

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de método para análise de nicotina e  
cotinina em amostras de mecônio utilizando a cromatografia em fase  
gasosa acoplada à espectrometria de massas

Luiza Saldanha Ribeiro Barros

Ribeirão Preto  
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de método para análise de nicotina e cotinina em amostras de mecônio utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Luiza Saldanha Ribeiro Barros  
Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Ribeirão Preto  
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Saldanha Ribeiro Barros, Luiza

Desenvolvimento e validação de método para análise de nicotina e cotinina em amostras de mecônio utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. . Ribeirão Preto, 2011.

73 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: De Martinis, Bruno Spinosa.

1. Nicotina.
2. Mecônio.
3. Cromatografia em fase gasosa.
4. Espectrometria de massas.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Luiza Saldanha Ribeiro Barros

Título do trabalho: Desenvolvimento e validação de método para análise de nicotina e cotinina em amostras de mecônio utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

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

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

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

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

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

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

## RESUMO

BARROS, L. S. R. **Desenvolvimento e validação de método para análise de nicotina e cotinina em amostras de mecônio utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2011. 66f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O mecônio é uma matéria fecal que começa a acumular no intestino do feto por volta do terceiro mês de gestação e normalmente é eliminado nos primeiros dias de vida do recém nascido. No mecônio ocorre o acúmulo de substâncias com as quais a mãe entrou em contato durante o período de gestação e, portanto, sendo possível avaliar a exposição fetal. Nos casos de mães fumantes, compostos presentes no tabaco tais como nicotina e substâncias que são formadas após a metabolização da nicotina como por exemplo a cotinina, podem ser também detectadas nas amostras de mecônio, já que ocorre o acúmulo de nicotina e seus metabólitos no mesmo. O uso do cigarro durante o período gestacional acarreta em uma série de problemas ao feto como baixo peso ao nascer, parto pré-maturo, doenças no trato respiratório, dentre outros. Nos dias atuais é possível fazer a pesquisa de drogas lícitas e ilícitas em várias amostras biológicas tais como, sangue, urina, cabelo, fluido oral, mecônio, entre outras. O mecônio é uma boa opção, por vários motivos: amostragem fácil e não invasiva (a coleta pode ser feita na fralda), indica o histórico do uso de substâncias pela mãe durante a gestação por ser cumulativo, etc. O objetivo foi desenvolver e validar um método analítico empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas para a determinação de nicotina e, seu metabólito, cotinina em amostras de mecônio coletadas de recém nascidos. Para o desenvolvimento do método foi utilizado 0,5g de mecônio e os analitos foram extraídos com metanol e em seguida a amostra foi submetida a purificação através da extração em fase sólida utilizando cartuchos *Bond Elut Certify I*. O método foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA e demonstrou linearidade de 160 – 1600 ng/g para nicotina e de 160 – 1000 ng/g para cotinina. Os limites de detecção estabelecidos foram de 10 ng/g para nicotina e 60 ng/g para cotinina, enquanto os limites de quantificação foram de 60 ng/g para nicotina e 100 ng/g para cotinina. A exatidão apresentou valores de 91,73% a 103,73%, a precisão intra-ensaio variou entre 3,21% a 10,86%, e a precisão inter-ensaio obteve valores entre 4,91% a 9,88%. O método validado foi aplicado em amostras de mecônio coletadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP).

**Palavras Chave:** Mecônio. Nicotina. Cotinina. CG-EM. Exposição intra-uterina.

## ABSTRACT

BARROS, L. S. R. **Development and validation of a methodology for analysis of nicotine and cotinine in meconium samples using gas chromatography-mass spectrometry.** 2011. 66f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Meconium is a fecal matter passed by the newborn after birth. It begins to form around the 3th month of gestation and accumulates in the fetus until birth. Substances which the mothers had contact during the gestation period may accumulate in meconium and, therefore, it's possible to assess fetal exposure. Substances from the tobacco smoke, like nicotine and its metabolite cotinine, also accumulates in the meconium and can be detected. Maternal smoking during pregnancy is hazardous to the fetus and it is associated with low birth weight, prematurity, respiratory tract infections and others. Nowadays it is possible to assess licit and illicit drugs in several biological samples like blood, urine, hair, oral fluid, meconium and others. Meconium is the best choice because it's easy to collect and it's noninvasive, indicates a history of substances use by the mother in the latter half of pregnancy, etc. The purpose of this study was to develop and validate a methodology using gas chromatography-mass spectrometry to assess nicotine and cotinine in meconium samples collected from newborns. To the development of the methodology 0,5g of meconium was used per assay and the analytes were extracted from the matrix using methanol. Then, a solid phase extraction was applied using Bond Elut Certify I cartridges. The methodology was validated in the range of 160 – 1600 ng/g for nicotine and 160 - 1000 ng/g for cotinine. The limit of detection established was 10 ng/g for nicotine and 60 ng/g for cotinine, while the limit of quantification was 60 ng/g for nicotine and 100 ng/g for cotinine. The accuracy showed values between 91,73% and 103,73%, the intra-assay precision between 3,21% and 10,86% and the inter-assay precision between 4,91% and 9,88%. The validated methodology was applied to analysis of meconium samples collected from newborns in the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP).

Keywords: Meconium. Nicotine. Cotinine. GC-MS. In utero exposure.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura da nicotina.....	3
<b>Figura 2</b> – Esquema de biotransformação da nicotina.....	4
<b>Figura 3</b> – Foto de uma fralda com mecônio.....	11
<b>Figura 4</b> – Esquematização da preparação de amostra.....	20
<b>Figura 5</b> – Cromatograma de uma amostra de mecônio fortificada com 300 ng/mL de nicotina, 250 ng/mL de cotinina e 250 ng/mL do padrão interno lidocaína.....	31
<b>Figura 6</b> – Cromatograma de uma amostra de mecônio branco.....	32
<b>Figura 7</b> – Cromatograma dos íons selecionados para a nicotina e o respectivo espectro de massas.....	33
<b>Figura 8</b> – Cromatograma dos íons selecionados para a cotinina e o respectivo espectro de massas.....	34
<b>Figura 9</b> – Cromatograma dos íons selecionados para a lidocaína e o respectivo espectro de massas.....	35
<b>Figura 10</b> – Linearidade da nicotina.....	37
<b>Figura 11</b> – Linearidade da cotinina.....	37
<b>Figura 12</b> - Cromatograma da amostra n°32, com os respectivos e spectros de massas da nicotina, cotinina e lidocaína.....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores dos Controles de Qualidade.....	30
<b>Tabela 2</b> – Programação da temperatura da coluna.....	30
<b>Tabela 3</b> – Íons utilizados na identificação e quantificação dos analitos e o tempo de retenção.....	31
<b>Tabela 4</b> – Limite de Detecção (LD), Limite Inferior de Quantificação (LIQ) e Limite Superior de Quantificação (LSQ).....	36
<b>Tabela 5</b> – Valores da precisão intra-ensaio (%).....	38
<b>Tabela 6</b> – Valores da precisão inter-ensaio (%).....	38
<b>Tabela 7</b> – Valores de exatidão (%).....	39
<b>Tabela 8</b> – Valores de recuperação (%).....	39
<b>Tabela 9</b> – Valores de especificidade (ng/g).....	40
<b>Tabela 10</b> – Valores da estabilidade pós-processamento.....	41
<b>Tabela 11</b> – Respostas das pacientes entrevistadas que assumiram o uso do cigarro e valores encontrados para nicotina e cotinina em ng/g.....	42



# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA</b> .....	14
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
4.1. Reagentes e padrões .....	18
4.2. Equipamentos e acessórios .....	18
4.3. Preparação das soluções padrão de calibradores, controle de qualidade e padrão interno .....	18
4.4. Preparação do tampão carbonato/bicarbonato pH 9,0 .....	19
4.5. Preparação da solução de ácido acético aquoso .....	19
4.6. Metodologia .....	19
4.7. Parâmetros utilizados na validação da metodologia .....	21
4.7.1. Limite de detecção .....	21
4.7.2. Limite de quantificação .....	22
4.7.3. Linearidade .....	22
4.7.4. Precisão .....	22
4.7.5. Exatidão .....	23
4.7.6. Recuperação .....	24
4.7.7. Especificidade .....	24
4.7.8. Estabilidade .....	25
4.7.9. Carry over .....	25
4.8. Casuística .....	26

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
5.1. Desenvolvimento do método .....	28
5.1.1. Otimização do método.....	29
5.1.2. Curva de calibração .....	29
5.1.3. Determinação de nicotina e cotinina em amostras de mecônio .....	30
5.2. Validação do método .....	36
5.2.1. Limites de detecção e quantificação .....	36
5.2.2. Linearidade.....	36
5.2.3. Precisão .....	38
5.2.4. Exatidão .....	38
5.2.5. Recuperação .....	39
5.2.6. Especificidade .....	40
5.2.7. Estabilidade .....	41
5.2.8. <i>Carry over</i> .....	41
5.2.8. Aplicação do método desenvolvido na análise das amostras de mecônio .....	42
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	46
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48

# **Introdução**

## 1. INTRODUÇÃO

O início do tabagismo ocorreu na sociedade moderna com a chegada da Revolução Industrial e com o fim das Grandes Guerras alcançou seu apogeu. O hábito de fumar, primeiramente, surgiu entre os homens, para depois da década de 50 ser comum entre as mulheres (UTAGAWA et al., 2007). O uso do tabaco antigamente já era associado a comportamentos sociais que variavam entre o glamour e a rebeldia (MARQUES et al., 2002).

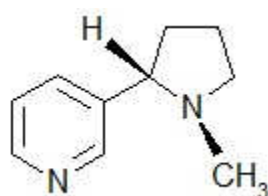
O tabaco é uma planta da família das Solanáceas de origem nos Estados Unidos e que chegou à Europa no século XVI (MARQUES et al., 2002). A principal representante é a *Nicotiana tabacum* L., uma planta anual, que pode atingir 2 metros de altura (GALVÃO et al., 2003). As folhas são verdes, de formato ovalado, oblongas e sésseis, possuem também flores e frutos (FABRE et al., 1971). A presença da nicotina em matrizes humanas se dá primeiramente pela exposição à fumaça do tabaco, mas ela também pode ser encontrada em uma série de vegetais. A família das Solanaceae agrega alguns vegetais mais comumente utilizados pela população, que contém nicotina em sua composição, como batatas, tomates, berinjelas e pimentas, porém, a nicotina se encontra em baixas concentrações o que não gera riscos ou quaisquer efeitos quando consumidos. Já nos produtos derivados do tabaco como cigarro, charuto e cachimbo podem ser encontradas altas concentrações de nicotina (BAIDOO et al., 2003; HOOFNAGLE et al., 2006; SIEGMUND et al., 1999). Acredita-se que a presença da nicotina nessas plantas tem a função de defesa natural contra fungos, bactérias, insetos e animais (SIEGMUND et al., 1999).

A quantidade de nicotina que é encontrada no tabaco varia de acordo com a espécie da planta e a natureza do solo. E por causa da fermentação que sofrem as folhas durante o processo de preparação, a dose de nicotina presente naquelas folhas diminui (FABRE et al., 1971).

Mais de vinte tipos de alcalóides são encontrados na planta do tabaco, e são os principais componentes ativos dos produtos de tabaco. Sendo que a nicotina, responsável pelo efeito de dependência, constitui em média 98% do total de alcalóides (KATAOKA et al., 2008). Exemplos de alcalóides também encontrados no tabaco são a anatabina e anabasina. Esses alcalóides além de contribuírem para as

propriedades organolépticas da fumaça do cigarro indicam a qualidade do tabaco (CAI et al., 2003).

O termo *Nicotiana* é derivado de Jean Nicot, um diplomata francês responsável pela propagação do tabaco na Europa, já *tabacum* é um cachimbo, assim chamado pelos índios, usado para fumar o tabaco (ROBBERS et al., 1997). Em 1828 Posselt e Reiman conseguiram isolar a nicotina das folhas do tabaco e no ano de 1843, Orfila deu início aos primeiros estudos farmacológicos com essa substância (TAYLOR, 2006).



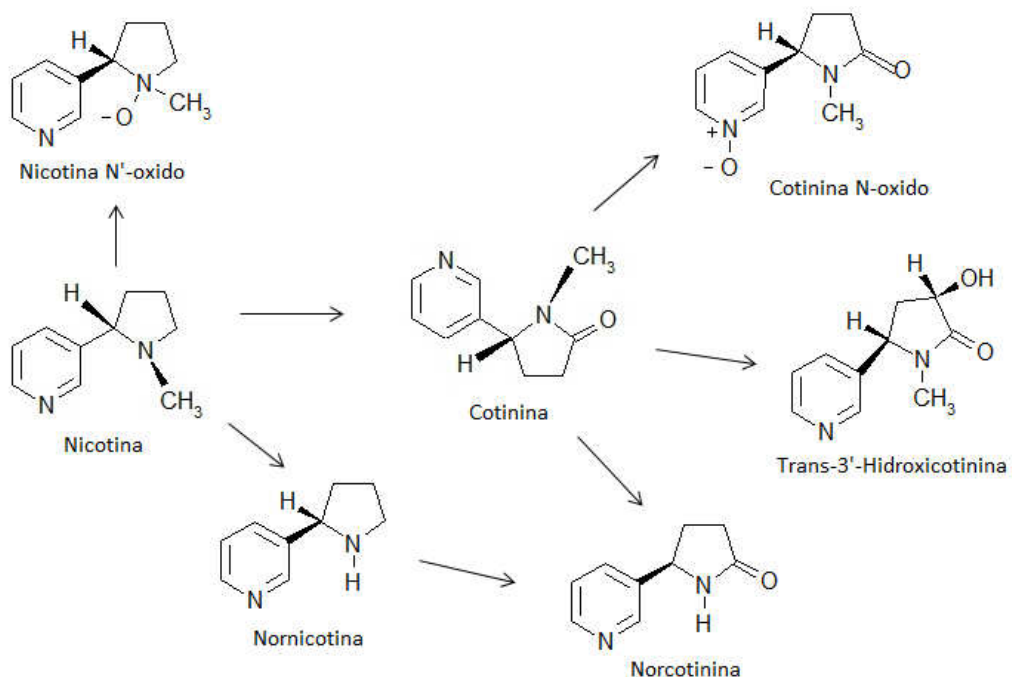
**Figura 1** - Estrutura da nicotina.

A nicotina, um dos principais componentes do tabaco, faz parte do grupo dos alcalóides. É uma base volátil de estrutura pirrolidínica, muito solúvel em água e em solventes orgânicos, principalmente álcool e éter, que são capazes de extraí-la de sua solução alcalina. É um líquido com odor característico, incolor, e que se torna amarelado na presença do ar, através de sua oxidação (GALVÃO et al., 2003). Com ponto de ebulição de 247°C, a nicotina se decompõe muito facilmente e é arrastada pelo vapor de água, é uma base cáustica com forte reação alcalina. A nicotina é muito solúvel em lipídios, o que favorece a sua rápida absorção pela pele (FABRE et al., 1971), mucosa bucal, nasal e na inalação pelos pulmões (KATAOKA et al., 2008).

Essa característica de rápida absorção gera uma grande importância toxicológica, em uma pessoa adulta, a DL50 fica entre 50 e 60 mg/kg. Considerada uma substância tóxica, a nicotina caso não seja manejada e administrada corretamente ou até em situações de acidente, pode causar quadros de intoxicação. Se for absorvida pela mucosa bucal, pode-se sentir queimação na boca, laringe, esôfago e estômago devido ao seu alto teor cáustico. Mas em geral a intoxicação aguda é caracterizada por vertigens, dores de cabeça, vômito, diarreia, podem ocorrer delírios, tremores e convulsões, suor frio, dilatação das pupilas, aumento ou

diminuição do pulso e da respiração, que pode levar a um quadro de asfixia, coma e óbito. Já a intoxicação crônica é classificada como o hábito de fumar, caracterizada por habituação, necessidade, dependência e efeitos deletérios causados nos dependentes do tabaco (FABRE et al., 1971).

Nos humanos o maior órgão de biotransformação da nicotina é o fígado, mas esse processo também pode ocorrer no pulmão e nos rins (BAO et al., 2005). O padrão de biotransformação da nicotina varia de um indivíduo para o outro, o mais comum é que mais de 70% da nicotina sofra oxidação pelo CYP450A6 e dê origem a cotinina, seu maior metabólito (MILLER et al., 2010). A biotransformação da nicotina se dá principalmente pelo caminho da oxidação e formação da cotinina: ocorre a catalização pelo citocromo P450 para produção do íon intermediário nicotina- $\Delta$ -1'(5')-iminium que sofre ação da aldeído oxidase citosólica dando origem a cotinina que ainda pode ser biotransformada em trans-3'-hidroxicotinina, norcotinina e cotinina-N-óxido (BAO et al., 2005). Devido a variações genéticas do CYP450A6 em algumas pessoas, pode ocorrer redução da atividade enzimática e consequente diminuição na velocidade de biotransformação de nicotina e cotinina após sua dose oral. Sendo assim, os fumantes que possuem baixo metabolismo pelo CYP450A6 possuem taxas menores de cotinina e de OH-cotinina comparado aos fumantes com metabolismo normal (BENOWITZ et al., 2006).



**Figura 2** – Esquema de biotransformação da nicotina.

Devido a sua baixa ligação com as proteínas plasmáticas, a distribuição da nicotina é muito rápida, sendo sua meia vida biológica aproximadamente de 2 horas (GALVÃO et al., 2006) então uma vez absorvida, ela rapidamente sai da corrente sanguínea devido a sua alta distribuição para os tecidos e metabolização (KOREN et al., 1992). A nicotina é capaz de atravessar a barreira placentária, trazendo prejuízo ao feto, e também secretada pelo leite materno podendo chegar a uma concentração de 0,5 mg/L (GALVÃO et al., 2006).

Devido a meia vida biológica da cotinina ser de aproximadamente 37 horas, esta substância é a mais apropriada para a avaliação da exposição crônica ao cigarro e, um ótimo marcador biológico tanto para determinação da exposição ativa quanto passiva (DERAUF et al., 2003). Uma vez que a nicotina é rapidamente metabolizada em cotinina esta só é usada para determinação de exposição recente (BARANOWSKI et al., 1998). Apesar da cotinina ser detectada na placenta e líquido amniótico, não há estudos publicados relatando como essa transferência ocorre (GRAY et al., 2008).

Quando a nicotina é fumada e chega até os pulmões, ela é rapidamente absorvida e cai na corrente sanguínea, chega ao cérebro em menos de 20 segundos e interage com vários sistemas de neurotransmissores para produzir efeitos psicoativos como o da recompensa (MILLER et al., 2010). Ou seja, quando a nicotina chega à corrente sanguínea ela age como estimulante do sistema nervoso central e periférico (HOOFNAGLE, 2006), estimulando o gânglio autônomo do SNC (KINTZ, 1992; MILLER et al., 2010) e age nos receptores colinérgicos nicotínicos, bem como em outras partes do sistema nervoso, liberando ou facilitando a produção de vários neurotransmissores como a dopamina, norepinefrina, serotonina, acetilcolina, vasopressina e beta endorfina (MILLER et al., 2010).

O tabaco pode ser fumado sob a forma de cigarro industrializado ou feito a mão, bem como sob a forma de cachimbo e charuto, e também pode ser mascado ou cheirado (rapé). O cigarro industrializado possui um filtro em sua extremidade que retira uma parte dos constituintes da fumaça antes que esta chegue aos pulmões. Como a nicotina é um líquido com ponto de ebulição de 250°C e a queima do cigarro chega a 800°C, é o suficiente para que o corra a volatilização da nicotina e a mesma possa ser inalada. O tabaco mascado geralmente é mantido na boca, o que gera uma absorção bucal e um leve pico plasmático de nicotina. Quando engolida,  $\frac{3}{4}$  da nicotina é perdida devido ao metabolismo de primeira passagem pelo

fígado. Já o rapé, é o tabaco em pó que pode ser cheirado e era mais popular nos séculos XVIII e XIX (WILLS, 1997).

Apesar de existirem muitos modos de uso do tabaco, o cigarro prevalece. Por volta de 1840 ele começou a ser industrializado e inicialmente era enrolado a mão, hoje em dia as máquinas de produção chegam a produzir 16 mil cigarros por minuto (GALVÃO et al., 2003).

Devido à alta temperatura gerada na brasa do cigarro, que pode chegar a 800°C, durante a combustão do tabaco três reações o correm simultaneamente: pirólise, pirossíntese e destilação. E duas fases podem ser diferenciadas, a gasosa e a particulada. A fase gasosa é formada de gases e vapores provenientes da pirólise e pirossíntese como o monóxido de carbono, óxido de nitrogênio, aldeídos e nitrosaminas. Já a fase particulada é composta por nicotina, água e alcatrão. O alcatrão é um conjunto de partículas como o benzopireno, nitrosaminas não voláteis e metais (GALVÃO et al., 2003).

A fumaça do cigarro é composta por mais de 4000 substâncias, das quais mais de 40 são considerados carcinógenos conhecidos. Metais (arsênico, níquel, cádmio e cromo), promotores potenciais de câncer (acetaldeído e fenóis), irritantes (bióxido de nitrogênio e formaldeído), toxinas ciliares (cianeto de hidrogênio e monóxido de carbono) (KANE et al., 2005), elementos radioativos (polônio-210, carbono-14, potássio-40) e também mofo e aditivos também são exemplos de substâncias que podem ser encontradas na fumaça do tabaco) (HUSAIN et al., 2005).

Outras substâncias encontradas na fumaça do tabaco são as aminas aromáticas como a 4-aminobifenila (ROETHIG et al., 2009), a 2-aminonaftaleno classificadas como carcinógenos humanos pela IARC (International Agency of Research on Cancer) e a O-toluidina considerada um provável carcinógeno humano pela IARC. Essas 3 aminas aromáticas são relacionadas ao câncer de bexiga (RIEDEL et al., 2006). A acroleína, também encontrada na fumaça do tabaco, é um aldeído relacionado a danos no DNA, e interferência na resposta reparadora das células epiteliais brônquicas e O 1,3-butadieno, classificado também como carcinógeno humano (ROETHIG et al., 2009)

A nicotina não é carcinogênica, mas dá origem a certas nitrosaminas como a 4-(nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona ou NNK, que é específica do tabaco e está classificada pela Organização Mundial da Saúde como pertencente ao grupo 1



de carcinógenos (ROETHIG et al., 2009; STEPANOV et al., 2007). Também pode ser avaliada por seus metabólitos: 4-(nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-butanol ou NNAL e seus conjugados com o ácido glicurônico (ROETHIG et al., 2009). Acredita-se que a NNK tenha um importante papel no desenvolvimento do câncer de pulmão em fumantes ativos e passivos. Outra nitrosamina específica do tabaco é a N'-nitrosonornicotina também classificada pela IARC como carcinógeno humano (HECHT et al., 2006), N-nitrosoanatabina, N-nitrosoanabasina dentre outras (CAI et al., 2003).

Segundo um levantamento de dados realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) no ano de 2005 nas 108 maiores cidades brasileiras, a prevalência do uso e dependência do tabaco chegou a 10,1%, o que equivale a 4.700.635 pessoas (CARLINI et al., 2006).

Um relatório da Agência de Proteção Ambiental americana (EPA) em 1992 concluiu que a fumaça ambiental do tabaco é um carcinógeno pulmonar humano e é responsável pela morte de vários fumantes passivos (MILLER et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o tabaco é responsável por 4 milhões de óbitos anualmente, o que equivale a 8% da mortalidade geral mundial. Caso o consumo do tabaco não diminua, estima-se que em 2020 haja 10 milhões de mortes por ano relacionado a esse consumo, ultrapassando mais mortes do que as provocadas por AIDS, tuberculose, mortalidade materna, acidentes de trânsito, suicídios e homicídios juntos. No Brasil, o consumo do tabaco leva à morte em média 80 mil pessoas por ano, sendo também responsável por 85% dos casos de bronquite crônica e enfisema pulmonar, 90% dos casos de câncer de pulmão, 25% dos casos de infarto do miocárdio e 25% dos derrames cerebrais. Por causa do hábito de fumar cigarro, a cada hora morrem 10 brasileiros (GALVÃO et al., 2003). Os adolescentes que aderem a esse hábito ainda muito cedo, e o cultivam por duas décadas ou mais, acabam por diminuir a sua expectativa de vida em 20 a 25 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

O hábito de fumar é relacionado a uma variedade de tipos de câncer tais como câncer de boca, faringe, laringe, esôfago, pâncreas e bexiga, e também é responsável por cerca de 90% das mortes causadas por câncer de pulmão. Nos Estados Unidos o ato de fumar cigarros foi considerado o fator ambiental de maior importância na contribuição para mortes prematuras evitáveis (ALENCAR, 2005).

Outras doenças relacionados ao fumo podem ser listadas: doenças aéreas obstrutivas crônicas, pneumonia, infarto do miocárdio, doenças cardiopulmonares, aneurisma da aorta, doença periférica vascular, derrame, úlcera péptica, dentre outras (WILLS, 1997).

Chan et. al. (2004), afirmaram que o tabaco juntamente com o álcool são drogas lícitas amplamente consumidas pela população em geral, sendo que, seu uso por mulheres no período gestacional é um sério problema de saúde pública.

Estudo realizado no Hospital Universitário – USP em São Paulo no ano de 1996 mostrou que em entrevistas realizadas com gestantes, 25% afirmaram ter utilizado álcool socialmente e 28% fizeram uso do cigarro, sendo que 74% destas usaram até 10 cigarros por dia e 6% ingeriram álcool e fumaram cigarro simultaneamente (COSTA et al., 1998).

Koren et al., (1992), relataram a comparação da concentração de nicotina e cotinina em bebês de mães fumantes e não fumantes. Os bebês de mães fumantes apresentaram um nível bem maior dessas substâncias em relação aos bebês de mães não fumantes. Observaram também que o fato destas substâncias serem encontradas nos bebês das mães não fumantes se dá pelo fumo passivo da mãe.

O hábito de fumar no período da gravidez é um sério fator de risco para uma diversidade de efeitos maléficos ao feto e complicações antes do parto que podem ocorrer de diversas formas. O cigarro afeta o funcionamento normal da placenta: as substâncias presentes no cigarro conseguem atravessar a placenta e chegar ao feto, agindo como vasoconstritores o que reduz o fluxo de sangue no útero. Essa ação resulta na diminuição do fornecimento de nutrientes e oxigênio para o feto que gera um quadro de hipóxia e desnutrição (LAW et al., 2003; ALIYU et al., 2010). Outro mecanismo de ação dos componentes do cigarro se dá pela grande afinidade que o monóxido de carbono tem pelas moléculas de hemoglobina, e quando essa ligação entre eles ocorre há a formação da carboxihemoglobina, o que diminui a oferta de oxigênio para o feto. Já a nicotina é capaz de aumentar a pressão sanguínea materna o que também prejudica o fluxo sanguíneo para o feto (ALIYU et al., 2010). Esses mecanismos são os primeiros passos para o retardo do crescimento fetal (LAW et al., 2003).

De acordo com um estudo realizado por Köhler et al. (2007) o fumo é considerado um importante fator de risco das complicações ocorridas na gravidez, sendo um dos maiores causadores de morte súbita infantil. Outras complicações que

podem atingir o feto são: aborto espontâneo, parto pré-maturo e baixo peso ao nascer (BARANOWSKI et al., 1998). A exposição intra-uterina aos componentes do cigarro acarreta também em diminuição do crescimento fetal, danos no desenvolvimento cerebral e aumento da possibilidade de dependência ao cigarro na vida adulta (GRAY et al., 2008), além de anomalias congênitas como fenda palatina e microcefalia (UTAGAWA et al., 2007).

Esse hábito é relacionado a mortalidade perinatal, déficit de atenção, hiperatividade (HUESTIS, et al, 2002), problemas no desenvolvimento neuronal e cognitivo (CHAN, et al., 2004; KOREN et al., 1992), ruptura de membranas, placenta prévia, deslocamento prematuro de placenta, pré-eclâmpsia (ALIYU et al., 2010; SHERIF et al., 2004). O fumo durante a gravidez também é relacionado a infecções do trato respiratório durante a primeira infância (NUESSLEIN et al., 1999; KÖHLER et al., 2007), e essas infecções estão associadas a altas concentrações de cotinina em amostras biológicas do recém nascido (BEARER, 2003), ao aumento de defeitos cardíacos congênitos, infecções pós natal em prematuros (GRAY et al., 2008), e aumento da chance de dependência de nicotina na vida adulta (GRAY et al., 2008). Pode causar o aumento do risco de redução congênita de membros, mas é raro, e também é relacionado ao aumento do risco de gravidez ectópica (WILLS, 1997).

Esses efeitos causados pelo uso do cigarro durante a gravidez são mais corriqueiros em fumantes pesados, já em mulheres que pararam de fumar até o terceiro mês de gestação essa incidência é reduzida (WILLS, 1997).

A nicotina presente na circulação materna atravessa a membrana amniocoriônica e certa quantidade dessa substância alcança o feto via placenta e é eliminada no fluido amniótico pela urina (KÖHLER et al., 2010). A nicotina consegue atravessar a placenta com menos de 1% convertida em cotinina, e não há estudos que relatam a transferência placentária de seus metabólitos ou sobre a capacidade de metabolização do feto (GRAY et al., 2008).

Quando é realizada a identificação precoce da exposição gestacional a drogas ilícitas, álcool e tabaco, intervenções terapêuticas podem ser utilizadas. As mães que dão continuidade ao uso dessas substâncias durante o período gestacional colocam o recém-nascido em risco de desenvolver sérios problemas de saúde (DERAUF et al., 2003). Por sentimento de culpa, vergonha e até mesmo medo de serem repreendidas, muitas grávidas que fumam durante a gravidez não revelam esse hábito (CHAN et al., 2004).

Hoje em dia é possível avaliar o grau de exposição ao cigarro, medindo a concentração de nicotina e, de seu metabólito, cotinina em amostras biológicas como sangue, urina, fluido oral, cabelo e mecônio (CORREA et al., 1985 apud BARANOWSKI et al., 1998; GRAY et al., 2008).

A obtenção de amostras biológicas comumente utilizadas nas análises toxicológicas tais como sangue e urina, em recém-nascidos, é uma etapa que apresenta alguns problemas como a invasividade no casos de amostras de sangue e a dificuldade na amostragem na obtenção de amostras de urina. Além disso, tais amostras não indicarão o consumo da droga a longo prazo, ficando restrito ao uso recente (BARANOWSKI et al., 1998).

Köhler et al. (2007) relataram que a determinação de nicotina e cotinina em amostras de urina simplesmente revela a exposição mais recente ao cigarro, ou seja, caso a mãe tenha entrado em contato com a fumaça do tabaco poucos dias antes da análise. Em relação às amostras de cabelo, a nicotina é acumulada nos fios e revela a exposição caso haja contato com o cigarro num período de 3 meses de gestação. O problema do uso do cabelo como matriz é que frequentemente o bebê nasce com pouco cabelo, não sendo suficiente para análise. Para os bebês que nascem com muito cabelo, existe a dificuldade em se convencer as mães sobre a permissão para a coleta.

Os estudos que tem sido realizados para a exposição intra-uterina ao tabaco englobam as análises de nicotina e cotinina em amostras de soro e urina coletadas da mãe, além de entrevistas. Porém, o ponto fraco é que esses métodos somente avaliam indiretamente a exposição fetal, além das entrevistas com as mães não serem 100% confiáveis, pois em vários casos existe a negação da mãe sobre a utilização de qualquer substância durante a gestação, o que muitas vezes não se confirma após a realização de testes toxicológicos (BARANOWSKI et al., 1998; KINTZ et al., 1992).

O mecônio é o primeiro material fecal do recém-nascido, apresenta consistência pegajosa e coloração que varia entre o verde escuro ao preto o que difere das fezes normais e também das chamadas fezes de transição que são de coloração amarelada e muitas vezes de aspecto aquoso (BEARER, 2003). Sua formação começa por volta da 12ª a 16ª semana de gestação e acumula no intestino do feto até o momento do parto, sua eliminação ocorre até o 5º dia de vida. É uma matriz complexa composta de água, mucopolissacarídeos, lipídeos, proteínas, vernix

caseosa, ácidos e sais biliares, colesterol, precursores do esterol, células epiteliais, células sanguíneas, células escamosas, resíduos do fluido amniótico e enzimas(MOORE et al., 1998). Além de sua complexa composição, também podem ser encontrados uma série de xenobióticos com os quais a mãe pode ter tido contato durante a gravidez, como por exemplo, drogas ilícitas, terapêuticas, cigarro, álcool e pesticidas (GRAY et al., 2009). O acúmulo de xenobióticos se dá por sua incorporação no mecônio através de difusão passiva, deglutição do líquido amniótico onde os xenobióticos foram excretados pela liberação de urina do feto e excreção biliar fetal. De uma forma muito particular, pode ocorrer a liberação do mecônio, ainda dentro da barriga da mãe, no líquido amniótico como sinal de estresse, mas mesmo assim a grande parte desse material permanece no intestino do feto (BEARER, 2003).



**Figura 3** – Foto de uma fralda com mecônio.

O acúmulo de substâncias no mecônio, já que ocorre durante meses, produz altas concentrações de substâncias e uma ampla janela de detecção (GRAY et al, 2008). Aparentemente a janela de detecção de substâncias no mecônio é de mais ou menos 20 semanas da gestação e é uma matriz muito indicada para verificação de exposição intrauterina, a amostragem é fácil, não invasiva e coleta-se o material diretamente da fralda. As drogas permanecem estáveis por mais de duas semanas a temperatura ambiente e por no mínimo um ano quando refrigeradas (MOORE et al., 1998). Uma boa quantidade de mecônio pode ser conseguida até o 3º dia de vida do

recém nascido e a presença de nicotina e seus metabólitos reflete a exposição intrauterina ao cigarro (KÖHLER et al., 2007).

Nas últimas duas décadas, o mecônio tem sido considerado a matriz de escolha para avaliação da exposição intrauterina a xenobióticos. Como seu acúmulo começa por volta do 2º trimestre de gestação até o parto, ele serve como um reservatório de substâncias (GRAY et al., 2009). A determinação de drogas de abuso em mecônio é bem desenvolvida, enquanto que para os biomarcadores do tabaco é menos prevalente e com isso ainda há uma série de questões a serem desvendadas como a disposição e prevalência desses biomarcadores nessa matriz (GRAY et al., 2010). A desvantagem encontrada para a utilização do mecônio em análises toxicológicas está relacionada à sua complexidade e heterogeneidade, necessitando assim de etapas adicionais de preparo e limpeza das amostras e extração dos analitos (SALEM et al., 2001), e o material deve ser bem misturado para facilitar a uniformidade dos xenobióticos por toda matriz (MOORE et al., 1998).

Existem muitas técnicas para avaliar a presença de nicotina e seus metabólitos em amostras biológicas. Como exemplo temos as técnicas de Cromatografia em fase gasosa (GC) e a Cromatografia em fase líquida, empregando diferentes detectores como (LC-UV/Vis) e espectrômetro de massas (GC/MS ou LC/MS), além das técnicas enzimáticas como Radioimunoensaios (Radioimmunoassay - RIA) e Imunoensaio de Enzimas (Enzyme Linked Immunoassay - ELISA) (HOOFNAGLE et al., 2006; BAIDOO et al., 2003; KIM et al., 2005; KATAOKA et al., 2009). A melhor das opções é a cromatografia acoplada à espectrometria de massas por fornecer um resultado mais confiável e ser considerado o método de confirmação.

As análises de nicotina e cotinina, em baixos níveis de concentração em amostras biológicas requerem metodologias sensíveis e seletivas (HARIHARAN et al., 1991). A utilização de espectrometria de massas para a detecção dessas substâncias é a técnica mais indicada por sua alta seletividade e sensibilidade.

# **Aspectos Éticos da Pesquisa**

## 2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). A aprovação do Comitê de Ética segue em anexo (anexo1).



## **Objetivos**

### **3. OBJETIVOS**

- 1) Desenvolver e validar um método analítico empregando Cromatografia em fase gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS) para determinação de nicotina e cotinina em amostras de mecônio;
- 2) Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de mecônio coletadas de recém nascidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

## **Materiais e Métodos**

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Reagentes e padrões**

O padrão da nicotina, cotinina e o padrão interno lidocaína foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA. Os reagentes necessários para as análises foram: metanol e diclorometano (grau P.A. - JT Baker, EUA), isopropanol e hidróxido de amônio (grau P.A. – Mallinkrodt, EUA), ácido acético glacial (grau P.A. - Merck, Brasil), carbonato de sódio anidro (Synth, Brasil), bicarbonato de sódio (Chemco, Brasil).

### **4.2. Equipamentos e acessórios**

Para a realização das análises, foi utilizado um cromatógrafo em fase gasosa CP 3800 acoplado a um espectrômetro de massas, modelo Saturn 2000 (Varian, EUA), com um amostrador automático CombiPal (CTC Analtics, Suíça); coluna capilar de sílica fundida HP-5MS de 20 m x 0,18 mm x 0,18 µm de espessura de filme (Agilent, EUA); cilindro de gás hélio 5.0 analítico (White Martins, Brasil); microseringa (Hamilton, EUA); agitador de tubos (Phoenix AP 56, EUA); mesa agitadora orbital (Tecnal TE 140, Brasil); centrífuga (Hettich, Alemanha); evaporador (TurboVap LV, Caliper LifeScience, EUA); compressor (Schulz, CSA-7,5, Brasil); balança analítica (Sartorius, BL 1500S, EUA), deionizador de água (Simplicity, Millopore, EUA), cartuchos Bond Elut Certify I (Varian, EUA), manifold 12 posições (Supelco, EUA) e bomba de vácuo (Tecnal TE 058, Brasil).

### **4.3. Preparação das soluções padrão de calibradores, controle de qualidade e padrão interno**

Para preparação da solução padrão de calibradores e controle de qualidade de nicotina e cotinina, e do padrão interno lidocaína, foram pesados 10mg de nicotina, cotinina e lidocaína que foram diluídas para concentrações de 1mg, 100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL da seguinte forma: 10 mg de cada padrão foram pesados separadamente em balões volumétricos de 10mL e o volume foi

completado com metanol dando origem a uma solução de 1mg/mL. Em seguida, 1mL dessa solução foi transferido para outro balão volumétrico de 10mL originando a solução de 100 µg/mL, e assim sucessivamente até originar a solução de 1 µg/mL. Para o padrão interno lidocaína foi preparada uma solução

#### **4.4 Preparação do tampão carbonato/bicarbonato pH 9,0**

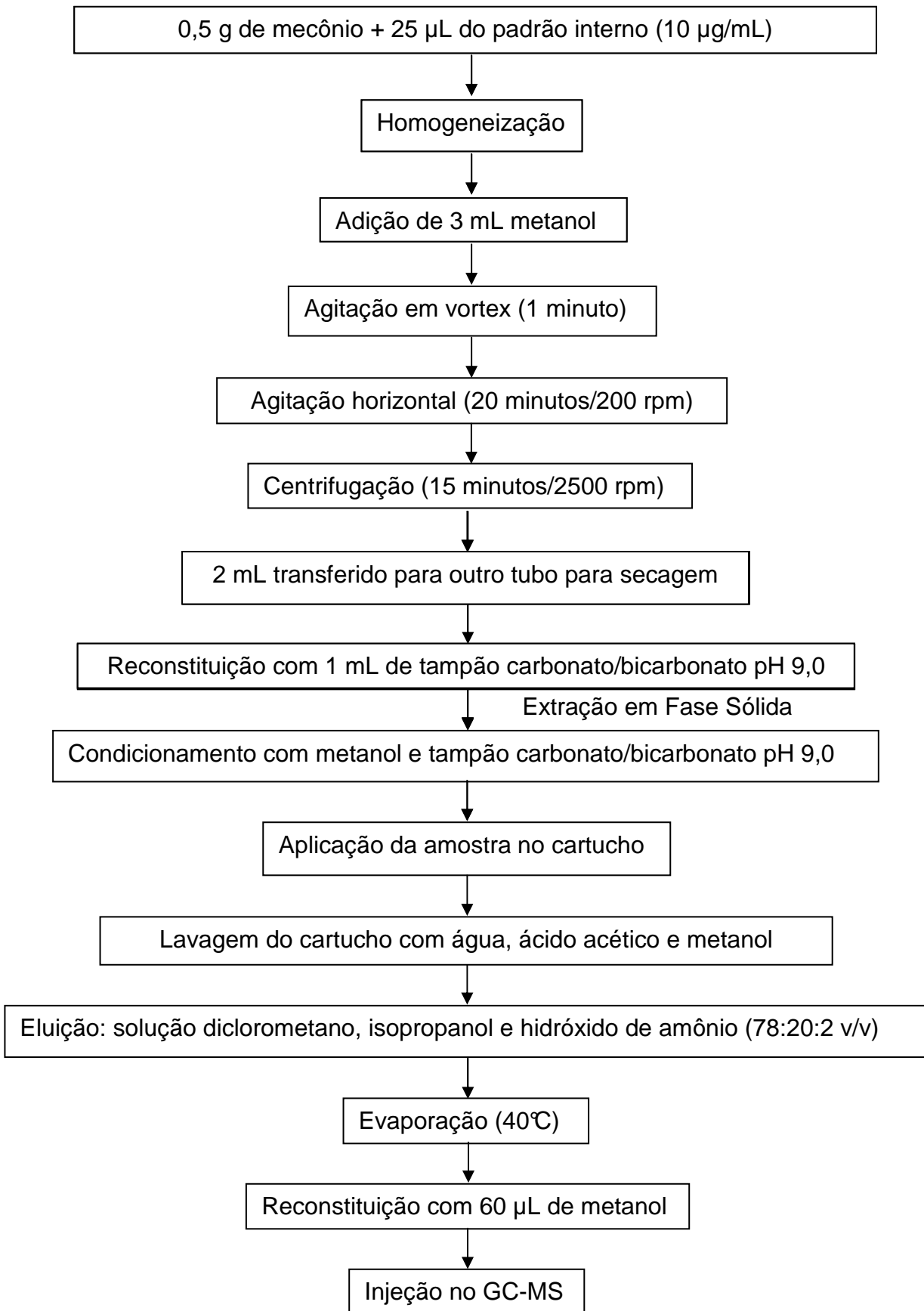
Preparou-se uma solução saturada de bicarbonato de sódio (60g/L de água). Em seguida, o pH foi ajustado a 9,0 com carbonato de sódio anidro.

#### **4.5 Preparação da solução de ácido acético aquoso**

Preparou-se uma solução de ácido acético aquoso a 1,0 M. Foram pipetados 5,75 mL do ácido acético glacial em um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água deionizada.

#### **4.6 Metodologia**

O método desenvolvido para a extração da nicotina e cotinina do mecônio foi desenvolvido a partir do método proposto por Gray et. al. (2009). O diagrama esquemático do processo de preparação da amostra de mecônio está representado na Figura 4:



**Figura 4** – Esquemática da preparação de amostra.

0,5 g de mecônio foi pesado em um tubo de ensaio e fortificado com 250 ng do padrão interno. A mistura foi homogeneizada com o auxílio do vortex. Em seguida foi adicionado 3 mL de metanol e o tubo foi novamente agitado em vortex por 1 minuto. Em seguida, o tubo foi submetido a agitação horizontal por 20 minutos a 200 rpm. A amostra foi centrifugada por 15 minutos a 2500 rpm, seguida de transferência de 2 mL da fase orgânica para outro tubo de ensaio. O extrato foi evaporado até aproximadamente 60 µL a 40°C e reconstituído com 1 mL de tampão carbonato/bicarbonato de pH 9,0. A amostra foi então submetida a extração em fase sólida com cartuchos *Bond Elut Certify I* acoplados a um *manifold* ligado a uma bomba de vácuo. Primeiramente, os cartuchos de extração foram condicionados com 3 mL de metanol e 1 mL do tampão carbonato/bicarbonato de pH 9,0. Em seguida a amostra foi adicionada e eluída por gravidade. Posteriormente o cartucho foi lavado com 3 mL de água, 1 mL de ácido acético aquoso. Foi utilizado o vácuo de 50 kPa por 5 minutos para que o cartucho ficasse completamente seco. Mais 3 mL de metanol foi adicionado para completar a lavagem e novamente foi utilizado o vácuo de 50 kPa por 5 minutos para que o cartucho ficasse completamente seco. A eluição foi realizada com 3 mL de uma solução de diclorometano:isopropanol:hidróxido de amônia (78:20:2 v/v). Esse extrato foi evaporado a 40°C no concentrador de amostras e reconstituído com 60 µL de metanol, agitado em vortex e transferido para o *vial* para análise.

#### **4.7 Parâmetros utilizados na validação da metodologia**

Os parâmetros utilizados para validação do método foram os recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentados na resolução RE n° 899 de 29 de maio de 2003.

##### **4.7.1. Limite de detecção**

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado. É estabelecido por meio da análise de amostras fortificadas com soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível

detectado, mas não necessariamente quantificado, em que a razão sinal/ruído seja de 3:1.

Os experimentos foram realizados em duplicata, fortificando-se as amostras de mecônio com concentrações decrescentes, até que os picos cromatográficos dos analitos em questão apresentassem valores iguais ou maiores que 3 para a relação sinal/ruído, em ambas corridas.

#### **4.7.2. Limite de quantificação**

O limite inferior de quantificação é a menor concentração na qual os analitos podem ser detectados e quantificados com precisão de até 20% e exatidão entre 80 e 120%. O limite superior de quantificação é a maior concentração que pode ser determinada com precisão de até 15% e exatidão entre 85 a 115%.

O limite inferior de quantificação foi estabelecido por meio de análises de mecônio fortificado com concentrações decrescentes dos analitos até o menor nível quantificado, com precisão e exatidão aceitáveis, considerando-se a razão sinal/ruído de 10:1.

#### **4.7.3. Linearidade**

É a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esse parâmetro é avaliado através da injeção de amostras em concentrações crescentes para se obter uma curva analítica cujos pontos são determinados correlacionando-se cada concentração com o valor obtido na razão entre a área do padrão sobre a área do padrão interno.

#### **4.7.4. Precisão**

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. É determinada utilizando-se, no mínimo 3 concentrações



(baixa, média e alta), que estejam dentro do intervalo da curva de calibração, realizando-se no mínimo 5 determinações por concentração.

Precisão intra-ensaios: é a concordância entre os resultados obtidos em análise dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Precisão inter-ensaio: é a concordância dos resultados obtidos pelo mesmo laboratório em dias diferentes, com analista diferente e/ou equipamentos diferentes.

Pode ser expressa como Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite valores de até 20%, segundo a fórmula abaixo:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

Onde:

DPR: Desvio Padrão Relativo

DP: Desvio Padrão

CMD: Concentração Média Determinada

A precisão foi realizada em 5 dias. Foram avaliadas as precisões intra e inter-ensaio com a utilização de 5 replicatas para cada um dos 3 controles de qualidade (baixo, médio e alto). A precisão intra-ensaio foi calculada obtendo-se os coeficientes de variação dos controles de qualidade de cada composto dividindo-se o desvio padrão pela média aritmética em cada dia de análise. Para a precisão inter-ensaio, foi calculado o coeficiente de variação de todas as análises dividindo-se pela média aritmética de todas as análises, que forneceram ao todo 25 ensaios.

#### 4.7.5. Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia estudada em relação ao valor verdadeiro. É calculada pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = (\text{CME}/\text{CT}) \times 100$$

Onde :

CME: Concentração Média Experimental

CT: Concentração Teórica

A exatidão é avaliada utilizando-se no mínimo 3 concentrações (baixa, média e alta) ao longo da faixa de variação da curva de calibração, com no mínimo 5 determinações por concentração. Os valores de exatidão aceitos podem variar de 80 a 120% para o limite inferior de quantificação e de 85 a 115% para os demais pontos. A exatidão da metodologia foi avaliada juntamente com a precisão, aplicando-se o cálculo nas médias das concentrações dos cinco dias de análises para cada controle de qualidade.

#### **4.7.6. Recuperação**

A recuperação mede a eficiência do método em extrair os analitos de uma matriz biológica dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a % são desejáveis, embora admita-se valores menores, desde que o método seja preciso e exato. Foi determinada comparando-se os resultados de quantificação de amostras que foram fortificadas posteriormente a extração, com os resultados de quantificação das amostras que foram fortificadas anteriormente a extração. Os padrões internos foram adicionados anteriormente a extração nas duas situações, de forma que os resultados de quantificação obtidos pudessem avaliar a capacidade do solvente de extrair os analitos do mecônio quando fossem comparados com uma situação que, teoricamente, equivale a 100% de eficiência de extração. A recuperação foi avaliada nos controles de qualidade.

#### **4.7.7. Especificidade**

É a capacidade que o método apresenta de detectar e quantificar com exatidão aceitável um composto em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de decomposição, metabólitos, medicamentos e componentes da matriz biológica. O limite inferior de quantificação não deve ser quantificado fora do intervalo entre 80 a 120% quando calculado na presença dos interferentes investigados. Foi determinada através da fortificação das amostras de mecônio na

concentração dos controles de qualidade inferiores juntamente com quantidades elevadas (1000 ng/g de mecônio) de possíveis compostos interferentes que podem estar presentes em situações reais de análise. Os interferentes avaliados foram: sulfato ferroso, fluoxetina, diazepam, dipirona, ácido acetilsalicílico, efedrina e cocaína.

#### **4.7.8. Estabilidade**

Permite avaliar a propriedade que o analito e o método apresentam de resistir a condições normalmente exigidas durante a análise.

No presente projeto foi avaliada a estabilidade das amostras e extratos:

- 1) Estabilidade de longa duração: avalia o tempo em que o analito pode permanecer em uma matriz biológica quando congelado a -20°C.
- 2) Estabilidade pós processamento: avalia o tempo em que as amostras podem ser analisadas após preparadas. Foi determinada através da reinjeção dos controles de qualidade 12 horas após o término da preparação destes.
- 3) Estabilidade de curta duração: A estabilidade de curta duração avalia o tempo em que o composto pode resistir à temperatura à qual normalmente está exposto sobre a bancada de análise.
- 4) Estabilidade de congelamento e descongelamento: A estabilidade de congelamento e descongelamento avalia a capacidade do composto de resistir à degradação quando submetido a vários ciclos de congelamento e descongelamento.

#### **4.7.9. Carry over**

Avalia a influência de uma análise anterior no resultado da análise seguinte, devido a resíduos que podem permanecer retidos em alguns componentes do cromatógrafo como *liner*, injetor, coluna, seringa e detector. Sua avaliação foi feita submetendo uma amostra de mecônio branca (sem a presença dos compostos investigados) logo após a análise do ponto mais alto da curva de calibração

#### **4.8. Casuística**

As amostras de mecônio necessárias para o desenvolvimento e validação da metodologia de análise estão sendo coletadas de recém nascidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, cujas mães aceitam participar da pesquisa em questão. Os critérios de inclusão são: mães que possuam residência fixa, união estável, tenham um filho ou mais e, que as mães fumantes admitam o uso do cigarro e as não fumantes registre a negação do uso do cigarro. A coleta das amostras que se iniciou em 21 de setembro será realizada até o final de 2009. Após o parto quando a mãe já se encontra no quarto, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido juntamente com o questionário são aplicados a aquelas mães que aceitarem participar da pesquisa. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e foi considerado aprovado na data de 16 de setembro de 2009.

## **Resultados e Discussão**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Desenvolvimento do método

Alguns processos de extração foram avaliados inicialmente no desenvolvimento do método, foram eles: *Headspace*, microextração em fase sólida, extração líquido-líquido e extração em fase sólida.

Inicialmente foi empregada a técnica de *Headspace* que consiste na preparação de uma solução contendo a amostra de mecônio fortificada com nicotina e lidocaína, e uma solução tampão de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  de pH 9,0, que é colocada em frasco de vidro lacrado. Após a incubação a  $100^\circ\text{C}$  por 12 minutos, a fase vapor é injetada no cromatógrafo para análise. Além da solução tampão de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  de pH 9,0, uma tentativa foi feita utilizando apenas água fortificada com nicotina e lidocaína e que foi aquecida a  $110^\circ\text{C}$  por 20 com agitação a cada 5 minutos. Os resultados obtidos com essa técnica não foram satisfatórios, pois a recuperação da nicotina foi muito baixa.

Outra técnica testada foi a microextração em fase sólida (SPME) no modo de *Headspace* e utilizando a fibra de extração e PDMS/DVB. Nessa técnica, após a incubação ( $60^\circ\text{C}$  por 25 minutos sob agitação magnética constante) da solução contendo amostra de mecônio fortificada com nicotina e lidocaína, e uma solução tampão de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  de pH 9,0, uma fibra é exposta por 15 minutos na fase vapor e, na qual, potencialmente, deveria ocorrer a adsorção do analito. Posteriormente a fibra é inserida no injetor do cromatógrafo em fase gasosa por 1 minuto onde os analitos são dessorvidos e entram na coluna cromatográfica. A técnica de microextração em fase sólida apresentou boa recuperação para a nicotina, mas, não foi capaz de extrair a lidocaína. Não foram realizados testes com a cotinina pois, até então o padrão não estava disponível no laboratório naquele momento de análise

A extração líquido-líquido utilizando solventes também foi avaliada. Esta técnica de extração exaustiva é baseada na partição dos analitos em dois solventes imiscíveis de polaridades diferentes. Vários solventes foram testados para a extração tais como metanol, hexano, acetato de etilo, éter de petróleo, isopropanol,

éter etílico e heptano. A extração líquido-líquido apresentou boa resposta tanto para a nicotina quanto para lidocaína, mas, não foi capaz de extrair a cotinina.

A técnica escolhida para extração foi a extração em fase sólida (SPE), que foi realizada utilizando-se os cartuchos *Bond Elut Certify I*. Como o mecônio é uma matriz biológica complexa, etapas adicionais de limpeza são necessárias para se obter um extrato mais limpo (SALEM et al., 2001).

### **5.1.1. Otimização do método**

Após a escolha da SPE como técnica extratora, foram testados diferentes solventes para homogeneização e extração dos analitos da matriz. Inicialmente foram testados metanol, álcool isoamílico, éter de petróleo, 2-metil-1-propanol, isobutanol, éter etílico, álcool isopropílico, clorobutano e diclorometano. Cada um desses solventes foram adicionados separadamente em tubos de ensaio contendo as amostras de mecônio (0,5g) já fortificado para posterior extração com o método anteriormente descrito. O metanol foi o único solvente que apresentou resultado satisfatório em termos de extração dos 3 analitos pesquisados.

Duas formas de homogeneização do mecônio foram testadas: homogeneização com espátula e agitação em vortex. O uso da espátula pode levar a uma perda de material e conseqüente diminuição da sensibilidade, pois, boa parte do mecônio permanece aderida a ela. A agitação em vortex gerou resultados mais satisfatórios sem perda de matriz. O mecônio é uma matriz semi-sólida o que dificulta sua fortificação em comparação com matrizes aquosas como sangue e urina. Sendo assim, a completa incorporação dos controles de qualidade e do padrão interno não é garantida (Gray et al., 2009).

### **5.1.2. Curva de calibração**

Após a otimização do método, uma curva de calibração para cada analito com 6 concentrações foi construída: 160 ng, 400 ng, 600 ng, 1000 ng, 1200 ng e 1600 ng por grama de mecônio para nicotina e 160 ng, 300 ng, 500 ng, 600 ng, 800 ng e 1000 ng por grama de mecônio para cotinina. Os controles de qualidade foram

determinados para as seguintes concentrações em nanogramas por grama de mecônio:

**Tabela 1 – Valores dos Controles de Qualidade**

<b>Controles de Qualidade (CQ)</b>	<b>Nicotina</b>	<b>Cotina</b>
<b>CQ 1</b>	320	320
<b>CQ 2</b>	760	540
<b>CQ 3</b>	1200	760

Na curva de calibração foi necessário aplicar métodos matemáticos de ponderação, foi utilizado o fator de ponderação 1/x.

### 5.1.3. Determinação de nicotina e cotinina em amostras de mecônio

As concentrações de nicotina e cotinina foram determinadas utilizando um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas com analisador de massas do tipo *ion trap* no modo *Full Scan* de detecção. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB – 5MS de 20 m de comprimento x 0,18 mm x 0,18 µm de espessura de filme. As amostras são injetadas no modo *split*. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 0,6 mL/min.

As condições cromatográficas estão descritas abaixo:

- Temperatura do injetor: 240°C
- Temperatura do *trap*: 200°C
- Temperatura do *transfer line*: 230°C
- Temperatura do *manifold*: 40°C

**Tabela 2 – Programação da temperatura da coluna**

<b>Temperatura inicial</b>	<b>Taxa de aquecimento</b>	<b>Tempo de permanência</b>	<b>Tempo de corrida</b>
70	-	0	0
280	25	2	10,40

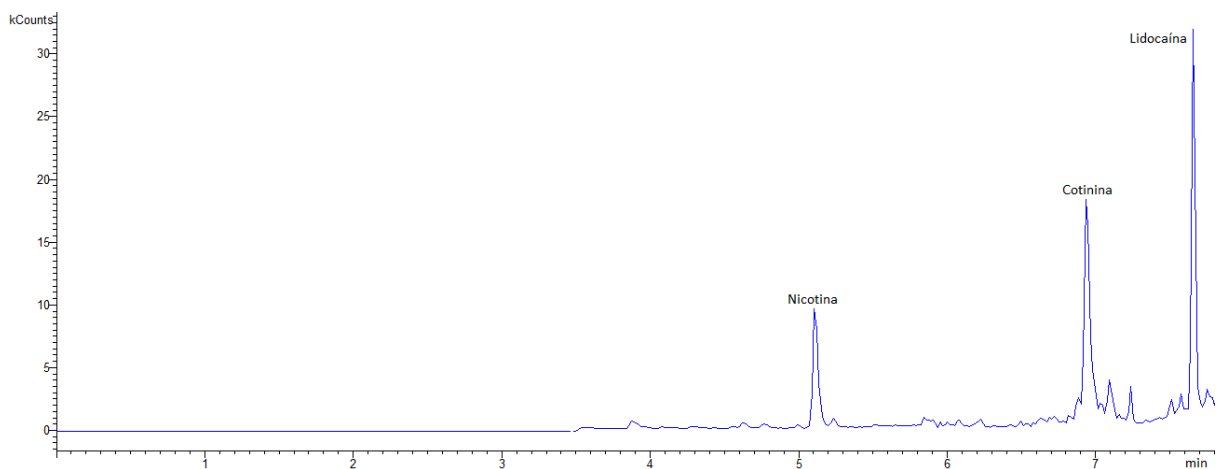


A Tabela 3 apresenta os íons monitorados na identificação e quantificação dos analitos.

**Tabela 3** – Íons utilizados na identificação e quantificação dos analitos e o tempo de retenção

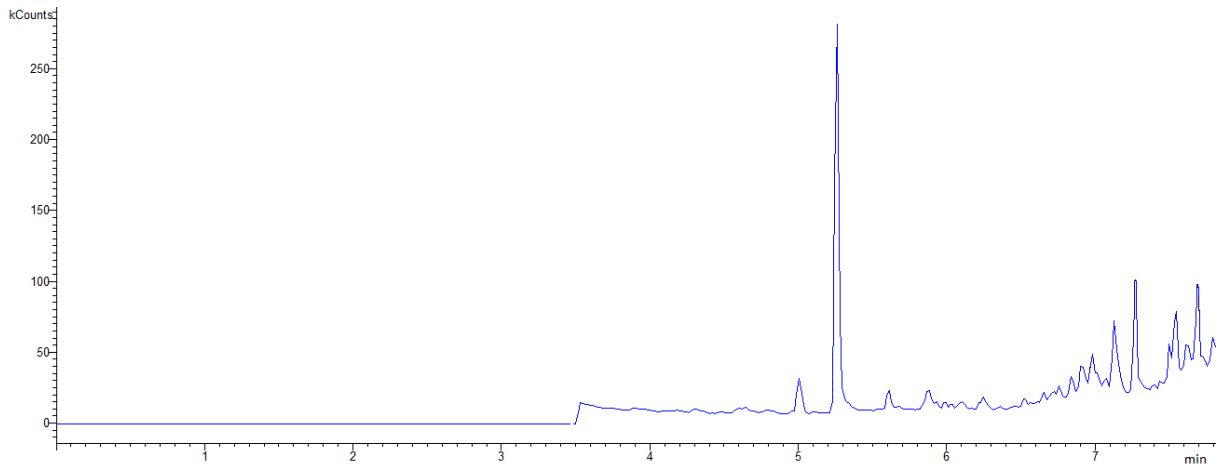
Analitos	Íons monitorados		Tempo de retenção
	Íons de identificação	Íon de quantificação	
Nicotina	84, 133, 162	84	5,122
Cotina	98, 147, 176	98	6,943
Lidocaína	58, 86, 235	86	7,670

A Figura 5 representa um cromatograma de uma amostra de mecônio fortificada com concentrações conhecidas dos analitos de interesse para identificação de seus respectivos tempos de retenção e verificação do sinal.



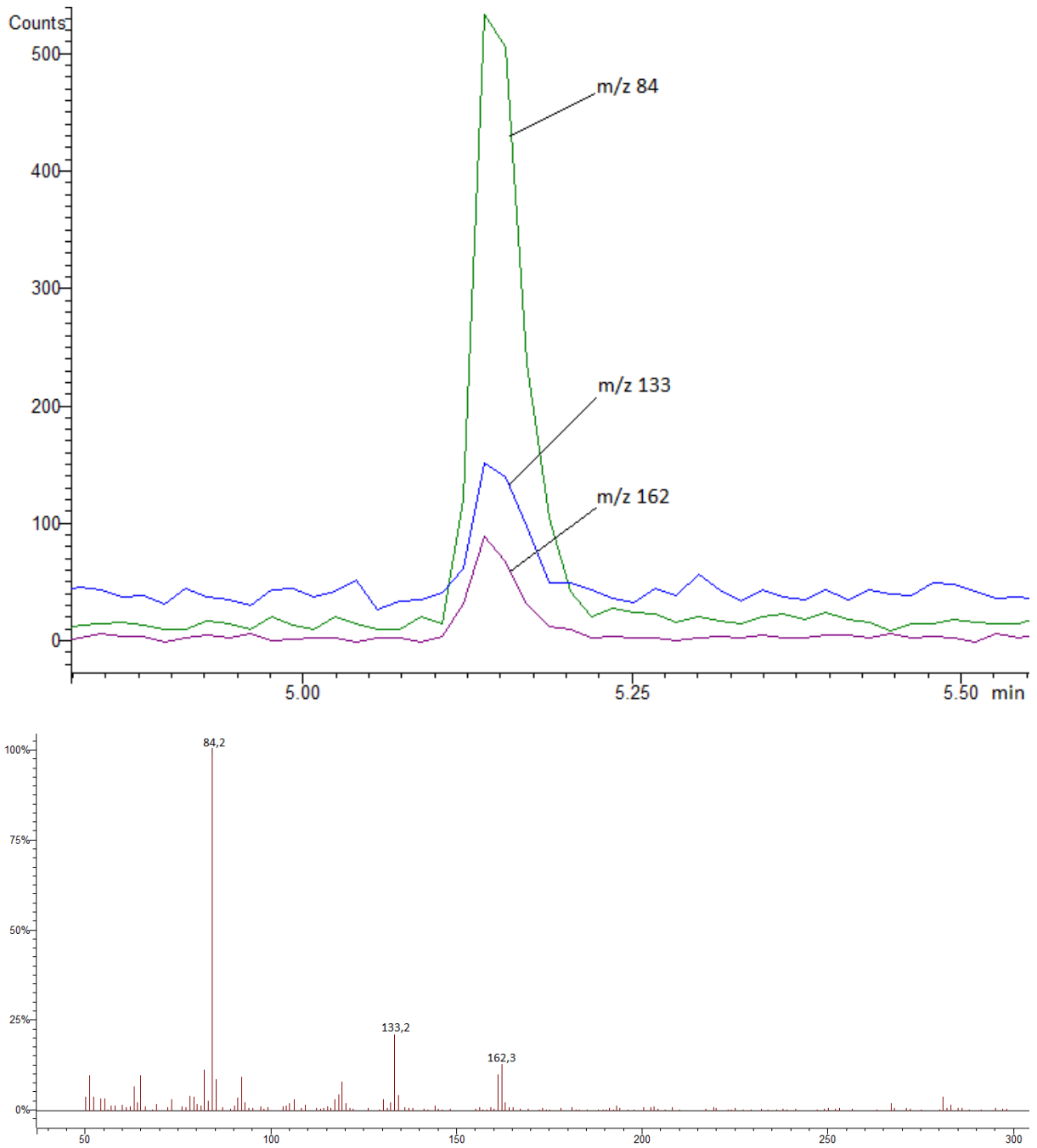
**Figura 5** – Cromatograma de uma amostra de mecônio fortificada com 300 ng/mL de nicotina, 250 ng/mL de cotina e 250 ng/mL do padrão interno lidocaína

O achado de uma matriz biológica, incluindo mecônio, que esteja isenta de nicotina e seus metabólitos é dificultado por causa da exposição ambiental e da nicotina presente em alguns alimentos (Gray et al., 2008). A Figura 6 representa um cromatograma de uma amostra de mecônio branco (isenta dos analitos em questão).

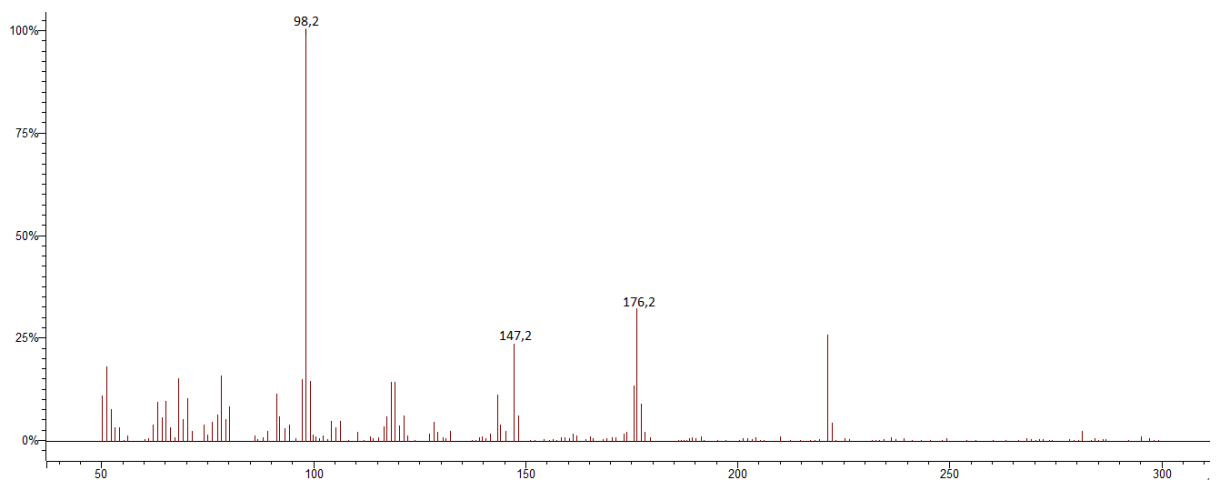
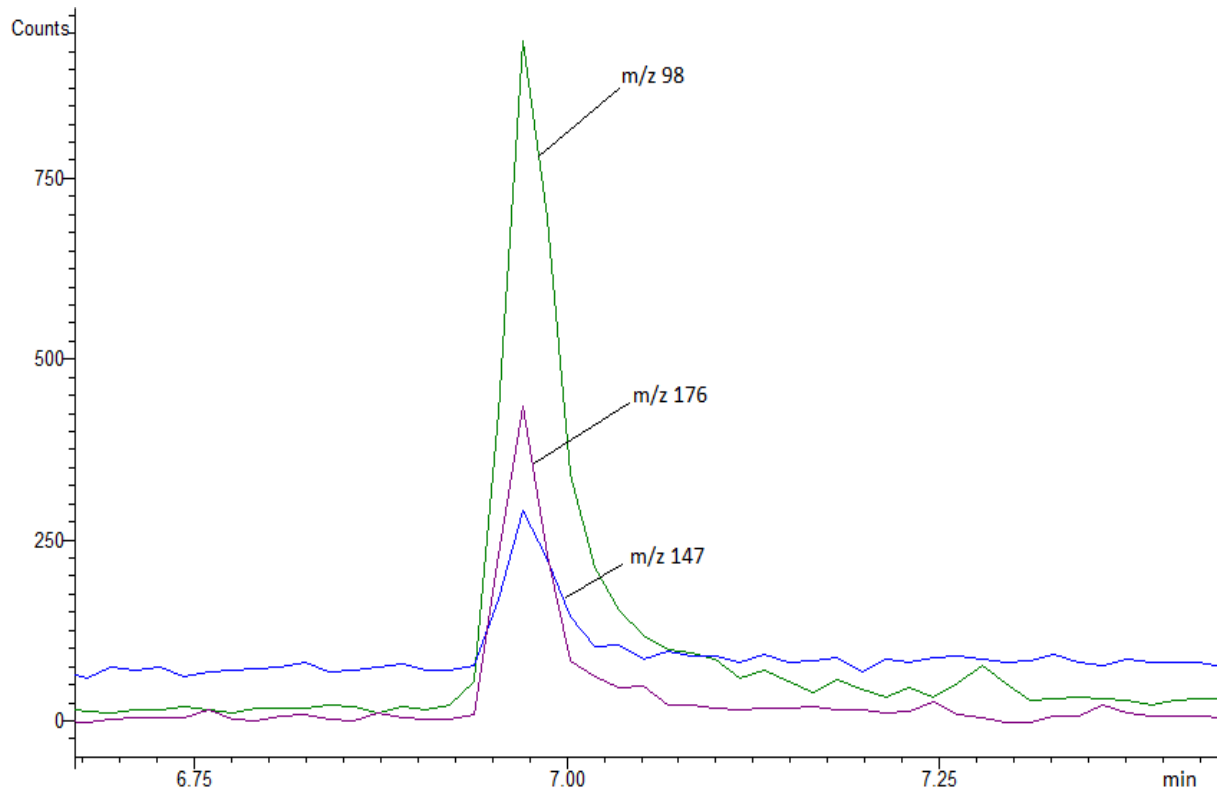


**Figura 6 – Cromatograma de uma amostra de mecônio branco**

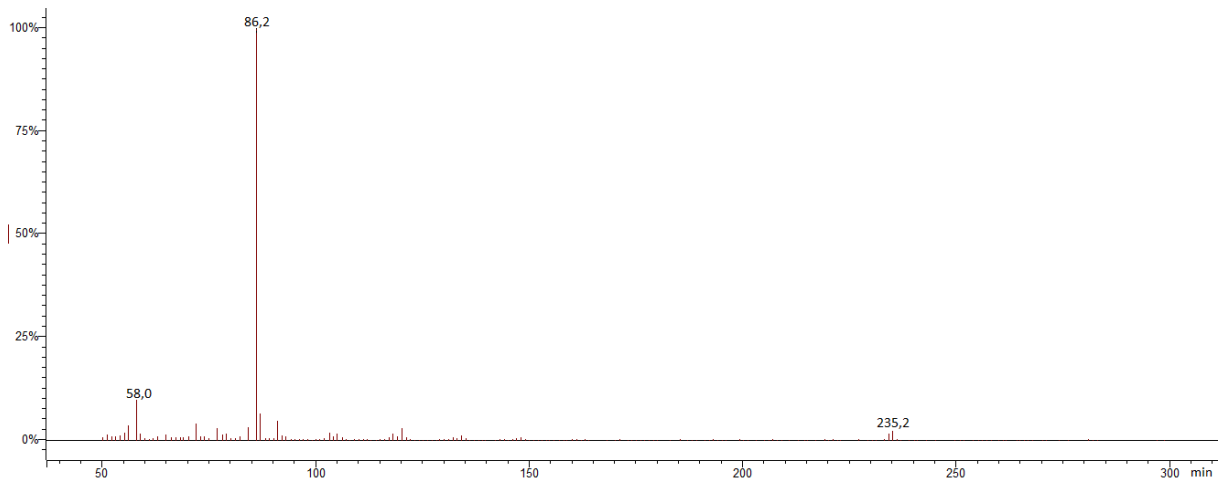
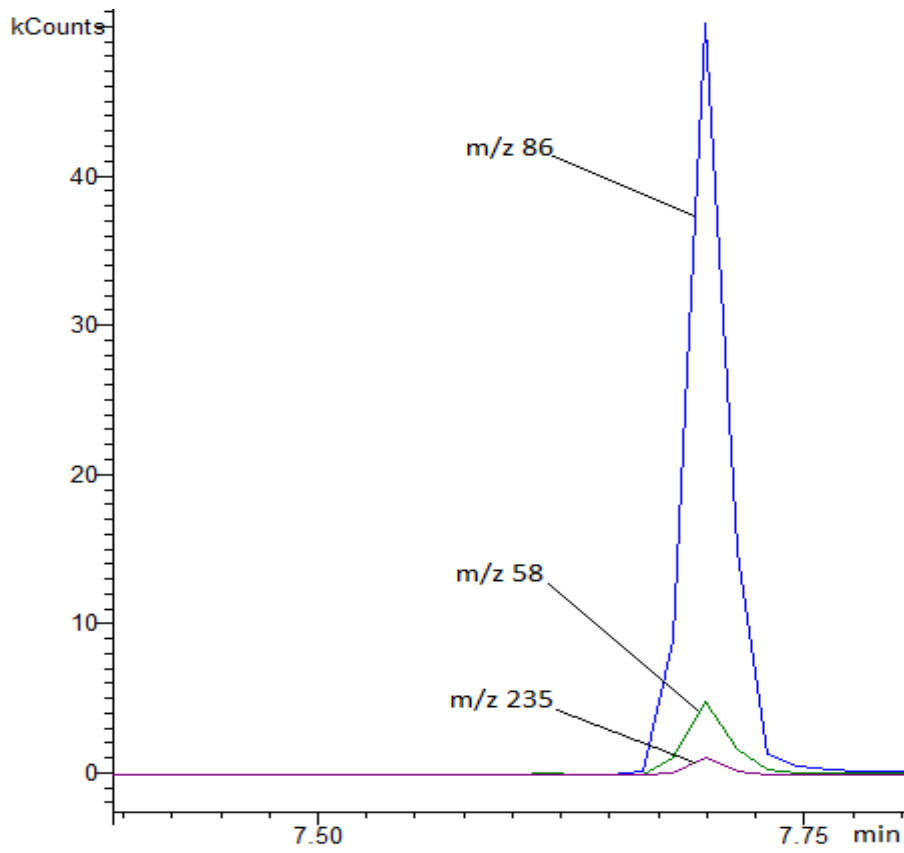
As Figuras de 7 a 9 representam os picos cromatográficos dos íons selecionados de cada analito, seguido dos respectivos espectros de massas.



**Figura 7** – Cromatograma dos íons selecionados para a nicotina e o respectivo espectro de massas



**Figura 8** – Cromatograma dos íons selecionados para a cotinina e o respectivo espectro de massas



**Figura 9** – Cromatograma dos íons selecionados para a lidocaína e o respectivo espectro de massas

## 5.2. Validação do método

### 5.2.1. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação da nicotina e cotinina foram determinados nas amostras de mecônio fortificadas com concentrações decrescentes a partir de 100ng/g de mecônio até 10ng/g de mecônio. Os valores obtidos para o limite de detecção, limite inferior de quantificação e limite superior de quantificação estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Limite de Detecção (LD), Limite Inferior de Quantificação (LIQ) e Limite Superior de Quantificação (LSQ)

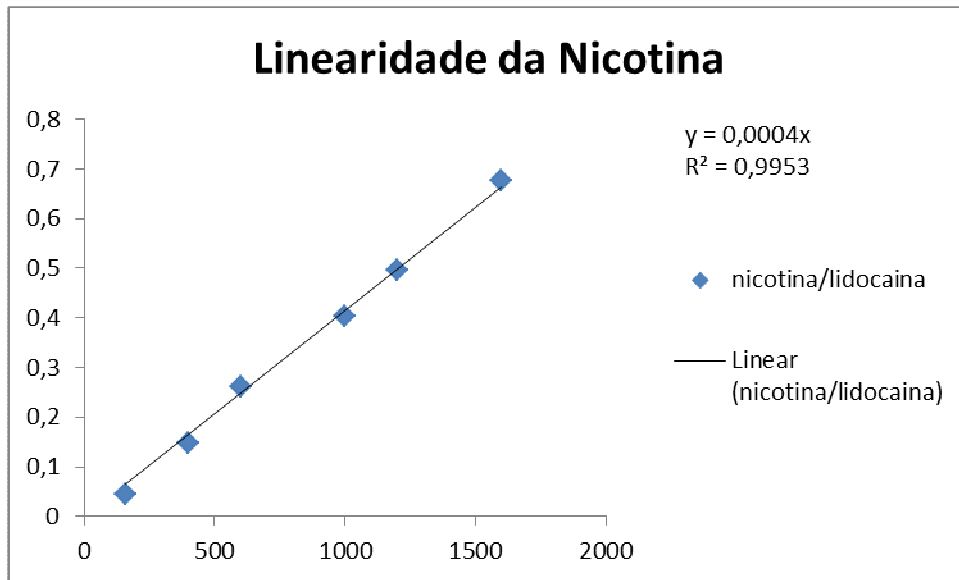
<b>Analito</b>	<b>LD (ng/g)</b>	<b>LIQ (ng/g)</b>	<b>LSQ (ng/g)</b>
<b>Nicotina</b>	10	60	1600
<b>Cotinina</b>	60	100	1000

Os valores encontrados por Gray et al. em 2008 utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas-espectrometria de massas (LC/MS/MS) para o LD da nicotina e cotinina foi de 1,25 ng/g e o LIQ para nicotina de 5 ng/g e para cotinina de 1,25 ng/g. Essa discrepância pode ter ocorrido devido a diferenças na realização do método e também no modo de análise com diferentes aparelhos utilizados.

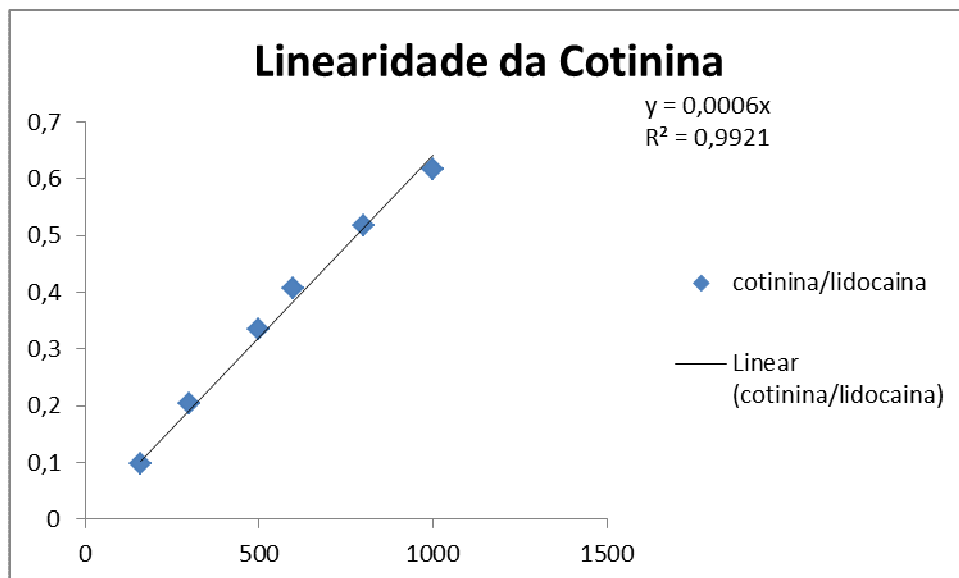
### 5.2.2. Linearidade

A linearidade do método verificada foi de de 160ng/g de mecônio a 1600ng/g para a nicotina e de 160ng/g a 1000ng/g para cotinina. Gray et al. em 2008 determinaram a faixa de linearidade de 1,25 – 500 ng/g para cotinina e de 5 – 500 ng/g para nicotina com  $R^2 > 0,99$ . E em Gray et al., 2009 utilizando novamente a LC/MS/MS obtiveram uma faixa de linearidade de 1-500 ng/g para cotinina e de 2,5 – 500 ng/g para nicotina com  $R^2$  de 0,998 para ambos analitos.

As Figuras 10 e 11 representam as curvas de calibração e linearidade de cada analito. O eixo Y representa a razão entre a área do padrão pela área do padrão interno e o eixo X representa a concentração do analito expressa em nanogramas por grama de mecônio.



**Figura 10** – Linearidade da nicotina



**Figura 11** – Linearidade da cotinina

### 5.2.3. Precisão

As análises foram realizadas em cinco dias alternados. A Tabela 5 representa os valores da precisão intra-ensaio e a Tabela 6 representa os valores da precisão inter-ensaio. Todos os valores encontrados estavam dentro do limite de variação aceitáveis, ou seja, até 20% para o CQ1 e até 15% para os CQ 2 e 3. A precisão intra-ensaio apresentou uma variação de 3,21% a 10,86%, que foram os valores do CQ3 e CQ1 da nicotina respectivamente. A precisão inter-ensaio variou de 4,91% a 9,88%, que correspondem aos valores do CQ2 da cotinina e do CQ1 da nicotina respectivamente.

**Tabela 5** – Valores da precisão intra-ensaio (%)

<b>Controles de Qualidade (CQ)</b>	<b>Nicotina</b>	<b>Cotinina</b>
<b>CQ 1</b>	10,86	8,40
<b>CQ 2</b>	6,86	3,93
<b>CQ 3</b>	3,21	6,74

**Tabela 6** – Valores da precisão inter-ensaio (%)

<b>Controles de Qualidade (CQ)</b>	<b>Nicotina</b>	<b>Cotinina</b>
<b>CQ 1</b>	9,88	9,10
<b>CQ 2</b>	8,33	4,91
<b>CQ 3</b>	8,64	8,50

### 5.2.4. Exatidão

Todos os controles de qualidade inferiores foram quantificados dentro do intervalo de 80% a 120% e os controles intermediários e superiores dentro do intervalo de 85% a 115%. A exatidão variou de 91,73%, para o CQ 1 da nicotina, a



103,73% para o CQ1 da cotinina. A Tabela 7 representa os valores médios de exatidão obtidos nos cinco dias de análise para os três controles de qualidade de cada um dos compostos.

**Tabela 7** – Valores de exatidão (%)

<b>Controles de Qualidade (CQ)</b>	<b>Nicotina</b>	<b>Cotinina</b>
<b>CQ 1</b>	91,73	103,73
<b>CQ 2</b>	97,63	100,19
<b>CQ 3</b>	103,04	92,88

### 5.2.5. Recuperação

A recuperação verificada para os compostos variou de 43,47% a 87,02% para o CQ 3 e CQ 1 da cotinina respectivamente. A Tabela 8 mostra os valores obtidos da recuperação para todos os CQs da nicotina e cotinina.

**Tabela 8** – Valores de recuperação (%)

<b>Controles de Qualidade (CQ)</b>	<b>Nicotina</b>	<b>Cotinina</b>
<b>CQ 1</b>	59,91	87,02
<b>CQ 2</b>	45,30	72,51
<b>CQ 3</b>	70,36	43,47
<b>Média</b>	58,52	67,66

Gray et al. em 2008 publicaram valores de recuperação médio de 75,6% para nicotina e 89,6% para cotinina. Já em 2009, Gray et al. com os mesmos parceiros obtiveram valores de recuperação médio para nicotina de 100,8% e para cotinina de 104,5%.

### 5.2.6. Especificidade

Esse parâmetro foi avaliado fortificando uma amostra de mecônio, sem a presença dos analitos, com nicotina, cotinina e lidocaína na concentração do controle de qualidade inferior (160 ng/g) e com substâncias, possíveis interferentes, na concentração de 1 µg/g. A Tabela 9 representa os valores dos controles de qualidade inferiores, para os analitos avaliados, na presença dos interferentes.

**Tabela 9** – Valores de especificidade (ng/g)

<b>Interferentes</b>	<b>Nicotina</b>	<b>Cotinina</b>
<b>Sulfato ferroso</b>	322	376
<b>Fluoxetina</b>	232	372
<b>Diazepam</b>	264	370
<b>Dipirona</b>	312	346
<b>Ácido acetilsalicílico</b>	250	328
<b>Efedrina</b>	304	342
<b>Cocaína</b>	358	336

Todos os valores encontrados estavam dentro do limite de variação permitidos de 20% para o controle de qualidade inferior. Exceto a nicotina que apresentou valor um pouco abaixo do permitido na presença da fluoxetina.

Gray et al. em 2008 realizou testes de especificidade utilizando uma série de compostos que poderiam interferir na análise da nicotina e seus metabólitos em mecônio. Dentre os interferentes analisados estavam alcalóides provenientes do tabaco como anabasina e anatabina, drogas ilícitas como THC e metabólitos, amfetamina, metanfetamina, cocaína com metabólitos e derivados, drogas terapêuticas como diazepam, lorazepam, ácido acetilsalicílico, e substâncias encontradas normalmente em bebidas como cafeína. Nenhuma dessas substâncias interferiram na avaliação da nicotina e seus metabólitos.

### 5.2.7. Estabilidade

Os experimentos de estabilidade foram realizados apenas para a estabilidade pós-processamento, que foi determinada através da reinjeção dos controles de qualidade inferiores e superiores 24 horas após a primeira injeção, em triplicata. A Tabela 10 representa os valores obtidos da estabilidade pós processamento para nicotina e cotinina.

**Tabela 10** – Valores da estabilidade pós-processamento

<b>Analitos</b>	<b>CQ 1 (ng/g)</b>	<b>C.V. (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>CQ 3 (ng/g)</b>	<b>C.V. (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>Nicotina</b>	211,24	3,2	66,01	990,7	16,9	82,55
<b>Cotinina</b>	402,8	16	125,88	789,72	8,5	103,9

Em 2008, Gray et al. publicaram que a nicotina e alguns de seus metabólitos estudados se mantiveram estáveis no mecônio por 72 horas armazenados a 4°C (estabilidade de longa duração) e também a 15°C por 24 horas após o processamento (estabilidade pós-processamento) com perda de menos de 15% com uma variação de valores entre 93,2% a 119%. E uma vez que as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 24 horas (estabilidade de curta duração) e também submetidas ao processo de congelamento e descongelamento (estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento) os valores para a estabilidade variou de 74,5% a 120,4% devendo assim serem evitados.

Köhler et al. em 2007 analisaram amostras de urina e mecônio que foram armazenadas a -20°C até o momento da análise e relataram que a nicotina e seus metabólitos se mantiveram estáveis por mais de um ano.

### 5.2.8. Carry over

O carry over foi avaliado injetando-se uma amostra livre de analitos imediatamente após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração. A nicotina e a cotinina apresentaram carry over em pequena extensão. Sendo assim, quando

foram injetados os pontos mais altos da curva e as amostras para se investigar o uso do cigarro, foi injetada anteriormente uma amostra livre dos compostos, ou mesmo de solvente puro, para eliminar qualquer possibilidade de um resultado falso positivo.

### 5.2.8. Aplicação do método desenvolvido na análise das amostras de mecônio

A análise cromatográfica foi realizada nas amostras de mecônio das pacientes que relataram o uso de cigarro durante a gravidez. A Tabela 11 apresenta as respostas de todas as mães entrevistadas que assumiram o uso do cigarro durante a gravidez e os valores encontrados para nicotina e cotinina.

**Tabela 11** – Respostas das pacientes entrevistadas que assumiram o uso do cigarro e valores encontrados para nicotina e cotinina em ng/g

<b>Nº da amostra</b>	<b>Frequência de uso</b>	<b>Última exposição</b>	<b>Análise do mecônio</b>	<b>Nicotina (ng/g)</b>	<b>Cotinina (ng/g)</b>
<b>01</b>	Não informado	Meses atrás	Positivo	*	-
<b>07</b>	Não informado	Meses atrás	Positivo	*	*
<b>13</b>	Entre 11 e 20	Dias atrás	Positivo	*	-
<b>15</b>	Entre 1 e 10	Ontem	Positivo	*	*
<b>17</b>	Entre 1 e 10	Dias atrás	Positivo	*	*
<b>18</b>	Entre 1 e 10	Ontem	Positivo	*	-
<b>19</b>	Entre 1 e 10	Ontem	Positivo	164,42	184,94
<b>20</b>	Entre 11 e 20	Ontem	Positivo	*	*
<b>26</b>	Entre 1 e 10	Dias atrás	Positivo	*	*
<b>32</b>	Entre 11 e 20	Ontem	Positivo	283,2	181,94
<b>33</b>	Entre 11 e 20	Meses atrás	Positivo	*	*
<b>34</b>	Entre 1 e 10	Dias atrás	Positivo	*	*
<b>36</b>	Entre 1 e 10	Ontem	Positivo	*	-

\* Amostras que apresentaram valores de nicotina e cotinina abaixo do limite de quantificação

- Amostras que apresentaram valores de cotinina não detectáveis

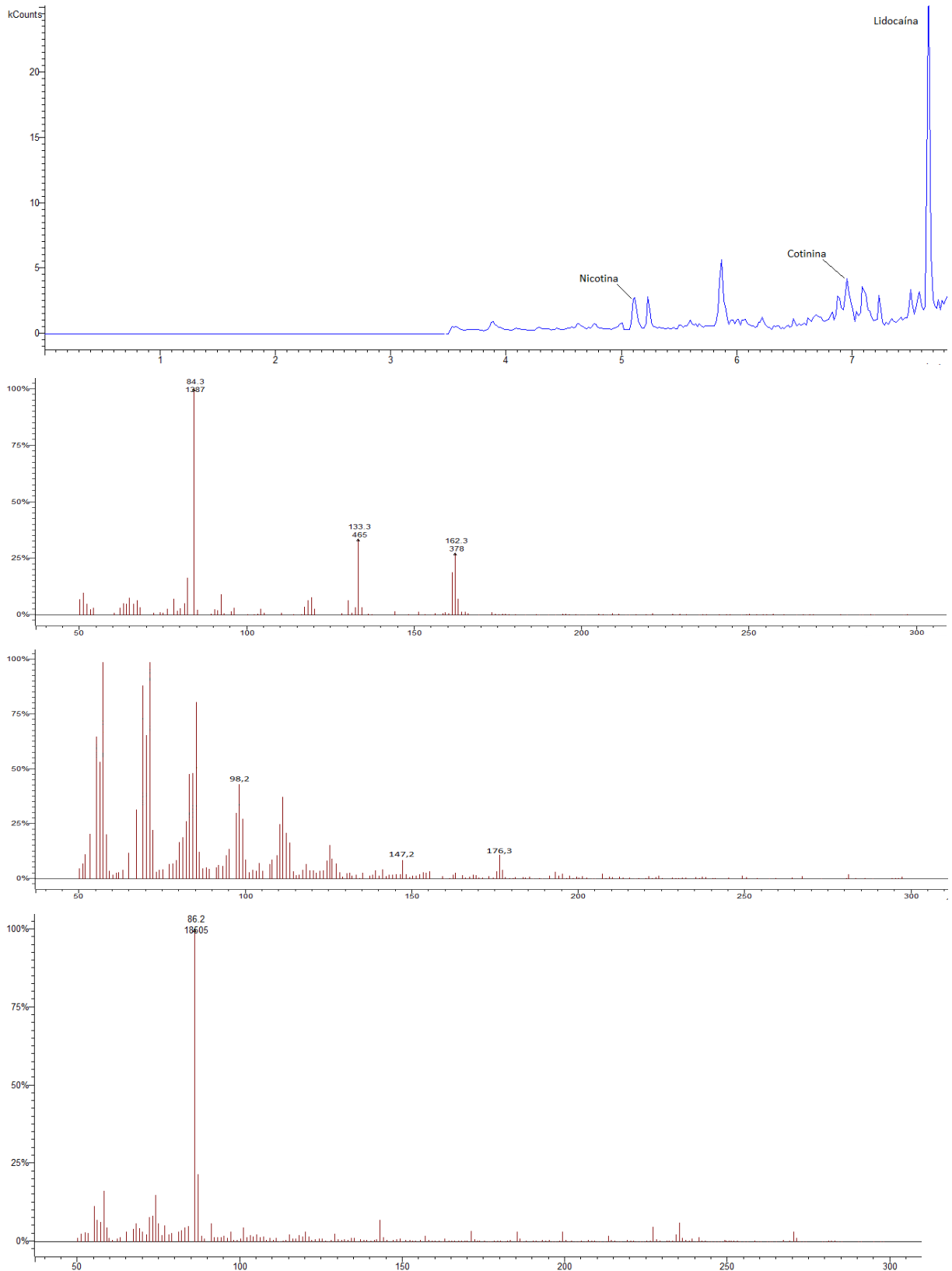
Em todos os casos, durante a entrevista, todas as mães afirmaram o uso do cigarro durante a gravidez. As amostras 01, 13, 18 e 36 apresentaram valores de cotinina não detectáveis apesar de a maioria ter tido contato com o cigarro há pouco tempo atrás. A nº 01 informou que parou o uso do cigarro durante o 2º trimestre de gestação. E das 13 pacientes entrevistadas, as de número 1, 13, 15, 17, 18, 19, 26, 32, 34 e 36 frequentavam lugares onde haviam fumantes, ou seja, também eram fumantes passivas.

Das 36 amostras coletadas, 13 se mostraram positivas em relação ao contato com o cigarro durante o período de gestação.

Em estudo realizado por Ostrea et al. em 1994 todas as amostras de mecônio analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foram positivas para a presença de cotinina e a análise de nicotina somente foi feita por radioimunoensaio sendo todas igualmente positivas. Diferentemente do que ocorreu com Gray e colaboradores em 2009 que afirmam que em um recente trabalho realizado por eles em seu laboratório utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectro de massas- espectro de massas, 25% das amostras foram positivas para nicotina e trans-3'-hidroxicotinina, um metabólito da nicotina, mas não para cotinina. Já em trabalho realizado por Baranowski et al. (1998) amostras de mecônio foram avaliadas para determinação de nicotina, cotinina e cafeína utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. Em nenhuma das amostras a nicotina pode ser identificada.

Essas diferenças encontradas nas diversas concentrações de nicotina e seus metabólitos pode ser devido a diferentes populações estudadas, diferentes hábitos de fumar, conteúdo variável de nicotina no cigarro ou até reações cruzadas com outros analitos (GRAY et al., 2008).

A Figura 12 representa o cromatograma e os respectivos espectros de massas da amostra nº 32, que identifica a nicotina, a cotinina e a lidocaína.



**Figura 12-** Cromatograma da amostra n°32, com os respectivos e espectros de massas da nicotina, cotinina e lidocaína.

## **Conclusões**

## 6. CONCLUSÕES

- O método mostrou ser eficiente para identificação da nicotina e seu metabólito cotinina em amostras de mecônio;

- O mecônio é uma matriz biológica complexa, de difícil manipulação, porém efetiva na preservação dos analitos estudados e amplamente utilizada na avaliação da exposição *in utero* de cigarro;

- Mesmo que as respostas adquiridas nos questionários maternos tenham concordado com as análises de mecônio realizadas, é importante salientar que em muitos casos pode haver o medo de repressão, pelo uso do cigarro, por parte das mães e assim gerar uma resposta não verdadeira quando questionadas sobre o uso de tal substância;

- o método desenvolvido e validado pode ser empregado em análises de rotina dos analitos estudados, com o objetivo de determinar se o recém nascido foi exposto ao cigarro durante o período gestacional, o que pode gerar uma série de problemas de saúde tanto logo após ao parto quanto durante o seu desenvolvimento.



## **Referências Bibliográficas**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALIYU, M. H.; LYNCH, O.; WILSON, R. E.; ALIO, A. P.; KRISTENSEN, S.; MARTY, P. J.; WHITEMAN, V. E.; SALIHU, H. M. Association between tobacco use in pregnancy and placenta-associated syndromes: a population-based study. **Archives of Gynecology and obstetrics**, Germany, mar. 2010.

BAIDOO, E. E. K.; CLENH, M. R.; SMITH, R. F.; TETLER, L. W. Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and sample stacking capillary electrophoresis-mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, Netherlands, v. 796, n. 1, p. 303 – 313, jan, 2003.

BAO, Z.; HE, X. Y.; DING, X.; PRABHU, S.; HONG, J. Y. Metabolism of nicotine and cotinine by human cytochrome P450 2A13, **Drug metabolism and disposition**, United States, v. 33, n. 2, p. 285 – 261, fev. 2005.

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

BEARER, C. F. Meconium as a biological marker of prenatal exposure. **Ambulatory Pediatrics**, Lawrence, v. 3, n. 1, p. 40 – 43, jan. 2003.

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

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

CARLINI E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; SILVA, A. A. B.; NOTO, A. R.; FONSECA, A. M.; CARLINI, C. M.; OLIVEIRA, L.G.; NAPPO, S. A.; MOURA, Y. G.; SANCHEZ, Z. M. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país, 2005. São Paulo: CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2006.

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

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

DERAUF, C.; KATZ, A. R.; EASA, 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**, Baltimore, v. 158, n. 7, p. 705 – 709, apr. 2003.

FABRÉ, R.; TRUHAUT, R. Tóxicos extraídos em meio alcalino. In:\_\_\_\_\_. **Toxicologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1971.

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

GRAY, T.R.; EIDEN, R. D.; LEONARD, K. E.; CONNORS, G.; SHISLER, S.; HUESTIS M. A. Nicotine and metabolites in meconium as evidence of maternal cigarette smoking during pregnancy and predictors of neonatal growth deficits. **Nicotine and Tobacco Research**, England, v. 12, n. 6, p. 658 – 664, abr. 2010

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

GRAY, T. R.; SHAKLEYA, D. M.; HUESTIS, M. A. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, nornicotinine and norcotinine in human meconium by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 863, n. 1, p. 107 – 114, jan. 2008.

GRAY, T. R.; SHAKLEYA, D. M.; HUESTIS, M. A. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Germany, v. 383, n. 8, p. 1977 – 1990, abr. 2009.

HARIHARAN, M.; VANNOORD, T. Liquid-chromatographic determination of nicotine and cotinine in urine from passive smokers: comparison with gas chromatography with a nitrogen-specific detector. **Clinical Chemistry**, United States, v. 37, n. 7, p. 1276 – 1280, 1991.

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

HOOFNAGLE, A. N.; LAHA, T. J.; RAINEY, P. M.; SADRZADEH, S. M.; H. Specific detection of anabasine, nicotine, and nicotine metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **American Society for Clinical Pathology**, v. 126, p. 880 – 887, 2006.

HUESTIS, M. A.; CHOO, R. E. Drug abuse's smallest victims: in utero drug exposure. **Forensic Science International**, Ireland, v. 128, n. 1 – 2, p. 20 – 30, ago. 2002.

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

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

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

KIM, I.; DARWIN, W. D.; HUESTIS, M. A. Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of, n. Chromatography B**, Netherlands, v. 814, n. 2, p. 233 – 240, jan. 2005.

KINTZ, P. Gas chromatographic analysis of nicotine and cotinine in hair. **Journal of Chromatography**, Netherlands, v. 18, n. 3, p. 347 – 353, 1992.

KINTZ, P.; MANGIN, P. Evidence of gestational heroin or nicotine exposure by analysis of fetal hair. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 63, n. 1-3, p. 99 – 104, dec. 1992.

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**, England, v. 26, n. 6, p. 535 – 544, aug. 2007.

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

KOREN, G.; KLEIN, J.; FORMAN, R.; GRAHAM, K.; PHAN, M. Biological markers of intrauterine exposure to cocaine and cigarette smoking. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**, Basel, New York, Karger, v. 18, n. 3-4, p.228 – 236. 1992.

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

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

MILLER, E. I.; NORRIS, H. R. K.; ROLLINS, D. E.; TIFFANY, S. T.; WILKINS, D. G. A novel validated procedure for the determination of nicotine, eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-

extraction coupled with chromatography – electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Netherlands, v. 878, p. 725 – 737, 2010.

MOORE, C.; NEGRUSZ, A.; LEWIS, D. Determination of drugs of abuse in meconium. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 713, n. 1, p. 137 – 146. 1998.

NUESSLEIN, T. G.; BECKERS, D.; RIEGER, C. H. L. Cotinine in meconium indicates risk for early respiratory tract infections. **Human and experimental toxicology**, England, v. 18, n. 4, p. 283 – 290, abr. 1999.

RIEDEL, K.; SCHERE, G.; ENGL, J.; HAGEDORN, H. W.; TRICKER, A. R. Determination of three carcinogenic aromatic amines in urine of smokers and nonsmokers. **Journal of Analytical Toxicology**, Unites States, v. 30, p. 187 – 195, abr. 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Alcalóides. In:\_\_\_\_\_. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. cap. 9, p. 163 – 208.

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



SALEM, M. Y.; ROSS, S. A.; MURPHY, T. P.; ELSOHLY, M. A. GC – MS determination of heroin metabolites in meconium: evaluation of four solid-phase extraction cartridges. **Journal of Analytical Toxicology**, Niles, v. 25, n. 2, p. 93 – 98, mar. 2001.

SHERIF, N. A.; KAMEL, S. M.; AL-ASHKAR, O. S.; SHARAKI, O. A.; SEIF, E. A.; HEGAZY, E. A. Detection of cotinine in neonate meconium as a marker for nicotine exposure in utero. **Eastern Mediterranean Health Journal**, Egypt, v. 10, n. 1 – 2, p. 96 – 105, mar. 2004.

SIEGMUND, B.; LEITNER, E.; PFANNHAUSER, W. Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 8, p. 3113 – 3120, jul. 1999.

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

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

UTAGAWA, C. Y.; SOUZA, R. A.; SILVA, C. O. M.; SILVA, M. O. Tabagismo e gravidez: repercussões no desenvolvimento fetal. **Cadernos UniFOA**, n. 04, p. 97 – 103, 2007.

WILLS, S. Tobacco. In: \_\_\_\_\_. **Drugs of abuse**. 3 ed. Cambridge: The Pharmaceutical Press, 2002. cap. 14, p. 157 – 163.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The tobacco health toll**. Cairo: Regional Office for the Eastern Mediterranean, 2005. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/TFI/PDF/TobaccoHealthToll.pdf>> Acesso em: 10 mar. de 2009.