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

Avaliação da exposição fetal à nicotina através da análise
toxicológica em mecônio

Simone Gomes Sant'Anna

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2010

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

Avaliação da exposição fetal à nicotina através da análise
toxicológica em mecônio

Simone Gomes Sant'Anna

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

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

Sant'Anna, Simone Gomes

S233a Avaliação da exposição fetal à nicotina através da análise
toxicológica em mecônio / Simone Gomes Sant'Anna. – São Paulo, 2010.
80p.

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

Orientador: Yonamine, Mauricio

1. Análises toxicológica 2. Tabaco: Toxicologia I. T. II. Yonamine,
Mauricio, orientador.

615.9 CDD

Simone Gomes Sant'Anna

Avaliação da exposição fetal à nicotina através da análise
toxicológica em mecônio

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, Ivo e Landi, pelo amor e incentivo.
Ao meu orientador e professor, Mauricio, pelos
ensinamentos e paciência ao longo desses anos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Aquele que sempre me protege, orienta e sustenta.

Aos meus pais e as minhas queridas irmãs, pela presença constante e amor sincero.

Aos meus sobrinhos pela alegria que trazem a minha vida.

A Maísa, Quininha, Malu, Cinha, Dinha e Milton, pelo apoio, incentivo durante todo este período.

Ao professor e orientador Mauricio Yonamine, pelos ensinamentos, oportunidade e confiança para realização deste trabalho, por ser um exemplo de conduta profissional e também pela sua amizade.

À equipe do setor de Neonatologia do Hospital Universitário, em especial à Profa. Dra. Edna Maria Albuquerque Diniz, pela colaboração na coleta de amostras e pelas sugestões proporcionadas.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Dr. Ernani Pinto e Dra. Regina Lucia Moraes Moreau, e ao perito criminal Dr. José Luiz da Costa pelas sugestões e incentivo.

À Beatriz Bismara e a Daniela Mendes, pela amizade e os ensinamentos proporcionados no laboratório.

Aos meus amigos pós-graduandos, Marli, Raphael, Camila, Lívia, Ana Paula, Lorena, André, Larissa, Amanda e Karen pela convivência e amizade no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório análises toxicológicas, Beatriz, Ângelo, Felipe e aos estagiários, Luana, Daniela, Deise, Suelen, Paula pela colaboração e pelo convívio. Aos funcionários da Toxicologia, Roseli, Helena, Luzia e Dalva pela colaboração.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

A todos vocês, obrigada!

SUMÁRIO

Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	02
1.1 Revisão da literatura.....	06
1.1.1 Exposição fetal ao tabaco.....	06
1.1.2 Métodos de diagnóstico para verificação da exposição fetal.....	09
1.1.2.1 Questionários.....	09
1.1.2.2 Análises toxicológicas.....	11
1.1.2.2.1 Amostras biológicas utilizadas para verificar exposição fetal.....	11
1.1.2.2.2 Indicadores biológicos.....	12
1.1.2.2.3 Métodos utilizados para detecção de cotinina e nicotina em meconio.....	16
1.1.2.2.4 Extração acelerada por solvente.....	18
2. Objetivo.....	22
3. Material e métodos.....	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Equipamento e acessórios.....	24
3.1.2 Soluções-padrão.....	24
3.1.3 Reagentes e outros materiais.....	25
3.1.4 Amostras.....	25
3.2 Métodos.....	26
3.2.1 Aplicação do questionário materno.....	26
3.2.2 Desenvolvimento do método de extração acelerada por solvente....	27
3.2.2.1 Preparação da amostra.....	27
3.2.2.2 Preparação das soluções padrão.....	29
3.2.3 Condições cromatográficas do GC-NPD.....	29
3.2.4 Otimização do método.....	29
3.2.4.1 Otimização das condições de extração de nicotina e cotinina por ASE	30
3.2.4.1.1 Avaliação da temperatura.....	30
3.2.4.1.2 Número de ciclos.....	30
3.2.4.1.3 Avaliação do solvente.....	30
3.2.5 Validação do método.....	31

3.2.5.1 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	31
3.2.5.2 Precisão intra-ensaio e interensaio.....	31
3.2.5.3 Recuperação absoluta.....	32
3.2.5.4 Linearidade.....	32
4. Resultados.....	35
4.1 Cromatograma obtido nas condições padronizadas.....	35
4.2 Resultados da otimização das condições de extração de cotinina e nicotina em mecônio.....	37
4. 2.1 Avaliação da temperatura.....	37
4. 2.2 Avaliação do número de ciclos.....	38
4. 2.3 Avaliação do solvente.....	39
4.3 Resultados da validação do método.....	39
4.3.1 Limites de detecção e quantificação.....	39
4.3.2 Precisão intra e interensaio.....	40
4.3.3 Recuperação absoluta.....	41
4.3.4 Linearidade.....	41
4.4 Resultados da análise toxicológica em amostras de mecônio.....	42
5. Discussão.....	49
6. Conclusão.....	61
7. Referências.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação entre os levantamentos de 2001 e 2005, realizados pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), segundo o uso na vida de tabaco e dependência, distribuídos conforme o sexo e a faixa etária dos entrevistados das 108 cidades com mais de 200 mil habitantes do Brasil.....	04
Figura 2. Principais vias de biotransformação da nicotina no organismo humano.....	13
Figura 3. Sistema de extração acelerada por solvente (ASE).....	20
Figura 4. Sistema de extração em fase sólida (SPE).....	28
Figura 5. Cromatograma da nicotina 10µg/mL.....	35
Figura 6. Cromatograma do padrão interno prolintano 10µg/mL.....	36
Figura 7. Cromatograma da cotinina 10µg/mL.....	36
Figura 8. Cromatograma após extração e análise em GC-NPD de cotinina e nicotina.....	37
Figura 9. Avaliação da temperatura na eficiência de extração com hexano:acetona.....	38
Figura 10. Avaliação da temperatura na eficiência de extração com tampão fosfato 0,1M.....	38
Figura 11. Avaliação do número de ciclos estático na eficiência de extração de cotinina e nicotina.....	39
Figura 12. Cromatograma após extração e análise em GC-NPD da amostra 68.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais métodos analíticos propostos para determinação de cotinina e nicotina em mecônio.....	17
Tabela 2. Estrutura química dos padrões de referência (cotinina e nicotina) e padrão interno (prolintano).....	25
Tabela 3. Valores de limite de detecção e limite de quantificação de cotinina e nicotina com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio.....	40
Tabela 4. Valores de precisão intra-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.....	40
Tabela 5. Valores de precisão interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.....	41
Tabela 6. Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em mecônio.....	41
Tabela 7. Resultado das concentrações (ng/g) obtidas através das análises toxicológicas para determinação de cotinina e nicotina em mecônio de recém-nascidos provenientes do Hospital Universitário-USP.....	43
Tabela 8. Resultado da comparação entre o uso do tabaco durante a gravidez auto-reportados e cotinina detectada em mecônio de 84 recém-nascidos provenientes do Hospital Universitário-USP.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

GC-NPD	Gas chromatograph coupled with nitrogen-phosphorous detector / Cromatógrafo gasoso com detector de nitrogênio e fósforo
LPME	Liquid phase microextraction / Microextração em fase líquida
ASE	Extração acelerada por solvente
LLE	Extração líquido-líquido
SPE	Extração em fase sólida
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
PI	Padrão interno
CV	Coeficiente de variação

ANEXOS

ANEXO I - Comissão de Ética em pesquisa da FCF/USP.....	75
ANEXO II - Comissão de Ética de pesquisa do HU/USP.....	76
ANEXO III – Questionário “TWEAK”	77

SANT'ANNA, S. G.; **Avaliação da exposição fetal à nicotina através da análise toxicológica em mecônio** 2010. 80 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2010.

RESUMO

O tabaco é uma das principais drogas consumidas mundialmente e seu uso por mulheres em idade reprodutiva, em particular, têm representado uma grande preocupação por parte de especialistas e da sociedade em geral. Apesar dos efeitos adversos associados ao ato de fumar durante a gestação serem bastante documentados e conhecidos, sabe-se que uma parcela de mulheres grávidas tem dificuldades em abandonar o hábito. A exposição fetal aos constituintes do tabaco tem sido associada com aumento do risco de aborto espontâneo e nascimentos prematuros, incidência de recém-nascidos com baixo peso, síndrome de morte súbita infantil e distúrbios cognitivos e neurocomportamentais. Entretanto, devido ao sentimento de culpa e medo de ações punitivas, mulheres raramente admitem terem utilizado tabaco durante a gestação. Como resultado, uma série de marcadores biológicos tem sido estudada para se diagnosticar a exposição fetal aos constituintes do tabaco. Dentre os marcadores utilizados estão a nicotina e o seu principal produto de biotransformação, a cotinina, que podem ser detectados em amostras de mecônio de recém-nascidos. No presente estudo, um método analítico foi desenvolvido visando à detecção desses marcadores em amostras de mecônio. Foi considerada neste projeto a técnica de extração acelerada por solvente (ASE) por ser uma técnica promissora para o preparo de amostras sólidas e/ou semi-sólidas. Os analitos foram identificados por cromatografia em fase-gasosa com detector de nitrogênio e fósforo (GC/NPD). Os limites de detecção foram de 3 ng/g e 30 ng/g e os de quantificação foram de 5 ng/g e 40 ng/g, para cotinina e nicotina respectivamente, e apresentaram boa linearidade na faixa de concentração estudada (5-500 ng/g), com coeficiente de correlação (r^2) maior que 0,98. A precisão intra-ensaio, determinada pelo coeficiente de variação do método (CV%) foi menor que 15% e a precisão interensaio foram menor ou igual a 20% para nicotina e cotinina. A recuperação média foi de 77%. O método desenvolvido demonstrou ser rápido, preciso, prático e sensível e com uso de menores volumes de solventes orgânicos do que outros métodos descritos na literatura. O método desenvolvido e validado foi aplicado em amostras de mecônio de neonatos com suspeita ou não de exposição fetal aos constituintes do tabaco.

Palavras-chave. Mecônio. Exposição fetal. Extração acelerada por solvente (ASE). Nicotina. Cotinina.

SANT'ANNA, S. G.; **Evaluation of fetal exposure to nicotine through the toxicological analysis in meconium** 2010. 80 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2010.

ABSTRACT

Tobacco is one of the main drugs consumed worldwide and its use by women of reproductive age in particular has played a major concern among experts and society in general. Despite the adverse effects associated with smoking during pregnancy are well documented, it is known that a significant proportion of pregnant women have difficulties to quit the habit. Fetal exposure to tobacco constituents has been associated with increased risk of spontaneous abortion (miscarriage) and premature births, incidence of newborns with low birth weight, sudden infant death syndrome and neurobehavioral and cognitive disorders. However, due to guilt and fear of punitive actions, women rarely admit to have used tobacco during pregnancy. As a result, a series of biological markers have been studied to diagnose fetal exposure to tobacco constituents. Nicotine and cotinine are some of these biomarkers which can be detected in meconium samples from newborns. In this study, an analytical method was developed to detect these biomarkers in meconium samples. Accelerated solvent extraction (ASE), a promising technique for solid or semi-solid sample preparation, was considered in this work the that is considered a. The analytes were identified by gas-chromatography with nitrogen phosphorus detector (GC / NPD). The limits of detection (LOD) were 3 ng/g and 30 ng/g and the limits of quantification (LOQ) were 5 ng/g and 40 ng/g for cotinine and nicotine, respectively. The method showed good linearity in the concentration range studied (5-500 ng/g), with a coefficient of correlation (r^2) greater than 0.98. The intraday precision, determined by the coefficient of variation (CV %) was less than 15% and the interday precision was less or equal than 20% for nicotine and cotinine. The average recovery was 77%. The method proved to be fast, accurate, practical and sensitive and smaller volumes of organic solvents are necessary, compared to other methods published in the scientific literature. The developed and validated method was applied to meconium samples of suspected and non-suspected neonates of having been exposed to tobacco constituents during gestation.

Keywords: Meconium. Fetal exposure. Accelerated Solvent Extraction (ASE). Nicotine. Cotinine.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, o tabaco é a segunda maior causa de óbitos no mundo, sendo apontado como o responsável pela morte de cerca de seis milhões de pessoas por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Se tais tendências de expansão forem mantidas, as mortes causadas pelo uso de tabaco alcançarão 8,4 milhões/ano em 2020 (BRASIL, 2004). Por se tratar de um produto de comércio lícito, ser amplamente disponível e apresentar baixo custo, o tabaco está entre as drogas psicoativas mais consumidas.

No Brasil, as informações a respeito da magnitude do problema podem ser obtidas apenas através de levantamentos estatísticos, visto que não há dados práticos para esta avaliação. O Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) realizou em 2001, o primeiro levantamento domiciliar do uso de drogas dos brasileiros entre 12 e 65 anos, em 107 municípios com mais de 200 mil habitantes. Segundo o levantamento, das nove drogas mais consumidas no Brasil, o tabaco corresponde a 41,1% do total, percentual inferior somente ao álcool que representa 68,7%. Estes dois índices deixam bem distantes a terceira colocada, a maconha, que já foi usada por 6,9% das pessoas pelo menos uma vez na vida. Segundo o gênero, o levantamento apontou uma prevalência de uso do tabaco de 46,2% para o sexo masculino e 36,3% para o sexo feminino. Nesse mesmo estudo, cerca de 9,0% das pessoas entrevistadas se consideraram dependentes do tabaco (CARLINI *et al.*, 2002).

Entretanto, de acordo com levantamento do Ministério da Saúde, realizado em 2002 e 2003, entre adolescentes e adultos, a prevalência do tabagismo, nas 15 capitais brasileiras e no Distrito Federal variou de 12,9% a 25,2%. Quando analisada separadamente por gênero, os homens apresentaram taxas mais elevadas do que as mulheres em todas as capitais. As causas para a maior prevalência de tabagismo no sexo masculino são históricas e culturais. O tabagismo iniciou-se no mundo como um comportamento predominantemente do sexo masculino. Entre mulheres, o tabagismo era um comportamento pouco comum até a década de 30. O início da expansão do tabagismo no sexo feminino coincide com o início de uma publicidade voltada especificamente para este grupo populacional, em geral envolvendo o uso de modelos atléticos e que associam beleza e liberdade de expressão ao cigarro. Ainda, segundo os dados desta pesquisa, em cidades economicamente mais desenvolvidas das regiões Sul e Sudeste, a incidência de tabagismo entre mulheres já se aproxima da observada entre homens. Este fato pode apontar para uma preocupante tendência de crescimento da exposição ao tabaco no sexo feminino em nosso país (BRASIL, 2004).

Comparando os dados apresentados acima com um levantamento mais recente, realizado no ano de 2005 pelo CEBRID, verifica-se que em todas as faixas etárias a estatística dos anos anteriores se mantém, onde mais homens relatam o uso de tabaco que as mulheres. O mesmo aconteceu com as prevalências sobre dependência, sendo exceção apenas à faixa etária de 18 a 24 anos, em que mais mulheres (9,4%) do que homens (8,8%) preencheram os critérios da *Substance Abuse and Mental Health Service Administration* (SAMHSA) para dependência. Para melhor visualização dos resultados sobre

dependência, os mesmos foram também expressos na Figura 1, onde se observa que houve um ligeiro aumento do percentual de uso do tabaco no ano de 2005 em comparação com 2001 (GALDUROZ *et al.*, 2005).

Figura 1. Comparação entre os levantamentos de 2001 e 2005, realizados pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), segundo o uso na vida de tabaco e dependência, distribuídos conforme o sexo e a faixa etária dos entrevistados das 108 cidades com mais de 200 mil habitantes do Brasil (CARLINI *et al.*, 2002; GALDUROZ *et al.*, 2005).

O tabaco é uma das principais drogas consumidas mundialmente, o seu uso por mulheres em idade reprodutiva passou a ser considerado um assunto importante a ser abordado quando o tema é a saúde pública no mundo, devido ao aumento crescente no número de usuárias e pelas consequências para o desenvolvimento da criança durante a exposição fetal a essas substâncias (CARLINI *et al.*, 2002; GALDUROZ *et al.*, 2005).

O consumo de tabaco por mulheres está associado ao aumento do risco de infertilidade e quando usado durante a gravidez pode provocar uma série de malefícios ao feto. Apesar de desconhecida qual a dose e frequência que pode afetar a criança antes do nascimento, a quantidade de informações sobre os

efeitos nocivos que a exposição fetal aos constituintes do tabaco pode causar é amplamente divulgada. Mesmo assim, nos Estados Unidos, estimativas apontam que cerca de 12% das mulheres continuam a manter o hábito do fumo durante a gravidez (KLEIN *et al.*, 2004).

Desta forma, a identificação precisa de crianças expostas *in utero* ao tabaco seria extremamente necessária para uma melhor avaliação da natureza e magnitude dos efeitos. O acompanhamento clínico realizado nas crianças expostas, através de intervenções médicas e psico-sociais, poderiam ser melhor sucedidos se a rápida identificação da exposição fetal fosse realizada (HUESTIS E CONE, 1998). A aplicação de programas de intervenção social nas mulheres em idade reprodutiva também poderia evitar a recorrência de novas gestações de crianças com o mesmo problema de exposição *in utero* a esta substância. Desta forma, o desenvolvimento de um método eficaz de diagnóstico da exposição fetal seria bastante interessante como ferramenta de base para direcionar o posterior acompanhamento clínico ou o tratamento da dependência química da mãe através de intervenção social.

Nos últimos anos, a análise toxicológica em mecônio de neonatos tem apresentado especial interesse na avaliação da exposição fetal a substâncias psicoativas. A identificação de substâncias específicas como os produtos de biotransformação da nicotina em mecônio têm sido propostos como indicativo da exposição fetal ao tabaco. Entretanto, por se tratar de amostra biológica complexa, poucos métodos foram desenvolvidos visando a detecção desses marcadores em amostras de mecônio. Os métodos analíticos para identificação de produtos de biotransformação do tabaco se valem de extração convencional líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) como técnica de

preparação de amostras de mecônio, aplicadas de modo associado. Avaliando cada técnica de maneira individual, estas apresentam algumas desvantagens como utilização de relativamente grandes volumes de solventes orgânicos, formação de emulsões e a extração em múltiplas etapas. No presente estudo, uma técnica recente de preparação de amostras foi avaliada para o desenvolvimento de um método para determinação dos marcadores da exposição fetal ao tabaco, a extração acelerada por solvente (ASE). Esta técnica consiste em uma inovação tecnológica, visto que extrai amostras sólidas e semi-sólidas, utilizando pressão e temperatura controladas. Um dos benefícios da ASE é a possibilidade de combinar a extração e a filtração automatizadas da amostra em um único processo para aumentar a eficiência. Além do benefício acima mencionado, a técnica ainda permite a extração de matrizes sólidas ou semi-sólidas, com a vantagem do processo também ser rápido, prático e dispender menor consumo de solvente. O equipamento garante aquecimento uniforme e controle de temperatura preciso nas células de extração e isso garante extrações uniformes entre células ou baterias diferentes (GIERGIELEWICZ-MOŻAJSKA *et al.*, 2001; RICHTER *et al.*, 1996). De fato tem sido uma tendência em análises toxicológicas o emprego de técnicas de preparação de amostras que valorizem a simplicidade, praticidade e rapidez, a menor manipulação da amostra e a pouca ou nenhuma necessidade de uso de solventes orgânicos, características da ASE.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Exposição fetal ao tabaco

A mulher que fuma durante a gravidez sofre riscos à saúde e igualmente pode trazer conseqüências nocivas ao feto. O efeito tóxico do ato de fumar para a mãe e para o feto exposto *in utero* é pesquisado e discutido cientificamente, mas ainda não se conhecem todas as substâncias do tabaco que atravessam a placenta e que podem atuar sobre o equilíbrio hormonal da gestante ou como os agentes tóxicos podem prejudicar o desenvolvimento do feto. Das substâncias tóxicas presentes no tabaco, a nicotina tem sido frequentemente associada a alterações no desenvolvimento fetal (MUNAFO *et al.*, 2006; WISBORG *et al.*, 2000). A nicotina é administrada ao organismo com milhares de substâncias tóxicas que existem no tabaco. Neste já foram detectadas cerca de 6.700, das quais 4.720 identificadas quimicamente (CARVALHO, 2000), entre elas o benzopireno, nitrosaminas, benzeno, amônia, metais pesados como chumbo e cádmio, arsênico e formol. O tabagista ao inalar a fumaça, inala juntamente, em média, 2.500 substâncias lesivas ao organismo (BRASIL, 2007).

Durante muitos anos, o termo “barreira placentária” foi associado com o conceito de que uma das funções da placenta seria proteger o feto contra a passagem de substâncias nocivas vindas da mãe. No entanto, muitas substâncias tóxicas passam pela placenta por difusão simples (CASARETT e DOULL’S, 1995; OSTREA *et al.*, 1994).

A nicotina, um alcalóide encontrado nas folhas do tabaco (CURWIN *et al.*, 2005), pode agir nocivamente sobre o feto por vários mecanismos. Por ser

um vasoconstritor, essa substância diminui o fluxo sanguíneo para o feto, reduzindo nutrientes e o aporte de oxigênio. A nicotina também aumenta a contratilidade uterina, possui ação sobre os centros respiratórios do sistema nervoso central e pode causar alterações na histoarquitetura pulmonar (ROSEMBERG *et al.*, 2003).

Em 2004, o Serviço de Saúde Pública Americano (*Surgeon General's Report*) concluiu que fumar durante a gestação é relação causal entre ruptura de membranas, descolamento da placenta, parto prematuro, encurtamento da gestação, restrição de crescimento fetal e baixo peso ao nascer (GRAY *et al.*, 2008).

Gestantes que fumam cigarro podem aumentar em até 60% as concentrações de epinefrina e norepinefrina no plasma sanguíneo e elevação de vasopressina. Essas e outras catecolaminas atravessam a placenta, concentram-se no líquido amniótico e no sangue fetal e podem reduzir o fluxo sanguíneo na placenta, diminuindo em índices de até 22% (ROSEMBERG *et al.*, 2003). O transporte de oxigênio às células da placenta e ao feto também é diminuído pela vasoconstrição e é agravado pela formação de carboxiemoglobina, resultante da combinação do monóxido de carbono produzido pela queima do cigarro e a hemoglobina do sangue. Em um modelo animal, ratas grávidas expostas à fumaça de cigarros em diferentes doses apresentaram aumento considerável da concentração de carboxiemoglobina nos fetos (FARKAS *et al.*, 2006).

A diminuição do fluxo de sangue e oxigênio provoca uma série de lesões nas vilosidades da placenta. Esse efeito associado ao aumento das contrações

musculares do útero eleva o risco do descolamento precoce da placenta e conseqüentemente, o risco de aborto (ROSEMBERG *et al.*, 2003). Alguns autores constataram a associação causal entre exposição fetal aos constituintes do tabaco com a ocorrência da síndrome da morte súbita infantil (MITCHELL e MILERAD, 2006).

Estudos mais recentes observaram aumento do risco de ocorrer má formação congênita cardíaca, redução do perímetro cefálico, infecções pós-natal em prematuros e nascimento prematuro em casos cuja mãe relatou consumo do tabaco durante a gestação (GRAY *et al.*, 2008).

Ainda encontram-se relatos de que a exposição fetal aos constituintes do tabaco pode trazer complicações como infecções do trato respiratório durante o primeiro ano de vida (NUESSLEIN *et al.*, 1999).

1.1.2 Métodos de diagnóstico para verificação da exposição fetal

O diagnóstico da exposição fetal após uso materno de drogas é importante tanto para a intervenção terapêutica para a mãe quanto para oferecer um acompanhamento adequado para o recém-nascido e ajudar no desenvolvimento comportamental e aprendizado da criança (HUESTIS e CONE, 1998 e MOORE *et al.*, 1998).

Assim, a exposição a drogas pode ser diagnosticada através de métodos diretos, os marcadores biológicos, e indiretos, os questionários e os modelos estatísticos.

1.1.2.1 Questionários

Devido ao sentimento de culpa e o medo da punição, a maioria das gestantes não assumem a dependência ao tabaco (CHAN *et al.*, 2004).

Como pode ser visto a partir da aplicação de um questionário no estudo de KÖHLER *et al.* (2007), o relato de tabagismo permaneceu inalterado durante toda a gravidez em 75 das 115 mulheres testadas, ou seja, durante esse período, as mulheres eram fumantes, passivamente expostas ou não expostas ao tabaco. Para as mulheres com hábito de fumar inalterado, uma boa concordância entre os auto-relatórios e medição foi notada. Assim, os auto-relatos de todas as mulheres não-expostas e de todas as fumantes foram plenamente confirmados.

Contudo, a análise dos dados obtidos em outro estudo mostrou que 26,2% das gestantes que se identificam como não-fumantes tiveram resultados positivos, quando se dosaram a concentração de cotinina em saliva, compatíveis com quantidades encontradas em amostras de fumantes ativos (BOYD *et al.*, 1998).

GRAY *et al.* (2008), através da aplicação de questionários de auto-relato nas mães obtiveram que 65,3% das entrevistadas reportaram não fumar durante a gestação e destas, aproximadamente 75,0% não tiveram nicotina detectada na análise do mecônio de seus filhos. Das 34,7% mulheres que admitiram fumar no decorrer da gravidez, somente 17,6% apresentaram resultados negativos para os biomarcadores de exposição ao tabaco. Ainda neste estudo foi constatado que o hábito de fumar diariamente de 1-5 e de 6-10 cigarros foi relatado por 73,7% e 26,3% de fumantes, respectivamente.

Diante disso, conclui-se que a análise toxicológica em diversos espécimes biológicos pode ser um meio mais seguro para verificar a exposição a drogas lícitas e ilícitas.

1.1.2.2 Análises toxicológicas

1.1.2.2.1 Amostras biológicas utilizadas para verificar exposição fetal

Amostras de urina e sangue, amplamente utilizadas em análises toxicológicas de drogas de abuso, não são as amostras mais adequadas para verificar a exposição fetal, uma vez que somente fornecem a informação da exposição recente. Para identificação da exposição fetal, três espécimes biológicos demonstram-se mais aplicáveis neste contexto por fornecerem informações da exposição a longo prazo: unhas, mecônio e cabelo.

As unhas dos dedos das mãos iniciam a sua formação na 10ª semana de gestação (VALENTE-CAMPOS, 2002) e o mecônio começa a ser produzido a partir da 10ª a 12ª semana (HUESTIS e CONE, 1998). Os cabelos começam a crescer durante os últimos três a quatro meses de gestação (TOLEDO, 1999). Desta forma, são matrizes que podem informar a exposição a drogas a partir do momento de sua formação no útero materno.

Entretanto, cabelo e unha do neonato são amostras nem sempre disponíveis em quantidade suficiente para realização das análises toxicológicas. Nesse caso, o mecônio (primeiras fezes do recém nascido) tem sido proposto como uma matriz viável, por ser de fácil obtenção, coleta não-invasiva e com maior possibilidade de obter-se em quantidade suficiente para realização das análises (GARERI *et al.*, 2006).

O mecônio é constituído de aproximadamente 72 a 80% de água, células de descamação do trato gastrointestinal e da pele, lanugo, material gorduroso do vênix caseoso, líquido amniótico, bilirrubina, enzimas e várias secreções digestivas e intestinais (KWONG e RYAN, 1997; WONG, 2000; GAGERI *et al.*, 2006; COLVERO *et al.*, 2006). Nos últimos anos, alguns métodos foram desenvolvidos para detecção dos indicadores biológicos da exposição fetal a drogas lícitas e ilícitas em amostras de mecônio (CHAN *et al.*, 2003; MOORE *et al.*, 2003; PICHINI *et al.*, 2005; GARERI *et al.*, 2006; MARCHEI *et al.*, 2006).

1.1.2.2.2 Indicadores biológicos

A nicotina é metabolizada no fígado por um grupo de enzimas do citocromo P450 e se converte principalmente em cotinina para ser eliminada na urina. Além da cotinina, vários outros produtos de biotransformação são gerados; porém, estudos demonstraram que a cotinina é o metabólito que está em maior concentração no sangue e na urina de fumantes (SHERIF *et al.*, 2004). Na Figura 2 são apresentadas as principais vias de biotransformação da nicotina no organismo humano (TRICKER, 2003).

Figura 2. Principais vias de biotransformação da nicotina no organismo humano (TRICKER, 2003).

Para a verificação da exposição fetal ao tabaco, a determinação da presença de nicotina e/ou cotinina em amostras biológicas pode ser considerada prova específica de fumante regular ou exposição passiva à fumaça do tabaco. Entretanto, vegetais alimentícios da família das solanáceas elaboram nicotina em quantidades mínimas. Traços de nicotina existem na batata, na berinjela, na couve-flor, no pimentão verde, na polpa do tomate e no chá preto. Esses achados referem-se a traços de nanogramas de nicotina e, certamente, não invalidam as pesquisas da nicotina e cotinina como biomarcadores vinculados ao tabaco (ROSEMBERG *et al.*, 2003).

Contudo, relativamente poucos trabalhos descrevem a detecção de produtos de biotransformação da nicotina em mecônio. SHERIF *et al.* (2004), analisando grupos de mães fumantes ativas, expostas passivamente e não

expostas à fumaça do tabaco, verificaram que a cotinina em mecônio poderia ser um marcador biológico adequado para avaliar a exposição no período pré-natal. De fato, a cotinina é o principal produto de biotransformação da nicotina e é considerado um melhor indicador de exposição em longo prazo que o alcalóide inalterado. Além da cotinina, a *trans*-3'-hidroxicotinina foi determinada em mecônio de neonatos de mães expostas ativa e passivamente à fumaça do tabaco (MOORE *et al.*, 1998).

Autores afirmam que as concentrações dos produtos de biotransformação da nicotina no mecônio estão diretamente relacionadas ao grau de tabagismo ativo pela mãe (MOORE *et al.*, 1998). Entretanto, a presença de diferentes concentrações de nicotina e seus produtos de biotransformação em mecônio pode refletir diferenças entre as populações estudadas, hábitos dos fumantes, conteúdo de nicotina do cigarro e variabilidade analítica, incluindo reação cruzada com outros analitos derivados da nicotina (GRAY *et al.*, 2008).

Além disso, o conteúdo de produtos de biotransformação da nicotina no mecônio presume-se fornecer uma história de deglutição fetal e excreção biliar e, portanto, refletindo a exposição à fumaça na segunda metade da gravidez. GRAY *et al.* (2008) descreveram em literatura uma diferenciação entre os recém-nascidos de mães que relataram tabagismo, aos expostos à fumaça ambiental do tabaco e a não-exposição relatado para a análise do mecônio. E outro estudo, conduzido por KÖHLER *et al.* (2007), cujo objetivo era investigar se a análise do mecônio é adequada para discriminar entre os recém-nascidos de fumantes mostrou que o índice dosado em mecônio reflete a história da exposição à fumaça na segunda metade da gravidez.

GRAY *et al.* (2008 e 2008 B) não encontraram amostras positivas para norcotinina e/ou nornicotina sozinhas, mas estas substâncias estão presentes nas amostras com altas concentrações de nicotina, cotinina e OH-cotinina. Também relatam que OH-cotinina é altamente polar podendo não ser suficientemente recuperada em mecônio com o procedimento de extração em fase sólida empregado por esses autores.

Até 1998, somente a nicotina tinha sido experimentalmente demonstrada como capaz de atravessar a placenta, com 90% entrando na circulação fetal e 1% convertida em cotinina (PASTRAKULJIC *et al.*, 1998; SASTRY *et al.*, 1998). Atualmente, em adição a cotinina, como biomarcador efetivo em mecônio para monitorar exposição pré-natal ao tabaco, a nicotina é sugerida como o analito encontrado em maior prevalência em amostras positivas (GRAY *et al.*, 2008).

Entretanto, KÖHLER *et al.* (2007) observaram que a proporção de nicotina diminui com o passar do tempo após o nascimento e há aumento na proporção de OH-cotinina, considerando que a cotinina pouco muda.

KÖHLER *et al.* (2007) sugeriu que o valor de *cut-off* em urina para a qualificação do tabagismo seja a soma dos produtos de biotransformação da nicotina (cotinina mais OH-cotinina), e determina o valor de corte abaixo de 15 nmol/L para qualificar não expostos, entre 15 - 400 nmol/L para expostos passivos e valores acima de 400 nmol/L para caracterizar exposição ativa ao tabaco. Já o estudo de DERAUF *et al.* (2003) estabeleceram um *cut-off* no valor de 25 ng/g de cotinina em mecônio, enquanto GRAY *et al.* (2008) sugeriram valor de *cut-off* de 10 ng/g de mecônio para diferenciar as gestantes

fumantes ativas daquelas não fumantes ou expostas apenas passivamente ao tabaco.

1.1.2.2.3 Métodos utilizados para detecção de cotinina e nicotina em mecônio

Relativamente poucos trabalhos foram desenvolvidos para determinação de cotinina e nicotina em amostras de mecônio. Os métodos para identificação dos marcadores da exposição fetal à nicotina são baseados principalmente em extração líquido-líquido ou extração em fase sólida com detecção por cromatografia em fase gasosa acoplada ou não à espectrometria de massas (CHAN *et al.*, 2004; SHERIF *et al.*, 2004).

Geralmente, a presença de cotinina em mecônio é medida apenas por imunoensaio, muitas vezes sem a confirmação por cromatografia (DERAUF *et al.*, 2003; GRAY *et al.*, 2008). A maioria dos imunoensaios para cotinina ocorre por reação cruzada com a *trans*-3'-hidroxicotinina (OH-cotinina), mas não com a nicotina ou nornicotina. Dados sugerem que os imunoensaios podem falhar ao identificar aproximadamente um em cada quatro recém-nascidos expostos ao tabaco (GRAY *et al.*, 2008).

OSTREA *et al.* (1999) determinaram os produtos de biotransformação da nicotina, cotinina e *trans*-3'-hidroxicotinina em mecônio de recém-nascidos filhos de fumantes passivos e ativos a fim de determinar a exposição à nicotina ainda no útero com confirmação por GC-MS.

Outros pesquisadores analisaram amostras com e sem hidrólise enzimática para quantificar a concentração da substância conjugada e não conjugada. A hidrólise ocorreu *overnight* com a presença de *E.coli* tipo IX-A β -glucuronidase. A diferença entre as concentrações da substância não conjugada e conjugada indica glucuronidação da cotinina e OH-cotinina. Em seguida as amostras foram submetidas à extração em fase sólida (SPE) para se concentrar os analitos e remover componentes interferentes da matriz biológica (GRAY *et al.*, 2008).

Na associação das técnicas de hidrólise enzimática seguida de SPE aproximadamente três dias são necessários para pesagem e mecônio, preparação das amostras e análises de dados do LC-MS/MS, visto que só para a etapa de hidrólise a amostra fica incubada por 18h a 37°C (GRAY *et al.*, 2008 B).

Na Tabela 1 estão resumidos os procedimentos empregados por alguns autores para detecção da nicotina e de seus produtos de biotransformação em amostras de mecônio.

Tabela 1. Principais métodos analíticos propostos para determinação de cotinina e nicotina em mecônio.

Analitos	Extração	Deteção	LOD	LOQ	Referência
NIC; COT	SPE	HPLC/DAD	10 ng/g	-	Baranowski <i>et al.</i> , 1998
NIC; COT; OH-COT; NORNIC e NORCOT	Hidrólise Enzimática/SPE	LC-MS/MS	1,25; 1,25; 1,25; 5,00 e 1,25 ng/g	5,0; 1,25; 1,25; 1,25 e 5,0 ng/g	Gray <i>et al.</i> , 2008 e Gray <i>et al.</i> , 2008 B
COT; OH-COT	Hidrólise Enzimática/SPE	CG/MS	-	-	Ostrea <i>et al.</i> , 1999
NIC; COT; OH-COT	LLE/SPE	HPLC/DC	3,25; 3,50 e 3,85 ng/g	3,25; 3,50 e 3,85 ng/g	Köhler <i>et al.</i> , 2007

NIC, Nicotina; COT, Cotinina; OH-COT, *trans*-3'-hidroxicotinina; NORNIC, Nornicotina; NORCOT, Norcotinina.
HPLC – Hight Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Resolução)
DAD – Diode Array Detection (Detecção por Arranjo de Diodos)
LC-MS/MS - Cromatografia Líquida / Espectrometria de Massas
CG/MS - Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massas
DC – Colorimetric Detection (Detecção Colorimétrica)
SPE - Extração em fase sólida
LOD - Limite de Detecção
LOQ - Limite de Quantificação

1.1.2.2.4 Extração acelerada por solvente

Os estudos iniciais sobre a extração acelerada por solvente (ASE) apareceram no ano de 1995 e a primeira publicação sobre a técnica ocorreu em 1996 (RICHTER *et al.*, 1996). Atualmente tem se observado um aumento crescente no interesse nessa técnica na área analítica, incluindo os campos da toxicologia, forense, ocupacional, poluentes ambientais (amostras ambientais, como solos, sedimentos, e lodo de esgoto) e alimentos (GIERGIELEWICZ-MOŻAJSKA *et al.*, 2001).

Há variação quanto ao nome a ser utilizado para esta nova técnica de extração que trabalha com elevadas temperaturas e pressões, o que melhora drasticamente a velocidade de extração processo (BJOËRKLUND *et al.*, 2000).

A *Dionex Corporation* (Sunnyvale, CA, E.U.A.) comercializa um equipamento de extração com o nome ASE e que é usado por muitos laboratórios no mundo inteiro. Portanto, visto que ASE é uma marca Dionex, as denominações alternativas mencionadas cientificamente são extração por fluido pressurizado (PFE) ou, ainda, extração por líquido pressurizado (PLE). O termo mais amplamente utilizado é extração acelerada por solvente (ASE) e cerca de 80 a 90% das publicações mais relevantes referem-se ao termo ASE (BJOËRKLUND *et al.*, 2000).

No E.U.A., refere-se à técnica com o nome de extração por fluido pressurizado (PFE) e a *American Chemical Society* introduziu o PFE em sua sigla em revistas científicas. PFE também é usado pelo ambiente da Comunidade Européia. Outra denominação, que é usada pela *Elsevier Science* é PLE de extração líquido pressurizado. O nome ASE será usado ao longo deste trabalho. No entanto, é importante estar ciente que ao tentar localizar literaturas relevantes sobre esta técnica, tanto ASE, PFE ou PLE devem ser utilizados como termos de pesquisa adicionais de dados bases (BJOËRKLUND *et al.*, 2000).

Com a técnica do ASE, uma amostra sólida ou semi-sólida é inserida em uma célula de aço inoxidável que é preenchida com um fluido de extração. O solvente é bombeado através da pressurização e usado para extrair a amostra estaticamente sob temperatura (50 - 200°C) e pressão elevadas (1500 - 3000 psi) em curto período de tempo (5 - 10 min). Gás comprimido é usado para limpar a amostra e obter o extrato com os analitos em um frasco de coleta (RICHTER *et al.*, 1996). Portanto, os parâmetros de temperatura e pressão são programados e mantidos em seus valores específicos por aquecedores e bombas controlados eletronicamente. O solvente ao passar através da célula que contém a amostra, sob alta pressão e temperatura, mantém-se em fase líquida mesmo a temperaturas relativamente altas, usando às vezes até 200°C (BJOËRKLUND *et al.*, 2000). A Figura 3 mostra um esquema do sistema de extração acelerada por solvente.

Diferentes temperaturas, a quantidade de ciclos estáticos e o solvente utilizado são investigados para avaliar o efeito das condições experimentais

sobre o desempenho da extração acelerada por solvente (RICHTER *et al.*, 1996).

Neste trabalho apresentaremos os detalhes da ASE como uma técnica de extração e os efeitos dos parâmetros experimentais na recuperação.

Figura 3. Sistema de extração acelerada por solvente (ASE). (1) Bomba; (2) Célula de Extração; (3) Recipiente de Coleta; (4) Nitrogênio; (5) Solvente.

OBJETIVO

2. OBJETIVO DO TRABALHO

Os objetivos do trabalho foram:

- Desenvolvimento e a validação de um método analítico para identificação dos indicadores da exposição fetal ao tabaco empregando a extração acelerada por solvente (ASE) como técnica de preparação de amostra.
- Aplicação do método validado em amostras de mecônio de neonatos com suspeita e sem suspeita de exposição fetal ao tabaco.
- Avaliar uma possível correlação do relato da mãe e as concentrações dos biomarcadores nas amostras, analisando os níveis de cotinina e nicotina em amostras de mecônio, coletadas de uma população de recém-nascidos provenientes do Hospital Universitário (HU), na tentativa de estabelecer relação com as informações obtidas através do questionário quanto a exposição ao tabaco durante a gravidez.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Equipamento e acessórios

Equipamento de extração acelerada por solvente (ASE 100[®] Accelerated Solvent Extractor) da Dionex Corporation (Califórnia, EUA).

Equipamento de cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo modelo Agilent 6890N Network GC System da Agilent Corporation (Palo Alto, CA, EUA).

3.1.2 Soluções-padrão

Soluções-padrão de referência de nicotina e cotinina na concentração de 1,0 mg/mL foram obtidas da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA). A partir das soluções-padrão foram preparadas soluções de trabalho todas diluídas em metanol.

Solução de prolintano na concentração inicial de 100 mg/ml foi preparada a partir da diluição do pó obtido da Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Alemanha), a partir desta solução inicial foram preparadas soluções de trabalho todas diluídas em metanol.

A Tabela 2 mostra a estrutura química de cada um dos padrões de referência utilizados para este trabalho.

Tabela 2. Estrutura química dos padrões de referência (cotinina e nicotina) e padrão interno (prolintano).

	COTININA	NICOTINA	PROLINTANO
Peso molecular	176,21	162,23	217,35
Estrutura química
Log P (polaridade)	0,04	0,93	3,79
Solubilidade	água	água	-

3.1.3 Reagentes e outros materiais

Os reagentes metanol, ácido clorídrico, diclorometano, isopropanol, hidróxido de amônia, hidróxido de potássio, fosfato de potássio monobásico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Material inerte para ser utilizado na célula de extração - ASE[®] Prep DE terra diatomácea da Dionex Corporation (Califórnia, EUA).

Cartucho Bond-Elut[®] - Certify 130 mg 3 mL obtido da Varian (Darmstadt, Alemanha).

3.1.4 Amostras

Amostras de mecônio foram coletadas de recém-nascidos provenientes do berçário do Hospital Universitário - USP durante as primeiras 24 horas de vida, de forma consecutiva e aleatória, sem restrição quanto ao sexo e idade gestacional. Uma vez excretado pela criança, o material é recolhido da fralda com auxílio de espátula de madeira e colocado em coletor universal de plástico

sem conservante e encaminhado ao Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, onde é mantido em congelador a - 20°C até a análise. É aplicado um questionário para a mãe (ANEXO III) com o objetivo de obter informações quanto à idade e ao padrão de uso de tabaco antes e depois da gravidez. Também neste questionário coletam-se informações a respeito do recém-nascido: sexo, idade gestacional, peso, estatura, perímetro cefálico, ocorrência de complicação perinatal e presença de defeitos congênitos. Um termo de consentimento assinado pela mãe é obtido. Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (CEP n.419) – ANEXO I e pelo Comitê de Bioética em Medicina do Hospital Universitário da USP (CEP n. 723/07) - ANEXO II.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Aplicação do questionário materno

Conforme descrito anteriormente, para avaliação do padrão de comportamento em relação ao consumo de tabaco, é utilizado questionário padronizado e validado “TWEAK” (acrônimo de *Tolerance, Worry, Eye-opener, Amnesia* e *Cut down*) (adaptado de RUSSEL *et al.*, 1996) - ANEXO III. As amostras serão divididas em grupos a seguir:

GRUPO A (não-expostos): Amostras de recém-nascidos cujas mães relataram como sendo não-fumantes e não expostas passivamente à fumaça do tabaco (em casa ou no ambiente de trabalho). As informações a respeito do recém-nascido também não devem acusar qualquer anormalidade. Essas amostras

serão utilizadas como matriz biológica para o desenvolvimento e validação dos métodos.

GRUPO B (exposição passiva e/ou fumantes ocasionais): Amostras de recém-nascidos cujas mães relataram exposição passiva ao tabaco (antes e/ou durante a gestação, expostas em casa ou no ambiente de trabalho), ou que reportaram uso de 1 a 5 cigarros por dia.

GRUPO C (fumantes): Amostras de recém-nascidos cujas mães relataram ser fumantes (acima de 5 cigarros ao dia).

Foram coletadas aproximadamente 100 amostras para serem utilizadas com essa finalidade. E após utilização de algumas destas amostras para a validação do método foram utilizadas 84 amostras com a finalidade de quantificação.

3.2.2 Desenvolvimento do método de extração acelerada por solvente

3.2.2.1 Preparação da amostra

Uma alíquota de 500 mg de amostra de mecônio é adicionada com 2,4 g de diatomácea (material inerte) na célula de extração de 10 mL, juntamente com 10 µL de solução padrão prolintano na concentração de 10 µg/mL (padrão interno). Em seguida a célula é acoplada ao equipamento. O procedimento de extração acelerada por solvente (ASE) inicia-se através da passagem do solvente sob pressão pelo interior da célula, conforme Figura 3. As condições de extração foram as seguintes: 5 minutos de aquecimento; 3 minutos de ciclo

estático; 120°C de temperatura; 60 segundos de purga. Todo processo de extração foi executado a pressão de 1500 psi. Ao todo 20 a 22 mL de solvente foram coletados após a extração. O solvente utilizado foi solução tampão fosfato 0,1M pH 6,0. O extrato obtido é submetido a uma subsequente extração em fase sólida (SPE), cuja seqüência das etapas necessárias para extração pode ser observada na Figura 4. Na etapa de lavagem ocorre a eliminação dos contaminantes da amostra e na eluição a obtenção dos analitos de interesse. Um cartucho (BondElut®) contendo uma coluna C18 é condicionada com metanol e tampão fosfato 0,1M pH 6,0. O extrato aquoso proveniente da ASE passa através da coluna e, em seguida, promove-se a lavagem da coluna com 6,0 mL de água deionizada, a seguir com 3,0 mL de HCl 0,1M e última lavagem utilizando 9,0 mL de metanol. O analito é eluído com 2,0 mL de solução de diclorometano:isopropanol:hidróxido de amônio (12:3:0,3) recém preparada. O eluato é evaporado sob fluxo de N₂ a 40°C. O resíduo é reconstituído por dissolução em 50 µL metanol e 2,0 µL injetados no GC-NPD.

Figura 4. Sistema de extração em fase sólida (SPE) demonstrando a seqüência das etapas necessárias para extração: condicionamento, adição da amostra, lavagem e eluição.

3.2.2.2 Preparação das soluções padrão

Comercialmente, o solvente utilizado na diluição dos padrões de nicotina e de cotinina é o metanol, solução a 1,0 mg/mL. Todas as diluições seriadas realizadas para este projeto, a partir do padrão concentrado, mantêm o metanol como solvente de escolha, volátil para determinação por GC-NPD. Estas soluções são armazenadas sob refrigeração.

3.2.3 Condições cromatográficas do GC-NPD

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm de espessura do filme. As injeções foram feitas no modo *split* proporção 1:1. Nitrogênio foi usado como gás de arraste num fluxo constante de 1,2 mL/min. A temperatura do injetor foi de 200°C. Utilizou-se a seguinte rampa: temperatura do forno foi mantida a 100°C por 1 min e programada para aumentar 10°C/min até 250°C mantidos por 5 min. Tempo total da corrida cromatográfica: 21 min.

3.2.4 Otimização do método

Antes de se efetuar os ensaios necessários para validação de um método, alguns testes preliminares foram feitos para verificar a situação ótima para cada parâmetro que compõe o método. Cada um dos parâmetros analisados foi feito em triplicata, observando a área absoluta formada pelos analitos estudados.

3.2.4.1 Otimização das condições de extração de nicotina e cotinina por ASE

3.2.4.1.1 Avaliação da temperatura

Na célula de extração foram adicionados 500 mg de mecônio, 2,4 g de diatomácea (material inerte), 10 µL de solução padrão de cotinina e de nicotina na concentração de 10 µg/mL e padrão interno (prolintano) na mesma concentração. O solvente utilizado foi solução tampão fosfato 0,1M pH 6,0 e diferentes temperaturas foram avaliadas: 80, 100 e 120°C. A eficiência da extração foi avaliada através da área absoluta formada pelo analito nas diferentes temperaturas de extração.

3.2.4.1.2 Avaliação do número de ciclos

Nesse caso o procedimento analítico também foi o mesmo, variando-se o número de ciclos pelo qual o solvente entra em contato com a amostra: 1, 2, e 3 ciclos sendo cada um com duração de 3 minutos. A eficiência de extração também foi avaliada através da área absoluta formada pelo analito nas diferentes quantidades de ciclos de extração realizados.

3.2.4.1.3 Avaliação do solvente

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi utilizado para realização da otimização do solvente. Os ensaios foram realizados em triplicata, analisando-se diferentes solventes: hexano:acetona (1:1 v/v) e tampão fosfato 0,1M. A eficiência de extração também foi avaliada através da

área absoluta formada pelo analito nas diferentes quantidades de mecônio adicionadas.

3.2.5 Validação do método

A validação do método foi realizada estabelecendo-se os valores de limite de detecção e limite de quantificação, linearidade e precisão intra e interensaio. O método foi validado conforme recomenda o guia de validação da *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC, 2009).

3.2.5.1 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os LOD e LOQ do estudo foram determinados pelo método empírico que consiste em analisar uma série de amostras de mecônio contendo quantidades decrescentes dos analitos. O LOD foi considerado a menor concentração que gerou relação sinal/ruído igual a 3 e o LOQ a menor concentração que apresentou um coeficiente de variação que não excedeu 20% (ARMBRUSTER e PRY, 2008; UNODC, 2009).

3.2.5.2 Precisão intra-ensaio e interensaio

As precisões intra e interensaio foram determinadas indiretamente pelo cálculo de imprecisão através da determinação do coeficiente de variação do método (CV). No estudo analisaram-se amostras de mecônio em três dias diferentes, contendo as seguintes concentrações (dos pontos baixo, médio e alto) de cotinina e nicotina, respectivamente 20; 250 e 400 ng/g e 120; 250 e

400 ng/g. As análises foram realizadas em 6 replicatas para cada concentração (UNODC, 2009).

3.2.5.3 Recuperação absoluta

A recuperação absoluta do método foi avaliada através da análise de amostras com padrões de nicotina e cotinina nas mesmas concentrações utilizadas no estudo da precisão intra e interensaio, com subsequente injeção direta dos respectivos padrões.

No estudo, analisaram-se amostras de mecônio contendo as seguintes concentrações (dos pontos baixo, médio e alto) dos analitos cotinina (20; 250; 400 ng/g) e nicotina (120; 250; 400 ng/g). As análises foram realizadas em 6 replicatas para cada concentração (UNODC, 2009).

3.2.5.4 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (UNODC, 2009; RIBANI *et al.*, 2004). O estudo de linearidade foi realizado através da análise das amostras de mecônio submetidas ao método, em triplicata, nas seguintes concentrações de cotinina e de nicotina respectivamente: 5, 10, 50, 100, 300 e 500 ng/g e 40, 100, 200, 300, 400 e 500 ng/g.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Nessa seção são apresentados, inicialmente, resultados da otimização do método de ASE desenvolvidos para determinação de cotinina e nicotina em amostras de mecônio, além de cromatograma obtidos das análises desses compostos. Em seguida são apresentados os resultados de validação limite de detecção, limite de quantificação, e precisão intra e interensaio, linearidade e recuperação absoluta.

4.1 Cromatograma obtido nas condições padronizadas

A coluna HP 5MS utilizada neste trabalho apresenta caráter apolar, portanto, compostos polares eluem primeiro durante a separação cromatográfica e estes picos aparecem primeiro no cromatograma; já os compostos apolares eluem por último.

Nas Figuras 5, 6 e 7 são apresentados os cromatogramas dos padrões de nicotina, prolintano e cotinina, respectivamente, injetados separadamente (injetados isoladamente) na concentração de 10µg/mL.

Figura 5. Cromatograma da nicotina 10µg/mL (A).

Figura 6. Cromatograma do padrão interno prolintano 10µg/mL (B).

Figura 7. Cromatograma da cotinina 10µg/mL (C).

A seguir, uma mistura contendo os compostos-alvo na concentração de 100µg/mL foi também analisada. Uma boa separação foi obtida e confirmando os tempos de retenção observados durante a injeção isolada de cada padrão, conforme descrito no parágrafo anterior.

Devido à polaridade da coluna esperava-se eluição dos padrões na ordem cotinina, nicotina e prolintano; mas ao contrário, os tempos de retenção não seguiram conforme a teoria propõe e a eluição ocorreu na ordem nicotina, prolintano e cotinina.

Na Figura 8 é apresentado o cromatograma de uma amostra adicionada dos analitos na concentração de 100 ng/g submetido ao método de extração descrito no item 2.1.

Figura 8. Cromatograma após extração e análise em GC-NPD de cotinina e nicotina: pico da nicotina (A); pico do padrão interno (B) e pico de cotinina (C).

4.2 Resultados da otimização das condições de extração de cotinina e nicotina em mecônio

Na otimização das condições do método de extração acelerada por solvente (ASE), foram avaliados as seguintes variáveis: temperatura, número solvente e de ciclos de extração. Nessa avaliação, considerou-se a área absoluta de cada analito e, portanto, padrão interno não foi utilizado nessa fase.

4.2.1 Avaliação da temperatura

Nesse procedimento analítico a temperatura adotada foi de 120°C, pois as outras temperaturas estudadas apresentaram rendimentos menores (Figura 9 e Figura 10).

Figura 9. Avaliação da temperatura na eficiência de extração com hexano: acetona.

Figura 10. Avaliação da temperatura na eficiência de extração com tampão fosfato 0,1M.

4.2.2 Avaliação do número de ciclos

A influência do número de ciclos na eficiência de extração pode ser visualizada na Figura 11. O número de ciclos selecionado foi de 1 ciclo estático.

Figura 11. Avaliação do número de ciclos estático na eficiência de extração de cotinina e nicotina.

4.2.3 Avaliação do solvente

Ambos os solventes analisados apresentaram eficiência no processo de extração, entretanto para a continuidade do estudo, o tampão fosfato 0,1M foi adotado como solvente de escolha (Figura 9 e Figura 10).

4.3 Resultados da validação do método

4.3.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de cotinina e de nicotina obtidos para o método proposto estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de limite de detecção e limite de quantificação de cotinina e nicotina com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio.

	COTININA	NICOTINA
LOD	3 ng/g	30 ng/g
LOQ	5 ng/g	40 ng/g

LOD: Limite de detecção
LOQ: Limite de quantificação

4.3.2 Precisão intra e interensaio

Nas Tabelas 4 e 5 são apresentados os valores de precisão intra e interensaio, definido pelo coeficiente de variação do método (CV), para os analitos estudados.

Tabela 4. Valores de precisão intra-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.

	COTININA	NICOTINA
CQ1	10.2	11.9
CQ2	7.3	12.9
CQ3	4.7	7.7

CQ1 – 20 ng/g cotinina e 120 ng/g nicotina
CQ2 – 250 ng/g cotinina e 250 ng/g nicotina
CQ3 – 400 ng/g cotinina e 400 ng/g nicotina

Tabela 5. Valores de precisão interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.

	COTININA	NICOTINA
CQ1	20.1	3.0
CQ2	19.4	18.9
CQ3	6.4	4.3

CQ1 – 20 ng/g cotinina e 120 ng/g nicotina

CQ2 – 250 ng/g cotinina e 250 ng/g nicotina

CQ3 – 400 ng/g cotinina e 400 ng/g nicotina

4.3.3 Recuperação absoluta

Os valores de recuperação obtidos para a determinação de nicotina e cotinina em mecônio são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em mecônio.

Analito	Recuperação %		
	CQ1	CQ2	CQ3
Cotinina	76	65	83
Nicotina	85	72	82

CQ1 – 20 ng/g cotinina e 120 ng/g nicotina

CQ2 – 250 ng/g cotinina e 250 ng/g nicotina

CQ3 – 400 ng/g cotinina e 400 ng/g nicotina

4.3.4 Linearidade

O método demonstrou ser linear na faixa de concentração estudada para todos os analitos de interesse. As equações de regressão linear dos analitos e os coeficientes de correlação obtidos foram os seguintes para cada analito

estudado: nicotina $y = 0,0144x - 0,5509$; $r^2 = 0,9872$ e cotinina $y = 0,1400x + 5,4319$; $r^2 = 0,9801$.

4.4 Resultados da análise toxicológica em amostras de mecônio

Durante o período desta pesquisa, o número de amostras de mecônio coletadas foi superior ao da análise toxicológica porque várias amostras foram totalmente utilizadas para o desenvolvimento do método e aproximadamente 6 não tinham a quantidade suficiente para análise dos componentes estudados. Das amostras coletadas, 84 foram analisadas por GC/NPD (Tabela 7). Através da aplicação do questionário “TWEAK”, 20,25% das mães relataram o consumo de tabaco durante a gestação: para 35,30% a frequência foi de 1 a 5 vezes por dia e para 64,70% a frequência foi de mais de 5 cigarros ao dia. Das mães que afirmaram o consumo, apenas em 1 caso a mãe admitiu o consumo abusivo de tabaco (amostra 87) cerca de 30 cigarros ao dia. Os questionários mostram que 28,60% das gestantes relataram conviver com fumantes e, portanto, estavam expostas a fumaça do tabaco e foram consideradas fumantes passivas. Das entrevistadas, 47,55%, relataram ser não fumantes e 3,60% não preencheram as informações quanto ao hábito de fumar.

A Figura 12 apresenta o cromatograma após extração e análise em GC-NPD de uma amostra de mecônio cuja mãe fez uso de cigarro durante a gestação.

Figura 12. Cromatograma após extração e análise em GC-NPD da amostra 68, pico da nicotina (A); pico do padrão interno (B) e pico de cotinina (C).

Os resultados das concentrações de nicotina e cotinina obtidas com a aplicação do método desenvolvido por ASE e GC/NPD em amostras de mecônio de recém-nascidos provenientes do Hospital Universitário-HU são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultado das concentrações (ng/g) obtidas através das análises toxicológicas para determinação de cotinina e nicotina em mecônio de recém-nascidos provenientes do Hospital Universitário-USP.

ID	COT	NIC	Fumante	Passivo	Resultado
17	90,7	329,3	sim	sim	positivo
18	n.d.	n.d.	não	não	negativo
19	n.d.	n.d.	não	sim	negativo
20	158,3	n.d.	não	sim	positivo
21	28,0	n.d.	não	não	positivo
22	n.d.	n.d.	não	sim	negativo
23	n.d.	n.d.	não	não	negativo
24	n.d.	n.d.	sim	sim	negativo
25	41,8	131,8	sim	sim	positivo
26	n.d.	n.d.	não	não	negativo
27	48,1	n.d.	não	não	positivo
28	n.d.	n.d.	não	sim	negativo

29	50,2	221,5	sim	sim	positivo
30	n.d.	n.d.	não	não	negativo
31	n.d.	n.d.	não	não	negativo
32	29,1	n.d.	não	não	positivo
33	n.d.	n.d.	não	sim	negativo
34	29,9	n.d.	não	não	positivo
35	n.d.	n.d.	não	não	negativo
36	31,1	n.d.	não	não	positivo
37	29,2	n.d.	não	não	positivo
38	30,6	n.d.	não	não	positivo
39	n.d.	n.d.	não	não	negativo
40	n.d.	n.d.	não	não	negativo
41	34,2	n.d.	não	não	positivo
42	n.d.	n.d.	não	sim	negativo
43	30,2	n.d.	n.i.	n.i.	positivo
44	51,6	115,3	sim	sim	positivo
45	n.d.	n.d.	não	não	negativo
46	n.d.	n.d.	não	não	negativo
47	n.d.	n.d.	não	não	negativo
48	31,7	n.d.	não	sim	positivo
49	32,9	n.d.	não	não	positivo
50	32,8	n.d.	não	não	positivo
51	30, 8	74,3	não	não	positivo
52	35,3	366,6	sim	não	positivo
53	n.d.	n.d.	não	não	negativo
54	38,0	n.d.	sim	não	positivo
55	32,5	n.d.	não	sim	positivo
56	51,3	n.d.	não	não	positivo
57	n.d.	n.d.	não	não	negativo
58	46,8	n.d.	sim	sim	positivo
59	n.d.	n.d.	não	sim	negativo
60	38,7	n.d.	não	não	positivo
61	36,9	n.d.	não	sim	positivo
62	58,5	394,5	sim	não	positivo
63	n.d.	n.d.	não	não	negativo

64	38,5	86,5	não	sim	positivo
65	n.d.	171,7	não	não	negativo
66	32,3	108,0	não	sim	positivo
67	36,5	111,4	não	não	positivo
68	34,1	195,8	sim	sim	positivo
69	30,9	133,2	sim	sim	positivo
70	n.d.	n.d.	não	sim	negativo
71	29,4	93,8	não	não	positivo
72	33,3	224,1	não	não	positivo
73	30,6	84,6	não	sim	positivo
74	75,3	268,2	não	sim	positivo
75	29,1	137,1	não	não	positivo
76	28,6	91,4	não	não	positivo
77	40,4	89,7	não	sim	positivo
78	31,1	148,8	não	não	positivo
79	45,5	175,4	sim	sim	positivo
80	n.d.	n.d.	não	sim	negativo
81	n.d.	117,0	não	sim	negativo
82	n.d.	86,7	não	sim	negativo
83	n.d.	n.d.	não	não	negativo
84	43,7	1059,5	não	sim	positivo
85	40,8	n.d.	não	sim	positivo
86	n.d.	104,3	não	sim	negativo
87	49,0	334,0	sim	não	positivo
88	31,1	120,7	não	não	positivo
89	31,8	113,9	sim	não	positivo
90	30,6	105,3	não	não	positivo
91	33,1	n.d.	n.i.	n.i.	positivo
92	n.d.	n.d.	não	não	negativo
93	34,4	141,6	sim	sim	positivo
94	53,1	395,1	sim	não	positivo
95	88,0	803,1	não	sim	positivo
96	31,1	98,5	não	não	positivo
97	30,2	77,0	não	sim	positivo
98	31,5	66,6	n.i.	n.i.	positivo

99	32,0	180,8	sim	não	positivo
100	43,9	81,6	não	não	positivo

COT = Cotinina, NIC = Nicotina, n.i. = não informado, n.d.= não detectado

Através da Tabela 8 há possibilidade de comparar os auto-relatos preenchidos nos questionários pelas mães e os resultados de cotinina detectados na análise das amostras.

Tabela 8. Resultado da comparação entre o uso do tabaco durante a gravidez auto-reportados e cotinina detectados em mecônio de 84 recém-nascidos provenientes do Hospital Universitário-USP.

Auto-relato materno	Cotinina	Percentual
Fumante	detectado	88,2% (15)
	não detectado	11,8% (02)
Passivo	detectado	54,2% (13)
	não detectado	45,8% (11)
Não fumante	detectado	57,5% (23)
	não detectado	42,5% (17)
Não informado	detectado	100% (03)
	não detectado	-

Quanto às informações obtidas dos recém-nascidos em que o mecônio foi coletado e analisado, não foram observados casos de baixa estatura ou baixo peso, prematuridade ou perímetro cefálico não correspondente com a normalidade nos bebês. Durante a obtenção dos dados, o gênero encontrou-se definido nos prontuários dos recém-nascidos. Observações como alargamento de suturas, fossa occipital, marca fórcepe com hematoma na região maxilar, lesões, cefalohematoma, icterícia, palidez de mãos e membros inferiores, apêndice auricular, mancha avermelhada no couro cabeludo foram

identificadas nos prontuários dos recém-nascidos, porém, não mostram correlação com o consumo de tabaco pela mãe durante a gestação.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A exposição ao tabaco durante a gestação apresenta significativos problemas de saúde para as mulheres grávidas e para os fetos. Nesse contexto, o tabaco representa especial importância devido aos inúmeros efeitos nocivos associados ao uso freqüente e a grande prevalência de consumo por mulheres em idade reprodutiva (CARLINI *et al.*, 2002).

A identificação de biomarcadores de exposição à nicotina em amostras biológicas fornece uma alternativa ao auto-relato do uso do tabaco em período gestacional, necessária para melhor avaliação dos efeitos da droga no feto e posterior acompanhamento e tratamento da criança exposta.

Poucos autores investigaram a possibilidade de detecção de nicotina no mecônio para avaliar a exposição fetal ao tabaco, visto que é uma matriz biológica extremamente complexa em termos analíticos. Apesar disto, o mecônio é um marcador biológico ideal para testar a exposição fetal direta à fumaça do tabaco no período neonatal (BARANOWSKI *et al.*, 1998) além de fornecer informação da exposição a longo prazo. O mecônio, primeiras fezes do neonato, oferece diversas vantagens para a detecção de exposição ao tabaco pré-natal: disponível em quantidade suficiente para análise, coleta não-invasiva, fácil obtenção (GARERI *et al.*, 2006).

A cotinina é o principal produto de biotransformação da nicotina e é considerado o melhor marcador da exposição prolongada ao fumo do tabaco que a substância inalterada (BARANOWSKI *et al.*, 1998).

Técnicas de extração já descritas na literatura (Tabela 1) associam as extrações convencionais líquido-líquido (LLE) com a em fase sólida (SPE),

apresentando como desvantagem o consumo de grandes volumes de solventes orgânicos, formação de emulsões e múltiplas etapas de extração.

Portanto, para o desenvolvimento do método de análise de cotinina e nicotina em mecônio, inicialmente foi testada a microextração em fase líquida (LPME). A LPME é uma técnica que segue uma tendência em análises toxicológicas, a da miniaturização de técnicas analíticas de preparação de amostras, a exemplo da microextração em fase sólida (SPME); apresenta como principais vantagens a maior simplicidade e praticidade, a menor manipulação da amostra e a pouca ou nenhuma necessidade de uso de solventes orgânicos (YONAMINE *et al.*, 2003).

Na otimização das condições do método, foram avaliados as seguintes variáveis: solvente, quantidade de sal (efeito *salting out*), pH da fase aceptora, tempo de extração e quantidade de amostra.

Após conclusão dos estudos de otimização da LPME a determinação de nicotina e cotinina em mecônio foi realizada inicialmente no GC-NPD, entretanto é de conhecimento que a LPME apresenta como desvantagens ser uma técnica de extração não reprodutiva se não for acompanhada da utilização de padrões internos deuterados e, outra atribuição dada à LPME é, que a técnica perde precisão devido a operação manual do procedimento incluindo a preparação, impregnação e acomodação da fibra no sistema, além do fato de se trabalhar com um pequeno volume de fase aceptora (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Desta forma, como é incompatível o uso de padrões internos deuterados com o GC-NPD, transferiu-se o método para detecção por GC-MS.

Com o uso do GC-NPD, obteve-se bom resultado de resolução cromatográfica entre os picos de interesse. No entanto, sob condições semelhantes utilizadas no método para detecção dos analitos de interesse por GC-MS, surpreendentemente não obtivemos os mesmos resultados quanto à resolução cromatográfica.

Vários parâmetros foram investigados para a solução do problema como programação da temperatura do forno, fluxo do gás de arraste, outras colunas cromatográficas, instalação de pré-coluna, modo de injeção (*splitless w/surge*) em diversas pressões e tempos, mas não foi bem sucedido. Os resultados, embora um pouco melhores, não foram satisfatórios.

Optou-se então por retomar os trabalhos com a utilização de GC-NPD, sem a utilização de padrões internos deuterados. No entanto, como era de se esperar, a utilização da LPME com o GC-NPD, gerou resultados com baixa precisão (CV > 20%). Assim, os estudos com LPME foram abandonados.

Então, iniciou-se a avaliação da técnica de extração acelerada por solvente (ASE), utilizada para extrair analitos de matrizes complexas sólidas e semi-sólidas e também por ser uma técnica rápida de preparação de amostra que privilegia o pouco uso de solventes.

Nos últimos anos, questões ambientais têm merecido destaque e é uma tendência evitar a utilização de solventes ou substituí-los por alternativas mais seguras (LENARDÃO *et al.*, 2003). A ASE foi concebida para minimizar a quantidade de solvente utilizado sem prejudicar a velocidade de extração ou a facilidade de operação. O processo é normalmente concluído em 10 a 25 minutos.

A técnica de ASE opera pela passagem do solvente através de uma célula de extração que contém a amostra. O contato direto com o forno aquece esta célula e a extração é feita pela passagem do solvente aquecido pela amostra. O extrato obtido é depositado em um recipiente de coleta e está pronto para análise (FLANAGAN *et al.*, 2006).

A ASE combina o aumento de temperatura e pressão com solventes para melhorar a eficiência do processo de extração. Tais condições são atingidas em curto espaço de tempo e, além da rapidez, a ASE oferece um menor custo operacional por amostra, se comparado a outras técnicas, pois consome quantidades reduzidas de solvente. O aumento da temperatura acelera a extração cinética e a elevação da pressão mantém o solvente aquecido no estado líquido durante o processo, ou seja, abaixo da sua temperatura de ebulição, permitindo, assim, uma extração rápida e segura (ASE 100[®] *Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual* 2002).

Finalizada a otimização da ASE foi realizada a avaliação dos analitos inicialmente no GC-MS, entretanto, não obtivemos resultados satisfatórios quanto à resolução cromatográfica para avaliação simultânea de nicotina e cotinina. Novamente vários parâmetros foram investigados para a solução do problema como fluxo do gás de arraste, diferentes colunas cromatográficas (HP-5 e HP-1), variação da temperatura do forno, modo de injeção em pressões e tempos diversos, mas não foi bem sucedido.

Os trabalhos foram retomados com a utilização do GC-NPD, no entanto, a utilização da ASE apresentou um extrato extremamente viscoso e turvo após

concentração no fluxo de N₂ e o GC-NPD gerou cromatogramas com inúmeros interferentes que impossibilitaram a avaliação da amostra.

Devido ao mecônio ser uma amostra biológica bastante complexa, passamos o extrato obtido no ASE por outra etapa de extração (SPE) para possibilitar purificação e quantificação dos analitos em questão.

As condições cromatográficas empregadas no GC-NPD foram adequadas, possibilitando uma boa separação e resolução dos picos conforme pode ser visualizado na Figura 8. Este método permite que uma média de 24 amostras sejam analisadas dentro de uma rotina laboratorial de 8 horas.

As análises de amostras de mecônio podem ser realizadas com ou sem hidrólise enzimática para quantificar a concentração da substância conjugada e não conjugada para avaliação de exposição fetal ao tabaco.

Apesar de constatada a glucuronidação de cotinina e OH-cotinina em amostras submetidas à hidrólise enzimática, esta etapa não foi aplicada no desenvolvimento deste método, visto que, o estudo que indica a glucuronidação destes analitos identificou somente uma, entre 168 amostras analisadas, como positiva após a hidrólise. E ainda, dados de apoio mostram que a hidrólise enzimática é demorada e cara podendo ser eliminada sem comprometer significativamente detecção dos analitos indicativos de exposição de recém-nascidos ao tabaco (GRAY *et al.*, 2008).

Para obter condições ótimas para extração dos analitos por ASE, alguns parâmetros foram avaliados. Para melhorar a eficiência da extração, o solvente deve ser capaz de solubilizar o analito deixando a amostra intacta. A polaridade do solvente de extração deve coincidir com a do componente analisado.

Mistura de solventes com diferentes polaridades podem ser utilizadas para extrair uma ampla faixa de classes de compostos. Geralmente, um solvente que se mostra eficiente num procedimento de extração convencional, também será eficaz para ser aplicado no ASE. Ácidos fortes (HCl, HNO₃, H₂SO₄) não são recomendados devido a reação com o aço inoxidável presente no sistema ASE, porém, se aplicável, ácidos fracos como ácido acético ou fosfórico podem ser usados (DIONEX, *Technical Note* 208). A mistura hexano:acetona (1:1) demonstrou-se eficiente (CURWIN *et al.*, 2005) no desenvolvimento e aplicação da presente técnica para extrair bioindicadores do tabaco em mecônio, mas foi possível a substituição deste solvente orgânico por solução tampão fosfato pH 6,0, sem prejudicar a eficiência da extração.

O uso de solventes orgânicos apresenta desvantagens se comparado com a utilização do tampão fosfato, além de apresentar maior custo, ainda, são substâncias tóxicas do ponto de vista ambiental e ocupacional, cancerígenas e/ou inflamáveis. A substituição do solvente orgânico pelo tampão fosfato inclui princípios da química verde, pois a quantidade de solvente orgânico foi reduzida devido ao emprego deste apenas na etapa de SPE, sendo o mesmo dispensado na etapa inicial de extração por ASE. Tal fato reduz a produção de resíduos, a exposição de operadores a substâncias tóxicas e, conseqüentemente, diminui o risco de acidentes (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Considerando a estrutura química e o pka dos analitos estudados, é interessante utilizar um solvente com pH 6,0 (tampão fosfato) visto que, o mesmo, promoverá uma eficiente ionização das moléculas (forma protonada) aumentando a afinidade destas ao meio aquoso que será utilizado para a extração.

A temperatura é o mais importante parâmetro utilizado na extração por ASE. Observou-se que a temperatura de 120°C foi melhor para extração do analito em mecônio. Com o aumento da temperatura, a viscosidade do solvente diminui, assim, aumenta-se a capacidade do solvente entrar em contato com a matriz biológica e solubilizar o analito de interesse (DIONEX, *Technical Note* 208).

O efeito da pressão no sistema é manter o solvente na forma líquida mesmo estando acima da sua temperatura de ebulição e, também, mover rapidamente este fluido através de todo o sistema. O parâmetro referente à pressão que o equipamento dispõe não é ajustável, deste modo o sistema ASE[®]100 opera com 1500psi (10MPa) como pressão padrão (DIONEX, *Technical Note* 208).

O número de ciclos estáticos foi selecionado para aumentar a eficiência de extração devido ao maior tempo de contato do solvente com a matriz biológica e ajudar na manutenção do equilíbrio de extração. A variação da quantidade de ciclos estáticos empregados no processo é útil para amostras com alta concentração de analito ou amostras que dificultam o contato do analito com o solvente. Durante a determinação de cotinina em mecônio, observou-se que 1 ciclo apresentou maior eficiência de extração e que maior número de ciclos reduziu a área dos analitos.

Durante a determinação quantitativa de componentes em amostras orgânicas complexas, as concentrações dos analitos podem ser obtidas de diferentes formas. Resultados mais exatos podem ser obtidos adicionando-se um padrão interno (PI) tanto à amostra como aos padrões de calibração. O PI

tende a reduzir as incertezas que surgem no preparo e introdução da amostra no equipamento. Para a escolha do PI no método, inicialmente foi verificada a possibilidade do emprego de difenilamina (KARACONJI *et al.*, 2007). Porém, o método proposto utiliza ASE com posterior extração por SPE e difenilamina não era extraída por SPE. Então foi avaliado o uso de metil-fenil-pirazolona como padrão interno, e verificou-se que o tempo de retenção do PI ficou bem próximo ao tempo de retenção da cotinina e, além disso, a metil-fenil-pirazolona apresentava baixa recuperação no procedimento de extração. Optamos pelo prolintano como PI (Figura 8), pois também apresenta estrutura química semelhante aos analitos de interesse (Figura 3) e os resultados mostraram um tempo de retenção não tão próximo a cotinina e melhor recuperação se comparado com a metil-fenil-pirazolona.

Mesmo o prolintano apresentando log P diferente do verificado para a nicotina e cotinina, este se mostrou adequado para esta finalidade quando submetido à etapa de validação do método apresentando eficiência e reprodutibilidade satisfatórias. Os testes realizados para a determinação deste parâmetro foram estabelecidos de forma empírica.

Sabe-se que a nicotina pode ser encontrada em quantidades mínimas de nanogramas em amostras biológicas, sendo o analito proveniente de alguns vegetais da dieta e não propriamente da exposição ao tabaco (ROSEMBERG *et al.*, 2003). Para o processo de validação de uma nova metodologia é necessário utilizar amostras sem o analito de interesse. Não foi realizado nenhum tratamento da amostra para eliminar os analitos de estudo e/ou interferentes a ser utilizado como amostra de referência negativa. Entretanto as amostras utilizadas para a validação foram previamente analisadas pela

técnica ASE–SPE / GC-NPD para assegurar que foram utilizadas na validação amostras sem os analitos de interesse.

A nicotina e seus produtos de biotransformação se mantêm estáveis em mecônio por mais de duas semanas em temperatura ambiente e por mais de um ano quando este espécime for armazenado a - 20°C (KÖHLER *et al.*, 2007 e MOORE *et al.*, 1998).

Os valores de LOD (abaixo de 3 ng/g e 30 ng/g) e LOQ (abaixo de 5 ng/g e 40 ng/g), para cotinina e nicotina respectivamente , foram considerados satisfatórios para nicotina e cotinina, pois são compatíveis com outros métodos analíticos descritos na literatura científica. Considerar também que, neste método, a análise foi feita com GC-NPD, equipamento que possui menor sensibilidade que um LC/MS testado nos outros métodos citados (Tabela 1).

A precisão avalia a proximidade dos resultados analíticos obtidos a partir de uma série de medições repetidas da mesma medida nas condições estabelecidas pelo método. Os resultados refletem os erros aleatórios que ocorrem no método. As condições de repetibilidade (intra-ensaio) ocorrem quando as mesmas amostras de análises sobre o mesmo analista dia com o mesmo instrumento, reagentes e no mesmo laboratório. Qualquer alteração a estas condições, como diferentes analistas, dias diferentes, de diferentes instrumentos, diferentes laboratórios representam condições de reprodutibilidade (interensaio). A precisão é normalmente medida como o coeficiente de variação dos resultados analíticos obtidos a partir de preparados de forma independente (UNODC, 2009).

Para acomodar a composição complexa de mecônio, há estudos onde a imprecisão aceitável, de resultados inferiores a 20%, é estendida até 20 a 25% da concentração alvo (GRAY *et al.*, 2008 B). Os critérios de aceitação estabelecidos também podem ser alargados em alguns casos, por exemplo, na análise de amostras *postmortem* e nos casos onde os efeitos da matriz podem ser significativos (UNODC, 2009). Entretanto, neste método, tanto a precisão interensaio como a intra-ensaio produziram valores adequados para métodos cromatográficos, obtendo-se valores de coeficientes de variação menores ou iguais que 20% para precisão interensaio e menores que 15% para precisão intra-ensaio. O uso de padrão interno selecionado deve ter contribuído para obtenção desses valores, pois o padrão interno utilizado é quimicamente muito semelhante com os analitos, o que possibilitou a utilização do PI em todas as etapas analíticas de validação do método.

Para o estudo da linearidade, uma ampla faixa de trabalho foi avaliada (LOQ 5 a 500 ng/g) com base nas concentrações geralmente verificadas em casos de exposição fetal ao tabaco relatado na literatura. Curvas de calibração foram determinadas e os coeficientes de correlação (r^2) foram calculados, um alto coeficiente de correlação é geralmente usado como critério de linearidade, $r^2 > 0,99$. No entanto, isso não é suficiente para provar que existe uma relação linear e um método com um coeficiente de determinação de menos de 0,99 pode ainda estar apto para o efeito (UNODC, 2009).

Após o desenvolvimento e validação do método para determinação de biomarcadores do tabaco em mecônio por GC/NPD, este foi aplicado em amostras de mecônio de recém-nascidos do Hospital Universitário em que a mãe admitiu ou não o uso de tabaco durante a gestação. Na Tabela 8 foram

apresentados os resultados das análises por ASE em mecônio. Analisando as informações obtidas através dos questionários aplicados nas mães, constatou-se que a maioria dos relatos maternos sobre o uso de tabaco durante a gestação foram imprecisos e contraditórios, como era esperado.

Comparando as informações obtidas através do questionário aplicado para as mães e a análise de nicotina e cotinina em mecônio observou-se que das 17 amostras dos recém-nascidos em que as mães admitiram o uso, 14 tiveram nicotina e cotinina detectadas; em 1 amostra apenas a cotinina foi detectada e em 2 nenhum dos analitos foi detectado. Em outras 39 (46,43%) amostras também foram detectadas nicotina e/ou cotinina, apesar das mães não terem admitido o consumo. Outros autores revelaram divergências semelhantes onde as mulheres participantes do estudo não relataram o consumo e houve detecção de nicotina e/ou cotinina nas amostras de seus filhos e outras mães que admitiram consumir tabaco durante a gestação, porém não foram detectados marcadores desta exposição em seus recém-nascidos (BOYD *et al.*, 1998; GRAY *et al.*, 2008).

A cotinina foi o analito mais freqüentemente detectado nas amostras de mecônio em que as mães relataram o consumo e entre as mães que não relataram o consumo. Esse resultado também foi relatado por outros autores que detectaram com freqüência a presença de cotinina em amostras de mecônio (GRAY *et al.*, 2008; SHERIF *et al.*, 2004; DEMPSEY *et al.*, 1999).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, um método analítico utilizando a técnica de extração acelerada por solvente (ASE) seguida de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia gasosa com detector nitrogênio-fósforo (GC-NPD) foi desenvolvido para a para determinação de nicotina e cotinina em amostras de mecônio.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O método de quantificação e confirmação proposto apresentou limites de detecção de 3 ng/g para cotinina e 30 ng/g para nicotina. Os limites de quantificação foram de 5 ng/g para cotinina e 40 ng/g para nicotina. Os resultados obtidos na validação do método mostram que se trata de um método rápido, prático e linear que poderá ser aplicado para a determinação quantitativa e confirmatória de produtos de biotransformação do tabaco em mecônio de recém-nascidos com suspeitas de exposição fetal ao tabaco.

A precisão intra-ensaio, determinada pelo coeficiente de variação do método (CV%), foi menor que 15% e para a precisão interensaio o valor encontrado foi inferior ou igual a 20% tanto para nicotina quanto para cotinina. A recuperação média ficou acima de 77%.

O método desenvolvido demonstra ser preciso e sensível e com uso de menores volumes de solventes orgânicos do que outros métodos descritos na literatura.

As amostras analisadas e consideradas como positivas para o uso de tabaco durante a gestação apresentaram concentrações dos biomarcadores de exposição ao tabaco acima do LOQ. Como era de se prever, observou-se que

o questionário foi pouco eficaz no que diz respeito à constatação do uso de tabaco pelas mães durante a gestação. Fato este que corrobora com a necessidade de aplicação de um método diagnóstico laboratorial que possa ser usado para avaliação de casos suspeitos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **J. Chromatog. B**, v.774, p.215–222, 2002.
- ARMBRUSTER, D.A.; PRY, T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. **Clinical Biochemistry**, v.29, p.849-852, 2008.
- ASE 100[®] *Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual*. Dionex Corporation, 2002.
- BARANOWSKI, J., POCHOPIEN, G., BARANOWSKA, I. Determination of nicotine, cotinine and caffeine in meconium using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 707, p. 317–321, 1998.
- BJOERKLUND, E.; NILSSON, T.; BÖWADT, S. Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. **Analytical Chemistry**, v. 19, p. 434-445, 2000.
- BOYD, N.R.; WINDSOR, R.A.; PERKINS, L.L.; LOWE, J.B. Quality of measurement of smoking status by self-report and saliva cotinina among pregnant women. **Matern Child Health J**, v. 2, p.77-83, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis: Brasil, 15 capitais e Distrito Federal, 2002-2003. Rio de Janeiro: INCA, 2004. Disponível <http://www.inca.gov.br/tabagismo/programa/programadetabagismo.pdf>. [Acesso em 28/01/2010].

BRASIL. Coordenadoria Estadual Antidrogas do Estado do Paraná. A sociedade, mais do que vítima da droga, é a solução. 2007. Disponível em: <http://www.antidrogas.pr.gov.br/modules/noticias/makepdf.php?storyid= 599> [Acesso em 10/03/2010].

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

CASARETT, L.J.; KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J., eds. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. 1111p.

CARLINI, E.A.; GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; NAPPO, S.A. **I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil**: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país 2001. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo, 2002. 380p.

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

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

- COGNARD, E., STAUB, C. Determination of nicotine and its major metabolite cotinine in plasma or serum by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection. **Clin. Chem. Lab. Med**, v. 41, p. 1599-1607, 2003.
- COLVERO, M.O.; COLVERO, A.P.; FIORI, R.M.; GARCIA, P.C.R. Novas opções terapêuticas na síndrome de aspiração de mecônio. **Revista Brasileira de Saúde Maternal e Infantil**, v.6, p.367-374, 2006.
- CULEA, M., COZAR, O., NICOARA, S., PODEA, R. Exposure assessment of nicotine and cotinine by GC-MS. **Indoor Built Environ**, v. 14, p. 293-299, 2005.
- CURWIN, B.D.; HEIN, M.J.; SANDERSON, W.T.; NISHIOKA, M.G.; BUHLER, W. Nicotine Exposure and Decontamination on Tobacco Harvesters' Hands. **Ann. occup. Hyg.** (Published by Oxford University Press), v. 49, p. 407–413, 2005.
- DEMPSEY, D., MOORE, C., DEITERMANN, D., LEWIS, D., FEELEY, B., NIEDBALA, R.S. The detection of cotinine in hydrolyzed meconium samples. **Forensic Science International**, v. 102, p. 167–171, 1999.
- DEMPSEY, D., JACOB, P. III, BENOWITZ, N.L. Nicotine metabolism and elimination kinetics in newborns. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 67, p. 458–465, 2000.
- DERAUF, C.; KATZ, A.R.; EASAL, D. Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl esters and cotinine. **American Journal of Epidemiology**, v.158, n.7, p.705-709, 2003.

DIONEX. Methods Optimization in Accelerated Solvent Extration (ASE®)
Technical Note 208.

FARKAS, S.; HUSSEIN, J.; ARIANO, R. E.; SITAR, D. S.; HASAN, S. U.
Prenatal cigarette smoke exposure: pregnancy outcome and gestational changes in plasma nicotine concentration, hematocrit, and carboxyhemoglobin in a newly standardized rat model. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.214, p.118-125, 2006.

FLANAGAN, R.J.; MORGAN, P.E.; SPENCER, E.P.; WHELPTON, R. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomed. Chromatogr.**, v. 20, p. 530-538, 2006.

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

GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; CARLINI, E.A. **II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil**: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo, 2005.

GIERGIELEWICZ - MOŻAJSKA, H., DĄBROWSKI, L., NAMIESNIK, J.
Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples. **Critical Reviews in Anal. Chem.** v. 31, p. 149-165, 2001.

GRAY, T.R., MAGRI, R., SHAKLEYA, D.M., HUESTIS, M.A. Meconium Nicotine and Metabolites by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry: Differentiation of Passive and Nonexposure and Correlation

with Neonatal Outcome Measures. **Clinical Chemistry**. v. 54, p. 2018-2027, 2008.

GRAY, T.R., SHAKLEYA, D.M., HUESTIS, M.A. Quantification of nicotine, cotinine, *trans*-3'-hydroxycotinine, nornicotine and norcotinine in human meconium by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr B**, v. 863, p. 107-114, 2008 B.

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

JUNG, B.H., CHUNG, B.C., CHUNG, S., LEE, M., SHIM, C. Simultaneous GC-MS determination of nicotine and cotinine in plasma for the pharmacokinetic characterization of nicotine in rats. **J. Pharm. Bimed. Anal.**, v. 20, p. 195-202, 1999.

KARACONJI, I.B., SKENDER, L., KARACIC, V. Determination of nicotine and cotinine in urine by headspace solid phase microextraction gas chromatography with mass spectrometric detection. **Acta Chim. Slov.**, v. 54, p. 74-78, 2007.

KLEIN, J.; BLANCHETTE, P.; KOREN, G. Assessing nicotine metabolism in pregnancy – a novel approach using hair analysis. **Forensic Sci Int.**, v.145, p.191-194, 2004.

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

- KÖHLER, E., BRETSCHNEIDER, D., RABSILBER, A., WEISE, W., JORCH, G.
Assessment of prenatal smoke exposure by determining nicotine and its metabolites in maternal and neonatal urine. **Human and Experimental Toxicology**, v. 20, p. 1–7, 2001.
- KOOG, D.A.S.; HÓLLER, J.F.; NIEMEN, T.A. Princípios de Análise Instrumental. 5 ed. Bookman: 2002.
- KWONG, T.C.; RYAN, R.M. Detection for intrauterine illicit drug exposure by newborn drug testing. **Clinical Chemistry**, v.43, n.1, p.235-242, 1997.
- LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; BATISTA, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA, C. C. Green Chemistry – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v.26, n.1, p. 123-129, 2003.
- LUCK, W., NAU, H., HANSEN, R., STELDINGER, R. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**; v. 8, p. 384–395, 1985.
- MARCHEI, E.; PELLEGRINI, M.; PACIFICI, R.; PALMI, I.; LOZANO, J.; GARCIA-ALGAR, O.; PICHINI, S. Quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol and its major metabolites in meconium by gas chromatographic-mass spectrometric assay: assay validation and preliminary results of the "meconium project". **Therapeutic Drug Monitoring**, v.28, n.5, p.700-706, 2006.

- MCDOWALL, R.D. Sample preparation for biomedical analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 492, p.3-58, 1989.
- MITCHELL, E.A.; MILERAD, J. Smoking and the sudden infant death syndrome. **Rev Environ Health**, v.21, p.81-103, 2006.
- MOORE, C., NEGRUSZ, A., LEWIS, D. Determination of drugs of abuse in meconium. **Journal of Chromatography B**, v. 713, p. 137–146, 1998.
- MOORE, C.; JONES J.; LEWIS D.; BUCHI, K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. **Clinical Chemistry**, v.49, n.1, p.133-136, 2003.
- MUNAFO, M.R.; WILEYTO, E.P.; MURPHY, M.F.; COLLINS, B.N. Maternal smoking during late pregnancy and offspring smoking behaviour. **Addict. Behav.**, v.31, p.1670-1682, 2006.
- NUESSLEIN, T.G.; BECKERS, D.; RIEGER, C.H. Cotinine in meconium indicates risk for early respiratory tract infections. **Human and Experimental Toxicology**, v. 18, p. 283-290, 1999.
- OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; SANTANA, F.J.M; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quim. Nova**, v. 31, p. 637-644, 2008.
- OSTREA, E.M.JR. Testing for exposure to illicit drugs and other agents in the neonate: a review of laboratory methods and the role of meconium analysis. **Current Problems in Pediatrics**, v. 29, p. 37–56, 1999.

- OSTREA, E.M.JR., KNAPP, D.K., ROMERO, A.I., MONTES, M., OSTREA, A. R. Meconium analysis to assess fetal exposure to nicotine by active and passive maternal smoking. **The Journal of Pediatrics**, v. 124, p. 471–476, 1994.
- PASTRAKULJIC, A.; SCHWARTZ, R.; SIMONE, C.; DEREWLANY, L.O.; KNIE, B.; KOREN, G. Transplacental transfer and biotransformation studies of nicotine in the human placental cotyledon perfused *in vitro*. **Life Sci**, v. 63, p. 2333-2342, 1998.
- PENG-JU, W., JUN, Y., QING-DE, S., YUN, G., XIAO-LAN, Z., JI-BAO, C. Rapid removal of template from molecularly imprinted polymers by accelerated solvent extraction. **Chin. J. Anal. Chem.**, v. 35, p. 484-488, 2007.
- PICHINI, S.; MARCHEI, E.; PACIFICI, R.; PELLEGRINI, M.; LOZANO, J.; GARCIA-ALGAR, O. Application of a validated high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay to the analysis of m- and p-hydroxybenzoylecgonine in meconium. **J. Chromatogr. B**, v. 820, n 5, p.151-156, 2005.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RICHTER, B.E., JONES, B.A., EZZELL, J.L., PORTER, N.L., AVDALOVIC, N.; POHL, C. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 1033-1039, 1996.

RODRIGUES, G.D.; SILVA, L.H.M.; SILVA, M.C.H. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água.

Quim. Nova, v. XY, p. 1-9, 2010.

ROSEMBERG, J.; ROSEMBERG, A.M.A.; MOARES, M.A. Nicotina: droga universal. São Paulo: Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, 2003.

Disponível em: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicações/nicotina.pdf> [Acesso em 10/02/2010].

RUSSEL, M.; MARTIER, S.S; SOKOL, R.J.; MUDAR, P.; JACOBSON, J. Detecting Risk Drinking during pregnancy: A comparison of four screening questionnaires. **American Journal of Public Health**, v. 86, n.10, p. 1435-1439, 1996.

SASTRY, B.V.; CHANCE, M.B.; HEMONTOLOR, M.E.; GODDIJN-WESSEL, T. A. Formation and retention of cotinina during placental transfer of nicotine in human placental cotyledon. **Pharmacology**, v. 57, p. 104-116, 1998.

SHERIF, N.A.; KAMEL, S.M.; AL-ASHKAR, O.S.; SEIF, E.A.; HEGAZY, E.A. Detection of cotinine in neonates meconium as a marker for nicotine exposure in utero. **East Mediter. Health J.**, v.10, n.1/2, p.96-105, 2004.

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

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

VALENTE-CAMPOS, S. **Avaliação da exposição à cocaína através da análise toxicológica em unha.** São Paulo, 2002. 121p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

WISBORG, K.; HENRIKSEN, T.B.; JESPERSEN, L.B. Nicotine patches for pregnant smokers: a randomized controlled study. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v.96, n.6, p.967-971, 2000.

WONG, A. **Cocaína/crack, canabinóides, anfetaminas e opiáceos no cabelo, urina e mecônio de recém-nascidos de baixo peso e a correlação destes no cabelo e urina das mães.** São Paulo, 2000. 141p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the Global Tobacco Epidemic, 2009. Genebra:2009. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/mpower/en/> [Acesso em 28/01/2010].

YONAMINE, M.; TAWIL, N.; MOREAU, R.L.M.; SILVA, O.A. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas-chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., Amsterdam**, v. 789, p.73-78, 2003.

ANEXOS

ANEXO I - Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 49/2007

São Paulo, 08 de maio de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Prof. Maurício Yonamine
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 07 de maio de 2007, **APROVOU** o projeto "Análise toxicológica dos bioindicadores do etanol e do tabaco em mecônio de recém-nascidos procedentes do Berçário do Hospital Universitário – USP" (Protocolo CEP nº 419) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser incluído no TCLE os itens IV.1 à IV.3.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP

ANEXO II - Comitê de Bioética em Medicina do Hospital Universitário/USP

São Paulo, 18 de maio de 2007.

Il^{mo}(a). Sr^a(a).

Dr. Maurício Yonamine

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “*Análise toxicológica dos bioindicadores do etanol e tabaco em mecônio de recém-nascidos procedentes do Berçário do Hospital Universitário da USP*” - **Co-Autor(es)**: Edna Maria de Albuquerque Diniz e Marli Roehsig - **Registro CEP-HU/USP**: 723/07 – **SISNEP CAAE**: 0004.0.198.018-07

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 18 de maio de 2007, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório está previsto para **18 de maio de 2008**.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

ANEXO III - Questionário aplicado para mãe

Questionário

Identificação no _____

Data da internação: _____

Idade: _____

Considere as seguintes questões sobre hábitos que você tinha ANTES DA GRAVIDEZ:

1. Quantos cigarros costumava fumar?

() não sou fumante

() 1 a 5 cigarros por dia

() mais que cinco cigarros por dia

2. Caso seja fumante, há quanto tempo tem este hábito?

_____ Anos

_____ Meses

3. Você se considera fumante passivo (mora com fumantes ou convive com colegas fumantes)?

() Sim

() Não

4. Qual a frequência de uso de bebidas alcoólicas?

() Não consumo bebidas alcoólicas (nunca)

() Raramente

() 1 a 2 vezes por semana

() 3 a 4 vezes por semana

() Diariamente

5. Caso seja consumidor, quantos “drinques” você precisa beber para se sentir “alto”?

Obs: Considere “drinque” como 1 garrafa de cerveja, 1 taça de vinho, 1 dose de uísque ou pinga.

_____ Drinques

6. Você tem amigos próximos que se preocuparam ou reclamaram quanto ao seu consumo de bebidas alcoólicas no ano passado?

() Sim

() Não

6. Você algumas vezes bebe alguma bebida alcoólica logo de manhã?

() Sim

() Não

7. Já ocorreu de algum amigo ou familiar te avisar de algo que você tenha dito ou feito quando estava bebendo que você não conseguiu lembrar depois?

() Sim

() Não

8. Você já sentiu a necessidade de reduzir a quantidade ou a frequência de beber?

() Sim

() Não

Considere as seguintes questões sobre hábitos que você teve DURANTE A GRAVIDEZ:

9. Durante a gravidez, qual foi a frequência de uso de cigarro?

- ☐ não fiz uso de cigarro
- ☐ não fiz uso, mas fui fumante passivo (em casa ou no trabalho)
- ☐ fumei de 1 a 5 cigarros por dia
- ☐ fumei mais que cinco cigarros por dia

10. Durante a gravidez, qual foi a frequência de uso de bebidas alcoólicas?

- ☐ Não consumi bebidas alcoólicas
- ☐ Raramente
- ☐ 1 a 2 vezes por semana
- ☐ 3 a 4 vezes por semana
- ☐ Diariamente

Informações a Respeito do bebê

Identificação no.: _____

Peso: _____

Estatura: _____

Perímetro cefálico: _____

Sexo:

() Masculino () Feminino () Indefinido

Duração da gestação (em semanas): _____

Data da coleta das amostras de mecônio: _____

1. Anomalias ou malformação observadas na criança

() Sim

() Não

2. Caso positivo, quais?

() Cardíaca

() Sistema Nervoso Central

() Respiratória

() outras _____