

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

Desenvolvimento e aplicação de método analítico para
determinação de ésteres etílicos de ácidos graxos
(bioindicadores do etanol) em amostras de mecônio

Marli Roehsig

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2009

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

Desenvolvimento e aplicação de método analítico para
determinação de ésteres etílicos de ácidos graxos
(bioindicadores do etanol) em amostras de mecônio

Marli Roehsig

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica

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

Roehsig, Marli

R713d Desenvolvimento e aplicação de método analítico para determinação de ésteres etílicos de ácidos graxos (bioindicadores do etanol) em amostras de mecônio / Marli Roehsig. – São Paulo, 2009.

79p.

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

Orientador: Yonamine, Mauricio

1. Análises toxicológicas 2. Cromatografia em fase gasosa : Análise: Toxicologia I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

615.9 CDD

Marli Roehsig

Desenvolvimento e aplicação de método analítico para
determinação de ésteres etílicos de ácidos graxos (bioindicadores
do etanol) em amostras de 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, Ortim e Lucinda, pelo amor e incentivo
Ao meu namorado, Elías, pelo carinho e compreensão
Ao meu orientador e professor, Maurício, pelos
ensinamentos e paciência ao longo desses anos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Aquele que sempre me guarda e me escuta.

Aos meus familiares: Ortim e Lucinda, Marcia e Christian, Cláudio, Lauri e Nikychiella, Isadora, pelo apoio, incentivo durante todo este período.

Ao Elías, pelo carinho, compreensão e força nos momentos difíceis.

Ao professor e orientador Maurício Yonamine, pelos ensinamentos, oportunidade e confiança para realização deste trabalho e por ser um exemplo de conduta profissional.

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. Tania Marcourakis pelas sugestões e incentivo.

Ao Emerson, meu professor de Toxicologia da graduação, pelo incentivo.

Ao Sidnei, pelo auxílio na síntese dos padrões e à Daniela Mendes, pelos ensinamentos proporcionados no laboratório.

Aos meus amigos pós-graduandos, Carolina, Rafael, Raphael, Filipe, Camila, Kaline, Simone, Ana Paula, Livia, Larissa, Cecília, Tiago, Amanda, Daniel, Fabiane, Stella, Vânia, Vanessa e Fabyane pela convivência e amizade no desenvolvimento deste trabalho.

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

Às colegas da República, Ana Paula, Walquíria, Juliana, Giovana, Nívia, Karla, Karla Maria, Liziane pelo convívio e amizade.

À FAPESP pelo financiamento do projeto e pela concessão de bolsa de estudos.

A todos vocês, Obrigada!

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
1.1 Exposição fetal ao etanol.....	05
1.1.1 Efeitos tóxicos da exposição fetal ao etanol.....	06
1.2 Métodos de diagnóstico para verificação da exposição fetal.....	08
1.2.1 Análises toxicológicas.....	09
1.2.1.1 Amostras biológicas utilizadas para verificar exposição fetal.....	09
1.2.2.2 Indicadores biológicos.....	10
1.2.2.3 Métodos utilizados para detecção de FAEEs em mecônio.....	15
2. Objetivo do trabalho.....	18
3. Material.....	19
3.1 Equipamento e Acessórios.....	19
3.2 Soluções-padrão.....	19
3.3 Reagentes e outros materiais.....	19
3.4 Amostras.....	20
4. Métodos.....	21
4.1 Aplicação do questionário para mãe.....	21
4.2. Desenvolvimento do método de microextração em fase sólida por <i>headspace</i>	22
4.2.1 Amostra sem o analito de interesse.....	22
4.2.2 Preparação da amostra.....	22
4.3 Condições do GC/MS.....	23
4.3.1 Condições cromatográficas.....	23
4.3.2 Condições do espectrômetro de massa.....	24
4.4 Otimização do método.....	24
4.4.1 Avaliação do pH.....	24
4.4.2 Avaliação da temperatura.....	26
4.4.3 Avaliação do tempo.....	25
4.4.4 Avaliação da quantidade de mecônio.....	26
4.4.5 Avaliação do efeito <i>salting out</i>	26
4.5 Síntese dos padrões deuterados.....	26
4.6 Validação do método.....	29
4.6.1 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	29
4.6.2 Linearidade.....	29

4.6.3 Precisão intraensaio e interensaio.....	30
4.6.4 <i>Carryover</i>	30
4.6.5 Recuperação.....	30
5. Resultados.....	32
5.1 Cromatograma e espectros obtidos nas condições padronizadas...	32
5.2. Otimização das condições de extração dos FAEEs em mecônio....	38
5.2.1 Resultados do estudo do pH ótimo para extração.....	38
5.2.2 Resultados da influência da temperatura de extração.....	39
5.2.3 Resultado do estudo da influência do tempo de extração.....	39
5.2.4 Resultados da avaliação da quantidade de mecônio.....	40
5.2.5 Resultados da avaliação da adição de cloreto de sódio na amostra	41
5.3 Resultados da validação do método.....	42
5.3.1 Limites de detecção e quantificação.....	42
5.3.2 Linearidade.....	43
5.3.3 Precisão intra e interensaio.....	47
5.3.4 <i>Carryover</i>	48
5.3.5 Recuperação.....	48
5.4 Resultado da análise toxicológica em amostras de mecônio.....	49
6. Discussão.....	53
7. Conclusão.....	65
8. Referências bibliográficas.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de relato de dependência de álcool segundo o sexo, na população brasileira – ano de 2001 e 2005.....	02
Figura 2. Metabolismo não-oxidativo do etanol e formação dos FAEEs.....	11
Figura 3. Estrutura molecular dos oito ésteres etílicos de ácidos graxos.....	12
Figura 4. Esquema do procedimento de microextração em fase sólida por <i>headspace</i> empregado na determinação de FAEEs em mecônio....	23
Figura 5. Esquema das reações químicas na produção dos padrões de ésteres etílicos de ácidos graxos deuterados.....	28
Figura 6. Cromatograma GC/MS-SCAN dos FAEEs : pico do laurato de etila e laurato de etila-d5 (A); pico do miristato de etila e miristato de etila-d5 (B); pico do palmitoleato de etila e palmitoleato de etila-D5 (C); palmitato de etila e palmitato de etila-d5 (D); linoleato de etila e linoleato de etila-d5 (E); oleato de etila e oleato de etila-d5 (F); estearato de etila e estearato de etila-d5 (G); araquidonato de etila e araquidonato de etila-d5 (H).....	33
Figura 7. (A) Espectro de massa do laurato de etila e (B) espectro de massa do laurato de etila-d5.....	34
Figura 8. (A) Espectro de massa do miristato de etila e (B) espectro de massa do miristato de etila-d5.....	34
Figura 9. (A) Espectro de massa do palmitoleato e (B) espectro de massa do palmitoleato de etila-d5.....	35
Figura 10. (A) Espectro de massa do palmitato de etila e (B) espectro de massa do palmitato de etila-d5.....	35
Figura 11. (A) Espectro de massa do linoleato de etila e (B) espectro de massa do linoleato de etila-d5	36
Figura 12. (A) Espectro de massa do oleato de etila e (B) espectro de massa do oleato de etila-d5.....	36
Figura 13. (A) Espectro de massa do estearato de etila e (B) espectro de massa do estearato de etila-d5.....	37
Figura 14. (A) Espectro de massa do araquidonato de etila e (B) espectro de massa do araquidonato de etila-d5	37
Figura 15. Avaliação da influência do pH na eficiência de extração dos FAEEs.....	38
Figura 16. Avaliação da temperatura na eficiência de extração dos FAEEs.....	39
Figura 17. Avaliação do tempo na eficiência de extração dos FAEEs...	40

Figura 18. Avaliação da quantidade de mecônio na eficiência de extração dos FAEEs.....	41
Figura 19. Avaliação do efeito <i>salting out</i> na eficiência de extração dos FAEEs.....	42
Figura 20. Curva de calibração do laurato de etila.....	43
Figura 21. Curva de calibração do miristato de etila.....	43
Figura 22. Curva de calibração do palmitoleato de etila.....	44
Figura 23. Curva de calibração do palmitato de etila.....	44
Figura 24. Curva de calibração do linoleato de etila.....	45
Figura 25. Curva de calibração do oleato de etila.....	45
Figura 26. Curva de calibração do estearato de etila.....	46
Figura 27. Curva de calibração do araquidonato de etila.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais métodos analíticos propostos para determinação de FAEEs em mecônio.....	17
Tabela 2. Valores <i>m/z</i> do pico base encontrados para análise dos FAEEs e análogos d5 por GC/MS-Scan.....	25
Tabela 3. Ácidos Graxos utilizados para síntese dos padrões deuterados.....	27
Tabela 4. Valores (ng/g) de limite de detecção e limite de quantificação dos FAEEs analisados.....	42
Tabela 5. Valores de precisão intra-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada FAEE.....	47
Tabela 6. Valores de precisão interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada FAEE.....	48
Tabela 7. Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em mecônio.....	49
Tabela 8. Resultado das concentrações (ng/g) obtidas através das análises toxicológicas para determinação de FAEEs em mecônio de recém-nascidos provenientes do Hospital Universitário – USP.....	50
Tabela 9. Íon precursor e respectiva fragmentação	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH	álcool desidrogenase
ALDH	acetaldeído desidrogenase
CI	ionização química
CV	coeficiente de variação do método
DHA	etil docosahexonoato
E12	laurato de etila
E14	Miristato de etila
E16	Palmitato de etila
E16:1	Palmitoleato de etila
E17	etil-heptadecanóico
E18	Estearato de etila
E18:1	Oleato de etila
E18:2	Linoleato de etila
E18:3	Linolenato de etila
E20:4	Araquidonato de etila
EI	ionização eletrônica
FAEEs	fatty acid ethyl esters
FAS	síndrome fetal alcoólica
GC/MS	cromatografia gasosa com espectrometria de massas
GC/FID	cromatografia gasosa e detector ionização de chama
HS-SPME	microextração em fase sólida por <i>headspace</i>
LCMS/MS	cromatografia líquida e espectrometria de massas
LLE	extração líquido-líquido
LOD	Limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
PI	padrão interno
SPE	extração em fase sólida

ANEXOS

ANEXO I - Comissão de Ética de pesquisa em humanos – FCF.....	74
ANEXO II - Comissão de Ética de pesquisa em humanos – HU.....	75
ANEXO III- Questionário “TWEAK”.....	76

ROEHSIG, M.; **Desenvolvimento e aplicação de método analítico para determinação de ésteres etílicos de ácidos graxos (bioindicadores do etanol) em amostras de mecônio** 2009. 109 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2009.

RESUMO

O álcool é uma das substâncias psicoativas mais consumidas mundialmente e seu uso por mulheres em idade reprodutiva, em particular, tem representado grande preocupação por parte de especialistas e da sociedade em geral. Apesar dos efeitos adversos associados ao ato de ingerir bebidas alcoólicas durante a gestação ser bastante documentados e conhecidos, sabe-se que uma parcela de mulheres grávidas tem dificuldades em abandonar o hábito. O consumo excessivo de álcool durante a gravidez tem sido associado com a síndrome fetal pelo álcool (FAS), caracterizada por crianças com dificuldades comportamentais e de aprendizado. Entretanto, devido ao sentimento de culpa e medo de ações punitivas, mulheres raramente admitem terem utilizado álcool durante a gestação. Como resultado, uma série de marcadores biológicos tem sido estudada para se diagnosticar a exposição fetal ao etanol. Dentre os marcadores utilizados estão os ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE), que podem ser detectados em amostras de mecônio de recém-nascidos. No presente trabalho, um método analítico foi desenvolvido visando a detecção de oito FAEEs em amostras de mecônio e aplicada em amostras coletadas de recém-nascidos cujas mães admitiram ou não o uso de etanol durante a gestação. A microextração em fase sólida por *Headspace* (HS-SPME), uma técnica de preparação de amostras relativamente recente, foi utilizada para análise. Os FAEEs foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS), operado no modo de ionização química. Os correspondentes ésteres etílicos deuterados foram sintetizados e utilizados como padrão interno. Os limites de quantificação (LOQ) obtidos foram abaixo de 150 ng/g e limites de detecção (LOD) foram abaixo de 100ng/g para todos os analitos. O método mostrou boa linearidade na concentração estudada (LOQ-2000ng/g), com coeficiente (r^2) melhor que 0.98. Os valores de precisão apresentaram coeficientes de variação menores que 15% para todos os FAEEs estudados. Quando o método foi aplicado em amostras de mecônio, foi possível detectar níveis de alguns FAEEs de recém-nascidos não suspeitos a exposição fetal ao etanol.

Palavras-chave. Mecônio. Exposição fetal. Etanol. Microextração em fase sólida por headspace (HS-SPME). Ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE)

ROEHSIG, M.; **Development and application of an analytical method for the determination of fatty acid ethyl esters (biomarkers of ethanol) in meconium samples** 2009. 109 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2009.

ABSTRACT

Alcohol is the main psychoactive drug consumed worldwide and its increasing use by young women has been a great problem point out by specialists in the subject. Although the adverse effects associated to the habit of drinking alcoholic beverages during gestation being very much documented, it is known that a considerable number of pregnant women have difficulties to abandon the habit. Excessive alcohol use during pregnancy has been associated with Fetal Alcohol Syndrome (FAS) characterized by children with cognitive and behavioral disorders. However, because of denial, embarrassment and fear, maternal reports of gestational use of alcohol are often inaccurate. Consequently, a series of biomarkers have been studied to diagnose fetal exposure to alcohol. Recently, fatty acid ethyl esters (FAEE) have been studied as biomarkers found in meconium of neonates exposed in utero. In the present work, an analytical method was developed aiming the detection of eight FAEEs in meconium samples and applied to real specimens collected from newborns whose mothers admitted or not the use of alcohol during pregnancy. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), a relatively recent sample preparation technique, was used for analysis. FAEEs were identified and quantified by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), operated in chemical ionization mode. The corresponding deuterated ethyl esters were synthesized and used as internal standards. The lower limits of quantification (LOQ) obtained were below 150ng/g and limits of detection (LOD) were below 100ng/g for all analytes. The method showed good linearity in the range of concentration studied (LOQ-2000ng/g), with coefficient of linearity better than 0.98. The precision assay, given by the relative standard deviation (RSD) of the method was lower than 15% for all FAEEs studied. When the method was applied to real samples, it was possible to detect trace levels of some FAEEs from non-suspected ethanol exposed newborns.

Keywords: Meconium. Fetal exposure. Ethanol. Headspace Solid Fase Microextraction (HS-SPME). Fatty acid ethyl esters (FAEE)

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O consumo de drogas por mulheres em idade reprodutiva passou a ser considerado um importante assunto de saúde pública no mundo, pelo aumento crescente no número de usuárias e pelas conseqüências para o desenvolvimento da criança durante a exposição fetal a essas substâncias.

Nesse contexto, o etanol representa especial importância devido à grande prevalência de consumo por mulheres em idade reprodutiva (CARLINI *et al.*, 2002) e aos inúmeros efeitos nocivos associados ao uso freqüente.

Por se tratar de droga lícita, ser amplamente disponível e apresentar baixo custo, o etanol é, sem dúvida, uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo e, por isso, representa um grande problema de saúde pública. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, o álcool tem sido apontado como responsável por 4.0% de morbidade mundial. Globalmente, cerca de 1.8 milhões de pessoas morreram em decorrência do uso de bebidas alcoólicas no ano de 2000 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

No Brasil, as informações a respeito da magnitude do problema podem ser obtidas através de levantamentos recentes. 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 álcool corresponde a 68,7% do total. O levantamento apontou ainda uma prevalência de uso de álcool de 77,0% para o sexo masculino e 60,6% para o feminino.

Nesse mesmo estudo, 11,2% das pessoas entrevistadas se consideraram dependentes de bebidas alcoólicas (CARLINI *et al.*, 2002).

Comparando-se com o levantamento mais recente realizado no ano de 2005 (GALDUROZ *et al.*, 2005), observa-se um aumento na porcentagem de dependentes de álcool entre homens e mulheres (Figura 1). Enquanto no levantamento realizado no ano de 2001 a porcentagem de dependentes do sexo masculino e feminino era de 17,1 e 5,7%, em 2005 esses números aumentaram para 19,5 e 6,9%.

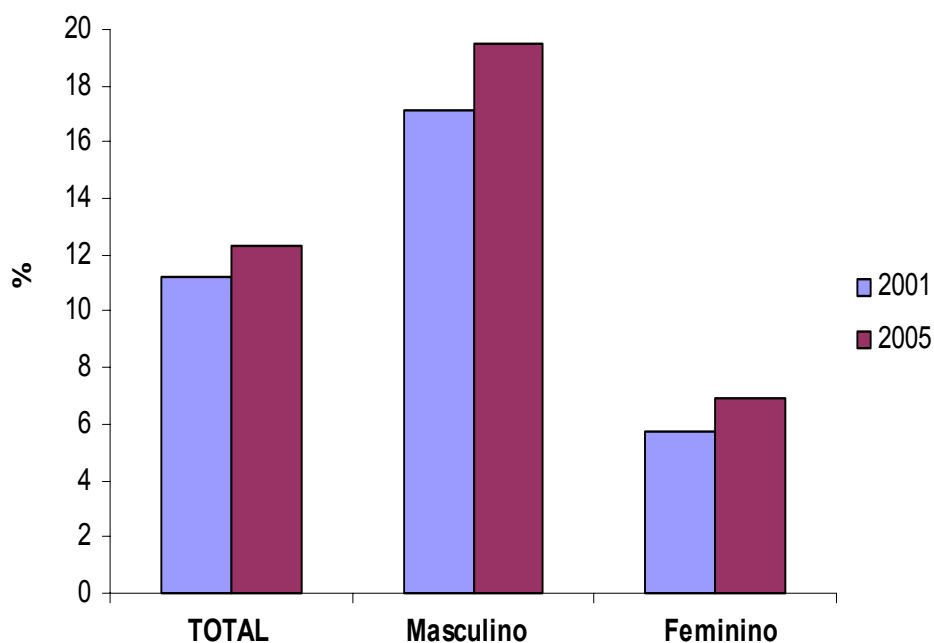


Figura 1. Porcentagem de relato de dependência de álcool segundo o sexo, na população brasileira – ano de 2001 e 2005 (adaptado de CARLINI *et al.*, 2001 e GALDUROZ *et al.*, 2005).

De acordo com levantamento do Ministério da Saúde, realizado em 2002 e 2003, entre pessoas de 15 anos ou mais, a prevalência de consumo de

bebida alcoólica, nas 15 capitais brasileiras e no Distrito Federal variou de 32,4% a 58,6%. Quando analisada separadamente por gênero, observa-se que a prevalência de consumo entre homens, nesta pesquisa, variou de 48,9% a 72,1%, enquanto que em mulheres essa variação foi de 19,7% a 47,5% (BRASIL, 2004).

O consumo excessivo de álcool por mulheres durante a gestação pode provocar uma série de malefícios ao feto. Uma vez que não se sabem ao certo qual a dose e frequência que pode afetar a criança antes de nascimento, a identificação precoce de crianças expostas *in utero* a essa substância é extremamente necessária para uma melhor avaliação dos efeitos (BEARER *et al.*, 2003).

O tratamento e acompanhamento (intervenções médicas e psicossociais) de crianças expostas poderiam ser melhor sucedidos se a rápida identificação da exposição fetal fosse realizada (HUESTIS & CONE, 1998). Desta forma, o desenvolvimento de um método eficaz de diagnóstico da exposição fetal é bastante interessante como ferramenta de base para direcionar posterior tratamento da criança. 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 ésteres etílicos de ácidos graxos em mecônio tem sido proposta como indicativo da exposição fetal ao álcool (KLEIN *et al.*, 1999). Entretanto, por se tratar de amostra biológica complexa, relativamente poucos métodos foram desenvolvidos visando à detecção desses marcadores em amostras de mecônio (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Geralmente os métodos analíticos se valem de extração convencional líquido-líquido (LLE) seguida de

extração em fase sólida (SPE) como técnica de preparação de amostras. Estas apresentam algumas desvantagens como utilização de relativamente grandes volumes de solventes orgânicos, formação de emulsões (na LLE) e extração em múltiplas etapas (na SPE).

Até o presente momento, não há um consenso sobre biomarcadores específicos ou valores de referência em amostras biológicas que indiquem a exposição fetal ao etanol (CHAN *et al.*, 2004a). Portanto, os oito ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs - *fatty acid ethyl esters*) mais utilizados segundo a literatura científica: laurato de etila, miristato de etila, palmitato de etila, palmitoleato de etila, estearato de etila, oleato de etila, linoleato de etila e araquidonato de etila foram incluídos no desenvolvimento do método. Após o desenvolvimento e validação do método analítico, este foi aplicado em amostras de mecônio de neonatos provenientes do Berçário do Hospital Universitário-USP. Uma vez que a presença e concentração de determinados ésteres etílicos de ácidos graxos em mecônio é dependente da dieta, também foi objetivo do presente estudo contribuir na geração de dados que poderão auxiliar no estabelecimento de valores de referência para avaliar a exposição fetal. Cabe ressaltar que essa determinação nunca foi realizada na população brasileira.

CHAN *et al.*, (2003) realizaram um estudo com grupos de mulheres de diferentes regiões (Toronto, Canadá e Jerusalém, Israel), coletando mecônio dos recém-nascidos nestas cidades. Dentre os resultados encontrados, verificou-se que as características dos FAEE foram similares em ambas as populações.

BEARER *et al*, (2003) realizaram um estudo em uma comunidade do sul da África com mães que admitiram o uso de etanol durante a gestação, coletando mecônio para análise dos FAEEs. Nesta população, o oleato de etila foi o éster predominante em mecônio. Devido a questões econômicas, psicossociais e a antiga forma de pagar parte do salário dos trabalhadores com vinho produzido na fazenda, há um grande e freqüente consumo etanol por mulheres nessa comunidade (VILJOEN *et al*, 2005).

Assim sendo, uma das propostas do presente estudo foi o desenvolvimento de uma nova técnica de preparação de amostras para identificação dos marcadores da exposição fetal ao etanol. Nesse contexto, foi empregada a técnica de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME), que apresenta como principais vantagens sobre as técnicas convencionais (LLE ou SPE) o pouco ou nenhum uso de solventes, a maior praticidade, rapidez e simplicidade. A identificação dos analitos foi feita através da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) no modo de ionização química (CI).

1.1 Exposição fetal ao etanol

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 & DOULL’S, 1995; OSTREA *et al.*, 2004).

O etanol é absorvido em pequenas quantidades a partir da mucosa gástrica, mas sua absorção é mais eficiente no intestino, ao nível do duodeno. A concentração plasmática máxima é atingida geralmente entre 30 a 90 minutos após a ingestão da bebida alcoólica (FREIRE *et al.*, 2005).

Por ser uma molécula pequena, o etanol é rapidamente distribuído pelo corpo e atravessa prontamente a barreira placentária, o que faz com que o feto também esteja exposto ao etanol. Devido à lenta biotransformação e eliminação da placenta, o líquido amniótico permanece impregnado de etanol e seu produto de metabolismo, o acetaldeído (FREIRE *et al.*, 2005).

Não se sabe ao certo qual quantidade de álcool consumida pela mãe pode atingir o feto. No entanto, quando o consumo de álcool é de 12g/dia ou mais, aumenta-se consideravelmente o risco da criança nascer com baixo peso (MARISCAL *et al.*, 2006).

1.1.1 Efeitos tóxicos da exposição fetal ao etanol

Tanto o etanol quanto o acetaldeído têm efeitos diretos sobre vários fatores de crescimento celular, inibindo a proliferação de certos tecidos. Além disso, o etanol induz a formação de radicais livres de oxigênio que são capazes de danificar proteínas e lipídeos celulares, aumentando a apoptose e prejudicando a organogênese. O etanol também inibe a síntese de ácido retinóico, que é uma substância reguladora do desenvolvimento embrionário. A suscetibilidade fetal ao álcool é modulada pela quantidade ingerida, época do desenvolvimento fetal, estado nutricional e capacidade de metabolização materna e fetal (FREIRE *et al.*, 2005).

Apesar de há muito tempo, se suspeitar que o consumo de álcool durante a gestação poderia ter efeitos deletérios para o feto, somente na segunda metade do século XX esses efeitos começaram a ser realmente estudados. Há uma estimativa que de 2 a 9 entre 1000 nascimentos são afetados pelas embriopatias decorrentes da exposição *in utero* ao álcool, fazendo dele o mais prevalente agente teratogênico humano (CHAN *et al.*, 2004 b).

Além disso, o consumo de álcool na gestação está relacionado ao aumento do número de abortos e a fatores comprometedores do parto, como risco de infecções, descolamento prematuro de placenta, prematuridade do trabalho de parto (FREIRE *et al.*, 2005)

Algumas mulheres que consomem freqüentemente bebidas alcoólicas durante a gravidez têm filhos prematuros e alguns podem apresentar anormalidades, incluindo a Síndrome Fetal Alcoólica (FAS). Crianças com FAS podem ter baixo peso e pele mais clara do que as outras, apresentar danos cerebrais, traços faciais anormais, entre eles alargamento de *filtrum* labial, fissuras palpebrais diminuídas e lábio leporino. Elas também podem apresentar dificuldades de aprendizado e retardo mental de gravidade variável (HUESTIS & CHOO, 2002; BEARER, *et al.*, 2003; BAUMANN *et al.*, 2006).

O uso de álcool durante a gestação está associado ainda a anormalidades congênitas no sistema respiratório, nos órgãos genitais e músculo-esqueléticas (BAUMANN *et al.*, 2006).

Segundo WHITEHEAD & LIPSCOMB (2003), crianças expostas ao álcool no período pré-natal nascem com tamanho e peso consideravelmente menores que aquelas que não foram expostas. FREIRE *et al.* (2005)

observaram uma redução média de 109 g no peso dos filhos de mães consumidoras de álcool, sendo que nos neonatos do sexo feminino a redução de peso foi mais acentuada (186g). Também foi observado que a média do comprimento dos recém-nascidos cujas mães não consumiam álcool foi de 48,2 cm, ao passo que naquelas cujas mães ingeriram bebidas alcoólicas foi de 46,7 cm.

A quantidade de álcool necessária para produzir dano fetal é desconhecida e é influenciada pela variabilidade individual. Nenhuma dose de álcool é considerada como segura para consumo durante a gestação (HUESTIS & CHOO, 2002).

1. 2 Métodos de diagnóstico para verificação da exposição fetal

Marcadores biológicos para determinação do consumo de etanol durante a gestação permitiriam a identificação precoce e intervenção para crianças afetadas, além de facilitar o reconhecimento das mulheres em risco de uso de etanol durante a sua próxima gestação. Também poderiam ajudar a melhorar a compreensão de efeitos pré-natais da exposição ao etanol sobre o desenvolvimento neurocomportamental. Podem proporcionar também, medidas objetivas para exposição fetal à longo prazo como recuperação materna, aceitação pela sociedade e diminuir a pré-disposição (BEARER *et al.*, 2003).

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 médico adequado para o recém-nascido (HUESTIS & CONE, 1998).

Assim, a exposição a drogas pode ser diagnosticada por métodos diretos, através da análise toxicológica dos marcadores biológicos, e indiretos, utilizando-se questionários e modelos estatísticos.

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

Estudos realizados por DERAUF *et al.* (2003), correlacionam o auto-relato do uso de substâncias lícitas ingeridas durante a gestação com a detecção neonatal em mecônio dos metabólitos do etanol. A análise dos dados obtidos mostrou que grande parte das mulheres que não admitiram o uso de etanol durante a gestação teve resultados positivos nas amostras de mecônio dos seus neonatos.

Diante disso, a análise toxicológica em diversos espécimes biológicos é um meio seguro de diagnóstico para verificar a exposição a drogas lícitas e ilícitas.

1.2.1 Análises toxicológicas

1.2.1.1 Amostras biológicas utilizadas para verificar exposição fetal

Para identificação da exposição fetal, três espécimes biológicos demonstram-se mais aplicáveis neste contexto por fornecerem informações da exposição a longo prazo: cabelo, unhas e mecônio. 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.

Os cabelos começam a aparecer entre o terceiro e quarto mês de gestação (TOLEDO, 1999). Unhas dos dedos das mãos iniciam a sua formação na 10^a semana de gestação (VALENTE-CAMPOS, 2002) e o mecônio começa a ser produzido a partir da 10^a a 12^a semana (HUESTIS & CONE, 1998). 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 em aproximadamente 72 a 80% de água, células de descamação do trato gastrintestinal e da pele, lanugo, material gorduroso do vérnix caseoso, líquido amniótico, bilirrubina, enzimas e várias secreções digestivas e intestinais (KWONG & 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 (GARERI *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2003; PICHINI *et al.*, 2005; MARCHEI *et al.*, 2006).

1.2.1.2 Indicadores biológicos

Para a verificação da exposição fetal ao etanol, a determinação de uma série de FAEEs em mecônio tem sido proposta como indicativo do consumo em período gestacional (Figura 2).

Ésteres etílicos de ácidos graxos são metabólitos não oxidativos do etanol produzidos pela esterificação do álcool e ácidos graxos livres, catalisados pela enzima FAEE sintase (Figura 2) (GAGERI *et al.*, 2006). São substâncias relativamente voláteis e entre os ésteres etílicos encontrados em mecônio estão: laurato de etila, miristato de etila, palmitoleato de etila, palmitato de etila, linoleato de etila, oleato de etila, estearato de etila e araquidonato de etila. Na Figura 3 são apresentadas as estruturas químicas desses oito ésteres etílicos de ácidos graxos.

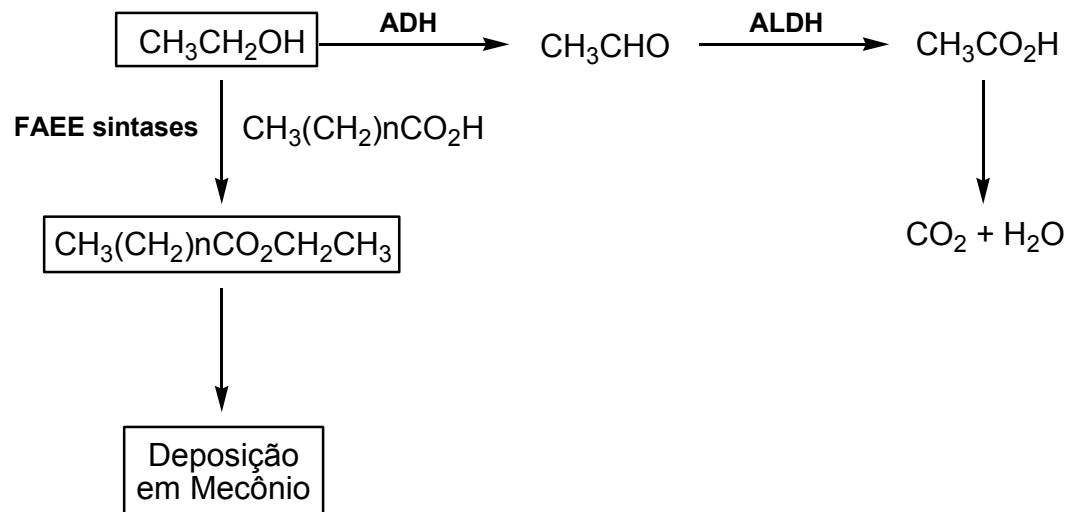


Figura 2. Metabolismo não-oxidativo do etanol e formação dos **FAEEs**. **ADH**: álcool desidrogenase, **ALDH**: acetaldeído desidrogenase. Adaptado de GAGERI *et al.* (2006).

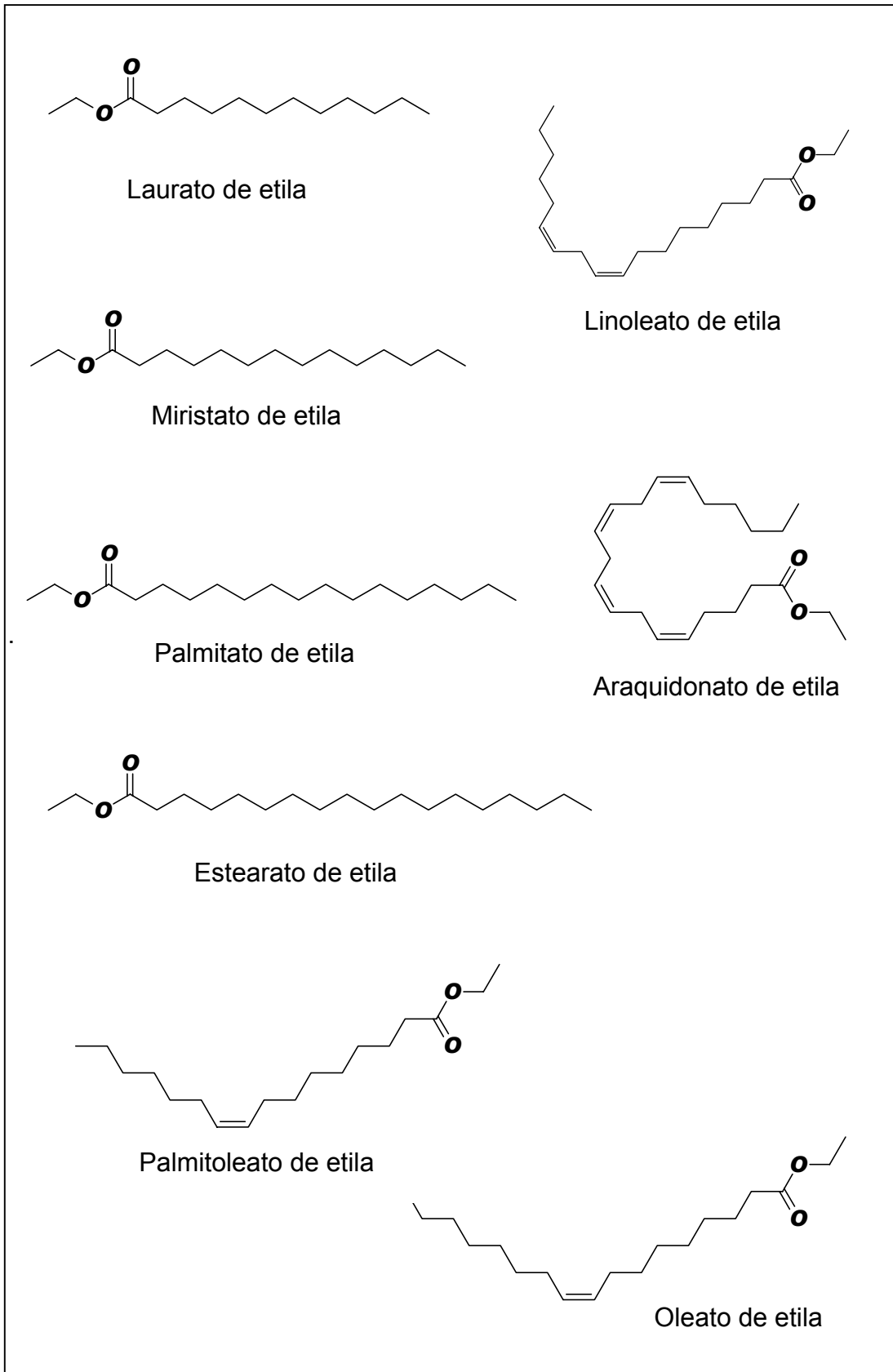


Figura 3. Estrutura molecular de oito ésteres etílicos de ácidos graxos.

Comparados com o etanol e seus metabólitos oxidativos, os FAEEs possuem meia vida prolongada (DERAUF, 2003). No sangue, podem ser detectados até 24 horas após a última ingestão de álcool (PRAGST *et al.*, 2001). Depois de depositados no mecônio, podem ser marcadores a longo prazo da exposição ao etanol.

Embora o mecanismo de deposição dos FAEEs em mecônio não esteja totalmente esclarecido, estudo realizado por CHAN (2004c) mostrou que os FAEEs formados na circulação materna não são transferidos para o feto através da placenta humana uma vez que são degradados. É provável que as concentrações desses analitos detectados em mecônio sejam produzidas e metabolizadas pelo feto a partir etanol transferido para ele.

Entretanto, em estudos preliminares, verificou-se que alguns FAEEs podem ser encontrados em mecônio de neonatos não expostos *in utero* ao etanol. A razão para esse fenômeno ainda não está totalmente esclarecida e tem sido atribuída à dieta e condições fisiológicas ou patológicas *in vivo* (CHAN *et al.*, 2003; CHAN *et al.*, 2004a). De fato, CHAN *et al.* (2003) detectaram baixas concentrações de FAEEs em mecônio de crianças não expostas ao álcool, apesar do nível basal ser significativamente menor quando comparado com os casos confirmados de exposição a bebidas alcoólicas. Outra hipótese para esse fenômeno é que vários FAEEs estão presentes em alimentos ingeridos como, por exemplo, em diferentes azeites de oliva (CAMINO, 2002). Além disso, pequenas quantidades de álcool estão ainda presentes em certos medicamentos (CHAN *et al.*, 2004a).

Em outro estudo realizado por CHAN *et al.* (2004b), amostras de mecônio foram analisadas para a presença de FAEEs. Em comparação com

neonatos nascidos de mães que admitiram uso freqüente de bebidas alcoólicas durante a gestação, amostras de mecônio de crianças não-expostas apresentaram quantidades bem menores de FAEEs. O laurato de etila (E12) e o miristato de etila (E14) foram os FAEEs predominantes em mecônio de crianças não expostas ao etanol. Em contrapartida, neonatos altamente expostos *in utero* acumularam grandes quantidades de FAEEs de cadeia mais longa como o palmitato de etila (E16), o estearato de etila (E18); o oleato de etila (E18:1) e o linoleato de etila (E18:3), adicionalmente ao E12 e E14.

Não há um consenso no critério de análise para diferenciar neonatos expostos e sem exposição fetal ao etanol. Alguns trabalhos encontraram concentrações significativamente maiores da presença cumulativa dos FAEEs em mecônio de neonatos expostos (13126 ng/g) quando comparados aos não-expostos (410 ng/g), de acordo com o relato materno (Klein et al 1999). Em um estudo conduzido por CHAN *et al.*, (2003), observou-se que miristato de etila (>80%), seguido de laurato de etila e palmitato de etila (>50%) foram os mais prevalentes FAEEs detectados em mecônio de neonatos não-expostos ao etanol. Esses autores estabeleceram um *cut off* de 2 nmol/g (~600ng/g) de mecônio totalizados pela soma de quatro FAEEs (palmitato de etila, linoleato de etila, oleato de etila e estearato de etila) e encontraram 100% de sensibilidade e 98,4% de especificidade (CHAN *et al.*, 2003). Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, um resultado positivo foi definido através da presença cumulativa de sete individuais FAEE maior que 2 nmol/g, excluindo laurato de etila e miristato de etila (CHAN *et al.*, 2004a). Por outro lado, OSTREA *et al.*, (2006) concluíram que linoleato de etila e araquidonato de etila são biomarcadores de alta especificidade para exposição fetal ao etanol e os

autores sugerem que o araquidonato de etila e o docosahexanoato de etila poderiam ser potentes biomarcadores dos efeitos do etanol no desenvolvimento do cérebro do feto (OSTREA *et al.*, 2006). BEARER *et al.* (2005) concluiu que a análise de um único marcador (linoleato de etila) em mecônio foi a melhor forma de identificar mulheres que utilizaram etanol durante a gestação, apesar de ter encontrado seis FAEEs diferentes entre mecônio de recém-nascidos de mulheres que consumiram e que não consumiram etanol (BEARER *et al.*, 2005).

1.2.2.3 Métodos utilizados para detecção de FAEEs em mecônio

Os métodos para identificação dos marcadores da exposição fetal do etanol são baseados principalmente em extração líquido-líquido ou extração em fase sólida com detecção por cromatografia em fase gasosa ou líquida acoplada ou não à espectrometria de massas (CHAN *et al.*, 2004a; MOORE *et al.*, 2003; DERAUF *et al.*, 2003; CHAN *et al.*, 2003, KLEIN *et al.*, 1999; PICHINI *et al.*, 2008).

Para quantificação dos FAEEs em mecônio por cromatográfica gasosa ou por HPLC, no preparo das amostras algumas técnicas são descritas, sendo que na grande maioria são empregadas as técnicas de extração líquido-líquido com hexano e acetona, com posterior aplicação da técnica de SPE (MOORE *et al.*, 2003; KLEIN *et al.*, 1999; CHAN *et al.*, 2003)

Na Tabela 1 estão resumidos os procedimentos empregados por alguns autores para detecção de FAEEs em amostras de mecônio.

A desvantagem da utilização dos métodos convencionais (SPE e LLE) para extração dos FAEEs em mecônio é a utilização de solventes orgânicos e várias etapas de extração, expondo analistas. Outra desvantagem é o maior tempo consumido para realizar a análise e grande quantidade de amostra (geralmente 1g) (HUTSON *et al.*, 2009).

Além disso, nos últimos anos, questões ambientais têm merecido destaque e é uma tendência evitar a utilização de solventes ou substituí-los por alternativos mais seguros (LENARDÃO *et al.*, 2003).

No presente trabalho foi desenvolvido o método de HS-SPME que, em comparação com outros métodos, não inclui a necessidade de solventes orgânicos e minimiza o tempo de preparação das amostras por obter extratos mais limpos (HUTSON *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Principais métodos analíticos propostos para determinação de FAEEs em mecônio.

Analitos	Extração	Deteção	LOQ	Referência
E12, E14, E16, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4, DHA	LLE seguido por SPE	GC/MS-CI	–	Ostrea <i>et al.</i> , 2006
E17, E16, E16:1, E18 E18:1, E18:2, E20:4	LLE seguido por SPE	GC/MS-CI	–	Moore <i>et al.</i> , 2003
E12, E14, E16, E17, E18, E18:1, E18:2,	LLE seguido por SPE	GC/FID	0,32 até 0,44 nmol/g (~100ng/g)	Chan <i>et al.</i> , 2003
E12, E14, E16, E16:1, E17, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4,	SPE	GC/FID	0,32 até 0,44 nmol/g (~100ng/g)	Chan <i>et al.</i> , 2004
E14, E16, E16:1, E18, E18:2, E18:3, E20:4,	LLE seguido de SPE	GC/FID e GC/MS	–	Bearer <i>et. al.</i> , 2005
E12; E14; E16; E16:1; E18 E18:1; E18:2; E20:4	LLE seguido por SPE	LCMS/MS	0,12 até 0,20 nmol/g	Pichini <i>et al.</i> , 2008
E12; E14; E16; E16:1; E18; E18:2	SPE	GC/FID	–	Klein <i>et al.</i> , 1999
E16; E18; E18:1; E18:2	HS-SPME	GC/MS	0,13 até 0,32 nmol/g	Hutson <i>et al.</i> , 2009

Laurato de etila (E12), miristato de etila (E14), palmitato de etila (E16), palmitoleato de etila (E16:1), heptadecanoato de etila (E17), estearato de etila (E18), oleato de etila (E18:1), linoleato de etila (E18:2), linolenato de etila (E18:3), araquidonato de etila (E20:4).

LLE – extração líquido-líquido

GC/FID- cromatografia gasosa e detector ionização de chama

GC/MS-CI – cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas operado no modo de ionização química

LCMS/MS – cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas

SPE – extração em fase sólida

HS-SPME- microextração em fase sólida por *Headspace*

LOQ – limite de quantificação

DHA – etil docosahexanoato

OBJETIVO

2. OBJETIVO DO TRABALHO

Os objetivos do trabalho foram:

- Desenvolvimento de um método para identificação dos indicadores da exposição fetal ao etanol (ésteres etílicos de ácidos graxos) em amostras de mecônio, utilizando a microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) como técnica de preparação de amostra.
- Após o desenvolvimento do método, aplicação do mesmo em amostras de mecônio de neonatos provenientes do Hospital Universitário-HU para avaliar possível correlação do resultado analítico com o relato de uso da mãe e informações obtidas a respeito do recém-nascido.

*MATERIAL E
MÉTODOS*

3. MATERIAL

3.1 Equipamento e Acessórios

-Equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo Focus GC acoplado a espectrômetro de massa *Ion Trap* modelo Polaris Q, ambos da Thermo Electron (Waltham, MA, EUA).

3.2 Soluções-padrão

Os padrões de referência dos ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs): laurato de etila (E12), miristato de etila (E14), palmitato de etila (E16), palmitoleato de etila (E16:1), estearato de etila (E18), oleato de etila (E18:1), linoleato de etila (E18:2), araquidonato de etila (E20:4), etil-heptadecanoato e os respectivos ácidos graxos foram obtidos da Sigma (Milwaukee, EUA). Etanol deuterado (etanol-d5) foi obtido da Cambridge Isotope Laboratories (Andover, EUA).

Padrões internos deuterados dos respectivos FAEEs foram sintetizados através da esterificação dos ácidos graxos correspondentes em meio ácido na presença de etanol-d5, conforme descrito na seção “Métodos item 4.5”. A partir dos padrões obtidos foram preparadas soluções de trabalho diluídas em acetonitrila.

3.3 Reagentes e outros materiais

-Reagentes (solventes, sais, etc) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

-Fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100µm e o dispositivo de microextração em fase sólida (SPME) foram obtidos da Supelco (Bellefonte, EUA). A fibra é submetida a um condicionamento prévio por 30 min a 250°C no injetor do equipamento de cromatografia em fase gasosa antes de serem utilizadas.

3.4 Amostras

Foram analisadas 63 amostras de mecônio obtidas dos recém-nascidos 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 foi recolhido da fralda com auxílio de espátula de madeira e colocado em frasco plástico sem conservante e encaminhado ao Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, onde foi mantido sob refrigeração. É aplicado um questionário para a mãe (ANEXO III) com o objetivo de obter informações quanto à idade e ao padrão de uso de bebidas alcoólicas antes e depois da gravidez. Também neste questionário coletou-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 foi 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/USP (CEP n. 723/07). (ANEXO II).

4. MÉTODOS

4.1 Aplicação do questionário para mãe

Conforme descrito anteriormente, para avaliação do padrão de comportamento em relação à bebida alcoólica, foi 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 foram divididas em grupos a seguir:

GRUPO A (não-expostos): Amostras de recém-nascidos cujas mães relataram como sendo não-consumidoras de bebidas alcoólicas. As informações a respeito do recém-nascido também não deveriam acusar qualquer anormalidade.

GRUPO B (consumidoras de bebidas alcoólicas): Amostras de recém-nascidos onde os questionários “TWEAK” mostraram-se afirmativo para o consumo de bebidas alcoólicas e cujas mães admitiram uso da substância durante a gestação.

O tratamento das amostras foi realizada no grupo A (não-exposto), para eliminar o analito de interesse (uma vez que FAEEs estão presentes no mecônio em pequenas quantidades mesmo sem o consumo de etanol pela mãe durante a gestação) e serem utilizadas como branco para o desenvolvimento e validação dos métodos.

4.2 Desenvolvimento do método de microextração em fase sólida por *headspace*

4.2.1 Amostra sem o analito de interesse

Em estudos preliminares, verificou-se que alguns FAEEs podem ser encontrados em mecônio de neonatos não expostos *in utero* ao etanol (Chan *et al.*, 2003).

O melhor tratamento da amostra para eliminar os analitos de interesse e/ou interferentes para obter “o branco”, foi manter as amostras de mecônio na estufa durante 4 horas a uma temperatura de 110°C. A degradação dos FAEEs foi analisada por GC/MS.

4.2.2 Preparação da amostra

Em *vial* de *headspace* de 10 mL foram adicionados 100mg de mecônio, 2 mL de água destilada, 40µL da solução de laurato de etila-d5, miristato de etila-d5, palmitoleato de etila-d5, palmitato de etila-d5, etil-linoleato-d5, oleato de etila-d5, estearato de etila-d5, araquidonato de etila-d5, na concentração de 1µg/mL e 10 mg de cloreto de sódio (NaCl). Em seguida os *vials de headspace* foram lacrados e submetidos à agitação magnética e temperatura de 80°C no vapor da solução. O procedimento de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) inicia-se através da exposição da fibra de SPME aos vapores da solução *headspace*. Em seguida, a fibra é exposta no injetor do equipamento GC/MS conforme esquematizado na Figura 4.

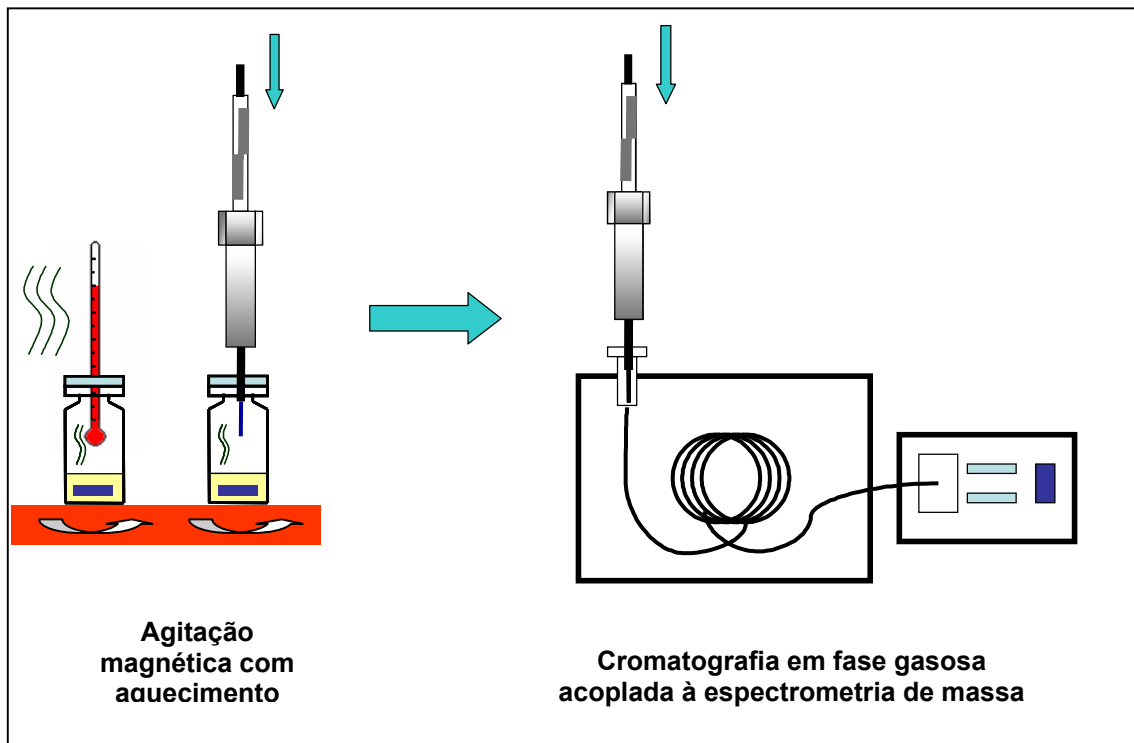


Figura 4. Esquema do procedimento de microextração em fase sólida por *headspace* empregado na determinação de FAEEs em mecônio.

4.3 Condições do GC/MS

4.3.1 Condições cromatográficas

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com dimensões de 30m x 0.25mm x 0.1 μ m de espessura do filme. As injeções foram feitas no modo *splitless*. Hélio foi usado como gás de arraste num fluxo constante de 1mL/min. A temperatura do injetor foi de 250°C. Foi usado um *liner* especial para SPME. Utilizou-se a seguinte rampa: temperatura do forno foi mantida a 80°C por 1 min e programada para aumentar 10°C/min até 200°C mantidos por 5 min, posteriormente elevação de

15°C/min até 280°C mantidos por 3 min. A temperatura da interface GC/MS foi mantida constante a 270 °C. Tempo total da corrida cromatográfica: 26,33 min.

4.3.2 Condições do espectrômetro de massa

O modo de operação utilizado foi *full scan*, com seleção de massas de 100 a 400. A temperatura da fonte de ionização foi de 220°C e o início da detecção dos FAEEs (*Start time*) após 5.50 minutos.

Entre os modos de ionização disponíveis no espectrômetro de massas (ionização química ou ionização eletrônica), de eleição foi a ionização química (CI) com fluxo de metano de 1 mL/min. A Tabela 2 mostra os íons selecionados para quantificação dos analitos.

4.4 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 abundância absoluta no GC/MS.

4.4.1 Avaliação do pH

Em *vial de headspace* de 10mL foram adicionados 100mg de mecônio, 2 mL de água destilada, 40µL da solução de laurato de etila, miristato de etila, palmitoleato de etila, palmitato de etila, linoleato de etila, oleato de etila, estearato de etila e araquidonato de etila, na concentração de 1µg/mL. Em seguida os *vials de headspace* foram lacrados e submetidos à agitação

magnética a temperatura de 80°C durante 30 min. A extração e as análises foram realizadas em triplicata para cada pH estudado. Os seguintes valores de pH foram testados nesse estudo pH 2,0; 4,0; 6,0 e 9,0; o ajuste foi realizado com HCl.

Tabela 2. Valores (m/z) do pico base encontrados para análise dos FAEEs e os análogos d5 por GC/MS-Scan.

Composto	Valores de m/z
Laurato de etila-d5	234
Laurato de etila	229
Miristato de etila- d5	262
Miristato de etila	257
Palmitoleato de etila- d5	288
Palmitoleato de etila	283
Palmitato de etila- d5	318
Palmitato de etila	313
Linoleato de etila- d5	312
Linoleato de etila	307
Oleato de etila- d5	316
Oleato de etila	311
Estearato de etila- d5	318
Estearato de etila	313
Arquidonato de etila- d5	338
Araquidonato de etila	333

4.4.2 Avaliação da temperatura

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi utilizado com a diferença que nesse caso o pH foi igual a 4,0. A extração foi realizada nas diferentes temperaturas: 70, 80 e 90°C. A eficiência da extração foi avaliada

através da área absoluta formada pelos analitos nas diferentes temperaturas de extração.

4.4.3 Avaliação do tempo de extração

Nesse caso o procedimento analítico também foi o mesmo, fixando-se temperatura de extração em 80°C. Variaram-se então os tempos para extração: 10, 20, 30 e 40 minutos. A eficiência de extração também foi avaliada através da área absoluta formada pelos analitos nos diferentes tempos de extração realizados.

4.4.4 Avaliação da quantidade de mecônio

Para realização da otimização da quantidade de mecônio, o procedimento de preparação da amostra foi o mesmo já descrito e a extração ocorreu durante 30 minutos. Ensaios foram realizados em triplicata, adicionando-se diferentes quantidades de mecônio: 10, 50, 100 e 200 mg. A eficiência de extração também foi avaliada através da área absoluta formada pelos analitos nas diferentes quantidades de mecônio adicionadas.

4.4.5 Avaliação do efeito salting out

A evaporação de soluções aquosas é melhorada pelo efeito *salting out*, que também foi avaliado adicionando diferentes quantidades de NaCl em 100mg de mecônio: 0mg, 10mg e 50mg na amostra.

4.5 Síntese dos padrões deuterados

Padrões deuterados de FAEEs não estão disponíveis comercialmente, portanto, a síntese dos padrões internos deuterados dos FAEEs foi realizada através da esterificação dos ácidos graxos correspondentes com etanol-d5 (Tabela 3).

Tabela 3. Ácidos Graxos utilizados para síntese dos padrões deuterados.

Ácido Graxo	Fórmula Molecular
Ácido Laurico	$C_{12}H_{24}O_2$
Ácido Mirístico	$C_{14}H_{28}O_2$
Ácido Palmitoleico	$C_{16}H_{30}O_2$
Ácido Palmitico	$C_{16}H_{32}O_2$
Ácido Linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$
Ácido Oleico	$C_{18}H_{34}O_2$
Ácido Esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$
Ácido Araquidônico	$C_{20}H_{32}O_2$

Os padrões deuterados Laurato de etila-d5, palmitato de etila-d5, palmitoleato de etila-d5, estearato de etila-d5, oleato de etila-d5, linoleato de etila-d5 e araquidonato de etila-d5 foram sintetizados conforme método modificado de PRAGST *et al.* (2001). Em um balão volumétrico de 5 mL, 200 µL de etanol-d5 foram adicionados em 50µg do ácido graxo correspondente. A mistura foi resfriada com banho de gelo seco para a adição de 50 µL de cloreto de tionila, em seguida a reação foi processada sob aquecimento a 40°C durante 2 horas. Os produtos das reações foram analisados por cromatografia gasosa com espectrometria de massa para a avaliação do grau de pureza. Um esquema da reação de síntese dos padrões está representado na Figura 5.

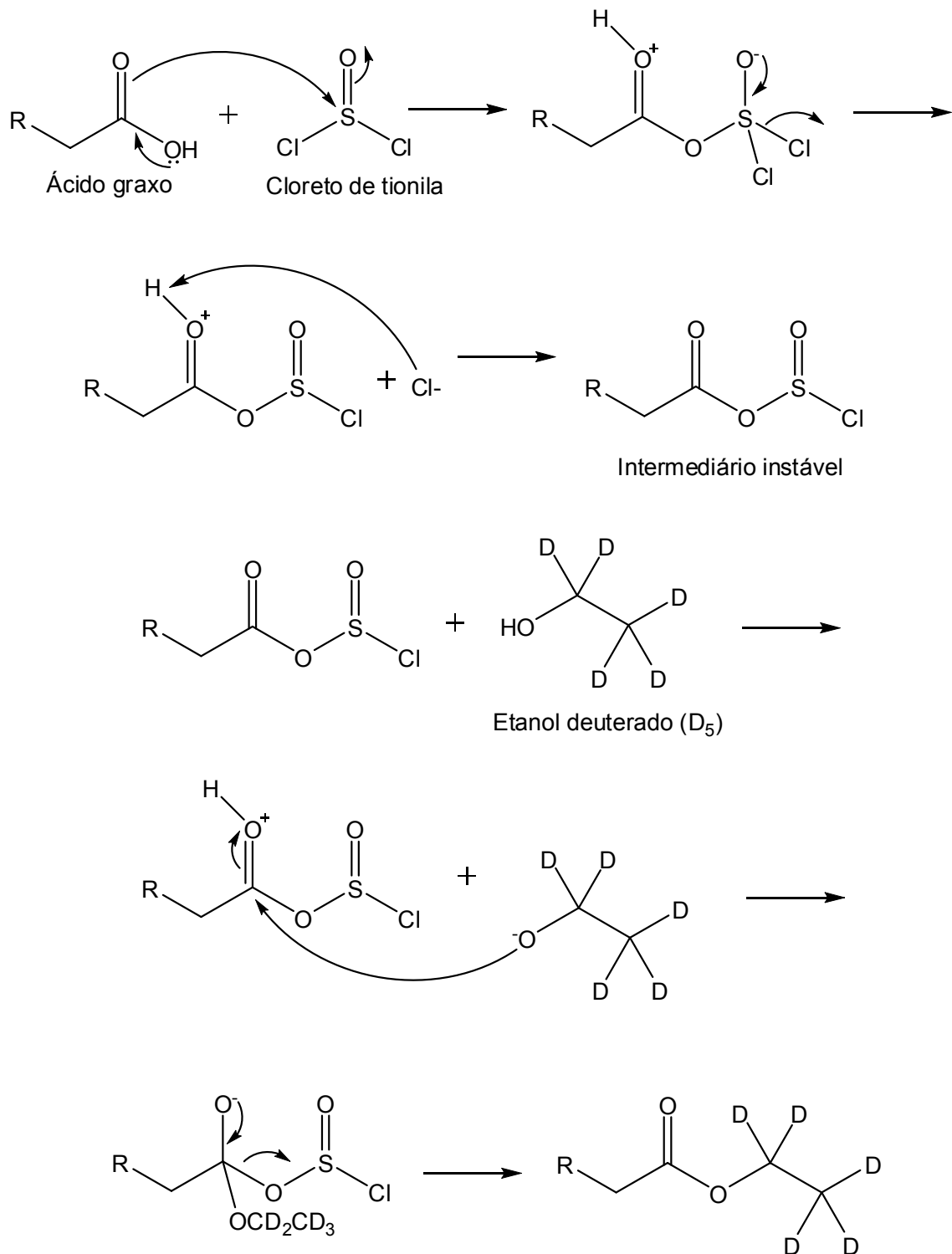


Figura 5. Esquema das reações químicas na produção dos padrões de ésteres etílicos de ácidos graxos deuterados.

4.6 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 recomendado pela Resolução 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

4.6.1 Limite 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 na qual a detecção foi viável e o LOQ a menor concentração que apresentou um coeficiente de variação que não excedeu 20% (ARMBRUSTER & PRY, 2008)

4.6.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RIBANI *et al.*, 2004). O estudo de linearidade foi realizado pela análise das amostras de mecônio submetidas ao método em triplicata nas seguintes concentrações dos FAEEs: (LOQ de cada FAEE, 100, 200, 500, 1000 e 2000 ng/g) e para o araquidonato de etila: (LOQ, 300, 400, 500, 1000 e 2000 ng/g).

4.6.3 Precisão intraensaio 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) dos FAEEs: laurato de etila, miristato de etila, palmitoleato de etila, oleato de etila e estearato de etila (120; 810; 1500 ng/g); palmitato de etila e linoleato de etila (200; 850; 1500 ng/g) e araquidonato de etila (450; 975; 1500 ng/g). As análises foram realizadas em 5 replicatas para cada concentração.

4.6.4 Carryover

O *carryover* foi avaliado através da adição de padrões na maior concentração do analito (ponto alto da precisão), com posterior extração por HS-SPME, seguido da extração de um branco para determinar se havia um sinal (resposta) característica do analito. O procedimento foi realizado com 6 replicatas e em cada análise, a fibra ficou exposta no injetor durante todo o tempo de corrida: 26,33 min.

4.6.5 Recuperação absoluta

A recuperação absoluta do método foi avaliada através da análise de amostras com padrões de FAEEs 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 FAEEs: laurato de etila, miristato de etila, palmitoleato de etila, oleato de etila e estearato de etila (120; 810; 1500 ng/g); palmitato de etila e linoleato de etila (200; 850; 1500 ng/g) e araquidonato de etila (450; 975; 1500 ng/g). As análises foram realizadas em 6 replicatas para cada concentração.

RESULTADOS

5.RESULTADOS

Nessa seção são apresentados, inicialmente, resultados da otimização do método de HS-SPME desenvolvido para determinação dos ésteres etílicos de ácidos graxos em amostras de mecônio, além de cromatograma e espectros obtidos das análises desses compostos. Em seguida são apresentados os resultados de validação (limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e precisão intra e interensaio, recuperação e *carryover*).

5.1 Cromatograma e espectros obtidos nas condições padronizadas

Na Figura 6 é apresentado um cromatograma de íons totais de uma amostra adicionada dos analitos na concentração de 500 ng/mg submetido ao método proposto. Nas Figuras 7 a 14 são apresentados os espectros de massa de cada analito e seu padrão interno deuterado.

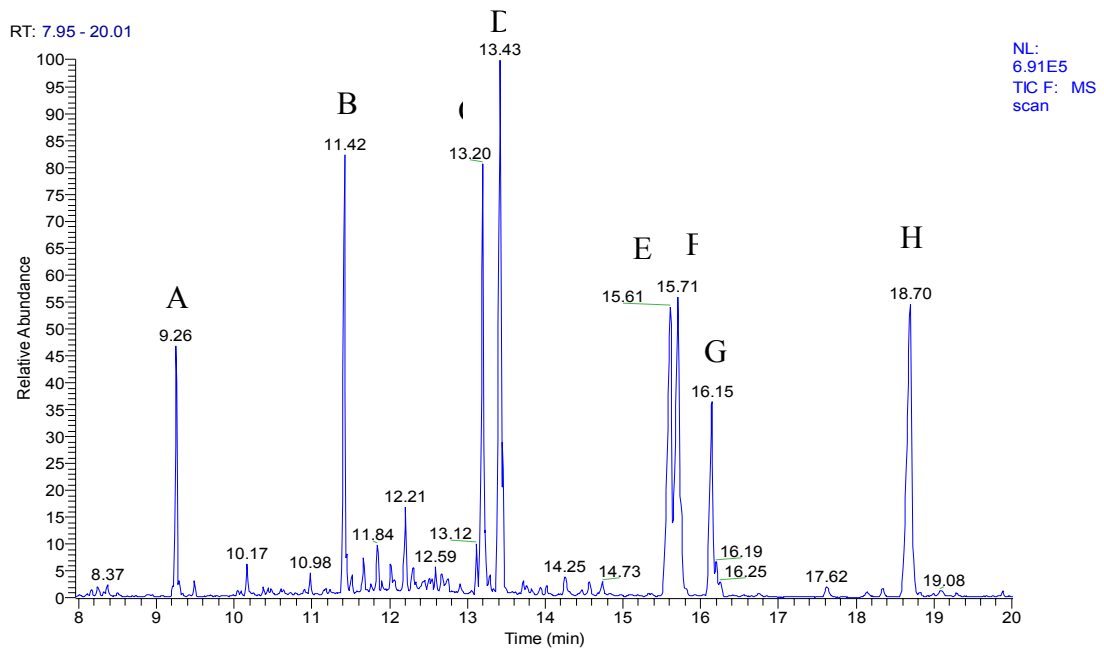


Figura 6. Cromatograma GC/MS-SCAN dos FAEEs : pico do laurato de etila e laurato de etila-d5 (A); pico do miristato de etila e miristato de etila-d5 (B); pico do palmitoleato de etila e palmitoleato de etila-d5 (C); palmitato e palmitato-d5 (D); linoleato e linoleato-d5 (E); oleato e oleato-d5 (F); estearato e estearato-d5 (G); araquidonato e araquidonato-d5 (H).

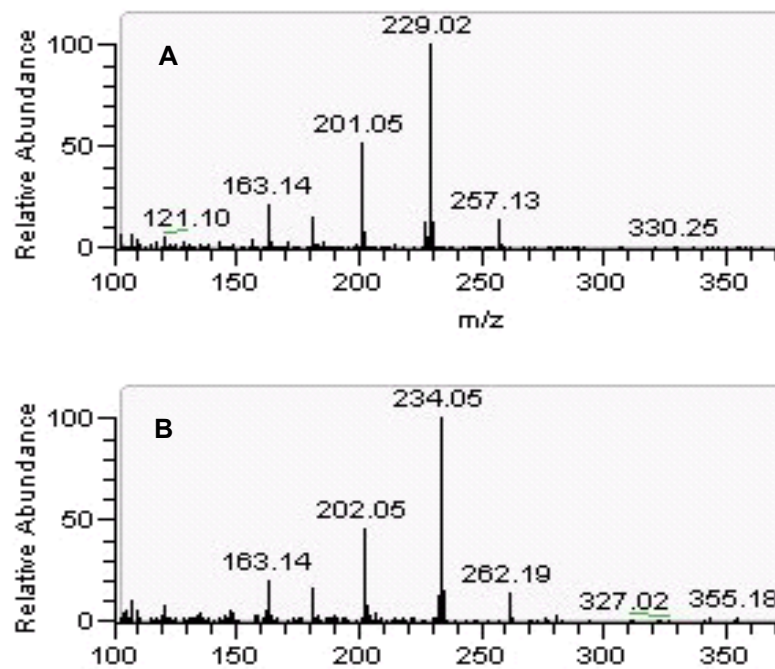


Figura 7- (A) Espectro de massa do laurato de etila e (B) espectro de massa do laurato de etila-d5.

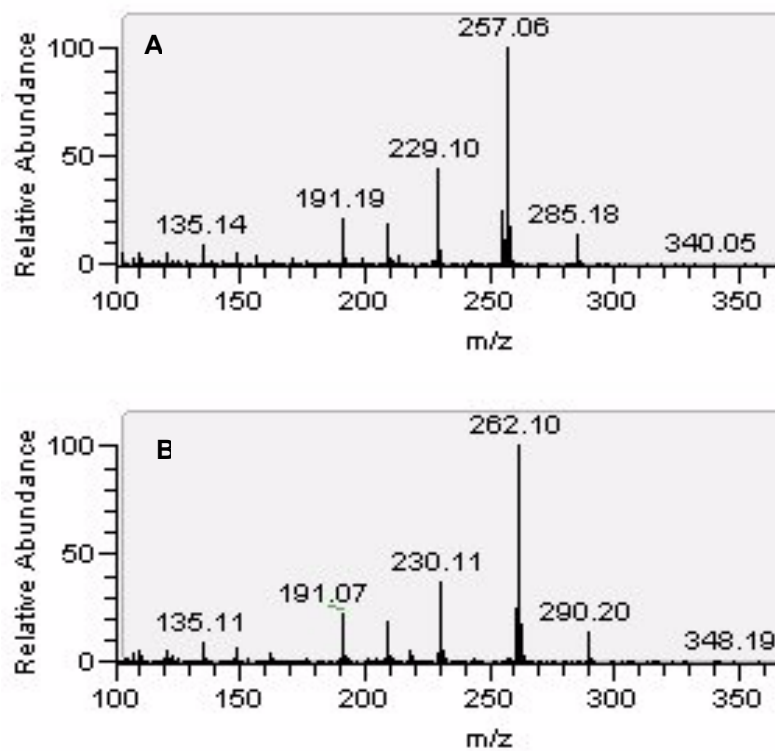


Figura 8- (A) Espectro de massa do miristato de etila e (B) espectro de massa do miristato de etila-d5.

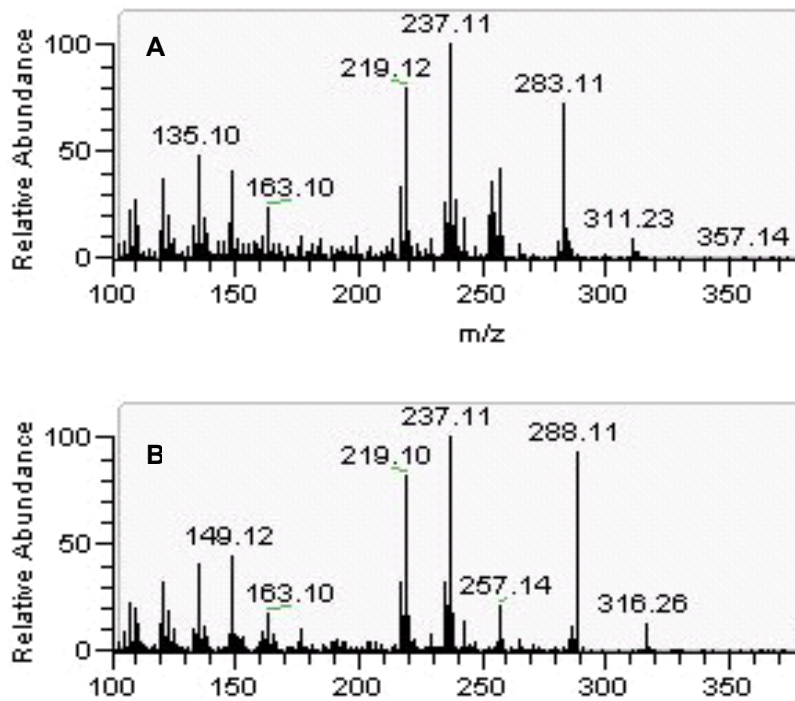


Figura 9- (A) Espectro de massa do palmitoleato de etila e (B) espectro de massa do palmitoleato de etila-d5.

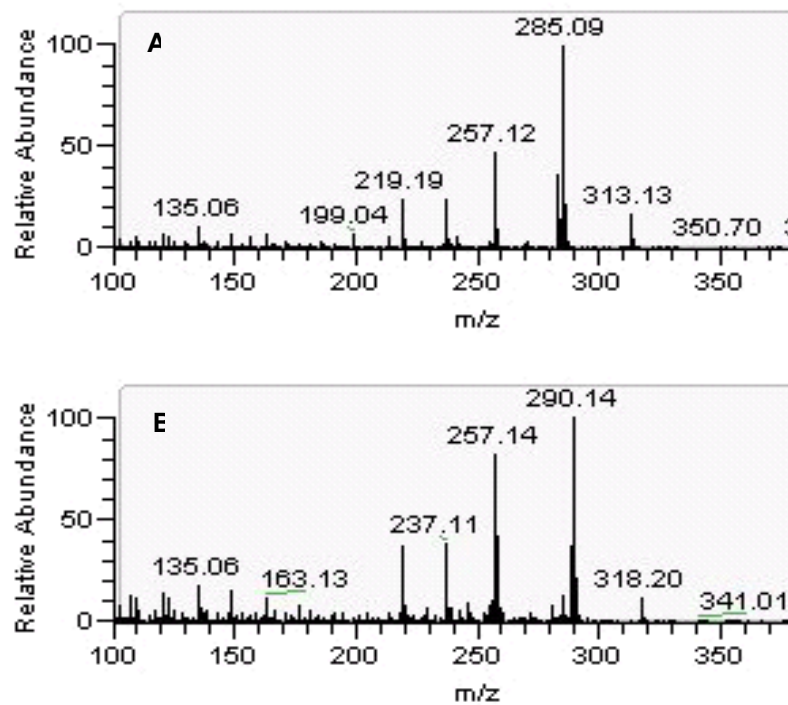


Figura 10- (A) Espectro de massa do palmitato de etila e (B) espectro de massa do palmitato de etila-d5.

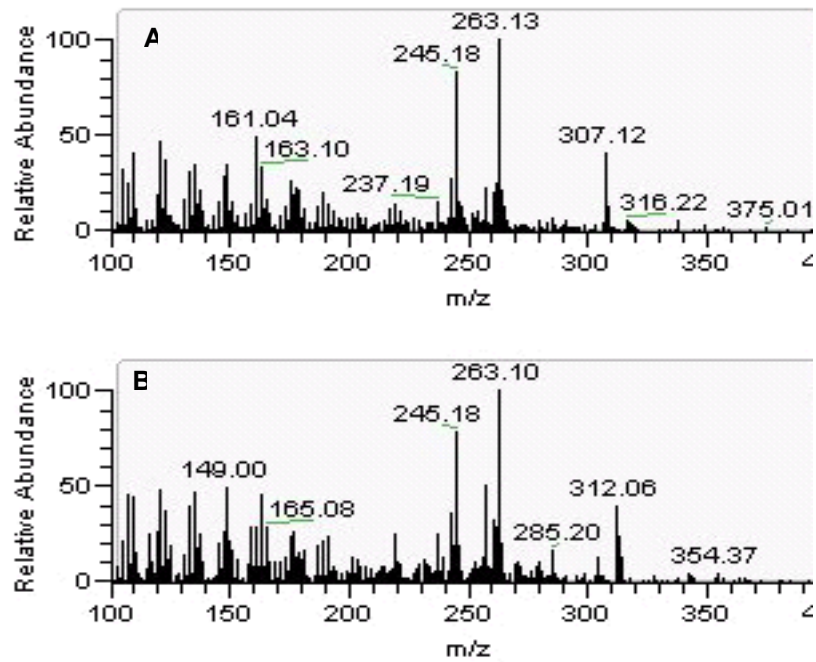


Figura 11- (A) Espectro de massa do linoleato de etila e (B) espectro de massa do linoleato de etila-d5.

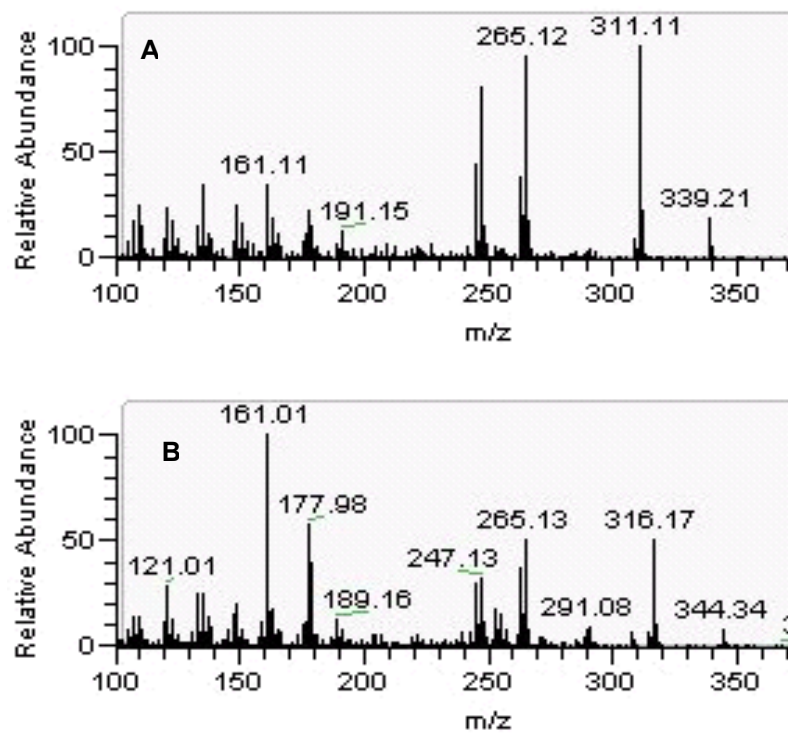


Figura 12- (A) Espectro de massa do oleato de etila e (B) espectro de massa do oleato de etila-d5.

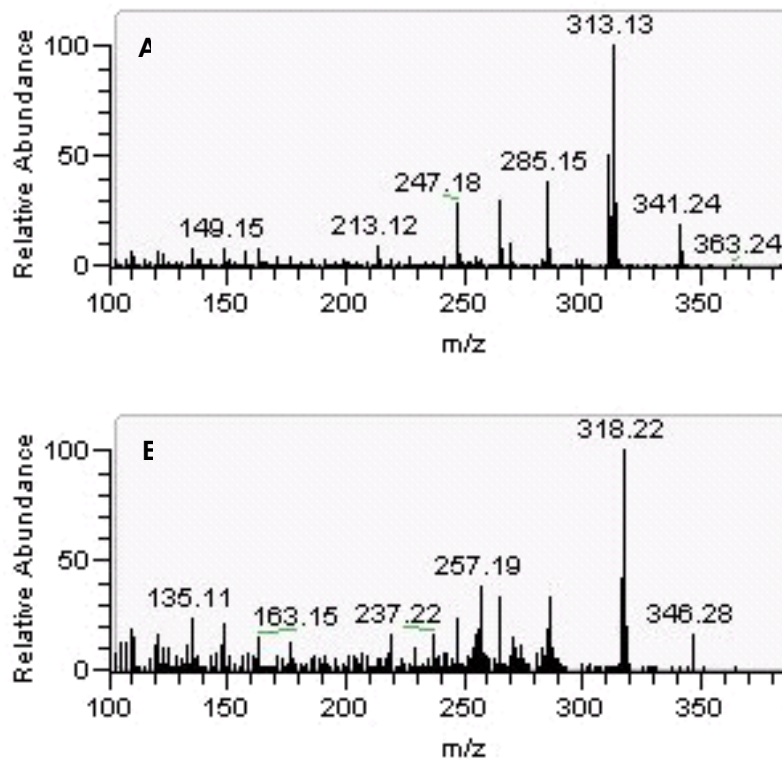


Figura 13- (A) Espectro de massa do estearato de etila e (B) espectro de massa do estearato de etila-d5.

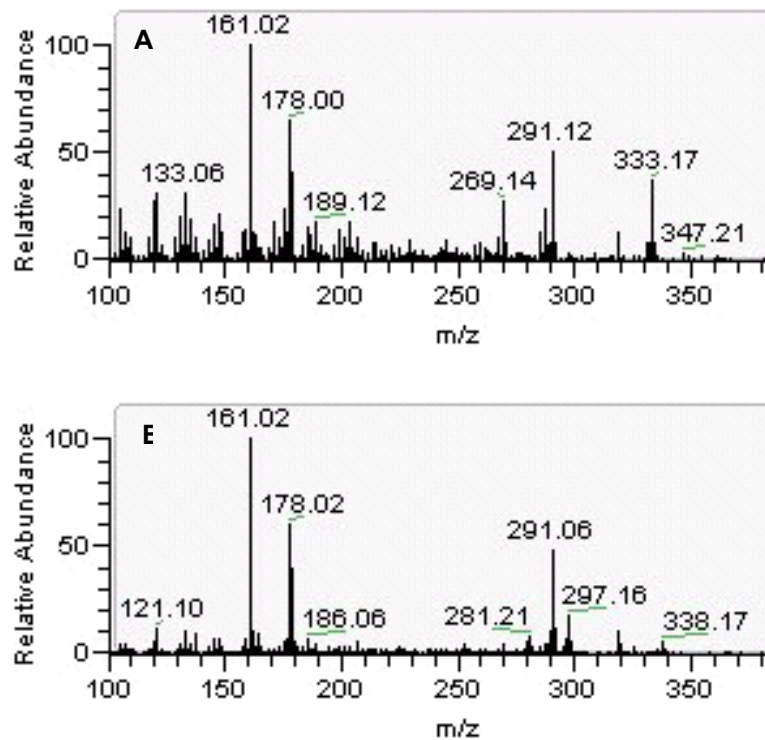


Figura 14- (A) Espectro de massa do araquidonato de etila e (B) espectro de massa do araquidonato de etila-d5

5.2 Otimização das condições de extração dos FAEEs em mecônio

Na otimização das condições do método, foram avaliadas as seguintes variáveis: pH, temperatura, tempo de extração, quantidade de amostra e quantidade de sal (efeito *salting out*). Nessa avaliação, considerou-se a área absoluta de cada analito e, portanto, padrões internos não foram utilizados nessa fase.

5.2.1 Resultados do estudo do pH ótimo para extração

Nos ensaios de otimização de extração, verificou-se que, para a maioria dos FAEEs, melhores rendimentos são observados em pH 4,0 (Figura 15)

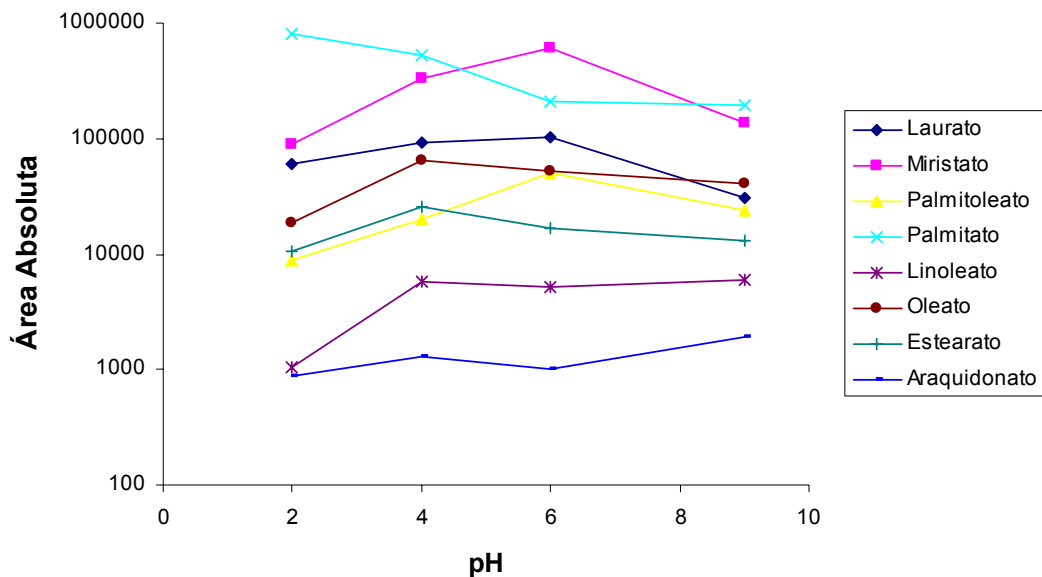


Figura 15 – Avaliação da influência do pH na eficiência de extração dos FAEEs.

5.2.2 Resultados da influência da temperatura de extração

Nesse procedimento analítico, fixando-se o pH 4,0, a temperatura adotada foi de 80°C, pois nas outras temperaturas estudadas os rendimentos foram menores (Figura 16)

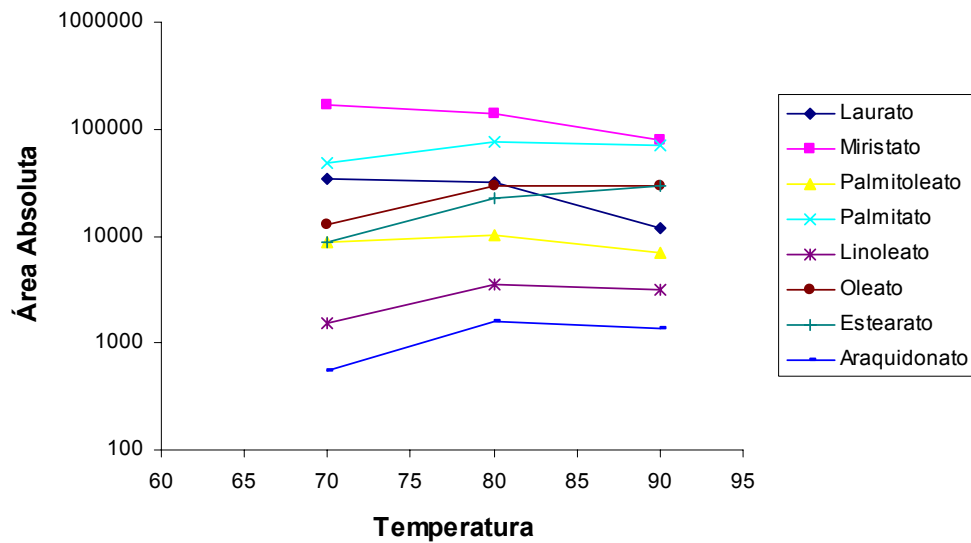


Figura 16 – Avaliação da temperatura na eficiência de extração dos FAEEs

5.2.3 Resultado do estudo da influência do tempo de extração

A influência do tempo na eficiência de extração pode ser visualizada na Figura 17. O tempo de extração selecionado foi de 30 minutos.

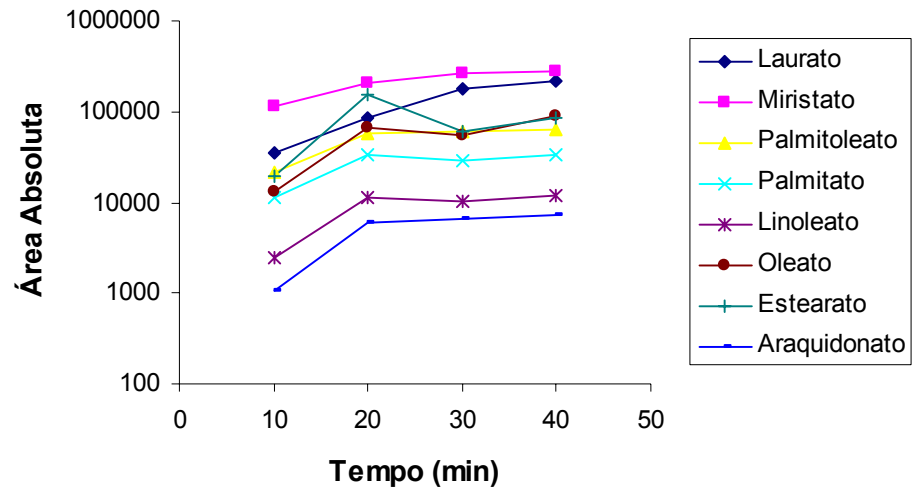


Figura 17. Avaliação do tempo na eficiência de extração dos FAEEs.

5.2.4 Resultados da avaliação da quantidade de mecônio

A influência da quantidade de mecônio na eficiência de extração pode ser visualizada na Figura 18. Observou-se que a eficiência da HS-SPME decresce com o aumento da quantidade de amostra. Avaliando-se a resposta de área absoluta proporcionalmente à quantidade avaliada, selecionou-se a massa de 100 mg.

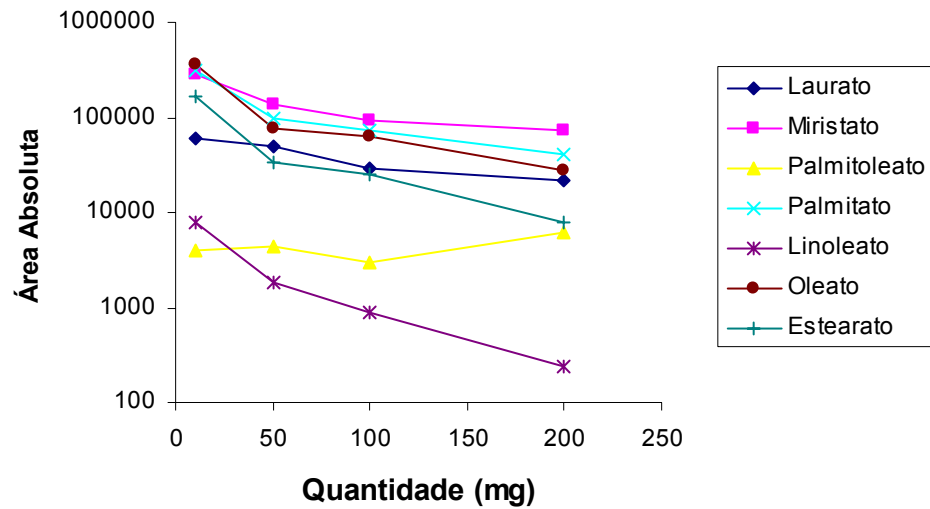


Figura 18. Avaliação da quantidade de mecônio na eficiência de extração dos FAEEs.

5.2.5 Resultados da avaliação da adição de cloreto de sódio na amostra

Foi observado que a eficiência de extração primeiramente aumentou com a adição de sal e posteriormente diminuiu com o aumento da quantidade de NaCl adicionada (Figura 19). Desta forma, 10 mg foi a quantidade selecionada.

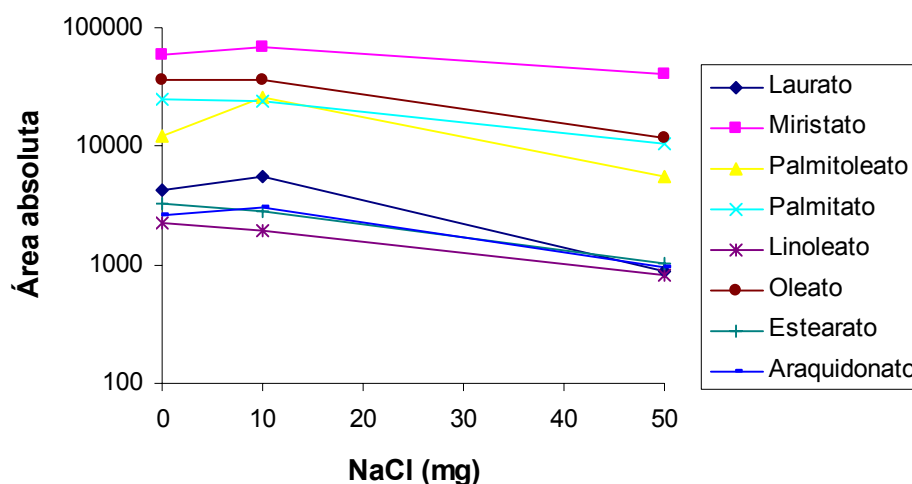


Figura 19. Avaliação do efeito *salting out* na eficiência de extração dos FAEEs.

5.3 Resultados da validação do método

5.3.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos FAEEs obtidos para o método proposto estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores (ng/g) de limite de detecção e limite de quantificação dos FAEEs analisados.

	E12	E14	E16:1	E16	E18:2	E18:1	E18	E20:4
LOD	10	5	20	30	50	20	10	100
LOQ	20	10	40	60	75	40	20	150

LOD: Limite de detecção

LOQ: Limite de quantificação

E12: laurato de etila, E14: miristato de etila, E16:1: palmitoleato de etila, E18:1 oleato de etila e E18: estearato de etila; E16: palmitato de etila; E18:2: linoleato de etila; E20:4: araquidonato de etila.

5.3.2 Linearidade

O método demonstrou ser linear na faixa de concentração estudada para todos os FAEEs. As curvas de calibração e equações de regressão linear dos analitos são apresentadas nas Figuras 20 a 27.

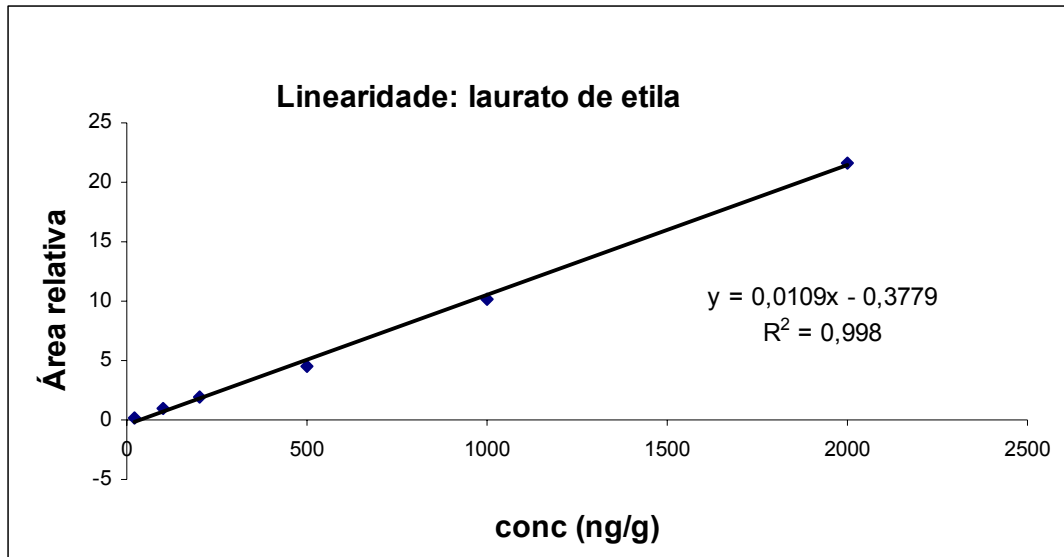


Figura 20. Curva de calibração do laurato de etila.

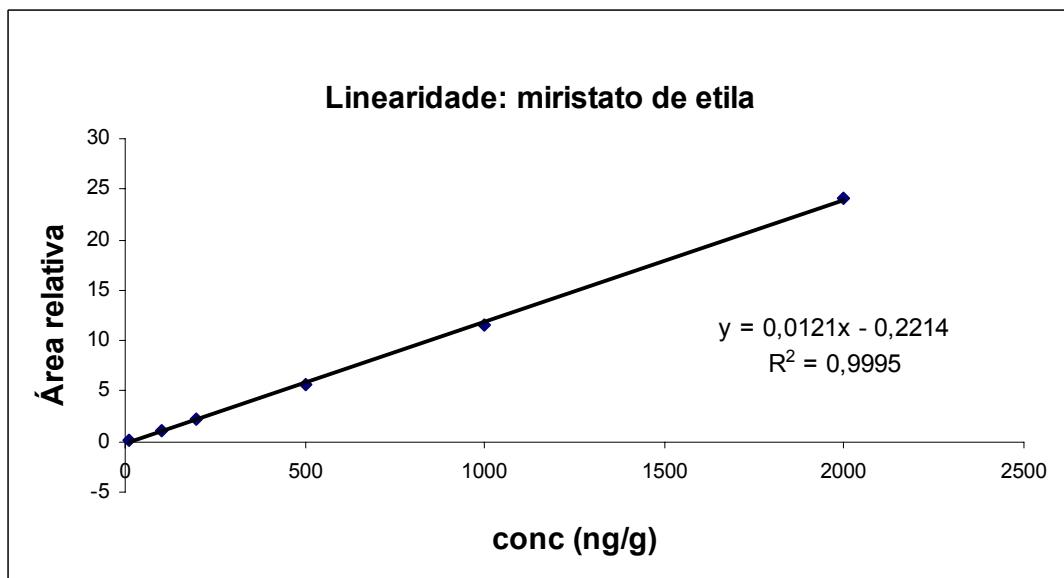


Figura 21. Curva de calibração do miristato de etila

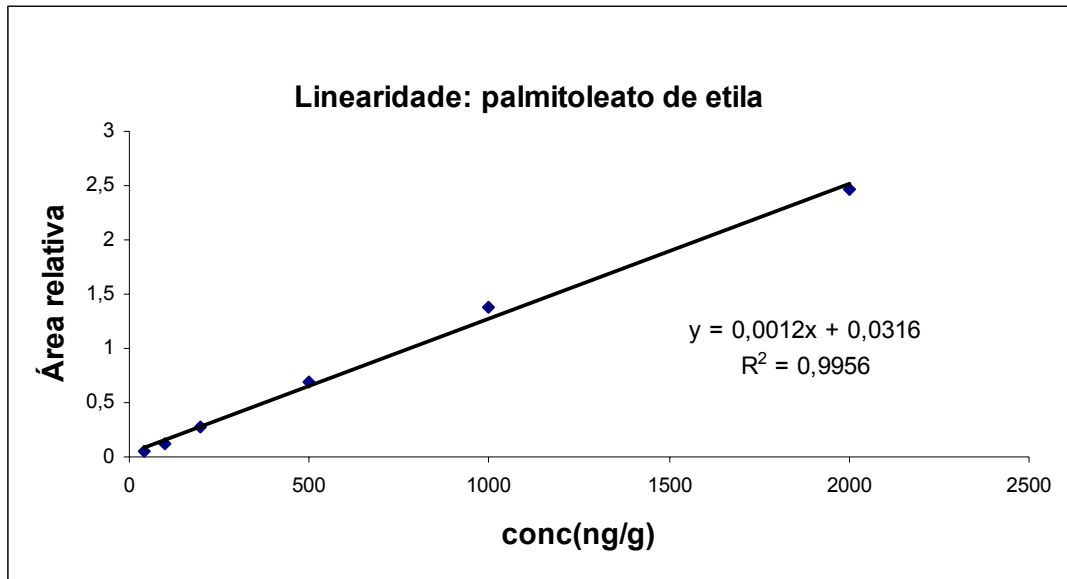


Figura 22. Curva de calibração do palmitoleato de etila

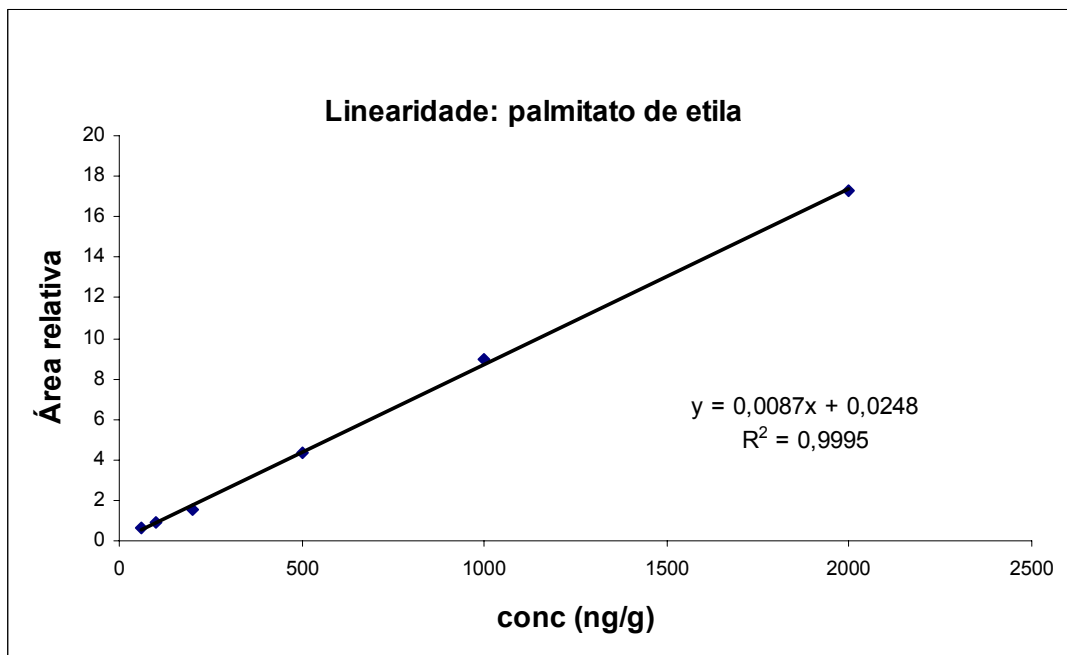


Figura 23. Curva de calibração do palmitato de etila

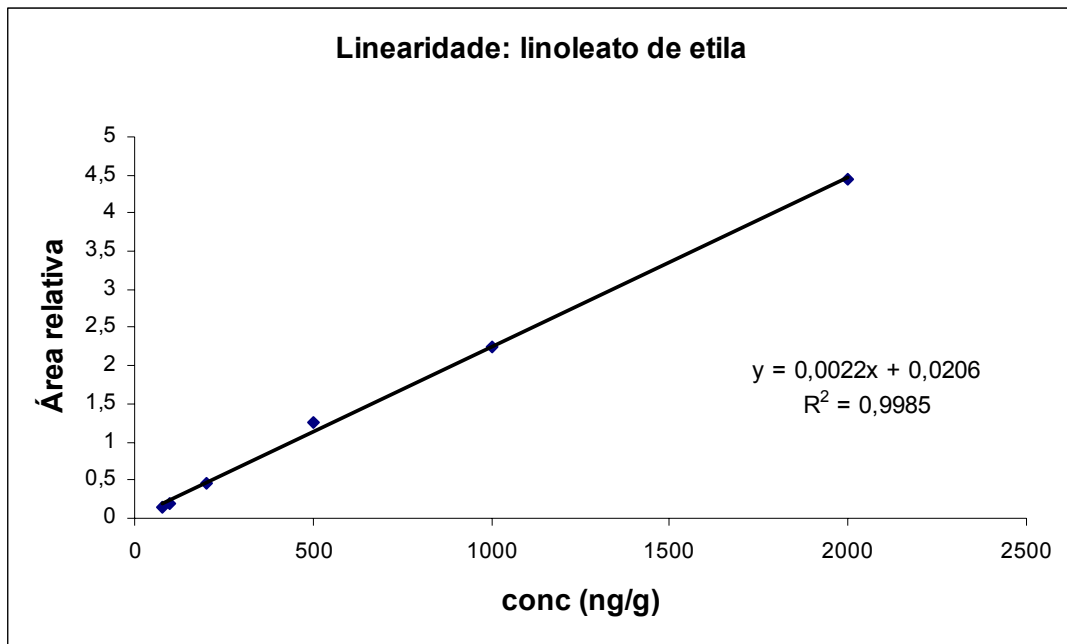


Figura 24. Curva de calibração do linoleato de etila

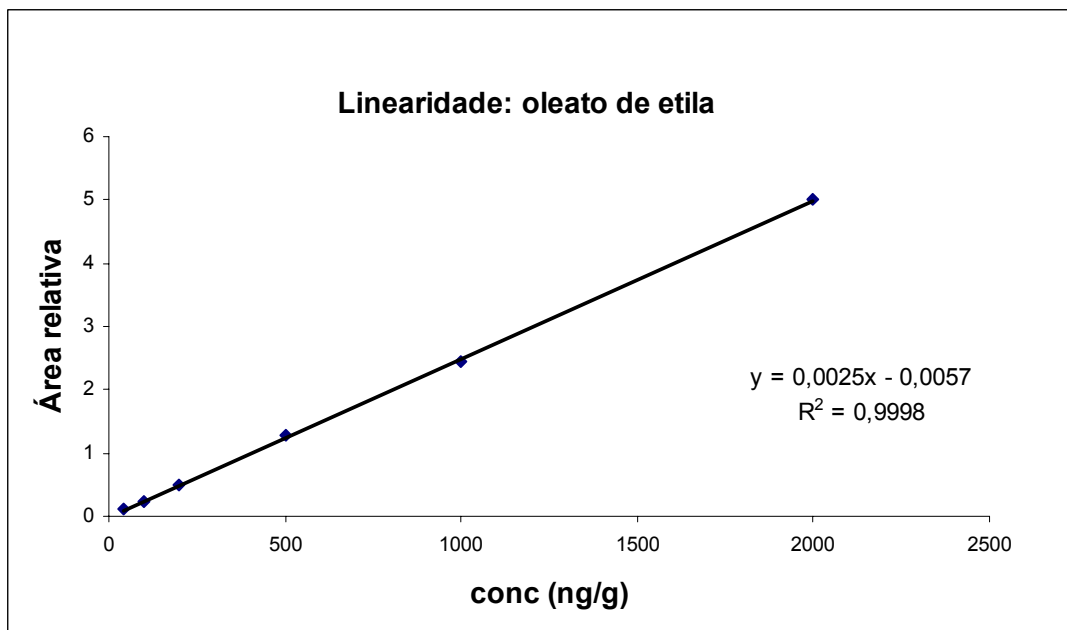


Figura 25. Curva de calibração do oleato de etila

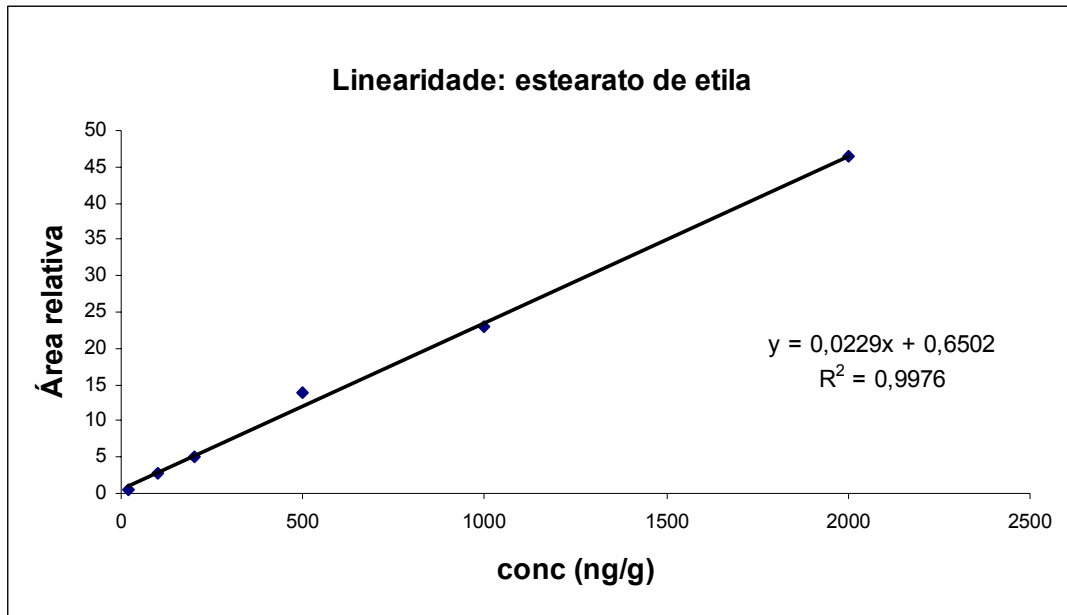


Figura 26. Curva de calibração do estearato de etila

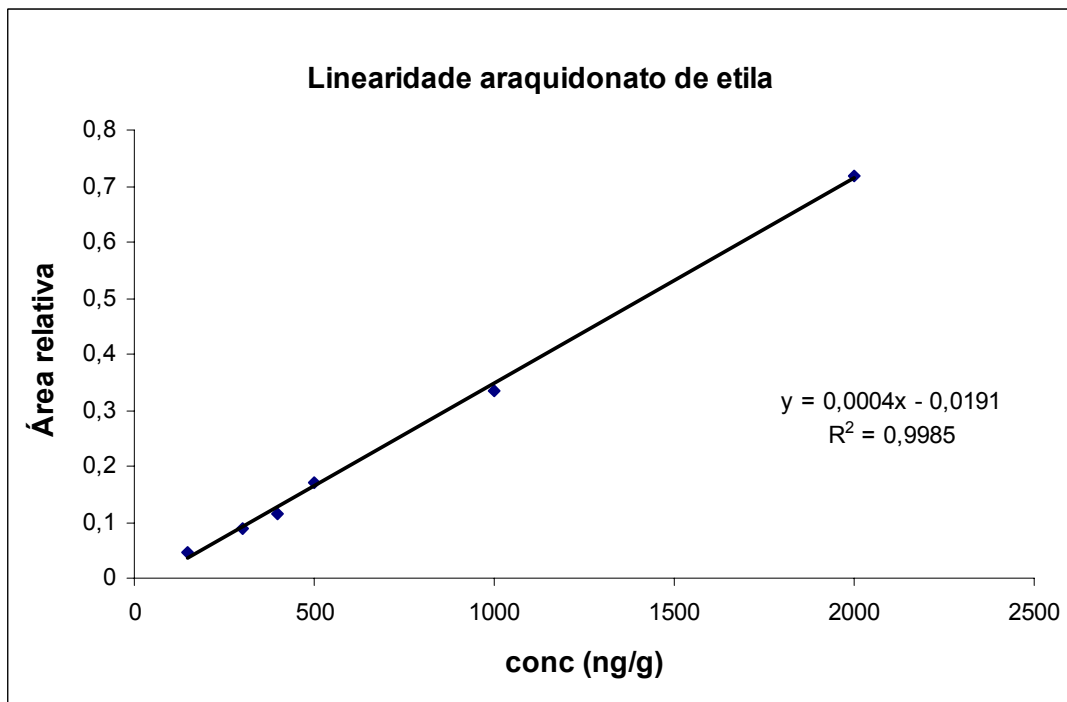


Figura 27. Curva de calibração do araquidonato de etila.

5.3.3 Precisão intra e interensaio

Nas Tabelas 5 e 6 são apresentados os valores de precisão intra e interensaio, definido pelo coeficiente de variação do método (CV), para todos os FAEEs estudados.

Tabela 5 – Valores de precisão intra-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada FAEE.

	E12	E14	E16:1	E16	E18:2	E18:1	E18	E20:4
CQ1	5,5	3,0	5,5	10,5	6,1	9,1	14,4	8,6
CQ2	5,6	2,3	4,4	9,1	4,2	4,7	5,0	2,9
CQ3	4,6	6,1	3,3	6,6	4,6	9,6	9,6	4,7

CQ1 – 120ng/g: laurato de etila (E12), miristato de etila (E14), palmitoleato de etila (E16:1), oleato de etila (E18:1) e estearato de etila (E18); 200ng/g: palmitato de etila (E16) e linoleato de etila (E18:2); 450ng/g: araquidonato de etila (E20:4).

CQ2 – 810ng/g: laurato de etila (E12), miristato de etila (E14), palmitoleato de etila (E16:1), oleato de etila (E18:1) e estearato de etila (E18) ; 975ng/g palmitato de etila (E16) e linoleato de etila (E18:2); araquidonato de etila (E20:4)

CQ3- 1500ng/g para todos FAEEs.

Tabela 6 – Valores de precisão interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada FAEE.

	E12	E14	E16:1	E16	E18:2	E18:1	E18	E20:4
CQ1	1,4	3,8	1,4	8,5	5,3	8,7	11,0	7,1
CQ2	6,6	3,6	2,2	2,5	4,5	3,7	10,2	3,9
CQ3	3,1	3,6	3,2	2,0	3,1	1,8	1,3	7,7

CQ1 – 120ng/g: laurato de etila (E12), miristato de etila (E14), palmitoleato de etila (E16:1), oleato de etila (E18:1) e estearato de etila (E18); 200ng/g: palmitato de etila (E16) e linoleato de etila (E18:2); 450ng/g: araquidonato de etila (E20:4).

CQ2 – 810ng/g: laurato de etila (E12), miristato de etila (E14), palmitoleato de etila (E16:1), oleato de etila (E18:1) e estearato de etila (E18) ; 975ng/g palmitato de etila (E16) e linoleato de etila (E18:2); araquidonato de etila (E20:4)

CQ3- 1500ng/g para todos FAEEs

5.3.4 Carryover

Não foi verificada a presença dos analitos em amostras brancas de mecônio, injetadas após a análise das amostras com adição de padrões.

5.3.5 Recuperação

Os valores de recuperação obtidos para a determinação de FAEEs em mecônio são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em mecônio.

Analito	Recuperação%		
	CQ1	CQ2	CQ3
Laurato	9,8	9,1	1,7
Miristato	33,4	19,0	3,7
Palmitoleato	26,0	13,8	5,0
Palmitato	16,0	13,9	5,7
Linoleato	19,0	12,4	1,9
Oleato	33,0	10,1	9,0
Estearato	5,3	7,4	4,7
Araquidonato	5,7	9,9	7,7

CQ1 – 120ng/g: laurato de etila (E12), miristato de etila (E14), palmitoleato de etila (E16:1), oleato de etila (E18:1) e estearato de etila (E18); 200ng/g: palmitato de etila (E16) e linoleato de etila (E18:2); 450ng/g: araquidonato de etila (E20:4).

CQ2 – 810ng/g: laurato de etila (E12), miristato de etila (E14), palmitoleato de etila (E16:1), oleato de etila (E18:1) e estearato de etila (E18) ; 975ng/g palmitato de etila (E16) e linoleato de etila (E18:2); araquidonato de etila (E20:4)

CQ3- 1500ng/g para todos FAEEs

5.4 Resultado da análise toxicológica em amostras de mecônio

Durante o período deste estudo, o número de coletas de mecônio foi superior ao da análise toxicológica porque várias amostras foram totalmente utilizadas para o desenvolvimento do método e aproximadamente 3 não tinham a quantidade suficiente para análise dos FAEEs. Das amostras coletadas, 63 foram analisadas por GC/MS (Tabela 7). Através da aplicação do questionário “TWEAK”, 26,9% das mães relataram o consumo de etanol durante a gestação: para 7,9% a frequência foi de 1 a 2 vezes por semana e para 19% a frequência foi rara, todas com consumo social. Das mães que afirmaram o consumo, apenas em 1 caso a mãe admitiu o consumo abusivo de etanol (amostra 02)

71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
73	n.d.	n.d.	n.d.	94	n.d.	69	n.d.	149
74	n.d.	n.d.	n.d.	87	23	147	n.d.	154
75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
76	n.d.	n.d.	n.d.	715	477	83	n.d.	n.d.
77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	208	n.d.	n.d.
78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

laurato de etila (E12), miristato de etila (E14), palmitoleato de etila (E16:1), oleato de etila (E18:1); estearato de etila (E18); palmitato de etila (E16); linoleato de etila (E18:2); araquidonato de etila (E20:4); Não detectado (n.d.); identificação (ID); pos (positivo); neg (negativo).

Quanto às informações obtidas dos recém-nascidos, não foram observados casos de prematuridade, baixo peso, baixa estatura ou perímetro cefálico não correspondentes com a normalidade nos bebês em que o mecônio foi coletado e analisado. Durante a obtenção dos dados, o gênero encontrou-se definido nos prontuários dos recém-nascidos. Observações como icterícia, alargamento de suturas, fossa occipital, marca fórcepe com hematoma na região maxilar, palidez membros inferiores e mãos, lesões, cefalohematoma, apêndice auricular, mancha avermelhada em couro cabeludo foram identificadas nos recém-nascidos, porém, não correlacionados com o consumo de etanol pela mãe durante a gestação.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Por se tratarem de componentes relativamente voláteis, foi utilizada a extração de FAEEs da matriz pela técnica de HS-SPME, já aplicada em alguns métodos desenvolvidos para identificação desses compostos em cabelo (AUWARTER *et al.*, 2001; PRAGST *et al.*, 2001). A HS-SPME, uma aplicação alternativa da SPME, é baseada na partição de analitos entre a fase polimérica da fibra, a região do *headspace* (vapor) e a amostra. A HS-SPME tem se apresentado ideal para análise de compostos voláteis e semi-voláteis em espécimes biológicas devido à menor possibilidade de interferentes fixos da matriz (O'REILLY *et al.*, 2005; MILLS & WALKER, 2000).

Para este estudo, a fibra selecionada foi a de polidimetilsiloxano (PDMS), uma vez que este revestimento é especialmente adequado para compostos lipofílicos semi-voláteis.

As condições cromatográficas empregadas foram adequadas, possibilitando uma boa separação e resolução dos picos conforme pode ser visualizado na Figura 6. O tempo empregado para cada análise foi de 26,33 min.

Quanto às condições de operação do espectrômetro de massa, foram considerados os modos de ionização eletrônica (EI) e ionização química (CI).

No modo de operação em EI, um fluxo de elétrons é produzido por um filamento de tungstênio ou rênio aquecido. Esses feixes de elétrons bombardeiam as moléculas na fase de vapor com alta energia e registram o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z). A ionização forma um íon correspondente à

molécula intacta com perda de um elétron e é chamado de íon molecular, M^+ . O íon molecular, ainda com excesso de energia, produz uma série de fragmentos ionizados. O padrão de fragmentação é característico da estrutura original da molécula e permite que o espectro produzido (massas dos fragmentos formados X intensidade) seja utilizado para comparação com uma base de dados já conhecida.

No modo de ionização química (CI), a amostra é inserida na câmara de ionização à pressão de cerca de 1,0 torr por um gás carreador, como o metano. Este gás é ionizado por ionização eletrônica para gerar os íons primários que reagem com excesso de metano produzindo íons secundários CH_5^+ , $C_2H_5^+$, $C_3H_5^+$. Esses, por sua vez, reagem com a amostra. Este processo de ionização é mais brando que o EI, produzindo espectros com menos fragmentação e geralmente, obtêm-se a massa da molécula a ser analisada com mais um próton, chamada de molécula protonada (MH^+).

No presente trabalho, selecionou-se o modo de operação em CI, pois foi verificado que a ionização eletrônica desses compostos resultava em fragmentos idênticos para os vários FAEEs, conforme relatado por outros autores (PICHINI *et al.*, 2008; MOORE *et al.*, 2003).

Na tentativa de detectar os FAEEs por MS/MS, uma das etapas da otimização das condições de operação foi a seleção dos íons para fragmentação seriada. Para isso, baseou-se na abundância da molécula protonada (MH^+) e as análises de fragmentação desses compostos foram realizadas. A Tabela 9 ilustra o íon precursor, que para a maioria dos FAEEs foi a molécula protonada (MH^+) e ainda nesta tabela observam-se os íons

resultantes da quebra do íon precursor selecionado de cada éster etílico e do seu respectivo padrão deuterado.

Tabela 9- Íon precursor e respectiva fragmentação.

Composto	Íons selecionados para fragmentação MS/MS	Valores de m/z no modo MS/MS
Laurato de etila-d5	234	202
Laurato de etila	229	201
Miristato de etila-d5	262	230
Miristato de etila	257	229
Palmitoleato de etila-d5	288	237
Palmitoleato de etila	283	237
Palmitato de etila-d5	318	318
Palmitato de etila	313	257
Linoleato de etila-d5	312	261
Linoleato de etila	307	261
Oleato de etila-d5	316	265
Oleato de etila	311	265
Estearato de etila-d5	318	286
Estearato de etila	313	285
Araquidonato de etila-d5	338	287
Araquidonato de etila	333	287

Na caracterização dos íons utilizando MS/MS com analisador *Ion Trap* e ionização química, a molécula protonada de cada FAEE foi selecionada para fragmentação, obtendo-se o íon produto. Resultados semelhantes da fragmentação da molécula protonada foram encontrados por PICHINI *et al.* (2008), utilizando cromatografia líquida com espectrometria de massas em *tandem* com analisador quadrupolo, para determinar FAEEs.

Não obtivemos resultados esperados utilizando o modo MS/MS e analisador *Ion Trap*, portanto, para a detecção dos analitos no espectrômetro

de massas, o modo *full scan*, que é um modo de operação do MS que gera um espectro completo, foi o de escolha. Neste método, a identidade do composto pode ser verificada pela comparação do seu espectro *full scan* com padrões e a sua quantificação através da área do pico gerada por um fragmento específico. Na maioria dos FAEEs, foi utilizada a molécula protonada como íon quantificador. A exceção foi o palmitato de etila, cujo MH^+ é 285, mas que em sua seleção como íon quantificador era verificada a presença de uma substância interferente no mesmo tempo de retenção. Desta forma, especificamente para o palmitato de etila foi selecionado o íon 313 que corresponde à forma da molécula ligada ao íon secundário $C_2H_5^+$.

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 do etil-heptadecanoato, utilizado na maioria dos trabalhos que determinam FAEEs em mecônio (MOORE *et al.*, 2003; KLEIN *et al.*, 1999; CHAN *et al.*, 2003).

Entretanto, utilizando-se a HS-SPME, verificou-se que os ensaios não foram reprodutíveis para a determinação dos FAEEs com o uso do etil-heptadecanoato como PI. Desta forma, optou-se pela utilização de padrões internos deuterados de cada analito. Padrões internos deuterados são análogos estáveis do analito nos quais são incorporados átomos de deutérios (SKOOG *et al.*, 2002).

Por não serem disponíveis comercialmente, os padrões deuterados dos FAEEs foram sintetizados através da esterificação dos ácidos graxos correspondentes com etanol-d5. Nesta reação, o cloreto de tionila (SOCl_2) reage com a hidroxila (OH) do ácido graxo formando um intermediário instável altamente eletrofílico. A protonação do intermediário instável pelo etanol deuterado gera um eletrófilo forte o suficiente para reagir com o nucleófilo -O-CD₂-CD₃.

A formação dos FAEEs deuterados sintetizados foi constatada por GC/MS com resultado adequado para o uso como padrão interno após análises cromatográficas.

Para a fase de desenvolvimento do método é necessário o uso da matriz biológica sem a presença dos analitos de interesse. Entretanto, é de conhecimento que alguns FAEEs podem ser encontrados em mecônio de neonatos não expostos *in utero* ao etanol (CHAN *et al.* 2003).

Várias amostras de mecônio de neonatos não-suspeitos de exposição fetal ao etanol foram analisadas com objetivo de encontrar amostras sem ésteres etílicos. Porém, na maioria das amostras analisadas, foi comum a presença de ésteres etílicos de ácidos graxos em pequenas concentrações, principalmente aqueles com cadeias mais curtas como laurato de etila, miristato de etila e palmitato de etila.

Para eliminar os FAEEs presentes nas amostras, alíquotas de 100mg de mecônio foram colocadas em frasco de *headspace* e deixadas na estufa durante 4 horas a temperatura de 110°C. Ao analisar a amostra após o tratamento descrito acima, nenhum éster etílico foi detectado, atingindo-se o

resultado esperado. Por isso, este foi o tratamento de escolha para remoção dos ésteres etílicos de ácidos graxos presentes em amostras de mecônio.

Com o intuito de se obter condições ótimas para extração dos analitos por HS-SPME, alguns parâmetros foram avaliados. O tempo de extração (30 minutos) é o mesmo utilizado por PRAGST *et al.* (2001) durante o processo de otimização para análise de quatro FAEEs em amostras de cabelo. Nesse estudo, foi observado que um prolongamento do tempo de extração provoca uma pequena redução na área absoluta dos FAEEs, fato que pode ser explicado devido à ocorrência de hidrólise de alguns FAEEs (PRAGST *et al.*, 2001).

O efeito da quantidade de amostra (efeito matriz) sobre a área do pico usando a técnica de microextração em fase sólida por *headspace* foi determinada utilizando 10, 50, 100 e 200mg de mecônio. Em geral, durante o desenvolvimento de um método analítico, para se melhorar o limite de detecção, uma das estratégias é aumentar a quantidade de amostra empregada. Entretanto, no caso da técnica de HS-SPME foi observado que quanto menor a quantidade de amostra de mecônio, mais eficiente era a extração. Nosso objetivo então foi encontrar um ponto onde a quantidade de amostra empregada afetasse menos o rendimento de extração. Desta forma, foi selecionada a quantidade de 100 mg, pois, em geral, a eficiência da extração foi levemente menor comparada a 10 e 50 mg mas teve uma eficiência bem melhor comparada a 200mg (Figura 18).

A temperatura da solução *headspace* também tem influência considerável no rendimento da extração. Observou-se que a temperatura de 80°C é a melhor temperatura para extração dos FAEEs em mecônio. Segundo

PRAGST *et al.* (2001), a volatilidade tende a diminuir com o aumento do comprimento da cadeia alifática dos FAEEs. Em nossos experimentos, enquanto os FAEEs com cadeias menores como laurato de etila, miristato de etila e palmitoleato de etila já são extraídos na menor temperatura testada (70°C), a extração dos demais FAEEs com cadeias maiores é melhorada com temperaturas maiores.

Também foi avaliado o efeito *salting out* que se baseia na adição de sais nas amostras em meio aquoso com o objetivo de reduzir a solubilidade dos compostos na fase aquosa e melhorar a eficiência das extrações. Em geral, a eficiência de extração tende a aumentar com adição de sal na amostra. Entretanto, neste caso, as áreas produzidas pelos analitos diminuíram na medida em que se aumentou a quantidade de NaCl. Dessa forma, 10 mg foi a quantidade escolhida. O melhor valor de pH encontrado para extração dos FAEEs foi de 4.0. Neste estudo observou-se que em valores de pH mais baixos (2) ou mais altos (9), o rendimento da extração dos analitos reduzia consideravelmente.

Após serem definidas as condições de valores de pH, quantidade de mecônio utilizada durante a extração, adição de NaCl (efeito *salting out*), tempo e temperatura de extração, foi verificada a possibilidade de automatização de todo o processo, tentando-se aproveitar do recurso do equipamento disponível (GC/MS com amostrador automático).

De fato, a automatização das técnicas de preparação da amostra permite um aumento da produtividade, capacidade de obter a mesma, ou melhor, precisão, diminuição do treinamento de funcionários, redução do contato humano com a amostra biológica (McDOWALL, 1989).

Para a elaboração do método automatizado de HS-SPME foram mantidas as mesmas condições cromatográficas e de extração previamente otimizadas no método manual exceto na quantidade de mecônio analisada. Porém, alguns parâmetros diferentes foram avaliados nesse método:

Na extração por HS-SPME automatizado, o processo é realizado seqüencialmente, ou seja, enquanto o dispositivo de SPME está mantido no injetor para dessorção dos analitos, a próxima amostra será extraída. Para certificar-se de que o tempo de adsorção da fibra não influenciaria a próxima análise do método automatizado, foram avaliados diferentes tempos de adsorção da fibra no injetor: 3 min, 5 min, e 7 min. Além deste parâmetro, ainda foram avaliadas diferentes alturas de inserção da agulha no vial de *headspace* 10mm, 20mm, 30mm. A quantidade de mecônio foi de 10 mg e adicionou-se 40 μ L da solução de laurato de etila, miristato de etila, palmitoleato de etila, palmitato de etila, linoleato de etila, oleato de etila, estearato de etila, araquidonato de etila a 100 μ g/mL. Após cada extração, fazia-se uma nova injeção da fibra sem outro período de contato com a amostra para certificar-se de que nenhum dos FAEEs estivessem aderidos e interferissem nas análises posteriores.

A eficiência de extração no modo automatizado não foi a mesma obtida no modo manual. Assim, o procedimento descrito anteriormente foi testado novamente, com a diferença que nesse caso o tempo de adsorção da fibra foi de 7 minutos e a adição de padrões foi na concentração de 1 μ g/mL. A extração ocorreu em diferentes temperaturas: 70, 80 e 90°C.

O tempo de adsorção da fibra considerado ideal para extração por HS-SPME no método automatizado foi de 7 minutos. Tempos menores de

dessorção demonstravam presença de alguns FAEEs. Foi utilizada uma concentração alta (100 µg/mL) para garantir que não haveria influência da extração anterior.

A imersão da agulha que acondiciona a fibra de polidimetilsiloxano em 30 mm do *vial* de *headspace* foi que melhor extraiu os analitos. A programação com 10 mm de imersão foi insuficiente para expor a fibra e resultou na quebra da mesma. A imersão da agulha em maior profundidade pode comprometer a extração, pois ao expor a fibra, há risco de atingir a solução, o que não é o objetivo da técnica *headspace*.

Contudo, embora tenha parecido promissor à primeira vista, os cromatogramas obtidos mostraram que a HS-SPME automatizado não apresentava uma boa resposta para os FAEEs comparada com a injeção manual. Inicialmente, acreditava-se que a temperatura do modo automatizado não correspondia à temperatura monitorada manualmente. Porém, resultados feitos em triplicata avaliando 70, 80 e 90°C mostraram que as diferentes temperaturas não resultaram em melhora da extração. Uma das razões para a baixa resposta verificada pode estar associada ao fato de que no modo automatizado, a extração é feita por agitação mais branda, sem barras magnéticas enquanto no manual, a agitação é feita por barras e agitador magnético.

Desta forma, o método de HS-SPME automatizado foi abandonado e substituído pela forma manual. Assim, os dados de validação do método (limite de detecção e quantificação, linearidade e precisão intra e interensaio) foram obtidos nesse modo de operação.

Os valores de LOD e LOQ foram considerados satisfatórios para todos os FAEEs, pois são compatíveis com outros métodos analíticos descritos na literatura científica. Para alguns FAEEs, valores tão baixos quanto 20 ng/mg puderam ser obtidos como LOQ.

Tanto a precisão interensaio como a intraensaio produziram valores adequados para métodos cromatográficos, obtendo-se valores de coeficientes de variação menores que 15% para precisão interensaio e para precisão intraensaio. O uso de padrões internos deuterados deve ter contribuído para obtenção desses valores, pois o padrão interno utilizado é muito parecido quimicamente com os analitos, o que possibilitou a participação do PI em todas as etapas analíticas de validação do método.

Para o estudo da linearidade, uma ampla faixa de trabalho foi avaliada (LOQ a 2000 ng/g) com base nas concentrações geralmente verificadas em casos de exposição fetal ao etanol relatado na literatura. Trabalhos mencionam desde a detecção de FAEEs individualmente até a determinação da concentração total dos analitos.

O termo *carryover* é utilizado para referir a contaminação de uma amostra analisada por uma imediatamente anterior a ele. No presente trabalho, não foi observado *carryover* para análise dos FAEEs.

O método proposto e validado neste trabalho consiste basicamente no emprego da técnica de microextração em fase sólida por *headspace* como preparação da amostra. Após a extração, as amostras são injetadas no GC/MS. Calcula-se que o tempo necessário para a realização do procedimento analítico seja de 60 minutos. Quando comparado a outros métodos descritos na literatura, é rápido e prático.

Após o desenvolvimento e validação do método para determinação de FAEEs em mecônio por GC/MS, este foi aplicado em amostras de mecônio de recém-nascidos do Hospital Universitário em que a mãe admitiu ou não o uso de etanol durante a gestação. Na Tabela 7 foram apresentados os resultados das análises por HS-SPME em mecônio. Analisando as informações obtidas através dos questionários aplicados nas mães, constatou-se que a maioria dos relatos maternos sobre o uso de etanol 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 FAEEs em mecônio observou-se que a sensibilidade do mesmo é baixa. Das 16 amostras dos recém-nascidos em que as mães admitiram o uso, 12 tiveram algum FAEE detectado e em cinco nenhum foi detectado. Em outras 19 amostras também foram detectados FAEEs, apesar das mães não terem admitido o consumo. Divergências semelhantes foram reveladas por outros autores onde as mulheres não relataram o consumo e outras mães que admitiram consumir álcool durante a gestação porém não foram detectados FAEEs em seus recém-nascidos (DERAUF *et al*, 2003).

Das amostras em que foram detectados FAEE em mecônio, 4 tinham a maioria dos FAEEs acima do LOQ, mas apenas 1 mãe admitiu o consumo, com freqüência de 2 vezes por semana e quantidade de 6 drinques durante a gestação.

Laurato de etila foi o éster mais freqüente 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 vários autores que

detectaram com frequência FAEEs com cadeias mais curtas como laurato de etila e miristato de etila em amostras de mecônio (CHAN *et al.*, 2003)

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÕES

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

- O método desenvolvido apresentou limites de detecção abaixo de 50 ng/g para quase todos o FAEEs e 100 ng/g para o araquidonato de etila. Os limites de quantificação foram abaixo de 150 ng/g. Os resultados obtidos na validação do método mostraram que trata-se de um método rápido, prático e linear, que pode ser aplicado para a determinação quantitativa e confirmatória de FAEEs em mecônio de recém-nascidos com suspeitas de exposição fetal ao etanol.

- As amostras analisadas e consideradas como positivas para o uso de etanol durante a gestação apresentaram concentrações da maioria dos FAEEs estudados acima do LOQ e a soma cumulativa dos ésteres acima de 600 ng/g de amostra. Apenas em um dos casos considerados positivos a mãe admitiu o consumo abusivo de etanol durante a gestação. Como era de se prever, foi observado que o questionário foi pouco eficaz no que diz respeito à constatação do uso de álcool pelas mães durante a gestação. Esse fato corrobora com a necessidade de um método diagnóstico laboratorial que possa ser aplicado em casos suspeitos.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis.

Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>. Acesso em: 11 mar. 2005.

ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. **Clinical Biochemistry**, v.29, p.849-852, 2008.

AUWARTER, V.; SPORKERT, F.; HARTWIG, S.; PRAGST, F.; VATER, H.; DIEFENBACHER, A. Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption: segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers. **Clinical Chemistry**, v.47, p.2114-2123, 2001.

BAUMANN, P.; SHILD, C. HUME, R.F. SOKOL, R.J. Alcohol abuse – A persistente preventable risk for congenital anomalies. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, p. 1-7, 2006

BEARER, C.F.; JACOBSON, J.; JACOBSON, S. W. ; BARR, D.; CROXFORD, J.; MOLTENO, C.D.; VILJOEN, D. L. ; MARAIS, A.S.; CHIODO, L. M.; CWIK, A. Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol. **Journal of Pediatrics**, v. 143, p. 463-469, 2003.

BEARER, C.F., SANTIAGO, L.M., O'RIORDAN, M.A., et al. Fatty acid ethyl esters: quantitative biomarkers for maternal alcohol consumption. **Journal of Pediatrics**, v. 146, p. 824-830, 2005.

BRASIL. Ministério da 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. 185p. Disponível em: www.inca.gov.br/inquerito. Acesso em: 13 nov. 2006.

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.

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. **Clinical Biochemistry**, v.37, p.429-438, 2004a.

CHAN, D.; KLEIN, J.; KARASKOV, T.; KOREN, M. Fetal exposure to alcohol as evidenced by fatty acid ethyl esters in meconium in the absence of maternal drinking history in pregnancy. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.26, p.474-481, 2004b.

CHAN, D.; KNIE, B.; BOSKOVIC, R.; KOREN, G. Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies. **Journal of**

Pharmacology and Experimental Therapeutics, v.310, n.1, p.75-82, 2004c.

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.

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.

FREIRE, T.M.; MACHADO, J.C.; MELO, E.V.; GUSMÃO, M. Efeitos do consumo de bebida alcoólica sobre o feto. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, n.7, p.376-81, 2005.

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

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.

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.

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.

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

HUTSON, J. R.; ALEKSA, K. PRAGST, F.; KOREN, G. Detection and quantification of fatty acid ethyl esters in meconium by headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal Chromatography, B**, v. 877, p.8-12, 2009.

KLEIN, J.; KARASKOV, T.; KOREN, G. Fatty acid ethyl esters: a novel biologic marker for heavy in utero ethanol exposure: a case report. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.21, n.6, p.644-646, 1999.

SKOOG, D.A.S.; HÓLLER, J.F.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

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.

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.

MARISCAL, M.; PALMA, S.; LLORCA, J.; PEREZ-IGLESIAS, R.; PARDO-CRESPO, R.; DELGADO-RODRIGUEZ, M. Pattern of alcohol consumption during pregnancy and risk for low birth weight. **Annals of Epidemiology**, v.16, n.6, p.432-438, 2006.

MCDOWALL, R.D. Sample preparation for biomedical analysis. **Journal of Chromatography, Biomedical Applications**, v.492, p.3-58, 1989.

MILLS, G.A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. **Journal of Chromatography, A**, v.902, n.1, p.267-287, 2000.

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.

O'REILLY, J.; WANG, Q.; SETKOVA, L.; HUTCHINSON, J.P.; CHEN, Y.; LORD, H.L.; LINTON, C.M.; PAWLISZYN, J. Automation of solid phase microextraction. **Journal of Separation Science**, v.28, p.2010-2022, 2005.

OLIVEIRA, C.D.R.; ROEHSIG, M.; ALMEIDA, R.M.; ROCHA, W.L.; YONAMINE, M. Recent advances in chromatographic methods to detect

drugs of abuse in alternative biological matrices. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.3, p.95-109, 2007.

OSTREA, E. M. JR; MANTARING, J.D.; SILVESTRE, M.A. Drugs that affect the fetus and newborn infant via the placenta or breast milk. **Pediatric Clinics of North America**, v.51, p. 539- 579, 2004.

OSTREA Jr., E.M.; HERNANDEZ, J.D.; BIELAWSKI, D.M.; KAN, J.M.; LEONARDO, G.M.; ABELA, M.B.; CHURCH, M.W.; HANNIGAN, J.H.; JANISSE, J.J.; AGER, J.W.; SOKOL, R.J. Fatty acid ethyl esters in meconium: are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v.30, n.7, p.1152-1158, 2006.

PEREZ-CAMINO, M.C.; MOREDA, W.; MATEOS, R.; CERT, A. Determination of esters of fatty acids with low molecular weight alcohols in olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.16, p.4721-4725, 2002.

PICHINI, S.; PELLEGRINI, M.; CAGERI, J.; KOREN, G.; GARCIA-ALGAR, O.; VALL, O.; VAGNARELLI, F.; ZUCCARO, P.; MARCHEI, E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium: assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts. **Journal of Pediatrics**, v.143, p.463-469, 2008.

PRAGST, F.; AUWAERTER, V.; SPORKERT, F.; SPIEGEL, K. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and

gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). **Forensic Science International**, v.121, p.76-88, 2001.

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.

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.

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.

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.

VILJOEN, D. L.; GOSSAGE, J. P.; BROOKE, L.; ADNAMS, C. M.; JONES, K. L.; ROBINSON, L. K.; HOYME, H.E.; SNELL,C.; KHAOLE, N.C.O.; KODITUWAKKU, P.; OHENE ASANTE, K. O.; FINDLAY, R.; QUINTON, B.; MARAIS, A. S.; KALBERG, W. O.; MAY, P.A.; Fetal Alcohol Syndrome Epidemiology in a South African Community: A second study of a very high prevalence area. **Journal of Studies on Alcohol**, p. 593-604, 2005.

WHITEHEAD, N.; LIPSCOMB, I. Patterns of alcohol use before and during pregnancy and the risk of small-for-gestational-age birth. **American Journal of Epidemiology**, v.158, n.7, p.654-662, 2003.

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. **Public health problems caused by alcohol**. 2004. Disponível em: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB115/B115_37-en.pdf. Acesso em: 13 nov. 2006.

ANEXOS

ANEXO I- Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-USP**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício 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 Rochsig - **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 _____