UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Avaliação dos teores de nicotina e cotinina, por
cromatografia em fase gasosa, em urina de crianças
fumantes passivas**

Cláudia Isabel Guastini Delfim

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo
2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Delfim, Cláudia Isabel Guastini
D349a Avaliação dos teores de nicotina e cotinina, por cromatografia
em fase gasosa, em urina de crianças fumantes passivas / Cláudia
Isabel Guastini Delfim. -- São Paulo, 2004.
95p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza

1. Toxicologia social 2. Cromatografia em fase gasosa :
Análise toxicológica 3. Nicotina : Farmacologia I. T. II.
Nascimento, Elizabeth de Souza, orientador.

615.9 CDD

Cláudia Isabel Guastini Delfim

**AVALIAÇÃO DOS TEORES DE NICOTINA E COTININA, POR
CROMATOGRRAFIA EM FASE GASOSA, EM URINA DE
CRIANÇAS FUMANTES PASSIVAS**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 14 de abril de 2004.

Dedico este trabalho,

À Deus, a minha eterna gratidão pelo dom da vida, por todas as graças concedidas, por tudo o que me fez progredir, e pelo mérito de estar concluindo esta etapa, certa de que estou colaborando com Vosso plano entre os homens.

Às minhas filhas **Inara** e **Luana**:

Grandes foram as lutas, maiores as vitórias.
O tempo passou, e com ele o sofrimento das horas
tristes, das despedidas e da ausência. Sinto-me
orgulhosa de seus exemplos e esforços que talvez
não saiba explicar em palavras o especial
reconhecimento e minha eterna gratidão.

Ao meu marido **Luis**:

Toda caminhada torna-se breve com teu inestimável apoio. As alegrias de hoje também são tuas, pois o amor, estímulo, carinho e compreensão a mim concedidos foram armas desta vitória. Divido com você os méritos desta conquista, ela é tão sua quanto minha.

À meu pai **Vicente** (*in memoriam*), tú que vieste repartindo humildade, amor e sabedoria. Agora, mais do que nunca, a tua presença se faz sentir, pois *"não morre quem nos outros vive, não morre quem nos vivos vive"*.

À minha mãe **Maria**, procuro entre as palavras, aquela que você gostaria de ouvir e só encontro: OBRIGADA.

Aos meus cunhados **Carlos e Roseli**, pela solidariedade e pelo apoio nos momentos de ausência.

Aos meus **irmãos** e todos os meus familiares que acompanharam mais esta etapa de minha vida, muito obrigada.

À Prof^a. Dr.^a **Elizabeth Souza Nascimento**,
que como uma mãe, me acolheu nos momentos
difíceis e me deu forças para lutar pelos meus
ideais; pela constante orientação e
companheirismo, que tornou possível a realização
deste trabalho e por tudo que pude aprender
nesses anos de convívio, meus sinceros
agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Aos **Coordenadores do Curso de Pós-Graduação** em Farmácia, área de Toxicologia e Análises Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, pela oportunidade;

Aos **professores** do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pelos ensinamentos;

À Pró Reitora Acadêmica **Ana Cardoso Maia de Oliveira Lima** pelo auxílio financeiro para que se possibilitasse a realização deste trabalho;

Aos professores **Ovandir Alves Silva** e **Cláudio Schvartsman** pelas valiosas sugestões e correções feitas no exame de qualificação;

Aos **funcionários da secretaria de Pós-Graduação**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela dedicação e ajuda;

Aos funcionários **Luzia, Dalva, Roseli e Helena** pela efetiva ajuda na rotina de trabalho;

Ao **Dr. João Paulo B. Lotufo**, pela colaboração na obtenção das amostras;

Aos **pacientes**, por aceitarem participar deste trabalho;

À amiga **Patrícia Faria**, por nunca ter dispensado esforços em me ajudar, provando ser uma verdadeira amiga;

Às amigas **Sueli S. Zago, Michela e Nádia**, de quem tive a felicidade de me tornar amiga, por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos de minha vida;

Ao amigo e colega de trabalho **Fernando César Cardoso Maia**, por despertar meu interesse pela Toxicologia, pelo constante incentivo, por toda ajuda e principalmente pela amizade;

À amiga e colega de trabalho **Angélica Augusta Grigoli**, pelo constante apoio, incentivo e auxílio durante a realização deste trabalho e principalmente pela amizade;

Aos amigos deste Curso de Pós-Graduação, em especial à **Paula, Isarita, Eliane, Maurício, Cláudia, Vanessa, Simone, Fábio, e Daniela**, pois com certeza nossa convivência amenizou as dificuldades que passamos durante esta fase de nossas vidas.

À minha amiga **Patrícia Estrella Winkworth**, pela revisão do *summary*;

À bibliotecária **Leila Bonadio**, pela correção das referências bibliográficas;

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa,

os meus agradecimentos.

Queria eu, hoje, poder abrir os
meus braços e receber de volta
todos os dias que estive distante
de minhas filhas...

Queria eu, hoje, poder abrir os
meus braços e suprir todas as
carências e necessidades de meu
marido, criadas pela minha
ausência...

Queria eu, hoje, poder abrir os
meus braços e abraçar todos os
meus amigos para que
permanecessem comigo até o fim
de meus dias...

Queria eu, hoje, abrir os meus
braços para meu pai, e sentir seu
abraço só mais uma vez, certa de
que estaria muito orgulhoso de
mim...

Mas hoje, abro os meus braços
para Deus, que me fez progredir e
aprender, embora para isto, eu
tenha conhecido, amado e
perdido muitos abraços.

Cláudia Isabel Guastini Delfim, dezembro de 2003.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1. Características do tabaco.....	7
2.2. Composição química da fumaça do tabaco.....	9
2.3. Propriedades toxicocinéticas da nicotina.....	12
2.3.1. Absorção.....	13
2.3.2. Distribuição.....	13
2.3.3. Biotransformação.....	14
2.3.4. Excreção.....	16
2.4. Toxicodinâmica da nicotina.....	16
2.5. Principais efeitos tóxicos do tabagismo.....	18
2.6. Exposição involuntária à fumaça do tabaco.....	19
2.7. Marcadores de exposição ambiental à fumaça do tabaco.....	23
2.8. Métodos para detecção de nicotina e cotinina em amostras biológicas.....	24
3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO.....	32
3.1. Objetivos.....	33
3.2. Plano de trabalho.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1. Casuística.....	35
4.2. Material.....	36
4.2.1. Padrões.....	36
4.2.2. Solventes e reagentes.....	36
4.2.3. Soluções de trabalho.....	36
4.2.4. Calibradores.....	37
4.2.5. Controles.....	37
4.2.6. Equipamentos, acessórios e vidraria.....	38
4.2.7. Amostras.....	38

4.3. Método.....	39
4.3.1. Padronização do procedimento de extração de métodos analíticos.....	39
4.3.2. Otimização dos parâmetros cromatográficos.....	42
4.3.3. Validação do método analítico para determinação de nicotina e cotinina em urina.....	43
4.3.3.1. Limite de detecção.....	43
4.3.3.2. Limite de quantificação.....	43
4.3.3.3. Recuperação.....	44
4.3.3.4. Estudo da Linearidade.....	44
4.3.3.5. Curva de calibração.....	45
4.3.3.6. Precisão do método analítico.....	45
4.3.3.7. Exatidão.....	46
4.3.3.8. Estabilidade do analito na amostra.....	46
4.3.4. Análise de nicotina e cotinina em urina.....	47
4.3.5. Determinação da gravidade específica.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1. Características das crianças participantes do estudo.....	49
5.2. Otimização das condições cromatográficas.....	51
5.3. Perfil cromatográfico da separação de nicotina e cotinina.....	52
5.4. Resultados dos parâmetros da validação do método analítico para determinação de nicotina e cotinina em urina.....	54
5.4.1. Limite de detecção.....	54
5.4.2. Limite de quantificação.....	54
5.4.3. Recuperação.....	55
5.4.4. Linearidade.....	56
5.4.5. Precisão.....	57
5.4.6. Exatidão.....	58
5.4.7. Estabilidade.....	59
5.5. Determinação das concentrações plasmáticas de nicotina e cotinina em pacientes com ou sem problemas respiratórios.....	61

6.	DISCUSSÃO.....	63
7.	CONCLUSÕES.....	71
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9.	ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Constituintes mais importantes da fumaça do tabaco	11
TABELA 2	Métodos utilizados para quantificação de nicotina e cotinina em amostras biológicas.....	28
TABELA 3	Identificação, idade e gênero dos participantes do estudo de avaliação da exposição passiva a fumaça do tabaco.....	49
TABELA 4	Resultados dos limites de detecção do método para a determinação de nicotina e cotinina em urina.....	54
TABELA 5	Resultados dos limites de quantificação do método para a determinação de nicotina e cotinina em urina.....	54
TABELA 6	Recuperação da nicotina adicionada ao pool de urina, nas concentrações de 30; 80; 180 ng/mL.....	55
TABELA 7	Recuperação da cotinina adicionada ao pool de urina, nas concentrações de 30; 80; 180 ng/mL.....	55
TABELA 8	Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações urinária de nicotina. Análise em 5 replicatas e durante 3 dias. Cálculo: ANOVA.....	58
TABELA 9	Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações urinária de cotinina. Análise em 5 replicatas e durante 3 dias. Cálculo: ANOVA.....	58
TABELA 10	Inexatidão do método analítico para a determinação de nicotina em urina.....	59
TABELA 11	Inexatidão do método analítico para a determinação de cotinina em urina.....	59

TABELA 12 Avaliação da estabilidade através da porcentagem de inexistência da nicotina em urina na concentrações 30, 80 e 180 ng/mL armazenadas em <i>freezer</i> (-20°C).....	60
TABELA 13 Avaliação da estabilidade através da porcentagem de inexistência da cotinina em urina na concentrações 30, 80 e 180 ng/mL armazenadas em <i>freezer</i> (-20°C).....	60
TABELA 14 Resultados da determinação de nicotina e cotinina em crianças de pais fumantes.....	62
TABELA 15 Resultados positivos na determinação de nicotina e cotinina em crianças de pais não fumantes.....	62

ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS

QUADRO 1 Síndrome de abstinência da nicotina.....	17
QUADRO 2 Principais causas de morte associadas à exposição ao tabaco..	19
QUADRO 3 Parâmetros cromatográficos para análises de nicotina e cotinina	42
FIGURA 1 Composição de um cigarro de tabaco.....	10
FIGURA 2 Produto de biotransformação da nicotina em humanos e outros mamíferos.....	15
FIGURA 3 Níveis de cotinina em mães fumantes, não fumantes e seus filhos.....	21
FIGURA 4 Marcha analítica do procedimento de extração de nicotina e cotinina em amostras de urina.....	41
FIGURA 5 Cromatograma obtido com a coluna capilar Ultra-2 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m) nas condições cromatográficas otimizadas (descritas em 4.3.2), onde a nicotina, cotinina e p.l. apresentaram respectivamente os tempos de retenção de 4,738, 8,309 e 7,139 minutos.....	50
FIGURA 6 Cromatograma obtido com a coluna capilar Ultra-2 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m) de extrato de branco de urina, submetido ao procedimento de extração descrito em 4.3.1. onde o P.l. apresentou tempo de retenção de 7,146 minutos.....	52
FIGURA 7 Cromatograma obtido com a coluna capilar Ultra-2 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m) nas condições 4.3.1. do extrato de amostra de urina adicionada de 150 ng/mL de nicotina (A), cotinina (B) e 200 ng/mL de P.l.	53
FIGURA 8 Curva de linearidade da nicotina em urina na faixa de concentração de 10 a 200 ng/mL.....	56

FIGURA 9 Curva de linearidade da cotinina em urina na faixa de concentração de 10 a 200 ng/mL.....	57
FIGURA 10 Cromatograma de extrato de amostra de urina de criança exposta à fumaça do tabaco. A concentração obtida foi de 61,9 ng/mL de cotinina (A), (P.I. = 6,8999).....	61

RESUMO

A cotinina, principal produto de biotransformação da nicotina, é considerada um excelente marcador biológico de exposição tanto para fumantes ativos quanto passivos. A cotinina apresenta maior estabilidade química que a nicotina e possui uma meia vida de eliminação de cerca de 40 horas. Assim, um método analítico sensível, preciso e exato foi desenvolvido, para sua determinação, empregando-se a cromatografia em fase gasosa com coluna capilar (HP-Ultra2, 25m x 0.20mm x 0.33 μ m) e detetor de nitrogênio e fósforo (CG/DNP). A nicotina e a cotinina foram extraídas sob condições alcalinas com diclorometano, de amostras de urina às quais foi adicionado o padrão interno (clorprenalina). Após evaporação do extrato sob fluxo de nitrogênio, o resíduo foi retomado utilizando-se 50 μ L de metanol onde 1 μ L foi injetado no CG/DNP. O método mostrou-se linear na faixa de 10 a 200 ng/mL com coeficiente de correlação (r) igual a 0,0965 e 0,9966 para a cotinina e nicotina, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação foram 5 ng/mL e 10 ng/mL, tanto para a cotinina quanto para a nicotina. A nicotina e a cotinina mantiveram-se estável por 15 e 21 dias a - 20°C. A avaliação das amostras de urina de algumas crianças evidenciaram o contato com pais ou parentes fumantes, apresentando resultados de cotinina entre 13,70 a 272,60 ng/mL. O método validado neste trabalho mostrou-se apropriado para a avaliação da presença de cotinina em amostras de urina de fumantes passivos, apresentando as vantagens de fácil execução, curto tempo de análise e baixo custo.

SUMARY

Cotinine, the principal product of biotransformation of nicotine, is considered an excellent biological marker to measure the exposure to cigarette smoke for both the active and passive smokers. Cotinine presents a higher chemical stability than the nicotine and it possesses a half-life of elimination of approximate 40 hours. Therefore, a sensible analytical method, very precise and accurate, was developed using a process of gas chromatography with a nitrogen phosphorous detector (GC/NPD). Nicotine and the cotinine were extracted, under alkaline conditions with dichloromethane, from urine samples which had the internal standard clorprenaline added to them. After evaporation of the extract under nitrogen flux, the residue was retaken using 50 μL of methanol, where 1 μL was injected in the GC/NPD. The method proved to be linear in the range of 10 to 200 ng/mL with a coefficient of correlation (r) equal to 0,0965 and 0,9966 to cotinine and nicotine, respectively. The limits of detection and quantification were 5ng/mL and 10ng/mL for both cotinine and nicotine. Nicotine and cotinine maintained themselves stable for 15 and 21 days at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The evaluation of same urine samples taken from children passively exposed to tobacco throgh there parentes or relatives evidenced cotinine levels from 13,70 to 272,60 ng/mL. The validated method in this work proved to be appropriate for the evaluation of the cotinine presence in the urine samples taken from

1 Introdução

Atualmente há cerca de 1,1 bilhão de fumantes no mundo (INCA, 2003). Aproximadamente três milhões de mortes ocorrem a cada ano em decorrência de disfunções associadas ao fumo em indivíduos com idade inferior a setenta anos, em países economicamente desenvolvidos (HACKSHAW e WALD, 1996).

A exposição à fumaça do tabaco está relacionada com o aumento do risco de câncer (particularmente de pulmão), de doenças cardíacas e de doenças de ordem respiratória. Esta exposição pode ocorrer no ambiente domiciliar, no ambiente de trabalho, em lugares públicos e em locais de lazer (CURTIN, MORABIA e BERNSTEIN, 1999).

Os indivíduos se expõem diariamente a fatores indutores de câncer, sendo o tabagismo o principal deles. O fumo é responsável por 90% dos casos de câncer de pulmão, estando o hábito de fumar ligado à origem de tumores malignos em diversos órgãos, como a boca, laringe, faringe, pâncreas, rins, bexiga, colo de útero e esôfago (INCA, 2003; MONTESANO e HALL, 2001).

Nos recintos onde o fumo é permitido, o ar é poluído com substâncias tóxicas presentes no tabaco, particularmente nicotina, além de outros compostos nocivos para o sistema respiratório e cardiovascular, tais como o monóxido de carbono, a acroleína e os fenóis (ROSEMBERG, 1996).

Segundo a OMS, o fumo passivo, também conhecido como "fumaça do tabaco no ambiente" ou "ETS" (*Environmental tobacco smoke*), é a combinação da fumaça proveniente do cigarro aceso e da fumaça exalada pelo fumante. As pessoas expostas a essa combinação, inalam as substâncias tóxicas do fumo, e são denominadas "fumantes passivos" (KÖHLER *et al.*, 1999). Nesses, os efeitos tóxicos observados variam de acordo com a idade, o tempo e a intensidade de exposição (MONTESANO e HALL, 2001; ROSEMBERG, 1996).

As crianças, particularmente as mais jovens, são extremamente susceptíveis à ação da fumaça do tabaco sofrendo com muita frequência, complicações das vias respiratórias (KÖHLER *et al.*, 1999). A incidência de asma em crianças aumenta significativamente quando as mesmas são expostas ao tabaco e o risco tende a aumentar quando esta exposição ocorre ainda no útero. (VON MUTIUS, 2002).

KÖHLER *et al.*, 1999 observa que a prevalência de asma é mais alta entre crianças de famílias de fumantes, e a gravidade das doenças esta diretamente relacionado ao aumento da exposição à fumaça do cigarro.

As crianças podem, também, se expor aos compostos presentes na fumaça do tabaco, como a nicotina e o monóxido de carbono, desde a vida intra-uterina, pois, como foi mencionado anteriormente, essas substâncias atravessam facilmente a barreira placentária. Nas que convivem com pais fumantes, observa-se um aumento de sintomas, tais como, tosse crônica e distúrbios respiratórios (LANDAU, 2001).

O monóxido de carbono e a nicotina, presentes na fumaça do tabaco são os compostos que podem exercer maior dano sobre o feto e, portanto, são os mais estudados. O monóxido de carbono liga-se fortemente a hemoglobina, diminuindo o transporte do oxigênio, fundamental na respiração celular, podendo provocar uma hipóxia crônica (SECKER-WALKER *et al.*, 1997)

DIAZ, DINSMOOR e LIN, 2001, observaram que, em crianças que nasceram com peso inferior a 1500g, o maior fator de risco identificado foi o uso de cigarros pelas mães. Mulheres que fumam durante a gravidez não somente aumentam o risco para seus filhos como também podem sofrer problemas secundários, tais como ruptura da bolsa gestacional. Esses efeitos podem estar associados à exposição de níveis elevados de monóxido de carbono.

A nicotina pode agir nocivamente sobre o feto produzindo vasoconstrição uterina, diminuindo assim, o suprimento sangüíneo para o feto e aumentando a contractilidade uterina (JAUNIAUX *et al*, 1999).

A inalação da nicotina por crianças expostas à fumaça do tabaco pode aumentar a pressão sistólica e o ritmo cardíaco das mesmas. Em crianças a árvore bronquial, principalmente das mais jovens, é muito sensível à ação irritante e inflamatória da corrente secundária do fumo do cigarro. Por isso, crianças fumantes involuntárias, sofrem maior incidência de bronquites e infecções das vias aéreas inferiores. Nas crianças alérgicas observa-se uma rinite mais intensa e crise asmática em decorrência da poluição ambiental pelo fumo do tabaco. (KÖHLER *et al*, 1999; ROSEMBERG, 1996; WAKEFIELD *et al*, 2000).

Pode-se evidenciar a exposição à fumaça do tabaco avaliando a presença de nicotina e cotinina, produto de biotransformação da nicotina, em flúidos biológicos de indivíduos expostos. A literatura científica apresenta diversos métodos que permitem a quantificação desses compostos. A meia vida da nicotina é muito curta e bifásica: a primeira fase começa em 9 minutos e a última fase em 2 horas. Por isso a cotinina, principal produto de biotransformação da nicotina, é considerada um excelente marcador biológico de exposição em fumantes ativos e passivos, uma vez que apresentam uma concentração urinária que permite detecção, meia vida de eliminação longa (SAKARI e PUHAKAINEN, 1991), é quimicamente estável, além de não sofrer nenhuma influência do pH urinário ao ser excretada (ODDOZE *et al.*, 1999).

A cotinina produz alterações bioquímicas, tais como, o aumento da liberação de neurotransmissores cerebrais e a interferência nas enzimas envolvidas na síntese de estrógeno e testosterona (ZEVIN *et al.*, 1999).

Assim, o objetivo do presente trabalho é o de validar um método cromatográfico que permita determinar a nicotina e cotinina em urina, com o intuito de auxiliar na investigação clínica de crianças expostas passivamente à fumaça do tabaco. Visa, também, comparar os níveis urinários de cotinina em crianças com os resultados obtidos através de questionário da avaliação dos hábitos domiciliares de exposição ao tabaco.

2 Revisão da literatura

2.1. Características do tabaco

Em 1492, Colombo levou para Europa informações sobre o hábito de fumar tabaco (MACKAY e CROFTON, 1996). Este teve grande repercussão na Europa quando Jean Nicot enviou sementes de uma planta com "maravilhosos poderes curativos", sendo que, posteriormente, esta planta foi denominada "Nicotiana" em homenagem a Nicot (ROSEMBERG, 1981).

Em 1558, a plantação de tabaco se estendeu pela Europa onde o hábito de fumar cachimbo se difundiu rapidamente (MACKAY e CROFTON, 1996).

O tabaco é obtido da planta do gênero *Nicotiana*, da família das solanáceas, que engloba mais de 50 espécies diferentes. Suas duas principais espécies *N. rústica* L. e *N. tabacum* L., produzem grandes quantidades do principal alcalóide, a nicotina (HOEHNE, 1939 apud SCHVARTSMAN, 1996; SALOMON, 1994).

Este hábito foi amplamente disseminado pela América do Sul (MACKAY e CROFTON, 1996). A população nativa do Brasil considerava o tabaco como uma erva divina e recomendavam seu uso para úlcera, abscessos e dores generalizadas (ROUTH *et al*, 1998).

Em 1525, o comércio do tabaco já tinha se estabelecido entre o Caribe e a Índia, se estendendo depois para a China, Japão, Portugal, Espanha, África e América Central. Por volta do século XVII, o tabaco começou a ser cultivado na Rússia, Índia e Japão (MACKAY e CROFTON, 1996).

A primeira grande expansão do consumo de cigarros data da Primeira Grande Guerra, tendo ocorrido generalização ainda maior depois da Segunda Guerra Mundial (ROSEMBERG, 1981).

O cigarro é a principal modalidade de forma industrializada do tabaco em todo o mundo, começando a ser comercializado em meados de 1840. Inicialmente eram enrolados à mão e em 1850 essa operação foi mecanizada (ROUTH *et al*, 1998).

As modalidades mais comuns do uso do tabaco são na forma de:

Cigarro: Constituído de pequena porção de tabaco picado, enrolado em papel muito fino, podendo também ser confeccionado com palha de milho;

Charuto: Preparado com folhas curadas envolvidas por uma folha seca, em diversas formas e tamanhos. O fumo produzido é muito intenso, com alto teor de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono;

Cachimbo: Dispositivo mais antigo que se conhece para fumar, usado em quase todos os países, apresentando inúmeras formas e nomes. Consiste de um aparelho composto de um formilho, onde se deposita o tabaco e de um tubo por onde se aspira a fumaça;

Rapé: Tabaco seco reduzido a pó fino que se inala ou tabaco úmido e grosso que se retém na boca;

Tabaco de mascar: Dependendo da região, o tabaco para mascar vai acompanhado de outros condimentos como o mentol, cravo e canela (GALVÃO & MOREAU, 1996; ROUTH *et al*, 1998).

2.2. Composição química da fumaça do tabaco

Após décadas de investigação, aproximadamente 4000 constituintes químicos foram identificados na fumaça do tabaco (BORGERDING *et al*, 1997).

A fumaça do cigarro é resultante da combustão incompleta do tabaco, que ocorre em presença de quantidades suficientes de oxigênio na extremidade acesa do cigarro, onde a temperatura que atinge cerca de 950°C, sofre combustão completa, pela presença de oxigênio em concentração suficiente. Porém, à medida que se afasta da zona incandescente, o teor de oxigênio diminui e a combustão é incompleta, levando a formação de produtos progressivamente menos oxidados (WHO, 2003).

Quando um cigarro é aceso ocorrem vários processos como: pirólise, combustão, destilação, pirossíntese, condensação e eluição de compostos que contribuem para a formação de uma mistura química complexa proveniente da fumaça principal da ponta do cigarro (BORGERDING *et al*, 1997). A pirólise, ocasionada pela decomposição térmica do tabaco, resulta em substâncias orgânicas fracionadas em pequenas moléculas; a pirossíntese, ocorre quando os elementos formados se recombina dando origem a novas substâncias não existentes no tabaco; e o alto aquecimento na ponta do cigarro propicia a destilação de compostos, como a nicotina (ROSEMBERG, 1981).

O cigarro consiste de tabaco enrolado em papel e contém, com frequência, um filtro de acetato de celulose (BORGERDING *et al*, 1997).

FIGURA 1. Composição de cigarros de tabaco.

A composição química da fumaça depende da qualidade do tabaco, de como é embalado, do comprimento da coluna do tabaco, das características do filtro e do papel, da temperatura em que é queimado e da maneira de fumar.

A fumaça da corrente principal é produzida quando o fumante aspira o cigarro aceso a uma temperatura de aproximadamente 950°C, sendo a principal fonte de exposição individual. A fumaça da corrente lateral é a produzida pela queima da ponta do cigarro a baixas temperaturas (350°C), no intervalo entre as tragadas, sendo a principal fonte de contaminação ambiental pelo cigarro e a principal fonte de exposição para o não fumante, correspondendo a cerca de 85% da fumaça gerada em um ambiente na presença de fumantes (ABEL, 1983; FIELDING *et al*, 1988 apud SCHVARTSMAN, 1996;). Aproximadamente 70% da fase gasosa componente da fumaça da corrente principal consiste de nitrogênio e oxigênio. O dióxido e o monóxido de carbono estão presentes em altas proporções na fase gasosa (ABEL, 1983).

No entanto, nessas fontes, duas fases fundamentais podem ser diferenciadas: a gasosa e a particulada. A fase gasosa é definida como parte da fumaça que passa através do filtro e é composta por gases e vapores formados na pirólise e na pirossíntese; a fase particulada, também chamada de condensado, é constituída de um aerosol contendo substâncias voláteis que

não passa através do filtro (ABEL, 1983). As partículas da corrente principal da fumaça do tabaco possuem em torno de 0,2 a 0,3 μm de diâmetro. Ao aspirar a fumaça do cigarro, o indivíduo absorve partículas, que ficam retidas, aproximadamente 50 a 95% no trato respiratório superior (WHO, 2003).

A Tabela 1 apresenta os constituintes mais importantes destas fases.

TABELA 1. Constituintes mais importantes da fumaça do tabaco (GALVÃO & MOREAU, 1996).

Constituinte	Concentração/cigarro
FASE GASOSA	
Monóxido de carbono	17 mg
Amônia	60 μg
Acroleína	70 μg
Acetaldeído	800 μg
Dimetilnitrosamina	13 ng
Acetonitrila	123 μg
Ácido cianídrico	110 μg
FASE PARTICULADA	
Nicotina	1,5 mg
Fenol	85 μg
Cresóis (3 compostos)	70 μg
Benzo(a)pireno	20 ng
Benzo(a)antraceno	40 ng
Nitrosonornicotina	250 ng
Nitrosoanatabina	1,5 μg
Cádmio	0,1 μg

Entre os constituintes da fumaça do tabaco encontram-se diversos compostos considerados carcinógenos químicos como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. (GRIMMER *et al*, 2000).

Muitas substâncias podem ser usadas como marcadores bioquímicos da exposição à fumaça do tabaco, oriundos da queima de seus diversos componentes, tais como o monóxido de carbono, tiocianato, óxidos de nitrogênio e nitrosaminas. Porém, estas substâncias fazem parte da constituição de produtos da combustão de outros compostos orgânicos, e portanto, são pouco específicos na avaliação da exposição ambiental à fumaça do tabaco (VIZUET *et al*, 1998).

2.3. Propriedades toxicocinéticas da nicotina

A nicotina é o ingrediente ativo de maior relevância da fumaça do cigarro e um dos agentes tóxicos mais potentes e de alta toxicidade que se conhece (WHO, 2004). Fumantes apresentam uma prolongada e forte dependência à nicotina (TAYLOR, 2001).

A dose letal considerada para o homem encontra-se entre 40 a 60 mg, porém foram observados efeitos graves em indivíduos expostos a 4 mg de nicotina. A DL₅₀, para ratos via oral é 50 mg kg⁻¹; para ratos via dérmica 140 mg kg⁻¹; para camundongos, via intraperitonal 5.9 mg kg⁻¹; camundongos via intravenosa 0.8 mg kg⁻¹ (UNIVERSITY OF OXFORD, 2004).

2.3.1. Absorção

A nicotina é facilmente absorvida pelo trato respiratório, membrana bucal, trato intestinal e via dérmica (ABEL, 1983; SALOMON, 1994; TAYLOR, 2001).

A nicotina da fumaça do charuto e do cachimbo é alcalina (pH 8,5) sendo rapidamente absorvida na mucosa bucal. Por outro lado, como a fumaça do cigarro tem um caráter ácido (pH 5,5) é melhor absorvida pelos alvéolos pulmonares (IPCS INCHEM, 2004; SALOMON, 1994).

Esta diferença de pH entre os tipos de utilização do tabaco, portanto de local de absorção, pode explicar porque a incidência de câncer na cavidade bucal é maior nos fumantes de cachimbo e charuto, pois não aspiram a fumaça, a absorção da nicotina é local (GALVÃO & MOREAU, 1996).

Na exposição de nicotina através da via pulmonar observam-se efeitos no SNC perceptíveis em aproximadamente 8 segundos após a absorção (O'BRIEN, 2001).

2.3.2. Distribuição

A nicotina é transportada em sua maior parte na forma livre, ou seja, pouco ligada às proteínas plasmáticas, sendo rápida e amplamente distribuídas aos órgãos e tecidos do organismo, atravessando a barreira placentária e sendo secretada no leite materno (ABEL, 1983).

2.3.3. Biotransformação

Aproximadamente 80% a 90% da nicotina é biotransformada, principalmente no fígado pelas enzimas microssomais hepáticas (TAYLOR, 2001), sendo que, para o tabagista crônico sua meia vida biológica é de aproximadamente duas horas. Seu principal produto de biotransformação é a cotinina, cuja meia-vida biológica é mais longa, constituindo-se num parâmetro mais adequado da avaliação da exposição que a própria nicotina (ZEVIN *et al*, 1999).

A cotinina é biotransformada, primariamente, por oxidação em trans-3'-hydroxicotinina, uma N-oxidação e conjugação com ácido glicurônico, sendo o produto final excretado pela urina (ZEVIN *et al*, 1999).

A Figura 2 ilustra um esquema da biotransformação da nicotina em humanos e outros mamíferos.

FIGURA 2. Produtos de biotransformação da nicotina em humanos e outros mamíferos (VIZUET *et al*, 1996).

2.3.4. Excreção

O perfil dos produtos de biotransformação da nicotina parece ser semelhante tanto no fumante ativo quanto nos fumantes passivos. A nicotina e seus produtos de biotransformação são rapidamente eliminados pelos rins, porém a velocidade de excreção depende do pH urinário: em pH alcalino a excreção diminui (TAYLOR, 2001).

2.4. Toxicodinâmica da nicotina

As complexas alterações observadas no organismo após a administração de nicotina são causadas por sua ação nos diversos sítios neuroefetores e quimiossensíveis, e também pelo fato desse alcalóide ser capaz de estimular e dessensibilizar receptores (DOMINO, 1998).

Muitas drogas de abuso, inclusive a nicotina, provocam no cérebro a liberação de dopamina, um neurotransmissor primário relacionado à sensação de prazer e recompensa, permitindo concluir que a dependência de nicotina resulta numa atividade dos neurônios dopaminérgicos (DOMINO, 1998).

A nicotina é capaz de aumentar ou diminuir a frequência cardíaca por excitação do simpático ou por paralisia dos gânglios parassimpáticos. A nicotina desencadeia uma descarga de adrenalina da medula supra-renal e este hormônio acelera a frequência cardíaca e eleva a pressão arterial (TAYLOR, 2001). Dessa forma, fumar um ou dois cigarros (aproximadamente 0,3 a 1 mg de nicotina) geralmente provoca um aumento de frequência cardíaca e da pressão arterial e um leve aumento da frequência respiratória; alguns indivíduos se sentem estimulados, ao passo que outros relatam sedação (GALVÃO & MOREAU, 1996).

Em tabagistas dependentes, existem evidências de que a ânsia de fumar correlaciona-se com um nível sanguíneo baixo de nicotina, evitando, assim, os sinais e sintomas da abstinência. Esses sintomas são apresentados no Quadro 1 (O'BRIEN, 2001).

QUADRO 1. Sinais e sintomas observados na síndrome de abstinência à nicotina (adaptado de O'BRIEN, 2001).

Irritabilidade, impaciência, hostilidade.
Ansiedade
Humor deprimido ou disfórico
Dificuldade de concentração
Inquietude
Redução da frequência cardíaca

A cotinina, o maior produto de biotransformação da nicotina, apresenta atividade bioquímica, com efeitos relacionados aos neurotransmissores cerebrais, além de afetar algumas enzimas envolvidas na síntese de estrógeno e testosterona (ZEVIN *et al*, 1999).

2.5. Principais efeitos tóxicos do tabagismo

ZHONG *et al*, 2000 citam que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), muita estudos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais demonstram claramente que o consumo de tabaco é um fator etiológico importante em diversas enfermidades incapacitantes e inclusive letais, como o câncer de pulmão, a bronquite crônica, o enfisema pulmonar e em particular a isquemia cardíaca.

Os principais riscos à saúde decorrentes da exposição ao tabaco são: coronariopatia e outras formas de doença vascular periférica, inclusive coronariopatias, bronquite crônica e enfisema, câncer e efeitos no desenvolvimento embrionário e fetal (DIBENEDETTO, 1995; LANDAU, 2001; SKURNIK e SHOENFELD, 1998; WALD e HACKSHAW, 1996).

O Quadro 2 apresenta as principais causas de morte associadas ao uso do tabaco.

As principais substâncias químicas isoladas da fumaça do cigarro, relacionadas com estes efeitos nocivos, podem ser classificadas em quatro grupos essenciais: nicotina, monóxido de carbono, substâncias irritantes da mucosa respiratória e substâncias cancerígenas (SHAHAM, RIBAK e GREEN, 1992).

QUADRO 2. Principais causas de morte associadas à exposição ao tabaco

<p>Câncer de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lábio, cavidade oral e faringe • Esôfago • Pâncreas • Laringe • Pulmão, traquéia e brônquios • Bexiga urinária • Rim e outros órgãos urinários <p>Doenças cardiovasculares:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Doenças reumáticas • Hipertensão • Isquemia cardíaca • Lesões pulmonares • Outras doenças cardíacas • Doenças cerebrovasculares • Arteriosclerose • Aneurisma da aorta • Outras doenças arteriais 	<p>Doenças respiratórias:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tuberculose • Pneumonia e gripe • Bronquite e enfizema • Asma • Obstrução crônica das vias aéreas <p>Doença pediátrica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Baixo peso ao nascer <p>Câncer do pulmão e outras doenças causadas pelo fumo passivo</p> <p>Incêndio causado pelo fumo</p>
---	--

Fonte: adaptada, BRASIL, 2003.

2.6. Exposição involuntária à fumaça do tabaco

O cigarro é um poluente individual muito mais nocivo que a poluição atmosférica (ROSEMBERG, 1981) e um grande problema de saúde por exposição ambiental, principalmente para as crianças (BEK *et al*, 1999).

Deste modo, o fumante passivo exposto à fumaça de cigarro em ambientes fechados e mal ventilados pode inalar às concentrações perigosas de agentes tóxicos (WAKEFIELD *et al*, 2000).

A constatação de que constituintes do tabaco são inalados e absorvidos se dá ao se avaliar alguns biomarcadores da exposição à fumaça do tabaco em fluídos biológicos de não fumantes (ZHONG *et al*, 2000).

A cotinina tem sido utilizada como um biomarcador que permite a quantificação da exposição do fumante passivo (FRIED *et al*, 1995).

A exposição à fumaça do tabaco aumenta os riscos de enfermidades para os não fumantes, principalmente em indivíduos asmáticos e naqueles mais susceptíveis como os alérgicos, prejudicam os tecidos respiratórios e aumentam o risco de câncer pulmonar (THOMPSON *et al*, 1990; WAKEFIELD *et al*, 2002).

A exposição pré-natal à fumaça do tabaco leva ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo abortos espontâneos, aumento do risco à síndrome infantil de morte súbita e baixo peso ao nascer. Pode também afetar a maturação do pulmão e principalmente alterar funções fisiológicas (ROGERS e KAVLOCK, 2001).

As crianças, particularmente vulneráveis aos efeitos nocivos do tabagismo involuntário, estão constantemente expostas e podem desenvolver diversos problemas de saúde nos primeiros anos de vida (CHARTON, 1996). A Figura 4 ilustra os níveis de cotinina em filhos de mães fumantes quando comparados com filhos de mães não fumantes.

FIGURA 3. Níveis de cotinina em mães fumantes, não fumantes, e em seus filhos (SALAZAR, 1998)

O aparelho respiratório das crianças, sobretudo as mais jovens, é muito sensível à ação irritante e inflamatória da corrente secundária da fumaça do cigarro. Por isso, crianças fumantes involuntárias sofrem maior incidência de bronquites e infecções das vias aéreas (BEK, *et al*, 1999; DIBENEDETTO, 1995).

Durante o primeiro ano de vida, a exposição à fumaça do tabaco provoca um impacto sobre o sistema respiratório observado através de sintomas como tosse, bronquite ou outros danos pulmonares. Observa-se um aumento de doenças respiratórias em crianças de todas as idades expostas à fumaça do cigarro. Muitas mulheres mantêm o hábito de fumar durante a gravidez, afetando o sistema respiratório do feto, observando-se redução das funções pulmonares nos primeiros seis meses de vida. Esta exposição intra-uterina aumenta a frequência de infecções do trato respiratório durante o primeiro ano de vida (GERGEN, 2001).

Willers *et al*, 2000, relatam que os maiores níveis de cotinina encontrados em urina, plasma e saliva de crianças são os de mães fumantes e estão correlacionados com o número de cigarros fumados no ambiente doméstico.

Charlton, 1996, ao avaliar pacientes com câncer de pulmão, observou que para indivíduos não fumantes que moraram com 2 fumantes durante a infância e a adolescência (12 ou mais anos) havia o dobro do risco de sofrer doenças respiratórias e câncer de pulmão, mesmo sem nunca ter fumado.

2.7. Marcadores de exposição ambiental à fumaça do tabaco

Alguns métodos bioquímicos permitem avaliar a exposição à fumaça do tabaco através da determinação do nível de certos constituintes ou seus metabólitos em fluídos biológicos (soro, saliva ou urina). Estes marcadores são considerados como provas da existência e extensão da exposição dos fumantes passivo (SHAHAM, RIBAK e GREEN, 1992).

Os marcadores - aceitáveis são:

- *Carboxiemoglobina*: o monóxido de carbono presente na fumaça do tabaco é inalado pelo ar alveolar, e se liga à hemoglobina, formando a carboxiemoglobina. Este composto apresenta uma estabilidade 240 vezes maior do que a oxiemoglobina. A concentração de monóxido de carbono absorvido é dependente do grau de ventilação respiratória. A meia vida da carboxiemoglobina é de 2 - 4 horas refletindo, portanto, uma exposição recente. O monóxido de carbono não é um indicador específico da fumaça do tabaco, pois está presente em outras fontes, como gás de fogão e emissão de poluentes automotivos.
- *Tiocianato*: O tiocianato é um produto de biotransformação do cianeto presente na fumaça do tabaco, apresentando uma meia vida biológica de 14 dias. A presença deste composto na urina do indivíduo reflete uma exposição a longo prazo, enquanto que sua presença no soro está relacionada com uma exposição recente.
- *Nicotina*: É um marcador específico e sensível desde que encontrado na urina, saliva e soro de indivíduos após uma exposição recente ao fumaça do tabaco, apresentando uma meia vida de 2 horas.

- *Cotina*: É um produto de biotransformação da nicotina e de maior expressão na fumaça do tabaco. Sua meia vida plasmática é de 10 a 40 horas, podendo apresentar tempos iguais em não fumantes. É um marcador seguro e muito utilizado para se avaliar, em fumantes ativos e passivos, a exposição crônica à fumaça do tabaco.

Os níveis de cotina, dosados em amostras de fluídos biológicos em humanos, são influenciados por fatores associados ao metabolismo da nicotina e por fatores ambientais que incluem a intensidade e a duração da exposição, à quantidade de nicotina presente no cigarro, às dimensões e a ventilação do local de exposição, além do tempo de exposição.

2.8. Métodos para detecção de nicotina e cotina em amostras biológicas

Como indicado anteriormente, alguns marcadores biológicos, como o monóxido de carbono e o tiocianato, não são específicos para avaliar a exposição à fumaça do tabaco deixando a cotina como a melhor alternativa de indicador biológico de exposição diária à fumaça do tabaco. A concentração de cotina urinária dependerá da dose de nicotina, da percentagem de conversão em cotina, e dos produtos de biotransformação (FEYERABEND *et al*, 1986).

A correlação entre cotina e exposição ao tabagismo foi avaliada em diversos estudos (CONKLIN *et al*, 2001; COPE *et al*, 1996; KIM *et al*, 1997). Os níveis urinários de cotina permitem diferenciar nitidamente o fumante ativo do indivíduo exposto passivamente à fumaça do cigarro (SCHVARTSMAN, 1996).

A literatura científica apresenta uma grande variedade de métodos que permitem a determinação de nicotina e cotinina em fluídos biológicos, incluindo os que utilizam radioimunoensaio (RIA), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia à gás (CG), com detectores de captura de elétron (DCE), de ionização de chama (DIC), nitrogênio/fósforo (DNF) ou acoplado à espectrometria de massa (CG-EM) (COPE *et al*, 1996; JACOB III, WILSON e BENOWITZ, 1981).

HEINRICH-RAMM *et al*, 2002, relatou que a técnica de RIA para pesquisa de nicotina em urina de não fumantes, resultou em valores 2.9 vezes mais elevados do que os obtidos por CG/EM, provavelmente devido à por uma reação cruzada com metabólitos nicotínicos, como a trans-3'-hydroxicotinina.

Willers *et al*, 2000, observou uma boa correlação entre a cotinina urinária determinada por CG-EM e a cotinina na saliva determinada por CG-NPD. Outros estudos também indicam uma boa correlação entre os níveis de cotinina no plasma e saliva. O cabelo é uma matriz biológica que pode ser utilizada pesquisa de nicotina em crianças fumantes passivas, bem como a urina e a saliva. Uma alternativa interessante é o sangue, porém por ser uma matriz biológica obtida por processo invasivo, tende a ser evitada. Tanto a nicotina quanto a cotinina se acumulam ao longo do cabelo, e podem ser utilizadas para diferenciar os fumantes de não fumantes, ao longo de um período de exposição (PICHINI *et al*, 1997).

A análise laboratorial ideal deve ser rápida, simples, de baixo custo, específica, precisa, exata e apresentar boa capacidade de detecção. Este último item é necessário pela crescente evidencia de uma maior incidência de em fumantes passivos, o que acarreta na necessidade de se utilizar um método analítico que permita a avaliação da cotinina em baixas concentrações. Em não fumantes, as concentrações de cotinina em fluídos biológicos são de

aproximadamente 0,5 a 1 % dos níveis encontrados em fumantes ativos (FEYERABEND *et al*, 1986).

Nos últimos 30 anos foram desenvolvidos vários métodos utilizando técnicas cromatográficas para a análise de nicotina e cotinina (VONCKEN, SCHEPERS e SCHÄFER, 1989) a partir de diversos tipos de procedimentos de extração, diversas colunas cromatográficas e tipos de detectores (KIM *et al*, 1997; LOURENÇO *et al*, 2000; VEREBEY *et al*, 1982).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi adotada em muitos trabalhos como alternativa apropriada para análise de nicotina e cotinina (BERANOWSKI, POCHOPIEN e BARANOWSKA, 1997; NAKAJIMA *et al*, 2000). Neles, colunas de fase normal e reversa e detectores U.V. demonstram ser bastante eficientes nesse tipo de análise (CEPPA *et al*, 2000; ODDOZE, PAULI e PASTOR, 1998).

A cromatografia gasosa acoplada ao detector de chama (DIC), apresenta uma sensibilidade menor e detecta alguns interferentes que são eliminados com o uso do DNF (LOURENÇO, MATOS e OLIVEIRA, 2000). O detector EM pode ser utilizado para confirmação de interferentes ou dos compostos pesquisados, por ser uma técnica altamente sensível e específica.

A determinação de nicotina e cotinina em urina usando CG/DNF é bem aceita, uma vez que nem todos dispõem de detectores EM (HARIHARAM e VANNOORD, 1991; VONCKEN, SCHEPERS e SCHÄFER, 1989).

As técnicas mais freqüentemente recomendadas no preparo das amostras são as extrações líquido-líquido e sólido-líquido. Nas primeiras extrações recomenda-se que a amostra esteja em pH básico e após a extração, o meio deve ser acidificado (KOGAN *et al*, 1981; NAKAJIMA *et al*, 2000).

A Tabela 2 apresenta alguns métodos propostos para a quantificação de nicotina e cotinina em material biológico.

TABELA 2 - Métodos utilizados para quantificação de nicotina e cotinina em amostras biológicas

Amostra	Técnica	Extração	Características cromatográficas	Observações	Referência
- Urina 24 h. 10 – 20 mL	- CLAE	- XAD-2 - Acetona – diclorometano	- Detector UV - Coluna LC-PAH C ₁₈ - Fase móvel: Acetonitrila: tampão pH 4 (88:12)	- LD cotinina = 4,7 ng/mL	TYRPIEN <i>et al</i> , 2000
- Urina 12 h. 10 mL	- CLAE	- Diclorometano	- Detector UV - Coluna LiChrosorb® Si 60 - Fase móvel: Diclorometano: metanol:amoníaco (90:10:0,2)	- LD cotinina = 2ng/mL	KOLONEN e PUHAKAINEN, 1990
- Urina 20 mL	- CLAE	- Sólido-líquido Extrelut®	- Detector UV - Coluna µBondapak C ₁₈ - Fase móvel: acetonitrila:metanol:tampão (90:30:880)	- LD cotinina = 0,5 ng/L	ODDOZE <i>et al</i> , 1998
- Urina – 4 mL	- CLAE	- Líquido/líquido Cloro de metileno - Líquido/sólido	- Detector UV - Coluna L-C ₈ DB - Fase móvel: Acetonitrila: Água (9:91)	- LD nicotina e cotinina = 1 ng/mL	HARIHARAN e VANNOORD, 1991
- Urina – 5 mL	- CLAE	- Diclorometano	- Detector UV – 260 nm - Coluna C ₈ - Fase móvel: Fase aquosa: Acetonitrila: Metanol (81:10:9)	- LD cotinina = 5 ng/mL	CEPPA <i>et al</i> , 2000

Cont. TABELA 2

<i>Amostra</i>	<i>Técnica</i>	<i>Extração</i>	<i>Características cromatográficas</i>	<i>Observações</i>	<i>Referência</i>
- Plasma – 1 MI	- CLAE	- Diclorometano	- Detector UV – 260 nm - Coluna Capcell Pak C ₁₈ UG120 - Fase móvel: 2% CH ₃ OH, 2mM NaH ₂ PO ₄ , 0,1% ácido fórmico, 1 mM Sulfonato heptano de sódio.	- LQ cotinina = 1 ng/mL	NAKAGIMA <i>et al</i> , 2000
- Mecônio – 2 g	- CLAE	- Clorofórmio e coluna C ₈	- Detector diodo - Coluna - C ₁₈ LiChrosorb® - Fase móvel: água:metanol: tampão acetato pH 4.66: acetonitrila: ácido acético (50:29:20:2:1)	- LD cotinina = 10 ng/mL	BARANOWSKI, POCHOPIEN e BARANOWSKA, 1997
- Cabelo – 10 a 20 mg	- CLAE	- Diclorometano - Extrelut-3	- Detector: UV - Coluna - Coluna L-C ₈ DB - Fase móvel: água:acetonitrila: (94.6:5.3)	- LD nicotina 0.2ng/mg cotinina 1ng/mg.	PICHINI <i>et al</i> , 1997
- Urina 24 h. 10 – 20 MI	- CCD	- XAD-2	- Placa 4x18 de sílica gel com C18 - Linha de frente: 7,5 cm - Fase Móvel: acetonitrila:água (88:12) com adição de 1-octanosulfato (50 mg/100 mL) $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 260$ nm	- LD cotinina = 13,5 ng/spot	TYRPIEN <i>et al</i> , 2000

Cont. TABELA 2

Amostra	Técnica	Extração	Características cromatográficas	Observações	Referência
- Urina 1 mL	- CG – EM	- 5 % tolueno em diclorometano	- Coluna HP Ultra 1 25 m x 0,2mm - Injetor 250°C split/splitless	- LQ cotinina = 0.88 ng/mL	HENSCHEN <i>et al</i> , 1995
- Urina 24 h. 10 – 20 mL	- CG – EM	- XAD-2	- Coluna HP Ultra 1 25 m x 0,2mm - Injetor 250°C splitless - Impacto do elétron= 70 eV - Fonte do íon = 200°C	- LD cotinina = 5 ng/mL	TYRPIEN <i>et al</i> , 2000
- Plasma ou soro – 1 mL	- CG – EM	- Diclorometano	- Coluna DB 5 30 m x 0,32mm - Injetor 280°C - split 0.5 - Impacto do elétron= 70 eV	- LD cotinina = 10 ng/mL	VONCKEN, SCHEPERS e SCHÄFER, 1989
- Plasma, urina, ou saliva – 100 µL	- CG – DNF	- Diclorometano	- Coluna HP-FFAP 7 m x 0,32mm - Injetor = 170°C - Detector = 300°C	- LD nicotina e cotinina = 0.1 ng/mL	FEYERABEND e RUSSEL, 1990
- Urina – 1 mL	- CG – DNF	- Líquido/líquido Cloro de metileno - Líquido/sólido C ₂	- Coluna DB 5 15 m x 0,32mm - Injetor 220°C - split 0.5 - Detector = 280°C	- LD nicotina e cotinina = 10 pg	HARIHARAN e VANNHOORD, 1991
- Plasma – 1 mL	- CG – DNF	- Cloro de metileno	- Coluna empacotada 3% SE-30 - Injetor 250°C - Detector = 300°C	- LQ = 50 ng/mL	KOGAN <i>et al</i> , 1981

Cont. TABELA 2

Amostra	Técnica	Extração	Características cromatográficas	Observações	Referência
- Urina – 1 mL	- CG - DNF	- Diclorometano	- Coluna empacotada 2% Carbowax 20 M - Injetor = 250°C - Detector = 300°C	- LD cotinina = 10 ng/mL	FEYERABEND et al, 1986
- Plasma 0,5 mL	- CG -- DIC	- Alcool isoamino	- Coluna WCOT 12m x 0,2 mm - Injetor = 245°C - Detector = 300°C	- LD nicotina e cotinina = 1 e 5 ng/mL	VEREBEY et al, 1982
- Urina – 0,1 mL	Radioimú- noensaio	-	-	- LQ = 1 ng/MI	THOMPSON et al, 1990
- Saliva --	CL-EM- EM	- XAD-4	- Detector ultraviolet absorbance (UVPM), fluorescence (FPM).	- LQ = 10 ng/mL	PHILLIPS e BENTLEY, 2001

LD = Limite de Detecção

LQ = Limite de Quantificação

CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência

CG = Cromatografia gasosa

DNF = Detector de nitrogênio e fósforo

DIC = Detector de ionização de chama

EM = Espectrometria de massa

3 Objetivos e Plano de Trabalho

3.1. Objetivos

Este trabalho tem por objetivo padronizar e validar um método quantitativo quando à análise simultânea de nicotina e cotinina, em fumantes passivos, usando a cromatografia gasosa com coluna capilar e detector de nitrogênio e oxigênio (CG-DNP) e, através deste método, avaliar os níveis urinários de cotinina e nicotina em crianças expostas à fumaça do tabaco.

2.2. Plano de trabalho

O plano de trabalho delineado para se atingir os objetivos propostos consta

Revisão bibliográfica de vários aspectos relacionados à exposição a fumaça do tabaco, inclusive dos métodos analíticos propostos para determinação e quantificação de cotinina e nicotina em urina de fumantes passivos;

Padronização e validação de um método por CG-DNP, através do estudo de sua linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, efeito da matriz, exatidão e estabilidade;

Aplicação do método validado em amostras de urina provenientes de crianças expostas à fumaça do tabaco em ambientes domésticos;

Avaliação dos resultados obtidos.

4 Material e Métodos

4.1. CASUÍSTICA

Participaram do estudo, 70 crianças (n=70) de ambos os sexos e de faixa etária entre 0 e 5 anos.

A urina, proveniente de uma única micção, foi coletada:

- com saco coletor: para as crianças que ainda utilizavam fraldas e transferidas para o frasco de polietileno;
- e diretamente em frasco de polietileno.

Após a coleta, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise.

Os responsáveis legais dos pacientes foram informados, em detalhes, verbalmente e por escrito (Anexo 2) sobre o estudo a ser realizado, consentindo na participação, por escrito, conforme modelo apresentado no Anexo 3.

As amostras foram obtidas em colaboração com o médico João Paulo B. Lotufo, do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Os critérios de inclusão das crianças neste trabalho, consideraram para todas as crianças admitidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pelo ambulatório pediátrico da pneumologia, com ou sem problemas respiratórios.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

4.2. Material

4.2.1. Padrões

- Padrão de nicotina, teor 98 % SIGMA;
- Padrão de cotinina, teor 98 % SIGMA;
- Padrão de Clorprenalina, teor 98 % LILLY.

4.2.2. Solventes e reagentes

- Diclorometano LiChrosolv[®] (MERCK);
- Metanol LiChrosolv[®] (MERCK);
- Acetona LiChrosolv[®] (MERCK);
- Ácido acético glacial (MERCK);
- Água ultrapura Milli-Q[®];
- Hidróxido de potássio (CARLO ERBA).

4.2.3. Soluções de trabalho

Foram preparadas separadamente soluções-padrão estoque de cotinina, nicotina e clorprenalina, de 1 mg/mL, dissolvendo-se 10 mg de cada padrão em 10 mL de metanol. Esta solução foi preparada mensalmente e conservada a – 4°C.

A solução-padrão de trabalho da mistura de nicotina e cotinina (10.000 ng/mL), foi preparada por diluição das soluções a 1 mg/mL em metanol, tomando-se 100 µL das soluções de nicotina e cotinina de 1mg/mL e completando para um volume final de 10mL.

A solução-padrão de trabalho de clorprenalina de 20.000 ng/mL, foi preparada por diluição da solução a 1 mg/mL em metanol, tomando-se 200 µL da solução de clorprenalina (1 mg/mL) e completando para um volume final de 10 mL.

A solução de hidróxido de potássio 5 N foi preparada em água ultrapura.

4.2.4. Calibradores

Alíquotas da solução-padrão de trabalho (4.2.3.) foram apropriadamente diluídas em *pool* de urina (4.2.7.) para obtenção de calibradores nas concentrações de 10; 50; 100 e 200 ng/mL. Após a preparação dos calibradores, os mesmos foram divididos em tubos devidamente identificados.

4.2.5. Controles

Alíquotas da solução-padrão de trabalho (4.2.3.) foram apropriadamente diluídas em *pool* de urina (4.2.7.) para obtenção de controles nas concentrações de 30; 80 e 180 ng/mL. Após a preparação dos controles, os mesmos foram divididos em tubos devidamente identificados.

Observação: os calibradores e controles foram preparados e utilizados no mesmo dia.

4.2.6. Equipamentos, acessórios e vidraria

- Cromatógrafo a gás Hewlett-Packard, modelo 6890, com detector de nitrogênio fósforo (GCNPD), injetor split/splitless;
- Integrador HP 3395 (Hewlett-Packard, Wilmington, EUA);
- Coluna Capilar J & W Scientific - Ultra-2, de 25 m x 0,20 mm de diâmetro interno x 0,33 μm espessura do filme;
- Agitador mecânico FANEM 251 (São Paulo, Brasil);
- Mesa agitadora TECNAL;
- Centrífuga SORVALL T 600 D;
- Bloco de aquecimento PIERCE - Reacti-therm, modelo n.º 18870, com fluxo de nitrogênio;
- Micropipetas Finnpiette com volumes ajustáveis de 5 a 40 μL , 40 a 200 μL , 200 a 1000 μL e 1000 a 5000 μL ;
- Micro-seringa de 10 μL Hamillton;
- Balança analítica Sartorius (Goettingen, Alemanha);
- Tubos de ensaio para centrífuga;
- Beckers afunilados com tampa esmerilhada.
- Gases especiais para cromatografia em fase gasosa: Hélio, ar sintético e hidrogênio (Air Liquide).

4.2.7. Amostras

Os calibradores e controles, foram constituídos por um *pool* de urina de indivíduos sem histórico de exposição a fumaça do tabaco. Este *pool* de urina foi utilizado somente após ter sido submetido à análise de nicotina e cotinina e apresentado resultado negativo para os dois analitos.

As amostras da primeira urina da manhã coletadas pelos próprios pacientes expostos à fumaça do tabaco, foram também submetidas à análise de urina Tipo I.

4.3. Método

4.3.1. Padronização do procedimento de extração do método analítico

A partir de referências de métodos usados na quantificação de cotinina e nicotina encontradas na literatura (CEPPA, *et al*, 2000; FEYERABEND e RUSSEL, 1990) foram analisadas a quantidade de KOH necessária para alcalinizar a urina (0,5 e 1 mL), o tempo de agitação (10 e 15 minutos, razão de divisão do injetor (20 e 30) e a atenuação do integrador (0 e 1). As extrações de branco de urina foram realizadas para verificar a adequação do procedimento de extração na tentativa de evitar possíveis interferentes. Adicionalmente, a vidraria utilizada na extração e evaporação foi analisada quanto à possível adsorção.

Na determinação de nicotina e cotinina utilizou-se o seguinte procedimento, ilustrado na Figura 4:

- Em um tubo de centrífuga, adicionar 5 mL de urina, 100 µL de P.I. (clorprenalina a 20 ng/µL) e 1 mL de hidróxido de potássio 5 N;
- Adicional 3 mL de diclorometano e agitar em mesa agitadora por 15 minutos;
- Centrifugar a 2.000 rpm por 15 minutos;

- Transferir a fase orgânica para um tubo de evaporação e adicionar 10 μL de ácido acético glacial;
- Evaporar sob fluxo de N_2 a uma temperatura de aproximadamente 30°C ;
- Retomar com 50 μL de metanol;
- Injetar 1 μL no CG/NPD.

Obs.: A vidraria usada na evaporação foi previamente descontaminada com solução potássica alcoólica, silanizada com diclorodimetilsilano, metanol e lavagem com acetona. As micropipetas foram recalibradas mensalmente. O grau de pureza de cada reagente foi testado através de corridas cromatográficas.

FIGURA 4. Marcha analítica do procedimento de extração de nicotina e cotinina em amostras de urina.

4.3.2. Otimização dos parâmetros cromatográficos

Para a otimização do método analítico foi utilizado um *pool* de urina. As alíquotas de urina foram homogeneizadas e, no momento do uso, foram adicionadas nicotina e cotinina em diferentes concentrações, para o preparo da curva de calibração e estudos dos parâmetros de validação e extraídas segundo o procedimento descrito em 4.3.1.

Os parâmetros cromatográficos para análise de nicotina e cotinina foram padronizados conforme a descrição apresentada no Quadro 3 a seguir:

QUADRO 3: Parâmetros cromatográficos para análises de nicotina e cotinina.

INJETOR	<ul style="list-style-type: none"> - TEMPERATURA: 270° - RAZÃO DE DIVISÃO: 1/20
COLUNA	<ul style="list-style-type: none"> - Fluxo de Hélio: 10 mL/minuto - Temperatura inicial: 148°C - Rampa 1: 10°C/minuto - Temperatura final: 200°C - Tampa 2: 20°C/minuto - Temperatura final: 280°C por 8 minutos
DETECTOR	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura: 280°C - Fluxo de hidrogênio: 3,0 mL/minuto - Fluxo de ar sintético: 60,0 mL/minuto - Gás auxiliar (hélio): fluxo total de 0,4 mL/minuto. - Corrente na pérola: 50 pA (picoamperes)
PARÂMETROS DE INTEGRAÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> - Atenuação: 0 - Limiar de detecção de pico (threshold): 1 - Largura de pico: 0,04 min - Velocidade do papel: 0.5 cm/min

4.3.3. Validação do método analítico para determinação de nicotina e cotinina em urina

A validação do método proposto consiste da avaliação dos parâmetros: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, recuperação, efeito da matriz, precisão inter e intra-dia, exatidão e estabilidade, descritos a seguir:

4.3.3.1. Limite de detecção

O limite de detecção, definido como a concentração mínima que se diferencia do zero com determinada confiabilidade (BRASIL, 2003; CHASIN *et al*, 1998), ou seja, a mínima concentração de nicotina e cotinina adicionada à amostra que apresentou um coeficiente de variação menor que 20 %, foi obtido a partir de diluições sucessivas da amostra adicionada de 50 ppb. As análises para cada concentração foram realizadas em cinco replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.1.

4.3.3.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação do método, definido com a menor concentração que se pode medir com precisão adequada (BRASIL, 2003; CHASIN *et al*, 1998), e com coeficiente de variação menor ou igual a 10%, foi obtido por adição de nicotina e cotinina na urina, inferiores a 50ppb. As análises para cada concentração foram realizadas em cinco replicatas, segundo procedimento descrito em 4.3.1.

4.3.3.3. Recuperação

A recuperação da nicotina e cotinina nas amostras de urina, foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo nicotina e cotinina, é submetida ao processo de extração, em relação a concentração obtida quando a amostra, sem a presença de nicotina e cotinina, é submetida ao processo de extração, onde no extrato final obtido são adicionados os padrões de nicotina e cotinina. As análises foram realizadas segundo o procedimento descrito em 4.3.1.

A porcentagem de recuperação dos analitos foi obtida aplicando-se a seguinte equação (CHASIN *et al*, 1998):

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração da amostra}}{\text{Concentração branco adicionado}} \times 100$$

4.3.3.4. Estudo da Linearidade

O estudo da faixa de linearidade do método, que visa avaliar o intervalo das concentrações nas quais a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional às concentrações de nicotina e cotinina (BRASIL, 2003; CHASIN *et al*, 1998), foi realizado através da adição, às amostras de *pool* de urina, solução padrão de nicotina e cotinina, para se obter as seguintes concentrações: 10; 20; 50; 100; 150; 200 ng/mL. Essas amostras e as de branco de urina foram analisadas em cinco replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.1.

4.3.3.5. Curva de calibração

A curva de calibração foi preparada adicionando-se, às amostras de um *pool* de urina, uma solução padrão de nicotina e cotinina, para se obter as seguintes concentrações: 10; 50; 100 e 200 ng/mL. Tais amostras, assim como um branco de urina, foram submetidas ao procedimento descrito 4.3.1 e analisadas em três replicatas. A partir dos resultados das análises, foi construída a curva de calibração projetando-se no eixo das abcissas as concentrações plasmáticas de nicotina e cotinina e no eixo das ordenadas as relações de áreas obtidas entre os picos da nicotina e cotinina e do padrão interno. A análise de regressão linear foi efetuada para obtenção das equações da reta utilizadas para o cálculo de nicotina e cotinina. Esse processo foi realizado para obtenção da curva de calibração em cada amostra (BRASIL, 2003; CHASIN *et al*, 1998).

4.3.3.6. Precisão do método analítico

A precisão do método é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. A medida de precisão pode ser expressa através do cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação, obtidos em condições determinadas de repetibilidade e/ou reprodutibilidade (BRASIL, 2003; CHASIN *et al*, 1998). Para avaliar a precisão, amostras de um *pool* de urina adicionadas de três concentrações diferentes: 30; 80; 180 ppb de nicotina e cotinina foram preparadas e em seguida analisadas em cinco replicatas para cada concentração, segundo o procedimento descrito em 4.3.1., em um dia para o estabelecimento da precisão intra-dia, em três dias consecutivos, para a precisão interdias.

Os cálculos para o estabelecimento dos coeficientes de variação para os ensaios descritos foram realizados por meio de análise estatística ANOVA: fator único e pelo cálculo de coeficiente de variação CV% (CHASIN *et al*, 1998).

O cálculo do coeficiente de variação aplicando-se a análise de variância (ANOVA) permite o isolamento de componentes de variação a fim de identificar possíveis fontes de erros, quando estes são independentes. Com este modelo é possível observar e calcular a variabilidade da análise com diferentes equipamentos ou analistas, quando desejado ou necessário.

4.3.3.7. Exatidão

A exatidão é a diferença entre o valor real presente na amostra e valor obtido na análise. Para o estudo da exatidão, amostras de um *pool* de urina adicionadas de três concentrações 30, 80 e 180 ng/mL de nicotina e cotinina foram preparadas e em seguida analisadas em cinco replicatas para cada concentração, segundo o procedimento 4.3.1. A exatidão é avaliada através da inexatidão e pode ser representada pela equação:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{\text{concentração obtida} - \text{concentração esperada}}{\text{concentração esperada}} \times 100$$

4.3.3.8. Estabilidade do analito na amostra

A estabilidade do analito é avaliada por meio da comparação da concentração obtida no tempo zero e após o período de armazenamento (BRASIL, 2003; CHASIN *et al*, 1994).

As amostra do *pool* de urina adicionadas com três concentrações diferentes 30, 80 e 180 ng/mL de nicotina e cotinina foram preparadas e armazenadas em três replicatas até serem analisadas, segundo o procedimento descrito em 4.3.1. A estabilidade do analito em *freezer* (-20°C) foi avaliada no período de 15 e 30 dias, através da comparação da concentração obtida no tempo zero e após este período de armazenamento.

A estabilidade do analito foi avaliada pelo aumento da inexatidão, sendo consideradas amostras estáveis as que mantiveram seus resultados dentro de uma margem de inexatidão de até 10%. A variação foi calculada considerando a média da 1ª análise como 100%.

4.3.4 Análise de nicotina e cotinina em urina

As análises de nicotina e cotinina das amostras proveniente de crianças expostas a fumaça do tabaco e do grupo controle foram realizadas pelo método descrito em 4.3.1. e nas condições cromatográficas descritas em 4.3.2.

4.3.5. Determinação da gravidade específica

A gravidade específica urinária foi medida com o auxílio de um urodensímetro. Estas análises foram realizadas antes do congelamento das amostras. A urina normal possui densidade entre 1.010 e 1.030. Urinas mais concentradas tendem a apresentar uma densidade maior.

5 Resultados

5.1. Características das crianças participantes do estudo

A Tabela 3 apresenta alguns parâmetros de identificação das crianças avaliadas.

TABELA 3. Identificação, idade e gênero dos participantes do estudo de avaliação da exposição passiva a fumaça do tabaco.

<i>Número</i>	<i>Paciente</i>	<i>Faixa etária</i>	<i>Gênero</i>
A 000	J.A.A.	0-2	F
A 003	E.A.B.	3-5	M
A 004	J.F.J.	3-5	M
A 005	L.F.L.	0-2	M
A 006	I.S.G.	0-2	M
A 007	J.C.L.	SI	F
A 008	V.A.S.	SI	M
A 009	SI	SI	SI
A 010	R.M.S.	0-2	M
A 012	A.L.V.	3-5	F
A 013	E.F.A.	0-2	F
A 014	R.C.A.	0-2	M
A 015	E.V.R.	0-2	F
A 016	T.F.C.	0-2	M
A 017	N.C.S.	0-2	F
A 018	T.A.	0-2	F
A 019	G.H.C.	0-2	M
A 020	G.R.O.	0-2	F
A 021	E.S.V.	0-2	F
A 023	V.S.S.	3-5	M
A 025	J.P.S.A.	0-2	M
A 027	J.R.S.	0-2	F
A 028	S.O.L.	0-2	M
A 030	N.S.T.	3-5	F
A 032	J.P.C.	0-2	M
A 033	M.C.A.	3-5	F
A 034	I.C.F.	3-5	M
A 035	T.M.C.L.	0-2	F
A 036	D.W.S.	0-2	M
A 038	M.H.S.S.	FI	M
A 041	N.S.M.	3-5	M

Cont. TABELA 3

<i>Número</i>	<i>Paciente</i>	<i>Faixa etária</i>	<i>Gênero</i>
A 043	K.G.V.	3-5	M
A 044	V.V.L.	0-2	F
A 045	V.S.	0-2	F
A 046	E.G.S.	3-5	M
A 047	N.A.R.	0-2	F
A 048	J.C.S.	0-2	M
A 049	R.C.S.	0-2	F
A 050	R.R.S.	0-2	M
A 051	J.O.B.	0-2	M
A 053	C.E.S.	0-2	M
A 055	S.C.M.	3-5	F
A 056	K.H.L.S.	0-2	M
A 057	L.L.V.	0-2	F
A 058	J.V.S.C.	3-5	M
A 059	G.C.D.D.	0-2	M
A 060	G.A.S.	0-2	M
A 062	L.O.G.	0-2	M
A 063	I.S.B.	3-5	F
A 064	M.A.S.	0-2	M
A 065	L.O.G.	0-2	M
A 067	V.M.S.	3-5	F
A 069	E.S.R.	0-2	M
A 070	K.M.S.	0-2	F
A 072	E.M.B.	0-2	M
A 073	L.O.P.	0-2	M
A 076	G.S.S.	0-2	M
A 077	W.D.L.	0-2	M
A 079	F.S.S.	3-5	F
A 080	V.L.C.S.	0-2	M
A 087	C.R.F.	3-5	M
A 089	L.N.M.S.	0-2	M
A 093	P.J.C.O.	0-2	F
A 098	C.A.M.F.	0-2	M
A 100	A.B.A.R.S.	0-2	F
A 103	N.S.C.	0-2	F
A 106	L.B.S.	0-2	M
A 107	M.P.A.	0-2	M
A 108	L.F.V.F.	0-2	M
A 109	K.J.S.	0-2	M

Legenda:

F – Feminino

M – Masculino

SI - Sem informações

5.2. Otimização das condições cromatográficas

A Figura 5 ilustra um cromatograma correspondente a otimização dos parâmetros cromatográficos, onde a nicotina, cotinina e P.I. apresentaram respectivamente, os tempos de retenção de 4,738, 8,309 e 7,139 minutos.

FIGURA 5. Cromatograma obtido com a coluna capilar Ultra-2 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m) nas condições cromatográficas otimizadas (descritas em 4.3.2), onde a nicotina (A), cotinina (B) e P.I. apresentaram respectivamente os tempos de retenção de 4,738, 8,309 e 7,139 minutos.

5.3. Perfil cromatográfico da separação de nicotina e cotinina

As Figuras 6 e 7 ilustram os cromatogramas obtido da análise do *pool* de branco de urina e de *pool* de amostras de urina adicionadas de 150 ng/mL de nicotina e cotinina.

FIGURA 6. Cromatograma obtido com a coluna capilar Ultra-2 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m) de extrato de branco de urina adicionado de P.I., submetido ao procedimento de extração descrito em 4.3.1. onde o **P.I.** apresentou o tempo de retenção de 7,146 minutos.

FIGURA 7. Cromatograma obtido com coluna capilar Ultra-2 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m) nas condições 4.3.1. do extrato de amostra de urina adicionada de 150 ng/mL de nicotina (A), cotinina (B) e 200 ng/mL de P.I.

5.4. Resultados dos parâmetros da validação do método analítico para determinação de nicotina e cotinina em urina

5.4.1. Limite de detecção

Os limites de detecção do método para a nicotina e cotinina são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: Resultados dos limites de detecção do método para a determinação de nicotina e cotinina em urina.

	Limite de detecção*	Coeficiente de variação (CV)
Nicotina	5 ng/mL	12,9 %
Cotinina	5 ng/mL	11,2%

* Média dos valores das análises em cinco replicatas

5.4.2. Limite de quantificação

Os limites de quantificação do método para a nicotina e cotinina são apresentados na Tabela 5.

TABELA 5: Resultados dos limites de quantificação do método para a determinação de nicotina e cotinina em urina

	Limite de quantificação*	Coeficiente de variação (CV)
Nicotina	10 ng/mL	8.44 %
Cotinina	10 ng/mL	11.51 %

*Média dos valores das análises em cinco replicatas.

5.4.3. Recuperação

Os valores do estudo da recuperação para a nicotina e cotinina são apresentados respectivamente, nas Tabela 6 e 7.

TABELA 6: Recuperação da nicotina adicionada ao pool de urina, nas concentrações de 30; 80; 180 ng/mL.

Concentração de nicotina em urina (ng/mL)	Recuperação*	Coeficiente de variação (CV)
30	85%	5.17 %
80	76%	4.78 %
180	93%	5.12 %

* Média dos valores das análises em cinco replicatas

TABELA 7: Recuperação da cotinina adicionada ao pool de urina, nas concentrações de 30; 80; 180 ng/mL.

Concentração de cotinina em urina (ng/mL)	Recuperação*	Coeficiente de variação (CV)
30	75%	10.24 %
80	72,5%	6.75 %
180	72,7%	5.86 %

* Média dos valores das análises em cinco replicatas

5.4.4. Linearidade

As Figuras 8 e 9 ilustram as curvas de linearidade, da nicotina e da cotinina em urina, respectivamente, nas concentrações de 10; 25; 50; 100; 150; 200 ng/mL. Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise em cinco replicatas.

FIGURA 8: Curva de linearidade da nicotina em urina na faixa de concentração de 10 a 200 ng/mL.

FIGURA 9: Curva de linearidade da cotinina em urina na faixa de concentração de 10 a 200 ng/mL.

5.4.5. Precisão

A precisão do método é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. A medida de precisão pode ser expressa através do cálculo do desvio-padrão e do coeficiente de variação, obtidos em condições determinadas de repetibilidade e/ ou reprodutibilidade e por meio de análise de variância ANOVA: fator único.

Os coeficientes de variação e desvio padrão obtidos no estudo da precisão intra-dia e inter-dias para as amostras de urina adicionadas de nicotina e cotinina nas concentrações de 30, 80 e 180 ng/mL são apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

TABELA 8: Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações urinárias de nicotina. Análise em 5 replicatas e durante 3 dias. Cálculo: ANOVA.

Concentração de nicotina em urina (ng/mL)	Precisão intra-dia CV(%)	Precisão inter-dias (3 dias)	
		CV(%)	Média
30	10.60	5.95	31.58
80	8.35	8.95	76.0
180	12.0	8.67	191.13

TABELA 9: Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações urinárias de cotinina. Análise em 5 replicatas e durante 3 dias. Cálculo: ANOVA.

Concentração de cotinina em urina (ng/mL)	Precisão intra-dia CV(%)	Precisão inter-dias (3 dias)	
		CV(%)	Média
30	5.96	2.23	29.31
80	5.69	4.19	77.14
180	2.81	6.46	179.53

5.4.6. Exatidão

A exatidão do método, sendo representada pela tendenciosidade, ou seja, a inexatidão, foi estabelecida através da análise em cinco replicatas das amostras de urina adicionadas de nicotina e cotinina nas concentrações 30,

80 e 180 ng/mL e os valores obtidos estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

TABELA 10: Inexatidão do método analítico para a determinação de nicotina em urina.

Concentração de nicotina (ng/mL)	Inexatidão (%)*
30 ng/mL	- 4.6 %
80 ng/mL	- 1.42%
180 ng/mL	5.1 %

* Média dos valores das análises em cinco replicatas.

TABELA 11: Inexatidão do método analítico para a determinação de cotinina em urina.

Concentração de cotinina (ng/mL)	Inexatidão (%)*
30 ng/mL	- 0.5 %
80 ng/mL	- 0.3%
180 ng/mL	- 0.69 %

* Média dos valores das análises em cinco replicatas.

5.4.7. Estabilidade

Os resultados do estudo da estabilidade da nicotina e cotinina em urina, nas concentrações 30, 80 e 180 ng/mL, são apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente e estão relacionados a estabilidade das amostras armazenadas em *freezer* por 15 e 30 dias, avaliada através do

aumento da porcentagem de inexactidão com relação ao tempo zero. As concentrações obtidas se referem à média da determinação da nicotina e cotinina analisadas em três replicatas.

TABELA 12: Avaliação da estabilidade através da porcentagem de inexactidão da nicotina em urina, nas concentrações de 30, 80 e 180 ng/mL armazenadas em *freezer* (-20°C).

Concentração

esperada (ng/mL)	Média ₀	Média ₁₅	Inexactidão % 15	Média ₃₀	Inexactidão % 30
30	29.01	32.76	12,92	32.25	11,16
80	80.84	76.89	- 4,88	77.24	- 4,45
180	178.66	182.76	2,29	181.94	1,83

Média₀ = Média de 3 determinações no tempo zero.

Média₁₅ = Média de 3 determinações após 15 dias.

Média₃₀ = Média de 3 determinações após 30 dias.

TABELA 13: Avaliação da estabilidade através da porcentagem de inexactidão da cotinina em urina, nas concentrações de 30, 80 e 180 ng/mL armazenadas em *freezer* (-20°C).

Concentração

esperada (ng/mL)	Média ₀	Média ₁₅	Inexactidão % 15	Média ₃₀	Inexactidão % 30
30	29.85	32.49	8,84	34	13.90
80	79.22	75.82	- 4,29	73.7	- 6,96
180	178.60	183.94	- 2,99	181.57	1,66

Média₀ = Média de 3 determinações no tempo zero.

Média₁₅ = Média de 3 determinações após 15 dias.

Média₃₀ = Média de 3 determinações após 30 dias.

5.5. Determinação das concentrações plasmáticas de nicotina e cotinina em pacientes com e sem problemas respiratórios

A Figura 10 ilustra um cromatograma do extrato de uma amostra de urina de criança exposta à fumaça do tabaco. Os resultados obtidos na quantificação de nicotina e cotinina nas amostras dos pacientes são apresentados na Tabela 14.

FIGURA 10 Cromatograma do extrato de amostra de urina de criança exposta à fumaça do tabaco. A concentração obtida foi de 61,9 ng/mL de cotinina (A), (P.I. = 6,899).

Os resultados da determinação cromatográfica (CG) da nicotina e cotinina na urina de crianças expostas ou não à fumaça do tabaco são apresentados nas Tabelas 14 e 15.

TABELA 14. Resultados da determinação de nicotina e cotinina em crianças de pais fumantes.

Número	Permanência em casa	Outros fumantes	Nicotina (ng/mL)	Cotinina (ng/mL)	Pai fumante	Mãe fumante
A 003	Meio período	Avó	0,0	24,30	Não	Sim
A 016	Período integral	Empregada	0,0	14,70	Sim	Sim
A 019	Período integral	Outros	0,0	61,90	Não	Sim
A 021	Período integral	-	39,80	33,60	Sim	Sim
A 033	Período integral	Avô e 3 tios	188,40	272,60	Não	Sim
A 034	SI	SI	0,0	19,30	Sim	Não
A 036	Período integral	-	0,0	38,0	Não	Sim
A 047	Meio período	Outros	0,0	39,60	Não	Sim
A 055	Período integral	Tia	0,0	13,70	Sim	Não
A 056	Período integral	Avó	0,0	93,3	Sim	Sim
A 057	Período integral	-	0,0	82,15	Sim	Sim
A 103	Período integral	-	0,0	18,9	Não	Sim

SI - Sem informação

TABELA 15. Resultados positivos na determinação de nicotina e cotinina em crianças de pais não fumantes.

Número	Permanência em casa	Outros fumantes	Nicotina (ng/mL)	Cotinina (ng/mL)
A 006	Período integral	-	13,55	50,90
A 017	Meio período	-	0,0	10,00
A 023	SI	SI	0,0	25,60
A 048	SI	-	0,0	12,60

SI - Sem informação

6 Discussão

Pela facilidade e caráter não invasivo, a urina é o material mais freqüentemente escolhido na análise de nicotina e cotinina em fumantes passivos (HAUFROID e LISON, 1998). As concentrações dessas substâncias encontradas em urina são um pouco mais elevadas que as encontradas em plasma ou saliva, permitindo a diferenciação do fumante ativo do passivo.

Participaram deste projeto 70 crianças de ambos os sexos e de faixa etária entre 0 e 5 anos, cujas características foram inseridas de acordo com o modelo apresentado no Anexo 1e apresentadas na Tabela 3.

A coleta de urina foi realizada pela equipe de enfermagem do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo em função da disponibilidade dos pacientes e de seus familiares. Como as amostras foram coletadas em dias aleatórios, o Dr. João Paulo B. Lotufo optou por realizar a análise da urina Tipo I, para verificação da gravidade específica, no laboratório do Hospital Universitário. Como não tivemos acesso à coleta e menos ainda à realização de creatinina nestas amostras, optou-se por congelá-las logo após a realização da análise de urina Tipo I, para posterior análise num prazo máximo de 20 dias.

As medidas de creatinina e gravidade específica permitem ajustar as concentrações de cotinina urinária na diluição de amostras (COPE *et al*, 1996). Os valores de gravidade específica podem ser seguramente utilizados no lugar de valores de creatinina para avaliação de cotinina, tanto para pesquisas quanto para propostas clínicas (HADDOW *et al*, 1994).

Este trabalho teve como objetivo, além de validar um método para a determinação de nicotina e cotinina em urina, aplicá-lo em situações de exposição real, ou seja, em crianças expostas à fumaça do tabaco.

Assim, tendo em vista os objetivos do presente trabalho, foi escolhida a técnica cromatográfica para quantificação de nicotina e cotinina em urina.

A cromatografia gasosa com coluna capilar permite a detecção de nicotina e cotinina em tempo de análise relativamente curto e desempenho cromatográfico satisfatório. Observou-se na literatura que os detectores normalmente utilizados na separação de nicotina e cotinina são os DIC, DNF e CG-EM. Observou-se que o DNF responde melhor para estes compostos do que o DIC resultando num cromatograma mais limpo e de baixo custo comparado com CG-EM.

O primeiro ensaio laboratorial realizado foi a injeção de padrões de nicotina e cotinina para se verificar a resposta do detector e da coluna escolhida. Após a verificação dos resultados, foram realizados testes com o injetor, utilizando um *split* de 30 primeiramente, onde o cromatograma apresentou muitos picos optando-se em diminuir a razão de divisão do *split* para 20, para se evitar uma possível saturação da coluna cromatográfica.

Foram avaliados os parâmetros do processo de validação para assegurar a confiança dos resultados analíticos, visando minimizar eventuais erros. Nas condições estabelecidas o detector apresentou linearidade adequada após seleção do volume de amostra e volume de retomada do extrato, e a detecção de concentrações de nicotina e cotinina foram compatíveis aos objetivos do presente trabalho.

O procedimento de extração (Figura 3) foi selecionado a partir de trabalhos descritos na literatura, com as adaptações comentadas, a seguir (FEYERABEND e RUSSEL, 1990; CEPPA *et al*, 2000).

A literatura indica várias soluções para o ajuste do pH, na alcalinização da amostra, que vão desde soluções tampão até soluções alcalinas (GRIMMER *et al*, 2000; FEYERABEND e RUSSEL, 1990; KIM *et al*, 1997). Na

padronização do procedimento de extração do presente trabalho, optou-se por uma solução de hidróxido de potássio 5 N, por apresentar melhores resultados.

Grande parte dos trabalhos disponíveis na literatura emprega como solvente extrator o diclorometano (CEPPA *et al*, 2000; VONCKEN, SCHEPERS e SCHÄFER, 1989; FEYERABEND e RUSSEL, 1990), que foi o utilizado no presente trabalho.

O volume de 5 mL de amostra, alcalinizada com 0,5 mL de KOH 5N, extraída com 3 mL de diclorometano propiciou resultados satisfatórios em relação as concentrações esperadas.

O padrão interno utilizado inicialmente foi a mefenetamina, mas durante a cromatografia, a área do pico desse composto apresentou muita variação. Assim, foram testados mais dois padrões internos, a metoxiamina e a clorprenalina, sendo que a clorprenalina apresentou melhores resultados.

Inicialmente observou-se uma alta variação nas concentrações de nicotina, cotinina e padrão interno nos resultados analíticos obtidos, suspeitando-se de que uma possível adsorção das substâncias poderia estar ocorrendo nos frascos de evaporação. Estes, com base nestas evidências, passaram a ser silanizados. A partir da introdução desse procedimento, os resultados de nicotina, cotinina e padrão interno se tornaram reprodutíveis.

A evaporação do extrato foi feita sob fluxo de nitrogênio, para evitar uma possível oxidação das substâncias, porém observou-se nesse processo uma perda considerável de nicotina, possivelmente por evaporação. Assim, para evitar esta perda, foi adicionado 10 µL de ácido acético glacial, observando-se melhores resultados para a nicotina.

O resíduo decorrente do procedimento descrito em 4.3.2, foi dissolvido em 50 μL de metanol e injetado com o auxílio de microseringa por um processo manual, e para evitar contaminações das seringas, foram lavadas 30 vezes com metanol entre as injeções cromatográficas.

Foram avaliados os parâmetros de validação como linearidade, precisão intra e inter ensaios, limite de detecção e quantificação, recuperação, exatidão e estabilidade.

A curva de calibração foi construída a partir de adicionados em urina, em concentrações que abrangeram os valores normalmente encontrados em fumantes passivos. Foram avaliados seis pontos de concentração, sendo o ponto mais baixo de 10 ng/mL. Os coeficientes de determinação de 0,9966 e 0,9965 encontrados para a nicotina e cotinina, respectivamente, permitem considerar que o método gera resultados proporcionais à concentração das substâncias em análise, dentro de uma faixa específica, sendo possível relacionar a medida dependente da concentração (CHASIN *et al*, 1998).

Neste estudo, a curva de calibração foi injetada a cada lote de amostra (12 amostras) para possibilitar a quantificação mais confiável do analito. A curva era injetada no início de cada lote em três replicatas.

Em relação ao limite de detecção foi considerado confiável um valor de coeficiente de variação igual ou menor a 20%. Os valores encontrados, foram de 5 ng/mL para nicotina e cotinina.

Em relação ao limite de quantificação foi considerado confiável um valor de coeficiente de variação igual ou menor a 10%. Os valores encontrados, foram de 10 ng/mL para nicotina e cotinina.

Os limites de detecção encontrados na literatura para nicotina e cotinina respectivamente são de 0,01ng/mL (FEYERABEND *et al*, 1986; HARIHARAN e VANNOORD, 1991), 0.1ng/mL (FEYERABEND e RUSSEL, 1990) e 1 ng/mL (JACOB, WILSON e BENOWITZ, 1981), utilizando CG/NPD, onde as técnicas de extração e as características cromatográficas são diferentes das utilizadas neste trabalho. Outros métodos como CLAE e CG-EM permitem um limite de detecção para cotinina em urina a partir de 0,8 ng/mL, pois a sensibilidade do equipamento é maior.

O estudo de recuperação absoluta, onde a área relativa da nicotina e cotinina adicionadas ao extrato, sem ter sido submetida ao processo de extração, foi comparada com as áreas relativas destas substâncias obtidas de extratos provenientes de amostras adicionadas submetidas ao processo de extração, mostrou resultados satisfatórios (ANVISA, 2003 e CHASIN *et al*, 1998).

Os coeficientes de variação obtidos para a precisão intra-ensaio para as concentrações de 30, 80 e 180 ng/mL de nicotina e cotinina e os da precisão inter-ensaio foram considerados satisfatórios (ANVISA, 2003 e CHASIN *et al*, 1998).

Lamentavelmente, não foi possível obter uma amostra certificada para nicotina e cotinina, que permitisse avaliar a exatidão, parâmetro importante no processo de validação. Assim, foram adicionados à urina os padrões de nicotina e cotinina em concentrações conhecidas, que foram quantificados, sendo os resultados comparados com os valores adicionados. A porcentagem de inexatidão do método obtida encontra-se entre os limites aceitáveis (ANVISA, 2003 e CHASIN *et al*, 1998).

A estabilidade dos analitos foi avaliada pelo aumento da inexatidão, sendo consideradas estáveis as amostras que mantiveram seus resultados

dentro de uma margem de inexatidão de até 10%. Como as amostras eram coletadas e armazenadas a -20°C por no máximo 15 dias, optou-se em verificar a estabilidade por 15 dias e no máximo 30 dias. Tanto a nicotina como a cotinina mantiveram-se estáveis por até 30 dias em *freezer*.

Devido à meia vida muito curta da nicotina, alguns fumantes passivos apresentaram somente cotinina em sua urina.

A presença de nicotina em alguns alimentos como batatas, tomates, beringelas e chás, também podem resultar na presença de cotinina na urina. HAUFROID *et al*, 1998 estipulou então uma média de consumo diário destes alimentos, calculando o valor de cotinina urinária entre 0,6 e 6,2 ng/mL. Através desta informação, acredita-se válido estabelecer como limite de quantificação o valor de 10 ng/mL de urina.

Vários estudos demonstram que os níveis de cotinina urinária em não fumantes podem ser inferiores a 100 ng/mL de urina (HAUFROID e LISON, 1998). Levando-se em consideração a fidedignidade dos questionários, neste trabalho encontrou-se um valor máximo de 272 ng/mL.

No presente trabalho chegaram ao laboratório da FCF/USP 82 amostras de urina de crianças em idades que variavam entre 0 a 5 anos, porém foram excluídas 12 amostras, cujo volume era insuficiente para análise. É interessante mencionar que, uma vez que o volume dessas amostras eram inferiores aos 5mL validados no presente método, tentou-se realizar a determinação da nicotina e cotinina com um volume menor, porém os resultados foram negativos.

Assim, permanece a dúvida de que seriam mesmo negativos ou se o volume utilizado foi inadequado, não permitindo a quantificação de nicotina e cotinina.

Das 70 amostras restantes 7 foram excluídas por falta de informação ao preencherem o questionário (Anexo 1). Além dessas, foram excluídas 8 por apresentarem gravidade específica inferior ao valor normal (1.010 - 1.030).

Das 55 crianças participantes do estudo, 21 foram enquadradas no grupo controle. O critério de inclusão destas crianças neste grupo, foi pela avaliação do questionário (Anexo 1), onde, se este apresentasse dados negativos para contato com fumantes, realizar-se-ia a análise da amostra. Para inclusão neste grupo, o resultado da análise também teria que ser negativo para nicotina e cotinina.

Das 34 crianças restantes, 18 eram filhas de pais fumantes, onde 50% dos pais e 83% das mães eram fumantes, e/ou conviviam com algum fumante em sua residência, porém os resultados da análise de nicotina e cotinina em urina se mostraram inferiores ao limite de detecção.

Entre as 16 crianças que apresentaram resultados positivos para cotinina 10 sofriam de doenças respiratórias. Uma avaliação precisa das condições de saúde dessas crianças será motivo de Tese de Doutorado do Dr. João Paulo B. Lotufo.

O método validado no presente trabalho mostrou-se apropriado para a verificação da presença de nicotina e cotinina em amostras de urina de fumantes passivos, apresentando as vantagens de fácil execução, curto tempo de análise e baixo custo.

7 Conclusões

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- O método analítico validado para a determinação de nicotina e cotinina em urina de crianças fumantes passivas utilizando Cromatografia Gasosa com detector de Nitrogênio e Fósforo apresentou linearidade, limite de detecção, exatidão, precisão e recuperação adequados à quantificação em urina, com um limite de quantificação à partir de 10 ng/mL;
- As amostras de urina apresentaram uma boa estabilidade, podendo ser conservada a -20°C por 4 semanas sem perdas significativas do analito;
- A avaliação das amostras de urina indicou que 23% das crianças que estavam em contato com pais ou parentes fumantes, apresentaram cotinina nesta matriz.

8 Referências bibliográficas

8 Referências bibliográficas¹

ABEL, E.L. Pharmacology of tobacco. In: _____. *Marihuana, tobacco, alcohol, and reproduction*. Boca Raton: CRC Oress, 1983. p. 55-59.

BARANOWSKI, J.; POCHOPIEN. G.; BARANOWSKA. I. Determination of nicotine, cotinine and caffeine in meconium using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B*, Amsterdam, v.707, n.1/2, p.317-321, 1998.

BEK, K.; TOMAÇ, N.; DELIBAS, A.; TUNA, F.; TEZIÇ, H.T.; SUNGUR, M. The effect of passive smoking on pulmonary function during childhood. *J. Postgrad. Med.*, Bombay, v.75, p.339-341, 1999.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Inspeção. Centros de Bioequivalência. Legislação. Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res\[655-2-0\].html](http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res[655-2-0].html). Acesso em: 23 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de câncer. Disponível em: <http://www.inca.org.br/atualidades/ano9/estimativas.html>. Acesso: 20 março - 74 -2003.

¹ De acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 2002.

- BORGERDING, M.F.; BODNAR, J.A.; CHUNG, H.L.; MANGAN, P.P.; MORRISON, C.C.; RISNER, C.H.; ROGERS, J.C.; SIMMONS, D.F.; UHRIG, M.S.; WENDELBOE, F.N.; WINGATE, D.E.; WINKLER, L.S. Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 1. Chemical composition of mainstream smoke. *Food Chem. Toxicol., Amsterdam*, v.36, p.169-182, 1997.
- CEPPA, F.; JAHIRI, Y. E.; MAYAUDON, H.; DUPUY, O.; BURNAT, P. High-performance liquid chromatographic determination of cotinine in urine in isocratic mode. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.746, p.115-122, 2000.
- CHARLTON, A. Children and smoking: the family circle. *Br. Med. Bull., Oxford*, v.52, p.90-107, 1996.
- CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADOR, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.
- CONKLIN, B.S.; SUROWIEC, S.M.; REM, Z.; SHENG LI, J.M.; ZHONG, D.S.; LUMSDEN, A.B.; CHEN, C. Effects of nicotine and cotinine on porcine arterial endothelial cell function. *J. Surg. Res.*, Orlando, v.95, p.23-31, 2001.
- COPE, G.; NAYYAR, P.; HOLDER, R.; GIBBONS, J.; BUNCE, R. A simple near-patient test for nicotine and its metabolites in urine to assess smoking habit. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v.256, p.135-149, 1996.

- CURTIN, F.; MORABIA, A.; BERNSTEIN, M. S. Relation of environmental tobacco smoke to diet and health habits: variations according to the site of exposure. *J. Clin. Epidemiol.*, Oxford, v.52, p.1055-1062, 1999.
- DAVIS, R.A.; STILES, M.F.; DEBETHIZY, J.D.; REYNOLDS, J.H. Dietary nicotine: a source of urinary cotinine. *Food Chem. Toxicol.*, Amsterdam, v.29, p.821-827, 1991.
- DIAZ, L.M.; DINSMOOR, M.J.; LIN, P.Y. Preventable risk factors for the delivery of very low birth weight infants in Richmond, Virginia. *Prim Care Update Ob Gyns*, New York, v. 8. p. 1-4, 2001.
- DIBENEDETTO, G. Passive smoking in childhood. *J. Roy Soc Health*, London, v.115, n.1, p.13-16, 1995.
- DOMINO, E.F. Tobacco smoking and nicotine neuropsychopharmacology: some future research directions. *Neuropsychopharmacology*, New York, v.18, p.456-468, 1998.
- EISSENBERG, T.; BALSTER, R.L. Initial tobacco use episodes in children and adolescents: current knowledge, future directions. *Drug Alcohol Depend.*, Amsterdam, v.59, p.S41-S60, 2000.
- ENVIRONMENT HEALTH CRITERIA. Disponível em:
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc211.htm>. Acesso: 12 jan. 2004.
- FEYERABEND, C.; RUSSEL, M.A.H. A rapid gas-liquid chromatographic method for the determination of cotinine and nicotine in biological fluids. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.42, p.450-452. 1990.

- FEYERABEND, C.; BRYANT A.E.; JARVIS, M.J.; RUSSELL, A.H. Determination of cotinine em biological fluids of non-smokers by packed column gas-liquid chromatography. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.38, p.917-919, 1986.
- FRIED, P.A.; PERKINS, S.L.; WATKINSON, B.; McCARTNEY, J.S. Association between creatinine-adjusted and unadjusted urine cotinina values in children and the mother's report of exposure to environmental tobacco smoke. *Clin. Biochem.*, New York, v.28, p.415-420, 1995.
- GALVÃO, J.P.; MOREAU, R.L.M. Tabaco In: OGA, S.; CHASIN, A.A.M.; MACHADO-SANTELLI, G.M. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. p.309-316.
- GERGEN, P.J. Environmental tobacco smoke as a risk factor for respiratory disease in children. *Respir. Physiol.*, Amsterdam, v.128, p.39-46, 2001.
- GRIMMER, G.; DETTBARN, G.; SEIDEL, A.; JACOB J. Detection of carcinogenic aronatic amines in urine of non-smoker. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.247, p.81-90, 2000.
- HADDOW, J.E.; KNIGHT, G.J.; PALOMAKI, G.E.; NEVEUX, L.M.; CHILMONCZYK, B.A. Replacing creatinine measure with specific gravity values to adjust urine cotinine concentrations. *Clin. Chem.*, Washington, v.40, n.4, p.562-564, 1994.
- HARIHARAN, M.; VANNOORD, T. Liquid-chromatographic determination of nicotine and cotinine in urine from passive smokers: comparison with gas chromatography with a nitrogen- specific detector. *Clin. Chem.*, Washington, v.37, n.7, p.1276-1280, 1991.

- HAUFROID, V.; LISON D. Urinary cotinine as a tobacco-smoke exposure index: a minireview. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.71, p.162-168, 1998.
- HEINRICH-RAMM. R.; WEGNER, R.; GARDE, A.H.; BAUR, X. Cotinine excretion (tobacco smoke biomarker) of smokers and nonsmokers: comparison of GC/MS and RIA results. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, Jena, v.205, n.6, p.493-499. 2002.
- HENSCHEN, M.; FRISCHER, T.; PRACHT, T.; SPIEKERKÖTTER, E.; KARMAUS, W.; MEINERT, R.; LEHNERT, W.; WEHRLE, E.; KUERHR, J. The internal dose of passive smoking at home depends on the size of the dwelling. *Environ. Res.*, Orlando, v.72, p.65-71, 1997.
- IPCS INCHEM. Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations. Disponível em: <http://www.inchem.org>. Acesso em: 12 jan. 2004.
- JAUNIAUX, E.; GULBIS, B.; ACHARYA, G.; THIRY, P.; RODRICK, C. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, New York, v.93, n.1, p. 25-29, January 1999.
- JACOB III, P.; WILSON, M.; BENOWITZ N.L. Improved gas chromatographic method for the determination of nicotine and cotinine in biologic fluids. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.222, p.61-70, 1981.
- KIM, K.R.; KIM, J.H.; JEONG, D.H.; PAEK, D.J.; LIEBICH, H.M. Gas chromatographic profiling analysis of urinary organic acids from nonsmokers and smokers. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.701, p.1-8, 1997.

- KOGAN, M.J.; VEREBEY, K.; JAFFEE, J.H.; MULÉ, S.J. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in human plasma by nitrogen detection gas-liquid chromatography. *J. Forensic Sci.*, West Conshohocken, v.26, p.6-11, 1981.
- KÖHLER, E.; SOLLICH, V.; SCHUSTER, R.; THAL, W. Passive smoke exposure in infants and children with respiratory tract diseases. *Hum. Exp. Toxicol.*, Letchworth, v. 18, p. 212-217, 1999.
- KOLONEN, S.A.; PUHAKAINEN, E.V.J. Assessment of the automated colorimetric and the high-performance liquid chromatographic methods for nicotine intake by urine samples of smoker's smoking low- and medium-yield cigarettes. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v.196, p.159-166, 1991.
- LOURENÇO, M.G.; MATOS, A.; OLIVEIRA, M.C. Gas-liquid chromatographic determination of major tobacco alkaloids. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.898, p.235-243, 2000.
- MACKAY, J.; CROFTON, J. Tobacco and the developing world. *Br. Med. Bull.*, Oxford, v.52, n.1, p. 206-221, 1996.
- NAKAJIMA, M.; YMAMOTO, T.; KUROIWA, Y.; YOKOI, T. Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.742, p.211-215, 2000.
- NILSON, R. The reliability of the data used for risk assessment. *Risk Anal.*, Malden, v.21, n.4, p.737-760, 2001.

- O'BRIEN, C.P. Drug addiction and drug abuse. In: HARDMAN, J.G.; LIMBERD, L.E.; GILMAN, A.G., eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10.ed, New York: McGraw-Hill, 2001. p.630-631.
- ODDOSE, C.; DUBUS, J.C.; BADIER, M.; THIRION, X.; PAULI, A.M.; PASTOR, J.; BRUGUEROLLE, B. Urinary cotinine and exposure to parental smoking in a population of children with asthma. *Clin. Chem.*, Washington, v.45, p.505-509, 1999.
- ODDOSE, C.; PAULI, A.M.; PASTOR J. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of nicotine in nonsmoker human and rat urines. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.708, p.95-101, 1998.
- PHILLIPS K.; BENTLEY M.C. Seasonal assesment of environmental tobacco smoke and respirable suspended particle exposures for nonsmokers in bremen using personal monitoring. *Environ. Int.*, New York, v.27, p. 69-85, 2001.
- PICHINI, S.; ALTIERI, I.; PELLEGRINI, M.; PACIFICI, R.; ZUCCARO, M. The analysis of nicotine in infants' hair for measuring exposure to environmental tobacco smoke. *Forensic. Sci. Int.*, Amsterdam, v.84, p.253-258, 1997.
- REAL HOSPITAL PORTUGUÊS DE BENEFICIÊNCIA E PERNANBUCO. Disponível em: <http://www.rhp.com.br/tabaco/html> Acesso em: 20 mar. 2003.
- ROGERS, J.M.; KAVLOCK R.J. Developmental toxicology In: KLAASSEN, C.D., eds. *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 6. ed. New York: McGraw-Hill International, 2001. p.355.

- ROSEMBERG, J. Informações básicas sobre tabagismo. *Secretaria do Estado da Saúde*, São Paulo, 1996. p.9-23.
- ROSEMBERG, J. *Tabagismo*: sério problema de saúde pública. São Paulo: Almed, 1981. p.13-302.
- ROUTH, H.B.; BHOWMIK, K.R.; PARISH, J.L.; PARISH, L.C. Historical aspects of tobacco use and smoking. *Clin Dermatol.*, Philadelphia, v.16, p. 539-544, 1998.
- SAKARI, A.K.; PUHAKAINEN, E.V.J. Assessment of the automated colorimetric and the high-performance liquid chromatographic methods for nicotine intake by urine samples of smokers'smoking low - and medium - yield cigarettes. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v.196, p.159-166, 1991.
- SALAZAR, G.R.; GARCÍA, C.GH.; BERLANGA, R.Z.; AHUMADA, M.; SÉRON-FERRÉ, M.; VIODEL R, F. Efecto del tabaquismo materno em el crecimiento de sus hijos. *Rev. Med. Chile*, Santiago v.126, p.1059-1064, 1998.
- SALOMON, M. Nicotine. In: GOLDFRANK, R.L.; FLOMENBAUM, N.E.; LEWIN. N.A.; WEISMAN, R.S.; HOWLAND, M.A.; HOFFMAN, R.S., eds. *Goldfrank's toxicologic emergencies*. 5. ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1994. p. 997-1007.
- SCHARTSMAN, C. Exposição ao tabagismo domiciliar em lactentes com síndrome de sibilancia, utilizando nível urinário de cotinina como indicador biológico. São Paulo, 1996, 117p. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina , da Universidade de São Paulo.

SECKER-WALKER, R.H.; VACEK, P.M.; FLYNN, B.S.; MEAD, P.B. Smoking in pregnancy, exhaled carbon monoxide, and birth weight. *Obstet. Gynecol.*, New York, v.89, n.5, p.648-652, 1997.

SHAHAM, J.; RIBAK, J.; GREEN, M. The consequences of passive smoking: an overview. *Public Health Rev.*, Tel Aviv, v.93, p.15-28, 1992.

SKURNIK, Y.; SHOENFELD, Y. Health effects of cigarette smoking. *Clin. Dermatol.*, Philadelphia, v.16, p.545-556, 1998.

TAYLOR, P. Agents acting at the neuromuscular junction and autonomic ganglia. In: HARDMAN, J.G.; LIMBERD, L.E.; GILMAN, A.G., eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.208-210.

THOMPSON, S.G.; STONE, R.; NANCHAHAL, K.; WALD, N.J. Relation of urinary cotinina concentrations to cigarette smoking and to exposure to other people's smoke. *Thorax*, London, v.45, p.356-361, 1990.

TYRPIEN, K.; WIELKOSZYNSKI, T.; JANOSZKA, B.; DOBOSZ, C.; BODZEK, D.; STEPLEWSKI, Z. Application of liquid separation techniques to the determination of the main urinary nicotine metabolites. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.870, p.29-38, 2000.

UNIVERSITY OF OXFORD. Disponível em:
<http://www.ptcl.chem.ox.ac.uk/MSDS/NI/nicotine.html>. Acesso: 12 jan. 2004.

VEREBEY, K.G.; DePACE, A.; MULÉ, S.J.; KANZLER, M.; JAFFE, J.H. A rapid, quantitative GLC method for the simultaneous determination of nicotine and cotinine. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.6, p.294-296, 1982.

- VISUET, A.R.M.; MAQUEDA, E.L.V.; ORTIZ, L.A.T.; ROSSIER, L.A.M. Nicotina en vegetales diferentes del tabaco. *Rev. Inst. Nac. Enferm. Resp.*, Mexico, v.9, n.1, p.67-69, 1996.
- VISUET, A.R.M.; MAQUEDA, E.L.V.; ORTIZ, L.A.T.; ROSSIER, L.A.M. Cotinina urinária como indicador de la cesación del hábito tabáquico. *Rev. Inst. Nac. Enferm. Resp.*, Mexico, v.11, n.2, p.96-101, 1998
- VONCKEN, P.; SCHEPERS, G.; SCHÄFER K.H. Capillary gas chromatographic determination de trans-3'-hydroxycotinne simultaneously with nicotine and cotinine in urine and blood samples. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.479, p.410-418, 1989.
- VON MUTIUS, E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, Saint Louis, v. 109, n. 6, p. S526-S532, 2002.
- WAKEFIELD, M.; BANHAM, D.; McCAUL, K.; MARTIN, J.; RUFFIN, R.; BADCOCK, N.; ROBERTS, L. Effect of feedback regarding urinary cotinine and brief tailored advice on home smoking restrictions among low-income parents of children with asthma: a controlled trial. *Prev. Med.*, Orlando, v.34, p.58-65, 2002.
- WALD, N.J.; HACKSHAW, A.K. Cigarette smoking: an epidemiological overview. *Br. Med. Bull.*, Oxford, v.52, p.3-11, 1996.
- WELLS, A.J. Heart disease from passive smoking in the workplace. *JACC*, v.31, n.1, p.1-9, 1998.

- WILLERS, S.; AXMON, A.; FEYERABEND, C.; NIELSEN, J.; SKARPING, G.; SKERFVING, S. Assessment of environmental tobacco smoke exposure in children with asthmatic symptoms by questionnaire and cotinine concentrations in plasma, saliva, and urine. *J. Clin. Epidemiol.*, Oxford, v.53. p.715-721, 2000.
- ZEVIN, S.; JACOB, III P.; GEPPETTI, P.; BENOWITZ, N.L. Clinical pharmacology of oral cotinine. *Drug Alcohol Depend.*, Amsterdam, v. 60, p.13-18, 2000.
- 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, p.3-18, 2000.

9 Anexos

ANEXO I

QUESTIONÁRIO SUBMETIDO AOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Questionário sobre hábitos tabagistas

GRUPO COM DOENÇA RESPIRATÓRIA () SEM DOENÇA RESPIRATÓRIA ()

Nome:

Idade:

() 0-2 () 3-5

Sexo:

() Masculino () Feminino

Nível escolar da mãe:

() 1º a 4º série
() 5º a 8º série
() 1º ao 3º colegial
() Superior incompleto
() Superior completo

Mãe fumante:

() Sim () Não

Total de cigarros fumados por dia pela mãe:

() 1 - 10
() 11 - 20
() 21 - 39
() Acima de 40

Anos de tabagismo da mãe:

() 1 - 3 anos
() 3 - 6 anos
() 6 - 9 anos
() 9 - 12 anos
() 12 - 15 anos
() Acima de 15 anos

Tempo permanecido pela mãe em casa:

() Só de noite
() Meio período + noite
() Período integral + noite
() Sem contato com a mãe

Nível escolar do pai:

() 1º a 4º série
() 5º a 8º série
() 1º ao 3º colegial
() Superior incompleto
() Superior completo

Pai fumante:

() Sim () Não

Total de cigarros fumados por dia pelo pai:

() 1 - 10
() 11 - 20
() 21 - 39
() Acima de 40

Anos de tabagismo do pai:

() 1 - 3 anos () 3 - 6 anos
() 6 - 9 anos () 9 - 12 anos
() 12 - 15 anos
() Acima de 15 anos

Tempo permanecido pelo pai em casa:

() Só de noite
() Meio período + noite
() Período integral + noite
() Sem contato com a mãe

Outros fumantes em casa:

() Avô () Avó () irmão
() empregada () outros

Total de cigarros fumados por outras pessoas em casa:

() 1 - 10
() 11 - 20
() 21 - 39
() Acima de 40

Anos de tabagismo de outras pessoas na casa:

() 1 - 3 anos
() 3 - 6 anos
() 6 - 9 anos
() 9 - 12 anos
() 12 - 15 anos
() Acima de 15 anos

Tempo permanecido de outros tabagistas na casa:

() até 2 horas
() até 6 horas
() até 8 horas
() O dia todo.

Tempo permanecido pela criança em casa:

() Só de noite
() Meio período + noite
() Período integral + noite
() Sem contato com a mãe

ANEXO II

INFORMAÇÕES RELATIVAS AO SUJEITO DA PESQUISA

1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

Para o objetivo da pesquisa iremos usar como população de estudo voluntários de ambos os sexos entre 0 e 5 anos, pacientes com problemas pulmonares ou outras patologias que sejam fumantes passivos do Hospital Universitário.

2. DESCRIÇÃO DE MÉTODOS QUE AFETEM OS SUJEITOS DA PESQUISA

Será realizada coleta de urina de cada voluntário; após estes responderem questionário elaborado e assinarem o termo de consentimento pós informação; para posterior extração e análise segundo o método validado. Não será realizado, em hipótese alguma, nenhum procedimento invasivo de coleta ou administração de qualquer fármaco aos voluntários.

3. FONTES DE MATERIAL E COLETA

As amostras de urina serão coletadas de pacientes fumantes passivos em tratamento no Hospital Universitário.

4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A população que elegemos para desenvolvimento do projeto apresentam as seguintes características:

Grupo 1

- Sexo: ambos
- Idade: entre 0 e 5 anos
- Pacientes que são fumantes passivos e apresentem patologias pulmonares

Grupo 2

- Sexo: ambos

- Idade: entre 0 e 15 anos
- Pacientes que são fumantes passivos sem patologias pulmonares

5. DESCRIÇÃO DE RISCOS COM AVALIAÇÃO DE GRAVIDADE

A coleta não apresenta riscos ou desconforto aos sujeitos da pesquisa, uma vez que o procedimento não será invasivo e realizado pelo próprio voluntário.

Não serão administrado fármacos ou qualquer outra substância aos sujeitos da pesquisa, serão apenas analisados as substâncias de interesse (nicotina e cotinina) presentes na urina dos voluntários descritos nas características da população e nos critérios de inclusão.

ANEXO III
TERMO DE CONCENTIMENTO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:

.....
Documento de Identidade Nº : Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone:

2. Responsável Legal:

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):

Documento de Identidade Nº: Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade: CEP: Tel:

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: *Avaliação dos teores de nicotina e cotinina, por cromatografia em fase gasosa, em urina de crianças fumantes passivas.*

2. Pesquisador: *Cláudia Isabel Guastini Delfim*

Cargo/Função: Inscrição Conselho Regional Nº: CRF: 12.239

Departamento da FCF/USP: Toxicologia e Análises Toxicológicas

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco (X) Risco Mínimo () Risco Médio ()
Risco Baixo () Risco Maior ()

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.)

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. Desconfortos e riscos esperados; 4. Benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Da indenização por parte do Patrocinador por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)