UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

NAYNA CÂNDIDA GOMES

RIBEIRÃO PRETO

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de concentração: Toxicologia.

Orientada: Nayna Cândida Gomes

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis.

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

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

Gomes Cândida, Nayna
Saliva: uma matriz alternativa para determinação de biomarcadores do cigarro em gestantes. Ribeirão Preto, 2018.
p. 115: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientador: De Martinis, Bruno Spinosa.

1. Nicotina. 2. Cotinina. 3. Cromatografia gasosa. 4. Gestantes fumantes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Nayna Cândida Gomes
Título do trabalho: Saliva: uma matriz alternativa para determinação de biomarcadores do cigarro em gestantes.

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

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedico esta pesquisa ao meu pai Mário, à minha mãe Iolanda e à minha irmã Nayara, por todo apoio, incentivo e por sempre estarem ao meu lado; e, em memória, à minha avó Margarida por todo amor, carinho e orações.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e me conceder força e fé.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, por todos os ensinamentos, dedicação e incentivo ao longo desses anos.

Aos meus pais Mário e Iolanda, por sempre lutarem para me proporcionar estudos de boa qualidade para que eu pudesse realizar os meus sonhos, por acreditarem em mim, me apoiarem e por me incentivarem a concluir mais essa etapa da minha vida profissional.

À minha irmã Nayara, por toda paciência, conselhos, incentivo, orações, ensinamentos, por sempre estar ao meu lado e por acreditar em mim e nos meus sonhos.

Ao Renato, por todo amor, carinho, companhia, incentivo e por me apoiar em todos os momentos sempre estando ao meu lado.

À minha família que sempre torceram para que eu conseguisse realizar os meus sonhos.

Aos meus amigos de laboratório, Dayanne, Eduardo, Fabiana, Fernanda, Laís, Mércia, Natália e Ricardo, por toda amizade, incentivo, ajuda e companheirismo;

À Ângela, por todo companheirismo, ensinamentos e pela ajuda nesta pesquisa por meio da coleta de dados e das amostras de saliva.

À Prof.ª Mariza Catulina De Queiroz Silva Picon por todos os ensinamentos e dedicação.

A todos os meus amigos, pela amizade e pelos momentos de distrações.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e do auxílio por meio do projeto CAPES Pró-Forense 25/2014.

Às gestantes, pela disponibilidade ao participar desta pesquisa.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

GOMES, N. C. **Saliva: an alternative matrix for the determination of cigarette biomarkers in pregnant women.** 2018. 115f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Smoking during pregnancy is the main factor associated with complications in both and gestation. It is related, for example, premature births, low birth weight, diseases in the respiratory tract of the fetus and, with child death. Exposure to tobacco smoke can be assessed by the presence of nicotine and cotinine in biological fluids including plasma, serum, urine, saliva, hair and nails. The saliva is an alternative matrix that presents as advantages the ease of obtaining, is not an invasive sample, the collection can be assisted, it is of low cost, the risk of contraction of infections during the collection and handling of the sample is minimal and can be used in situations where it is difficult to obtain another type of sample. As the prevalence of pregnant cigarette smokers is relatively high, confirmation by an analysis laboratory is important to correctly and reliably classify whether the pregnant woman is a smoker or not. The objective of this research was to develop and validate a method for the analysis of nicotine and cotinine in saliva samples from pregnant women. Liquid-liquid extraction was used for the preparation of saliva samples and gas chromatography with specific thermionic detector was performed for the separation, identification and quantification of the analytes nicotine, cotinine and the internal standard ketamine. The limit of detection was 10 ng/mL for nicotine and 6 ng/mL for cotinine. The lower limits of quantification were 40 ng/mL and 20 ng/mL for nicotine and cotinine, respectively. The method was considered linear in the concentration range of 40 to 2000 ng/mL (R=0.996) for nicotine and 20-2000 ng/mL (R=0.999) for cotinine. The recovery values of the analytes range from 66.1% to 92.2%. The intraday precision ranged from 6.06% to 11.50% and the interday precision ranged from 6.89% to 10.57%. The intraday accuracy ranged from -11.29% to 19.81%, and the interday accuracy ranged from -11.78% to 13.08%. Both analytes presented stability in the biological samples and in solution. At the first evaluation (gestational period of 1 to 25 weeks), the method was applied to 259 saliva samples from pregnant smokers and nonsmokers. And in the second (gestational period of 36 to 40 weeks and up to 113 days postpartum), it was applied in 45 samples of pregnant smokers. A significant difference was observed when comparing the self-report of pregnant smokers and nonsmokers in the first evaluation with the concentration of nicotine and cotinine in saliva samples ($p<0.001$). The concentrations of cotinine in saliva samples correlated positively with the number of cigarettes consumed daily by pregnant smokers in the first evaluation ($p<0.001$). No statistically significant differences were found for the variables: number of daily cigarettes ($p=0.255$), nicotine concentration ($p=0.949$) and cotinine ($p=0.665$). The cutoff point of nicotine was greater than zero, with sensitivity of 36.8% and specificity of 97.7%. For cotinine, the cutoff point was greater than 17.2 ng/mL, with sensitivity of 94.3% and specificity of 98.8%. The analytical method developed and validated met the criteria required by resolution 27/2012 and 899/2003 of the National Sanitary Surveillance Agency.

Keywords: Nicotine; Cotinine; Gas chromatography; Pregnant smokers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias de biotransformação da nicotina e proporções estimadas dos metabólitos excretados na urina. 7
Figura 2. Esquematização do dispositivo utilizado na coleta de saliva (fluído oral).. 15
Figura 3. Esquematização da extração líquido-líquido. 19
Figura 4. Esquema do procedimento analítico. 24
Figura 5. Desenho de estudos para gestantes fumantes. 33
Figura 6. Amostra de saliva (fluído oral). 34
Figura 7. Dados coletados das gestantes fumantes e não fumantes. 35
Figura 8. Cromatograma obtido ao analisar a solução padrão de 100 ng de nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina nas condições cromatográficas descritas por Malafatti et al. (2010). 38
Figura 9. Cromatograma obtido ao analisar a solução de 100 ng de nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina utilizando a programação da temperatura do forno descrita por Franqui et al. (2015). 38
Figura 10. Cromatograma obtido na otimização dos picos dos analitos ao analisar a solução padrão de 180 ng de nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina. 39
Figura 11. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra de saliva "branco", submetida à extração com a DPX. 41
Figura 12. Cromatograma obtido pela análise de saliva fortificada com 180 ng dos padrões nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina, submetida à extração com a DPX. 41
Figura 13. Cromatograma obtido pela análise de saliva fortificada com 180 ng dos padrões nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina, submetida à extração líquido-líquido. 42
Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas de uma amostra "branco" (cor preta) com uma amostra de saliva fortificada com 180 ng dos padrões nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina (vermelho), submetida à extração líquido-líquido. 42
Figura 15. Área relativa da nicotina. 44
Figura 16. Área relativa da cotinina. 44

Figura 17. Cromatograma da análise de um extrato de uma amostra "branco", após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração. 47
Figura 18. Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação linear (R) da nicotina. 48
Figura 19. Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação linear (R) da cotinina. 48
Figura 20. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra "branco" submetida à extração líquido-líquido. 49
Figura 21. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra "zero" submetida à extração líquido-líquido. 50
Figura 22. Cromatograma da amostra número 23, da segunda avaliação, positiva para nicotina e cotinina e fortificada com 300 ng do padrão interno ketamina. 58
Figura 23. Cromatograma da amostra número 01, negativa para nicotina e cotinina e fortificada com 300 ng do padrão interno ketamina. 58
Figura 24. Aumento do número de cigarros consumidos, da primeira para a segunda avaliação, segundo o autorrelato das gestantes. 61
Figura 25. Gestantes que relataram manter o número de cigarros consumidos por dia da primeira para a segunda avaliação. 61
Figura 26. Diminuição do número de cigarros consumidos por dia, da primeira para a segunda avaliação, segundo o autorelato das gestantes. 62
Figura 27. Curva ROC e sua respectiva área sob a curva (AUC) para análise da nicotina (A) e da cotinina (B) em relação a exposição à fumaça do cigarro. 63
Figura 28. Esquematização da extração líquido-líquido feita por Malafatti et al. (2010). 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos que determinaram nicotina e cotinina em amostras biológicas..16
Tabela 2. Condições cromatográficas do método.....25
Tabela 3. Programação da coluna cromatográfica. 25
Tabela 4. Coeficiente de variação da nicotina e da cotinina com relação aos solventes extratores e aos gases utilizados na concentração das amostras. 44
Tabela 5. Concentrações do LD, LIQ, CQs e do LSQ para a nicotina e a cotinina...45
Tabela 6. Resultados das concentrações de CQB dos analitos na análise do parâmetro de seletividade. 46
Tabela 7. Valores dos coeficientes de variação dos fatores de matriz normalizados para cada analito nos controles de qualidade baixo e alto. 47
Tabela 8. Valores de recuperação (%). 50
Tabela 9. Valores do coeficiente de variação (%) obtidos no ensaio de precisão intradia. 51
Tabela 10. Valores do coeficiente de variação (%) obtidos no ensaio de precisão interdia. 51
Tabela 11. Valores de erro padrão relativo (%) obtidos no ensaio de exatidão intradia. 52
Tabela 12. Valores de erro padrão relativo (%) obtidos no ensaio de exatidão interdia. 52
Tabela 13. Valores de estabilidade dos analitos na saliva dado em porcentagem da variação da concentração com relação à concentração nominal. 53
Tabela 14. Valores de estabilidade dos analitos em solução dado em porcentagem. 54
Tabela 15. Associação entre o consumo de cigarros durante a gestação e a presença de nicotina na amostra de saliva. 56
Tabela 16. Associação entre o consumo de cigarros durante a gestação e a presença de cotinina na amostra de saliva. 56
Tabela 17. Comparação das concentrações de nicotina e cotinina na saliva entre o grupo de gestantes fumantes e não fumantes. 59
Tabela 18. Correlação das concentrações dos analitos com o número de cigarros fumados por dia pelas gestantes fumantes. 59

Tabela 19. Comparação do número de cigarros consumidos por dia e das concentrações de nicotina e cotinina entre a primeira e a segunda avaliação. 60
Tabela 20. Parâmetros da avaliação da eficácia do método de análise de nicotina e cotinina em amostra de saliva diante da exposição à fumaça do cigarro. 63
Tabela 21. Respostas dadas pelas 87 gestantes que relataram o uso de cigarro durante a gravidez e as concentrações para nicotina e cotinina. 74
Tabela 22. Respostas dadas pelas 172 gestantes que relataram o não uso de cigarro durante a gestação e as concentrações de nicotina e cotinina. 83
Tabela 23. Teste de dependência à nicotina de Fagerström. 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASE	Extração Acelerada por Solvente
AUC	Área sob a curva (*Area Under the Curve*)
CDC	Centers For Disease Control And Prevention
COT	Cotinina
CQA	Controle de Qualidade de Alta Concentração
CQB	Controle de Qualidade de Baixa Concentração
CQM	Controle de Qualidade de Média Concentração
CV	Coeficiente de Variação
CYP2A6	Citocromo P450 2A6
DPX	Extração em Fase Sólida Modificada com Ponteiras Descartáveis
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ELL	Extração líquido-líquido
EPR	Erro Padrão Relativo
FMN	Fator de Matriz Normalizado
FTND	Teste de Dependência à Nicotina de Fagerström
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC-FID	Cromatografia Gasosa acoplado ao Detector de Ionização de Chamas
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplado ao Espectrômetro de Massas
GC-NPD	Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio e Fósforo
GC-TSD	Cromatografia Gasosa com Detector Termiônico Específico
IARC	*International Agency for Research on Cancer*
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas
LC-UV	Cromatografia Líquida com Detector de Ultravioleta;
LD	Limite de Detecção
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LSQ	Limite Superior de Quantificação
MAO	Monoamina oxidase
MDMA	Metilenodioximetanfetamina
MEPS	Microextração em Solvente Empacotado
N_2	Nitrogênio

nAChRs	Receptores nicotínicos colinérgicos
NaOH	Hidróxido de sódio
NIC	Nicotina
NNK	4-(nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROC	*Receiver Operating Characteristic*
SDME	Microextração em Gota Única
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em Fase Sólida
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THC	Tetraidrocanabinol
WHO	*World Health Organization*

SUMÁRIO

RESUMO.....i
ABSTRACT.....ii
LISTA DE FIGURAS.....iii
LISTA DE TABELAS.....v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....vii

1 INTRODUÇÃO..... 1

2 REVISÃO DA LITERATURA..... 3
2.1 TABACO E CIGARRO..... 3
2.2 NICOTINA E COTININA..... 5
2.2.1 Propriedades toxicocinéticas da nicotina..... 6
2.2.2 Propriedades toxicodinâmicas da nicotina..... 8
2.3 PRINCIPAIS EFEITOS TÓXICOS DO TABAGISMO..... 10
2.3.1 Efeitos nocivos do tabaco na gravidez..... 11
2.4 AMOSTRA BIOLÓGICA ALTERNATIVA: SALIVA..... 13
2.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO..... 18
2.2.1 Extração líquido-líquido..... 18

3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA..... 20

4 OBJETIVOS..... 21
4.1 OBJETIVO GERAL..... 21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 21

5 MATERIAIS E MÉTODOS..... 22
5.1 MATERIAIS..... 22
5.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS..... 22
5.3 PREPARO DE SOLUÇÕES E REAGENTE..... 22
5.3.1 Preparo de soluções-padrão..... 22
5.3.2 Preparo do reagente..... 23
5.3.2.1 Solução de hidróxido de sódio 5M (NaOH 5M)..... 23
5.4 MÉTODOS..... 23
5.4.1 Procedimento experimental..... 23
5.4.2 Condições Cromatográficas..... 25
5.4.3 Otimização do método de preparo da amostra..... 25
5.4.3.1 *Estudo da influência do solvente extrator e do nitrogênio e ar comprimidodurante a etapa de concentração da amostra*..... 26
5.4.4 Validação do método..... 26
5.4.4.1 Determinação e preparo dos controles de qualidades e dos limites de detecção e quantificação..... 27
5.4.4.2 Seletividade..... 28
5.4.4.3 Efeito residual (carry over)..... 28
5.4.4.4 Efeito matriz..... 28
5.4.4.5 Curva de calibração (linearidade)..... 29
5.4.4.6 Recuperação..... 30
5.4.4.7 Precisão..... 30
5.4.4.8 Exatidão..... 30
5.4.4.9 Estabilidade do analito em matriz biológica..... 31
5.4.4.10 Estabilidade dos analitos em solução..... 32
5.5 CASUÍSTICA..... 32
5.5.1 Critérios de inclusão e exclusão..... 32

5.5.2 Desenho do estudo 33
5.5.3 Análises estatísticas 35
5.5.4 Análises estatísticas adicionais 36

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
6.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO 37
6.1.1 Determinação das condições cromatográficas 37
6.1.2 Desenvolvimento do método de extração 39
6.1.3 Otimização do método de preparo da amostra 43
6.1.3.1 Estudo da influência do solvente extrator e do nitrogênio e ar comprimido durante a etapa de concentração da amostra. 43
6.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO 45
6.2.1 Determinação dos controles de qualidade e dos limites de detecção e quantificação 45
6.2.2 Seletividade 46
6.2.3 Efeito residual (carry over) 46
6.2.4 Efeito matriz 47
6.2.5 Curva de Calibração 47
6.2.6 Recuperação 50
6.2.7 Precisão 51
6.2.8 Exatidão 52
6.2.9 Estabilidade dos analitos na matriz biológica 53
6.2.10 Estabilidade dos analitos em solução 53
6.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SALIVA 54
6.3.1 Análises estatísticas 58
6.3.2 Análises estatísticas adicionais 62

7 CONCLUSÃO 65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66
APÊNDICE A 74
APÊNDICE B 83
ANEXOS 91

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TABACO E CIGARRO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2 NICOTINA E COTININA

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

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

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

2.2.1 Propriedades toxicocinéticas da nicotina

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

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

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

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

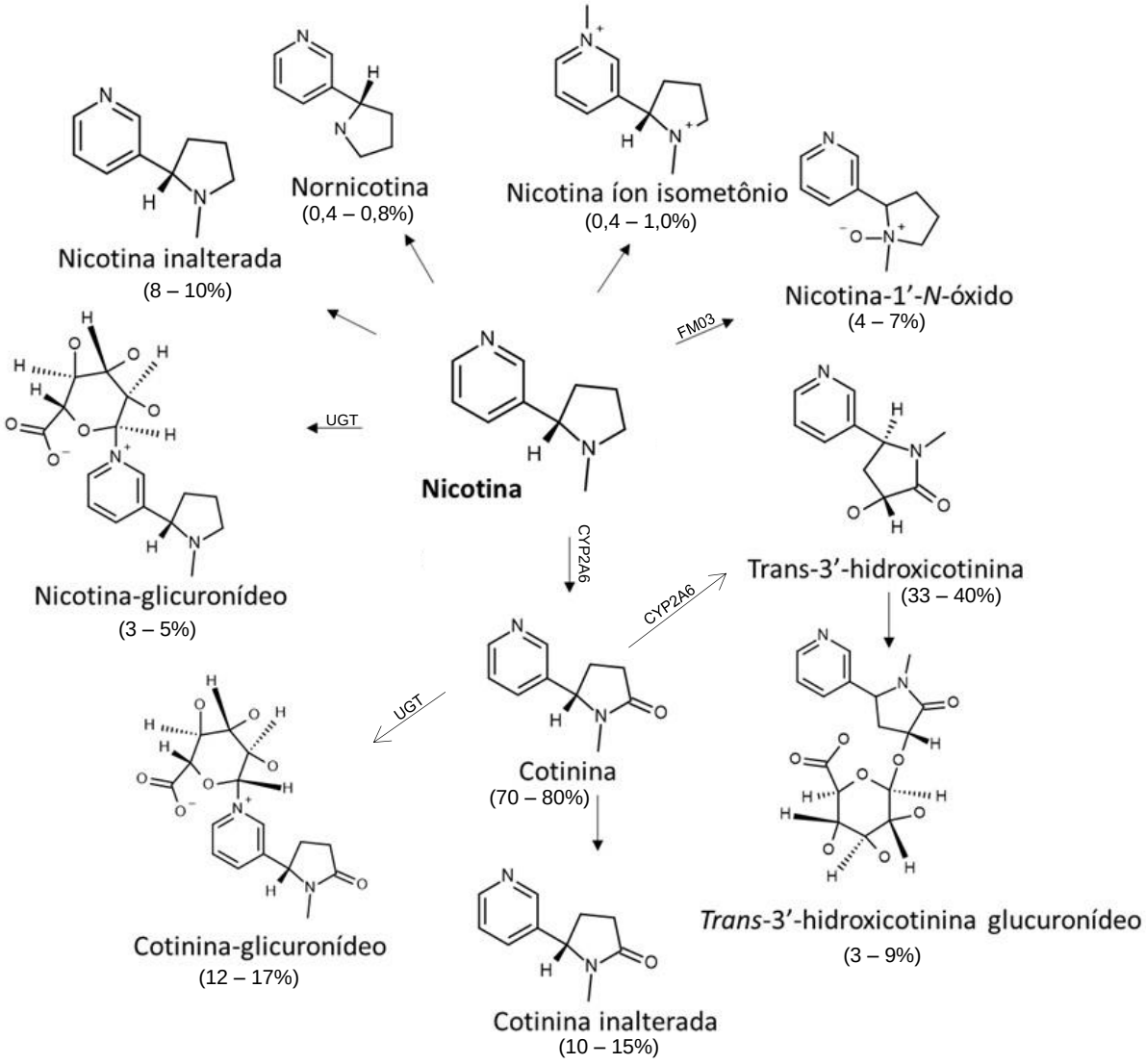

Figura 1. Principais vias de biotransformação da nicotina e proporções estimadas dos metabólitos excretados na urina.
Fonte: adaptada de BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014.

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

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

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

2.2.2 Propriedades toxicodinâmicas da nicotina

Quando uma pessoa fuma um cigarro, a nicotina chega até os pulmões onde é absorvida rapidamente, cai na corrente sanguínea, alcança o cérebro entre 10 a 20 segundos, e se liga a receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs) que são constituídos por diferentes combinações de cinco subunidades, presentes nos gânglios autonômicos, na junção neuromuscular e no sistema nervoso central (SNC) (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009; MILLER et al., 2010). Em humanos, as subunidades mais abundantes são: α4β2, α3β4 e a α7 (homomérico). A subunidade β2 é crítica para os efeitos comportamentais da nicotina e para a liberação da dopamina. Já a subunidade α4 é importante, uma vez que determina a sensibilidade à nicotina. O subtipo α3β4 tem relação com os efeitos cardiovasculares provocados pela nicotina, enquanto que os receptores α-7 (homomérico) interferem na rápida transmissão sináptica e podem desempenhar um papel na aprendizagem (FOWLER et al., 2011; GALVÃO; GALVÃO; MOREAU, 2014).

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3 PRINCIPAIS EFEITOS TÓXICOS DO TABAGISMO

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

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

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

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

2.3.1 Efeitos nocivos do tabaco na gravidez

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4 AMOSTRA BIOLÓGICA ALTERNATIVA: SALIVA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

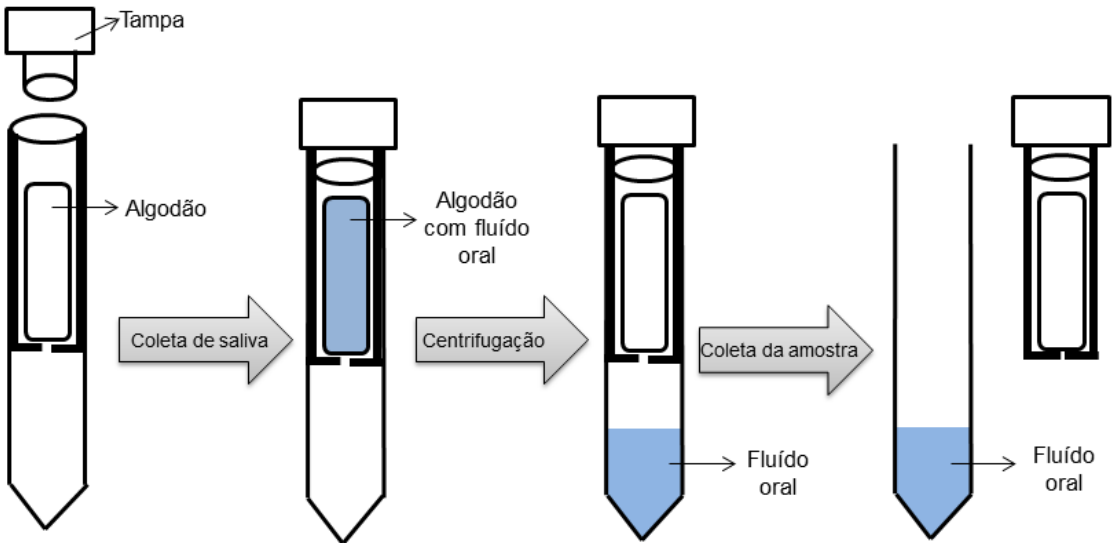

Figura 2. Esquematização do dispositivo utilizado na coleta de saliva (fluído oral).
Fonte: adaptada de Bueno, 2014.

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

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

Continuação da Tabela 1.

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

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

2.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

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

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

2.2.1 Extração líquido-líquido

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

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

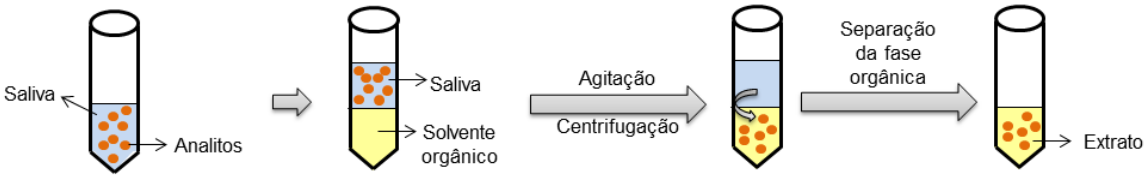

Figura 3. Esquematização da extração líquido-líquido.

3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A pesquisa com seres humanos deve resguardar a integridade de todos os envolvidos, incluindo as questões sobre a preservação da privacidade, a minimização de riscos e desconfortos, a busca de benefícios, a não discriminação e a proteção de grupos de pessoas vulneráveis. Neste contexto é utilizado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), assim como a avaliação por Comitês de Ética em Pesquisa. O TCLE tem por objetivo permitir que a pessoa que está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa consiga compreender os procedimentos, os riscos, os desconfortos, os benefícios e os direitos envolvidos, visando permitir uma decisão autônoma (GOLDIM, PITHAN e OLIVEIRA, 2003). O TCLE desta pesquisa está em Anexo 1.

Atendendo à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, bem como as normas complementares à mesma, esse estudo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) – CAAE número: 56574416.3.0000.5403, número do parecer: 1.771.184 (ANEXO 2). E também, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP) – CAE número: 56574416.3.3001.5407 (ANEXO 3).

Atendendo também à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, bem como as normas complementares à mesma, o trabalho “**Fatores sociais e psicológicos associados ao consumo do cigarro durante a gravidez”**, foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (HCFMRP/USP) – CAAE número: 42795615.4.0000.5440, número do parecer: 1.061.153, para a coleta das amostras (ANEXO 4).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método para análise de nicotina e cotinina em amostras de saliva de gestantes.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Desenvolver e validar o método para análise de nicotina e cotinina em amostras de saliva empregando a extração líquido-líquido.

II. Aplicar o método desenvolvido em amostras de gestantes fumantes e não fumantes de cigarro e comparar as concentração de nicotina e cotinina, entre esses grupos, baseados no autorrelato.

III. Comparar o número de cigarros e a concentração de nicotina e cotinina antes e após a intervenção para abstenção ao cigarro.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

O padrão da nicotina e cotinina e o padrão interno ketamina foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA. E os reagentes utilizados foram: hidróxido de sódio, metanol e isopropanol (JT Baker, EUA), diclorometano (Panreac, EUA). Todos os solventes utilizados eram grau HPLC, e todos os reagentes eram grau P.A. (Padrão Analítico).

5.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Para a realização das análises de nicotina e cotinina, foi utilizado um cromatógrafo em fase gasosa modelo CP 3800 (Varian) acoplado ao detector termiônico específico (TSD), com amostrador automático modelo CP 8400 (Varian); coluna capilar de sílica fundida OV-1 (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme); cilindro de ar sintético 5.0, nitrogênio 4.6 e hidrogênio 4.5 (Air Liquide, Brasil); seringa de injeção líquida de volume 10 µL (Agilent, EUA).

E ainda: concentrador de amostras Caliper LifeScience Turbo Vap (LP, EUA); cilindro de nitrogênio 4.0 (Air Liquide, Brasil); agitador TE 140 (Tecnal, Brasil); vórtex AP-56 (Phoenix, EUA); centrífuga universal 32 (Hettich, Alemanha); balança analítica BL 1500S (Sartorius, EUA).

5.3 PREPARO DE SOLUÇÕES E REAGENTE

5.3.1 Preparo de soluções-padrão

A solução-padrão de referência de nicotina foi obtida em uma concentração inicial de 10 µg/mL e foi diluída para concentração de 1 µg/mL da seguinte forma: foram pipetados 100 µL da ampola de 1000 µg/mL em um balão volumétrico de 10 mL e o volume final foi completado com metanol, originando a solução de concentração 10 µg/mL. Em seguida, 1 mL dessa solução foi transferido para outro balão volumétrico de 10 mL e o volume final foi completado com metanol originando a solução de 1 µg/mL.

Já a solução-padrão de referência de cotinina foi obtida em uma concentração inicial de 5000 µg/mL e foi diluída para as concentrações de 1000 µg/mL,10 µg/mL e 1 µg/mL da seguinte forma: foram transferidos 25 mg desse padrão para o balão volumétrico de 5 mL e foi completado o volume final com metanol, obtendo a

solução de concentração de 5 mg/mL. Partindo desta solução, foi transferido 1 mL para um balão volumétrico de 5 mL, o volume final foi completado com metanol, obtendo assim, a solução com concentração de 1000 µg/mL. Posteriormente, foram pipetados desta solução (1000 µg/mL) 100 µL para um balão volumétrico de 10 mL e o volume final foi completado com metanol, originando a solução de concentração 10 µg/mL. Por fim, 1 mL dessa solução foi transferido para outro balão volumétrico de 10 mL e o volume final foi completado com metanol originando a solução de 1 µg/mL.

A solução de padrão interno (ketamina) foi preparada na concentração inicial de 10 µg/mL. Para tanto, foram pipetados 100 µL da ampola de 1000 µg/mL em um balão volumétrico de 10 mL e o volume final foi completado com metanol, originando a solução de concentração 10 µg/mL.

Todas as soluções preparadas foram devidamente identificadas, armazenadas no freezer a -20ºC, em frascos de vidro com tampa rosqueável e envolvidos por papel alumínio.

5.3.2 Preparo do reagente

5.3.2.1 Solução de hidróxido de sódio 5M (NaOH 5M)

Foram pesados 20 g de hidróxido de sódio e foi transferido para um béquer com 50 mL água deionizada, após a solubilização, o transferiu para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final foi completado com água deionizada. A solução foi devidamente identificada e armazenada em um frasco de plástico.

5.4 MÉTODOS

5.4.1 Procedimento experimental

O método para extração de nicotina e cotinina na saliva foi desenvolvido com base em procedimentos propostos por Malafatti et al. (2010) (ANEXO 5, FIGURA 28) e está esquematizado na Figura 4:

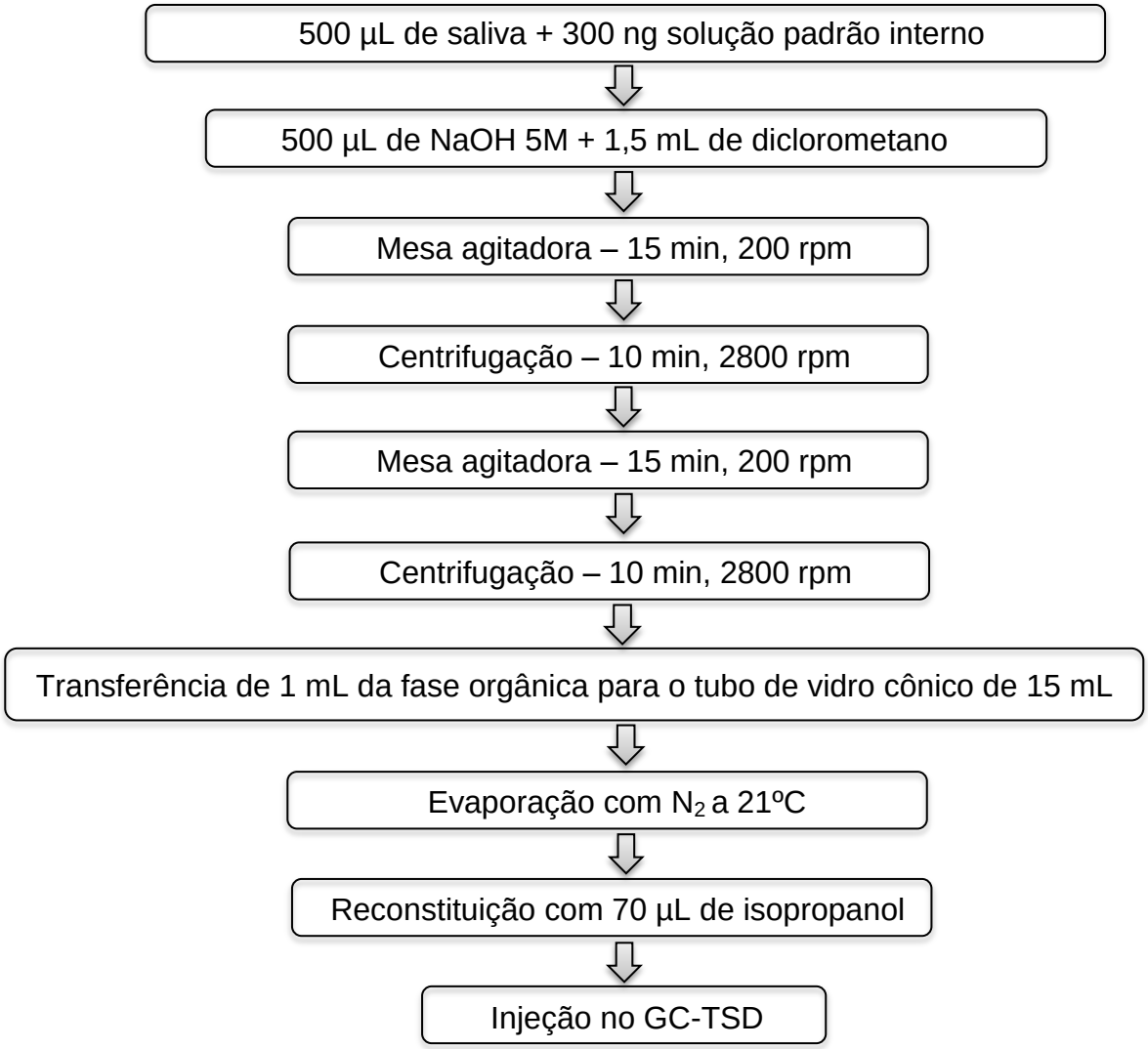

Figura 4. Esquema do procedimento analítico.

No procedimento, 500 µL de saliva foram pipetados em um tubo de vidro de fundo cônico de 9 mL e foram fortificados com 300 ng (600ng/mL) do padrão interno (ketamina). Em seguida, foram adicionados 500 µL de hidróxido de sódio 5M (NaOH 5M) e 1,5 mL de diclorometano. Esse tubo foi submetido duas vezes à agitação horizontal por 15 min a 200 rpm e duas vezes a centrifugação por 10 min a 2800 rpm. Feito isso, 1 mL da fase orgânica foi transferida para outro tubo de vidro de fundo cônico de 15 mL. O extrato foi evaporado a 21ºC no concentrador de amostras sob fluxo de nitrogênio (N_2), ressuspenso com 70 µL de isopropanol, agitado em vórtex por 30 segundos e transferidos 70 µL para o frasco do amostrador automático. Foram injetados 2 µL no GC-TSD.

5.4.2 Condições Cromatográficas

Foi desenvolvido o método para determinação de nicotina e cotinina em amostra de saliva empregando um cromatógrafo em fase gasosa com detector termiônico específico (GC-TSD). A separação foi realizada em coluna capilar de sílica fundida OV-1 (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme). O fluxo do gás de arraste (N_2) foi ajustado para 1,0 mL/min. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas do método.

Parâmetro Instrumental	
Tempo total de análise	13,60 min
Temperatura do injetor	260ºC
Temperatura do detector	280ºC
Corrente da pérola	2.900 A
Fluxo do gás de arraste	1,0 mL/min

A rampa de temperatura da coluna capilar empregada no método cromatográfico está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Programação da coluna cromatográfica.

Temperatura (ºC)	**Taxa de aquecimento (ºC/min)**	**Tempo de permanência (min)**
70	-	1
260	25	5

5.4.3 Otimização do método de preparo da amostra

Antes de iniciar os ensaios para a validação, foram realizados testes para verificar as condições ideais para os parâmetros que compõem o método de

extração. Cada um desses parâmetros foi analisado em triplicata e foi observado a área relativa dos analitos obtida no GC-TSD e o coeficiente de variação das áreas.

5.4.3.1 *Estudo da influência do solvente extrator e do nitrogênio e ar comprimido durante a etapa de concentração da amostra*

Foram pipetados em 12 tubos de vidro de fundo cônico de 9 mL, 500 µL de saliva e foram fortificados com os padrões nicotina e cotinina na concentração de 200 ng/mL e com o padrão interno na concentração de 600 ng/mL. Em seis amostras, foi utilizado o diclorometano como solvente extrator e nas outras seis, foi utilizado o éter etílico. Durante a etapa de concentração da amostra, três dos extratos obtidos da extração com diclorometano, foram evaporados sob fluxo de N_2 e nos outros três extratos foi utilizado o ar comprimido. O mesmo procedimento de concentração de amostras foi feito com os extratos obtidos da extração com o éter etílico.

Sabe-se que o ar comprimido não é um gás inerte e não é recomendado utilizá-lo para esse procedimento. Porém devido ao baixo custo em relação ao N_2, foram realizados esses testes para verificar o possível uso.

Essas amostras foram submetidas ao procedimento experimental descrito em 5.4.1.

5.4.4 Validação do método

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, por meio de estudos experimentais e atendimento de requisitos específicos (ANVISA, 2012).

Os parâmetros avaliados durante a validação do método foram os recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, sendo estes: a precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade. Também foi realizado o parâmetro de recuperação conforme o recomendado na resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA. Para a construção do banco de dados e cálculos das concentrações dos analitos foi utilizado o programa Microsoft® Excel® 2010 e para as análises estatísticas foi utilizado o programa MedCalc® v16.4.3.

5.4.4.1 Determinação e preparo dos controles de qualidades e dos limites de detecção e quantificação

Para realizar os ensaios de validação é necessário fazer a determinação e o preparo dos controles de qualidades e dos limites de detecção e quantificação.

Os experimentos de controles de qualidade e dos limites de detecção e quantificação foram realizados em quintuplicata. As amostras foram preparadas utilizando saliva “branco” (amostras de saliva de gestantes não expostas ao cigarro segundo o autorelato e, nas quais os analitos não foram detectados na análise por GC-TSD) fortificadas com soluções padrão nas concentrações determinada para cada controle e limite. Estão descritos a seguir os procedimentos de preparo dos controles e dos limites:

- Limite de detecção (LD): é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada. Para o estabelecimento desse limite, as amostras são fortificadas com soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectado, e não necessariamente quantificado, em que a razão sinal/ruído seja 3:1.
- Limite inferior de quantificação (LIQ): é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão (até 20%) e exatidão (80 – 120%) aceitáveis, sob condições experimentais estabelecidas. As amostras de saliva foram fortificadas com concentrações decrescentes até o menor nível quantificável, com precisão e exatidão aceitáveis, considerando também a razão sinal/ruído 5:1.
- Controle de qualidade de baixa concentração (CQB): as amostras foram fortificadas com concentração de três vezes superior a concentração do limite inferior de quantificação.
- Controle de qualidade de média concentração (CQM): as amostras foram fortificadas com concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação.
- Controle de qualidade de alta concentração (CQA): as amostras foram fortificadas com 80% da maior concentração da curva de calibração.
- Limite superior de quantificação (LSQ): as amostras foram fortificadas com a maior concentração do analito da curva de calibração.

5.4.4.2 Seletividade

É a capacidade do método em detectar e quantificar os analitos, com exatidão aceitável, na presença de interferentes que podem estar presentes em situações reais de análises. Este parâmetro foi determinado pela análise de seis amostras de saliva “branco”, de diferentes indivíduos, fortificadas com a concentração do padrão interno e dos limites inferiores de quantificação, da nicotina e da cotinina, juntamente com uma concentração elevada (2000 ng/mL) dos possíveis interferentes. Os interferentes analisados foram: lidocaína, metilenodioximetanfetamina (MDMA), alprazolam, metoclopramida, cacaína, paroxetina, tetraidrocanabinol (THC), morfina e codeína.

Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do LIQ. Sendo assim, as respostas dos picos dos interferentes próximos ao tempo de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos nas amostras do LIQ e inferiores a 5% da resposta do padrão interno.

5.4.4.3 Efeito residual (carry over)

O efeito residual avalia a influência de uma análise anterior no resultado da análise seguinte, devido à presença de resíduos que possam ficar retidos em alguns componentes do cromatógrafo como *liner*, injetor, coluna, seringa e detector. Este parâmetro foi determinado por três injeções de uma amostra de saliva “branco”, sendo uma injeção no início da curva de calibração e, as outras duas, logo após a injeção de uma amostra processada no limite superior de quantificação dos analitos.

Para avaliar este parâmetro, devem-se comparar as respostas dos picos com tempos de retenção iguais aos dos analitos e ao do padrão interno com a resposta do analito e do padrão interno na concentração do LIQ. Sendo que as respostas dos picos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos e 5% da resposta do padrão interno.

5.4.4.4 Efeito matriz

O efeito matriz avalia o efeito dos componentes da matriz biológica na resposta dos analitos e do padrão interno. Este parâmetro foi determinado através da análise de seis amostras processadas de saliva “branco” de indivíduos diferentes, e posteriormente foram adicionados os analitos nas concentrações do CQB e CQA e

do padrão interno. Também foram analisadas as soluções dos analitos nas concentrações do CQB e CQA e do padrão interno. Foi obtido o fator de matriz normalizado pelo padrão interno (FMN) para cada amostra, de acordo com a fórmula abaixo:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz / Resposta do padrão interno em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução / Resposta do padrão interno em solução}}$$

O coeficiente de variação dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%.

5.4.4.5 Curva de calibração (linearidade)

A linearidade tem como objetivo avaliar a capacidade do método analítico apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Este parâmetro foi determinado pela análise em quintuplicata de amostras de saliva “branco” fortificadas com o padrão interno na concentração de 600 ng/mL e com os analitos em oito concentrações diferentes. Também foram analisadas uma amostra “branco” (isenta de analitos e padrão interno) e uma amostra “zero” (fortificada apenas com padrão interno) para cada curva de calibração. Para cada analito foram avaliadas e construídas três curvas de calibração.

Para obter as curvas de calibração foi plotado no eixo “y” a razão entre as áreas do pico do analito e do padrão interno, e no eixo “x” o valor da concentração em que as amostras foram fortificadas. Não foram utilizados os resultados da amostra “branco” e da amostra “zero” para a construção da equação da curva de calibração.

A curva de calibração é aprovada quando, no mínimo, 75% dos padrões de calibração são aprovados, ou seja, o LIQ deve apresentar desvio inferior ou igual a 20% da concentração nominal e os outros padrões devem apresentar desvio inferior ou igual a 15% e, no mínimo, devem ser aprovados seis padrões de concentração diferentes, incluindo o LIQ e LSQ. Também é calculado o coeficiente de correlação linear (R), sendo que este deve ser maior ou igual a 0,99.

5.4.4.6 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do procedimento de extração dos analitos de uma matriz biológica dentro de um limite de variação. As porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno são desejáveis próximas a 100 %, porém admitam-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. Foi determinada comparando-se os resultados de quantificação de cinco amostras extraídas e fortificadas anteriormente à extração, com os resultados das análises de cinco amostras extraídas e fortificadas posteriormente. Este parâmetro foi avaliado nos 3 controles de qualidade (baixo, médio e alto) e o padrão interno foi adicionado anteriormente à extração nas duas situações.

O cálculo da recuperação foi obtido pela relação percentual das concentrações das amostras fortificadas antes e depois da extração.

5.4.4.7 Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma corrida. Foram avaliadas a precisão intradia, determinada em uma mesma corrida, e a precisão interdia, determinada em três corridas provenientes de dias diferentes. As corridas foram feitas em quintuplicatas e nas concentrações do LIQ, CQB, CQM e CQA.

O cálculo da precisão intradia foi obtido pelo Coeficiente de Variação (CV) baseado nas cinco replicatas e o da precisão interdia foi baseado nas cinco replicatas dos três dias, de acordo com a fórmula abaixo:

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão X 100}}{\text{Concentração média experimental}}$$

O coeficiente de variação deve ser inferior ou igual a 20% para o LIQ e inferior ou igual a 15% para os outros padrões de calibração.

5.4.4.8 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico aplicado em relação ao valor verdadeiro. Foram avaliadas a exatidão intradia, determinada em uma mesma corrida, e a exatidão interdia, determinada em três

corridas provenientes de dias diferentes. As corridas foram feitas em quintuplicatas nas concentrações do LIQ, CQB, CQM e CQA.

O cálculo da exatidão intradia foi obtido pelo Erro Padrão Relativo (EPR) baseado nas cinco replicatas e o da exatidão interdia foi baseado nas cinco replicatas dos três dias, de acordo com a fórmula abaixo:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \text{ X } 100}{\text{Valor nominal}}$$

Os EPRs devem estar dentro da faixa de ±20% do valor nominal para o LIQ e de ±15% do valor nominal para os demais padrões de calibração.

5.4.4.9 Estabilidade do analito em matriz biológica

Este parâmetro permite avaliar se a concentração do analito permanece dentro dos limites estabelecidos durante a análise em uma dada matriz biológica. Para determinar a estabilidade dos analitos na matriz biológica, três amostras foram fortificadas nas concentrações de CQB e CQA e analisadas imediatamente após sua preparação. Posteriormente, foram comparadas com as análises de três amostras fortificadas com CQB e CQA após serem submetidas aos ensaios descritos abaixo:

I. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: avalia a estabilidade do analito em condições de congelamento e descongelamento que as amostras são submetidas. As amostras de saliva foram congeladas à -20ºC e mantidas por no mínimo 12 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. No total, as amostras foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento e, em seguida, foi realizada a quantificação do analito.

II. Estabilidade de curta duração: avalia a estabilidade do analito durante o processamento de todas as amostras em temperatura ambiente, sobre a bancada de análise. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente até o processamento da última amostra (12 horas), e posteriormente foram processadas e analisadas.

III. Estabilidade de longa duração: avalia a estabilidade do analito durante o período e condições de armazenamento das amostras. As amostras de saliva foram processadas e armazenadas a -20ºC por cinco meses.

IV. Estabilidade pós-processamento: avalia a estabilidade do analito durante o tempo de análise das amostras. Foi realizada a reinjeção das amostras processadas após 24 horas da primeira injeção.

Nos três primeiros ensaios, o padrão interno foi adicionado após as amostras passarem pelas condições descritas anteriormente.

A estabilidade é demonstrada quando a desvio for inferior ou igual a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

5.4.4.10 Estabilidade dos analitos em solução

Avalia a estabilidade do analito na solução primária e na solução de trabalho por um tempo superior ao período de uso e armazenamento. Foi analisada a estabilidade da nicotina e cotinina em solução, através de três amostras da solução trabalho de 10 µg/mL e de 1 µg/mL armazenadas a -20ºC durante seis meses e submetidas a análise e comparadas com a resposta de soluções recém-preparadas.

Para considerar as soluções estáveis, estas não devem apresentar desvio superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém-preparadas.

5.5 CASUÍSTICA

Tanto a coleta das amostras de saliva e dos dados, quanto os procedimentos de intervenção para abstenção do consumo de cigarro na gestação, foram realizados pela aluna de doutorado Ângela Tamye Lopes Fujita do programa de Pós-Graduação em Medicina Clínica (2015). Enquanto que o procedimento de desenvolvimento do método analítico e a análise dos biomarcadores do cigarro na saliva foram realizados pela pesquisadora deste trabalho de mestrado.

5.5.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas todas as mulheres com diagnóstico confirmado de gravidez com idade mínima de 18 anos e que se disponham a participar do estudo, independentemente do número de gestações prévias. O período de gestação considerado foi de 1 a 25 semanas e entre 36 a 40 semanas e até 113 dias após o parto. E foram excluídas gestantes em que o feto apresentasse distúrbios ou anomalias, e as que eram portadoras de comorbidades graves tais como:

cardiopatias congênitas, anemias, transplantadas, pneumopatias graves ou neoplasias. Também foram excluídas as amostras de saliva com quantidade insuficiente para análise.

5.5.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo do tipo ensaio clínico, analítico e com abordagem quantitativa.

As amostras de saliva foram coletadas das gestantes fumantes e não fumantes nos Postos de Saúde de Ribeirão Preto. Obtivemos um total de 87 amostras de salivas de gestantes fumantes na primeira avaliação e 45 amostras na segunda avaliação, e 172 amostras de saliva de gestantes não fumantes, no período de 17/06/2015 a 17/08/2017.

Quando a gestante era fumante a saliva foi coletada em dois momentos (primeira avaliação e segunda avaliação), sendo o primeiro quando o período gestacional era de 1 a 25 semanas. Neste momento, foi aplicada uma intervenção e foi analisado o nível dos biomarcadores do cigarro na saliva. No segundo momento, quando o período gestacional foi de 36 a 40 semanas ou até 113 dias após o parto, o nível dos biomarcadores do cigarro foi analisado (Figura 5). Já para gestantes não fumantes, caso controle, a saliva foi coletada somente uma vez durante o período gestacional de 1 a 25 semanas, e, posteriormente foi realizada a análise laboratorial das concentrações de nicotina e cotinina.

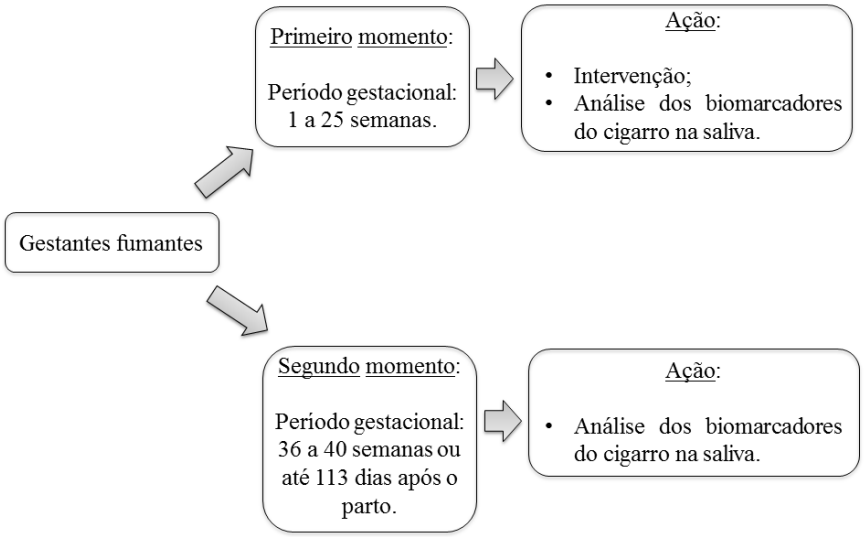

Figura 5. Desenho de estudos para gestantes fumantes.

Para a coleta, foi utilizado o dispositivo específico, o Salivette®, que apresenta um algodão em seu interior. As voluntárias inseriram o algodão na boca, e foi mantido por 2 minutos. Posteriormente, o algodão embebido com o fluido oral que contém predominantemente a saliva, foi transferido novamente ao frasco coletor e foi centrifugado a 3000 rpm por cinco minutos. As amostras foram identificadas somente com o número do Hygia das voluntárias e foram armazenadas no congelador a -20ºC até o momento da análise (Figura 6).

Figura 6. Amostra de saliva (fluído oral).

Além da coleta das amostras de saliva, também foram coletados dados sobre a frequência de uso do cigarro, exposição passiva à fumaça do cigarro e uso de outras drogas (Figura 7). Também foi aplicado o Teste de Dependência à Nicotina de Fagerström (FTND) que é composto por seis perguntas (ANEXO 6, Tabela 23). Para cada alternativa existe uma pontuação e, a soma destes pontos, permite avaliar e classificar o grau de dependência de nicotina em: muito baixa, baixa, média, elevada e muito elevada (PIETROBON; BARBISAN; MANFROI, 2007).

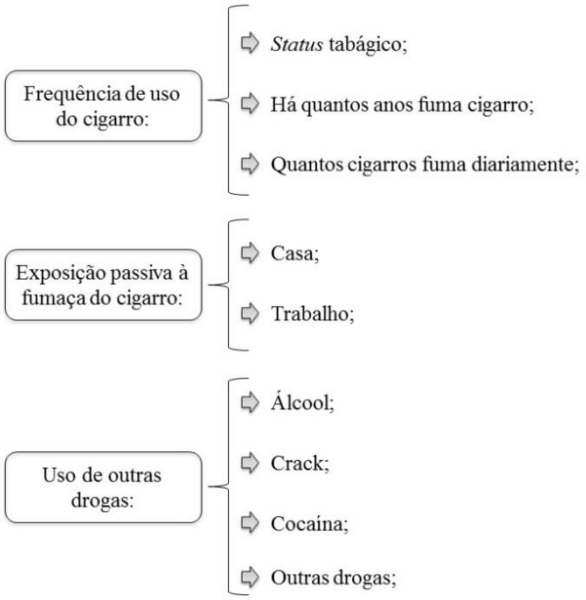

Figura 7. Dados coletados das gestantes fumantes e não fumantes.

Foi construída uma tabela de contingência para as gestantes fumantes e não fumantes, para avaliar o uso de cigarro segundo o autorrelato e a presença de nicotina e cotinina na saliva, na primeira avaliação (n=259). Foram considerados positivos para esses biomarcadores do cigarro na saliva, os valores superiores ou iguais ao limite de detecção do método analítico.

5.5.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico MedCalc® v16.4.3 e, para todos os testes, o nível de significância (p) adotado foi de 0,05.

Foi feita uma comparação da concentração de nicotina e cotinina entre o grupo de gestantes fumantes e de gestantes não fumantes, na primeira avaliação (n=259). Foram consideradas fumantes as gestantes que relataram ser fumante regular e de início recente, e não fumante as gestantes que relataram que nunca fumaram e as ex-fumantes. Os valores de concentrações de nicotina e cotinina foram considerados positivos, quando estes estavam acima ou iguais ao limite de detecção de cada analito. Os resultados foram expressos em medidas de tendência central (média e mediana) e em medidas de dispersão (mínimo, máximo e desvio padrão) das concentrações dos analitos nicotina e cotinina para cada grupo. Na análise inferencial foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

O teste de Spearman foi realizado nas análises de correlações entre as concentrações de nicotina e cotinina e o número de cigarros consumidos por dia pelas gestantes fumantes (n=85). Neste teste, foi determinado o coeficiente de rho

que varia entre -1 e 1, quanto mais próximo estiverem destes extremos, maior será a correlação entre as variáveis.

Foram comparados o número de cigarros consumidos diariamente e as concentrações de nicotina e cotinina entre a primeira e a segunda avaliação (n=45), através de um teste não paramétrico de comparação pareada chamado de Wilcoxon.

5.5.4 Análises estatísticas adicionais

Foi construída uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) que é uma ferramenta capaz de avaliar quantitativamente o desempenho do teste diagnóstico por meio das medidas de sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo. Também foi determinada a área sob a curva (AUC – *Area Under the Curve*) que avalia o desempenho deste teste, sendo assim, quanto mais próximo o valor for de 1, maior é a capacidade do teste de diferenciar os indivíduos que foram expostos (fumantes) dos que não foram expostos (não fumantes). Para a construção da curva ROC foram utilizadas as concentrações de nicotina e cotinina encontradas nas salivas das gestantes fumantes e não fumantes, na primeira avaliação (n=259).

Por meio da curva ROC, foi determinado um ponto de corte para a concentração de nicotina e cotinina de modo a priorizar a sensibilidade do método. Cada ponto de corte está associado a um valor de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade da análise de nicotina e cotinina é a probabilidade do teste ser positivo para um indivíduo, quando ele realmente é fumante. E a especificidade é a probabilidade de um indivíduo ser negativo no teste de nicotina e cotinina, quando ele é realmente não fumante. Os valores preditivos positivo e negativo também foram calculados, sendo o positivo a proporção de indivíduos verdadeiramente expostos entre os positivos para nicotina e cotinina, e, os negativos, a proporção de indivíduos verdadeiramente não expostos entre os negativos para estes analitos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

No desenvolvimento do método de análise de nicotina e cotinina em saliva foi feita a otimização das condições de análise por cromatografia gasosa com detector termiônico específico e também do método de extração desses analitos na saliva.

6.1.1 Determinação das condições cromatográficas

Para estabelecer as condições desta análise, iniciou o desenvolvimento do método com a análise das soluções padrões de nicotina, cotinina e do padrão interno ketamina.

Inicialmente, foram testadas as condições cromatográficas descritas por Malafatti et al. (2010), em que a temperatura do injetor empregada foi de 260ºC e do detector de 280ºC. A programação da temperatura do forno foi iniciada em 180ºC e foi elevada a 250ºC a uma taxa de 30ºC/min permanecendo por 0,5 minutos, posteriormente foi elevada a 259ºC a uma taxa de 15ºC/min permanecendo por 0,1 minutos, e depois aumentou a temperatura para 260ºC a uma taxa de 0,1ºC/min, totalizando 13,40 minutos de análise. Ao utilizar essas condições, foi obtido um cromatograma com a ausência da separação do analitos, em que estes provavelmente saíram no mesmo tempo de retenção do solvente isopropanol. O cromatograma está ilustrado na Figura 8.

Foi realizado outro teste em que foram mantidas as temperaturas do injetor e do detector a 260ºC e 280ºC, respectivamente, e utilizou a programação da temperatura do forno igual à realizada por Franqui et al. (2015), em que a temperatura foi iniciada a 120ºC, permanecendo por 2 min, e foi elevada até 300ºC, a uma taxa de 40ºC/min e permanecendo por 4 min, totalizando 8,0 minutos de análise. Essas condições cromatográficas resultaram em um cromatograma com a separação dos analitos, nicotina, cotinina e padrão interno, porém o pico da nicotina teve tempo de retenção muito próximo ao do isopropanol. O cromatograma está ilustrado na Figura 9.

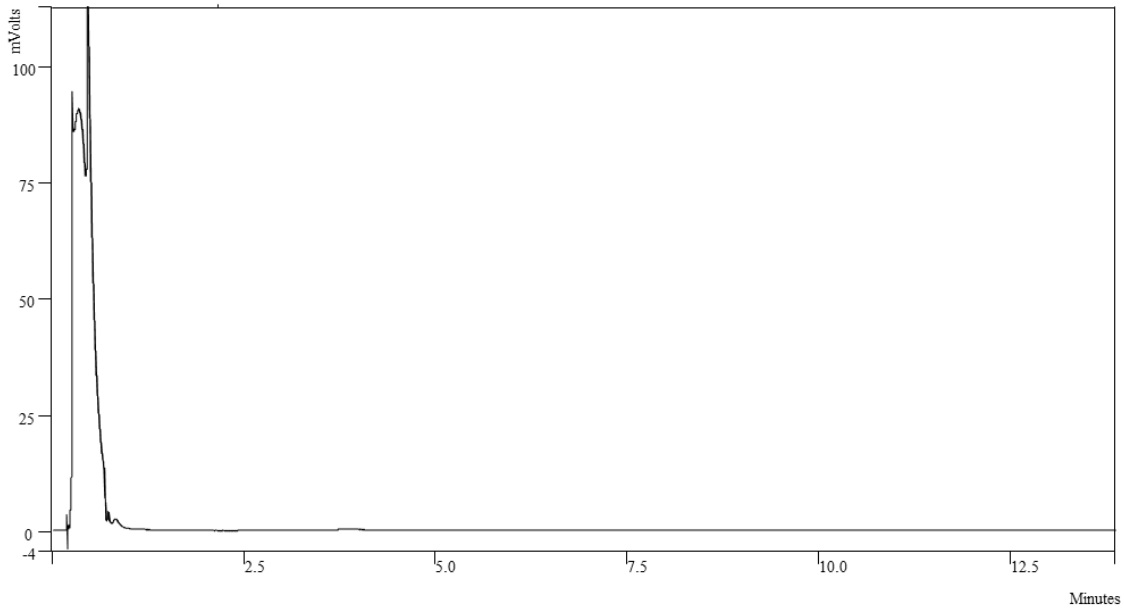

Figura 8. Cromatograma obtido ao analisar a solução padrão de 100 ng de nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina nas condições cromatográficas descritas por Malafatti et al. (2010).

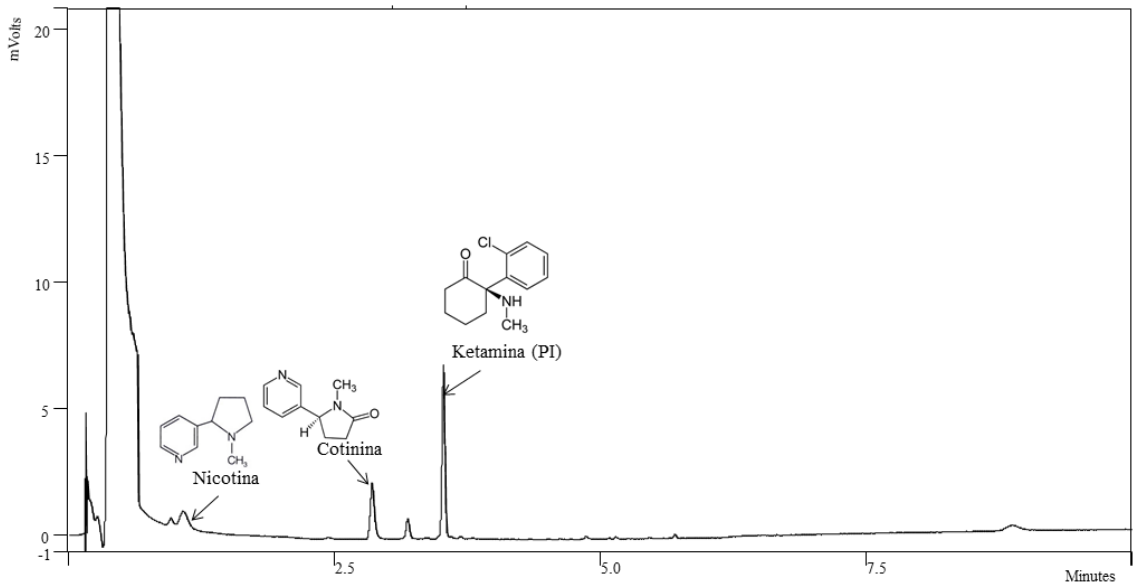

Figura 9. Cromatograma obtido ao analisar a solução de 100 ng de nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina utilizando a programação da temperatura do forno descrita por Franqui et al. (2015).

Foram realizados vários testes com modificações na programação da temperatura do forno, na taxa de aquecimento e no tempo de permanência da temperatura, a fim de melhorar a separação da nicotina. Foi obtida a melhor separação ao alterar a rampa de temperatura, o tempo de permanência da

temperatura inicial e da final e ao diminuir taxa de aquecimento de 40ºC/min para 25ºC/min. Na Figura 10 está ilustrado o cromatograma obtido com os tempos de retenção de cada analito, sendo da nicotina 2,554 minutos, da cotinina 4,159 minutos e do padrão interno ketamina 4,976 minutos.

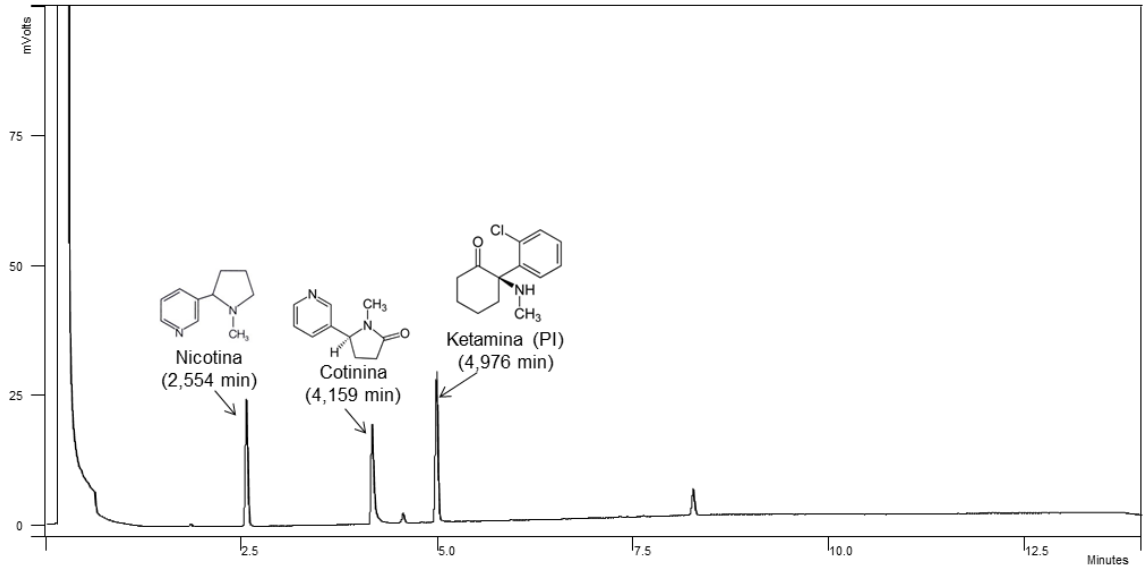

Figura 10. Cromatograma obtido na otimização dos picos dos analitos ao analisar a solução padrão de 180 ng de nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina.

6.1.2 Desenvolvimento do método de extração

Inicialmente foram avaliados alguns métodos de extração, sendo estes: a extração em fase sólida (SPE), a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida modificada com ponteiras descartáveis (DPX).

A SPE foi realizada em três amostras de saliva branco (500 µL) fortificadas com 100 ng de nicotina e cotinina e 300 ng de ketamina, adicionadas de 2 mL de NaOH 5 M e 1,8 mL de água Milli-Q. Em seguida, esses tubos de vidro de fundo cônico foram colocados na mesa de agitação horizontal por 20 minutos a 200 rpm e centrifugados por 15 minutos a 2500 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro de fundo cônico. No procedimento de purificação e concentração dos analitos foram utilizados os cartuchos *Bond Elut Certify I* (200 mg – 6 mL) que apresentam um fase extratora mista, formada por grupamentos octil (oito carbonos) ligados a grupamentos de ácido benzenosulfônicos. Os cartuchos foram condicionados com 2 mL de metanol, lavados com 1 mL metanol e eluídos com 3 mL de acetato de etila. O eluato foi evaporado a 21ºC no concentrador de

amostras sob fluxo de N_2, reconstituído com 70 µL de isopropanol e submetido à análise por GC-TSD. Os resultados obtidos com essa técnica não foram satisfatórios, pois foi possível extrair somente a cotinina.

Outra técnica testada foi a extração em fase sólida modificada com ponteiras descartáveis (DPX), também realizada em triplicata. No preparo da amostra, foram pipetados 500 µL de saliva branco em um tudo de vidro de fundo cônico de 9 mL, e foram fortificadas com 180 ng de nicotina e cotinina e 300 ng de ketamina. Foram adicionados 2 mL de metanol e 100 µL de ácido clorídrico 0,1 M e, em seguida, foi submetido a agitação no vortex e posteriormente à agitação horizontal por 20 minutos a 200 rpm e a centrifugação por 20 minutos a 2800 rpm. A fase orgânica foi transferida para outro tubo de vidro de fundo cônico.

Na etapa de purificação e concentração dos analitos foi utilizada a ponteira DPX-CX1 que apresenta grupamentos sulfônicos de forte interação de adsorção com compostos básicos. O condicionamento dessa ponteira foi feito com 1 mL da solução de acetonitrila (30% v/v). Em seguida, aspirou a amostra e a manteve em contato com a fase sólida por 30 segundos, permitindo a entrada de ar constante, para ocorrer o contato da amostra com o polímero sulfonado presente na fase sólida da ponteira e para que a concentração dos analitos seja realizada com sucesso. Posteriormente, foi feito a lavagem das ponteira com 1 mL de metanol por 10 segundos. E, para a eluição dos analitos, foi utilizado 1 mL da solução de diclorometano: isopropanol: hidróxido de amônia (78:20:2), realizando três vezes o procedimento para garantir a retirada dos analitos retidos na fase sólida da ponteira. O eluato foi evaporado a 21ºC no concentrador de amostras sob fluxo de N_2, reconstituído com 70 µL de isopropanol e submetido à análise por GC-TSD.

Os resultados obtidos da extração com a DPX foram bastante satisfatórios, uma vez que foi possível extrair os analitos nicotina e cotinina e a ketamina (Figura 11 e 12). Porém, não foi possível desenvolver o método utilizando a DPX devido a quantidade insuficiente dessas ponteiras no laboratório e o alto custo destas.

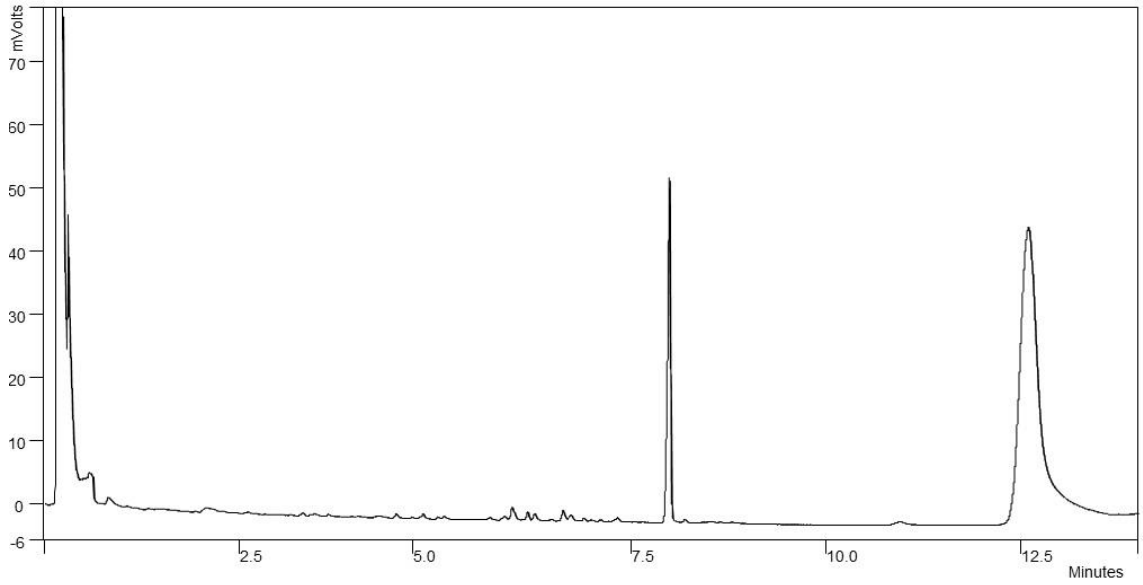

Figura 11. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra de saliva "branco", submetida à extração com a DPX.

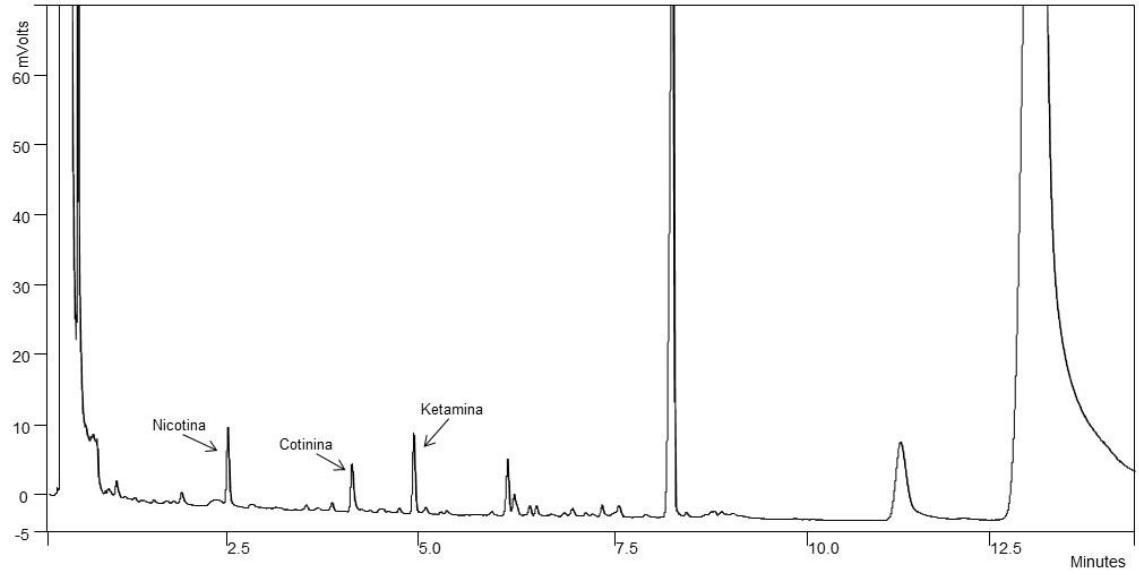

Figura 12. Cromatograma obtido pela análise de saliva fortificada com 180 ng dos padrões nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina, submetida à extração com a DPX.

A técnica escolhida foi a extração líquido-líquido (ELL), uma vez que tratar-se de uma técnica simples de ser feita, os solventes extratores apresentam ampla faixa de solubilidade e seletividade e também o custo é mais baixo do que em relação a SPE e a extração com a DPX. Além disso, as proteínas presentes na amostra de saliva podem ser desnaturadas através da ELL, sendo assim, é possível obter um cromatograma com menor número de interferentes da matriz. A Figura 13 representa

o cromatograma de uma amostra de saliva fortificada com concentrações conhecidas dos analitos nicotina e cotinina e o padrão interno ketamina. E na Figura 14, há a sobreposição dos cromatogramas de uma amostra de saliva “branco” com uma amostra fortificada.

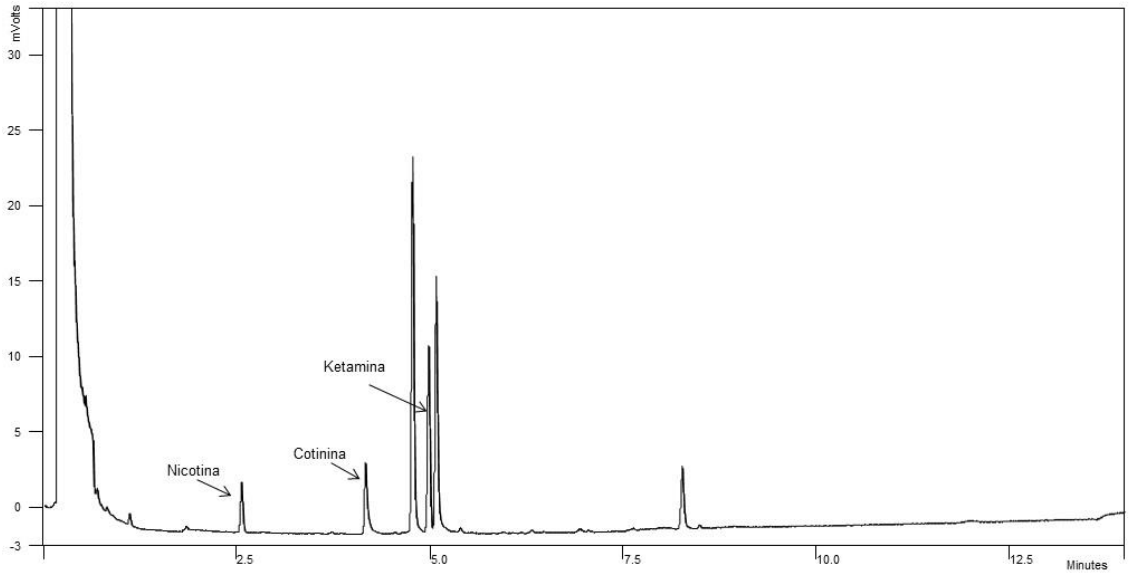

Figura 13. Cromatograma obtido pela análise de saliva fortificada com 180 ng dos padrões nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina, submetida à extração líquido-líquido.

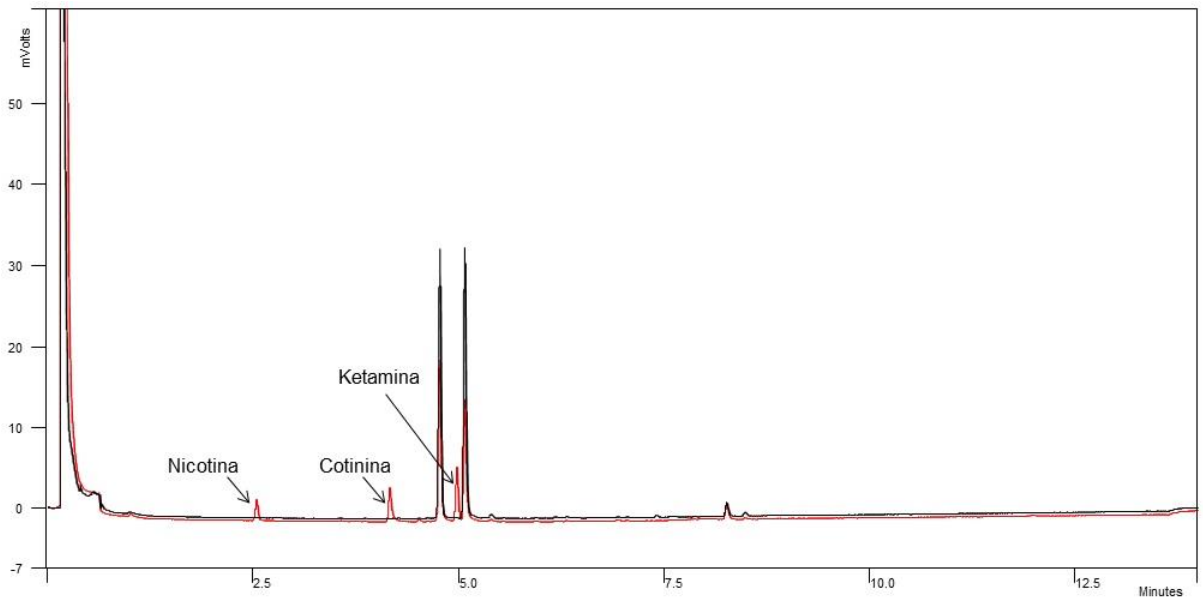

Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas de uma amostra "branco" (cor preta) com uma amostra de saliva fortificada com 180 ng dos padrões nicotina e cotinina e 300 ng do padrão interno ketamina (vermelho), submetida à extração líquido-líquido.

6.1.3 Otimização do método de preparo da amostra

Na otimização do método de extração foram avaliadas as seguintes variáveis: solvente extrator e gás utilizado na etapa de concentração da amostra.

6.1.3.1 Estudo da influência do solvente extrator e do nitrogênio e ar comprimido durante a etapa de concentração da amostra.

Após a escolha da ELL como técnica de extração, foram testados dois solventes extratores a fim de se obter melhor recuperação dos analitos. Os solventes utilizados foram: diclorometano e éter etílico. Cada um desses solventes foram adicionados separadamente em tubos de vidro de fundo cônico contendo NaOH 5M e as amostras de saliva (500 µL) já fortificadas, seguido de agitação horizontal, centrifugação e evaporação. Para cada tipo de solvente foi testada a evaporação do extrato sob fluxo de N_2 e, também, sob fluxo de ar comprimido.

Ao comparar os resultados obtidos com relação aos solventes extratores, foi observado que com o diclorometano, as áreas relativas dos analitos, nicotina e cotinina, foram maiores do que com o éter etílico (FIGURAS 15 e 16). A extração realizada com diclorometano também apresentou coeficiente de variação melhor do que com éter etílico, como pode ser observado na Tabela 4. Portanto, foi escolhido como solvente extrator o diclorometano.

Com relação ao fluxo de gás utilizado para a evaporação do extrato, originados da extração feita com diclorometano, foi observado que com o gás N_2, as áreas relativas da nicotina foram, aproximadamente, seis vezes maiores do que ao evaporar o extrato sob fluxo de ar comprimido (FIGURA 15). Já para a cotinina, as áreas relativas da evaporação feita com ar comprimido foram, aproximadamente, duas vezes maiores do que com o gás N_2 (FIGURA 16). Porém, como em uma amostra estará presentes ambos os analitos e o coeficiente de variação da cotinina foi bom nas duas condições de evaporação (TABELA 4), foi determinado utilizar o N_2 para concentrar a amostra.

Tabela 4. Coeficiente de variação da nicotina e da cotinina com relação aos solventes extratores e aos gases utilizados na concentração das amostras.

Condições	Nicotina	Cotinina
Diclorometano e N_2	11,57%	2,30%
Diclorometano e Ar comprimido	34,07%	2,30%
Éter Etílico e N_2	19,96%	5,26%
Éter Etílico e Ar comprimido	43,28%	21,08%

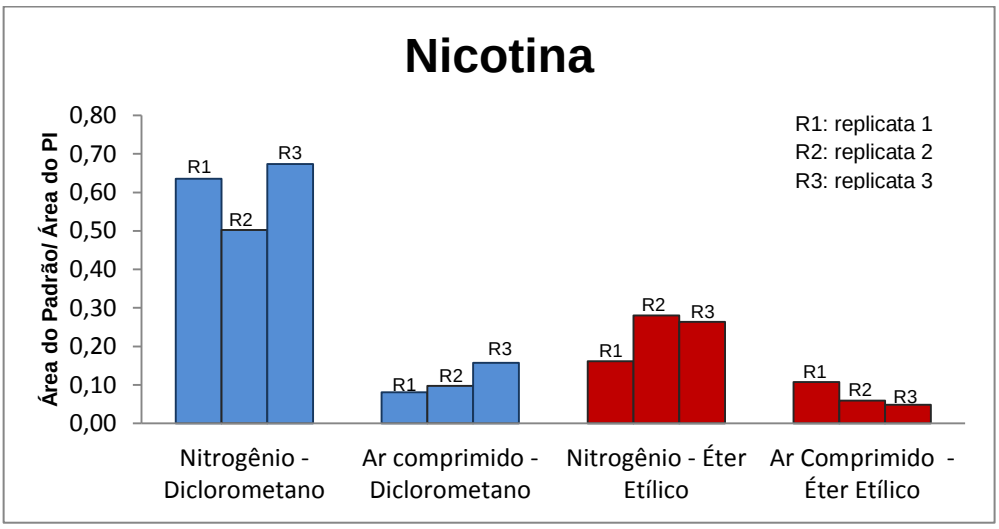

Figura 15. Área relativa da nicotina.

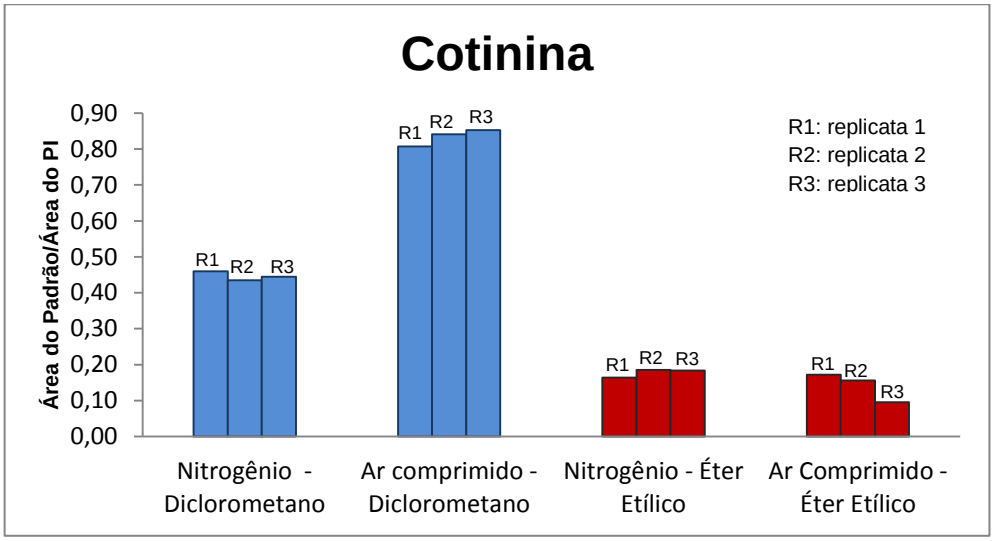

Figura 16. Área relativa da cotinina.

6.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação de um método analítico garante que os resultados analíticos sejam confiáveis, sendo isso essencial para interpretação correta dos resultados e, consequentemente, a realização de uma intervenção clínica adequada. A seguir, estão apresentados os resultados da validação.

6.2.1 Determinação dos controles de qualidade e dos limites de detecção e quantificação

O limite de detecção dos analitos foi determinado nas amostras de saliva fortificadas com concentrações decrescentes, até o limite mínimo de 6 ng/mL para a nicotina e cotinina. Esses valores variaram para cada analito, sendo de 6 ng/mL para a cotinina e 10 ng/mL para nicotina, enquanto que os valores do limite inferior de quantificação foram 20 ng/mL para cotinina e 40 ng/mL para nicotina.

Os valores do limite superior de quantificação foi 2000 ng/mL para ambos os analitos. Foram estabelecidos os valores dos controles de qualidade baixo, médio e alto, a partir desses valores. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações do LD, LIQ, CQs e do LSQ para a nicotina e a cotinina.

Analitos	LD (ng/mL)	LIQ (ng/mL)	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)	LSQ (ng/mL)
Nicotina	10	40	120	1000	1500	2000
Cotinina	6	20	60	1000	1500	2000

LD: limite de detecção, LIQ: limite inferior de quantificação, CQB: controle de qualidade de baixa concentração, CQM: controle de qualidade de média concentração, CQA: controle de qualidade de alta concentração, LSQ: limite superior de quantificação.

Em um método o limite inferior de quantificação é importante, uma vez que ele determina a sensibilidade do método e também pode ser responsável por resultados falsos negativos, caso esse valor seja elevado (MOORE et al., 1995). Os LD e LIQ do método foram considerados satisfatórios e adequados para o propósito do estudo, pois foi possível diferenciar as gestantes fumantes das não fumantes.

Na pesquisa realizada por Toraño e Van Kan (2003) em que utilizaram o GC-MS, os valores de LD e LIQ em saliva, foram inferiores aos encontrados neste trabalho, uma vez que o LD foi de 0,6 ng/mL para nicotina e cotinina e o LIQ foi de 10 ng/mL para ambos os analitos. Assim como na pesquisa realizada por Shin et

al. (2002), que também utilizou GC-MS e amostra de saliva, sendo os valores de LD e LIQ de 1,0 ng/mL para nicotina e cotinina. Já no estudo realizado por Kardani, Daneshfar e Sahrai (2010) que utilizaram o GC-FID, os valores desses limites em amostras de saliva, foram superiores ao deste estudo, sendo o LD de 330 ng/mL para nicotina e de 340 ng/mL para cotinina, e o LIQ de 1100 ng/mL e 1130 ng/mL, para nicotina e cotinina, respectivamente.

Essa diferença nos valores do LD e LIQ pode ter ocorrido devido ao tipo de equipamento utilizado para as análises, uma vez que o cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas normalmente consegue detectar e quantificar concentrações mais baixas dos analitos. Outros valos de LD e LIQ encontrados na literatura estão apresentados na Tabela 1.

6.2.2 Seletividade

Os nove interferentes analisados na concentração de 2000 ng/mL (lidocaína, MDMA, alprazolam, metoclopramida, cacaína, paroxetina, THC, morfina e codeína) não interferiram no tempo de retenção, na identificação e na quantificação dos analitos e do padrão interno. Sendo assim, o método foi seletivo e específico para o objetivo de análise proposto. Na Tabela 6, estão apresentados os valores das concentrações dos limites inferiores de quantificação obtidos no parâmetro de seletividade.

Tabela 6. Resultados das concentrações de CQB dos analitos na análise do parâmetro de seletividade.

Analitos	Concentração (ng/mL)
Nicotina (40 ng/mL)	43,1
Cotinina (20 ng/mL)	22,0

6.2.3 Efeito residual (carry over)

Não foi observado efeito residual, ou seja, não houve detecção dos analitos nas amostras “branco” analisadas imediatamente após o maior ponto da curva analítica, como mostra na Figura 17. Portanto, este método cromatográfico foi adequado e, a análise de uma amostra de saliva com concentração menor ou igual ao LSQ, não interferiu no resultado da análise seguinte.

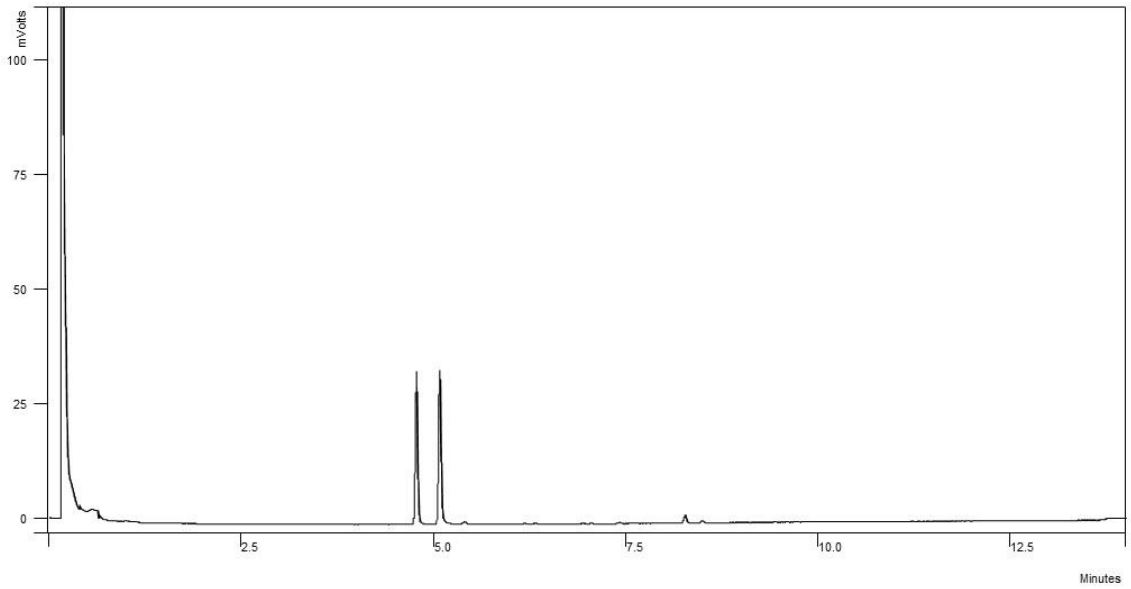

Figura 17. Cromatograma da análise de um extrato de uma amostra "branco", após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração.

6.2.4 Efeito matriz

Neste parâmetro foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN) pelo padrão interno para cada amostra. O coeficiente de variação do FMN para as amostras nos CQB e CQA foram menores que 15% tanto para a nicotina quanto para a cotinina e estão apresentamos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores dos coeficientes de variação dos fatores de matriz normalizados para cada analito nos controles de qualidade baixo e alto.

Analitos	CQB	CQA
Nicotina	1,04%	13,51%
Cotinina	4,23%	2,05%

CQB: controle de qualidade baixo, CQA: controle de qualidade alto.

6.2.5 Curva de Calibração

O método foi considerado linear na faixa de concentração de 20 a 1000 ng/500µL (40-2000 ng/mL) para a nicotina e de 10 a 1000 ng/500µL (20-2000 ng/mL) para a cotinina. A faixa de concentração dos analitos da curva de calibração contemplou as concentrações esperadas nas amostras de saliva da população em estudo. Os coeficientes de correlação linear foram de 0,996 para a nicotina e de 0,999 para a cotinina.

As Figuras 18 e 19 representam as curvas de calibração e linearidade de cada analito. O eixo Y representa a razão da área do padrão pela área do padrão interno e o eixo X representa a concentração do analito expressa em ng/500µL de saliva.

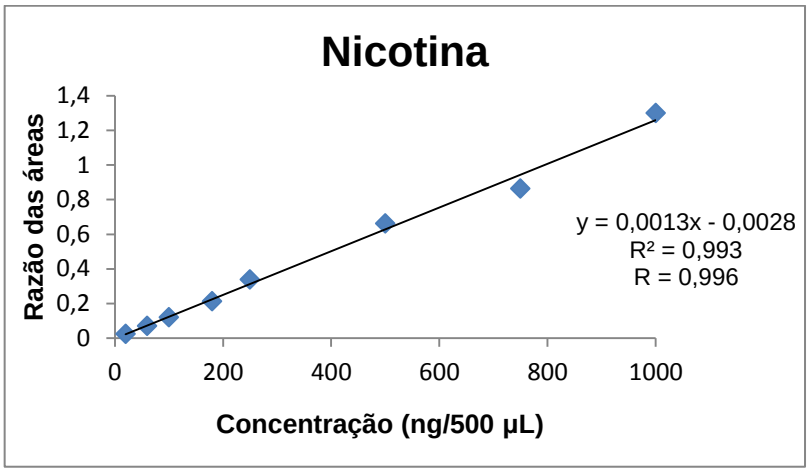

Figura 18. Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação linear (R) da nicotina.

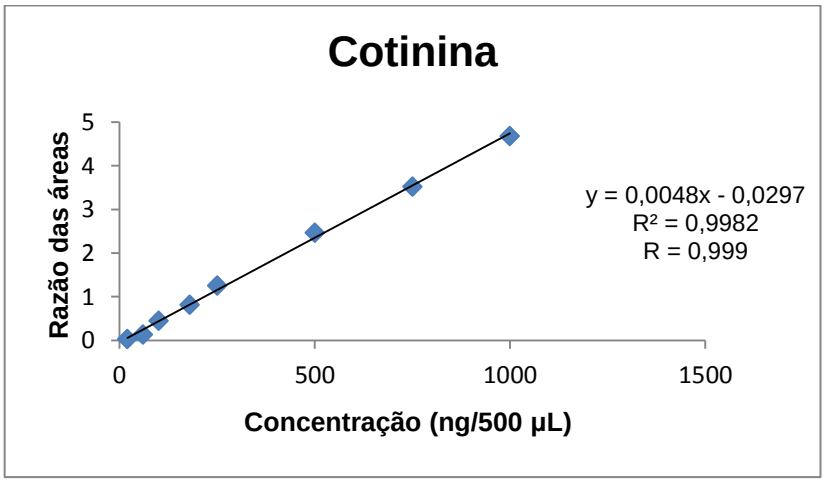

Figura 19. Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação linear (R) da cotinina.

Shin et al. em 2002 determinaram, por GC-MS, a faixa de linearidade para a nicotina e cotinina em amostra de saliva de 1,0 a 10000 ng/mL e com o valor de R igual a 0,998 para ambos os analitos. Sant'Anna (2010) analisou amostras de mecônio no GC-NPD e determinou a faixa de linearidade de 40 a 500 ng/g para a nicotina, com valor de R igual a 0,993, e de 5 a 500 ng/g para a cotinina, com valor de R igual a 0,99. Malafatti et al. (2010) também utilizou o GC-NPD, porém determinou em amostras de urina somente a cotinina. Foram construídas duas

faixas de linearidade para este analito, sendo uma de 10 a 1000 ng/mL (R=0,999) e outra de 500 a 6000 ng/mL (R=0,998).

Durante as análises dos padrões de calibração para construção da curva de calibração, foram analisadas uma amostra “branco” (isenta de analitos e do padrão interno) e uma amostra “zero” (isenta de analitos, porém com adição do padrão interno), mas estas não foram incluídas na construção da curva de calibração. Nenhum dos analitos, padrão interno e interferentes foram identificados na análise da amostra branco, portanto o método cromatográfico foi adequado. Além disso, é necessário que os analitos não estejam presentes na amostra “branco”, uma vez que estas são utilizadas no preparo dos controles de qualidade dos ensaios de validação. Na análise da amostra “zero”, a nicotina e a cotinina não foram detectadas, indicando que o padrão interno ketamina não interfere na análise dos analitos em estudo. Nas Figuras 20 e 21 estão ilustrados os cromatogramas obtidos na análise da amostra branco e na amostra zero, respectivamente.

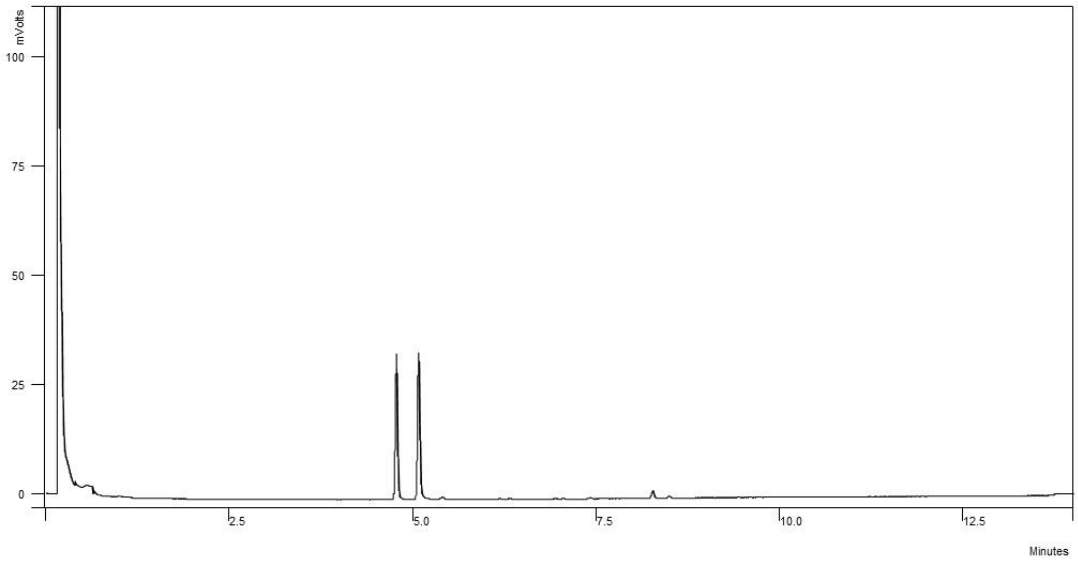

Figura 20. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra "branco" submetida à extração líquido-líquido.

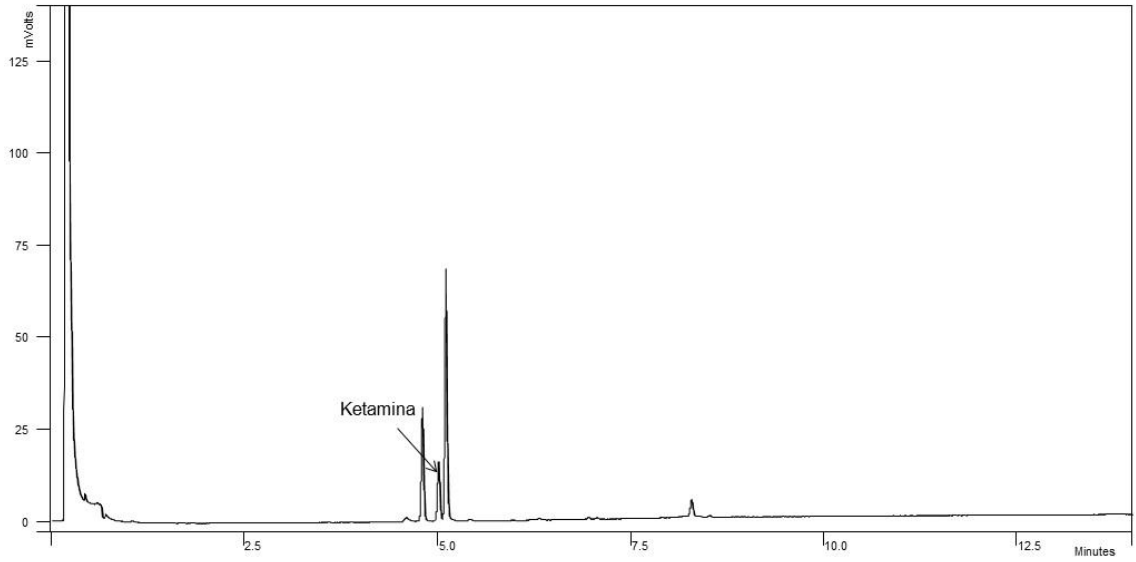

Figura 21. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra "zero" submetida à extração líquido-líquido.

6.2.6 Recuperação

Os valores de recuperação dos analitos variam de 66,1% a 92,2% para o CQM da nicotina e CQM da cotinina, respectivamente. O analito que apresentou maiores valores de recuperação foi a cotinina (valor médio 88,7%) e a nicotina foi o analito que apresentou menores valores de recuperação (valor médio 76,2%). A Tabela 8 mostra os valores obtidos da recuperação para todos os CQs da nicotina e cotinina.

Tabela 8. Valores de recuperação (%).

Controles de qualidade (CQ)	Nicotina	Desvio padrão	Cotinina	Desvio padrão
CQB	83,1	0,008	86,6	0,045
CQM	66,1	0,111	92,2	0,607
CQA	79,3	0,411	87,3	0,582
Média	76,2	0,744	88,7	1,768

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

Ortuño et al. (2015) determinaram valores de recuperação próximos ao deste estudo, sendo de 76,6% para nicotina e de 71,4% para cotinina em amostras de saliva submetidas à extração líquido-líquido. Porém, Barros (2011) que utilizou a extração em fase sólida e a amostra de mecônio obteve valores inferiores de recuperação, sendo a média destes de 58,52% para a nicotina e de 67,66% para a

cotinina. Porém, baixas porcentagens de recuperação já são esperadas em amostras complexas, como o mecônio, considerando algumas perdas atribuídas à própria amostra.

6.2.7 Precisão

Para ambos os analitos, os valores do coeficiente de variação dos limites inferiores de quantificação e dos controles de qualidade baixo, médio e alto, estavam dentro dos critérios estabelecidos pela ANVISA, tanto no ensaio intradia quanto no ensaio interdia. A precisão intradia apresentou uma variação de 6,06% a 11,50%, que foram os valores do LIQ e CQA da nicotina, respectivamente. E a precisão interdia variou de 6,89 a 10,57%, que correspondem aos valores de CQA da cotinina e do CQM da nicotina. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 9 e 10.

Tabela 9. Valores do coeficiente de variação (%) obtidos no ensaio de precisão intradia.

Analitos	LIQ	CQB	CQM	CQA
Nicotina	6,06	8,93	9,05	11,50
Cotinina	10,41	6,96	6,63	8,81

LIQ: limite inferior de quantificação, CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

Tabela 10. Valores do coeficiente de variação (%) obtidos no ensaio de precisão interdia.

Analitos	LIQ	CQB	CQM	CQA
Nicotina	9,46	8,04	10,57	7,55
Cotinina	8,49	8,20	8,82	6,89

LIQ: limite inferior de quantificação, CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

Na pesquisa realizada por Sant'Anna (2010), os valores da precisão intradia variaram de 4,7% a 12,9% que correspondem aos valores de CQA da cotinina e de CQM da nicotina, respectivamente. Já a precisão interdia variou de 3,0% a 20,1% que corresponde aos valores de CQB da nicotina e da cotinina. No estudo publicado por Meger et al. (2002), os valores da precisão tiveram uma menor variação, sendo o valor da intradia de 3,2% a 6,9% que equivale aos valores de CQM da nicotina e

da cotinina, e da interdia de 2,8% a 6,0% que equivale aos valores de CQB da cotinina e de CQM da nicotina.

6.2.8 Exatidão

Os valores de erro padrão (relativo aos limites inferiores de quantificação e aos controles de qualidade baixo, médio e alto para ambos os analitos) estavam dentro dos critérios estabelecidos pela ANVISA, tanto no ensaio intradia quanto no ensaio interdia. A exatidão intradia variou de -11,29%, para o CQA da nicotina, a 19,81%, para o LIQ da cotinina. E os valores da exatidão interdia variaram de -11,78% a 13,08% que correspondem aos valores de CQA da nicotina e de LIQ da cotinina. Os resultados estão descritos na Tabela 11 e 12.

Tabela 11. Valores de erro padrão relativo (%) obtidos no ensaio de exatidão intradia.

Analitos	LIQ	CQB	CQM	CQA
Nicotina	0,58	-8,57	2,17	-11,29
Cotinina	19,81	14,85	3,98	-1,82

LIQ: limite inferior de quantificação, CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

Tabela 12. Valores de erro padrão relativo (%) obtidos no ensaio de exatidão interdia.

Analitos	LIQ	CQB	CQM	CQA
Nicotina	4,50	-9,38	6,01	-11,78
Cotinina	13,08	10,54	0,96	-2,23

LIQ: limite inferior de quantificação, CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

No estudo realizado por Shin et al. (2002), os valores de erro relativo encontrado nos ensaios de exatidão intradia foram de 4,8% e 3,7% para a nicotina nas concentrações de 10 ng/mL e 50 ng/mL em saliva, respectivamente, e de 3,0% e 2,4% para a cotinina nas mesmas concentrações citadas anteriormente. Valores superiores foram encontrados na pesquisa feita por Malafatti et al. (2010) em que a exatidão variou de -1,7% a 11,9% para a cotinina que correspondem as concentrações de 6000 ng/mL e 30 ng/mL de urina.

6.2.9 Estabilidade dos analitos na matriz biológica

Os analitos são considerados estáveis na matriz biológica quando não há desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. Portanto, de acordo com os valores encontrados neste estudo, os analitos foram estáveis em todos os ensaios de estabilidade. Pode-se notar que a cotinina apresentou maior estabilidade na maioria dos ensaios quando comparada à nicotina. Os resultados estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de estabilidade dos analitos na saliva dado em porcentagem da variação da concentração com relação à concentração nominal.

Ensaio de estabilidade	Concentração	NIC	COT
Após dois ciclos de congelamento e descongelamento	CQB	13,25	1,85
	CQA	1,12	1,18
Curta duração	CQB	11,91	3,75
	CQA	5,84	1,01
Longa duração	CQB	13,98	3,21
	CQA	10,96	8,87
Pós-processamento	CQB	6,10	8,10
	CQA	8,00	1,85

CQB: controle de qualidade baixo, CQA: controle de qualidade alto.

Ortuño et al. (2015) realizaram os ensaios de estabilidade a longo prazo (um mês), após três ciclos de congelamento e descongelamento e também a estabilidade intradia. Em todos testes a nicotina e cotinina foram estáveis, assim como neste estudo.

6.2.10 Estabilidade dos analitos em solução

A nicotina e a cotinina mostraram-se estáveis em solução de metanol após 6 meses de armazenamento sob refrigeração a -20ºC, uma vez que o desvio foi inferior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas de ambos os analitos. Os resultados estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de estabilidade dos analitos em solução dado em porcentagem.

Ensaio de estabilidade	Concentração	NIC	COT
Estabilidade dos analitos em solução	Solução de 10 µg/mL	1,63	7,59
	Solução de 1 µg/mL	4,02	4,23

6.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SALIVA

A coleta da amostra de saliva foi realizada em dois momentos, nomeados de primeira e segunda avaliação. A primeira ocorreu quando o período gestacional era de 1 a 25 semanas e a segunda de 36 a 40 semanas e até 113 dias após o parto.

Na primeira avaliação realizou-se a coleta e a análise das amostras de saliva, tanto de gestantes que relataram o uso de cigarro durante a gravidez (gestantes fumantes), quanto de gestantes que relataram o não uso deste durante a gestação (gestantes não fumantes). Nesse primeiro momento foram analisadas 87 amostras de gestantes fumantes e 172 amostras de gestantes não fumantes.

A segunda avaliação foi desenvolvida apenas para as gestantes fumantes. Destas 87 gestantes, foram analisadas 45 amostras de saliva na segunda avaliação, uma vez que 28,57% (n=12) das amostras não foram enviadas para o laboratório, 30,95% (n=13) das pacientes não foram encontradas para realização da coleta, 2,38% (n=1) tiveram aborto no segundo trimestre da gestação e 38,1% (n=16) não estavam no período gestacional de 36 a 40 semanas.

A idade média das gestantes não fumantes foi 25,60 anos (n=172; M=24,5; DP±5,70) e a do período gestacional foi 14 semanas (DP±4,80). Destas, 87,20% (n=150) nunca fumou cigarro e 12,80% (n=22) eram ex-fumantes. Com relação à exposição passiva à fumaça de cigarro, 77,32% (n=133) relataram que nunca foram expostas em suas casas, 18,02% (n=31) foram expostas diariamente, 1,74% (n=3) semanalmente e 2,33% (n=4) mensalmente. Das gestantes não fumantes, 46,51% (n=80) não trabalhavam, 44,18% (n=76) trabalhavam em ambiente fechado, 4,07% (n=7) em ambiente aberto e 5,23% (n=9) trabalhavam em ambiente aberto e fechado. Sendo que, 15,2% (n=14) das gestantes que trabalhavam sofreram exposição passiva à fumaça do cigarro no ambiente de trabalho. Em relação ao

consumo de bebida alcoólica e maconha, 20,93% (n=36) e 0,58% (n=1) relataram, respectivamente, o consumo no último mês.

As gestantes fumantes apresentaram idade média de 27,9 anos (n=87; M=27,7; DP±5,70). Na primeira avaliação a média do período gestacional foi 16 semanas (n=87; M=16; DP±5,42), e na segunda avaliação a média foi de 37 semanas (n=30; M=37; DP±2,23) e de 27 dias após o parto (n=15; M=16; DP±27,81).

Com relação ao *status* tabágico das gestantes fumantes, na primeira avaliação, 96,55% (n=84) eram fumantes regulares de cigarro e 3,45% (n=3) fumantes de início recente. A média do período de tabagismo foi de 12 anos (DP±5,98) e a do consumo de cigarro por dia foi de 11 (DP±9,47). Quanto ao grau de dependência à nicotina, a média da pontuação no teste FTND foi de 5 (M=5; DP±2,37). Das 87 gestantes fumantes, 42,53% (n=37) nunca foram expostas de forma passiva à fumaça do cigarro dentro de suas casas, mas 56,32% (n=49) foram expostas diariamente e 1,15% (n=1) semanalmente. Em relação ao trabalho, 59,77% (n=52) das gestantes não trabalhavam, 24,14% (n=21) trabalhavam em ambiente fechado, 4,60% (n=4) em ambiente aberto e 11,49% (n=10) em ambiente aberto e fechado. No entanto, destas que trabalhavam 20,0% (n=7) sofreram exposição passiva à fumaça do cigarro no ambiente de trabalho. 50,57% (n=44) e 5,75% (n=5) das gestantes fumantes relataram o consumo de bebida alcoólica e de cocaína, respectivamente, no último mês.

Em relação ao *status* tabágico das gestantes fumantes, na segunda avaliação, 91,11% (n=41) eram fumantes regulares e 8,89% (n=4) eram ex-fumantes e a média do número de cigarros fumados por dia foi de 9 (DP±8,69).

A análise cromatográfica foi realizada nas amostras de saliva, tanto de gestantes que relataram o uso de cigarro durante a gravidez, quanto nas que relataram o não uso deste durante a gestação. A Tabela 21 apresenta as respostas dadas por 87 gestantes que relataram o uso de cigarro durante a gravidez e os valores encontrados para nicotina e cotinina (APÊNDICE A); e a Tabela 22 para as gestantes que relataram o não uso deste durante a gestação e também os valores encontrados para estes analitos (APÊNDICE B).

Foi construída uma tabela de contingência para as gestantes fumantes e não fumantes (n=259), para avaliar o uso de cigarro segundo o autorrelato e a presença de nicotina e cotinina na amostra de saliva, na primeira avaliação. Nas Tabelas 15 e

16 estão descritos os resultados das associações entre o consumo de cigarros durante a gestação e a presença de nicotina e cotinina na amostra de saliva, respectivamente.

Tabela 15. Associação entre o consumo de cigarros durante a gestação e a presença de nicotina na amostra de saliva.

Análise de nicotina	**Consumo de cigarro durante a gestação**		**Total**
	Não	**Sim**	
Nicotina negativa *(Concentração < LD)*	168	55	223 (86,1%)
Nicotina positiva *(Concentração ≥ LD)*	4	32	36 (13,9%)
Total	172 (66,4%)	87 (33,6%)	259

Consumo de cigarro na gestação: consumo referido pelas gestantes de qualquer quantidade de cigarro durante o período gestacional de 1 a 25 semanas.

Tabela 16. Associação entre o consumo de cigarros durante a gestação e a presença de cotinina na amostra de saliva.

Análise de cotinina	**Consumo de cigarro durante a gestação**		**Total**
	Não	**Sim**	
Cotinina negativa *(Concentração < LD)*	167	5	172 (66,4%)
Cotinina positiva *(Concentração ≥ LD)*	5	82	87 (33,6%)
Total	172 (66,4%)	87 (33,6%)	259

Consumo de cigarro na gestação: consumo referido pelas gestantes de qualquer quantidade de cigarro durante o período gestacional de 1 a 25 semanas.

Com relação aos resultados discordantes, 55 (21,24%) casos foram positivos para o relato das gestantes e negativo para a nicotina e 5 (1,93%) casos foram positivos para o relato das gestantes e negativos para a cotinina. As amostras de números 31, 35, 42, 84 e 86, da Tabela 21, são exemplos de amostras em que os valores desses analitos não foram detectáveis, apesar das gestantes terem relatado o consumo de cigarro durante a gravidez. Como a nicotina apresenta uma meia vida ($t_{1/2}$= 2 horas) menor que a cotinina ($t_{1/2}$= 16 horas), isso pode ter interferido nesses resultados, uma vez que é eliminada mais rapidamente do organismo, o que

também dificulta a detecção deste analito nas amostras de saliva. Além disso, a não detecção pode ter sido decorrente da variabilidade interindividual no metabolismo da nicotina devido às diferenças étnicas na atividade das enzimas (CYP2A6 e UGT1A) (STRAGIEROWICZ et al., 2013). Esses resultados também podem ter sido influenciados, pela alteração do metabolismo da nicotina durante a gravidez. Segundo Stragierowicz et al. (2013), a depuração metabólica da cotinina pode aumentar acentuadamente em 140% durante a gravidez, resultando em uma meia vida menor em quase 50% do que em uma mulher não grávida. Essa mudança do metabolismo pode ser explicada pela influência da maior concentração de estradiol durante a gravidez, o que induz a atividade do CYP2A6 que é responsável pelo metabolismo da nicotina, sendo assim, este analito também é eliminado do organismo de forma mais rápida (STRAGIEROWICZ et al., 2013). Rebagliato et al. (1998) relataram em sua pesquisa que o nível de cotinina salivar foi significativamente menor durante a gravidez quando comparado com o pós-parto ($p<0,001$).

Os valores também foram discordantes em 4 (1,54%) casos positivos para nicotina e negativo para o relato das gestantes, e em 5 (1,93%) casos positivos para cotinina e negativo para o autorrelato. As amostras de saliva que apresentaram estas discordâncias foram as de números 29, 45, 71, 80, 83, 91, 107 e 109, da Tabela 22. As gestantes das amostras de números 29, 45, 80, 107 e 109 relataram que nunca fumaram cigarro e que não foram expostas de forma passiva em casa ou no trabalho. A gestante da amostra número 91 informou que é ex-fumante há sete anos e que também não sofreu exposição passiva em casa ou no trabalho. Porém, pode ser que estas gestantes, tenham sido expostas de forma passiva à fumaça do cigarro em outro ambiente que não foi relatado ou podem ter omitido o consumo deste. Já as gestantes das amostras números 71 e 83 informaram que foram expostas de forma passiva à fumaça do cigarro no local de trabalho e em casa, respectivamente, e podem também terem omitido o consumo deste.

As amostras dos casos discordantes citadas acima (números: 31, 35, 42, 84 e 86 – Tabela 21; e 29, 45, 71, 80, 83, 91, 107 e 109 – Tabela 22) foram analisadas duas vezes para a confirmação dos resultados.

Nas Figuras 22 e 23 estão ilustrados os cromatogramas da amostra número 23 (positiva) e da amostra número 01 (negativa), respectivamente.

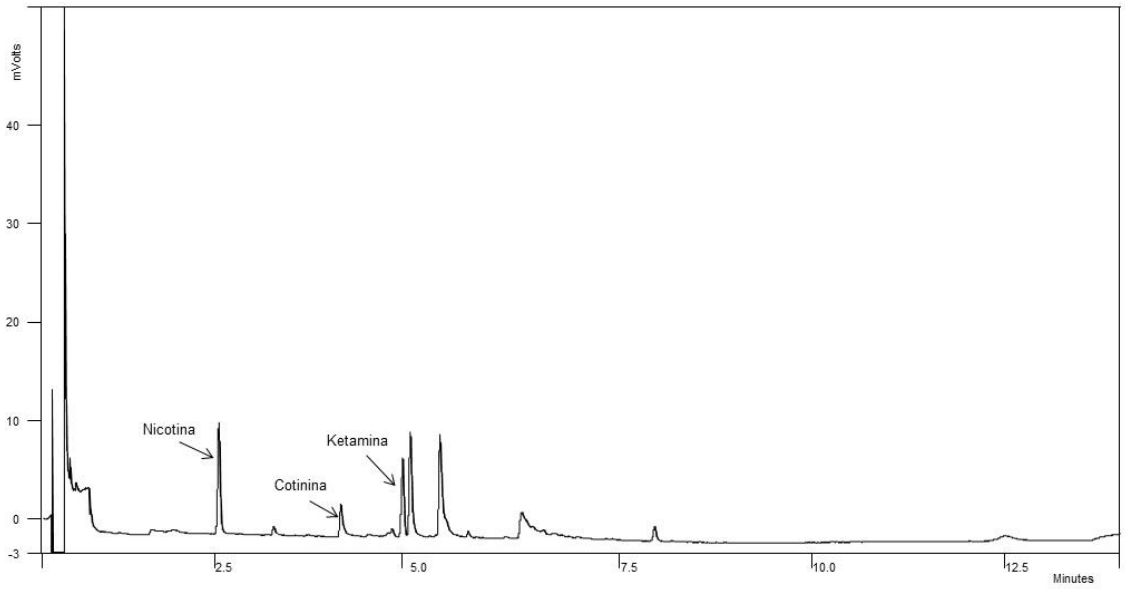

Figura 22. Cromatograma da amostra número 23, da segunda avaliação, positiva para nicotina e cotinina e fortificada com 300 ng do padrão interno ketamina.

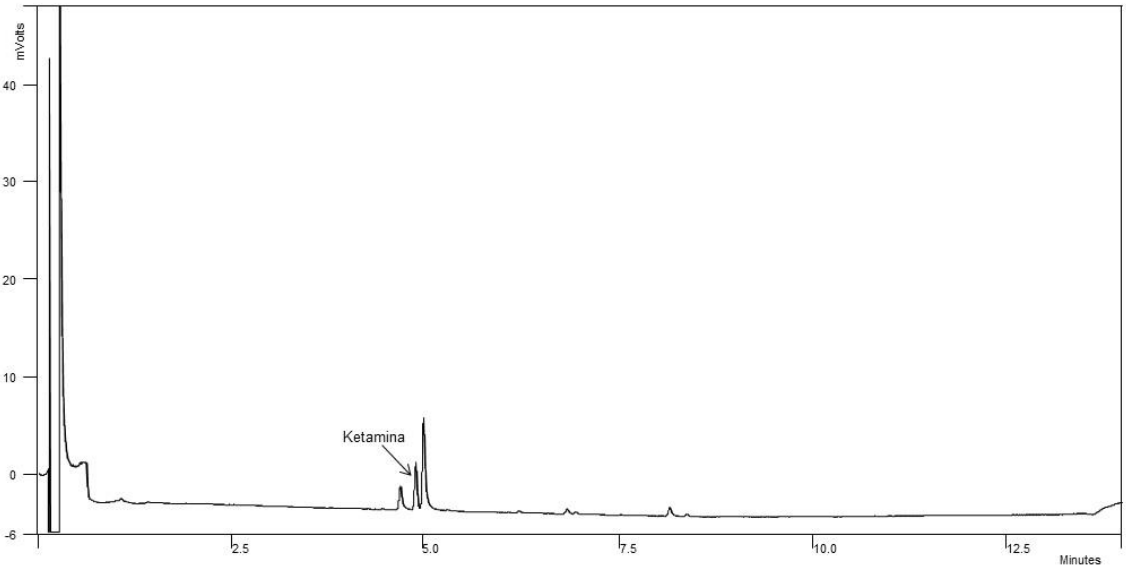

Figura 23. Cromatograma da amostra número 01, negativa para nicotina e cotinina e fortificada com 300 ng do padrão interno ketamina.

6.3.1 Análises estatísticas

Na análise inferencial foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, em que comparou a concentração de nicotina e cotinina entre o grupo de gestantes fumantes (n=87) e de não fumantes (n=172), na primeira avaliação (n=259). Houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações de nicotina e cotinina ($p<0,001$) nas amostras de saliva entre os grupos de gestantes fumantes e não

fumantes (Tabela 17). No trabalho realizado por Babhadiashar et al. (2014) também foi encontrado diferença estatisticamente significativa (p<0,001) para as concentrações de cotinina nas amostras de urina entre os grupos de indivíduos fumantes e não fumantes.

Tabela 17. Comparação das concentrações de nicotina e cotinina na saliva entre o grupo de gestantes fumantes e não fumantes.

Analitos (ng/mL)	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Análise Inferencial U	p
Nicotina	87 (F)	34,40	71,32	0,00	0,00	383,80	4856,0	<0,001
	172 (NF)	0,59	3,94	0,00	0,00	34,00		
Cotinina	87 (F)	160,99	122,88	141,2	0,00	802,00	473,50	<0,001
	172 (NF)	1,147	9,89	0,00	0,00	125,20		

F: fumante, NF: não fumante.

O teste de Spearman foi estatisticamente significativo e apresentou maior correlação das concentrações de cotinina com o número de cigarros consumidos por dia pelas gestantes fumantes na primeira avaliação (rho=0,486 e p<0,001). Já para a nicotina, essa correlação foi menor (rho=0,179) e não foi estatisticamente significativa (p=0,099).

Na Tabela 18 estão apresentados os valores de rho e p obtidos na correlação das concentrações dos analitos com o número total de cigarros fumados por dia pelas gestantes fumantes na primeira avaliação.

Tabela 18. Correlação das concentrações dos analitos com o número de cigarros fumados por dia pelas gestantes fumantes.

Concentração dos analitos (ng/mL)	Correlação	Número de cigarros por dia
Nicotina	Rho	0,179
	p	0,099
Cotinina	Rho	0,486
	p	<0,001

Babhadiashar et al. (2014) também realizaram esse teste e não encontraram correlação significativa entre as concentrações de cotinina nas amostras de urina e o número médio de cigarros consumidos (rho=0,061).

No teste de Wilcoxon foram comparados o número de cigarros consumidos diariamente e as concentrações de nicotina e cotinina, entre a primeira e segunda avaliação das gestantes fumantes (n=45). Na Tabela 19 pode-se observar que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para essas variáveis: número de cigarros consumidos por dia (p=0,255), concentrações de nicotina (p=0,949) e cotinina (p=0,665).

Tabela 19. Comparação do número de cigarros consumidos por dia e das concentrações de nicotina e cotinina entre a primeira e a segunda avaliação.

Variáveis	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p
Nº de cigarros primeira avaliação (por dia)	11,36	10,36	9,00	1,00	60,00	0,255
Nº de cigarros segunda avaliação (por dia)	9,16	8,69	5,00	0,00	30,00	
Concentração de nicotina (ng/mL) – Primeira avaliação	127,73	89,40	69,00	29,00	383,80	0,949
Concentração de nicotina (ng/mL) – Segunda avaliação	195,67	287,37	60,40	24,30	1873,60	
Concentração de cotinina (ng/mL) – Primeira avaliação	165,72	100,15	142,00	28,60	442,40	0,665
Concentração de cotinina (ng/mL) – Segunda avaliação	190,68	214,74	150,60	15,40	1372,60	

A ausência de diferença estatisticamente significativa para o número de cigarros consumidos diariamente e as concentrações dos analitos nas amostras de saliva das gestantes fumantes, entre a primeira e a segunda avaliação, pode ser atribuída devido à diversidade do comportamento do consumo de cigarro após a intervenção, visto que 28,89% das gestantes aumentaram o consumo de cigarros da primeira avaliação (n=13; M=10; DP±5,84) para a segunda (n=13; M=20; DP±7,70)

(FIGURA 24), 20,0% mantiveram o mesmo consumo (n=9; M=10; DP=8,23) (FIGURA 25), 42,22% diminuíram da primeira (n=19; M=10; DP±13,55) para a segunda avaliação (n=19; M=4; DP±4,29) (FIGURA 26) e 8,89% pararam de fumar (n= 4).

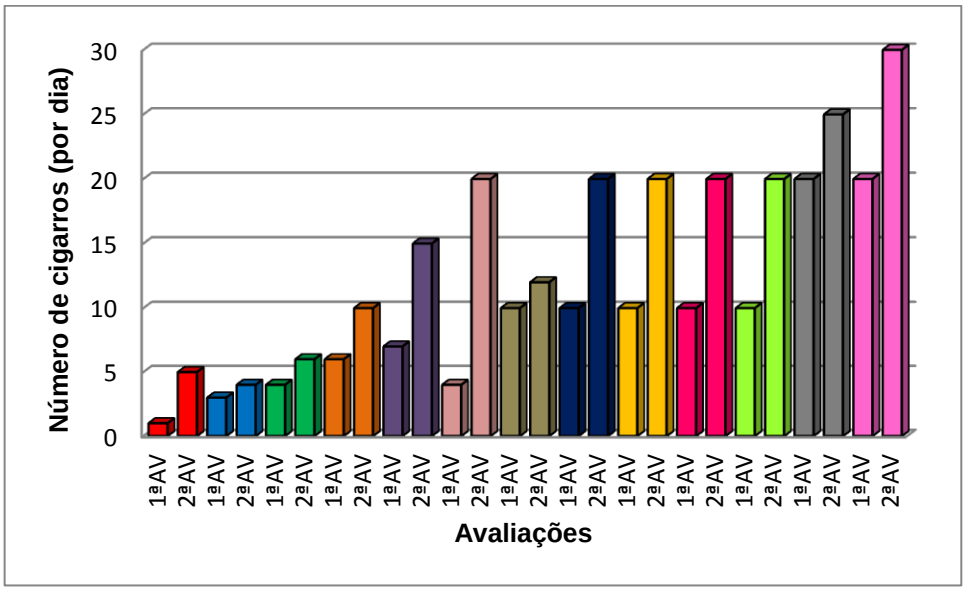

Figura 24. Aumento do número de cigarros consumidos, da primeira para a segunda avaliação, segundo o autorrelato das gestantes.

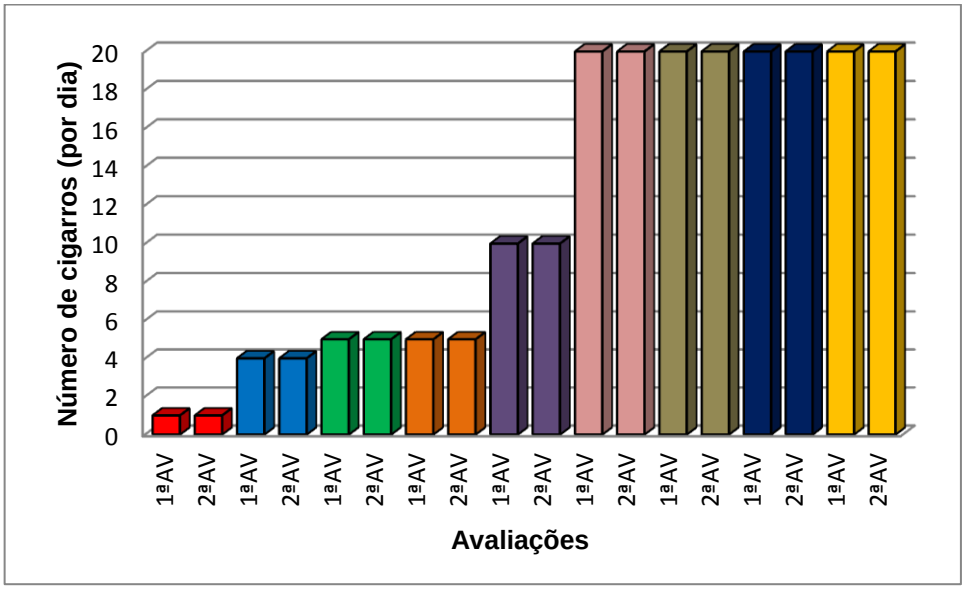

Figura 25. Gestantes que relataram manter o número de cigarros consumidos por dia da primeira para a segunda avaliação.

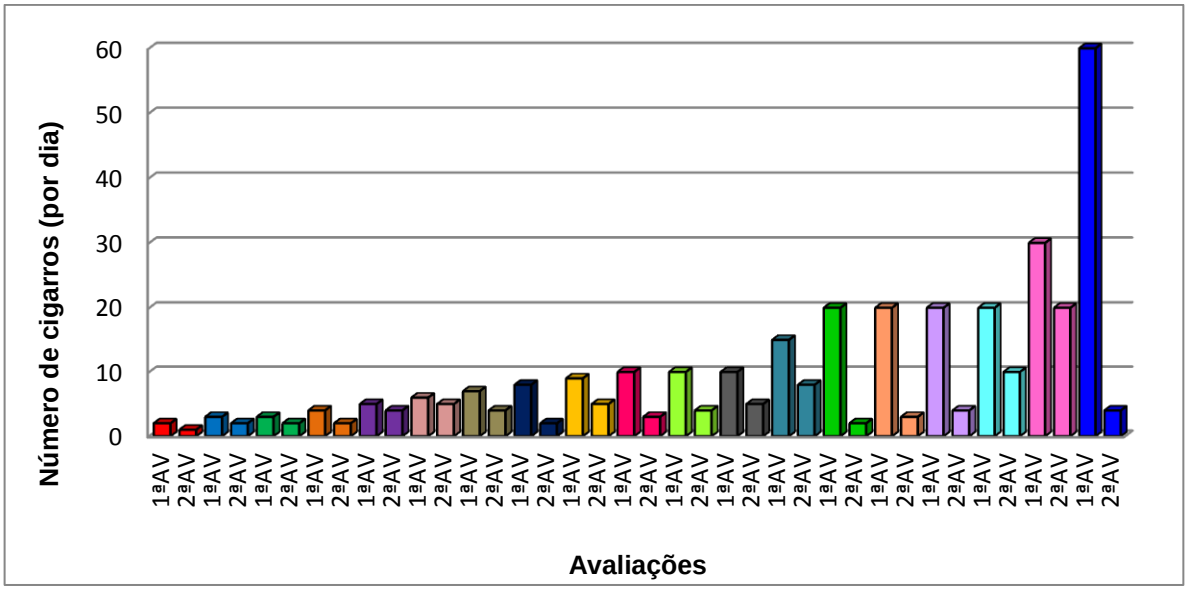

Figura 26. Diminuição do número de cigarros consumidos por dia, da primeira para a segunda avaliação, segundo o autorelato das gestantes.

Um fator que pode ter influenciado na concentração dos biomarcadores na saliva das gestantes fumantes foi o não controle do horário em que a gestante fumou o último cigarro antes da coleta da amostra, uma vez que após determinado tempo de exposição a concentração dos analitos diminui, principalmente da nicotina ($t_{1/2}$= 2 horas) que apresenta meia vida mais curta em relação à cotinina ($t_{1/2}$= 16 horas). Além disso, o metabolismo da nicotina também pode interferir nesses resultados, como discutido anteriormente.

Outro fator que pode influenciar nas concentrações desses analitos é a quantidade variável de nicotina entre as marcas de cigarro. Neste estudo, não foi coletado este dado.

Todos esses fatores podem ter influenciado nos resultados de concentração de nicotina e cotinina nas amostras de salivas das gestantes fumantes e, consequentemente, obteve-se ausência de resultados significativos nos testes de correlação de Spearman para nicotina e na comparação entre a primeira e segunda avaliação pelo teste de Wilcoxon.

6.3.2 Análises estatísticas adicionais

Através da curva ROC foi avaliado o desempenho das medidas de nicotina e cotinina em identificar os casos positivos, levando em consideração as concentrações desses analitos na saliva das gestantes fumantes e não fumantes.

Também foi determinado a AUC e o ponto de corte da concentração dos analitos para positividade dos casos. A sensibilidade e a especificidade do método foram calculadas a partir desse ponto de corte, assim como os valores preditivos, positivo e negativo, do teste. Os resultados dessa avaliação estão descritos na Tabela 20 e na Figura 27.

Tabela 20. Parâmetros da avaliação da eficácia do método de análise de nicotina e cotinina em amostra de saliva diante da exposição à fumaça do cigarro.

Parâmetros	Nicotina	Cotinina
Sensibilidade (%)	36,8	94,3
Especificidade (%)	97,7	98,8
Ponto de corte (ng/mL)	>0	>17,2
Valor preditivo positivo	88,9	97,6
Valor preditivo negativo	75,3	97,1
AUC	0,675	0,968
p	<0,001	<0,001

AUC= área sob a curva; p= nível de significância.

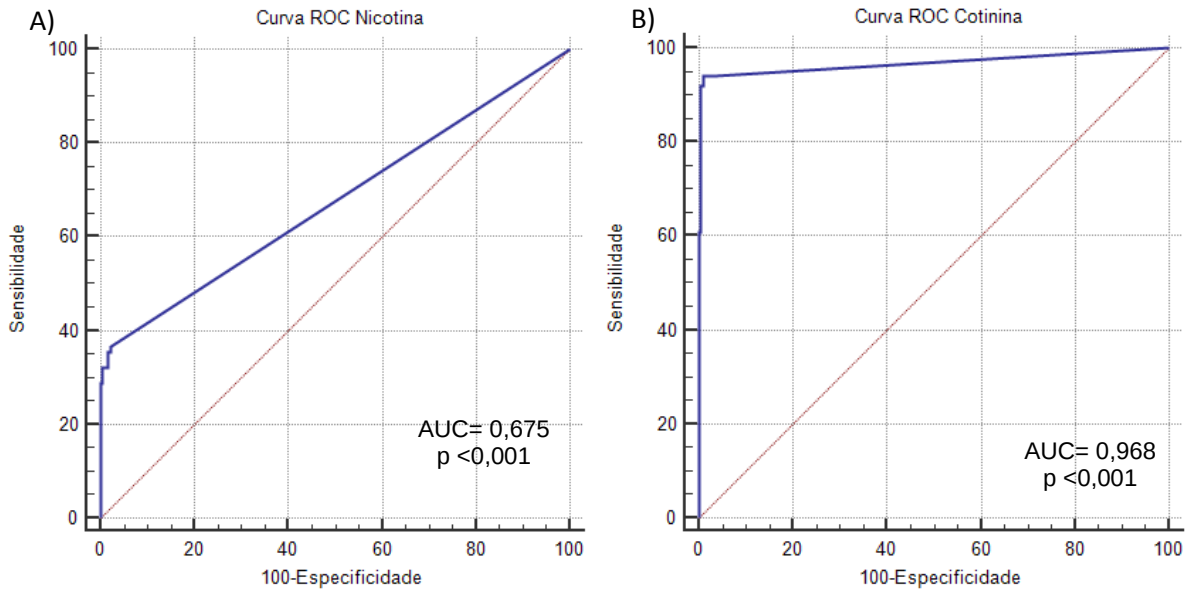

Figura 27. Curva ROC e sua respectiva área sob a curva (AUC) para análise da nicotina (A) e da cotinina (B) em relação a exposição à fumaça do cigarro.

A área sob a curva para a nicotina foi de 0,675 e para a cotinina foi de 0,968, sendo mais próximo de 1 e maior a capacidade do teste de diferenciar os indivíduos que foram expostos (gestantes fumantes) dos que não foram expostos (gestantes

não fumantes). A cotinina também apresentou melhores valores de sensibilidade (94,3%) e de especificidade (98,8%). Como explicado anteriormente, a meia vida da nicotina pode ter interferido nesses resultados. Consequentemente, pode-se dizer que a cotinina é melhor biomarcador de exposição à fumaça do cigarro do que a nicotina. Este pode ser um dos motivos em que alguns pesquisadores quantificam em amostras biológicas somente a cotinina.

O ponto de corte da nicotina foi maior que zero e para a cotinina foi maior que 17,2 ng/mL. Na literatura há várias pesquisas sobre o ponto de corte para a cotinina, mas apenas algumas incluem as gestantes, como na pesquisa desenvolvida por Stragierowicz et al. (2013) em que o valor encontrado foi relativamente próximo ao do presente estudo, sendo este de 18,8 ng/mL de saliva (sensibilidade=98,3%, especificidade=89,6%), ao combinar todos os períodos gestacionais (primeiro, segundo e terceiro trimestre). A proximidade desse ponto de corte da cotinina pode ser explicada devido ao fato de ambos os estudos conterem amostras de maiores períodos gestacionais.

No estudo realizado por Hegaard et al. (2007) também foi utilizado a amostra de saliva de gestantes fumantes e não fumantes, o ponto de corte encontrado para a cotinina foi de 13 ng/mL de saliva (sensibilidade=99%, especificidade=98%), sendo inferior ao deste estudo. Porém, na pesquisa realizada por Stragierowicz et al. (2013) foi verificado que o ponto de corte varia de acordo com o período gestacional, uma vez que o valor encontrado no primeiro trimestre foi de 31,9 ng/mL, no segundo de 18,1 ng/mL e no terceiro de 11,47 ng/mL, com sensibilidade de 100% e especificidade de 96% para todos estes testes. Como o período gestacional não foi relato por Hegaard et al. (2007), caso não seja semelhante ao do presente estudo, isso pode explicar a diferença entre os pontos de corte encontrados.

Na pesquisa realizada por Etter, Duc e Perneger (2000), com amostras de saliva de indivíduos fumantes e não fumantes, o ponto de corte também foi inferior ao deste estudo, sendo valor de 7 ng/mL de saliva. Durante a gravidez há um aumento do volume de sangue (30 a 40%), do volume de distribuição e da taxa de metabolismo da nicotina. Essas são as prováveis razões pelas quais os pontos de corte para a cotinina na saliva, de acordo com o período gestacional, diferem daqueles estabelecidos para a população em geral.

7 CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB, P. Nicotine, chemistry, 66ublicações, kinetics and biomarkers. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 192, p. 29 – 60, 2009.

BENOWITZ, N. L.; SWAN, G. E.; JACOB III,, P.; LESSOV-SCHLAGGAR, C. N.; TYNDALE, R. F. CUP2A6 genotype and the metabolism and disposition kinetics of nicotine. **Clinical pharmacology and therapeutics**. United States. v. 80, n. 5, p. 457 – 467, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FOWLER, C. D.; LU, Q.; JOHNSON, P. M.; MARKS, M. J.; KENNY, P. J. Habenular α5 nicotinic receptor subunit signaling controls nicotine intake. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 597 – 601, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pesquisa Nacional por amostra de Domicílios. **Tabagismo**. 2008. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/71ublicações/tabagismo.pdf >. Acesso em: Jan. 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE A

Tabela 21. Respostas dadas pelas 87 gestantes que relataram o uso de cigarro durante a gravidez e as concentrações para nicotina e cotinina.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO			EXPOSIÇÃO PASSIVA			TESTE DE DEPENDÊNCIA À NICOTINA DE FAGERSTRÖM		ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Tempo Fumo cigarros (ANOS)**	**Cigarros (ao dia)**	**Em casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Pontos**	**Grau de dependência**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
1 - 1ªAV	17 semanas e 15 dias	Fumante regular	14	20	Nunca	Não trabalha	NA	8	Muito elevado	77,8	158
1 - 2ªAV	38 semanas	Fumante regular	14	20	-	-	-	-	-	24,3	1372,6
2 - 1ªAV	14 semanas e 3 dias	Fumante regular	10	5	Nunca	Não trabalha	NA	5	Médio	ND	50,6
2 - 2ªAV	36 semanas e 6 dias	Ex-fumante	10	0	-	-	-	-	-	ND	ND
3 - 1ªAV	13 semanas e 1 dia	Fumante regular	17	1	Nunca	Não trabalha	NA	5	Médio	60,2	313,2
3 - 2ªAV	23 dias após o parto	Fumante regular	17	5	-	-	-	-	-	42	226
4- 1ªAV	21 semanas e 4 dias	Fumante regular	7	20	Diariamente	Não trabalha	NA	6	Elevado	317,4	249,4
4 - 2ªAV	36 semanas e 6 dias	Fumante regular	7	2	-	-	-	-	-	64	127,8
5 - 1ªAV	13 semanas e 6 dias	Fumante regular	10	10	Diariamente	Fechado	Não	3	Baixo	ND	151,3
5 - 2ªAV	9 dias após o parto	Fumante regular	10	12	-	-	-	-	-	ND	91,2
6 - 1ªAV	22 semanas e 4 dias	Fumante regular	11	20	Diariamente	Não trabalha	NA	7	Elevado	59,2	221,8
6 - 2ªAV	36 semanas	Fumante regular	11	4	-	-	-	-	-	ND	64,2
7 - 1ªAV	24 semanas e 3 dias	Fumante regular	18	20	Nunca	Aberto e fechado	Não	7	Elevado	ND	229,1
7 - 2ªAV	43 dias após o parto	Fumante regular	18	30	-	-	-	-	-	67,8	494
8 - 1ªAV	18 semanas e 6 dias	Fumante regular	16	6	Diariamente	Fechado	Não	2	Muito baixo	29	153,8
8 - 2ªAV	37 semanas e 1 dia	Fumante regular	16	5	-	-	-	-	-	48,6	226,8

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NA: não se aplica; - : ausência de dados; ND: não detectado.

Continuação Tabela 21.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO			EXPOSIÇÃO PASSIVA			TESTE DE DEPENDÊNCIA À NICOTINA DE FAGERSTRÖM		ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Tempo Fumo cigarros (Anos)**	**Cigarros (ao dia)**	**Em casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Pontos**	**Grau de dependência**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
9 - 1ªAV	19 semanas	Fumante regular	20	8	Diariamente	Não trabalha	NA	4	Baixo	ND	304
9 - 2ªAV	26 dias após o parto	Fumante regular	20	2	-	-	-	-	-	ND	178,4
10 - 1ªAV	19 semanas	Fumante regular	16	6	Nunca	Não trabalha	NA	1	Muito baixo	ND	42,4
10 - 2ªAV	38 semanas e 4 dias	Ex-fumante	16	0	-	-	-	-	-	ND	15,4
11 - 1ªAV	11 semanas e 2 dias	Fumante regular	4	20	Nunca	Fechado	Não	6	Elevado	43,2	80,8
11 - 2ªAV	4 dias após o parto	Fumante regular	4	3	-	-	-	-	-	34,2	98,4
12 - 1ªAV	18 semanas e 3 dias	Fumante regular	13	20	Nunca	Aberto e fechado	Sim	6	Elevado	84,4	286,2
12 - 2ªAV	37 semanas e 4 dias	Fumante regular	13	10	-	-	-	-	-	30,4	110,8
13 - 1ªAV	11 semanas e 1 dia	Fumante regular	17	10	Diariamente	Não trabalha	NA	1	Muito baixo	177,2	263,8
13 - 2ªAV	36 semanas	Fumante regular	17	20	-	-	-	-	-	ND	41,2
14 - 1ªAV	9 semanas	Fumante regular	13	9	Diariamente	Fechado	Não	3	Baixo	ND	162
14 - 2ªAV	38 semanas	Fumante regular	13	5	-	-	-			147	249,6
15 - 1ªAV	9 semanas e 4 dias	Fumante regular	8	2	Nunca	Fechado	Não	0	Muito baixo	ND	67,6
15 - 2ªAV	38 semanas	Fumante regular	8	1	-	-	-	-	-	ND	170
16 - 1ªAV	8 semanas e 1 dia	Fumante regular	11	7	Diariamente	Não trabalha	NA	5	Médio	ND	43
16 - 2ªAV	4 dias após o parto	Ex-fumante	11	0	-	-	-	-	-	ND	18,6
17 - 1ªAV	19 semanas	Fumante regular	5	4	Diariamente	Aberto e fechado	Não	4	Baixo	ND	132,8
17 - 2ªAV	48 dias após o parto	Fumante regular	5	2	-	-	-	-	-	ND	272,2

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NA: não se aplica; - : ausência de dados; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 21.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO			EXPOSIÇÃO PASSIVA			TESTE DE DEPENDÊNCIA À NICOTINA DE FAGERSTRÖM		ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Tempo Fumo cigarros (Anos)**	**Cigarros (ao dia)**	**Em casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Pontos**	**Grau de dependência**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
18 - 1ªAV	8 semanas e 6 dias	Fumante regular	5	5	Diariamente	Não trabalha	NA	3	Baixo	ND	127,2
18 - 2ªAV	37 semanas e 4 dias	Fumante regular	5	5	-	-	-	-	-	ND	43,8
19 - 1ªAV	10 semanas e 1 dia	Fumante regular	25	1	Nunca	Não trabalha	NA	0	Muito baixo	ND	31,6
19 - 2ªAV	36 semanas e 5 dias	Ex-fumante	25	0	-	-	-	-	-	ND	ND
20 - 1ªAV	8 semanas	Fumante regular	7	10	Nunca	Fechado	Não	7	Elevado	55,8	257,4
20 - 2ªAV	37 semanas e 3 dias	Fumante regular	7	3	-	-	-	-	-	ND	97,2
21 - 1ªAV	22 semanas e 1 dia	Fumante regular	19	10	Nunca	Fechado	Não	5	Médio	ND	110
21 - 2ªAV	30 dias após o parto	Fumante regular	19	20	-	-	-	-	-	59,8	150,6
22 - 1ªAV	10 semanas e 5 dias	Fumante regular	17	4	Diariamente	Aberto e fechado	Não	4	Baixo	ND	137,4
22 - 2ªAV	39 semanas	Fumante regular	17	20	-	-	-	-	-	33,4	241,4
23 - 1ªAV	16 semanas e 3 dias	Fumante regular	16	20	Nunca	Não trabalha	NA	7	Elevado	57,4	86,5
23 - 2ªAV	16 dias após o parto	Fumante regular	16	20				-	-	1873,6	251,8
24 - 1ªAV	22 semanas e 1 dia	Fumante regular	10	10	Diariamente	Não trabalha	NA	5	Médio	43,8	84,6
24 - 2ªAV	37 semanas	Fumante regular	10	4	-	-	-	-	-	ND	59,8
25 - 1ªAV	11 semanas e 2 dias	Fumante regular	8	10	Diariamente	Não trabalha	NA	5	Médio	ND	133,4
25 - 2ªAV	37 semanas	Fumante regular	8	5	-	-	-	-	-	150,6	131,4

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NA: não se aplica; - : ausência de dados; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 21.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO			EXPOSIÇÃO PASSIVA			TESTE DE DEPENDÊNCIA À NICOTINA DE FAGERSTRÖM		ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Tempo Fumo cigarros (Anos)**	**Cigarros (ao dia)**	**Em casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Pontos**	**Grau de dependência**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
26 - 1ªAV	12 semanas e 2 dias	Fumante regular	10	7	Diariamente	Não trabalha	NA	7	Elevado	ND	195,8
26 - 2ªAV	12 dias após o parto	Fumante regular	10	4	-	-	-	-	-	439,4	432
27 - 1ªAV	19 semanas e 1 dia	Fumante regular	8	7	Diariamente	Fechado	Não	5	Médio	ND	142
27 - 2ªAV	113 dias após o parto	Fumante regular	8	15	-	-	-	-	-	37	411,2
28 - 1ªAV	15 semanas	Fumante regular	13	30	Diariamente	Não trabalha	NA	8	Muito elevado	ND	261,6
28 - 2ªAV	38 semanas e 1 dia	Fumante regular	13	20	-	-	-	-	-	ND	200
29 - 1ªAV	23 semanas e 5 dias	Fumante regular	10	6	Nunca	Fechado	Não	6	Elevado	ND	137,6
29 - 2ªAV	38 semanas	Fumante regular	10	10	-	-	-	-	-	386,2	265,6
30 - 1ªAV	8 semanas e 2 dias	Fumante regular	23	10	Diariamente	Não trabalha	NA	2	Muito baixo	ND	322,6
30 - 2ªAV	40 semanas	Fumante regular	23	10	-	-	-	-	-	113,8	95,2
31 - 1ªAV	20 semanas e 1 dia	Fumante regular	6 meses	1	Diariamente	Não trabalha	NA	4	Elevado	ND	ND
31 - 2ªAV	38 semanas e 2 dias	Fumante regular	10 meses	1	-	-	-	-	-	ND	ND
32 - 1ªAV	15 semanas e 4 dias	Fumante regular	11	4	Diariamente	Não trabalha	NA	3	Baixo	ND	115,4
32 - 2ªAV	39 semanas e 2 dias	Fumante regular	11	4	-	-	-	-	-	41,4	197,4
33 - 1ªAV	14 semanas	Fumante regular	11	20	Diariamente	Aberto e fechado	Não	7	Elevado	ND	92,6
33 - 2ªAV	37 semanas	Fumante regular	11	30	-	-	-	-	-	ND	196,6

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NA: não se aplica; - : ausência de dados; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 21.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO			EXPOSIÇÃO PASSIVA			TESTE DE DEPENDÊNCIA À NICOTINA DE FAGERSTRÖM		ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Tempo Fumo cigarros (Anos)**	**Cigarros (ao dia)**	**Em casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Pontos**	**Grau de dependência**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
34 - 1ªAV	14 semanas	Fumante regular	8	4	Nunca	Não trabalha	NA	6	Elevado	ND	163,4
34 - 2ªAV	42 dias após o parto	Fumante regular	8	6	-	-	-	-	-	ND	152
35 - 1ªAV	18 semanas	Fumante regular	10	3	Nunca	Aberto e fechado	Não	3	Baixo	ND	ND
35 - 2ªAV	15 dias após o parto	Fumante regular	10	2	-	-	-	-	-	ND	61,2
36 - 1ªAV	12 semanas e 6 dias	Fumante regular	8	3	Nunca	Fechado	Não	6	Elevado	ND	57,6
36 - 2ªAV	36 semanas e 1 dia	Fumante regular	8	2	-	-	-	-	-	ND	31,2
37 - 1ªAV	24 semanas e 6 dias	Fumante regular	15	5	Nunca	Não trabalha	NA	5	Médio	112,6	280
37 - 2ªAV	9 dias após o parto	Fumante regular	15	5	-	-	-	-	-	60,4	171,8
38 - 1ªAV	22 semanas	Fumante regular	12	20	Nunca	Fechado	Não	5	Médio	ND	104,4
38 - 2ªAV	36 semanas	Fumante regular	12	20	-	-	-	-	-	ND	96
39 - 1ªAV	17 semanas	Fumante regular	13	20	Nunca	Aberto e fechado	Não	7	Elevado	ND	285,6
39 - 2ªAV	37 semanas	Fumante regular	13	20	-	-	-	-	-	ND	164,4
40 - 1ªAV	6 semanas e 7 dias	Fumante regular	6	3	Nunca	Não trabalha	NA	2	Muito baixo	56,6	77,8
40 - 2ªAV	36 semanas	Fumante regular	6	4	-	-	-	-	-	ND	109
41 - 1ªAV	17 semanas e 6 dias	Fumante regular	4	15	Diariamente	Não trabalha	NA	5	Médio	ND	128,8
41 - 2ªAV	38 semanas	Fumante regular	4	8	-	-	-	-	-	ND	122,2

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NA: não se aplica; - : ausência de dados; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 21.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO			EXPOSIÇÃO PASSIVA			TESTE DE DEPENDÊNCIA À NICOTINA DE FAGERSTRÖM		ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Tempo Fumo cigarros (Anos)**	**Cigarros (ao dia)**	**Em casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Pontos**	**Grau de dependência**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
42 - 1ªAV	23 semanas	Fumante regular	5	5	Diariamente	Não trabalha	NA	5	Médio	ND	28,6
42 - 2ªAV	37 semanas e 5 dias	Fumante regular	5	4	-	-	-	-	-	ND	ND
43 - 1ªAV	25 semanas	Fumante regular	7	10	Nunca	Não trabalha	NA	6	Elevado	234,6	144,4
43 - 2ªAV	36 semanas e 4 dias	Fumante regular	7	20	-	-	-	-	-	ND	111,4
44 - 1ªAV	9 semanas e 6 dias	Fumante regular	17	60	Nunca	Não trabalha	NA	10	Muito elevado	383,8	267,6
44 - 2ªAV	10 dias após o parto	Fumante regular	17	4	-	-	-	-	-	63,8	198,8
45 - 1ªAV	24 semanas	Fumante regular	15	20	Nunca	Não trabalha	NA	5	Médio	250,6	442,4
45 - 2ªAV	35 semanas e 6 dias	Fumante regular	15	25	-	-	-	-	-	ND	68,6
46 - 1ªAV	13 semanas e 3 dias	Fumante regular	15	10	Nunca	Não trabalha	NA	6	Elevado	90	162
47 - 1ªAV	9 semanas e 4 dias	Fumante regular	14	2	Diariamente	Fechado	Sim	4	Baixo	40,2	430
48 - 1ªAV	18 semanas e 4 dias	Fumante regular	14	20	Diariamente	Aberto	Sim	8	Muito elevado	38,8	193,6
49 - 1ªAV	4 semanas e 3 dias	Fumante regular	14	3	Nunca	Fechado	Não	7	Elevado	ND	202,8
50 - 1ªAV	16 semanas e 6 dias	Fumante regular	23	40	Nunca	Fechado	Sim	8	Muito elevado	30,2	302,6
51 - 1ªAV	12 semanas e 5 dias	Fumante regular	5	3	Diariamente	Não trabalha	NA	1	Muito baixo	ND	38,6
52 - 1ªAV	20 semanas e 1 dia	Fumante regular	16	2	Diariamente	Fechado	Não	4	Baixo	15,2	18,2

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NA: não se aplica; - : ausência de dados; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 21.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO			EXPOSIÇÃO PASSIVA			TESTE DE DEPENDÊNCIA À NICOTINA DE FAGERSTRÖM		ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Tempo Fumo cigarros (Anos)**	**Cigarros (ao dia)**	**Em casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Pontos**	**Grau de dependência**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
53 - 1ªAV	16 semanas e 7 dias	Fumante regular	7	2	Diariamente	Aberto	Não	4	Baixo	ND	150,4
54 - 1ªAV	7 semanas e 2 dias	Fumante regular	13	10	Diariamente	Fechado	Não	5	Médio	18,4	141,2
55 - 1ªAV	9 semanas e 6 dias	Fumante regular	10	6	Diariamente	Fechado	Nâo	6	Elevado	ND	282,4
56 - 1ªAV	9 semanas e 1 dia	Fumante regular	22	20	Diariamente	Não trabalha	NA	6	Elevado	ND	210
57 - 1ªAV	19 semanas	Fumante regular	9	7	Diariamente	Não trabalha	NA	3	Baixo	116,8	130,6
58 - 1ªAV	6 semanas e 6 dias	Fumante regular	5	10	Diariamente	Não trabalha	NA	5	Médio	20,6	315
59 - 1ªAV	11 semanas e 4 dias	Fumante regular	5	3	Diariamente	Não trabalha	NA	3	Baixo	ND	117,8
60 - 1ªAV	8 semanas e 6 dias	Fumante regular	13	12	Diariamente	Aberto	Sim	5	Médio	ND	134
61 - 1ªAV	23 semanas e 5 dias	Fumante regular	7	10	Diariamente	Não trabalha	NA	6	Elevado	ND	64
62 - 1ªAV	15 semanas e 4 dias	Fumante regular	16	20	Nunca	Aberto e fechado	Não	3	Baixo	ND	241,5
63 - 1ªAV	21 semanas e 5 dias	Fumante regular	16	20	Nunca	Aberto	Não sabe	7	Elevado	ND	151,2
64 - 1ªAV	25 semanas e 4 dias	Fumante regular	14	3	Diariamente	Não trabalha	NA	1	Muito baixo	19	98,4
65 - 1ªAV	19 semanas e 6 dias	Fumante regular	12	10	Nunca	Não trabalha	NA	5	Médio	ND	260
66 - 1ªAV	24 semanas e 1 dia	Fumante regular	7	4	Diariamente	Não trabalha	NA	6	Elevado	30,8	244,6

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NA: não se aplica; - : ausência de dados; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 21.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO			EXPOSIÇÃO PASSIVA			TESTE DE DEPENDÊNCIA À NICOTINA DE FAGERSTRÖM		ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Tempo Fumo cigarros (Anos)**	**Cigarros (ao dia)**	**Em casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Pontos**	**Grau de dependência**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
67 - 1ªAV	18 semanas e 5 dias	Fumante regular	4	0,5	Diariamente	Não trabalha	NA	0	Muito baixo	77,6	ND
68 - 1ªAV	9 semanas	Fumante regular	10	1	Nunca	Aberto e fechado	Não	0	Baixo	68,8	27,4
69 - 1ªAV	17 semanas e 5 dias	Fumante regular	13	6	Nunca	Fechado	Não	3	Baixo	60,4	165,4
70 - 1ªAV	15 semanas e 5 dias	Fumante regular	13	20	Diariamente	Não trabalha	NA	4	Baixo	ND	285
71 - 1ªAV	24 semanas e 1 dia	Fumante regular	4	7	Nunca	Não trabalha	NA	4	Baixo	ND	26
72 - 1ªAV	16 semanas	Fumante regular	13	20	Diariamente	Não trabalha	NA	7	Elevado	ND	158,4
73 - 1ªAV	19 semanas	Fumante regular	14	20	Nunca	Não trabalha	NA	7	Elevado	39,8	204
74 - 1ªAV	25 dias e 5 dias	Fumante regular	12	3	Diariamente	Aberto e fechado	Não	0	Muito baixo	ND	133,4
75 - 1ªAV	8 semanas	Fumante regular	10	3	Nunca	Não trabalha	NA	5	Médio	ND	264,6
76 - 1ªAV	12 semanas e 6 dias	Fumante regular	33	10	Diariamente	Não trabalha	NA	7	Elevado	ND	802
77 - 1ªAV	18 semanas e 5 dias	Fumante regular	24	10	Diariamente	Não trabalha	NA	7	Elevado	ND	93,4
78 - 1ªAV	15 semanas e 2 dias	Fumante regular	13	15	Diariamente	Fechado	Sim	4	Baixo	ND	58
79 - 1ªAV	16 semanas e 4 dias	Fumante regular	11	4	Semanalmente	Não trabalha	NA	0	Muito baixo	ND	38,8
80 - 1ªAV	14 semanas e 5 dias	Fumante regular	16	20	Diariamente	Não trabalha	NA	7	Elevado	ND	256,2

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NA: não se aplica; - : ausência de dados; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 21.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO			EXPOSIÇÃO PASSIVA			TESTE DE DEPENDÊNCIA À NICOTINA DE FAGERSTRÖM		ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Tempo Fumo cigarros (Anos)**	**Cigarros (ao dia)**	**Em casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Pontos**	**Grau de dependência**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
81 - 1ªAV	13 semanas e 6 dias	Fumante regular	15	6	Nunca	Não trabalha	NA	5	Médio	ND	86
82 - 1ªAV	12 semanas	Fumante regular	18	1	Diariamente	Não trabalha	NA	1	Muito baixo	ND	18,8
83 - 1ªAV	16 semanas e 4 dias	Fumante regular	14	7	Diariamente	Não trabalha	NA	5	Médio	ND	84
84 - 1ªAV	12 semanas e 6 dias	Fumante de início recente	-	3 por semana	Nunca	Não trabalha	NA	-	-	ND	ND
85 - 1ªAV	10 semanas e 5 dias	Fumante de início recente	-	-	Nunca	Fechado	Não	-	-	218,4	45,4
86 - 1ªAV	18 semanas	Fumante de início recente	-	-	Nunca	Não trabalha	NA	-	-	ND	ND
87 - 1ªAV	23 semanas	Fumante regular	3	10	Diariamente	Fechado	Sim	6	Elevado	64,2	244,2

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NA: não se aplica; - : ausência de dados; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

APÊNDICE B

Tabela 22. Respostas dadas pelas 172 gestantes que relataram o não uso de cigarro durante a gestação e as concentrações de nicotina e cotinina.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO		EXPOSIÇÃO PASSIVA			ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	Período gestacional	Status tabágico	Cigarros (ao dia)	Fumo na casa	Local de trabalho	Fumo trabalho	Concentração NIC (ng/mL)	Concentração COT (ng/mL)
1 - 1ªAV	5 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
2 - 1ªAV	9 semanas	Ex-fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
3 - 1ªAV	19 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
4 - 1ªAV	9 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
5 - 1ªAV	11 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
6 - 1ªAV	18 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
7 - 1ªAV	20 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
8 - 1ªAV	18 semanas	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
9 - 1ªAV	14 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
10 - 1ªAV	14 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Fechado	Não	ND	ND
11 - 1ªAV	8 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
12 - 1ªAV	14 semanas e 6 dias	Ex-fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
13 - 1ªAV	24 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
14 - 1ªAV	20 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
15 - 1ªAV	14 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto	Não sabe	ND	ND
16 - 1ªAV	11 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
17 - 1ªAV	25 semanas e 3 dias	Ex-fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
18 - 1ªAV	13 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
19 - 1ªAV	12 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
20 - 1ªAV	15 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 22.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO		EXPOSIÇÃO PASSIVA			ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Cigarros (ao dia)**	**Fumo na casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
21 - 1ªAV	11 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
22 - 1ªAV	17 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
23 - 1ªAV	8 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Semanalmente	Fechado	Sim	ND	ND
24 - 1ªAV	23 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
25 - 1ªAV	19 semans e 1 dia	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
26 - 1ªAV	14 semanas e 1 dia	Ex-fumante	0	Diariamente	Fechado	Não	ND	ND
27 - 1ªAV	14 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
28 - 1ªAV	12 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
29 - 1ªAV	10 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Mensalmente	Fechado	Não	ND	17,2
30 - 1ªAV	7 semanas	Nunca fumante	0	Diariamente	Fechado	Não	ND	ND
31 - 1ªAV	13 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
32 - 1ªAV	17 semanas e 7 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
33 - 1ªAV	19 semanas e 6 dias	Ex-fumante	0	Diariamente	Fechado	Não	ND	ND
34 - 1ªAV	16 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
35 - 1ªAV	15 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
36 - 1ªAV	19 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
37 - 1ªAV	16 semanas	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
38 - 1ªAV	13 semanas e 6 dias	Ex-fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
39 - 1ªAV	10 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
40 - 1ªAV	16 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
41 - 1ªAV	16 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
42 - 1ªAV	10 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
43 - 1ªAV	11 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 22.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO		EXPOSIÇÃO PASSIVA			ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Cigarros (ao dia)**	**Fumo na casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
44 - 1ªAV	12 semanas e 3 dias	Ex fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
45 - 1ªAV	20 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	17,4	ND
46 - 1ªAV	10 semanas	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
47 - 1ªAV	10 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
48 - 1ªAV	19 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
49 - 1ªAV	8 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
50 - 1ªAV	10 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
51 - 1ªAV	14 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
52 - 1ªAV	14 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto	Não sabe	ND	ND
53 - 1ªAV	24 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
54 - 1ªAV	12 semanas	Ex-fumante	0	Nunca	Aberto e fechado	Sim	ND	ND
55 - 1ªAV	11 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto	Não sabe	ND	ND
56 - 1ªAV	12 semanas	Ex-fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
57 - 1ªAV	21 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Mensalmente	Fechado	Não	ND	ND
58 - 1ªAV	17 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Sim	ND	ND
59 - 1ªAV	18 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
60 - 1ªAV	23 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto	Sim	ND	ND
61 - 1ªAV	14 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
62 - 1ªAV	12 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
63 - 1ªAV	18 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
64 - 1ªAV	9 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 22.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO		EXPOSIÇÃO PASSIVA			ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Cigarros (ao dia)**	**Fumo na casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
65 - 1ªAV	11 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
66 - 1ªAV	17 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
67 - 1ªAV	21 semanas e 5 dias	Ex-fumante	0	Diariamente	Aberto e fechado	Não	ND	ND
68 - 1ªAV	9 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto e fechado	Não	ND	ND
69 - 1ªAV	6 semanas	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
70 - 1ªAV	13 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
71 - 1ªAV	17 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto e fechado	Sim	26,2	21
72 - 1ªAV	10 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Fechado	Não	ND	ND
73 - 1ªAV	9 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
74 - 1ªAV	11 semanas	Nunca fumante	0	Mensalmente	Fechado	Não	ND	ND
75 - 1ªAV	25 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
76 - 1ªAV	16 semanas e 1 dia	Ex-fumante	0	Nunca	Fechado	Sim	ND	ND
77 - 1ªAV	10 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
78 - 1ªAV	20 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
79 - 1ªAV	12 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
80 - 1ªAV	16 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto	Não sabe	ND	17,2
81 - 1ªAV	7 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
82 - 1ªAV	8 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
83 - 1ªAV	5 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Semanalmente	Não trabalha	NA	ND	16,6
84 - 1ªAV	9 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
85 - 1ªAV	15 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 22.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO		EXPOSIÇÃO PASSIVA			ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Cigarros (ao dia)**	**Fumo na casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
86 - 1ªAV	19 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
87 - 1ªAV	13 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
88 - 1ªAV	12 semanas e 4 dias	Ex-fumante	0	Nunca	Fechado	Sim	ND	ND
89 - 1ªAV	16 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto e fechado	Sim	ND	ND
90 - 1ªAV	20 semanas	Ex-fumante	0	Diariamente	Fechado	Não	ND	ND
91 - 1ªAV	13 semanas e 5 dias	Ex-fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	125,2
92 - 1ªAV	13 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
93 - 1ªAV	15 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
94 - 1ªAV	22 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
95 - 1ªAV	11 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
96 - 1ªAV	20 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
97 - 1ªAV	15 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto e fechado	Sim	ND	ND
98 - 1ªAV	24 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
99 - 1ªAV	13 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
100 - 1ªAV	13 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Diariamente	Fechado	Não	ND	ND
101 - 1ªAV	12 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
102 - 1ªAV	8 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
103 - 1ªAV	16 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
104 - 1ªAV	16 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
105 - 1ªAV	12 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
106 - 1ªAV	15 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
107 - 1ªAV	11 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	24	ND

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 22.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO		EXPOSIÇÃO PASSIVA			ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Cigarros (ao dia)**	**Fumo na casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
108 - 1ªAV	10 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
109 - 1ªAV	21 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	34	ND
110 - 1ªAV	8 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
111 - 1ªAV	19 semanas	Nunca fumante	0	Semanalmente	Fechado	Não	ND	ND
112 - 1ªAV	10 semanas e 1 dia	Ex-fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
113 - 1ªAV	15 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
114 - 1ªAV	8 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
115 - 1ªAV	17 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
116 - 1ªAV	9 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
117 - 1ªAV	13 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto e fechado	Não	ND	ND
118 - 1ªAV	12 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
119 - 1ªAV	17 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
120 - 1ªAV	11 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
121 - 1ªAV	7 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Sim	ND	ND
122 - 1ªAV	14 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
123 - 1ªAV	14 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
124 - 1ªAV	9 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
125 - 1ªAV	7 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
126 - 1ªAV	20 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto e fechado	Sim	ND	ND
127 - 1ªAV	12 semanas	Nunca fumante	0	Não sabe	Aberto	Não sabe	ND	ND
128 - 1ªAV	8 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 22.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO		EXPOSIÇÃO PASSIVA			ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Cigarros (ao dia)**	**Fumo na casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
129 - 1ªAV	8 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
130 - 1ªAV	18 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
131 - 1ªAV	12 semanas e 4 dias	Ex-fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
132 - 1ªAV	13 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
133 - 1ªAV	20 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
134 - 1ªAV	11 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
135 - 1ªAV	15 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
136 - 1ªAV	20 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
137 - 1ªAV	9 semanas e 1 dia	Ex-fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
138 - 1ªAV	15 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
139 - 1ªAV	8 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
140 - 1ªAV	19 semanas	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
141 - 1ªAV	22 semanas e 3 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
142 - 1ªAV	24 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
143 - 1ªAV	10 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Fechado	Não	ND	ND
144 - 1ªAV	9 semanas e 6 dias	Ex-fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
145 - 1ªAV	12 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
146 - 1ªAV	12 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
147 - 1ªAV	9 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
148 - 1ªAV	17 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
149 - 1ªAV	13 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Fechado	Sim	ND	ND
150 - 1ªAV	14 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
151 - 1ªAV	9 semanas e 5 dias	Ex-fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

Continuação Tabela 22.

IDENTIFICAÇÃO		FREQUÊNCIA DE USO DE CIGARRO		EXPOSIÇÃO PASSIVA			ANÁLISE LABORATORIAL	
Nº Amostra no laboratório	**Período gestacional**	**Status tabágico**	**Cigarros (ao dia)**	**Fumo na casa**	**Local de trabalho**	**Fumo trabalho**	**Concentração NIC (ng/mL)**	**Concentração COT (ng/mL)**
152 - 1ªAV	6 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
153 - 1ªAV	12 semanas e 3 dias	Ex-fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
154 - 1ªAV	7 semanas	Ex-fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
155 - 1ªAV	20 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
156 - 1ªAV	13 semanas	Ex-fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
157 - 1ªAV	20 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
158 - 1ªAV	14 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Aberto e fechado	Sim	ND	ND
159 - 1ªAV	8 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
160 - 1ªAV	15 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
161 - 1ªAV	22 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
162 - 1ªAV	19 semanas e 2 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Sim	ND	ND
163 - 1ªAV	14 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
164 - 1ªAV	17 semanas e 6 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
165 - 1ªAV	12 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Mensalmente	Aberto	Não sabe	ND	ND
166 - 1ªAV	13 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Diariamente	Não trabalha	NA	ND	ND
167 - 1ªAV	8 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
168 - 1ªAV	17 semanas e 1 dia	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
169 - 1ªAV	6 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
170 - 1ªAV	19 semanas e 4 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND
171 - 1ªAV	21 semanas	Nunca fumante	0	Nunca	Fechado	Não	ND	ND
172 - 1ªAV	11 semanas e 5 dias	Nunca fumante	0	Nunca	Não trabalha	NA	ND	ND

1ªAV: primeira avaliação; 2ªAV: segunda avaliação; NIC: nicotina; COT: cotinina; ND: não detectado.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FATORES SOCIAIS E PSICOLÓGICOS ASSOCIADOS
AO CONSUMO DE CIGARROS DURANTE A GRAVIDEZ

Pesquisadores: Ângela Tamye Lopes Fujita, José Antônio Baddini-Martinez, Ricardo Gorayeb, Geraldo Duarte.
Telefone dos pesquisadores para contato: (19) 98142-2888.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas também está à disposição para esclarecer dúvidas éticas sobre o projeto pelo telefone (16) 3602-2228.

Cara Sra:

O consumo de tabaco durante a gravidez é responsável por inúmeras complicações na gestação e efeitos nocivos para a saúde do feto. É reconhecido que os fatores sociais e psicológicos têm influência na iniciação e manutenção do comportamento de fumar cigarros industrializados.

Este é um convite para você participar em uma pesquisa científica com o objetivo de investigar quais fatores sociais e psicológicos estão associados ao consumo de cigarros durante a gravidez assim como a influência dessas características nas respostas apresentadas frente a uma intervenção anti-fumo mínima.

Para comparação com os resultados observados nas pacientes que são fumantes também serão investigados pacientes que não são fumantes e ex-fumantes. Caso você concorde em participar deste estudo, irá ser submetida a avaliações em três momentos: na sua primeira consulta de pré-natal, com 36-40 semanas de gestação e até 40 dias após o parto.

A avaliação consistirá na aplicação de questionário para coleta de dados sociodemográficos, aplicação de instrumentos psicológicos e coleta de um pouco de saliva para avaliação de uma substância derivada da nicotina chamada cotinina, conforme descrito em seguida:

a) 1ª Entrevista (1ª consulta de pré-natal): Responder a um questionário impresso que irá investigar dados sociodemográficos, assim como questões referentes ao seu histórico tabágico e dependência de nicotina, caso você seja fumante. Você também terá que responder a alguns testes psicológicos que irão avaliar alguns fatores que podem ter associação com o consumo de cigarros. Uma amostra da sua saliva também será coletada para medir a quantidade de cotinina eliminada. Todos os testes psicológicos serão administrados independente de você ser fumante ou não. Caso você não entenda alguma pergunta, ou venha a se sentir desconfortável ou constrangido para responder alguma questão, estaremos à disposição para as explicações que forem necessárias.
b) 2ª entrevista (36-40 semanas de gestação): Serão feitas perguntas com relação ao consumo de tabaco e uma nova coleta de saliva. Mesmo que você não esteja fumando é importante que você compareça para esta entrevista.
c) 3ª entrevista (até 40 dias após o parto): Serão feitas perguntas com relação ao consumo de tabaco e uma última coleta de saliva.

Todos os dados coletados neste estudo serão empregados apenas com a finalidade de investigação científica e está garantido o sigilo da sua identificação no momento da publicação dos resultados. Os resultados deste estudo nos ajudarão a compreender melhor o papel de fatores sociais e psicológicos no consumo de tabaco durante a gravidez.

A sua participação nesta pesquisa não é obrigatória e o seu nome não será identificado em momento algum do estudo. Você não vai pagar por nenhum exame a ser realizado. Você não terá despesas extras para participar da investigação, além de ter que vir às consultas normais do pré-natal. Não haverá nenhuma compensação financeira pela sua participação no estudo. Na eventualidade de alguma complicação de saúde relacionada com o estudo, lhe está assegurado tratamento pela equipe médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Você tem a garantia de solicitar indenização na Justiça caso se sinta prejudicado pela ocorrência de eventuais danos devidos à pesquisa.

_____

Assinatura do Voluntário

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2015.

_____

Pesquisador Responsável
(Nome da pessoa que obteve o TCLE)

_____

Assinatura do Pesquisador

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2015.

ANEXO 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 031/2016
kms

Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2016.

À Pós-graduanda
Nayna Cândida Gomes
Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "SALIVA: UMA MATRIZ ALTERNATIVA PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES DO CIGARRO EM GESTANTES", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 413 – CAAE nº 56574416.3.0000.5403,** foi aprovado pelo do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 157ª reunião ordinária realizada em 7 de outubro de 2016.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO 3

FFCLRP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Campus de Ribeirão Preto

Of.CEtP/FFCLRP-USP/92-dgfs

Ribeirão Preto, 26 de outubro de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos a V. Sa. que o projeto de pesquisa intitulado **"Saliva: uma matriz alternativa para determinação de biomarcadores do cigarro em gestantes."** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP-USP, em sua 160ª Reunião Ordinária, realizada em 20.10.2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO** (CAAE nº 56574416.3.3001.5407).

Solicitamos que eventuais modificações ou emendas ao projeto de pesquisa sejam apresentadas ao CEP, de forma sucinta, identificando a parte do projeto a ser modificada e suas justificativas, e que, ao término do estudo, um relatório final seja entregue, via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Patrícia Nicolucci
Vice - coordenadora

Ao(À) Senhor(a)
Nayna Cândida Gomes
Programa de Pós-graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto –SP

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP USP
Fone: (16) 3315-4811
Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 23 - casa 37 - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Homepage: http://www.ffclrp.usp.br - e-mail: coetp@ffclrp.usp.br

ANEXO 4

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FATORES SOCIAIS E PSICOLÓGICOS ASSOCIADOS AO CONSUMO DE CIGARROS DURANTE A GRAVIDEZ

Pesquisador: JOSÉ ANTÔNIO BADDINI MARTINEZ

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 42795615.4.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.061.153

Data da Relatoria: 05/05/2015

Apresentação do Projeto:

"Estima-se que no Brasil 6,1% das mulheres sejam fumantes na gravidez. Este projeto tem como objetivo pesquisar associações entre características sociais e psicológicas com a ocorrência de tabagismo durante a gravidez, assim como a influência desses atributos nas respostas apresentadas pelas voluntárias frente a uma intervenção anti-fumo mínima. Será conduzido estudo longitudinal com uma amostra de gestantes atendidas em serviços públicos de pré-natal. Para a coleta de dados serão utilizados um questionário sociodemográfico e instrumentos que irão avaliar o status tabágico, nível de dependência a nicotina, dependência emocional ao cigarro, personalidade, ansiedade, depressão, estresse percebido e apego materno-fetal. As avaliações serão realizadas na primeira consulta de pré-natal, com 36-40 semanas de gestação e até 40 dias após o parto. A análise dos dados consistirá no uso de testes t pareados, testes de chi-quadrado ou testes Wilcoxon para comparações dos dados obtidos. Correlações entre os parâmetros obtidos e medidas da intensidade do tabagismo serão realizadas empregando-se os testes de Pearson ou Spearman. Um modelo de análise multivariada será construído com todas as variáveis obtidas

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

tendo como desfecho dual a presença ou ausência de tabagismo na semana 36 e uma semana após o parto.Palavras-chave: tabagismo, avaliação psicológica, características de personalidade, apego maternofetal, gravidez."

Objetivo da Pesquisa:

"Pesquisar associações entre características sociais e psicológicas com a ocorrência de tabagismo durante a gravidez, assim como a influência desses atributos em possíveis mudanças no comportamento de fumar das participantes."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: "Em princípio, este estudo traz um risco mínimo aos participantes. No entanto, em alguns casos, as respostas aos testes trazem recordações ou emoções pessoais que podem não ser agradáveis. Em caso de você se sentir desconfortável ou com qualquer mal estar psicológico devido à sua participação na pesquisa, você será atendido pela psicóloga responsável, que lhe prestará, sem custos, o atendimento psicológico necessário, mesmo depois de terminada a sua participação na pesquisa."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram esclarecidos os pontos elencados no parecer anterior sobre recrutamento, riscos, local de realização do estudo, número de participantes, grupos de participantes e pesquisadores envolvidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou riscos e benefícios, TCLE, cronograma, autorizações para realização do estudo em novas versões.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 2 de 24/04/2015, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2 de 24/04/2015, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Solicita-se que as respostas sejam enviadas por meio de uma carta constando, de forma ordenada, as respostas dos itens de consideração deste parecer, destacando as alterações realizadas e as possíveis localizações no Projeto e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O Projeto e TCLE contendo as modificações solicitadas devem ser apresentados na forma de novos documentos contendo nos rodapés de cada página a identificação (número) da nova versão, com a respectiva data de modificação dos referidos documentos. Ao adicionar as novas versões, favor não excluir os documentos já anexados." Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 13 de Maio de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Anexo 5

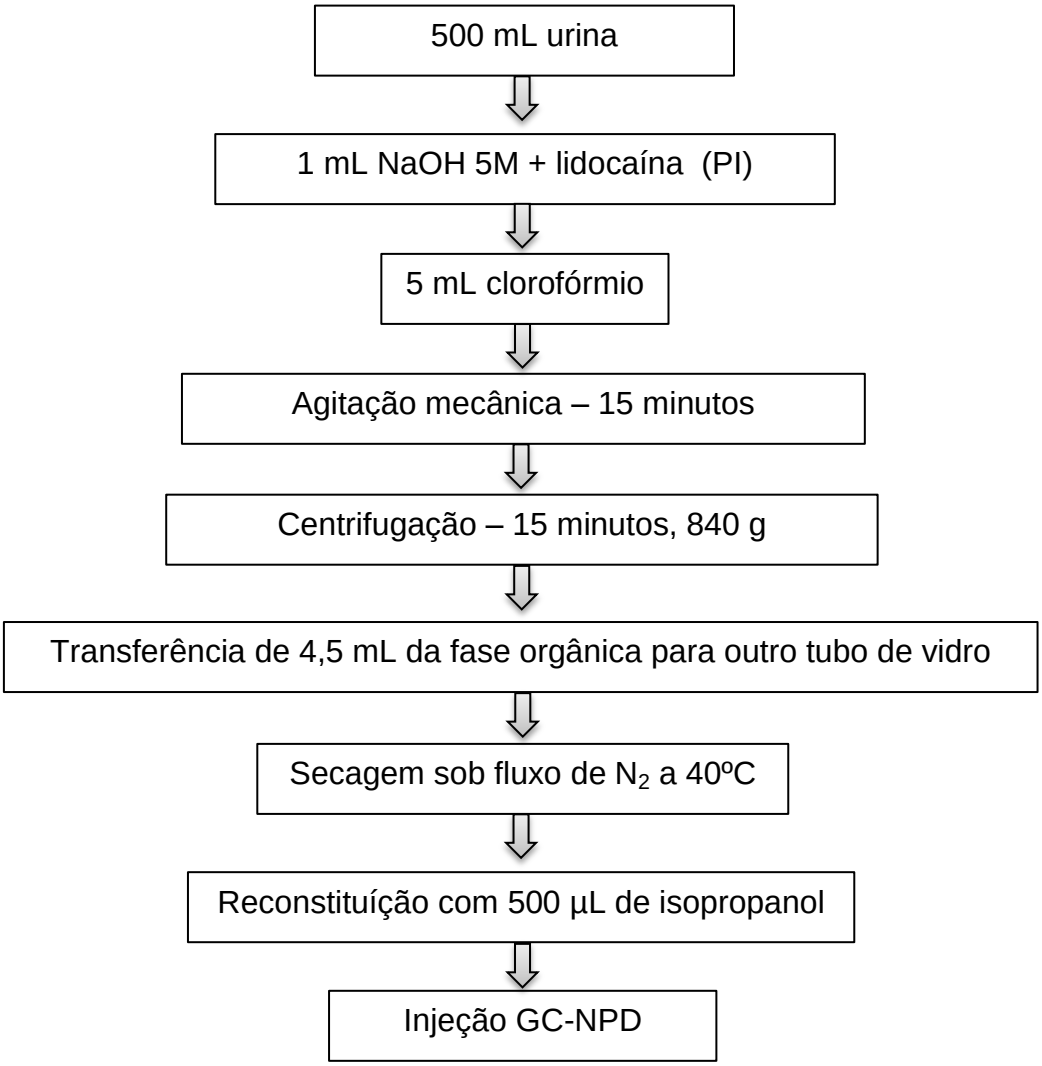

Figura 28. Esquematização da extração líquido-líquido feita por Malafatti et al. (2010).

Anexo 6

Tabela 23. Teste de dependência à nicotina de Fagerström.

Pergunta	Resposta	Pontuação
1) Quanto tempo após acordar você fuma seu primeiro cigarro?	(1) Dentro de 5 minutos (2) Entre 6-30 minutos (3) Entre 31-60 minutos (4) Após 60 minutos (5) Não fuma	3 2 1 0
2) Você acha difícil não fumar em lugares proibidos, como igrejas, ônibus, etc.?	(1) Sim (0) Não	1 0
3) Qual cigarro do dia traz mais satisfação?	(1) O primeiro pela manhã (2) Outros (3) Nenhum	1 0
4) Quantos cigarros você fuma por dia?	(1) Menos de 10 (2) De 11 a 20 (3) De 21 a 30 (4) Mais de 31 (5) Não fuma	0 1 2 3
5) Você fuma mais frequentemente pela manhã?	(1) Sim (0) Não	1 0
6) Você fuma mesmo doente?	(1) Sim (0) Não	1 0

Fonte: Pietrobon, Barbisan, Manfroi, 2007.

Conclusão sobre o grau de dependência:

0-2 pontos= muito baixo; 3-4 pontos= baixo; 5 pontos= médio; 6-7 pontos= elevado; 8-10 pontos= muito elevado.