase gasosa é constituída de gases e vapores formados na pirólise e pirossíntese, tais como o monóxido de carbono, óxido de nitrogênio, amônia, aldeídos, nitrosaminas voláteis e nitrilas. E a fase particulada, também chamada de condensado, é composta por nicotina, água e alcatrão (GALVÃO; MOREAU, 1996; DELFIM, 2004). O alcatrão é definido pela FTC (*Federal Trade Commission*) como o conjunto das partículas da fumaça do cigarro com exceção da água e dos alcaloides. Ele é composto por pelo menos 3.500 substâncias químicas, que são formadas durante a queima, em consequência à combustão incompleta dos materiais orgânicos presentes (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

A fumaça do cigarro é composta por 4.800 substâncias. O potencial carcinogênico dessas substâncias foi avaliado, no ano de 2000, pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) e classificou 69 constituintes da fumaça como cancerígeno em animais, dentre essas, 11 também foram comprovados em humanos (KANE et al., 2005; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014). São também exemplos de substâncias que podem ser encontras na fumaça do cigarro: metais (arsênio, níquel, cádmio e cromo), promotores potenciais de câncer (acetaldeído e fenóis), irritantes (bióxido de nitrogênio e formaldeído), toxinas ciliares (cianeto de hidrogênio e monóxido de carbono) e elementos radioativos

(polônio-210, carbono-14, potássio-40) (HUSAIN; KUMAR, 2005; KANE et al., 2005). São adicionadas ao tabaco algumas substâncias com o intuito de melhorar as propriedades organolépticas, como agentes umectantes, flavorizantes e aglutinantes. Podem aparecer também, outros compostos como resultado da contaminação do mesmo, como praguicidas e fertilizantes (GALVÃO; MOREAU, 1996).

A Resolução RDC nº 14/2012, da Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA), proibiu o uso da maioria dos aditivos em todos os produtos derivados do tabaco, uma vez que essas substâncias são adicionadas intencionalmente nesses produtos com a finalidade de mascarar o gosto ruim da nicotina, disfarçar o cheiro desagradável, reduzir a porção visível da fumaça e diminuir a irritabilidade da fumaça para os não fumantes. Sendo assim, um dos objetivos da resolução é de reduzir a atratividade dos produtos derivados do tabaco, o que apresenta impacto direto na redução da iniciação de novos fumantes (ANVISA, 2016). Também dispõem nessa Resolução, os valores dos limites máximos permitidos de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono na corrente primária da fumaça dos cigarros que são comercializados no Brasil, sendo estes: 10 mg/cigarro, 1mg/cigarro e 10 mg/cigarro, respectivamente (ASSESSORIA DE IMPRENSA DA ANVISA, 2016).

Várias substâncias podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos da exposição à fumaça do tabaco, resultante da queima de seus diversos componentes, como por exemplo, o monóxido de carbono, tiocianato, óxidos de nitrogênio e nitrosaminas (DELFIM, 2004). Dentre essas substâncias, uma das mais empregadas como biomarcador é a nicotina e o seu metabólito, cotinina (SHIN et al., 2002).

2.2 NICOTINA E COTININA

Em 1828, Posselt e Reiman isolaram a nicotina das folhas do tabaco e no ano de 1843, Orfila iniciou os primeiros estudos farmacológicos com essa substância (ROSEMBERG, 2003; TAYLOR, 2006).

A nicotina é a substância mais ativa da fumaça do cigarro. É um alcaloide líquido (pK_a 8,0), volátil, incolor, oleaginoso com estrutura pirrolidínica, que escurece quando entra em contato com o ar e a luz, uma vez que ocorre oxidação. É muito solúvel em água e em solventes orgânicos, principalmente em álcool e éter, que são

capazes de extraí-lo de sua solução alcalina (GALVÃO; MOREAU, 2003; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

2.2.1 Propriedades toxicocinéticas da nicotina

Devido ao fato da nicotina ser muito solúvel em lipídios, ela pode ser absorvida de forma rápida pela pele, mucosa bucal, nasal e inalada pelos pulmões e isso proporciona importância toxicológica (KATAOKA, 2008). É um dos agentes tóxicos mais potentes e rapidamente fatais. No homem, pode ser letal doses entre 40 a 60 mg, e os efeitos tóxicos já são observados com doses de 1 a 4 mg em indivíduos mais sensíveis (GALVÃO; MOREUA, 1996; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

A absorção da nicotina pela mucosa bucal é pH-dependente, uma vez que trata-se de uma base fraca. Isso explica o porquê de os fumantes de cachimbo e charuto não precisarem tragar, uma vez que a fumaça do tabaco utilizado nesses produtos é menos ácida (pH 6,5 ou maior) e a nicotina se encontra significativamente na forma não protonada, sendo, portanto, rapidamente absorvida pela mucosa bucal. Por outro lado, como a fumaça do cigarro apresenta caráter mais ácido (pH 5,5 a 6,0), há pouca absorção bucal, porque a nicotina está na forma protonada. Porém quando a fumaça alcança as vias aéreas inferiores e os alvéolos, ela é absorvida de forma rápida, devido à ampla superfície de contato dessas regiões (ROSEMBERG, 2003; BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009), sendo que existe um aumento rápido nos níveis plasmáticos de nicotina, atingindo uma concentração máxima dentro de 10 minutos (BENOWITZ, HUKKANEN; JACOB, 2009).

Como a nicotina é pouco ligada às proteínas plasmáticas, a distribuição é rápida e ampla aos órgãos e tecidos do organismo (GALVÃO; MOREUA, 1996). É biotransformada a uma série de metabólitos pelas enzimas hepáticas (80 a 90%) e em menor grau nos pulmões e rins. A metabolização da nicotina varia entre os indivíduos, o mais comum é a oxidação de 70 a 80% da nicotina pelo CYP2A6 à cotinina que é posteriormente metabolizada, principalmente, em trans-3'-hidroxicotinina (FURTADO, 2002; FONSECA et al., 2012; ORTUÑO et al., 2015). Outros metabólitos encontrados em menor quantidade são a nornicotina e a nicotina íon isômero. Pode ocorrer também a glicuronidação da nicotina, esta via geralmente tem menor importância, porém às vezes é determinante para a depuração da

nicotina no caso de pessoas com baixa atividade de CYP2A6 devido às variações genéticas (BENOWITZ et al., 2006; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014). Portanto, os fumantes que apresentam baixo metabolismo pelo CYP2A6 possuem razão menor de cotinina e de trans-3'-hidroxicotinina quando comparado aos fumantes com metabolismo normal (BENOWITZ et al., 2006). Na Figura 1 estão representadas as principais vias de biotransformação da nicotina.

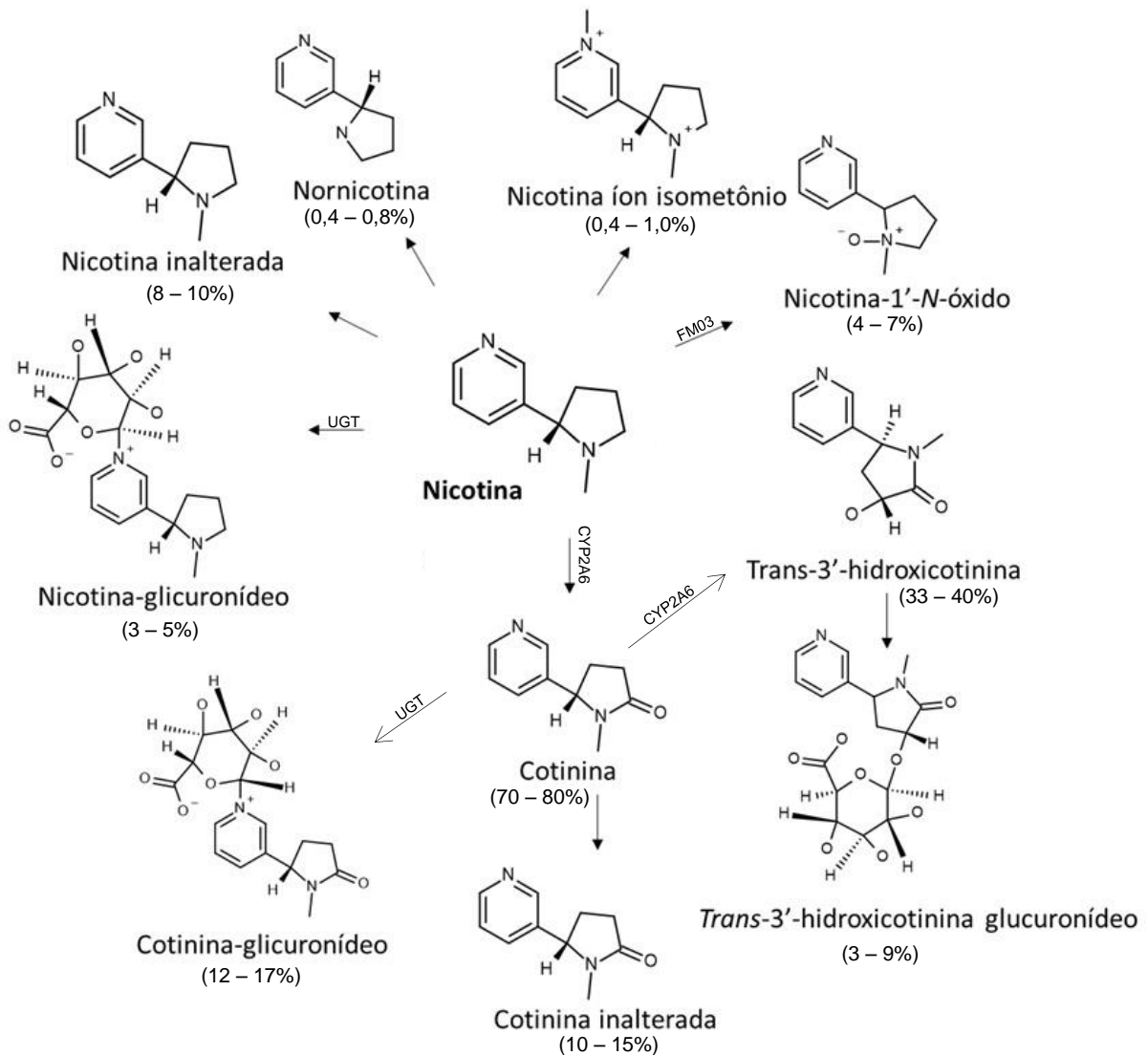


Figura 1. Principais vias de biotransformação da nicotina e proporções estimadas dos metabólitos excretados na urina.

Fonte: adaptada de BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014.

A excreção da nicotina pode ocorrer via renal por filtração glomerular e secreção tubular, com reabsorção variável dependendo do pH urinário, sendo assim, quando alcalino a excreção diminui. A meia vida desse alcaloide é em torno de 2 horas, já da cotinina é por volta de 16 horas (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014). Devido ao pK_a 4,5 da cotinina, maior quantidade se apresenta sob a forma não

ionizada no sangue (pH 7,4) e é fracamente solúvel em lipídios na forma de base livre, portanto há baixa taxa de distribuição para os tecidos. Esse fato explica parcialmente sua existência prolongada no sangue, outro fator que contribui para a meia vida prolongada é a baixa taxa de excreção renal quando comparada com a da nicotina (MALAFATTI; MARTINS, 2009). Conseqüentemente, a cotinina é bastante utilizada como um marcador quantitativo da exposição à nicotina, podendo ser detectada em vários fluidos biológicos, tais como plasma, soro, urina, saliva, cabelo e unhas (JACOB III et al., 2011; STRAGIEROWICZ et al., 2013; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

Nos fumantes, parte da nicotina, é excretada pela saliva e, quando deglutida, chega ao estômago em que o pH do meio é ácido, portanto não é absorvida. Porém, há absorção no intestino delgado onde o meio é alcalino. Esse mecanismo mantém os níveis de concentração da nicotina na circulação por certo tempo, após deixar de fumar (ROSEMBERG, 2003).

2.2.2 Propriedades toxicodinâmicas da nicotina

Quando uma pessoa fuma um cigarro, a nicotina chega até os pulmões onde é absorvida rapidamente, cai na corrente sanguínea, alcança o cérebro entre 10 a 20 segundos, e se liga a receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs) que são constituídos por diferentes combinações de cinco subunidades, presentes nos gânglios autonômicos, na junção neuromuscular e no sistema nervoso central (SNC) (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009; MILLER et al., 2010). Em humanos, as subunidades mais abundantes são: $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ e a $\alpha 7$ (homomérico). A subunidade $\beta 2$ é crítica para os efeitos comportamentais da nicotina e para a liberação da dopamina. Já a subunidade $\alpha 4$ é importante, uma vez que determina a sensibilidade à nicotina. O subtipo $\alpha 3\beta 4$ tem relação com os efeitos cardiovasculares provocados pela nicotina, enquanto que os receptores $\alpha 7$ (homomérico) interferem na rápida transmissão sináptica e podem desempenhar um papel na aprendizagem (FOWLER et al., 2011; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

A ligação da nicotina nos receptores nAChRs, os ativam e faz com que esses adquiram conformação de canal aberto, permitindo o influxo de cátions, tais como o sódio e o cálcio. A nicotina também estimula esses receptores pré-sinápticos, localizados nos terminais dos axônios dos neurônios do SNC, permitindo a liberação de vários neurotransmissores, por exemplo: dopamina, norepinefrina, acetilcolina,

glutamato, serotonina, endorfinas e ácido gama-aminobutírico (GABA). Esses neurotransmissores exercem efeitos ansiolíticos, eufóricos, de realce e melhora da memória, vigilância, cognição, do desempenho, execução de tarefas e ação antidepressiva e neuroestimulante. A dopamina é essencial para os efeitos reforçadores de nicotina e outras drogas de abuso (ROSEMBERG, 2003; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

Quando há uma exposição crônica à nicotina ocorre a neuroadaptação, isto é, há o desenvolvimento da tolerância farmacodinâmica que se evolui rapidamente para disforia, náuseas e vômitos. Essa evolução acontece em diferentes graus para várias respostas à nicotina, conforme as diferentes taxas de inativação dos subtipos de receptores nicotínicos colinérgicos (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

Segundo GALVÃO e MOREAU (1996), alguns estudos têm demonstrado que no caso da nicotina, parte desta tolerância se perde durante a noite, porém é rapidamente recuperada quando se recomeça a fumar nos dias seguintes, uma vez que os receptores se tornam ativos novamente. Com isso, há maior resposta subjetiva e cardiovascular no primeiro cigarro do dia quando comparado com os subsequentes. Ao longo do dia, à medida que os cigarros são fumados, as recompensas positivas vão progressivamente diminuindo, devido ao acúmulo de nicotina que resulta em um maior grau de tolerância, e os sintomas de abstinência se tornam mais fortes entre os subsequentes cigarros (GALVÃO; MOREAU, 1996; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014). Desta maneira, a motivação de fumar no final do dia, se dá principalmente pelo alívio dos sintomas de abstinência (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

Por consequência das características de dose-resposta e de tolerância, grande parte dos fumantes tende a absorver a mesma quantidade de nicotina diariamente para alcançar os efeitos desejados do cigarro (CDC, 2000). É comprovado que a nicotina é responsável pela dependência ao tabaco, quanto maior o consumo de tabaco maior é a nicotino-dependência. A dependência gerada pela nicotina é do mesmo tipo que a provocada por outros fármacos psicoativos. Isto significa que ela é o agente reforçador da dependência de fumar tabaco e desempenha os critérios de produzir efeitos euforizantes. Mesmo que a nicotina alcance o cérebro entre 10 a 20 segundos após a inalação da fumaça, o potencial de reforço gerado é menor que o da anfetamina ou da cocaína (GALVÃO; MOREAU, 1996).

Outros constituintes do cigarro também são contribuintes para a dependência. Como por exemplo, há inibição da atividade da MAO-A (monoamina oxidase-A) e da MAO-B (monoamina oxidase-B) pelos produtos formados da condensação do acetaldeído, presente na fumaça do tabaco, com as aminas biogênicas. Existem evidências de que a inibição da MAO (monoamina oxidase) contribui para o aumento dos efeitos reforçadores da nicotina, uma vez que há maior disponibilidade da dopamina (GALVÃO, GALVÃO e MOREAU, 2014).

O tabagista pode se tornar dependente em poucas semanas. Foi proposto um limiar mínimo de nicotina na saliva ou no sangue para a geração da dependência. Em um estudo foi verificado que a média de concentração da nicotina no sangue dos tabagistas dependentes é de 300 ng/mL. Um cigarro atinge concentração no sangue em torno de 14 ng/mL, chegando a 70 ng/mL em quem fuma cinco cigarros por dia. Conforme esse estudo seria coerente estimar os níveis de nicotina de 50 a 70 ng/mL como os mínimos para gerar a dependência. Esses níveis correspondem à inalação diária de 4 mg a 6 mg de nicotina (BENOWITZ; HENNIGFIELD, 1994).

Quando há uma ausência abrupta da nicotina ocorre um desequilíbrio da homeostasia que era mantida pela nicotina crônica, e, portanto, tem-se a síndrome de abstinência. Desta maneira, há uma liberação subnormal de dopamina e outros neurotransmissores. Em consequência disso, ocorre uma deficiência na resposta da dopamina a estímulos novos em geral e um estado de mal-estar e incapacidade de sentir prazer. Pode-se citar como sintomas de abstinência mais elevados: irritabilidade, impaciência, ansiedade, distúrbios do sono (sonolência, insônia), dificuldades de concentração, náuseas, cefaleia, fadiga, aumento do apetite com consequente elevação de peso (GALVÃO; MOREAU, 1996; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014). Manifestam-se também bradicardia, constipação e compulsão de fumar. Geralmente, os sintomas de abstinência atingem um pico na primeira semana de cessação e desaparecem durante as próximas 3 a 4 semanas (GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

2.3 PRINCIPAIS EFEITOS TÓXICOS DO TABAGISMO

Segundo a OMS, vários estudos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais comprovam que o consumo do tabaco é a causa importante em diversas enfermidades incapacitantes e até mesmo letais, como o câncer de pulmão, a

bronquite crônica, o enfisema pulmonar e, em particular, a isquemia cardíaca (ZHONG et al., 2000).

O hábito de fumar está relacionado com diversos tipos de câncer, tais como: câncer de boca, faringe, laringe, esôfago, pâncreas e bexiga. Também tem papel importante em 90,0% dos casos de câncer de pulmão. O ato de fumar, nos Estados Unidos, foi considerado o fator ambiental de maior importância na contribuição para mortes prematuras evitáveis (ALENCAR, 2005).

A nicotina não é carcinogênica, porém é metabolizada em certas nitrosaminas como a 4-(nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona ou NNK, que é específica do tabaco e é classificada pela OMS como pertencente ao grupo 1 de carcinógenos (STEPANOV, et al., 2007; ROETHIG et al., 2009). A NNK pode ter um papel importante no desenvolvimento do câncer de pulmão tanto de fumantes ativos quanto de passivos. A N'-nitrosornicotina, também específica do tabaco, é classificada pela IARC como carcinógeno humano, assim como a N-nitrosoanatabina, a N-nitrosoanabasina, dentre outras (CAI et al., 2003; HECHT et al., 2006).

2.3.1 Efeitos nocivos do tabaco na gravidez

Durante a gravidez há um aumento na concentração de estradiol que induz a atividade de CYP2A6, conseqüentemente aumenta-se o metabolismo da nicotina (BENOWITZ; HUKKANEN ; JACOB, 2009; STRAGIEROWICZ et al., 2013). Quando essa substância está presente na circulação materna, ela atravessa a membrana amniocoriônica e parte dela alcança o feto via placentária e é eliminada no fluido amniótico pela urina (KÖHLER et al., 2010). Somente 1% do metabólito cotinina consegue atravessar a placenta (GRAY et al., 2008).

O tabagismo durante a gravidez é o principal fator de risco prevenível associado com complicações tanto no parto quanto na gestação. Está relacionado com 5% das mortes infantis, 10% dos partos prematuros e 30% dos casos de baixo peso para a idade gestacional. Tanto o fumo ativo como o passivo, aumentam os riscos de descolamento da placenta, de ruptura prematura de membranas e de placenta prévia e de pré-eclâmpsia (LEOPÉRCIO; GIGLIOTTI, 2004; ALIYU et al., 2011). A exposição intra-uterina aos componentes do cigarro acarreta também em problemas no desenvolvimento neural e cognitivo do feto (STRAGIEROWICZ et al.,

2013), além de anomalias congênitas como fenda palatina e microcefalia (UTAGAWA et al, 2007).

O cigarro afeta o funcionamento normal da placenta. Pode-se citar como exemplo a nicotina que tem a capacidade de aumentar a pressão sanguínea materna o que prejudica o fluxo sanguíneo materno-fetal. Conseqüentemente, ocorre diminuição do fornecimento de nutrientes e oxigênio para o feto e, portanto, gera um quadro de hipóxia e desnutrição. A nicotina prejudica também, o desenvolvimento dos pulmões do feto, diminui o movimento de respiração fetal e aumenta a frequência cardíaca (LAW et al., 2003; ALIYU et al., 2011; GALVÃO, GALVÃO e MOREAU, 2014). Outro mecanismo de ação se dá pela presença do monóxido de carbono que tem grande afinidade pelas moléculas de hemoglobina. Quando há ligação ocorre a formação de carboxiemoglobina o que também diminui a oferta de oxigênio para o feto (ALIYU et al., 2011; LAW et al., 2003). Esses são os principais mecanismos de toxicidade do tabagismo na gestação e também são os primeiros passos para o retardo do crescimento fetal (LAW et al., 2003).

A exposição ao tabagismo também está associada a diferenças anatômicas no feto. Compararam fetos de gestantes fumantes com 23, 27 e 32 semanas, e descobriram que essa exposição está significativamente associada com o crescimento acelerado precoce da cabeça e dos diâmetros abdominais, bem como alteração no formato da cabeça, os braços são mais longos e as pernas mais curtas, e também apresenta uma redução da proporção do tamanho da tíbia com o fêmur (LAMPL; KUZAWA; JEANTY, 2005).

Uma pesquisa desenvolvida no Reino Unido revelou que os efeitos nocivos do fumo durante a gravidez podem ser vistos no rosto do feto por meio de ultrassom 4D. Ao observar as imagens, os pesquisadores descobriram que os fetos das gestantes fumantes tocavam a própria boca um número de vezes significativamente maior, em comparação com os das gestantes não fumantes, ou seja, a taxa de declínio desses movimentos foi significativamente mais lenta para fetos das gestantes fumantes. Segundo a pesquisa, isso acontece porque, quando a mulher fuma, o SNC do feto não se desenvolve como deveria, e atinge justamente a parte do cérebro que é responsável por controlar os movimentos da face e do corpo. Perceberam também que esse feto apresentou um atraso no desenvolvimento das habilidades para executar movimentos mais complexos e na capacidade de processamento da fala em crianças expostas ao fumo durante a gravidez.

Entretanto, ainda é necessária uma pesquisa mais ampla para confirmarem esses resultados (REISLAND et al., 2015).

Os efeitos causados pelo uso do cigarro durante a gravidez são mais comuns em mulheres grávidas que fumam bastante, já em mulheres que pararam de fumar até o terceiro mês de gestação essa incidência é reduzida (WILLS, 2002).

Mesmo havendo um amplo conhecimento de que fumar durante a gravidez pode prejudicar o feto, a prevalência desse hábito ainda é alta. No último levantamento feito nos Estados Unidos verificou-se que 14,0% das gestantes eram fumantes (GALVÃO, GALVÃO e MOREAU, 2014). Em 1996, foi realizado um estudo com gestantes no Hospital Universitário – USP em São Paulo e na entrevista, 25,0% afirmaram ter utilizado álcool socialmente e 28,0% fizeram uso de cigarro, sendo que 74,0% destas usaram até 10 cigarros por dia e 6,0% ingeriram álcool e fumaram cigarro simultaneamente (COSTA et al., 1998). Muitas gestantes fumantes não revelam o hábito de fumar durante a gravidez devido aos sentimentos de culpa, vergonha e até mesmo medo de serem repreendidas (CHAN et al., 2004).

2.4 AMOSTRA BIOLÓGICA ALTERNATIVA: SALIVA

A exposição à fumaça do tabaco pode ser avaliada através da presença de nicotina e cotinina nos fluidos biológicos incluindo plasma, soro, urina, saliva, cabelo, suor, leite materno, mecônio e líquido amniótico (JACOB III et al., 2011). Na Tabela 1 estão listadas algumas técnicas de extração e de detecção de nicotina e cotinina em amostras biológicas, bem como seus limites de detecção e de quantificação, segundo as literaturas científicas nacionais e internacionais.

As amostras biológicas não convencionais, também chamadas de alternativas, são utilizadas com sucesso para verificação da exposição à xenobióticos (MALAFATTI; MARTINS, 2009). O interesse da saliva como amostra biológica progrediu nos últimos anos e poderá ser uma matriz de primeira escolha (SANTOS, 2014).

A saliva é um fluido biológico, aquoso, hipotônico, transparente, com pH entre 6,0 – 8,0 e é composta por 99,0% de água, 0,3% de proteínas (principalmente amilase) e 0,3% de mucina (SANTOS et al., 2007; KINTZ; SPIEHLER; NEGRUSZ, 2008).

A saliva é secretada diretamente na cavidade bucal pelas glândulas salivares maiores e menores. Normalmente é secretado, diariamente, entre 0,5 a 1,0 L de

saliva (SANTOS et al., 2007; KINTZ; SPIEHLER; NEGRUSZ, 2008). A secreção salivar é controlada pelos nervos autônomos. A estimulação simpática, através da noradrenalina (norepinefrina), faz com que tenha baixos níveis de fluido e concentrações elevadas de proteína, enquanto que a estimulação parassimpática, através da acetilcolina, induz à secreção de grandes quantidades de fluido (KINTZ; SPIEHLER; NEGRUSZ, 2008).

O mecanismo de passagem das drogas do sangue para a saliva é por ultrafiltração ou difusão passiva, podendo ser detectada a forma não metabolizada nesta matriz. Essa incorporação é restringida para as moléculas que apresentam alto peso molecular, drogas ionizadas ou ligadas a proteínas plasmáticas (BORDIN, et al., 2015).

A saliva possui como principais vantagens a facilidade de obtenção, não é uma amostra invasiva, a coleta pode ser assistida e é de baixo custo (SANTOS, 2014). O risco de contração de infecção, durante a coleta, é mínimo e pode ser utilizada em situações que é difícil a obtenção de outro tipo de amostra, como por exemplo, em crianças ou pacientes com deficiência ou em pessoas ansiosas (SANTOS, 2014). As concentrações do analito na saliva são altamente correlacionadas com as concentrações plasmáticas (JACOB III et al., 2011). A janela de detecção é tão curta quanto o sangue, o que é considerado uma desvantagem quando comparada a matrizes como cabelo, suor e urina. Com relação ao período de detecção é considerado o instante em que a substância cai na circulação sanguínea até aproximadamente quatro meia vida após a administração (COSTA, 2008). No estudo realizado por Stragierowicz et al. (2013) o nível de cotinina na urina foi cerca de 4 a 5,5 vezes maior do que na saliva, porém esse valor depende do uso de correção de creatinina.

A coleta da saliva pode ser feita através do depósito direto da matriz em um tubo coletor ou utilizar um estimulante para aumentar a salivagem como o ácido cítrico, algodão ou parafilm® (BUENO, 2014). O dispositivo, cujo nome comercial é “*Salivette*”, apresenta um rolo de algodão que mede aproximadamente 1 cm de espessura e 3,5 cm de comprimento que é capaz de absorver o fluido oral que contém, predominantemente, saliva e também pequenas quantidades de fluido das fendas gengivais, de restos celulares e de sangue (KINTZ; SPIEHLER ; NEGRUSZ, 2008).

Após a coleta, o material é introduzido em um tubo fechado e a recuperação da amostra se dá pela centrifugação deste tubo. Posteriormente, obtém-se a amostra de fluido oral e pode utilizá-la para a análise (Figura 2) (SANTOS et al., 2007).

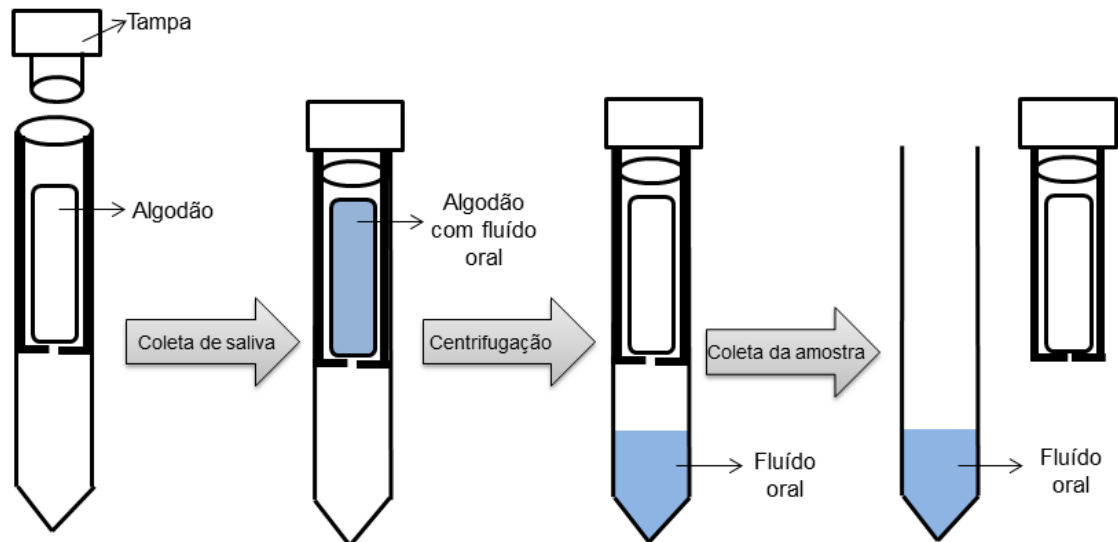


Figura 2. Esquematização do dispositivo utilizado na coleta de saliva (fluído oral).
Fonte: adaptada de Bueno, 2014.

Tabela 1. Estudos que determinaram nicotina e cotinina em amostras biológicas.

Autor	Analito	Método de análise	Método de extração	Amostra	LD NIC (ng/mL)	LD COT (ng/mL)	LIQ NIC (ng/mL)	LIQ COT (ng/mL)
LINDQVIST et al., 2002	COT	GC-NPD	ELL	Soro	-	-	-	6,0
MEGER et al.; 2002	NIC e COT	LC-MS/MS	ELL e SPE	Urina	0,1	0,1	10	10
SHIN et al., 2002	NIC e COT	GC-MS	ELL	Urina	0,2	0,2	1,0	1,0
				Plasma	1,0	1,0	1,0	1,0
				Saliva	1,0	1,0	1,0	1,0
TORAÑO, 2003	NIC e COT	GC-MS	ELL	Saliva	0,6	0,6	10,0	10,0
				Urina	0,6	0,6	10,0	10,0
DELFIM, 2004	NIC e COT	GC-NPD	ELL	Urina	5,0	5,0	10,0	10,0
KARDANI, 2010	NIC e COT	GC-FID	SDME	Urina	370,0	430,0	1230,0	1430,0
				Saliva	330,0	340,0	1100,0	1130,0
MALAFATTI, 2010	COT	GC-NPD	ELL	Urina	-	-	-	10,0
SANT'ANNA, 2010	NIC e COT	GC-NPD	ASE e SPE	Mecônio	30,0 ^b	3,0 ^b	40,0 ^b	5,0 ^b
BAHEIRAEI et al.; 2011	COT	Kits ELISA	-	Urina	-	1,0	-	1,0
				Sangue do cordão umbilical	-	1,0	-	1,0
BARROS, 2011	NIC e COT	GC-MS	ELL e SPE	Mecônio	10,0 ^b	60,0 ^b	60,0 ^b	100,0 ^b

Continuação da Tabela 1.

Autor	Analito	Método de análise	Método de extração	Amostra	LD NIC (ng/mL)	LD COT (ng/mL)	LIQ NIC (ng/mL)	LIQ COT (ng/mL)
CONCHEIRO, 2011	COT	LC-MS/MS	SPE	Suor	-	0,75 ^c	-	1,0 ^c
FONSECA, et al., 2012	NIC e COT	GC-MS/MS	ELL e SPE	Saliva	0,5	0,5	0,5	0,5
BORDIN, 2013	NIC e COT	GC-MS	DPX	Mecônio	15,0 ^b	5,0 ^b	20,0 ^b	10,0 ^b
IWAI, 2013	NIC e COT	GC-MS	MEPS	Urina	0,25	20,0	1,0	50,0
STRAGIEROWICZ et al., 2013	COT	LC-MS/MS	SPE	Urina	-	0,05	-	0,8
				Saliva	-	0,12	-	0,4
YUKI et al.; 2013	NIC e COT	LC-MS	ELL e SPE	Saliva	-	-	0,5	0,5
				Plasma	-	-	0,5	0,5
CHIADMI, 2014	COT	GC-MS	SPE	Urina	-	0,06	-	10,0
JACOB, 2015	NIC e COT	LC-UV	ELL	Saliva	1,7	1,3	7,5	7,5
				Leite materno	1,7	1,3	7,5	7,5
ORTUÑO, 2015	NIC e COT	LC-MS/MS	ELL	Saliva	0,158	0,013	0,48	0,040
				Urina	0,100	0,017	0,30	0,052
				Cabelo	0,008 ^a	0,0006 ^a	0,026 ^a	0,002 ^a
TSINISIZELI, 2015	NIC e COT	GC-MS/MS	ELL e SPE	Mecônio	1,25 ^b	1,25 ^b	5,03 ^b	1,25 ^b
JACOB, 2016	NIC e COT	LC-UV	ELL	Saliva	-	-	7,5	7,5
				Líquido amniótico	-	-	7,5	7,5
SHISLER et al., 2017	NIC e COT	LC-MS/MS	-	Mecônio	-	-	2,5 ^b	1,0 ^b

^a Valor expresso em ng/mg; ^b Valor expresso em ng/g; ^c Valor expresso em ng/patch; NIC: nicotina; COT: cotinina; GC-MS: cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas; GC-FID: cromatografia gasosa acoplado ao detector de ionização de chamas; LC-MS: cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas; GC-NPD: cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo; LC-UV: cromatografia líquida com detector de ultravioleta; Kits ELISA: imunoensaio competitivo em fase sólida; ELL: extração líquido-líquido, SDME: microextração em gota única; SPE: extração em fase sólida; DPX: extração em fase sólida modificada com ponteiros descartáveis; MEPS: microextração em solvente empacotado; ASE: extração acelerada por solvente.

2.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem o isolamento dos componentes de interesse da matriz, com o objetivo de se obter no final do processo um extrato da amostra com os analitos em maior concentração e com menor número de interferentes inerentes da matriz (PINTO; QUEIROZ, 2015).

A instrumentação analítica moderna proporciona o rápido desenvolvimento dos métodos analíticos. O preparo de amostra é a primeira e a mais trabalhosa etapa em uma análise (PINTO; QUEIROZ, 2015).

2.2.1 Extração líquido-líquido

Na extração líquido-líquido há a partição da amostra entre a fase orgânica e a aquosa (fases imiscíveis) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). O coeficiente de partição entre as duas fases sofre influência pela escolha do solvente extrator, pH da fase aquosa e pela proporção do volume das fases, aquosa e orgânica. Os solventes mais compatíveis com a ELL são os de baixo ponto de ebulição, uma vez que são removidos com maior eficiência no final do processo de extração e de baixa viscosidade para permitir melhor interação com a matriz da amostra (QUEIROZ, 2008). O rendimento da extração pode ser influenciado pela afinidade do soluto pelo solvente utilizado, da razão das fases e do número de extrações, portanto, quanto maior a afinidade do analito pelo solvente orgânico maior a recuperação (QUEIROZ; COLLIN; JARDIM, 2001).

A ELL é simples de ser feita e há diversos solventes, puros e disponíveis comercialmente, que fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. As proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, com isso há eliminação dos interferentes da matriz e, conseqüentemente, diminui a contaminação da coluna cromatográfica. Por outro lado essa técnica de extração possui desvantagens, como por exemplo: os analitos que apresentam alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico o que pode resultar em baixas recuperações; há uma concentração das impurezas presentes nos solventes juntamente com o extrato, acarretando no uso de solventes ultrapuros e formação de emulsão, o que resulta em maior tempo de preparo da amostra uma vez que deve desfazê-la (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; QUEIROZ, 2008).

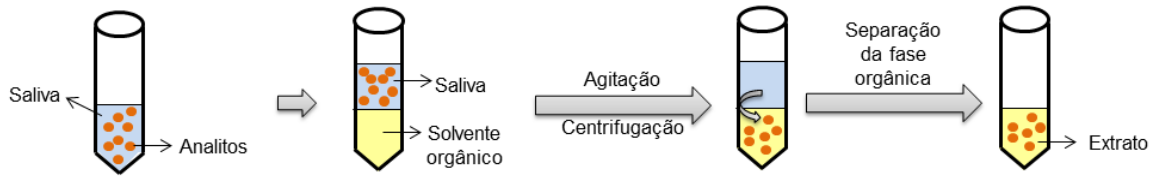


Figura 3. Esquematização da extração líquido-líquido.

3 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido e validado, empregando a extração líquido-líquido e a GC-TSD, atendeu aos critérios exigidos pela resolução 27/2012 e à 899/2003 da ANVISA, sendo possível detectar e quantificar os biomarcadores do cigarro, nicotina e cotinina, em amostras de saliva de gestantes.

Ao comparar o autorrelato das gestantes, na primeira avaliação, com as concentrações de nicotina e cotinina nas amostras de saliva, foi possível observar uma diferença significativa nessas concentrações para ambos os analitos ($p < 0,001$) entre os dois grupos, o de gestantes fumantes e o de não fumantes. As concentrações de cotinina em amostras de saliva correlacionaram positivamente com o número de cigarros consumidos diariamente pelas gestantes fumantes, na primeira avaliação ($\rho = 0,486$ e $p < 0,001$).

No teste de Wilcoxon não foram obtidas diferenças estaticamente significativas para as variáveis: número de cigarros diários ($p = 0,255$), concentração de nicotina ($p = 0,949$) e cotinina ($p = 0,665$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, B. Neoplasia. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Eds.). **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. cap. 7, p. 281 – 356, 2005.

ALIYU, M. H.; LYNCH, O.; WILSON, R. E.; ALIO, A. P.; KRISTENSEN, S.; MARTY, P. J.; WHITEMAN, V. E.; SALIHU, H. M. Association between tobacco use in pregnancy and placenta-associated syndromes: a population-based study. **Archeves of Gynecology and obstetrics**, Germany. v. 283, n. 4, p. 729 – 734, 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). **Aditivos**. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/aditivos-em-produtos-derivados-do-tabaco>>. Acesso em: 27 set. de 2016.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 27 de 17 de Maio de 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html> Acesso em 31 mar. 2016.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 899 de 29 de Maio de 2003. Disponível em: < http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf > Acesso em 31 mar. 2016.

Assessoria de Imprensa da ANVISA. **Limite de substância no cigarro**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/limite-de-substancia-no-cigarro/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR>. Acesso em: 27 set. De 2016.

BABHADIASHAR, N.; SOTOUDEH, M.; AZIZI, E.; BASHIRI, J.; DIDEVAR, R.; MALEKZADEH, R.; GHAHREMANI, M. H. Correlation between cigarette smoking and urine cotinine level in gastric cancer patients. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. v. 13, n. 1, p. 313 – 318, 2014.

BAHEIRAEI, A.; BANIHOSSEINI, S. Z.; HESHMAT, R.; MOTA, A.; MOHSENFAR, A. Association of self-reported passive smoking in pregnant women with cotinine level of maternal urine and umbilical cord blood at delivery. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**. v. 26, n. 1, p. 70 – 76, 2011.

BARROS, L. S. R. **Desenvolvimento e validação de método para análise de nicotina e cotinina em amostras de mecônio utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 73 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Toxicologia. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011.

BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB, P. Nicotine, chemistry, 21 publicações, kinetics and biomarkers. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 192, p. 29 – 60, 2009.

BENOWITZ, N. L.; SWAN, G. E.; JACOB III., P.; LESSOV-SCHLAGGAR, C. N.; TYNDALE, R. F. CYP2A6 genotype and the metabolism and disposition kinetics of nicotine. **Clinical pharmacology and therapeutics**. United States. v. 80, n. 5, p. 457 – 467, 2006.

BENOWITZ, N. L.; HENNIGFIELD, J. E. Establishing a nicotine threshold for addiction: The implications for tobacco regulation. **Journal of Medicine**. New England. v. 331, n. 2, p. 123 – 125, 1994.

BORDIN, D. C. M.; MONEDEIRO, F. F. S. S.; CAMPOS, E. G.; ALVES, M. N. R.; BUENO, L. H. P.; MARTINIS, B. S. D. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**. v. 7, n. 2, p. 125 – 143, 2015.

BORDIN, D. M.; ALVES, M. N. R.; CABRICES, O. G.; CAMPOS, E. G.; MARTINIS, B. S. D. A rapid assay for the simultaneous determination of nicotine, cocaine and metabolites in meconium using disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Analytical Toxicology**. v. 38, n. 1, p.1 – 8, 2013.

BOWKER, K.; LEWIS, S.; COLEMAN, T.; COOPER, S. Changes in the rate of nicotine metabolism across pregnancy: a longitudinal study. **Addiction**. v. 110, n. 11, p. 1827 – 1832, 2015.

BUENO, L. H. P. **Saliva como matriz alternativa na determinação de etanol com aplicação forense**. 62 f. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.

CAI, J.; LIU, B.; LIN, P.; SU, Q. Fast analysis of nicotine related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by megabore capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1017, n. 1 – 2, p. 187 – 193, 2003.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. US Department Of Health And Human Services – Reducing tobacco use. A report of the Surgeon General. Washington, 2000. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr4916a1.htm>>. Acesso em: 03 de Outubro de 2016.

CHAN, D.; CAPRARA, D.; BLANCHETTE, P.; KLEIN, J.; KOREN, G. Recent developments in meconium and hair testing methods for the confirmation of gestational exposures to alcohol and tobacco smoke. **Clinical Biochemistry**, Toronto. v. 37, n. 6, p. 429 – 438, 2004.

CHIADMI, F.; SCHLATTER, J. Simultaneous determination of cotinine and *trans*-3-hydroxycotinine in urine by automated solid-phase extraction using gas chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**. v. 28, n.4, p. 453 – 458, 2014.

CONCHEIRO, M.; SHAKLEYA, D. M.; HUESTIS, M. A. Simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates and nicotine metabolites in sweat by

liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bionalytical Chemistry**. v. 400, n. 1, p. 69 – 78, 2011.

COSTA, J. L. Características das amostras convencionais e não convencionais. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro. Guanabara: Koogan. Cap. 4, p. 41 – 45, 2008.

COSTA, M. T. Z.; QUINTAL, V. S.; HARO, F. M. B.; ÍCCHI, M.; SALGADO, M. V. S.; OKAY, Y.; VAZ, F. A. C.; RAMOS, J. L. A. Drogas de abuso na gestação: as orientações no pré-natal são suficientes?. **Pediatria**, São Paulo. v. 20, n. 4, p. 317 – 322, 1998.

DELFINO, C. I. G; **Avaliação dos tores de nicotina e cotinina, por cromatografia em fase gasosa, em urina de crianças fumantes passivas**. 114 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

ETTER, J. F.; DUC, T. V.; PERNEGER, T. V. Saliva cotinine levels in smokers and nonsmokers. **American Journal of Epidemiology**. v. 151, n. 3, p. 251 – 258, 2000.

FONSECA, B. M; et al. Determination of biomarkers of tobacco smoke exposure in oral fluid using solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v. 889-890, p. 116 – 122, 2012.

FOWLER, C. D.; LU, Q.; JOHNSON, P. M.; MARKS, M. J.; KENNY, P. J. Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signaling controls nicotine intake. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 597 – 601, 2011.

FRANQUI, L. S.; SANTOS, M. G.; VIRTUOSO, L. S.; MAIA, P. P.; FIGUEIREDO, E. C. Synthesis and characterization of a magnetic molecularly imprinted polymer for the selective extraction of nicotine and cotinine from urine samples followed by GC-MS analysis. **Analytical Methods**. v. 7, n. 21, p. 9237 – 9244, 2015.

FURTADO, R. D. Smoking and Anesthetic Implications. **Em. Bras. Anesthesiol**. V. 52, n. 3, p. 354-367, 2002.

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

GALVÃO, J. F.; MOREAU, R. L. M. Tabaco. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, cap. 4.7, p. 307 – 316, 1996.

GALVÃO, J. F.; MOREAU, R. L. M. Tabaco. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, cap. 4.7, p. 297 – 305, 2003.

GALVÃO, T. F.; GALVÃO, J. F.; MOREAU, R. L. M. Tabaco. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. Ed. São Paulo: Atheneu Editora. Cap. 4.8, p. 423 – 434, 2014.

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

GRAY, T. R.; MAGRI, R.; SHAKLEYA, D. M.; HUESTIS, M. A. Meconium nicotine and metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: differentiation of passive and nonexposure and correlation with neonatal outcome measures. **Clinical Chemistry**, United States. v. 54, n. 12, p. 2018 – 2027, 2008.

HECHT, S. S.; CARMELA, S. G.; LE, K. A.; MURPHY, S. E.; BOETTCHER, A. J.; LE, C.; KOOPMEINERS, J.; AN, L.; HENNRİKUS, D. J. 4-(metylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol and its glucuronides in the urine of infants exposed to environmental tobacco smoke. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**. v. 15, n. 5, p. 988 – 992, 2006.

HEGAARD, H. K.; KJAERGAARD, H.; MOLLER, L. F.; WACHMANN, H.; OTTESEN, B. Determination of a saliva cotinine cut-off to distinguish pregnant smokers from pregnant non-smokers. **Acta Obstetrica et Gynecologica**. v. 86, n. 4, p. 401 – 406, 2007.

HUSAIN, A. N.; KUMAR, V. O pulmão. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N (Eds.). **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 15, p. 747 – 812, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Número de fumantes no Brasil cai 30,7% nos últimos nove anos**. 2015. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/numero_fumantes_cai_30_virgula_sete_por_cento_em_nove_anos> Acesso em: Out. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco**. Prevalência de tabagismo. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/observatorio_controle_tabaco/site/home/dados_numeros/prevalencia-de-tabagismo>, 2016. Acesso em: Set. 2016.

IWAI, M.; OGAWA, T.; HATTORI, H.; ZAITSU, K.; ISHII, A.; SUZUKI, O.; SENO, H. Simple and rapid assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using micro-extraction by packed sorbent and gas chromatography-mass spectrometry. **Nagoya J. Med. Sci.** v. 75, n. 3 – 4, p. 255 – 261, 2013.

JACOB III, P.; YU, L.; DUAN, M.; RAMOS, L.; YTURRALDE, O.; BENEWITZ, N. L. Determination of the nicotine metabolites cotinine and *trans*-3'-hydroxycotinine in biologic fluids of smokers and non-smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Biomarkers for tobacco smoke exposure and for phenotyping cytochrome P450 2A6 activity. **Journal of Chromatography B**. v. 879, n. 3 – 4, p. 267 – 276, 2011.

JACOB, N.; GOLMARD, J. L.; BERLIN, I. Fetal exposure to tobacco: nicotine and cotinine concentration in amniotic fluid and maternal saliva. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**. v. 30, n. 2, p. 1 – 7, 2016.

JACOB, N.; GOLMARD, J.L.; BERLIN, I. Relationship between nicotine and cotinine concentrations in maternal milk and saliva. **Acta Paediatrica**. v. 104, n.8, p. 360 – 366, 2015.

KANE, A. B.; KUMAR, V. Patologia nutricional e ambiental. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N (Eds.). **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 09, p. 433 – 489, 2005.

KARDANI, F.; DANESHFAR, A.; SAHRAI, R. Determination of nicotine, anabasine, and cotinine in urine and saliva samples using single-drop microextraction. **Journal of Chromatography B**. v. 878, n. 28, p. 2857 – 2862, 2010.

KATAOKA, H.; INOUE, R.; YAGI, K.; SAITO, K. Determination of nicotine, cotinine and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis**. v. 49, n. 1, p. 108 – 114, 2008.

KINTZ, P.; SPIEHLER, V.; NEGRUSZ, A. Alternative Specimens. In: JICKELLS, S; NEGRUSZ, A. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. Pharmaceutical Press. Cap. 6, p. 165 – 181, 2008.

KÖHLER, E.; AVENARIUS, S.; RABSILBER, A.; GERLOFF, C.; JORCH, G. Nicotine and its metabolites in amniotic fluid at birth – assessment of prenatal tobacco smoke exposure. **Human & Experimental Toxicology**, England, v. 29, n. 5, p. 385 – 391, 2010.

KROEFF, L. R.; MENGUE, S. S.; SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; FAVARETTO, A. L. F.; NUCCI, L. B. Fatores associados ao fumo em gestantes avaliadas em cidades brasileiras. **Rev. Saúde Pública**. v. 38, n. 2, p. 261 – 267, 2004.

LAMPL, M.; KUZAWA, C.; JEANTY, P. Growth patterns of the heart and kidney suggest inter-organ collaboration in Facultative Fetal Growth. **American Journal of Human Biology**. v. 17, n. 2, p. 178 – 194, 2005.

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

LEOPÉRCIO, W; GIGLIOTTI, A. Tabagismo e suas peculiaridades durante a gestação: uma revisão crítica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 30, n. 2, p. 176-185, 2004.

LEVY, D.; JIANG, M.; SZKLO, A.; ALMEIRA, L. M.; AUTRAN, M.; BLOCH, M. Smoking and adverse Maternal and Child Health Outcomes in Brazil. **Nicotine e Tobacco Research**. v. 15, n. 11, p. 17- 1804, 2013.

LINDQVIST, R.; LENDAHL, L.; TOLLBOM, Ö.; ÄBERG, H.; HÄKANSSON, A. Smoking during pregnancy: comparison of self-reports and cotinine levels in 496 women. **Acta Obstet Gynecol Scand**. v. 81, n. 3, p. 240 – 244, 2002.

MALAFATTI, L.; MAIA, P. P.; MARTINS, M. C. G.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; MARTINS, I. Single gas chromatography method with nitrogen phosphorus detector for urinary cotinine determination in passive and active smokers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 4, p. 769 – 776, 2010.

MALAFATTI, L.; MARTINS, I. Aspectos analíticos da determinação de cotinina em matrizes biológicas. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 22, n. 1-2, p. 9 – 20, 2009.

MARQUES, A. C. P. R.; RIBEIRO, M. Nicotina: abuso e dependência. In: Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento / Coordenação de Ronaldo Laranjeira et al. 2. São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo/Associação Médica Brasileira. Cap. 3, p. 49 – 62, 2002.

MEGER, M.; KOSSIEN, I. M.; METZ, A. S.; JANKET, D.; SCHERER, G. Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v. 778, n. 1 – 2, p. 251 – 261, 2002.

MILLER, E. I.; NORRIS, H. R. K.; ROLLINS, D. E.; TIFFANY, S. T.; WILKINS, D. G. A novel validate procedure for the determination of nicotine, eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-extraction couple with chromatography – electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. Netherlands. v. 878, n. 9 – 10, p. 725 – 737, 2010.

MOORE, C.; LEWIS, D.; LEIKING, J. False-positive and false-negative rates in meconium drug testing. **Clin Chem**. v. 41, n. 11, p. 1614 – 1616, 1995.

ORTUÑO, R. P.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, J. M.; FERNÁNDEZ, E.; PASCUAL, J. A. High-throughput wide dynamic range procedure for the simultaneous quantification of nicotine and cotinine in multiple biological matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Springer**. v. 407, n. 28, p. 8463 – 8473, 2015.

Pesquisa Nacional por amostra de Domicílios. **Tabagismo**. 2008. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <
<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/26publicações/tabagismo.pdf> >. Acesso em: Jan. 2016.

PIETROBON, R. C.; BARBISAN, J. N.; MANFROI, W. C. Utilização do teste de dependência à nicotina de Fagerström como um instrumento de medida do grau de dependência. **Rev. HCPA**. v. 27, n. 3, p. 31 – 36, 2007.

PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. C. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos aplicações. **Scientia Chromatographica – Instituto Internacional de Cromatografia**. v. 7, p. 101-108, n. 2, 2015.

QUEIROZ, R.H. C. Extração Líquido-Líquido. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M.

E. P. B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro. Guanabara: Koogan. Cap.14, p. 146 – 154, 2008.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**. v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

REBAGLIATO, M.; BOLUMAR, F.; FLOREY, C. D. V.; JARVIS, M. J.; PEREZ-HOYOS, S.; HERNANDEZ-AGUADO, I; AVINO, J. Variations in cotinine levels in smokers during and after pregnancy. **The American Journal of Obstetrics and Gynecology**. V. 178, n. 3, p. 568 – 571, 1998.

REISSLAND, N.; FRANCIS, B.; KUMARENDRAN, K.; MASON, J. Ultrasound observations of subtle movements: a pilot study comparing fetuses of smoking and nonsmoking mothers. **Acta Paediatrica**. v. 104, n. 6, p. 596 – 603, 2015.

ROETHIG, H. J.; MUNJAL, S.; FENG, S.; LIANG, Q.; SARKAR, M.; WALK, R. A.; MENDES, P. E. Population estimates for biomarkers of exposure to cigarette smoke in adult U.S. cigarette smokers. **Nicotine and tobacco research**, England. v. 11, n. 10, p. 1216 – 1225, 2009.

ROSEMBERG, J. Nicotina: **Droga Universal**. Centro de Vigilância Epidemiológica. São Paulo. 2003.

RYDELL, M.; GRANATH, F.; CNATTINGIUS, S.; SVENSSON, A. C.; MAGNUSSON, C.; GALANTI, M. R. Maternal smoking during pregnancy and offspring's tobacco dependence. A study of exposure-discordant sibling pairs. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 167, p. 23 – 28, 2016.

SANT'ANNA, S. G. **Avaliação da exposição fetal à nicotina através da análise toxicológica em mecônio**. 80 f. Dissertação – Mestrado. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

SANTOS, G. S. C. **Saliva: identificação de variáveis fundamentais para a recolha de amostras de um biobanco**. Dissertação – Mestrado. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Católica Portuguesa. Viseu, 2014.

SANTOS, P. P. A; IGLESIAS, D. P. P.; SOUZA, E. L.; FREITAS, R. A.; GALVÃO, H. C. Saliva: **Métodos atuais para coleta e obtenção da amostra**. Porto Alegre, v. 48, n. 1 – 3, p. 95 – 98, 2007.

SHIN, H. S; KIM, J. G.; SHIN, Y. J.; JEE, S. H. Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v. 769, n. 1, p. 177 – 183, 2002.

SHISLER, S.; EIDEN, R. D.; MOLNAR, D. S.; SCHUETZE, P.; HUESTIS, M.; HOMISH, G. Smoking in pregnancy and fetal growth: the case for more intensive assessment. **Oxford Academic**. v. 19, n. 5, p. 525 – 531, 2017.

STEPANOV, I.; HECHT, S. S.; LINDGREN, B.; JACOB III, P.; WILSON, M.; BENOWITZ, N. L. Relationship of human toenail nicotine, cotinine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1butanol to levels of these biomarkers in plasma and urine. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, United States. v. 16, n. 7, p. 1382-1386, 2007.

STRAGIEROWICZ, J.; MIKOLAJEWSKA, K.; STOLARZ, M.Z.; POLANSKA, K.; LIGOCKA, D. Estimation of Cutoff Values of Cotinine in Urine and Saliva for Pregnant Women in Poland. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 1 – 11, 2013.

TAYLOR, P. Fármacos que atuam na junção neuromuscular e nos gânglios autônomos. In: BRUTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Eds.). **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro. 11 ed., cap. 09, p. 197 – 214, 2006.

TORAÑO, J. S.; VAN KAN, H. J. M. Simultaneous determination of the tobacco smoke uptake parameters nicotine, cotinine and thiocyanate in urine, saliva and hair, using gas chromatography-mass spectrometry for characterization of smoking status of recently exposed subjects. **Analyst**. v. 128, n. 7, p. 838 – 843, 2003.

TSINISIZELI, N.; SOTIROUDIS, G.; XENAKIS, A.; LYKERIDOU, K. E. Determination of nicotine and cotinine in meconium from Greek neonates and correlation with birth weight and gestational age at birth. **Chemosphere**. v. 119, p. 1200-1207, 2015.

UTAGAWA, C. Y.; SOUZA, R. A.; SILVA, C. O. M.; SILVA, M. O. Tabagismo e gravidez: repercussões no desenvolvimento fetal. **Cadernos UniFOA**, n. 4, p. 97-103, 2007.

WILLS, S. Tobacco. In: _____. **Drugs of abuse**. 3^a ed. Cambridge: The Pharmaceutical Press. Cap. 14, p. 157 – 163, 2002.

WILLS, S. Drugs in pregnancy and breast-feeding. In: _____. **Drugs of abuse**. 3 ed. Cambridge: The Pharmaceutical Press. Cap. 20, p. 217 – 233, 2002.

World Health Organization (WHO). **Tabaco**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/tobacco/en/>> Acesso em: Out. 2015.

YAMAGUCHI, E.T.; CARDOSO, M.M.S.C.; TORRES, M.L.A.; ANDRADE, A.G. Drogas de abuso e gravidez. **Revista de psiquiatria clínica**. v.35, n. 1, p. 44 – 47, 2008.

YUKI, D.; KIKUCHI, A.; MIURA, N.; KAKEHI, A.; ONOZAWA, M. Good relationship between saliva cotinine kinetics and plasma cotinine kinetics after smoking one cigarette. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 67, n. 2, p. 240-245, 2013.

ZHONG, L; GOLDBERG, M. S; PARENT, M. E; HANLEY, J. A. Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis. **Lung cancer**. Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 3 – 18, 2000.