



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Determinação de marcadores de exposição ao tabaco em amostras de fluido oral de indivíduos não fumadores

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Beatriz Marques da Fonseca

Orientador: Prof.^a Doutora María Eugenia Gallardo Alba

Co-orientador: Prof. Doutor José Manuel Lage Campelo Calheiros

Covilhã, Junho 2011

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projecto nº 9077 - "Avaliação da exposição ao fumo do tabaco ambiental nos locais de trabalho e da prevalência de sintomas relacionados. Contributo para a monitorização da efectividade da nova legislação nacional" Investigador Principal - José M. Calheiros - financiado pelo Programa Ambiente da Fundação Calouste Gulbenkian.

Agradecimentos

Escrever uma tese, assim como qualquer obra escrita, é um empreendimento solitário e por isso limpo esse comportamento egoísta com os agradecimentos e dedicatória da praxe.

Não quer este começo algo cínico dizer que agradeço e dedico esta tese por obrigação ou sem sentimento.

Pelo contrário. As pessoas que viveram, vivem e viverão comigo todo o percurso que me fez crescer até esta etapa sabem quem são. Sem elas, esta tese não seria possível.

Resumo

A exposição à poluição tabágica ambiental constitui um sério problema de saúde pública, já que os fumadores passivos estão expostos a mais de quatro mil substâncias tóxicas, entre as quais dezenas de cancerígenos e nicotina, principal agente responsável pelo desenvolvimento da dependência ao tabaco. Este alcalóide de ocorrência natural deriva das folhas de tabaco e é rápida e extensivamente metabolizado no fígado para formar uma larga variedade de metabolitos. A exposição crónica à nicotina, a droga mais consumida em todo o planeta, é responsável pela aparição de problemas de saúde como cancro, doenças do foro respiratório e neurológico, entre outros.

Como problema de saúde pública, é uma prioridade conhecer a verdadeira prevalência de indivíduos expostos a este tipo de poluição. Assim o principal objectivo do presente estudo é a determinação de nicotina e os seus principais metabolitos, cotinina e trans-3-hidroxicotinina em amostras de fluido oral por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem, de forma a avaliar a exposição de não fumadores a estas substâncias.

A metodologia proposta foi validada de acordo com critérios internacionalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos da *Food and Drug Administration* (FDA). Utilizando apenas 200 µL de amostra, o método demonstrou ser linear no intervalo de concentrações de 0,5 a 1000 ng/mL, exacto e preciso. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,5 ng/mL e a eficiência de extracção foi superior a 85% para todos os compostos de estudo.

Tendo em conta os resultados obtidos, podemos afirmar que a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem é uma poderosa e indispensável ferramenta que providencia uma elevada sensibilidade para a quantificação simultânea de biomarcadores de exposição ao fumo de tabaco num volume reduzido de fluido oral.

Palavras-chave

GC-MS/MS; SPE; fluido oral; biomarcadores de exposição a tabaco

Abstract

Exposure to tobacco smoke is a serious public health problem, since the passive smokers are exposed to more than four thousand toxic substances, including dozens of carcinogens and nicotine, the main agent responsible for the development of tobacco dependence. This naturally occurring alkaloid derives from tobacco leaves and is rapidly and extensively metabolized in the liver to form a wide variety of metabolites. Chronic exposure to nicotine, the most abused drug on the planet, is responsible for the appearance of health problems like cancer, respiratory and neurological diseases, etc.

As a public health problem, it is a priority to know the real prevalence of exposed individuals. Thus the main objective of this study was the determination of nicotine and its major metabolites, cotinine and trans-3-hydroxycotinine, in oral fluid samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, in order to assess the exposure of non-smoking individuals to those substances.

The proposed methodology was validated according to internationally accepted criteria for bioanalytical method validation, namely those from the Food and Drug Administration. Using a sample amount as low as 200 μ L, the method proved to be linear from 0.5 to 1000 ng/mL, precise and accurate. The limits of detection and quantification were 0.5 ng/mL and the extraction efficiencies were higher than 85% for all studied compounds.

As regards the obtained results, we can say that gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry is a powerful and indispensable tool that provides high sensitivity for the simultaneous measurement of biomarkers of exposure to tobacco smoke in small volumes of oral fluid.

Keywords

GC-MS/MS; SPE; oral fluid; biomarkers of exposure to tobacco

Índice

Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
Lista de Acrónimos	xvii
Justificação do tema e objectivos	xix
I.Revisão da literatura	1
1. O tabagismo	1
1.1. Esboço histórico e universalização do tabaco	2
1.2. Poluição tabágica ambiental	3
2. Compostos químicos do tabaco	6
2.1. A nicotina	8
2.1.1. Farmacocinética	8
2.1.2. Farmacodinâmica	10
2.1.3. Efeitos da nicotina no sistema nervoso central (SNC)	11
2.1.4. Efeitos da nicotina no sistema nervoso periférico (SNP)	12
2.1.5. Mecanismo de adição da nicotina	12
2.2. Marcadores biológicos	12
2.2.1.Cotina & Trans-3-hidroxicotina	14
3. Amostras biológicas: Fluido oral	15
4. Procedimentos de preparação das amostras	19
5. Extracção em fase sólida	20
5.1. Processo e mecanismo de extracção em fase sólida	22
5.2. Adsorventes para extracção em fase sólida	24
5.3. Vantagens da extracção em fase sólida	25
6. Cromatografia gasosa. Versatilidade analítica da espectrometria de massa	26
II.Parte experimental	29
1. Material e Métodos	29
1.1. Padrões e reagentes	29
1.2. Preparação de soluções	29
1.2.1. Soluções padrão	29
1.2.2. Outras soluções	30
1.3. Equipamentos	30
1.4. Amostras biológicas	31
1.5. Sistema cromatográfico e condições cromatográficas	31
1.6. Procedimento de extracção	33
2. Resultados e discussão	34
2.1. Identificação de compostos	34

2.2. Optimização do procedimento de extracção em fase sólida	42
2.3. Validação	45
2.3.1. Selectividade	45
2.3.2. Linearidade e curva de calibração	47
2.3.3. Precisão e exactidão	49
2.3.4. Limites analíticos do método (Limites de detecção e de quantificação)	50
2.3.5. <i>Carry over</i>	53
2.3.6. Estabilidade	53
2.3.6.1. Estabilidade a ciclos congelação/descongelação	53
2.3.6.2. Estabilidade de curta duração	54
2.3.6.3 Estabilidade em amostras processadas	55
2.3.7. Recuperação	55
2.4. Aplicação do método a amostras reais	56
III. Conclusões	61
IV. Bibliografia	63
V. Anexos	73
1. Consentimento informado (para a obtenção do fluído oral)	73
2. Comunicações submetidas no âmbito desta tese	74
3. Outras comunicações realizadas no decorrer desta tese	74
4. Trabalhos submetidos para publicação em revista indexada durante a realização deste trabalho	75

Lista de Figuras

Figura 1- <i>Nicotiana tabacum</i>	8
Figura 2- Estrutura química da nicotina	8
Figura 3- Esquema quantitativo do metabolismo da nicotina, baseado em estimativas da excreção média de metabolitos como percentagem urinária	10
Figura 4- Estrutura química da cotinina (A) e trans-3-hidroxicotinina (B)	14
Figura 5- Representação esquemática das etapas do método de SPE (1- Acondicionamento; 2- Aplicação da amostra; 3- Lavagem; 4- Eluição dos compostos)	21
Figura 6- Estrutura química do adsorvente Oasis [®] MCX (modo misto com troca catiónica)	25
Figura 7- Descrição básica do espectrómetro de massa	27
Figura 8- Representação esquemática dos diferentes modos de análise sequencial	28
Figura 9- Resumo das condições cromatográficas	32
Figura 10- Cromatograma do padrão nicotina à concentração 500 ng/mL (t _R =6,0 min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produtos	34
Figura 11- Cromatograma do padrão interno da nicotina (nicotina-d ₄) à concentração 300 ng/mL (t _R =6,0 min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produto	35
Figura 12- Cromatograma do padrão cotinina à concentração 500 ng/mL (t _R =8,8 min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produtos	36
Figura 13- Cromatograma do padrão interno da cotinina (cotinina-d ₃) à concentração 300 ng/mL (t _R =8,8 min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produto	37
Figura 14- Cromatograma do padrão trans-3-hidroxicotinina à concentração 500 ng/mL (t _R =9,8 min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produto	38
Figura 15- Cromatograma do padrão interno da trans-3-hidroxicotinina (trans-3-hidroxicotinina-d ₃) à concentração 300 ng/mL (t _R =9,8 min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produto	39
Figura 16- Cromatograma obtido de uma mistura padrão fortificada a 3 µg/mL com os compostos em estudo, derivatizados com MSTFA e análise por GC-MRM/MS tandem em splitless	41
Figura 17- Áreas cromatográficas obtidas por injeção directa após a etapa de	44

evaporação, sem adição de solução metanólica de HCl 1% e com adição prévia de solução metanólica de HCl 1% (n=3)

Figura 18- Reacção de derivatização da trans-3-hidroxicotina com formação do derivado trimetrilsililado 44

Figura 19- Cromatograma de uma amostra branca por SPE-GC-MS/MS 46

Figura 20- Exemplo de curvas de calibração da nicotina na gama de concentrações de estudo 48

Figura 21- Exemplo de curvas de calibração da cotina na gama de concentrações de estudo 48

Figura 22- Exemplo de curvas de calibração da trans-3-hidroxicotina na gama de concentrações de estudo 48

Figura 23- Sobreposição de um cromatograma de uma amostra branca com um cromatograma de nicotina [ião 105 (A_1) e 117 (A_2)], cotina [ião 118 (B_1) e 150 (B_2)] e trans-3-hidroxicotina [ião 175 (C_1) e 190 (C_2)], a 0,5 ng/mL. (Em cinzento encontra-se assinalado o cromatograma fortificado a 0,5 ng/mL e em laranja o cromatograma da amostra branca) 52

Figura 24- Cromatograma de amostra real # 8 (concentração de nicotina 269,07 ng/mL, concentração de cotina 54,87 ng/mL e concentração de trans-3-hidroxicotina 3,90 ng/mL) 58

Lista de Tabelas

Tabela 1- Características de diversos componentes do fumo do cigarro na corrente principal e secundária	6
Tabela 2- Revisão de metodologias analíticas na determinação de nicotina e metabolitos em fluidos biológicos	17
Tabela 3- As etapas do procedimento geral da extracção em fase sólida	21
Tabela 4- Grupos mais frequentemente usados como adsorventes e suas características	23
Tabela 5- Parâmetros GC-MRM (monitorização de múltiplas reacções)/MS tandem para a análise de nicotina, cotinina e trans-3-hidroxicotinina	32
Tabela 6- Transições monitorizadas em modo MRM (a transição utilizada para quantificação encontra-se sublinhada)	40
Tabela 7- Comparação de razões de áreas, composto vs PI a 10 e 100 ng/mL em fluido oral e água alcalinizada (n=3)	42
Tabela 8- Intervalos máximos de tolerância permitidos para as abundâncias relativas dos iões, monitorizados em modo MRM e expressos em percentagem (%)	45
Tabela 9- Resultados referentes à linearidade e curva de calibração	47
Tabela 10- Valores obtidos para a precisão intradia e exactidão do método para a nicotina, cotinina e trans-3-hidroxicotinina (n=6)	50
Tabela 11- Valores obtidos para a precisão interdia e exactidão do método para a nicotina, cotinina e trans-3-hidroxicotinina (n=3)	50
Tabela 12- Tabela resumo dos limites de quantificação em ng/mL para os analitos em estudo (n=5)	51
Tabela 13- Resumo dos resultados referentes ao estudo da estabilidade a ciclos de congelação e descongelação a quatro concentrações dos analitos em estudo (n=3)	54
Tabela 14- Resumo dos resultados referentes ao estudo da estabilidade de curta duração a quatro concentrações dos analitos em estudo (n=3)	54
Tabela 15- Resumo dos resultados referentes ao estudo da estabilidade em amostras processadas a quatro concentrações dos analitos em estudo (n=3)	55
Tabela 16- Recuperação média, em percentagem (%), para cada um dos compostos em estudo, calculada para três níveis de concentração (n=3)	56
Tabela 17- Compostos identificados nas amostras reais e respectiva quantificação	56

Lista de Acrónimos

3-HC	Trans-3-hidroxicotinina
ACh	Acetilcolina
<i>Bias</i>	Erro relativo médio
C ₁₀ H ₁₄ N ₂	Nicotina
C ₁₈	Octadecilsilano
C ₂	Etilsilano
C ₄	Butilsilano
C ₈	Octilsilano
CO	Monóxido de carbono
CV	Coefficiente de variação
CYP2A6	Cumarina 7-hidroxilase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	<i>Gas chromatography</i> (cromatografia gasosa)
GC-MS/MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry em tandem</i> (cromatografia gasosa com espectrometria de massa em tandem)
HCl	Acido clorídrico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromathography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
<i>ICH</i>	<i>International Conference on Harmonization</i>
INS	Inquérito Nacional de Saúde
LC	<i>Liquid chromatography</i> (cromatografia líquida)
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> (extração líquido-líquido)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (limite de detecção)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (limite de quantificação)
LPME	<i>Liquid-phase microextraction</i> (microextração em fase líquida)
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MAO	Enzima monoamino oxidase
MCX	<i>Mixed-mode Cation-eXchange</i> (modo misto com troca catiónica)
MeOH	Metanol
MEPS	<i>Microextraction in a packed syringe</i> (microextração em seringa empacotada)
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (monitorização de múltiplas reacções)
MS	Espectrometria de massa
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
NaOH	Hidróxido de sódio
NT	Neurotransmissor
OMS	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

p'	Índice de polaridade
pH	Logaritmo negativo da concentração hidrogeniónica
PI	Padrão interno
pKa	Constante de ionização
PTA	Poluição Tabágica Ambiental
r	Coeficiente de correlação
R ²	Coeficiente de determinação
S	Desvio padrão
SBSE	<i>Stir-bar sorptive extraction</i> (extracção sortiva em barra de agitação)
SCAN	<i>Scanning</i> (modo de varrimento contínuo)
SDME	<i>Single-drop microextraction</i> (microextracção em gota suspensa)
SIM	<i>Selective Ion Monitoring, Single Ion Monitoring</i> (monitorização selectiva de iões)
SiOH	Silanol
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SPDE	<i>Solid-phase dynamic extraction</i> (extracção dinâmica em fase sólida)
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> (extracção em fase sólida)
SPE-GC-MS/MS	Extracção em fase sólida - Cromatografia gasosa- Espectrometria de massa/ Espectrometria de massa
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i> (microextracção em fase sólida)
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsilil
tR	Tempo de retenção
WADA	World Anti-Doping Agency
X	Média
ε °	Força eluotrópica de adsorção em sílica

Justificação do tema e objectivos

Segundo a organização mundial de saúde (OMS), na actualidade consomem-se diariamente 200 toneladas de nicotina, totalizando 73 mil toneladas por ano. Há no mundo mais de 1 bilião e 200 milhões de fumadores consumidores de nicotina e estima-se que 2 biliões de pessoas não-fumadoras inalam nicotina por viverem expostas à poluição tabágica ambiental. Por outro lado, mais de metade da humanidade inala nicotina directamente quando são fumadores e indirectamente quando convivem com fumadores. De facto calcula-se que há no mundo em torno de 1 bilião de pessoas dependentes da nicotina (WHO 2009).

O tabaco contém mais de quatro mil substâncias tóxicas, por isso, são debatidos frequentemente alguns aspectos da problemática do tabagismo, da sua epidemiologia e medidas para o seu controlo. A exposição à poluição tabágica ambiental constitui um sério problema de saúde pública, já que conforme a OMS as pessoas passam, em geral, mais de 80% do seu tempo a respirar ar poluído pela nicotina através do fumo do tabaco e que a poluição nicotínica representa 80% de todas as fontes poluidoras (Pirkle 1996). Os fumadores passivos, além dos riscos apontados à sua saúde, sofrem outros decorrentes das substâncias tóxicas do tabaco, provocadas maioritariamente pela nicotina e dezenas de produtos cancerígenos.

O consumo de tabaco está intimamente associado a uma série de danos para a saúde, como cancro em diferentes localizações, múltiplas patologias do foro respiratório e cardiovascular, prejudicando muitas vezes de forma irreversível o bem-estar das pessoas. De facto, o último relatório da OMS estima que aproximadamente 5 milhões de pessoas morrem anualmente em todo o mundo como consequência do uso do tabaco (WHO 2009).

A nível legal, em Portugal, a Lei n.º37/2007 de 14 de Agosto, com entrada em vigor a 1 de Janeiro de 2008, estabelece, entre outras medidas, um conjunto de limitações ao consumo de tabaco em recintos fechados destinados a utilização colectiva. Com base no Inquérito Nacional de Saúde (INS) realizado em 2005/2006, 19,7% dos residentes em Portugal com idade igual ou superior a 10 anos, referiam ser fumadores actuais e segundo este mesmo inquérito cerca de 25% da população não fumadora referia estar em contacto com fumadores em espaços fechados (INFOTABAC 2009).

Entre os componentes principais do tabaco existem mais de vinte alcalóides diferentes, sendo a nicotina a mais abundante. Esta constitui 98% do total de alcalóides e é proveniente das folhas da planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*), onde atinge níveis de 2 a 7%. Em concentrações baixas funciona como um estimulante, sendo este o principal efeito responsável pela dependência do consumo de tabaco. A nicotina é rapidamente absorvida

pela mucosa da boca e nariz ou pela inalação nos pulmões e tem inúmeros efeitos em fumadores activos tal como fumadores passivos que estão expostos ao ambiente tabágico. É estimado que 70-80% da nicotina absorvida é metabolizada em cotinina e em menor proporção em trans-3-hidroxicotinina, entre outros compostos, servindo estes como marcadores biológicos (Kataoka 2009).

Desta forma, as substâncias analisadas para a realização deste estudo são os principais metabolitos da nicotina (cotinina e trans-3-hidroxicotinina) em amostras de fluido oral, com o intuito de avaliar a exposição de não fumadores a estas substâncias, já que como um problema de saúde pública é uma prioridade saber a verdadeira prevalência de indivíduos expostos à poluição tabágica ambiental e portanto, de fumadores passivos, uma vez, que este conhecimento quando baseado em questionários auto-administrados têm alguma controvérsia acerca da sua veracidade, porque em muitos casos as respostas podem ser distorcidas para esconder ou exagerar dados que chegam sobre as próprias características e hábitos de consumo. Conhecer a prevalência real do consumo, a exposição a este tipo de ambientes, são razões que têm impulsionado a busca por marcadores de avaliação/exposição biológica e/ou ambientais. Na verdade, estudos explorando vários tipos de biomarcadores têm um papel crucial na revelação de agentes nocivos existentes no ambiente, no aumento da compreensão dos processos biológicos e mecanismos das doenças crónicas associados à exposição ao fumo ambiental, bem como na adição de plausibilidade biológica na evidência epidemiológica (Husgafvel-Pursiainen 2002).

Assim o presente estudo tem como objectivos: 1) desenvolvimento de um método analítico para a identificação de nicotina e metabolitos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS), 2) optimização de uma técnica de extracção para a determinação de nicotina, cotinina e trans-3-hidroxicotinina em amostras de fluido oral e sua posterior validação e finalmente, 3) a aplicação da metodologia desenvolvida a amostras obtidas de indivíduos não fumadores, com o fim de avaliar a exposição a estas substâncias.

I. Revisão da literatura

1.0 tabagismo

O tabagismo é definido como o acto de consumir cigarros ou outros produtos que contenham tabaco, cuja droga ou princípio activo é a nicotina (Menezes 2004). O hábito de fumar independentemente da qualidade, quantidade ou frequência, constitui a causa mais importante de mortalidade evitável nos países desenvolvidos. O total de mortes anuais devido ao uso do tabaco atingiu 4,9 milhões, o que corresponde a mais de 10 mil mortes por dia. Na Europa, o fumo do tabaco é responsável por um milhão e 200 mil mortes anuais, prevendo-se que, em 2020, este número ascenda a dois milhões (Cunha 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que o tabagismo deve ser encarado como uma pandemia, ou seja, uma epidemia generalizada e como tal precisa ser combatido. Considera também que este comportamento é a principal causa de morte escusável e o Banco Mundial encara o controlo do tabagismo a medida preferível em relação custo-eficácia, quando confrontada com terapêuticas realizadas nas mais múltiplas patologias (Pamplona 2007).

Aproximadamente 50% dos fumadores morrem prematuramente devido aos danos deletérios do tabaco. As doenças relacionadas com o tabagismo activo são múltiplas: oncológicas, cardiovasculares, pneumológicas e outras, sendo também promotoras de internamentos, morbidade e diminuição da qualidade de vida. Por outro lado, o tabagismo activo tem ainda efeitos adversos na evolução de outras doenças, como asma, tuberculose, bronquiolite, pneumotórax idiopático e aumenta as complicações no pós-operatório de várias cirurgias (Pamplona 2007).

Além de todas as sequelas individuais há também que destacar o embate social do tabagismo, designadamente através dos soberbos valores económicos ligados a dispêndios na saúde e à permuta de parte dos gastos familiares em bens de primordial necessidade pela obtenção de tabaco. Pode ainda ser produtor de distintos incidentes relacionados com fogos domésticos, florestais ou na condução.

Em Portugal, existem diferenças relativas ao consumo de cigarros entre as zonas rurais e urbanas do país, nesta última há um maior consumo e são as mulheres que contribuem mais para este aumento, levando como é óbvio a eventuais complicações no futuro nos dois sexos, mas com a acrescida preocupação no caso do sexo feminino numa eventual gravidez (Fraga 2005). Esta dependência tem efeitos graves, estando associado a aborto espontâneo, gravidez ectópica, síndrome da morte súbita do recém nascido, parto pré-termo e baixo peso ao

nascimento, por isso deverão existir medidas de combate ao consumo de tabaco nesta população. Este consumo começa muitas das vezes na adolescência, daí que deva haver iniciativas dirigidas à prevenção do consumo de tabaco particularmente nestas idades.

Em geral, estão bem determinados os propósitos de precaução e controlo do tabagismo: proteger os não fumadores da exposição ao fumo diminuindo a incidência (acautelar o hábito tabágico) e a prevalência (auxiliar a supressão tabágica) de fumadores; conceber um ambiente em que fumar não seja norma; estabelecer as circunstâncias de produção e de comércio dos produtos do tabaco, o único produto considerado legal que pode levar à morte através do consumo regular (Fraga 2005).

1.1. Esboço histórico e universalização do tabaco

Foi a América o berço onde se propagou a nicotina conduzida pelo tabaco. Os aborígenes americanos tinham como costume fumar tabaco nas cerimónias religiosas. Neste continente todas as culturas indígenas esparsas vivenciavam o mesmo ritual mágico-religioso, sagrado, em que entravam em transe aspirando o fumo do tabaco, desde o sacerdote, cacique e os seus circundantes. Sendo um enigma como se disseminou este culto uma vez que estes povos dificilmente se podiam contactar (Fraga 2005).

Durante vários séculos, era cultivada pelos nativos que fumavam as folhas durante os cultos. O extracto das folhas da planta era aproveitado como insecticida, para eliminar parasitas dentro e fora do corpo (Longenecker 2002; Planeta 2007; Valle 2007).

O cultivo, o acto de mascar e de fumar tabaco eram então já costumes antigos em todo o subcontinente americano e também no australiano, quando os exploradores europeus visitaram pela primeira vez estes lugares (Rang 2004; Cunha 2007). A viagem de Colombo expandiu este hábito aos colonizadores europeus. De facto, o primeiro contacto do mundo civilizado com a nicotina foi no século XVI, surgindo na Europa por quatro caminhos: Espanha, Portugal, França e Inglaterra (Rang 2004).

O tabaco alastrou-se pela Europa como rastilho de pólvora. Cinquenta anos após a sua chegada, fumava-se cachimbo em praticamente todo o continente: nobres, plebeus, soldados e marinheiros. Assim, velozmente o tabaco foi introduzido a todas as populações do mundo civilizado.

A partir do século XVII, na Europa, todos os generais, soldados e populares fumavam. Após a sua chegada ao continente europeu, o tabaco alterou imediata e dramaticamente o contexto da política económica dos governos, tornando-se a maior fonte de renda dos cofres

públicos. Sendo a maneira mais comum de consumir através de cachimbo, hábito que se manteve durante pelo menos três séculos (Longenecker 2002).

No século XVIII, espalhou-se a mania de aspirar rapé, que reinou por uns 200 anos. Os nobres usavam tabaqueiras de ouro cravejadas de diamantes, prosperando assim a indústria da ourivesaria miniaturizada efectuada por artesãos notórios. Havia os que usavam uma tabaqueira por dia, possuindo centenas de tipos diferentes. O povo, sem posses, usava o rapé deposto no dorso do polegar da mão. Nos livros de anatomia é chamada de “tabaqueira anatómica” (Rosemberg 2002).

O charuto teve o seu reinado no século XIX. A sua popularidade entre os ricos denotava o seu elevado status económico-social. Já o cigarro surgiu em meados do século XIX. Na Espanha, porém, muito antes já se fumava tabaco enrolado em papel, denominado “papelete”. O termo “cigarillos” em espanhol deriva de “cigarral”, nome dado a hortas e plantações invadidas por cigarras. Este nome generalizou-se a “cigarette” em francês, inglês e algumas outras línguas, “zigarette” em alemão, “sigaretta” em italiano e cigarro em português. Em várias línguas, cigarro ou “cigar” referem-se a charuto. Paris foi invadida pelo cigarro em 1860. Nos Estados Unidos, houve uma efectiva detonação do cigarro na década de 1880, quando se criou uma máquina que produzia duzentas unidades por minuto (Koob 2006). Posteriormente surgiram as máquinas originando centenas de milhões por dia. O cigarro teve assim a sua expansão por ser mais económico, mais conveniente de carregar e usar do que o charuto ou o cachimbo. A primeira grande expansão mundial foi após a Primeira Guerra Mundial, de 1914 a 1918. Entretanto, sua difusão foi praticamente no sexo masculino. A difusão entre as mulheres cresce após a Segunda Guerra Mundial, de 1939 a 1945 (Valle 2007).

A nicotina levada pelo tabaco invólucro no cigarro generalizou-se pelo mundo, através de insólita transculturação.

1.2. Poluição tabágica ambiental

Depreende-se tabagismo passivo como a inalação do fumo de derivados do tabaco (cigarro, charuto, cigarrilhas, cachimbo e outros produtores de fumo) por indivíduos não-fumadores, que convivem com fumadores em ambientes fechados (Menezes 2004; Repace 2006). Este fumo do tabaco respirado por pessoas que não fumam é uma mistura de componentes com quatro origens diferentes: o fumo exalado pelo fumador, o fumo emitido pelo cigarro na sua combustão, os contaminantes emitidos pelo cigarro no momento de fumar e os contaminantes que se difundem através do papel do cigarro entre as tragadas (Banegas 1999).

O fumo dos derivados do tabaco em meios cerrados é denominado de poluição tabágica ambiental (PTA), que corresponde ao conceito de *Environmental Tobacco Smoke* (ETS) ou *Secondhand Smoke* e segundo a OMS é o principal responsável pela poluição nestes ambientes e pelo tabagismo passivo, sendo a terceira maior causa de morte evitável no mundo, precedentemente ao tabagismo activo e ao consumo excessivo de álcool (Fraga 2005).

O reconhecimento científico dos malefícios do consumo de tabaco, da poluição tabágica ambiental e das propriedades aditivas da nicotina com repercussões na efectividade das medidas de desabitação tabágica, têm estimulado o desenvolvimento e implementação de um leque alargado de medidas, programas e políticas de controlo do consumo (Fraga 2005).

Em Portugal, devido aos números assustadores de mortes associados a este vício existem proibições de fumar em ambientes públicos fechados, como esta que é regulada pela Lei nº 37/2007 “que aprova normas para a protecção dos cidadãos da exposição involuntária ao fumo do tabaco e medidas de redução da procura relacionadas com a dependência e a cessação do seu consumo” de 14 de Agosto de 2007. O seu objecto, como definido no artigo primeiro, emana das disposições da “Convenção Quadro da Organização Mundial de Saúde para o controlo do Tabaco” e procura acima de tudo evitar a exposição involuntária ao tabaco, assim como regulamentar o fabrico e a venda de produtos de tabaco, a informação e sensibilização da população para os seus malefícios.

Ainda muito recentemente, também Espanha endureceu a sua lei anti-tabaco proibindo o fumo de tabaco em todos os espaços públicos fechados (Jornal Público 2011). Apesar das boas intenções, estas leis são acima de tudo restritivas, sendo igualmente necessária uma fiscalização eficaz, a monitorização do número de fumadores e trabalhos de investigação que se foquem nos perigos e prejuízos. Estas políticas de prevenção do consumo de tabaco deverão ter como grande objectivo proteger as presentes e futuras gerações das consequências sociais, económicas, ambientais e ao nível da saúde (Fraga 2005).

Existe uma grande variabilidade no modo como os fumadores consomem os seus cigarros até mesmo por pessoas que fumam a mesma marca de cigarros, como são fumados (a profundidade e número de tragadas), o tipo de cigarro, a quantidade fumada e o tempo decorrido desde o último cigarro fumado. Todos estes factores influenciam as exposições tóxicas. Portanto, a capacidade poluidora tabágica altera com as atitudes do fumador, bem como as condições do espaço físico, variação de ar dos recintos, dimensões destes e o tempo que se permanece no local (Benowitz 2009).

Os não fumadores que respiram o fumo do tabaco têm um risco superior de possuírem doenças relacionadas com o tabagismo. Estes podem sofrer efeitos imediatos da poluição

tabágica ambiental, tais como, irritação nos olhos, manifestações nasais, tosse, cefaleia, aumento de problemas alérgicos principalmente das vias respiratórias e aumento dos problemas cardíacos, particularmente elevação da pressão arterial e angina (dor no peito). Outros efeitos a médio e longo prazo são a redução da capacidade funcional respiratória (capacidade do pulmão ser capaz de exercer a sua função) e aumento do risco de ter aterosclerose. As crianças, por usufruírem uma frequência respiratória mais elevada, são mais atingidas, sofrendo efeitos mais drásticos na sua saúde, envolvendo moléstias como a bronquite, pneumonia, asma entre outras (Banegas 1999; Repace 2006).

O ar poluído contém, em média, três vezes mais nicotina, três vezes mais monóxido de carbono e até cinquenta vezes mais substâncias cancerígenas do que o fumo que entra pela boca do fumador depois de passar pelo filtro do cigarro. E este fumo expelido pelo tabagista após a tragada contém, em média, um sétimo das substâncias voláteis e particuladas do total inalado (Banegas 1999).

Os dois componentes principais da PTA são o fumo exalado pelo fumador (corrente primária) e fumo que se evola da ponta do cigarro (corrente secundária) contendo, praticamente, todas as substâncias do tabaco e, muitas, em maiores proporções que a corrente principal (Tabela 1). Sendo, esta corrente secundária, a principal componente da PTA, pois é produzida durante 96% do tempo total do consumo dos derivados do tabaco. Contém, em comparação com a corrente principal, três vezes mais nicotina, três a oito vezes mais monóxido de carbono, 47 vezes mais amónia, quatro vezes mais benzopireno e 52 vezes mais dimetil nitrosamina piridil butanona, estes dois últimos, potentes cancerígenos. Os elementos contidos na corrente secundária são partículas de menor diâmetro, penetrando mais facilmente nas vias respiratórias, facilitando a sua chegada aos alvéolos (Jaakkola 1997; Banegas 1999; Borgerding 2005; Pandey 2010).

Tabela 1: Características de diversos componentes do fumo do cigarro na corrente principal e secundária (Banegas 1999)

Características	Corrente principal	Corrente secundária
Tamanho partículas (μm)	0,1-1,0	0,01-1,0
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	800-900 $^{\circ}\text{C}$	600 $^{\circ}\text{C}$
pH	6,0-6,7	6,7-7,5
Oxigénio	0,16	0,02
CO (mg)	19-23	25-100
Amoníaco (μg)	50-130	200-520
Ácido cianídrico (μg)	400-500	40-125
Nitrosaminas (ng)	10-40	200-4000
Acroleína (μg)	60-100	480-1500
Óxidos de nitrogénio (μg)	100-600	400-6000

2. Compostos químicos do tabaco

Presentemente, são identificados aproximadamente 4.720 componentes do cigarro (Repace 2006), muitos dos quais podem contribuir para os efeitos reforçadores positivos do tabaco. Porém, a maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos demonstram que a nicotina é o principal agente responsável pelo desenvolvimento da dependência ao tabaco (Stolerman 1995). Contudo, todos, sem excepção, são elevadamente lesivos para o organismo, tanto para o fumador activo como para o fumador passivo.

O fumo produzido pelo acto de fumar é o resultado da queima incompleta da matéria orgânica existente nos produtos derivados do tabaco e pode variar conforme as características das folhas, o modo como são cultivadas (a quantidade e qualidade dos aditivos químicos que lhes são acrescentados durante o processo de cultivo), a região de origem, as características de preparação (compactação, filtro e papel), armazenamento e industrialização, bem como do aporte de oxigénio e do grau da temperatura existente na ponta dos seus derivados, principalmente na do cigarro (Valle 2007).

Os componentes do tabaco encontram-se sob duas formas no fumo: sob a forma particulada (ou condensada) e sob a forma de gases (Longenecker 2002). A fase particulada corresponde a 95% do fumo e nela é encontrado o componente aditivo, a nicotina e o alcatrão, que é uma mistura de diversos componentes obtidos na destilação de várias substâncias orgânicas, como o petróleo, a madeira e o carvão. Cada partícula de alcatrão é composta por uma variedade de produtos químicos orgânicos, inorgânicos e uma extensa variedade de produtos orgânicos voláteis e semivoláteis. Entre os componentes da fase gasosa que produzem

efeitos indesejáveis estão o monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrogénio, amónia, nitrosamidas voláteis, ácido cianídrico, compostos voláteis contendo enxofre, hidrocarbonetos voláteis, álcoois, aldeídos, cetonas e componentes radioactivos. Algumas das últimas substâncias citadas são potentes inibidoras do movimento ciliar (Banegas 1999; Goodman 2005).

Há evidências de que determinadas doenças provocadas pelo uso crónico do tabaco podem ser conferidas às substâncias químicas isoladas do tabaco. Essas podem ser classificadas de acordo com os seguintes grupos: agentes tóxicos, os responsáveis pela dependência, como a nicotina (provoca alguns efeitos tais como alteração do ritmo cardíaco, dos ácidos gordos livres, colesterol e coagulação sanguínea, pode também causar broncoconstrição, diminuição do consumo de oxigénio e da actividade dos macrófagos alveolares, os quais interferem com a função respiratória), o monóxido de carbono (responsável pelo transporte de oxigénio e dióxido de carbono aos tecidos pela formação de carboxihemoglobina) e outras substâncias podem ser incluídas como ácido cianídrico, amónia e alcalóides do tabaco (lobelina) (Rosemberg 1983).

Vários compostos isolados do tabaco possuem potencial cancerígeno, evidenciando-se as nitrosaminas, a N-nitrosornicotina e polónio 210 (Hoffman 1978). Outras substâncias isoladas que detêm propriedades cancerígenas são fluoranteno, formaldeído e pireno. Atribuem-se também efeitos de iniciação tumoral aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (benzopireno), benzoatraceno e dibenzacridina.

Existem ainda, agentes irritantes ou tóxicos ciliares, sendo os mais relevantes a acroleína, o formaldeído, o ácido cianídrico, os fenóis e os cresóis. Estes compostos são responsáveis pelas reacções irritantes e inflamatórias do tracto respiratório.

Finalmente, os aditivos, estes encontram-se impregnados no tabaco, desde o cultivo até a manufactura, que pode originar precursores irritantes e com acção cancerígena. Existem os nitratos fertilizantes, os insecticidas (DDT), fungicidas (ditiocarbamatos) e o mentol. Os aditivos podem levar à iniciação ou dependência do acto de fumar, como é o caso do ácido levulínico (Keithly 2005).

2.1. A nicotina

2.1.1. Farmacocinética

A nicotina [1-metil-2-(3-piridil) pirrolidina] é um alcalóide de ocorrência natural (Figura 1), encontrado em membros da família das solanáceas, como a batata, pimentão verde e tomate, porém em concentrações muito baixas e em produtos do tabaco (charutos, cigarros, mastigação e rapé) em quantidades elevadas. Nas folhas do tabaco age como um inseticida (Yildiz 2004; Andrew 2006).



Figura 1: *Nicotiana tabacum* (NYBG 2011)

Este alcalóide, de estrutura química ($C_{10}H_{14}N_2$) (Figura 2), é uma amina terciária consistindo numa piridina e um anel pirrolidina (Adnan 2009). É um líquido, incolor, volátil, com $pK_a=8,5$, que se torna castanho e adquire o odor do tabaco na exposição ao ar, tendo meia-vida de aproximadamente duas horas (Benowitz 1996; Goodman 1996; Yildiz 2004).

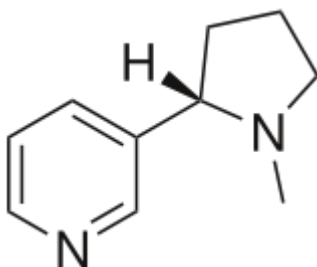


Figura 2: Estrutura química da nicotina (Yusuke 2010).

Pela queima do tabaco são libertadas partículas de dimensões 0.3 a 0.5 μm , que posteriormente são inaladas e conduzidas aos bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares. O

acto de fumar um cigarro faz com que haja uma rápida passagem para a circulação venosa pulmonar, a partir da qual este alcalóide distribui-se rapidamente para o ventrículo esquerdo do coração e depois para a circulação arterial sistémica e cérebro, onde chega rapidamente, num intervalo de 10 a 19 segundos, atravessando facilmente a barreira hematoencefálica e as membranas celulares de todos os órgãos (Henningfield 1993).

A absorção da nicotina depende do pH do fumo: sendo mais ácida, encontra-se portanto mais ionizada e desta forma mais dificilmente atravessa as membranas. O pH é habitualmente 6 e assim a nicotina está ionizada e passa directamente para os bronquíolos e alvéolos, não sendo absorvida pela mucosa oral. Em contacto subsequente com os fluidos fisiológicos que possuem um pH=7.4, atravessa as membranas celulares e os vasos sanguíneos. A nicotina habitualmente encontra-se 69% ionizada e a sua ligação às proteínas plasmáticas é inferior a 5% (Hukkanen 2005).

Dos 600 aditivos que a indústria utiliza no tabaco para torná-lo mais adaptável, vários têm a função de libertar mais nicotina. Entre estes, o mais importante é a amónia. Esta é alcalina e eleva o pH da nicotina (Henningfield 1993; Slade 1993) e deste modo eleva-se a nicotino-dependência, tornando o tabagista escravo do cigarro (Lewan 2000).

O processo de biotransformação da nicotina é complexo e a maior parte destes processos de metabolização ocorre no fígado e nos pulmões em menor proporção. Envolve a formação de numerosos metabolitos através de oxidação, hidroxilação e N-desmetilação (Fase I) e também metabolitos da fase II através da conjugação com ácido glucurónico. Existem variações inter-individuais na frequência e padrão do metabolismo de nicotina. Em geral, mais de 70% da nicotina sofre C-oxidação pelas enzimas hepáticas do citocromo P4502A6 (CYP2A6 do sistema, formalmente conhecida como cumarina 7-hidroxilase) para formar a cotinina, o metabolito primário e cerca de 4 a 7% a nicotina-N-óxido, através de N-oxidação. O mecanismo proposto de conversão da nicotina em cotinina (C-oxidação) envolve a hidroxilação da nicotina por enzimas microssomais e a conversão ao correspondente aldeído e posterior produção de cotinina por uma enzima citosólica. O mesmo sistema enzimático é responsável pela hidroxilação da cotinina para produzir trans-3-hidroxicotinina. A conversão de nicotina a nicotina-N-óxido (N-oxidação) envolve uma 3-monooxigenase que contém flavina (FMO3), resultando na formação de dois diastereoisómeros, o cis-1'-(R)-2'-(S) e trans-1'-(R)-2'-(S) isómeros. A nicotina tem um reduzido tempo de meia-vida plasmático, apenas de 1-2 h. No entanto a cotinina e trans-3-hidroxicotinina têm tempos de meia-vida aproximadamente 20 e 15 horas, respectivamente (Moyer 2002; Insook 2004) e por isso são considerados potencialmente úteis como biomarcadores de avaliação da exposição à nicotina (Benowitz 1984; Cashman 1992; Nakajima 1996; Pellegrini 2007; Benowitz 2009).

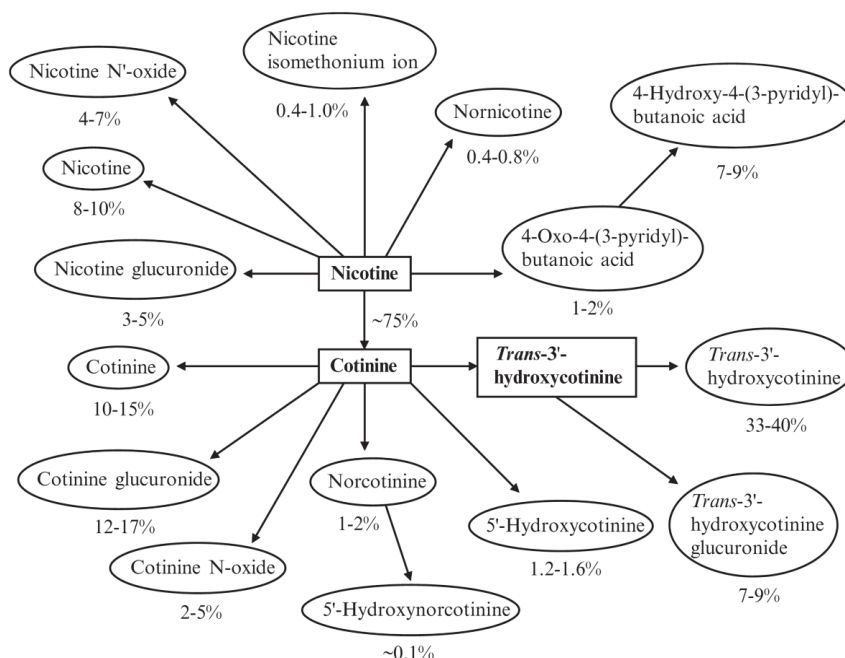


Figura 3: Esquema quantitativo do metabolismo da nicotina, baseado em estimativas da excreção média de metabólitos como percentagem urinária (Benowitz 2009).

Em média, 70% da nicotina é metabolizada a nível hepático. Factores que alteram o fluxo hepático, tais como comer, postura e exercícios reduzem o fluxo sanguíneo hepático e a taxa do metabolismo da nicotina (Benowitz 1997).

A nicotina por filtração glomerular e secreção tubular é excretada conforme o pH. Quando se encontra alcalina e por conseguinte na forma não ionizada, aumenta a absorção tubular e portanto há menor excreção pelo que fica em concentrações superiores na circulação (Benowitz 1996). A cotinina sofre maior metabolização, originando trans-3-hidroxicotinina (Figura 3) (Moyer 2002). Em estudos efectuados com seres humanos, onde o pH da urina se encontrava alterado, a eliminação renal era responsável por 10-15% da eliminação directa da nicotina, sendo dependente do pH. A ingestão de álcool em associação com o fumo aumenta a eliminação da nicotina uma vez que este acidifica a urina (Green 1996).

2.1.2. Farmacodinâmica

A nicotina executa a sua acção farmacológica unindo-se a receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR), localizados nos corpos celulares e terminais dos neurónios dopaminérgicos da área tegmental ventral. Esses receptores são pentâmeros constituídos por diversas combinações de subunidades (Picciotto 2000). São encontrados em diferentes regiões cerebrais e alteram de acordo com a afinidade de ligação e a resposta à estimulação pelos seus agonistas. Esta variação na estrutura e na função auxilia na explicação relativa à diversidade de efeitos ocasionados pela nicotina (Zevin 1998).

Os receptores nicotínicos são canais iónicos regulados por ligandos, existindo três classes principais: os musculares, ganglionares e do sistema nervoso central. Quando a nicotina se une ao seu receptor sucede uma modificação alostérica nas subunidades, originando um estado de activação com a abertura do canal iónico e um estado de dessensibilização com o fecho do canal. A activação destes receptores produz a libertação de neurotransmissores (NT), como a acetilcolina (ACh), dopamina (DA), norepinefrina, serotonina, beta-endorfina, glutamato, entre outros (Zevin 1998).

Em pequenas doses a nicotina provoca uma activação através dos receptores periféricos ou de um efeito directo no cérebro, que resulta no aumento nos batimentos cardíacos e pressão sanguínea. Com um aumento da dose, a nicotina actua directamente no sistema nervoso periférico, originando estimulação ganglionar e libertação de catecolaminas. Já em doses muito elevadas causa hipotensão e bradicardia (Zevin 1998).

A administração crónica de nicotina faz com que ocorra um aumento substancial do número de receptores nicotínicos da acetilcolina, o que leva a uma resposta adaptativa à dessensibilização prolongada do receptor (Rang 2004).

2.1.3. Efeitos da nicotina no Sistema Nervoso Central (SNC)

As drogas que levam à dependência têm em comum a propriedade de criar efeitos euforizantes ou prazerosos e assim agirem como reforçadores positivos. Este efeito reforçador positivo das drogas é resultante da activação do sistema dopaminérgico meso-corticolímbico, que faz parte do sistema de recompensa e possui como componentes essenciais a área tegmental ventral (sítio de corpos celulares de neurónios dopaminérgicos) e as suas projecções para regiões do sistema límbico incluindo o núcleo accumbens, o tubérculo olfactivo, a amígdala e o córtex frontal e límbico (Koob 2001).

A nicotina age por duas vias: por um lado activa os centros dopaminérgicos, os quais são responsáveis pela libertação de dopamina aumentando as concentrações deste neurotransmissor (NT) preferencialmente no núcleo accumbens; por outro, diminui a concentração da enzima monoamino oxidase (MAO) no cérebro, pelo que perde a sua actividade. Em consequência, a dopamina permanece íntegra e a sua libertação é maior (Chiara 2000). Esta repetição da exposição à nicotina sobre o cérebro produz uma neuroadaptação (Balfour 1996; Benowitz 1996).

2.1.4. Efeitos da nicotina no Sistema Nervoso Periférico (SNP)

A nicotina exerce os seus efeitos sobre a função cardiovascular via estimulação simpática neuronal. Estes são mediados por diversos mecanismos, podendo suceder pela activação de quimiorreceptores periféricos e efeitos directos no tronco cerebral, originando um aumento da frequência cardíaca, da contracção do coração, vasoconstrição coronária e da pressão arterial e secreção de adrenalina e noradrenalina pela medula adrenal. Contribuindo assim para os danos cardiovasculares devido à libertação da hormona antidiurética pela hipófise posterior, levando à redução do fluxo urinário e aumento da concentração plasmática de ácidos gordos livres (Rang 1996).

2.1.5. O mecanismo de adição da nicotina

Os fumadores regulares tornam-se adictos da nicotina, sendo esta adição descrita pela busca e utilização compulsiva da droga (Volkow 2006).

A activação da via dopaminérgica provoca o efeito reforçador positivo que abrange relaxamento, aumento do estado de vigília, redução do stress, modulação do humor, perda de peso e melhora da função cognitiva. Já o efeito reforçador negativo reporta-se aos sintomas de ausência da nicotina, como o nervosismo, irritabilidade, ansiedade, concentração e função cognitiva prejudicada, além do ganho de peso devido ao aumento do apetite (Volkow 2006).

2.2. Marcadores biológicos

Um biomarcador, ou marcador biológico, é uma substância, em geral utilizada como um indicador do estado biológico. É objectivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (Benowitz 1999; Santos 2008).

Em geral, evidenciam-se dois tipos de marcadores: indicador de traço (também designado de marcador de efeito ou marcador de dano potencial) que reconhece uma característica duradoura e estável, uma condição contínua. Abrangem a detecção de sinais “pré-clínicos” ou clínicos de doença (consequências biológicas, modificações na morfologia, estrutura ou função, alterações que antecedem o quadro clínico e sintomas clínicos consistentes com o dano). E o marcador de estado (denominado de marcador de exposição) que reconhece uma irregularidade. Incide uma situação transitória de um sujeito, tal como o nível de actividade de uma alteração ou o uso recente de uma droga, reflectindo assim a história mais breve do

seu consumo. Estes biomarcadores servem para revelar agentes nocivos existentes no ambiente ou detectar prematuramente populações de risco. Incluem também a concentração da substância ou dos seus metabolitos em fluidos biológicos, tendo como finalidade focar a absorção de uma substância e até estimar a sua dose interna e biologicamente efectiva. Consegue-se desta forma reconhecer um indicador biológico em cada parte do processo de um composto dentro do organismo, desde sua absorção, acção (metabolização) e excreção (Santos 2008).

A acção de fumar e da queima de produtos que possuem tabaco, resulta numa mistura complexa de inúmeros compostos numa fase gasosa e particulada que não podem ser quantificados por inteiro, como um todo. Desta forma analisam-se marcadores, como a nicotina e partículas respiráveis suspensas de forma a quantificar a exposição ao fumo ambiental (Calheiros 2006).

Existem vários marcadores de exposição do tabagismo, como os metabolitos em fluidos biológicos (a cotinina), os compostos não-metabolizados (o monóxido de carbono, a nicotina sérica e os compostos carcinogénios no sangue ou em órgãos específicos), os biomarcadores de exposição isolada a cigarros (monóxido de carbono exalado ou nicotina sérica). Entre os biomarcadores de dano potencial estão as mutações em tecidos (Santos 2008).

As características que hipoteticamente levam a designar um marcador como ideal para investigação de exposição nicotínica são: a exclusividade para a exposição tabágica ambiental; a fácil detecção; a relação aos outros componentes importantes da exposição tabágica ambiental, bem como estabilidade em diferentes condições ambientais. Além disso, a validade de um biomarcador depende da precisão, que pode ser influenciada por diferenças individuais nas taxas ou padrões de metabolismo ou de excreção, a presença de outras fontes (tais como a dieta), da química, sensibilidade e especificidade dos métodos analíticos utilizados (Benowitz 1999; Trullén 2006).

Muitos dos vários compostos usados como biomarcadores de tabagismo, tais como monóxido de carbono ligado à hemoglobina ou tiocianato em amostras de plasma ou urina, têm uma limitada capacidade de reflectir a exposição ao fumo ambiental devido à falta de especificidade ou sensibilidade. A falta de sensibilidade de alguns dos biomarcadores para o fumo do tabaco ambiental é muitas vezes relacionada com exposição a substâncias químicas iguais ou semelhantes através da dieta, outros factores do estilo de vida, ou do ambiente (Husgafvel-Pursiainen 2002). A nicotina também não é um bom biomarcador, uma vez que é extensivamente biotransformada em vários metabolitos e apresenta um tempo de meia-vida curto. Podem ser medidos, outros metabolitos da nicotina, como a cotinina, norcotinina e trans-3-hidroxicotinina (Petersen 2010).

2.2.1. Cotinina & Trans-3-hidroxicotinina

A cotinina, principal metabolito da nicotina, pode ser doseado no sangue, fluido oral ou urina. Possui um tempo de meia-vida de aproximadamente 20-40 horas, mas dependendo do grau e tipo de exposição, pode ser usada como marcador até 2 ou 3 dias após exposição à nicotina (Benowitz 2005).

Cerca de 80% da nicotina inalada é absorvida pelo sangue e transformada em cotinina. A sua detecção e quantificação é considerada como padrão fundamental para definir o comportamento tabágico por ser quase específica para o consumo de nicotina. Os níveis usados como ponto de corte tanto para a cotinina plasmática como para salivar são de 15 ng/mL, enquanto para a urinária é de 50 ng/mL (Benowitz 2000). A concentração na saliva de cotinina está relacionada com o número de cigarros fumados, sendo que sua concentração aumenta linearmente com o consumo de até 20 cigarros/dia, estabilizando a partir desse número (Blackford 2006).

Embora existam muitos estudos sobre o metabolismo da nicotina, o metabolismo da cotinina tem sido menos bem caracterizado. A (S)-cotinina é metabolizada principalmente a (3'R, 5'S)-trans-3-hidroxicotinina (3-HC) (Figura 4). Em humanos a cotinina é pouco metabolizada ao estereoisómero (3'R, 5'S)-cis-3-hidroxicotinina, embora pareça ser maior em algumas espécies animais. 3-HC é, em média, o mais abundante metabolito da nicotina encontrado na urina, representando aproximadamente 40% da dose de nicotina (Benowitz 2001), a CYP2A6 é a principal enzima responsável por esta hidroxilação.

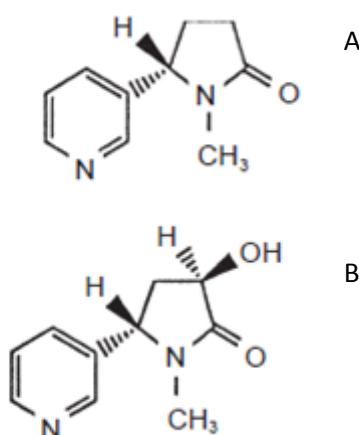


Figura 4: Estrutura química da cotinina (A) e trans-3-hidroxicotinina (B).

Uma vez que a cotinina não se liga de forma apreciável às proteínas plasmáticas, ocorre uma extensiva reabsorção tubular. A excreção de cotinina é menos influenciada pelo pH urinário do que a nicotina, já que é menos básica e desta forma está na forma não-ionizada. Sendo assim, a concentração da cotinina é mais elevada na urina do que em outros fluidos

biológicos, já que a principal via de excreção é a renal. Por outro lado, os níveis urinários de cotinina podem ser detectados até 60 horas depois de cessada a exposição (Hukkanen 2005). Este metabolito primário é muito mais polar que a nicotina e é metabolizado de forma mais lenta (Zevin 1997).

O ratio trans-3-hidroxicotinina/cotinina medido no plasma e no fluido oral é altamente correlacionado com a eliminação oral da nicotina. Pelo que essa relação é útil como marcador não invasivo da taxa de metabolismo da nicotina (Tutka 2005).

As preocupações relativas às limitações destes biomarcadores incluem: a) concentração de nicotina no ar não é um bom marcador da PTA porque é altamente variável, depende de factores dentro de um espaço como as superfícies, taxa de ventilação, tempo desde que se fumou, padrões de distribuição do ar, entre outros; b) o ratio de emissão de nicotina para a emissão de partículas respiráveis em suspensão não é constante numa ampla variedade de cigarros; c) a exposição ao vapor da nicotina na ausência de outros componentes PTA pode ocorrer; d) não há nenhum método padrão para a determinação de nicotina e os seus metabolitos nos fluidos biológicos, e) diferenças interindividuais nas taxas e padrões de metabolismo da nicotina e cotinina podem levar a que a cotinina seja um biomarcador de limitada utilidade e f) a exposição à nicotina na dieta pode causar confusão nas determinações de nicotina e cotinina em amostras biológicas (Benowitz 1999). Além destas restrições, o uso concomitante de certas medicações pode elevar os seus valores. As grávidas metabolizam a cotinina mais rapidamente devendo então ser considerado que o tempo de meia-vida fica reduzido. Existem diferenças no metabolismo também entre diferentes raças, sendo que nos afro-americanos e chineses a metabolização ocorre de forma mais lenta (SRNT 2002). Isto pode explicar a maior incidência de cancro de pulmão relacionado com o tabaco nestes diferentes locais. Tais diferenças de metabolismo parecem ser consistentes com os dados epidemiológicos. Disparidades raciais e individuais no metabolismo da nicotina podem ser um resultado de factores genéticos e/ou ambientais (Tutka 2005).

3. Amostras biológicas: Fluido oral

A saliva é hoje utilizada como uma alternativa ao sangue (que é a matriz mais comumente usada nos procedimentos de diagnóstico laboratorial) em algumas aplicações na monitorização terapêutica de fármacos e para a determinação de drogas (Shakleya 2009; Concheiro 2010). Porém, hoje, o termo fluido oral é preferível, porque saliva significa, especificamente, a secreção das glândulas salivares, enquanto fluido inclui secreções salivares de glândulas, assim como vários componentes de origem não salivar, fluido gengival, expectorado de secreção brônquica e nasal, derivados de soro e sangue de lesões bucais,

bactérias e produtos de bactérias, vírus e fungos, células epiteliais descamadas, outros componentes celulares e restos alimentares. Esta amostra biológica tem propriedades protectoras e contém uma variedade de componentes antimicrobianos e factores de crescimento. Além disso, possui funções de lubrificação e auxilia na digestão dos alimentos (Zelles 1995; Hans 2005; Gallardo 2008).

Este fluido pode ser colectado com ou sem estímulo. Pode ser estimulado pela acção de mastigar ou por aplicação de pastilhas de ácido cítrico, tefflon, etc. Este processo de estimulação afecta obviamente a quantidade de fluido oral, as concentrações de alguns componentes e leva a um aumento do pH do fluido. O processo sem qualquer estimulação origina um fluxo salivar que pode ser mais afectado pelo grau de hidratação, pelo estímulo olfactivo e a exposição à luz. O melhor procedimento de recolha do fluido oral é o método de drenagem, em que o fluido oral é deixado a escorrer do lábio inferior ou em alternativa cuspir (Navazesh 1993; Kaufman 2002; Gallardo 2008).

Esta amostra biológica oferece algumas vantagens distintas quando comparadas a outras matrizes, já que o processo de recolha é fácil, não-constrangedor e não-invasivo, não sendo portanto necessário nenhum equipamento especial para a recolha (Choo 2004; Gallardo 2008; Langel 2008). Além disso, dificulta a adulteração às drogas/tóxicos já que permanecem inalterados. Como desvantagens, a janela de detecção é de apenas horas, o volume de amostra é limitado (média 0,6 mL/min) e a concentração dos analitos é baixa. Outros factores como a contaminação por alimentos e bebidas, assim como drogas que são fumadas, inaladas ou tomadas por via oral podem também contaminar esta matriz (Wendy 2009; Gallardo 2008; Concheiro 2010).

Na tabela 2, apresenta-se um quadro resumo das metodologias desde 2009 até actualidade que permitem a quantificação de nicotina e metabolitos em fluidos biológicos. Estes trabalhos foram pesquisados na base de dados *Medline* efectuando uma busca com as palavras chave “*nicotine and metabolites*”.

Tabela 2: Revisão de metodologias analíticas na determinação de nicotina e metabolitos em fluidos biológicos (2009- 2011).

Referência	Analito	Amostra (volume)	Técnica extracção	Análise	Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	Recuperação (%)
Gray 2009	Drogas de abuso (Nicotina e metabolitos)	Mecónio (250 mg)	SPE	LC-MS/MS	Nicotina LOD e LOQ 2,5 ng/mL Cotina LOD 0,5 e LOQ 1 ng/mL Trans-3-hidroxicotina LOD e LOQ 5 ng/mL	97-104
Shakleya 2009	Opiáceos, cocaína, nicotina e metabolitos	Cérebro (100 mg)	SPE	LC-MS/MS	Nicotina LOD 125 e LOQ 250 pg/mL Cotina LOD 12,5 e LOQ 25 pg/mL Trans-3-hidroxicotina LOD 25 e LOQ 50 pg/mL	91-109
Shakleya 2009	Nicotina, cotina, trans-3-hidroxicotina e norcotina	Plasma (0,2 mL)	SPE	LC-MS/MS	Nicotina LOD 0,5 e LOQ 1 ng/mL Cotina LOD 0,5 e LOQ 1 ng/mL Trans-3-hidroxicotina LOD 2,5 e LOQ 5 ng/mL	73-124
Shakleya 2009	Nicotina, cotina, trans-3-hidroxicotina e norcotina	Fluido oral (0,5 mL)	SPE	LC-MS/MS	Nicotina LOD 0,5 e LOQ 1 ng/mL Cotina LOD 0,1 e LOQ 0,2 ng/mL Trans-3-hidroxicotina LOD 0,3 e LOQ 0,5 ng/mL	91-112
Massadeh 2009	Nicotina e Cotina	Urina e sangue (0,5 mL)	LLE	RP-HPLC e GC-MS	HPLC: Nicotina LOD 10 e LOQ 0,9 ng/mL Cotina LOD 0,5 e LOQ 1 ng/mL em plasma GC-MS: Nicotina LOD 0,25 e LOQ 0,8 ng/mL Cotina LOD 0,2 e LOQ 0,8 ng/mL em plasma	85-101
Marclay 2010	Nicotina e metabolitos	Urina (1 mL)	LLE	HILIC-MS/MS	LOD 500 pg/mL e LOQ 10 ng/mL para todos os compostos	70-99
Lafay 2010	Cotina	Urina (2,5 mL)	MEPS	CG-MS	LOQ 0,8 ng/mL	60
Concheiro 2010	Metadona, cocaína, opiáceos, nicotina e metabolitos	Fluido oral (0,25 mL)	SPE	LC-MS/MS	Nicotina LOD 0,5 e LOQ 1ng/mL Cotina e trans-3-hidroxicotina LOD 0,4 e LOQ 0,5 ng/mL	85-102

Iwasaki 2010	Nicotina e metabolitos	Cordão umbilical (Soro 0,1 mL)	SPE	HILIC- MS/MS	Nicotina LOD 0,5 e LOQ 5 ng/mL Cotina e trans-3- hidroxicotina LOD 0,5 e LOQ 1 ng/mL	86-107
Miller 2010	Marcadores da nicotina	Fluido oral (0,5 mL)	SPE	LC- MS/MS	Nicotina LOD 0,5 e LOQ 1 ng/mL Cotina e trans-3- hidroxicotina LOD 0,25 e LOQ 1 ng/mL	85-105
Joya 2010	Drogas de abuso (Nicotina e cotina)	Placenta (1000 mg)	SPE	GC-MS	Nicotina LOD 4,6 e LOQ 13.9 ng/mL Cotina LOD 0,7 e LOQ 2.1 ng/mL	37-83
Miller 2010	Oito metabolitos da nicotina e dois alcalóides	Urina e plasma (1 mL)	SPE	LC- MS/MS	Nicotina LOD 0,75 e LOQ 1 ng/mL Cotina LOD 0,25 e LOQ 1 ng/mL Trans-3- hidroxicotina LOD 0,25 e LOQ 1 ng/mL	65-85
Concheiro 2011	Metadona, cocaina opiáceo, nicotina e metabolitos	Suor (0,7 mL)	SPE	LC- MS/MS	Cotina e trans-3- hidroxicotina LOD 0,75 ng/mL	92-97
Jacob 2011	Nicotina e metabolitos	Fluidos biológicos- plasma, saliva e urina (1 mL)	LLE	LC- MS/MS	Cotina LOQ 0,02, 0,02, 0,05 ng/mL para plasma, saliva, urina, respectivamente Trans-3- hidroxicotina LOQ 0,02, 0,02, 0,10 ng/mL para plasma, saliva, urina, respectivamente	53-65
Pedrouzo 2011	Drogas de abuso (Nicotina e metabolitos)	Água (0,5 mL)	SPE	LC- MS/MS	LOQ 10 ng/mL	52-74

4. Procedimentos de preparação das amostras

O desenvolvimento de um método analítico completo inclui uma série de etapas desde a colheita da amostra até ao relatório final dos resultados. Passos intermediários envolvem o armazenamento de amostras, preparação de amostras, isolamento dos analitos, a sua identificação e finalmente a quantificação (Berrueta 1995).

Nas últimas duas décadas, têm sido desenvolvidos instrumentos analíticos sofisticados, dedicados principalmente à separação e detecção de compostos químicos. Em comparação, os avanços no campo da preparação da amostra têm sido mais modestos. Esta etapa, a preparação da amostra, é a mais tediosa e demorada, corresponde normalmente a mais de 60% do tempo total de análise e é a maior fonte de imprecisões e inexactidões. Estes passos e a sua qualidade determinam sem dúvida o sucesso de uma análise. O desenvolvimento de processos mais rápidos, mais rentáveis e ambientalmente amigáveis é uma necessidade premente (Tuulia 2008).

O objectivo da preparação da amostra para análise cromatográfica é extrair o analito da matriz original para um solvente. Este é frequentemente considerado como um passo fundamental nos procedimentos de análise porque ajuda a melhorar a sensibilidade da metodologia (Rehim 2004). O modo como a matriz é manipulada é um factor muito importante, uma vez que disso vai depender a reprodutibilidade dos resultados já que pode influenciar negativamente o rendimento de extracção e por conseguinte de todo o processo.

Existem muitas técnicas de preparação que podem ser usadas individualmente ou sequencialmente de acordo com a complexidade da amostra, natureza da matriz e o tipo de analitos. Igualmente crucial é a velocidade de extracção, a complexidade da instrumentação, simplicidade, flexibilidade e robustez da metodologia a desenvolver (Berrueta 1995). A extracção selectiva de analitos tem por base as diferenças de propriedades químicas e físicas, entre as quais, massa molecular, solubilidade, polaridade e volatilidade. Pode ser afectada pela sua interacção com a matriz e a sua eficiência estará em função de factores como a composição da amostra, tipo de solvente a utilizar e a sua concentração, o tempo de extracção, a temperatura, entre outros. Idoneamente, o procedimento deve ser altamente reprodutível, com elevada recuperação, totalmente automatizado e envolver um mínimo número de passos (Altun 2004).

As técnicas mais comumente utilizadas para extracção e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extracção líquido-líquido, extracção em fase sólida, extracção de fluidos supercríticos e extracção com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas. Estas técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para uso em análises de rotina já que diminuem o tempo de assistência do analista durante a

análise, evitam o risco de contacto com substâncias prejudiciais à saúde e aumentam, significativamente, o número de análises de amostras por tempo. Estes procedimentos podem ser subdivididos em dois modos: “off-line” onde a etapa de extracção e/ou concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico e “on-line” onde a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injector (Queiroz 2001).

Hoje em dia existem outras técnicas que surgiram na década de 90, como SPME (microextracção em fase sólida), MEPS (microextracção em seringa empacotada), SBSE (extracção sortiva em barra de agitação), LPME (microextracção em fase líquida), SDME (microextracção em gota suspensa), SPDE (extracção dinâmica em fase sólida) entre outras (Kataoka 2010).

5.Extracção em fase sólida

A extracção em fase sólida (SPE) é uma técnica rápida e selectiva de preparação de amostras. A versatilidade da SPE permite o seu uso para fins diversos, tais como, a remoção de compostos interferentes utilizando solventes apropriados de lavagem (purificação); pré-concentração da amostra; o fraccionamento da amostra para a análise de diferentes compostos com características físico químicas diferentes; armazenamento de analitos que são instáveis em meio líquido ou com volatilidade relativamente elevada (Berrueta 1995; Žwir-Ferenc 2006; Tuulia 2008).

O princípio da SPE é semelhante ao da extracção líquido-líquido (LLE), envolvendo uma separação de solutos entre duas fases. No entanto, em vez de duas fases líquidas imiscíveis, como na LLE, a SPE envolve a separação entre um líquido (amostra ou solvente com analitos) e uma fase sólida (adsorvente). Pode-se resumir o procedimento experimental em cinco etapas (Figura 5, Tabela 3):

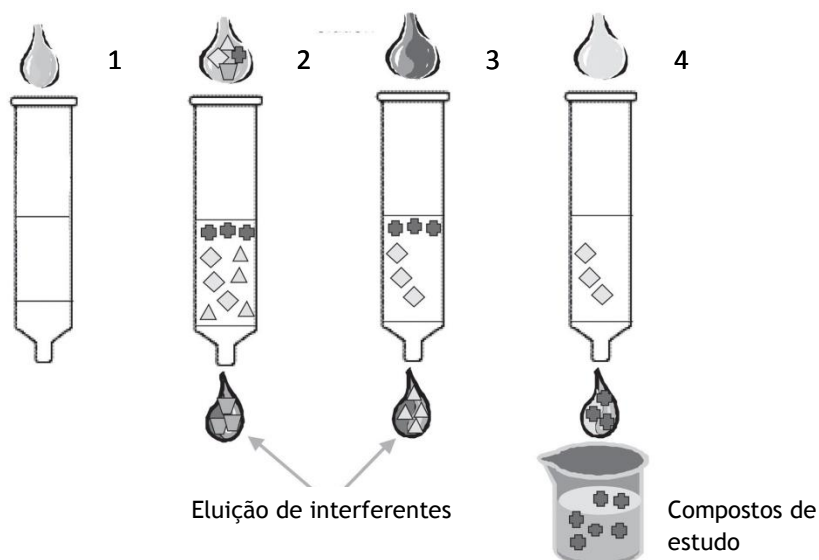


Figura 5: Representação esquemática das etapas do método de SPE (1- Acondicionamento; 2- Aplicação da amostra; 3- Lavagem; 4- Eluição dos compostos) (Biotage 2011).

Tabela 3: As etapas do procedimento geral da extracção em fase sólida (Berrueta 1995; Queiroz 2001; Telepchak 2004; Żwir-Ferenc 2006)

<p>1. Acondicionamento</p> <p>Esta etapa facilita a activação dos grupos funcionais do adsorvente pela passagem de um solvente apropriado e normaliza o ambiente da coluna para a amostra.</p> <p>O adsorvente deve ser precedentemente acondicionado, uma vez, que este material quando seco está orientado de forma aleatória para a superfície.</p> <p>A amplitude do acondicionamento resulta da polaridade do solvente requerido com o grupo orgânico ligado, de facto, quando o adsorvente está completamente exposto pode ocorrer uma maior interacção entre o soluto e a fase orgânica.</p>
<p>2. Aplicação da amostra</p> <p>Difusão da amostra através do adsorvente por gravidade ou aspiração por vácuo. Este processo permite a ligação dos compostos aos grupos funcionais do adsorvente (etapa de retenção ou adsorção).</p>
<p>3. Lavagem</p> <p>Remoção de compostos interferentes retidos com um solvente que não remove os analitos em estudo. Consiste numa série de aplicações de solventes, geralmente aumentando a ordem de polaridade ou de intensidade de eluição.</p>
<p>4. Secagem</p> <p>Remoção (por vácuo ou ar) de componentes que possam contaminar o extracto e preparação do adsorvente para mudar a utilização de solventes orgânicos que são imiscíveis com os solventes de lavagem.</p> <p>A água retida nos poros mais pequenos da coluna e a adsorvida na superfície da sílica pode afectar eventualmente a recuperação dos analitos, pelo que deve ter-se especial atenção na escolha do solvente de eluição para a etapa posterior.</p>
<p>5. Eluição</p>

Quebra mecanismos de ligações funcionais e libertação selectiva dos compostos para colecta e análise. Os diferentes mecanismos de retenção ou de eluição são devido a forças intermoleculares entre o analito, os sítios activos na superfície do adsorvente e a fase líquida ou matriz. A escolha do solvente de eluição deve ser efectuada tendo em conta a solubilidade dos analitos e deve ser também harmonizável com o método cromatográfico de análise.

É útil considerar as semelhanças da SPE e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em ambos os casos, ocorre um particionamento entre a fase móvel e fase estacionária. É claro que a eficiência e resolução do HPLC são muito maiores do que a SPE devido a um muito maior número de pratos teóricos. Para o desempenho ideal, cada passo SPE deve promover retenção total ou eluição completa dos compostos-alvo, ou secundariamente, fornecer a limpeza da amostra. O sucesso desses processos é dependente de aspectos químicos e físicos da extracção (Telepchak 2004).

5.1. Processo e mecanismo de extracção em fase sólida

A extracção em fase sólida é um processo alcançado pela interacção de três componentes: o adsorvente, o analito e o solvente. O analito deve ser retido com mais força para o adsorvente que para a matriz. A selecção do adsorvente depende das características do analito, da matriz e do método analítico, mas também depende das impurezas que devem ser separadas do analito.

Para a selecção do solvente, a força eluotrópica de adsorção em sílica ϵ° e o índice de polaridade p' são muito úteis na elaboração de procedimentos de extracção. O índice de polaridade é uma medida precisa da polaridade do solvente para a extracção líquido-líquido (medida da capacidade do solvente para interagir como dador de protões, receptor de protões ou dipolo). A escolha de um solvente de eluição é determinado pela relação entre ϵ° e da polaridade do analito. Os graus ϵ altos do metanol (0,73) são a base para a sua selecção como um eluente para a remoção de analitos moderadamente polares e fortemente polares de adsorventes polares. O metanol é único na sua interacção com ambos os grupos apolares e polares. Cloreto de metileno ($\epsilon^\circ = 0,32$) é frequentemente eluído com analitos apolares efectivamente a partir de fases apolares (Telepchak 2004).

A separação do analito dos interferentes na técnica de SPE pode ser realizada pelas três seguintes formas:

- Extracção selectiva: na camada de adsorvente durante o processo de enriquecimento os componentes seleccionados são mantidos e as impurezas não são retidas na camada;
- Lavagem selectiva: o composto de interesse e as impurezas são retidos na camada de adsorvente quando a amostra passa. As impurezas são lavadas através de soluções de lavagem

que são suficientemente fortes para removê-las, mas fracos para não remover os analitos de interesse;

- Eluição selectiva: os analitos de interesse são eluídos num solvente (Žwir-Ferenc 2006).

A selecção de um adsorvente apropriado na extracção depende da compreensão do mecanismo de interacção entre o adsorvente e o analito de interesse, isto é, depende do conhecimento das propriedades hidrofóbicas, polares e interacções iónicas do soluto e o adsorvente. Os mecanismos de retenção mais comuns em SPE são baseados em forças de Van der Waals (interacções não-polares), ligações de hidrogénio, forças dipolo-dipolo (interacções polares) e as interacções catião-anião (interacções iónicas).

Cada adsorvente oferece uma combinação única dessas propriedades que podem ser aplicadas a uma ampla variedade de extracções. Na tabela 4 encontram-se as principais interacções existentes:

Tabela 4: Grupos mais frequentemente usados como adsorventes e suas características (Žwir-Ferenc 2006)

Fase reversa
Envolve uma amostra polar ou moderadamente polar (fase móvel) e uma fase estacionária apolar (o material adsorvente é hidrofóbico constituído unicamente por grupos alquilo). Das fases estacionárias apolares mais utilizadas evidenciam-se as octasilano (C ₈), octadecilsilano (C ₁₈), etilsilano (C ₂), butilsilano (C ₄), fenilsilano e ciclohexilsilano. O analito de interesse é tipicamente apolar. A retenção dos analitos com soluções polares (água, por exemplo) é devido principalmente às forças atractivas entre as ligações carbono-hidrogénio do analito e os grupos funcionais da superfície do adsorvente. Os solventes não polares, que podem perturbar as forças entre o adsorvente e o composto, são usados para a eluição.
Fase normal
Envolve um analito polar, uma matriz apolar (por exemplo, acetona, solventes clorados e hexano) e uma fase estacionária polar (contém grupos funcionais polares, tais como hidroxilo, cianeto ou amina). A retenção é devido à interacção entre os grupos funcionais polares do analito e grupos polares na superfície do adsorvente, estas incluem ligações de hidrogénio, interacções π-π, entre outras. Um composto adsorvido por estes mecanismos é eluído com um solvente que interrompe o mecanismo de ligação, geralmente um solvente que é mais polar que a amostra. Estas sílicas, devido aos seus grupos funcionais polares, são muito mais hidrofílicas relativamente às sílicas de fase reversa. Estes adsorventes podem ser usados para adsorver compostos polares a partir de matrizes apolares.
Troca iónica
Compostos aniónicos (carga negativa) podem ser isolados num grupo amina quaternário, que estejam ligados à superfície da sílica. Compostos catiónicos (carga positiva) são isolados utilizando a sílica com grupos de ácido sulfónico alifático ligados na sua superfície. O principal mecanismo de retenção do composto é baseado principalmente na atracção electrostática do grupo funcional do analito para o grupo que está ligado à superfície da sílica. Os solventes de eluição são soluções básicas, ácidas ou tampões de força iónica elevada.

5.2. Adsorventes para extracção em fase sólida

O tipo de adsorventes utilizado na SPE é responsável pela eficiência do processo de extracção. A disponibilidade de diferentes materiais é uma das vantagens que as técnicas de adsorção possuem. Assim, quando novos materiais estão a ser desenvolvidos, é igualmente importante definir tanto a sua estrutura química, que determina o tipo de interacções, morfologia (ou seja, área de superfície específica, distribuição de diâmetro dos poros, tamanho de partículas, etc.), como as propriedades mecânicas e finalmente, a estabilidade da resina. Classicamente, os materiais correntes são divididos em sílica, carbono e adsorventes poliméricos macroporosos (Simpson 2000; Telepchak 2004).

A sílica é um material sólido, amorfo e poroso. Este polímero inorgânico tem um *backbone* rígido, que mostra pouco ou nenhum inchaço/encolhimento numa ampla gama de solventes. Permutadores de iões nos *backbones* da sílica recuperam rapidamente com mudanças de pH ou solventes.

A química da superfície da sílica é dominada pela presença de grupos hidroxilo, que se encontram no final da cadeia do polímero, permitindo adicionar uma grande variedade de diferentes grupos funcionais para aumentar a selectividade. Estes grupos polares são vulgarmente designados de silanol (SiOH) e devem cobrir toda a superfície da sílica, actuando como pontos de sequestro para a ligação de vários químicos. As fortes energias de absorção que possuem levam por vezes a uma ligação irreversível de compostos na superfície de sílica e esse factor pode limitar a eficácia deste material como adsorvente, especialmente para a separação em fase normal (Simpson 2000; Telepchak 2004).

Outros materiais de particular interesse modificados quimicamente são adsorventes de troca iónica, como os adsorventes poliméricos de modo misto, que combinam um esqueleto polimérico com grupos de troca iónica, para que possam misturar dois tipos de interacção - fase reversa e troca iónica. Estes materiais de modo misto são aplicados principalmente para extrair analitos a partir de matrizes complexas, como amostras alimentares, fluidos biológicos, tecido animal e águas residuais. O benefício da capacidade de troca iónica é que tanto os analitos como as interferências na amostra ou mesmo a capacidade de exigibilidade do adsorvente (no caso de adsorventes fracos de troca iónica) podem ser trocados durante as diferentes etapas da SPE, permitindo assim a eliminação de interferentes na etapa de lavagem e eluição dos analitos de forma mais selectiva, usando para tal apenas uma combinação de pH apropriado em cada etapa. Adsorventes de modo misto de troca iónica são projectados especificamente para interagir com espécies iónicas. No entanto, eles também podem efectivamente conservar as espécies não-carregadas através de interacções hidrofóbicas e hidrofílicas (Fontanals 2007).

Oasis[®] MCX (modo misto com troca catiónica) é classificada como resina de troca iónica forte, devido ao alto comportamento ácido e básico do grupo iónico que tem esqueleto Oasis[®] HLB (polivinilpirrolidona divinilbenzeno, fase reversa) quimicamente modificado com ácido sulfónico (Figura 6). Este adsorvente possui uma alta capacidade de troca iónica, onde não existem grupos silanol a complicar o modo de manutenção ou desenvolvimento do método. É estável entre pH 0-14, tornando as etapas do processo de extracção de forma simples e rápida. Se o objectivo é capturar os analitos básicos e depois lavar as interferências, as etapas de lavagem devem ser com um pH baixo para obter a máxima retenção. Com este pH, o grupo sulfonato é ionizado e mecanismos com retenção máxima ocorrem. Utilizando um pH elevado, o mecanismo de retenção de troca iónica não está presente, encontra-se apenas a retenção de fase reversa (Waters 2010).

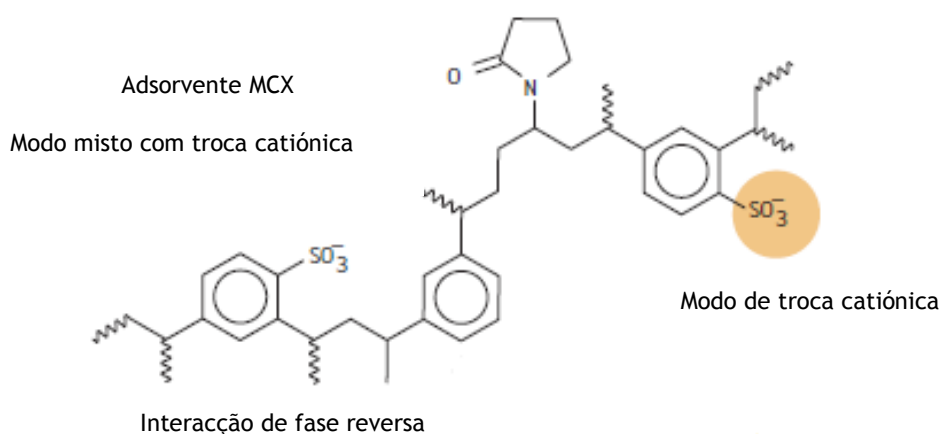


Figura 6: Estrutura química do adsorvente Oasis[®] MCX (modo misto com troca catiónica) (Waters 2010).

5.3. Vantagens da extracção em fase sólida

A SPE comparativamente à LLE necessita de menos tempo para a preparação da amostra (menos etapas) e pode ser completamente automatizada, requerendo menores quantidades de amostra e menor quantidade de solventes permitindo uma selectividade maior. Isto sucede, uma vez, que as colunas possibilitam um volume reduzido e por conseguinte a eluição num menor volume de solvente que pode ser evaporado mais rapidamente. O uso de um pequeno volume de solvente é muito importante hoje em dia, uma vez que custa mais dispor de maiores quantidades de solventes. O desenho da coluna permite também que quase todos os tipos de adsorventes independentemente da sua estrutura morfológica ou química possam ser embalados numa simples maneira (Waters 2010).

O pH na SPE é um parâmetro muito importante. Soluções utilizadas nos procedimentos têm uma gama muito ampla de pH e o material de acondicionamento à base de sílica,

normalmente têm uma faixa de pH estável de 2 a 7. A níveis de pH acima e abaixo deste intervalo, a fase ligada pode ser hidrolisada e clivada para fora da superfície de sílica ou a própria sílica pode ser dissolvida. Na SPE, no entanto, as soluções costumam ter um contacto com o adsorvente por um curto período de tempo e o facto de os cartuchos serem descartáveis e se destinarem a ser usados apenas uma vez, permitem a utilização de qualquer pH de forma a otimizar a retenção ou eluição dos analitos (Waters 2010).

Esta extracção prevê tempos mais curtos no processo, isso é especialmente importante quando várias extracções são necessárias. O analista pode mudar de solventes orgânicos para solventes aquosos e voltar a utilizar solventes orgânicos. Situação que não sucede com a extracção líquido-líquido.

As amostras biológicas são notoriamente complexas e injectá-las em instrumentos analíticos muito sensíveis normalmente não é possível. Com este tipo de extracção aumenta significativamente o tempo de vida útil dos equipamentos, como os sistemas cromatográficos.

As eficiências na extracção habitualmente excedem os 90%. Se não houver esse tipo de recuperação podem não estar ajustados parâmetros (tais como solubilidade, pH e força solvente). Por outro lado, permitem obter resultados reprodutíveis com níveis de concentração de analitos muito baixos. Esta é uma técnica que dá ao analista a capacidade de extrair uma vasta gama de compostos com maior selectividade (Telepchak 2004; Żwir-Ferenc 2006; Waters 2010).

6. Cromatografia gasosa. Versatilidade analítica da espectrometria de massa

Com os progressos tecnológicos em técnicas analíticas, a cromatografia pode ser combinada a vários sistemas de detecção, pois trata-se de uma técnica muito recorrente e de excelente desempenho (Martinez 2009).

A espectrometria de massa (MS) teve o seu início com Joseph John Thomson em 1887. Esta é uma das técnicas analíticas mais úteis e poderosas para a investigação científica, além de poder ser aplicada em várias áreas, como ciências biológicas, biomédicas, geologia, produtos naturais, sequenciamento de proteínas, identificação de marcadores biológicos entre outras. Tem sido muito utilizada para a medida de isótopos e também na determinação estrutural de moléculas orgânicas. Considerada actualmente como a melhor técnica de detecção para cromatografia, devido á alta sensibilidade a pequenas concentrações bem como pelo fornecimento de informações quantitativas e qualitativas de analitos orgânicos e inorgânicos

em misturas complexas, permite também a distinção de diferentes substâncias com o mesmo tempo de retenção. A maior vantagem em relação a outros detectores é o facto de ser altamente selectiva para o analito de interesse na separação cromatográfica.

Este detector é composto por uma 1) fonte de iões, no qual ocorre a ionização dos analitos, 2) um analisador, que faz a separação dos iões e o 3) detector que faz a geração de sinais eléctricos que são mensuráveis (Figura 7) (Bergo 2007; Oliveira 2010).

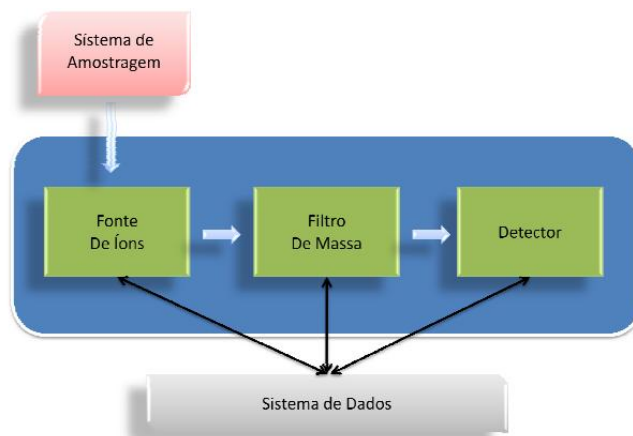


Figura 7: Descrição básica do espectrómetro de massa (Oliveira 2010).

A espectrometria de massa sequencial, também denominada tandem ou MS/MS, é uma técnica espectrométrica que ao invés de utilizar apenas um analisador de massa para separar os iões da mesma razão por carga (m/z) gerados na fonte de ionização, utiliza dois ou mais estágios de análise de massa, quadrupolos (Q1 e Q2). O compartimento Q1 funciona como um filtro de massa, usado para isolar o ião precursor e Q2, o segundo filtro de massa, é usado para estabelecer uma relação entre o ião precursor isolado e os outros iões que foram gerados a partir da fragmentação induzida, com auxílio de um gás inerte (Moliner 2008).

A principal relevância de um sistema MS em tandem está na possibilidade de monitorizar mais de um fragmento originado pelo ião precursor. Na presença de misturas complexas, os iões produtos fornecem informações inequívocas da presença de um determinado composto, tornando-se assim maior a confirmação analítica.

O detector mede a abundância de electrões gerada pelos iões, para cada relação m/z . O registo de todas as cargas detectadas durante o varrimento constitui o espectro de massa e este pode ser programado para a aquisição de dados conforme os modos de operação (Figura 8): em SCAN o espectrómetro de massa é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada m/z . Em modo SIM (single ion monitoring) após a ionização ocorre a separação de somente um ião específico o que aumenta a sensibilidade. No modo de operação de monitorização de múltiplas reacções (MRM) o espectrómetro é programado de forma a que dois ou mais iões sejam separados (SIM) e

fragmentados novamente (MS/MS). Através deste modo é possível analisar multianálitos dentro de uma mesma análise, já que permite a identificação e separação de cada transição monitorizada, apresentando como principal vantagem uma maior selectividade (Moliner 2008).

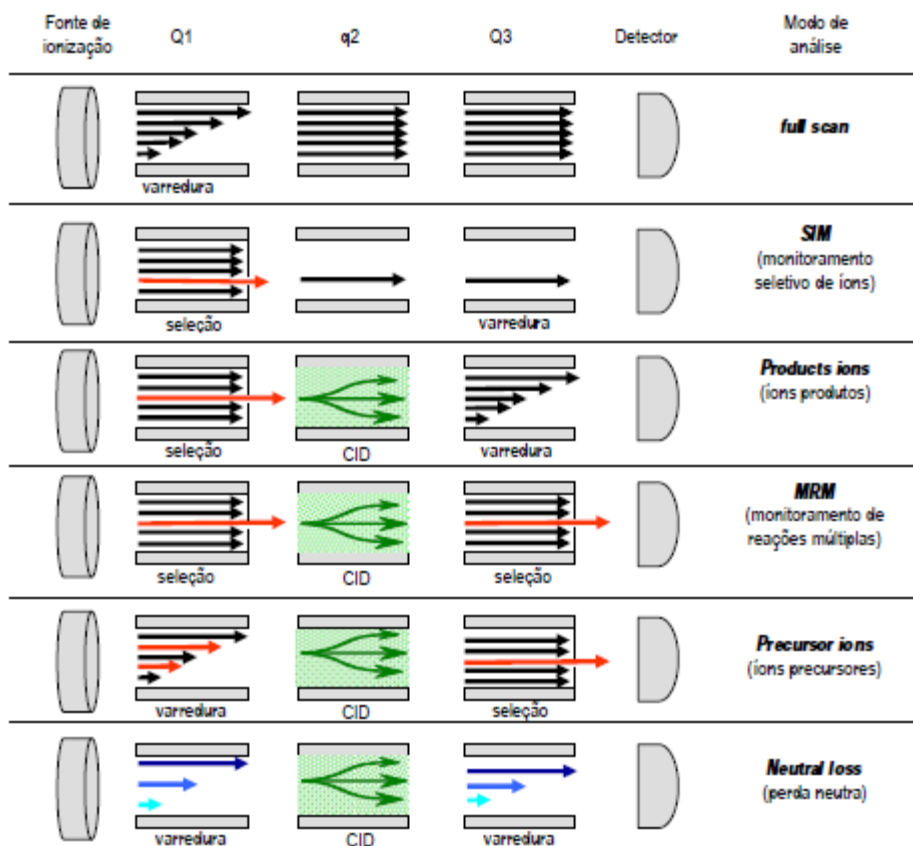


Figura 8: Representação esquemática dos diferentes modos de análise sequencial (Martinez 2009).

II. Parte experimental

1. Material e métodos

1.1. Padrões e reagentes

- ◆ S(-)-Nicotina em metanol (1 mg/mL), LGC Promochem (Barcelona, Espanha);
- ◆ (-)-Cotina em metanol (1 mg/mL), LGC Promochem (Barcelona, Espanha);
- ◆ Trans-3-hidroxicotina em metanol (1 mg), Toronto Research Chemicals Inc (Toronto, Canada);
- ◆ (±)-Nicotina-d₄ em acetonitrilo (100 ug/mL), LGC Promochem (Barcelona, Espanha);
- ◆ (±)-Cotina-d₃ em metanol (1 mg/mL), LGC Promochem (Barcelona, Espanha);
- ◆ Trans-3-hidroxicotina-d₃ (1 mg), Toronto Research Chemicals Inc (Toronto, Canada);
- ◆ Água desionizada e destilada com água Milli-Q;
- ◆ Hidróxido de amónio 24,5% *pro analysi*, J.T. Baker (Deventer, Holanda);
- ◆ Metanol 99,8% HPLC grade, Merck Co (Darmstadt, Alemanha);
- ◆ Ácido Clorídrico 37% *pro analysi*, Carlo Erba (Milão, Itália);
- ◆ Hidróxido de sódio comercial, Vaz Pereira (Benavente, Portugal);
- ◆ Isopropanol 99,8% *pro analysi*, Panreac (Barcelona, Espanha);
- ◆ Diclorometano 99,5%, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- ◆ N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) Macherey-Nagel, Panreac (Cascais, Portugal);
- ◆ Trimetilclorosilano (TMCS) Macherey-Nagel, Panreac (Cascais, Portugal).

1.2. Preparação de soluções

1.2.1. Soluções Padrão

As soluções de trabalho foram obtidas por diluição com metanol a partir das soluções stock, contendo uma mistura de todos os analitos de forma a obter soluções de concentrações de 2 ng/mL, 20 ng/mL e 1 µg/mL. Todas as soluções foram protegidas da luz e armazenadas a 4 °C.

1.2.2. Outras soluções

- ◆ Reagente de derivatização

Foram misturados os reagentes de forma a obter 1% TMCS em MSTFA. Esta solução foi protegida da luz e armazenada a 4 °C.

- ◆ Hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M

Foram pesados 4 g de NaOH e dissolvidos em água Mili-Q para um balão volumétrico. A solução foi homogeneizada por inversão. Completou-se com água desionizada até perfazer o volume de 100 mL.

- ◆ Ácido clorídrico (HCl) 0,2 M

Para um balão volumétrico de 100 mL de capacidade pipetaram-se 1,6 mL de HCl concentrado (36,5%) contendo 60 mL de água desionizada. Completou-se com água desionizada até perfazer o volume e homogeneizou-se por inversão.

- ◆ Ácido clorídrico 1% em metanol

Aferiram-se para um balão volumétrico de 100 mL de capacidade, 99 ml de metanol e 1 ml de ácido clorídrico.

- ◆ Diclorometano: Isopropanol: Hidróxido de amónio (78:20:2, v/v/v)

Para um balão de 100 mL foram medidos 78 mL de diclorometano, 20 mL de isopropanol e homogeneizou-se vigorosamente. A esta solução foi adicionado 2 mL de hidróxido de amónio e homogeneizou-se vigorosamente.

1.3. Equipamentos

- ◆ Micropipetas automáticas da Gilson de 10, 100 e 1000 µL;
- ◆ Colunas de extracção Oasis[®] MCX 30 mg da Waters (EUA);
- ◆ Vortex Mixer da Labnet International - modelo 230V;
- ◆ Câmara frigorífica da Dagard - refrigeração a 4 °C;
- ◆ Medidor de pH da Metrohm - modelo 744;
- ◆ Sistema de purificação de água Mili-Q Advantage A10[®] system da Millipore;
- ◆ Bomba de vácuo da GAST - modelo DOA-P505-BN (EUA);
- ◆ Câmara de congelação da Electrolux - modelo Inspire;
- ◆ Sistema de extracção da Waters - WAT200683 (EUA);
- ◆ Sistema de ultrasons da Elma - Transonic 460/H (Alemanha);
- ◆ Balança analítica da Sartorius - modelo CP225;

- ◆ Placa de agitação magnética da Selecta - modelo ASINCRO, J.P.;
- ◆ Bloco aquecimento “Tembloc” da J.P. Selecta, S.A.;
- ◆ Centrífuga Heraeus Multifuge 1S-R da Thermo Electron Corporation;
- ◆ Agitador Rotativo “movil-rod” da J.P. Selecta, S.A.;

1.4. Amostra biológica

As amostras biológicas utilizadas para a realização deste trabalho foram fluido oral, provenientes de voluntários e conservadas a -21 °C até sua utilização.

1.5. Sistema cromatográfico e condições cromatográficas

Foi usado um sistema cromatográfico GC-MS/MS modelo Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha). A separação cromatográfica foi efectuada utilizando uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Waldbronn, Alemanha) com as dimensões (30 m x 0,25 mm; 0,25 id).

Com o intuito de obter uma eficiência separativa adequada desenvolveu-se um programa de temperaturas da coluna: a temperatura inicial do forno foi de 90 °C durante 2 minutos, seguindo-se um gradiente de 30 °C/min até aos 190 °C e posteriormente 25°C/min até aos 250 °C. A temperatura final foi mantida constante durante dois minutos. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 11,75 minutos. A temperatura do injector e do detector foram de 150 °C e 250 °C, respectivamente. A temperatura da fonte foi 230 °C. O volume de injeção foi de 2 µL em modo splitless (Figura 9).

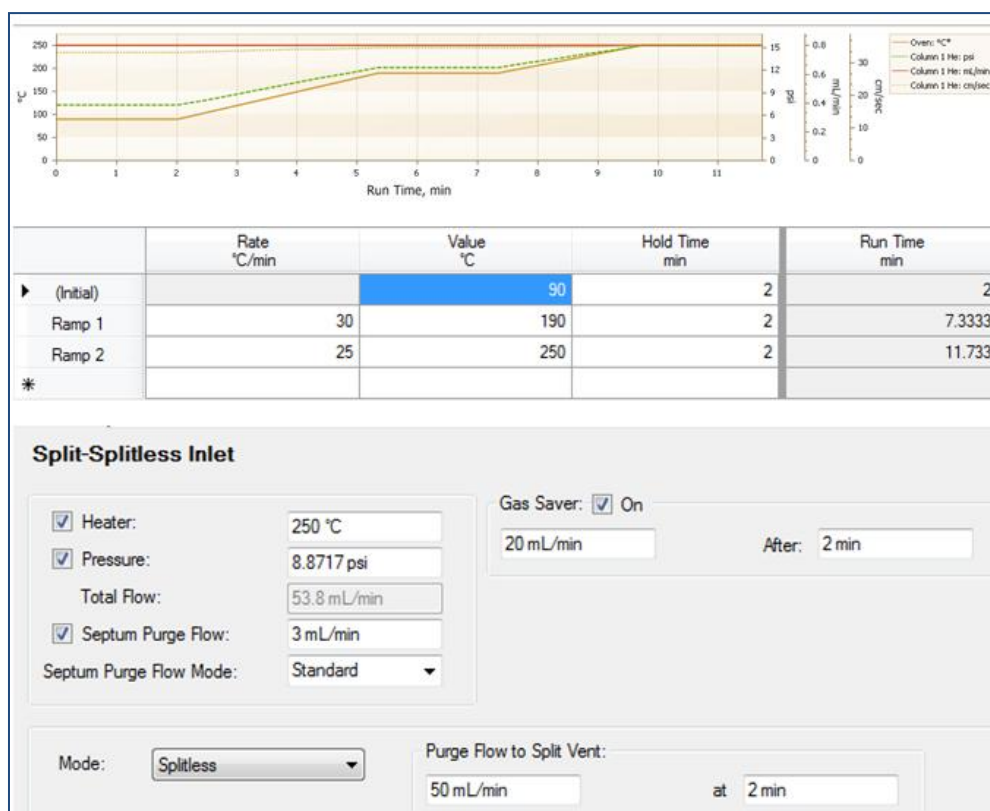


Figura 9: Resumo das condições cromatográficas.

Utilizou-se hélio como gás de arraste, a um fluxo constante de 0,8 mL/min. Na célula de colisão o fluxo de hélio foi de 1,5 mL/min e de azoto 2,5 mL/min em modo de impacto electrónico com uma corrente de 35 μ A e uma energia de 70 eV.

O espectrómetro de massa foi utilizado em modo de varrimento (modo SCAN), num intervalo de razões m/z de 50 a 500, com *dwelltime* de 235 μ s. Deste espectro de massa foi escolhido um ião precursor para cada analito que foi posteriormente fragmentado, originando os seguintes iões produtos (tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros GC-MRM (monitorização de múltiplas reacções)/MS tandem para a análise de nicotina, cotinina e trans-3-hidroxicotinina.

Segmento	Metabolitos	Ião Precursor (m/z)	Ião Produto (m/z)	Energia Colisão (V)
1	Nic	132,2	<u>105,1</u> 117,1	15
	Nic-d ₄	164,4	<u>123,4</u>	
2	Cot	174,6	104,1 <u>118,0</u>	15
	Cot-d ₃	177,6	<u>150,2</u>	
3	Trans	248,4	<u>175,1</u> 218,1	15
	Trans-d ₃	251,0	<u>190,0</u>	

Os tempos de retenção (tR) para a nicotina e nicotina-d₄ foram 6,0 minutos, cotinina e cotinina-d₃ 8,8 minutos e trans-3-hidroxicotinina e respectivo deuterado foram 9,8 minutos.

1.6. Procedimento de extracção

Adicionaram-se 2 mL de hidróxido de sódio (0,5 M) e 1,8 mL de água desionizada a 200 µL de fluido oral, que foi centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm. Esta mistura homogeneizou-se por movimentos de inversão/rotação durante 15 minutos. O sobrenadante foi adicionado à coluna de extracção (Oasis[®] MCX) previamente acondicionada com 2 mL de metanol e 2 mL de água desionizada.

Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 2 mL água desionizada, 2 mL de ácido clorídrico 0,2 M e 2 mL de metanol, posteriormente efectuou-se a sua secagem durante quinze minutos sob vácuo total. Procedeu-se à recolha dos analitos com 2 mL de diclorometano: isopropanol: hidróxido de amónio (78:20:2 v/v/v) e foram ainda adicionados 50 µL de ácido clorídrico 1% em metanol a fim de evitar a evaporação dos analitos.

Os extractos obtidos foram evaporados à secura sob uma corrente de azoto e adicionaram-se 65 µL de reagente de derivatização (MSTFA com 1% TMCS). Este processo foi realizado a 85 °C durante 45 minutos e uma alíquota de 2 µL foi injectada no sistema cromatográfico.

2. Resultados e discussão

2.1. Identificação de compostos

Nesta primeira etapa, para identificação da nicotina, cotinina e trans-3-hidroxicotinina foram otimizados parâmetros de ajuste de equipamento (fluxo do gás, programa de temperaturas, energias de colisão para fragmentar o ião precursor e gerar iões produtos, janela de análise) e a injeção da amostra.

Para a análise qualitativa, inicialmente o detector de massa foi utilizado em modo de varrimento contínuo (modo SCAN), num intervalo de razões m/z de 50 a 500 de modo a definir os iões mais característicos para cada composto. Com base nos espectros de massa obtidos, o ião precursor foi seleccionado, tendo em conta a intensidade de cada pico, como se pode observar através dos espectros de cada composto nas figuras 10-15.

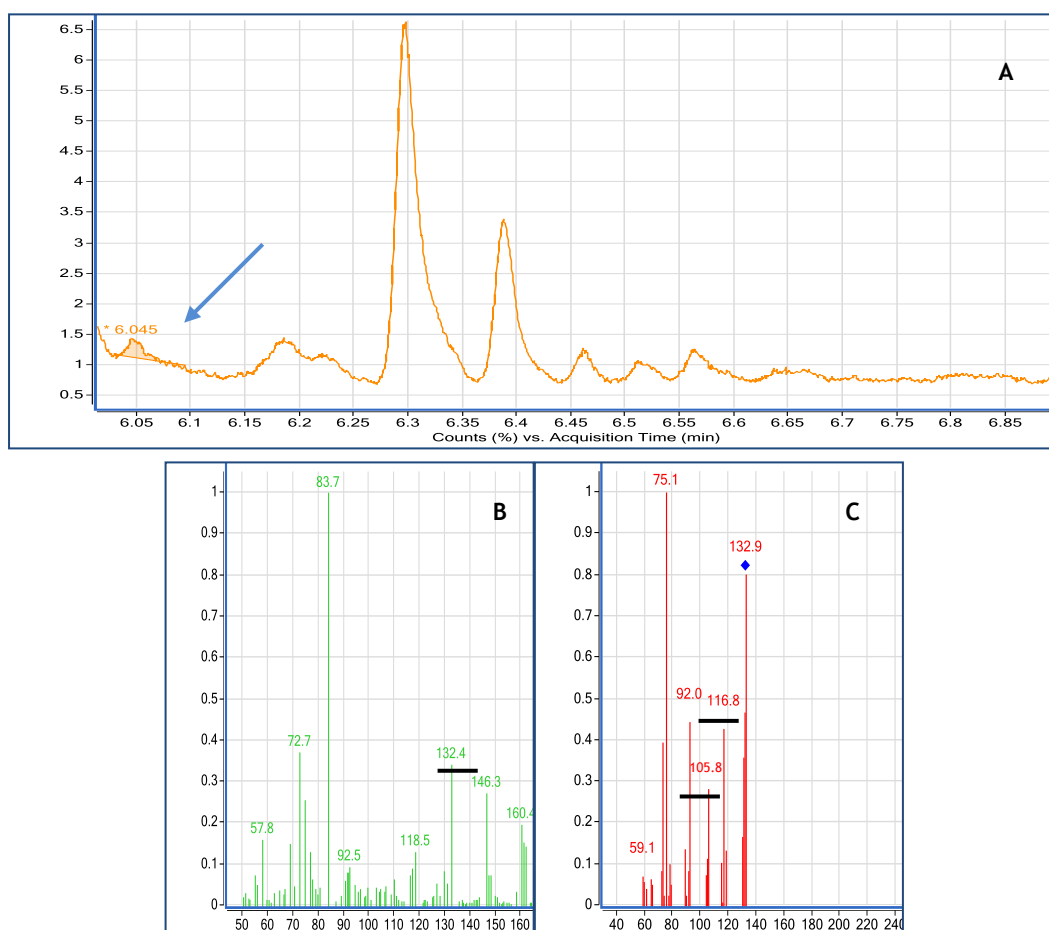


Figura 10: Cromatograma do padrão nicotina à concentração 500 ng/mL ($t_R=6,0$ min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produtos.

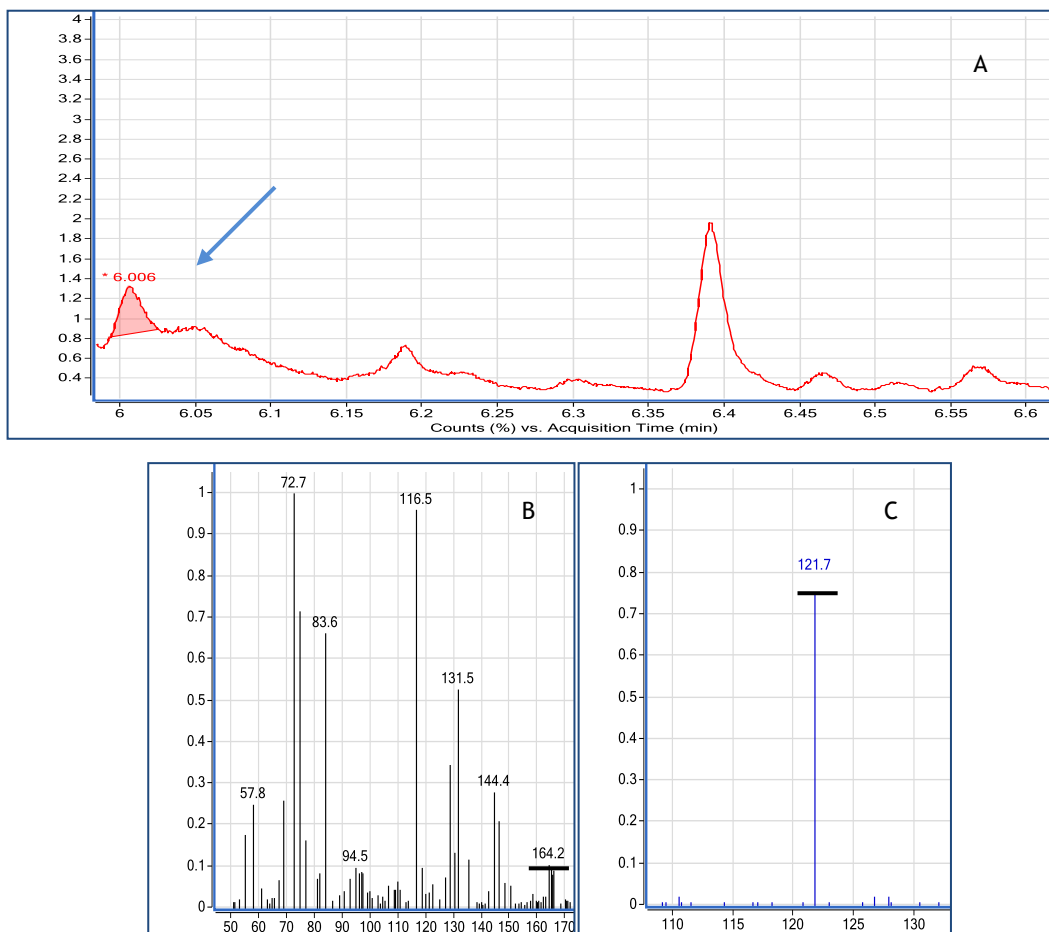


Figura 11: Cromatograma do padrão interno da nicotina (nicotina- d_4) à concentração 300 ng/mL ($t_R=6,0$ min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produto.

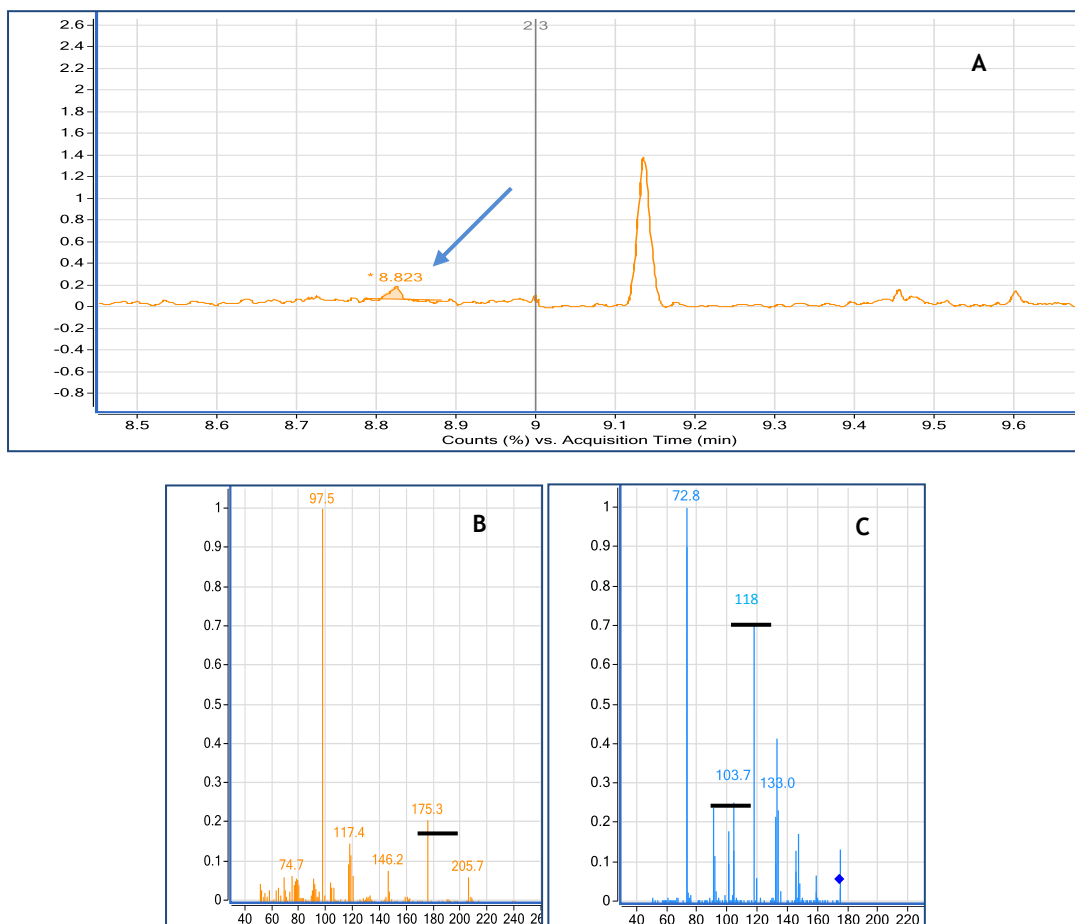


Figura 12: Cromatograma do padrão cotinina à concentração 500 ng/mL (tR=8,8 min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produtos.

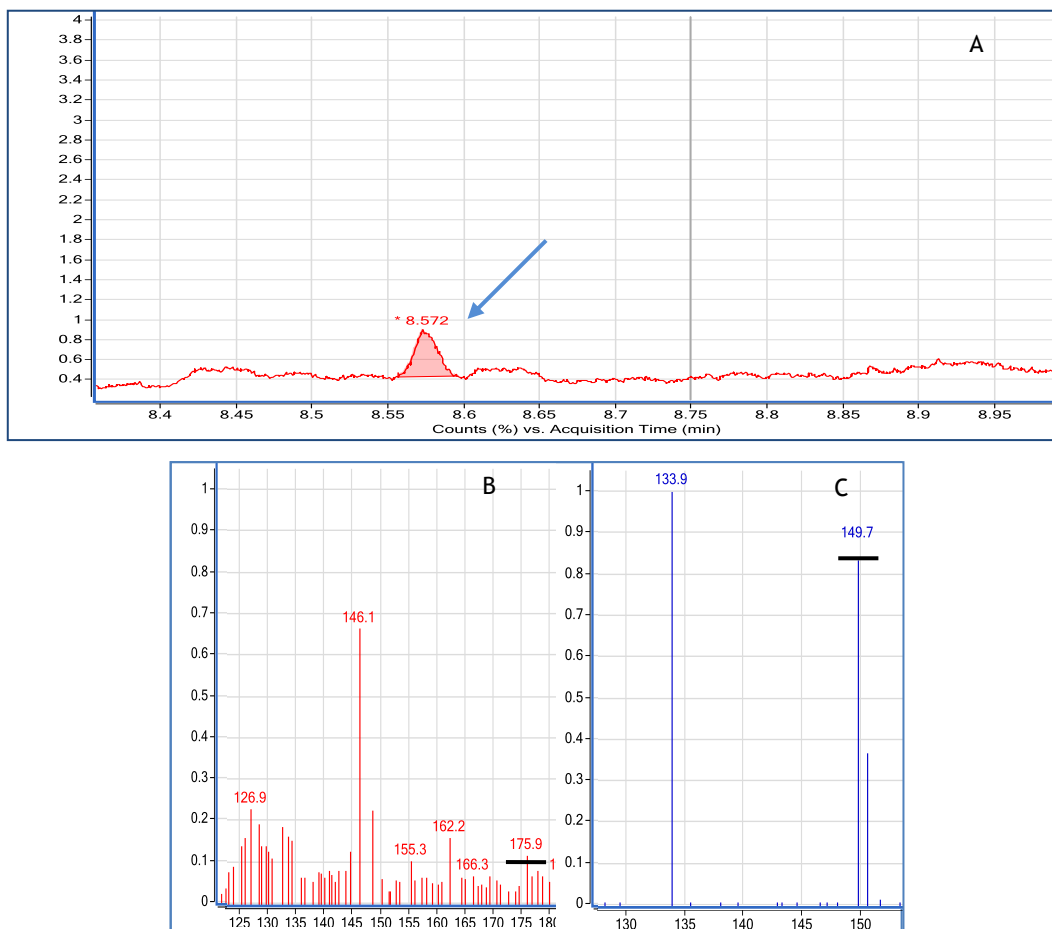


Figura 13: Cromatograma do padrão interno da cotinina (cotinina- d_3) à concentração 300 ng/mL ($t_R=8,8$ min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produto.

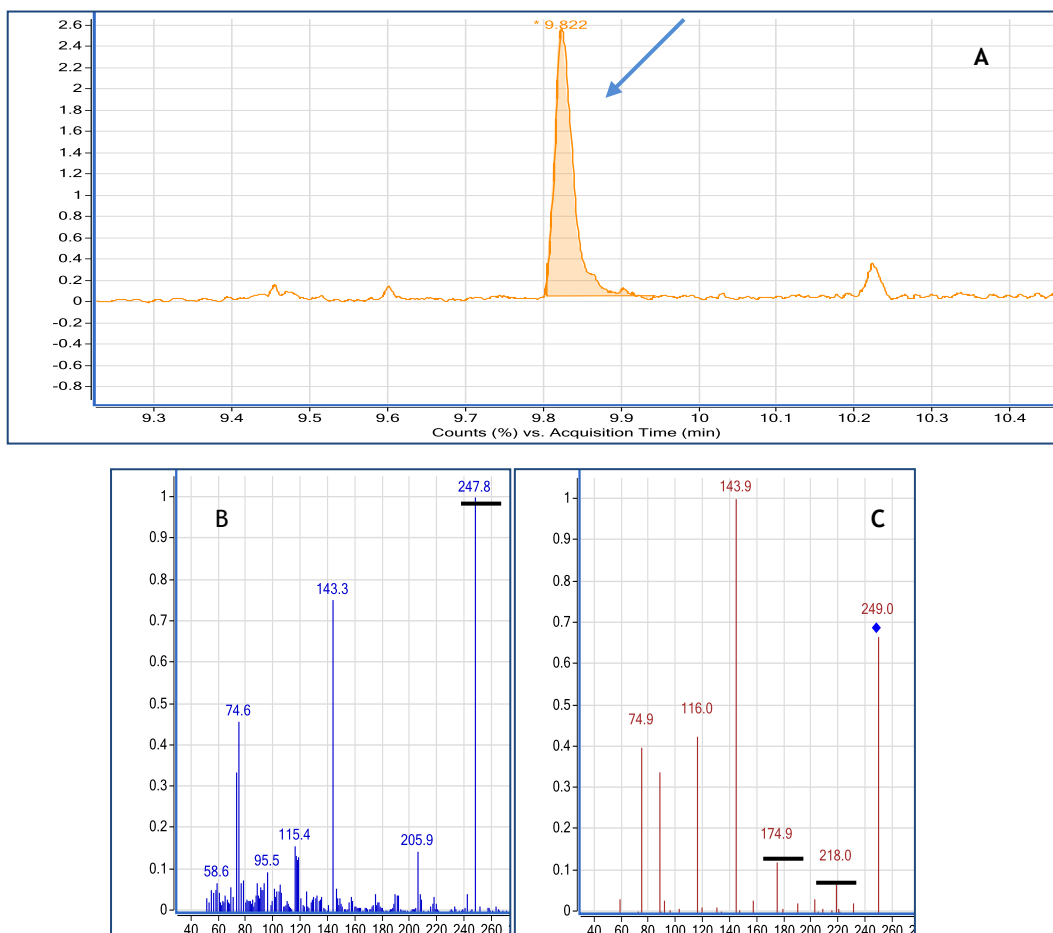


Figura 14: Cromatograma do padrão *trans*-3-hidroxicotinina à concentração 500 ng/mL ($t_R=9,8$ min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e íons produtos (C). Encontram-se a sublinhado o íon precursor e os íons produto.

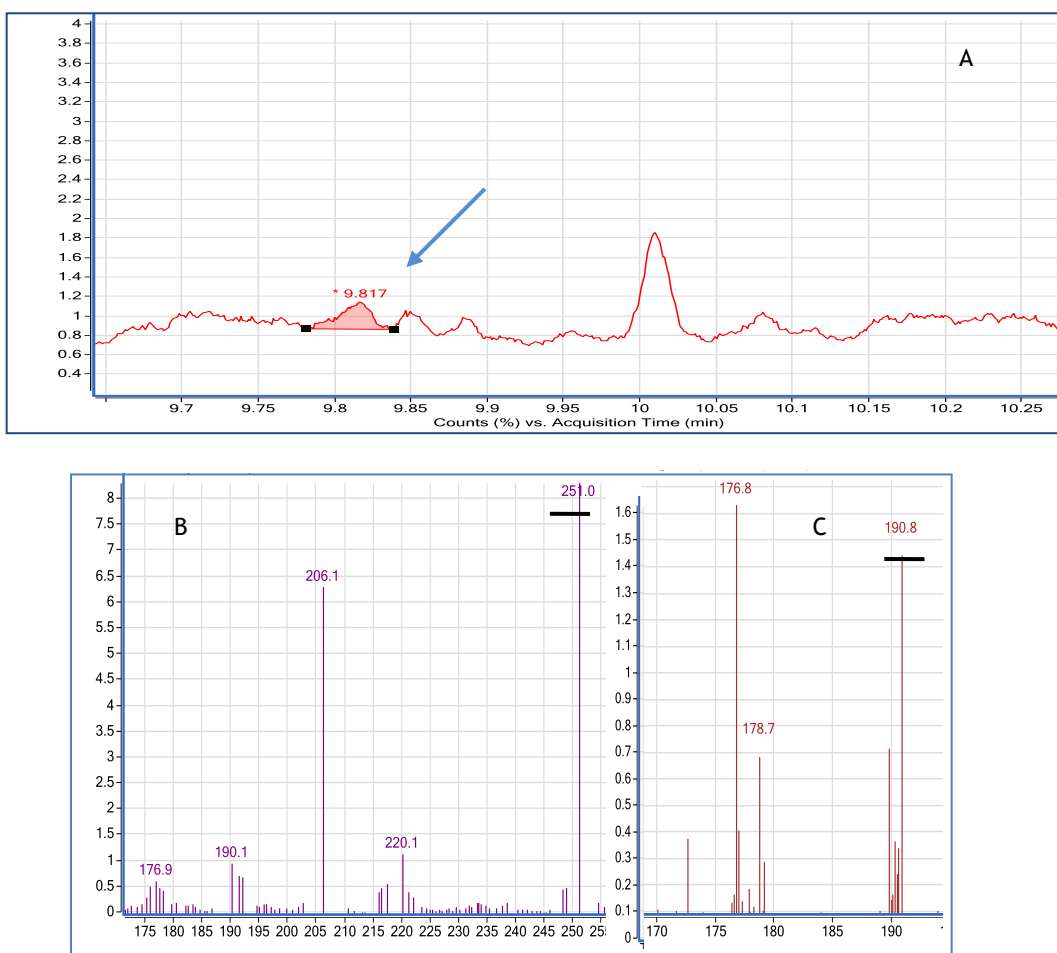


Figura 15: Cromatograma do padrão interno da trans-3-hidroxicotina (trans-3-hidroxicotina- d_3) à concentração 300 ng/mL ($t_R=9,8$ min.) (A) e respectivos espectros em scan (B) e iões produtos (C). Encontram-se a sublinhado o ião precursor e os iões produto.

Para finalizar a análise, os iões produtos foram gerados a partir do ião precursor anteriormente seleccionado usando 15 V como energia de colisão. As energias de colisão foram previamente optimizadas para cada composto em estudo de forma a aumentar a intensidade do sinal. Neste modo de operação de monitorização de múltiplas reacções (MRM), é observado um aumento extraordinário em selectividade e sensibilidade do método, permitindo uma identificação inequívoca, já que um ou mais iões precusores são seleccionados no primeiro analisador de massa para ser fragmentado através do segundo quadrupolo e posteriormente para cada um destes iões precusores os iões produtos são escolhidos e irão para o próximo estágio de detecção. Nas análises em modo MRM, é importante definir a janela de análise utilizada, já que esta está associada à precisão do instrumento durante o isolamento do ião.

Através das vantagens que um analisador de massa em série possui, foi possível seleccionar dois fragmentos característicos de cada composto (os mais estáveis e por isso mais intensos) o primeiro para a quantificação dos compostos e o segundo para qualificação (Figura 16).

As transições MRM estabelecidas para quantificação encontram-se na tabela 6. Estes iões têm maior intensidade e maior razão massa por carga, proporcionando picos mais adequados.

Tabela 6: Transições monitorizadas em modo MRM (a transição utilizada para quantificação encontra-se sublinhada).

Segmento	Metabolitos	Ião Precursor (<i>m/z</i>)	Ião Produto (<i>m/z</i>)	Energia Colisão (V)
1	Nic	132,2	<u>105,1</u>	15
			117,1	
2	Nic-d ₄	164,4	<u>123,4</u>	15
	Cot	174,6	104,1	
			<u>118,0</u>	
3	Cot-d ₃	177,6	<u>150,2</u>	15
	Trans	248,4	<u>175,1</u>	
			218,1	
	Trans-d ₃	251,0	<u>190,0</u>	

A escolha do ião para a nicotina não incidiu no ião *m/z* 84, resultante da perda do anel piridina, porque apesar da sua intensidade não é selectivo o suficiente, já que propicia a detecção de iões provenientes de outras fontes que não os analitos de interesse, aumentando a probabilidade de interferência da matriz. Além disso a sua fragmentação não fornece informações estruturais de interesse. Relativamente à cotinina, o ião com maior intensidade (*m/z* 98), que corresponde também à perda do anel piridina, não foi o escolhido mesmo apesar da sua elevada abundância. Tal deveu-se à existência de interferentes da matriz, o que não permite a correcta identificação do analito nas baixas concentrações normalmente encontradas em não fumadores (Toumi 1999; Gómez 2007). Da mesma forma os iões produto do ião precursor *m/z* 193 (*m/z* 86, 106, 114 e 134) são pouco abundantes para a quantificação (Jacob 2011).

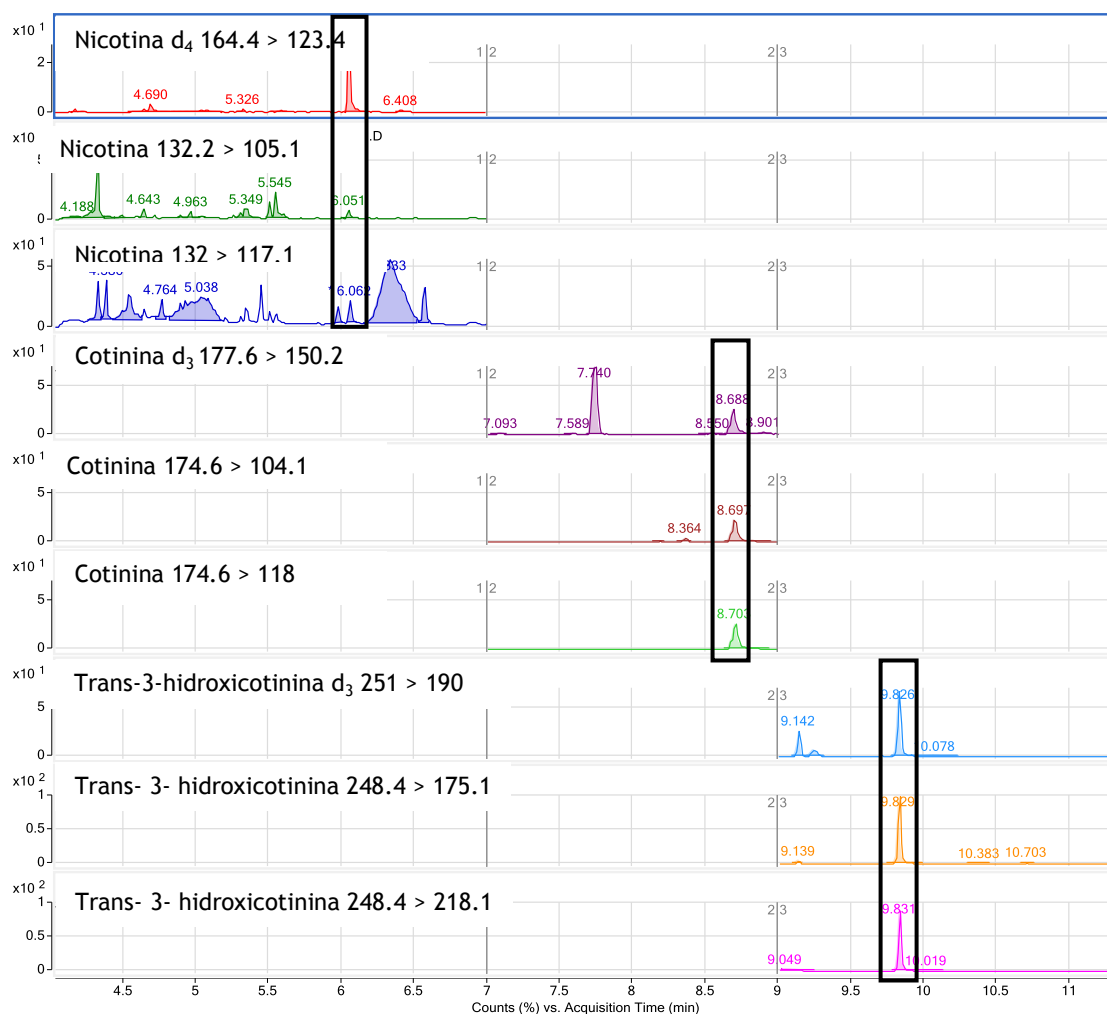


Figura 16: Cromatograma obtido de uma mistura padrão fortificada a 3 µg/mL com os compostos em estudo, derivatizados com MSTFA e análise por GC-MRM/MS tandem em splitless.

Procedeu-se de igual forma para os análogos deuterados (PI), substâncias de massa molecular diferente mas com características físico-químicas idênticas às dos compostos que se pretendem analisar. De forma a reduzir a contribuição significativa dos padrões internos nas áreas absolutas dos analitos, foram testados diferentes iões para que na fragmentação não se gerassem iões que interferissem no sinal dos analitos estudados.

Neste sentido e também na tentativa de se obter maiores áreas e por conseguinte alcançar baixas gamas de concentração, o modo de injeção foi otimizado. Assim foram testados os seguintes modos: modo split 1:2, split 1:5 e splitless. Uma vez que os extractos obtidos não possuíam interferentes foi possível utilizar o modo splitless, toda a amostra que é introduzida é injectada na coluna permitindo obter maiores razões de áreas.

2.2. Optimização do procedimento de extracção em fase sólida

A extracção em fase sólida foi a técnica utilizada para o tratamento das amostras de forma a minimizar o número de interferentes e maximizar a produtividade.

Inicialmente, devido à elevada percentagem de proteínas existentes no fluido oral e para facilitar a passagem da amostra pelo cartucho de extracção de forma a não ocorrer colmatação, procedeu-se a etapas de centrifugação, diluição e precipitação. No caso da precipitação (com acetonitrilo e ácido perclórico 30%) não se obtiveram resultados significativos quando comparadas com a não precipitação. Para a etapa de diluição foram utilizados vários tampões (tampão acetato pH 5,5; tampão carbonato de sódio pH 11 e NaOH a 0,5 M pH 13,5) para ajustar o pH da matriz biológica. Hidróxido de sódio 0,5 M revelou ser a melhor opção, uma vez que esta alcalinização permitiu os analitos encontrarem-se na sua forma protonada, auxiliando a sua libertação da amostra e a sua difusão, o que se reflectiu numa melhor resposta.

O volume de amostra foi de apenas 0,2 mL de fluido oral, que foi posteriormente substituído pelo mesmo volume de água no processo de validação já que apresentou resultados comparáveis (Tabela 7). O motivo de prosseguir este estudo com esta permuta na amostra prende-se com o facto de ser necessária uma elevada quantidade de fluido oral, o que pode ser complicado devido à escassez de amostra. Por outro lado, devido à grande sensibilidade do método e às características dos analitos (grande ubiquidade), a existência de amostras verdadeiramente brancas foi um problema, já que na grande maioria estavam presentes um ou mais dos analitos.

Tabela 7: Comparação de razões de áreas, composto vs PI a 10 e 100 ng/mL em fluido oral e água alcalinizada (n=3).

		Fluido oral	Água alcalinizada
10 ng/mL	Nicotina	0,23±0,01	0,24±0,01
	Cotina	0,13±0,01	0,12±0,01
	Trans-3-hidroxicotina	0,26±0,01	0,25±0,00
100 ng/mL	Nicotina	1,01±0,07	0,97±0,01
	Cotina	1,36±0,03	1,32±0,05
	Trans-3-hidroxicotina	1,44±0,03	1,44±0,02

Tendo em conta as características dos analitos em estudo, foram testadas dois tipos de colunas Oasis® HLB e Oasis® MCX. Esta última fase estacionária de modo misto (interacções troca iónica e fase reversa) revelou-se mais adequada para estes compostos, já que estas colunas são estáveis numa ampla gama de pH (1 a 14) e permitem recuperações maiores e

extractos mais limpos, favorecendo a retenção, uma vez que estes compostos básicos, com grupos funcionais ionizáveis (amina) interagem com os grupos aniônicos desta fase estacionária, ficando retidos mais eficientemente.

De modo a obter extractos mais limpos e melhor eficiência no procedimento de extracção optimizaram-se as etapas de lavagem e eluição. Na primeira etapa de lavagem, a água possibilita a eliminação de interferentes da matriz, permanecendo o analito na coluna, já a solução aquosa de HCl assegura que os compostos em estudo (básicos), se encontram na forma ionizada ficando retidos eficientemente pelo adsorvente enquanto, conjuntamente, elimina proteínas e outros interferentes. A escolha do metanol teve como intuito a limpeza do adsorvente e por conseguinte a obtenção de extractos mais limpos, já que este remove grande parte dos interferentes polares, neutros ou ácidos, retidos por interacções hidrofóbicas. Por fim, a adição de 2 mL de diclorometano:isopropanol:hidróxido de amónio (78:20:2, v:v:v) permite a eluição dos analitos. Optou-se por trabalhar com este volume e não com um superior (contrariamente a Insook et al. (2004) que utilizam 4 mL), já que se verificou que os analitos foram eluidos completamente e diminuindo consideravelmente o tempo de evaporação dos extractos sob corrente de azoto.

Após o processo de eluição é efectuada a evaporação da fase orgânica, uma operação extremamente delicada, devendo ser realizada lenta e cuidadosamente, evitando-se perdas da amostra por projecções ou acumulação nas paredes dos tubos.

Na optimização desta etapa, responsável pela maior percentagem de perda dos analitos, a adição de solução metanólica 1% HCl antes da evaporação tem um papel relevante (Figura 17), já que as áreas cromatográficas obtidas com a adição desta solução são significativamente superiores, particularmente para a nicotina. Isto sucede uma vez que há acidificação da fase orgânica, originando a formação de cloridratos dos analitos em estudo que são menos voláteis (Insook 2004). Este passo foi ainda aplicado por Jacob et al. (2011), Miller et al. (2010) e Shakleya et al. (2009). Este último autor refere a utilização de ácido acético, ácido fosfórico e ácido sulfúrico na tentativa de suprimir a alta volatilidade dos compostos em estudo. Ainda neste passo, tentaram-se otimizar outras percentagens (2, 5, 10%) de ácido clorídrico em solução metanólica, porém sem sucesso, já que acontecia a formação de um precipitado resultante da mistura de amónia do solvente de eluição com o ácido clorídrico. Foram ainda testados volumes diferentes da solução de 1% de HCl em metanol (50, 100 e 200 µL), no entanto não se obtiveram melhorias na eficiência da extracção pelo que se optou pelo menor volume de 50 µL.

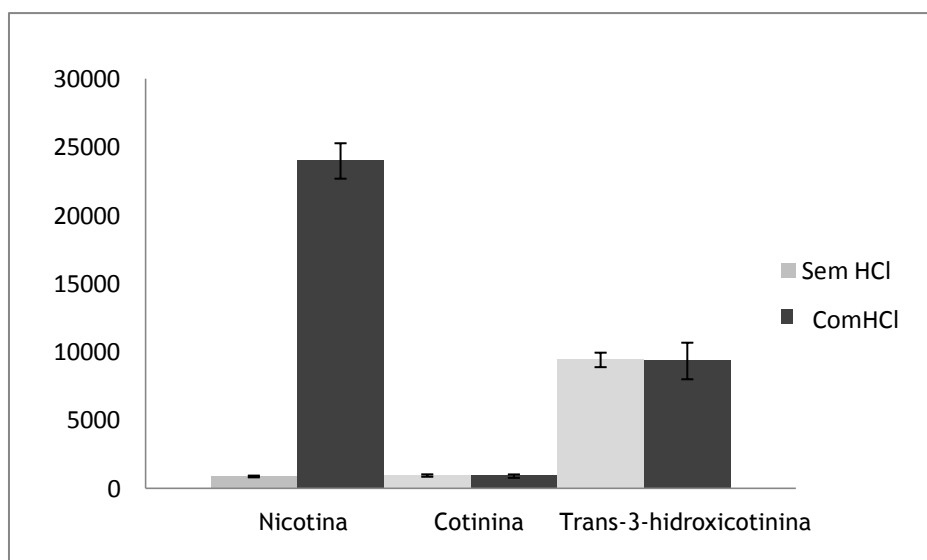


Figura 17: Áreas cromatográficas obtidas por injeção directa após a etapa de evaporação, sem adição de solução metanólica de HCl 1% e com adição prévia de solução metanólica de HCl 1% (n=3).

Posteriormente ao passo de evaporação, procede-se à derivatização dos analitos, de forma a tornar a trans-3-hidroxicotinina mais adequada para análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem, já que este composto possui um grupo hidroxilo (Figura 18). A selecção de um reagente de derivatização é um factor de grande relevância no desenvolvimento do método. Esta deve ser baseada nos grupos funcionais presentes na molécula e nas suas propriedades.

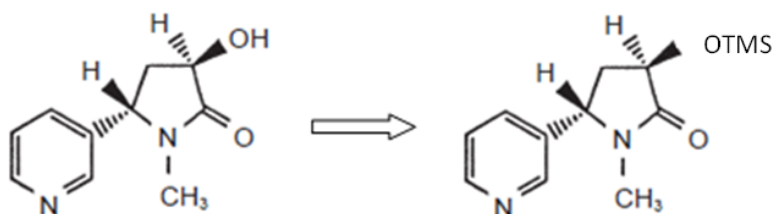


Figura 18: Reacção de derivatização da trans-3-hidroxicotinina com formação do derivado trimetilsililado.

Foram testados dois reagentes de derivatização, ambos reagentes de sililação (introduzem um grupo silil num composto orgânico em substituição a um hidrogénio activo) N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) e N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA), este último um forte dador de grupos trimetilsilil (TMS). O reagente MSTFA apesar da sua instabilidade e de requerer condições anidras rigorosas, foi o escolhido por apresentar cromatogramas de melhor resolução, intensidade e sem interferências.

Foram testados diferentes tempos de reacção (15,25,35,45 minutos), as melhores condições de derivatização foram obtidas com a temperatura 85 °C durante 45 minutos.

2.3. Validação

A validação é um processo metódico, que visa demonstrar que os processos analíticos se adaptam ao fim pretendido, garantindo a fiabilidade dos resultados.

Assim pretende-se demonstrar que o presente método é adequado ao propósito a que se destina, a confirmação qualitativa e quantitativa de marcadores de exposição a tabaco em amostras de fluido oral por SPE-GC-MS/MS. Para tal, fornecem-se evidências de que o método analítico desenvolvido é selectivo, linear dentro do intervalo de concentrações seleccionado, apresentando precisão e exactidão adequadas de acordo com princípios aceites internacionalmente da *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA 2001) e da *International Conference on Harmonization* (ICH 2005).

2.3.1 Selectividade

A identificação inequívoca do composto na amostra, por GC-MS/MS em modo MRM, pressupõe o reconhecimento de dois iões diagnóstico no fragmentograma. É importante monitorizar as suas intensidades relativas e por isso há necessidade de estabelecer quais os critérios de aceitação admitidos para as abundâncias relativas dos sinais iónicos. A abundância relativa de um ião diagnóstico, expressa como percentagem da intensidade do ião mais intenso (pico base) é determinada por integração da área do pico cromatográfico seleccionado normalizada ao pico base (que corresponde a 100%). Na tabela 8 encontram-se descritos os intervalos de aceitação permitidos para as abundâncias relativas utilizados na identificação dos compostos em estudo (Wada 2004).

Tabela 8: Intervalos máximos de tolerância permitidos para as abundâncias relativas dos iões, monitorizados em modo MRM e expressos em percentagem (%).

Abundância relativa (%relativa ao pico base)	Intervalo máximo de tolerância permitido (%)
>50	±10 (intervalo absoluto)
25 ≤ abundância ≤ 50	±20 (intervalo relativo)
5 ≤ abundância < 25	±5 (intervalo absoluto)
<5	±50 (intervalo relativo)

Além das abundâncias relativas, os critérios de confirmação qualitativa incluem ainda variação do tempo de retenção relativo do composto (TrR), expresso pela razão entre o tR do composto e o tR do padrão interno inferior ou igual a 1% quando comparado ao TrR do padrão do composto em análise. A razão entre o sinal do ião diagnóstico menos intenso e o sinal correspondente ao ruído da linha de base (razão sinal/ruído) ser superior a 3:1 (Wada 2004).

De forma a estudar a selectividade foi analisada diariamente uma amostra em branco para verificar as interferências (Figura 19), quer endógenas ou exógenas na matriz biológica, que podem ter múltiplas origens, desde componentes endógenos da própria matriz biológica, xenobióticos, metabolitos e produtos de decomposição.

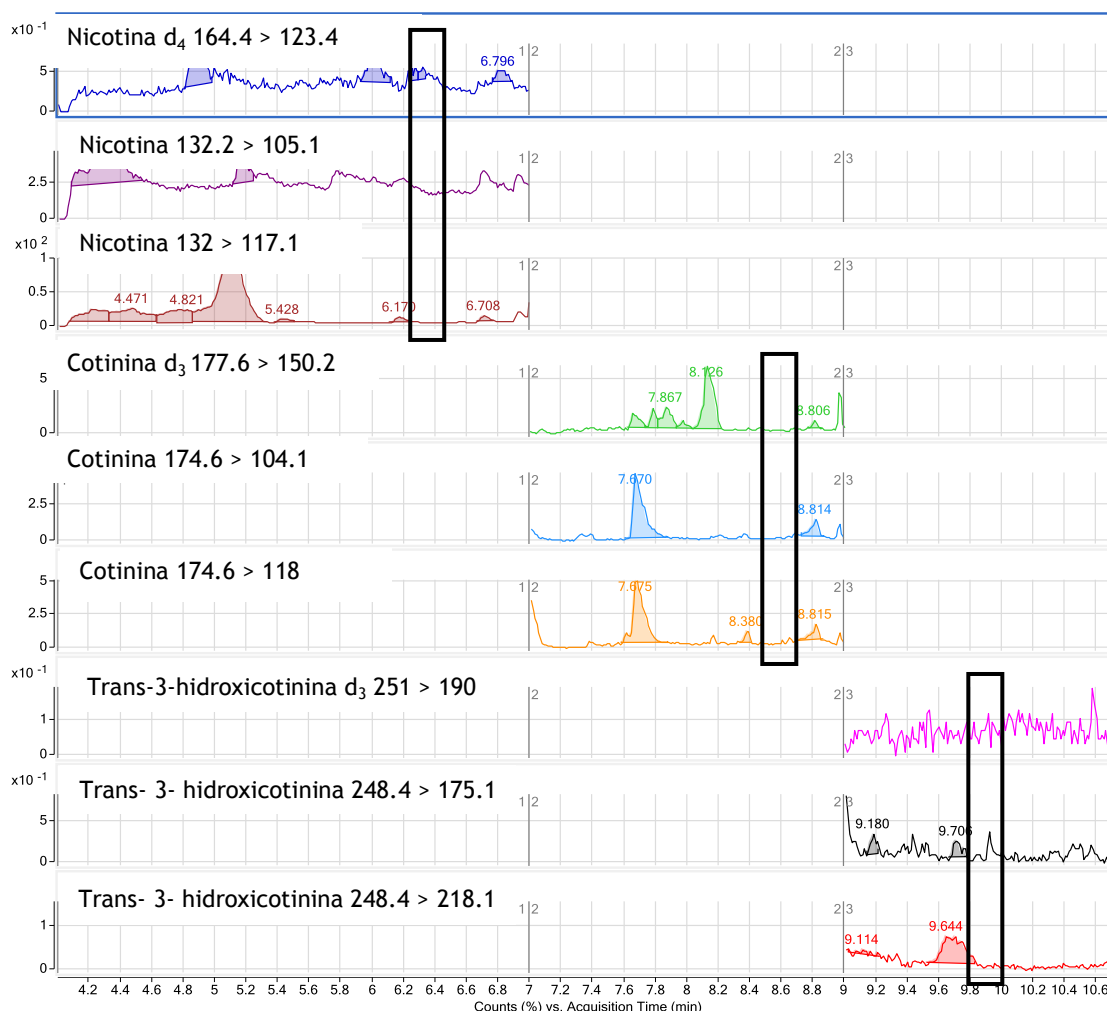


Figura 19: Cromatograma de uma amostra branca por SPE-GC-MS/MS.

De acordo com os critérios acima descritos, não foi observado qualquer interferente dos constituintes da matriz que coeluisse com os compostos em estudo e/ou padrões internos.

2.3.2. Linearidade e curva de calibração

A curva de calibração (relação de áreas entre o pico dos analitos em estudo e dos respectivos PI vs a concentração de cada analito) foi estabelecida utilizando amostras brancas fortificadas com concentrações crescentes dos analitos de estudo pelo procedimento de extração anteriormente descrito. Foram utilizados 10 calibradores equitativamente distribuídos entre 0,5 e 1000 ng/mL. Cada calibrador foi quantificado na curva de calibração obtida e determinou-se o erro médio relativo (EMR) das concentrações, que deverá ser de $\pm 20\%$ para a concentração mais baixa e de $\pm 15\%$ para as restantes concentrações (FDA 2001). O EMR situou-se para cada um dos analitos em estudo dentro dos limites para todas as concentrações.

Não foi possível obter linearidade na totalidade do intervalo de concentrações estudado, pelo que as curvas de calibração foram divididas em dois intervalos 0,5-10 ng/mL e 10-1000 ng/mL para os analitos em estudo (Figuras 20-22). Em todos os casos os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram superiores a 0,996 (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados referentes à linearidade e curva de calibração.

Analito	Linearidade (ng/mL)	Declive (m) *	Ordenada na origem (b) *	R^2 *
Nicotina	0,5-10	0,0222 \pm 0,0204	0,0643 \pm 0,0538	0,9982 \pm 0,0011
	10-1000	0,0011 \pm 0,0009	0,2365 \pm 0,2612	0,9964 \pm 0,0012
Cotina	0,5-10	0,0387 \pm 0,0238	0,0408 \pm 0,0289	0,9990 \pm 0,0009
	10-1000	0,0204 \pm 0,0121	0,3682 \pm 0,3334	0,9982 \pm 0,0004
Trans-3-hidroxicotina	0,5-10	0,2345 \pm 0,0205	0,1378 \pm 0,1475	0,9981 \pm 0,0017
	10-1000	0,0634 \pm 0,0354	4,0310 \pm 1,3990	0,9964 \pm 0,0021

*valores expressos como média \pm desvio padrão

De forma a completar o estudo de linearidade, foram analisadas diariamente 4 amostras de controlo, duas na gama baixa (2,5 ng/mL e 7 ng/mL) e duas na gama alta (50 ng/mL e 400 ng/mL).

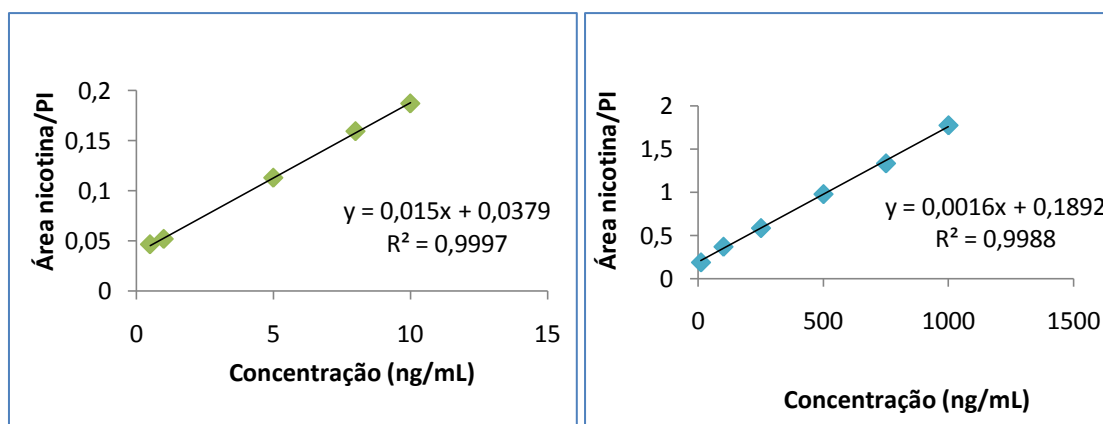


Figura 20: Exemplo de curvas de calibração da nicotina na gama de concentrações de estudo.

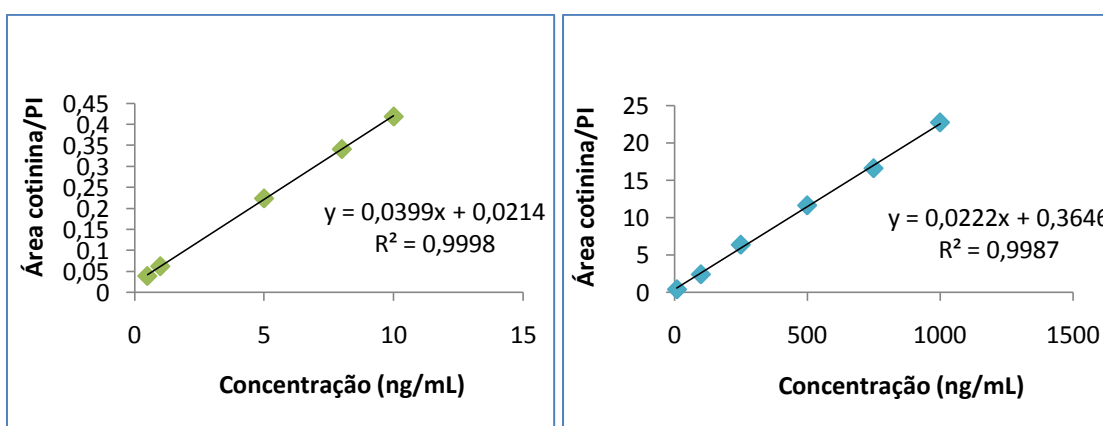


Figura 21: Exemplo de curvas de calibração da cotinina na gama de concentrações de estudo.

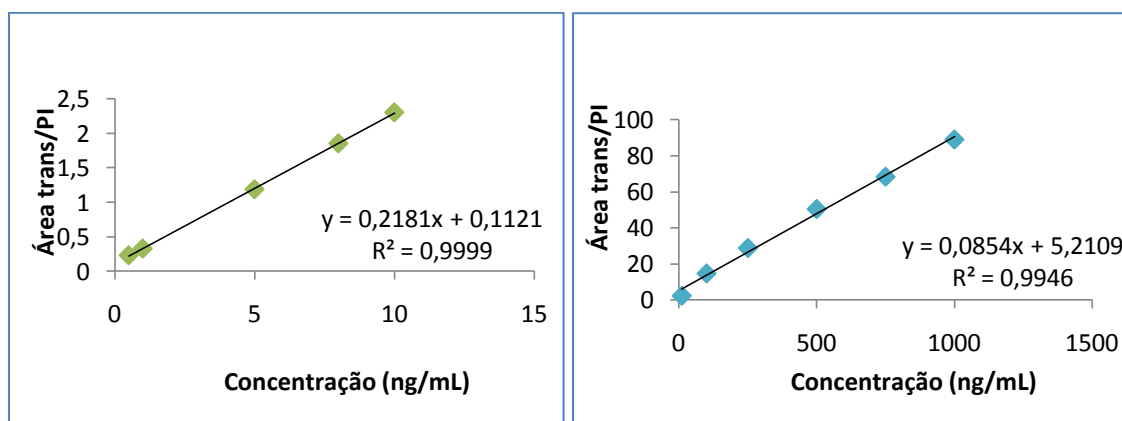


Figura 22: Exemplo de curvas de calibração da trans-3-hidroxicotina na gama de concentrações de estudo.

2.3.3. Precisão e exactidão

A precisão de um método exprime o grau de concordância entre os resultados analíticos, independentes, obtidos repetitivamente em condições estipuladas. A precisão intradia é determinada pela análise das amostras adquiridas num curto espaço de tempo, sem variar nenhum outro factor que possa afectar um resultado analítico (e.g. operador, laboratório, equipamento) e a precisão interdia consiste em determinar estas mesmas medidas realizadas em dias diferentes (FDA 2001).

A precisão do método foi determinada tanto a baixas como a altas concentrações. Assim, para determinar a precisão intradia foram preparadas e analisadas no mesmo dia amostras fortificadas a 0,5; 5; 100 e 500 ng/mL (6 réplicas para cada uma das concentrações). Os coeficientes de variação (CV) obtidos para todas as concentrações foram inferiores a 10% (Tabela 10). Para determinar a precisão interdia foram preparadas e analisadas em 5 dias diferentes amostras fortificadas a 2,5; 7; 50 e 400 ng/mL (3 réplicas para cada uma das concentrações). Os coeficientes de variação obtidos para todas as concentrações foram inferiores a 7% (Tabela 11). Estes valores encontram-se dentro dos limites normalmente considerados como aceitáveis pela FDA.

A exactidão do método descreve a proximidade das médias dos resultados obtidos para o valor real (concentração do analito), este parâmetro é determinado por réplicas das análises das amostras contendo quantidades conhecidas do analito (FDA 2001). Foi avaliada em todas as concentrações anteriormente referidas, em termos de EMR (*Bias*)¹ entre as quantidades de analito calculadas por interpolação na curva de calibração e aquelas que tinham sido adicionadas às amostras (valor considerado como verdadeiro) (Tabelas 10-11).

$$Bias = \frac{\text{Concentração calculada} - \text{concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (1)$$

Tabela 10: Valores obtidos para a precisão intradia e exactidão do método para a nicotina, cotinina e trans-3-hidroxicotinina (n=6).

Analito	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL)	C.V. (%)	Bias (%)
Nicotina	0,5	0,52	4,73	-3,45
	5	4,83	6,82	3,36
	100	97,40	8,51	2,60
	500	495,63	4,49	0,87
Cotinina	0,5	0,5	5,16	0,42
	5	4,93	6,07	1,45
	100	93,95	1,56	6,05
	500	500,04	4,97	-0,01
Trans-3-hidroxicotinina	0,5	0,53	3,79	-6,58
	5	5,04	5,10	-0,83
	100	99,15	9,62	0,85
	500	499,31	7,55	0,14

Tabela 11: Valores obtidos para a precisão interdia e exactidão do método para a nicotina, cotinina e trans-3-hidroxicotinina (n=3).

Analito	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL)	C.V. (%)	Bias (%)
Nicotina	2,5	2,54	5,40	1,62
	7	6,87	5,66	-1,82
	50	52,80	4,57	5,61
	400	399,93	3,66	-0,02
Cotinina	2,5	2,43	6,8	-2,74
	7	7,22	5,88	3,13
	50	48,69	4,81	-2,63
	400	393,41	3,75	-1,65
Trans-3-hidroxicotinina	2,5	2,52	6,51	0,79
	7	6,82	5,86	-2,62
	50	50,17	6,08	0,33
	400	420,82	3,19	5,20

2.3.4. Limites analíticos do método (Limites de detecção e de quantificação)

O limite de detecção (LOD) é a concentração mínima de analito visivelmente distinto de um branco e não tem que ser necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LOQ) é a concentração de analito que pode ser medida com precisão e exactidão com um coeficiente de variação inferior a 20% e *bias* num intervalo de $\pm 20\%$ da concentração calculada (FDA 2001; ICH 2005).

Na tabela 12 e na figura 23 encontram-se os valores referentes aos LOQ e a sobreposição de cromatogramas de uma amostra branca e de uma amostra fortificada para o ião quantitativo e qualitativo dos analitos de estudo à concentração de 0,5 ng/mL.

Neste estudo verificou-se que o LOQ é igual ao LOD, uma vez que não foi possível detectar concentrações inferiores a 0,5 ng/mL, devido à contribuição dos padrões internos deuterados no sinal cromatográfico dos analitos de estudo.

Tabela 12: Tabela resumo dos limites de quantificação em ng/mL para os analitos em estudo (n=5).

Analito	LOQ (ng/mL)	C.V. (%)	Bias (%)
Nicotina	0,5	11,43	-11,58
			11,95
			13,17
			1,79
			-7,24
Cotinina	0,5	10,67	-12,54
			8,42
			9,32
			-12,11
			-9,27
Trans-3- hidroxicotinina	0,5	9,43	-13,36
			9,30
			-9,86
			-10,76
			-4,38

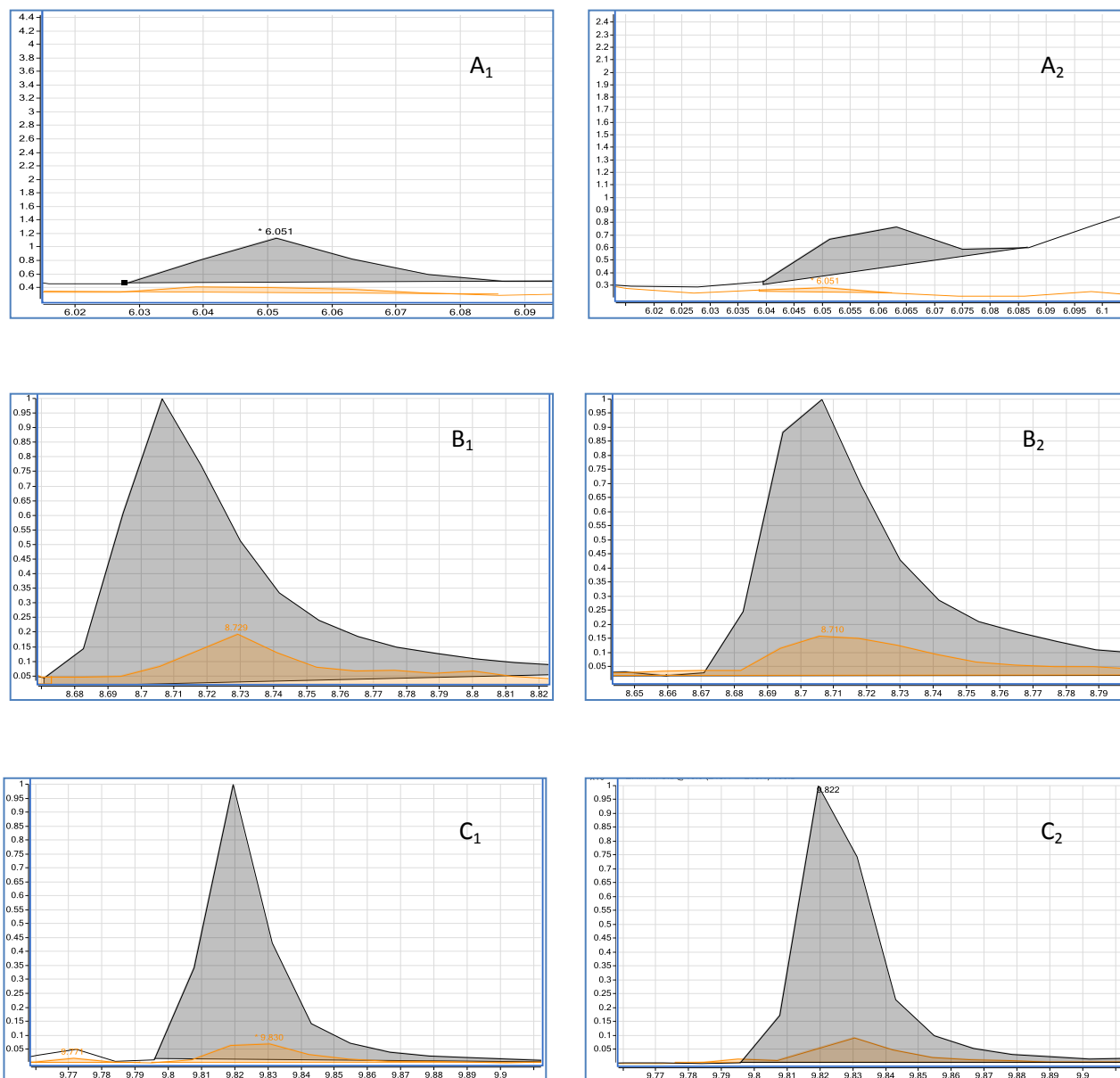


Figura 23: Sobreposição de um cromatograma de uma amostra branca com um cromatograma de nicotina [ião 105 (A₁) e 117 (A₂)], cotinina [ião 118 (B₁) e 150 (B₂)] e trans-3-hidroxicotina [ião 175 (C₁) e 190 (C₂)], a 0,5 ng/mL. (Em cinzento encontra-se assinalado o cromatograma fortificado a 0,5 ng/mL e em laranja o cromatograma da amostra branca).

Estes resultados são satisfatórios, tendo em conta o reduzido volume de amostra 0,2 mL. Concheiro et al. (2010) descreve resultados semelhantes com um volume ligeiramente superior (0,250 mL) de fluido oral utilizando um LC-MS/MS (LOQ de 1 ng/mL e de 0,5 ng/mL para cotinina e trans-3-hidroxicotina, respectivamente). Shakleya et al. (2009) conseguem detectar 0,1 e 0,3 ng/mL e quantificar 0,5 e 0,2 ng/mL, para a trans-3-hidroxicotina e cotinina, respectivamente, porém utilizam o dobro da amostra. Já Miller et al. (2010) quantificam 1 ng/mL para todos os compostos em 0,5 mL de fluido oral.

2.3.5. *Carry over*

Para verificar a existência de fenómenos de arrastamento, uma das alíquotas de amostra branca (não fortificada com os compostos em estudo) foi extraída e analisada, utilizada nas mesmas condições analíticas de calibradores e controlos. Após a injeção das amostras na concentração de 1000 ng/mL (concentração mais elevada) da curva de calibração a amostra branca foi injectada de forma a averiguar a existência de *carry over*. Determinou-se que neste estudo não foram observados fenómenos de arrastamento, mesmo tendo em conta o modo de injeção em splitless, modo este que pode não ser muito aconselhável, particularmente quando se trabalha com amostras biológicas muito sujas. De forma a prevenir esta situação, o *liner* (componente analítico) responsável por conduzir a amostra desde o injector até à entrada da coluna foi substituído em cada 100 injeções.

2.3.6. Estabilidade

A estabilidade de um composto numa matriz biológica depende de diversos factores, entre os quais as propriedades físico-químicas dos analitos, as circunstâncias de armazenamento, da amostra e do tipo de embalagem.

2.3.6.1. Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação

De forma a avaliar este parâmetro, as amostras fortificadas com os analitos em estudo foram testadas a quatro concentrações (2,5; 7; 50 e 400 ng/mL) e submetidas a ciclos de congelação num período de 24 horas, posteriormente foram descongeladas onde permaneceram à temperatura ambiente durante 2 h (este processo repetiu-se por mais duas vezes). Após extracção foram comparadas com amostras preparadas e analisadas no próprio dia. Os CV não foram superiores a 8% para todas as concentrações e para todos os analitos de estudo (Tabela 13), pelo que podemos afirmar que os analitos são estáveis durante pelo menos 3 ciclos de congelação/descongelação.

Tabela 13: Resumo dos resultados referentes ao estudo da estabilidade a ciclos de congelação e descongelação a quatro concentrações dos analitos em estudo (n=3).

Analito	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL)	C.V. (%)	Bias (%)
Nicotina	2,5	2,48	0,53	-0,7
	7	6,97	7,19	-0,4
	50	50,53	2,09	1
	400	399,74	2,17	0,1
Cotina	2,5	2,41	3,42	-4
	7	6,81	4,14	3
	50	47,83	4,50	4
	400	405,96	3,47	-1
Trans-3-hidroxicotina	2,5	2,53	4,50	1
	7	6,84	2,61	-2
	50	51,87	1,37	4
	400	390,03	1,57	2

2.3.6.2. Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi estudada a quatro níveis de concentração (2,5; 7; 50 e 400 ng/mL). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e após 24 horas foram extraídas e analisadas. Os valores não se desviaram acima dos 15%, considerando-se assim os analitos estáveis à temperatura ambiente por um período de pelo menos 24 horas, tendo sido comparadas com amostras preparadas e analisadas no mesmo dia (Tabela 14).

Tabela 14: Resumo dos resultados referentes ao estudo da estabilidade de curta duração a quatro concentrações dos analitos em estudo (n=3).

Analito	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL)	C.V. (%)	Bias (%)
Nicotina	2,5	2,66	3,00	6
	7	7,20	1,40	2
	50	49,51	0,34	-0,4
	400	401,55	3,54	-0,4
Cotina	2,5	2,48	6,18	-0,9
	7	7,19	1,35	2
	50	49,70	2,06	-0,6
	400	403,70	2,22	-0,6
Trans-3-hidroxicotina	2,5	2,49	2,66	-0,3
	7	6,99	4,61	-0,1
	50	49,85	1,57	-0,1
	400	393,23	3,30	-1

2.3.6.3 Estabilidade em amostras processadas

A estabilidade de amostras processadas foi estudada a quatro níveis de concentração (2,5; 7; 50 e 400 ng/mL). Os extractos foram mantidos no injector automático durante um período de 24 horas e foram reinjectados. Os valores não se desviaram acima dos 15% (Tabela 15), considerando-se assim os analitos estáveis em amostras processadas, após avaliação dos resultados comparados com os obtidos por análise de amostras preparadas e analisadas no mesmo dia.

Tabela 15: Resumo dos resultados referentes ao estudo da estabilidade de amostras processadas a quatro concentrações dos analitos em estudo (n=3).

Analito	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL)	C.V. (%)	Bias (%)
Nicotina	2,5	2,74	1,44	10
	7	7,22	12,03	3
	50	54,66	1,23	9
	400	414,74	2,22	4
Cotinina	2,5	2,76	1,85	11
	7	7,19	12,81	3
	50	54,79	1,96	10
	400	366,28	0,66	-8
Trans-3-hidroxicotinina	2,5	2,45	11,47	-2
	7	7,27	9,88	4
	50	49,03	10,19	-2
	400	419,93	2,95	5

2.3.7. Recuperação

A eficiência do processo de extracção é calculada como a recuperação média (%)² dos compostos em estudo, por comparação das áreas de pico após extracção com as obtidas por análise de extractos brancos fortificados com os analitos após extracção (correspondentes a uma recuperação de 100%) (FDA 2001).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do pico sujeito a extracção/PI}}{\text{Área do pico não sujeito a extracção/PI}} \times 100 \quad (2)$$

Para calcular a recuperação do método, foram fortificadas amostras de fluido oral a três concentrações: baixa (10 ng/mL), média (100 ng/mL) e alta (1000 ng/mL), às quais o padrão interno foi apenas adicionado no final da extracção.

Os valores relativamente à eficiência da extracção foram superiores a 84% para todos os analitos em estudo como apresentado na tabela 16.

Tabela 16: Recuperação média, em percentagem (%), para cada um dos compostos em estudo, calculada para três níveis de concentração (n=3).

Concentração (ng/mL)	Nicotina	Cotina	Trans-3-hidroxicotina
10	89,40 ± 6,87	98,36 ± 2,53	86,73 ± 3,56
100	89,20 ± 1,54	84,65 ± 4,30	89,24 ± 0,54
1000	98,13 ± 4,49	84,74 ± 13,83	99,75 ± 1,84

Resultados semelhantes foram adquiridos por Concheiro et al. (2010) em amostras de fluido oral para a análise destes compostos, entre 90 a 94%. Miller et al. (2010) reportam os valores de recuperação mais baixos para a cotina (93- 96%) nas suas gamas de concentrações estudadas (1, 10 e 100 ng/mL). Os valores de recuperação média mais elevados, nesta matriz biológica são conseguidos por Shakleya et al. (2009), que rondam aproximadamente entre 98-113% para estes compostos em estudo.

2.4. Aplicação do método a amostras reais

Como parte do processo de validação, a metodologia foi aplicada a amostras reais procedentes de indivíduos fumadores e não fumadores com idades compreendidas entre os 2 e 18 anos de ambos os sexos.

As concentrações de nicotina, cotina e trans-3-hidroxicotina em fluido oral determinadas são apresentadas na tabela 17, das quais 26 foram positivas para biomarcadores da exposição de tabaco. Nas amostras positivas foi observada uma grande variabilidade nas concentrações obtidas. No entanto, o reduzido número de amostras analisado não permite conclusões acerca dos valores obtidos, sendo desejável o estudo de um número consideravelmente maior de amostras, incluindo estudos de administração controlada.

A título de exemplo, na figura 24 apresenta-se um cromatograma relativo a amostra número 8.

Tabela 17: Compostos identificados nas amostras reais e respectiva quantificação.

Amostra	Idade (anos)	Sexo	Concentração (ng/mL)		
			Nicotina	Cotina	Trans-3-hidroxicotina
#1	13	Masculino	136,41	2,86	1,42
#2	13	Masculino	162,26	5,02	1,59
#3	13	Feminino	56,71	4,51	1,08
#4	12	Feminino	n.d.	4,79	1,78
#5	11	Feminino	2,69	3,70	1,91

#6	6	Masculino	n.d.	0,69	n.d.
#7	13	Feminino	2,53	n.d.	n.d.
#8	18	Feminino	269,07	54,87	3,90
#9	13	Feminino	4,41	7,70	0,76
#10	13	Feminino	n.d.	3,99	0,87
#11	12	Masculino	66,82	0,90	n.d.
#12	12	Masculino	52,64	n.d.	n.d.
#13	2	Masculino	n.d.	1,15	0,64
#14	6	Feminino	n.d.	n.d.	n.d.
#15	12	Masculino	n.d.	n.d.	n.d.
#16	13	Masculino	n.d.	n.d.	n.d.
#17	15	Feminino	2,95	9,44	4,48
#18	12	Feminino	3,30	2,20	0,72
#19	13	Feminino	191,99	8,25	4,68
#20	12	Masculino	164,52	2,26	0,89
#21	12	Feminino	n.d.	n.d.	n.d.
#22	12	Feminino	n.d.	n.d.	n.d.
#23	15	Feminino	n.d.	n.d.	n.d.
#24	3	Masculino	n.d.	n.d.	n.d.
#25	13	Masculino	n.d.	n.d.	n.d.
#26	13	Masculino	357,27	n.d.	n.d.
#27	6	Feminino	186,63	n.d.	n.d.
#28	11	Feminino	2,81	n.d.	n.d.
#29	11	Masculino	n.d.	0,67	0,48
#30	15	Feminino	n.d.	n.d.	n.d.
#31	12	Masculino	n.d.	n.d.	n.d.
#32	12	Feminino	n.d.	2,14	0,75
#33	13	Masculino	n.d.	n.d.	n.d.
#34	12	Masculino	n.d.	n.d.	n.d.
#35	12	Feminino	77,57	n.d.	n.d.
#36	12	Masculino	117,11	n.d.	n.d.

#37	12	Masculino	280,80	1,70	0,50
#38	12	Feminino	153,42	0,57	n.d.
#39	12	Masculino	43,46	1,36	n.d.
#40	12	Feminino	184,35	0,92	n.d.

(n.d.) não detectado

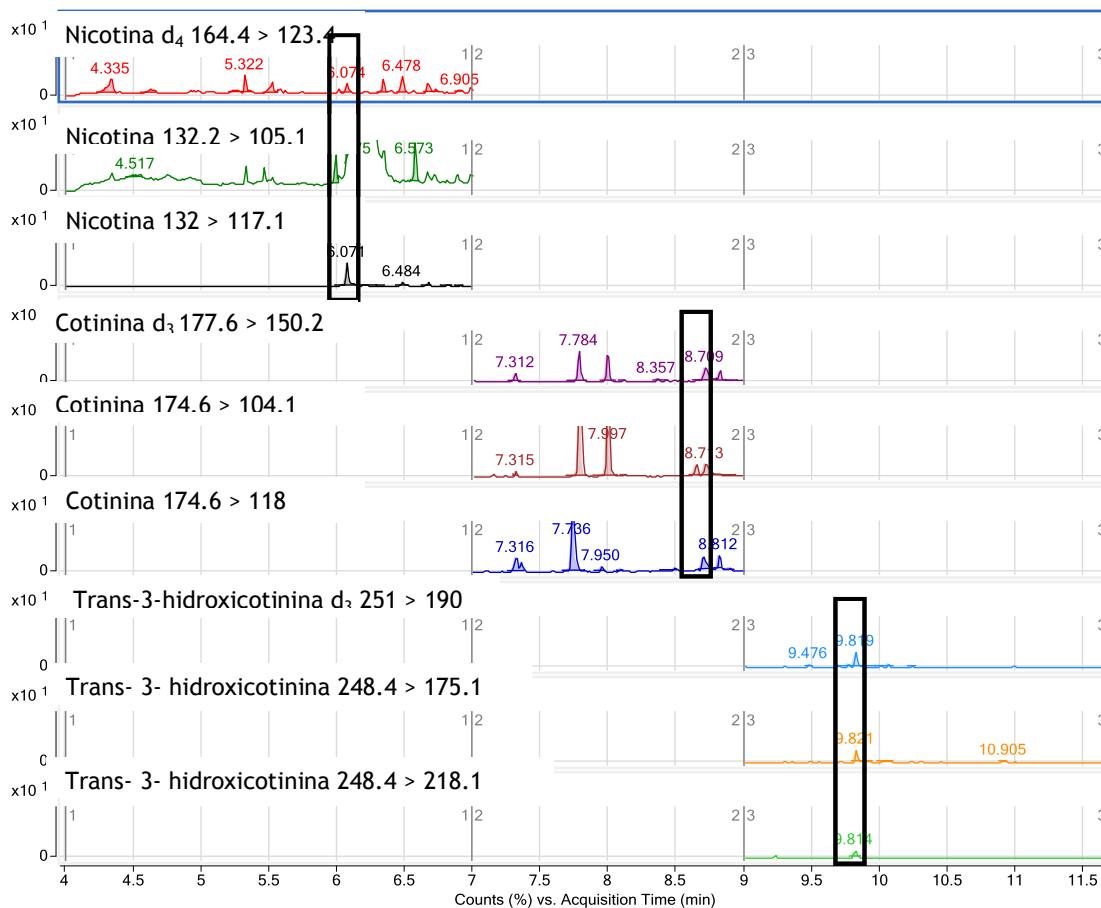


Figura 24: Cromatograma de amostra real #8 (concentração de nicotina 269,07 ng/mL, concentração de cotinina 54,87 ng/mL e concentração de trans-3-hidroxicotinina 3,90 ng/mL).

III. Conclusões

1. É proposto um método analítico para o doseamento de nicotina, cotinina e trans-3-hidroxicotinina em amostras de fluido oral utilizando extracção em fase sólida e posterior análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem.
2. A selecção de um volume inicial de 0,2 mL de fluido oral revelou-se satisfatória, já que possibilita a realização da análise com uma sensibilidade adequada para detectar as concentrações destas substâncias em casos de exposição ambiental a tabaco.
3. A metodologia que aqui se apresenta revelou ser selectiva, linear na gama de concentrações de estudo, precisa e exacta, conforme normas internacionalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos.
4. Obtiveram-se valores consistentes de recuperação que rondam 90% para os compostos estudados e baixos limites de detecção e quantificação possibilitando a detecção de compostos mesmo a baixas concentrações, como é de esperar em indivíduos não fumadores, mas expostos ao fumo.
5. A aplicação da metodologia a amostras reais revelou ser adequada para o doseamento de biomarcadores de exposição a tabaco em fluido oral de não fumadores.

IV. Bibliografia

Adnan M.M., Ahmad A.G., Khaled W.O. (2009). A single- Step Extraction Method for the Determination of Nicotine and Cotinine in Jordanian smokers' Blood and Urine Samples by RP-HPLC and GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*. 47: 170-177.

Altun Z., Rehim M., Blomberg L.G. (2004). New trends in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent, and MEPS-LC-MS-MS. *Journal of Chromatography B*. 813: 129-135.

Andrew H.N., Laha T.J., Rainey P.M., Sadrzadeh S.M.H. (2006). Specific Detection of Anabasine, Nicotine, and Nicotine Metabolites in Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal Clin Pathol*. 126: 880-887.

Balfour D.J., Fagerstrom K.O. (1996). Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders. *Pharmacol Therap*. 72: 51.

Banegas J.R., Estape J., Gonzalez-Enriquez J., Lopez G.A.V., Pardell H., Salvador T., Sanchez A.L., Villabi J.R. (1999). Exposición involuntaria al humo ambiental de tabaco: Revisión actualizada y posibilidades de actuación. *Semergen*. 25 (8): 702-711.

Benowitz N.L. (1996). Pharmacology of nicotine: Addiction and Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 36: 597-613.

Benowitz N.L. (1998). Nicotine safety and toxicity. Ed Oxford Univ Press New York.

Benowitz N.L. (1999). Biomarkers of Environmental Tobacco Smoke Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 107 (2).

Benowitz N.L., Jacob P.III. (1984). Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clin. Pharmacol. Ther*. 35: 499-504.

Benowitz N.L., Jacob P.III. (1997). Individual differences in nicotine kinetics and metabolism in humans [Review]. *Natl Inst Drug Abuse Res Monogr*. 173: 48-64.

Benowitz N.L., Jacob P.III. (2000). Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on nicotine and cotinine metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. 67: 653-659.

Benowitz N.L., Jacob P.III. (2001). Trans-3-hydroxycotinine: Disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking. *Journal Clin Pharmacol.* 51: 53-59.

Benowitz N.L., Hukkanen J., Jacob P.III. (2009). Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Exp Pharmacol.* 192: 29-60.

Bergo P.L.S. (2007). Desenvolvimento de um método de screening para anfetaminas em urina empregando EMI-MS com confirmação por GC-MS. Dissertação de mestrado Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F. (1995). A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments. *Chromatographia.* 40: 7-8.

Biotage. (2011). Introduction to Solid Phase Extraction (SPE) for Reaction Work-up. Acedido a 7.2.2011. Disponível em <http://www.biotage.com/DynPage.aspx?id=35833>.

Blackford A.L., Yang G., Hernandez-Avila M., Przewozniak K., Zatonski W., Figueiredo V. (2006). Cotinine concentration in smokers from different countries: relationship with amount smoked and cigarette type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(10): 1799-804.

Borgerding M., Hubert K. (2005). Analysis of complex mixtures - Cigarette smoke. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 57: 43-73.

Calheiros J.M. (2006). Fumo ambiental e saúde. *Rev Port Clin Geral.* 22: 245-53.

Casman J.R., Park S.B., Yang Z.C., Wrigton S.A., Jacob P. III., Benowitz N.L. (1992). Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of trans-nicotine N'oxide. *Chem Res Toxicol.* 5 (2): 639- 646.

Chiara D.I. (2000). Role of Dopamine in the Behavioural Actions of Nicotine Related to Addiction. *Journal Pharmacol.* 30: 393(1-3): 295- 314.

Choo R.E., Huestis M.A. (2004). Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med.* 42:1273-87.

Concheiro M., Gray T.R., Shakleya D.M., Huestis M.A. (2010). High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 398(2): 915-24.

Concheiro M., Shakleya D.M., Huestis M.A. (2011). Simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates and nicotine metabolites in sweat by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 400: 69-78.

Cunha G., Jorge A., Maria M., Francisca C.F.S., Glauce S.B.V., Vasconcelos S. (2007). Nicotina e tabagismo. *Revista electrónica pesquisa médica.* 1(4): 1-10.

FDA. (2001). "Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation." Acedido a 20.3.2011. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.

Fontanals N., Marce R.M., Borrull F. (2007). New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds Review. *Journal of Chromatography A.* 1152: 14-31.

Fraga S., Sousa S., Santos A., Mello M., Lunet N., Padrão P., Barros H. (2005). Tabagismo em Portugal. *Arquivos de medicina.* 19(5-6): 207-229.

Gallardo E., Queiroz J.A. (2008). The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomed Chromatogr.* 22: 795- 821.

Gómez M.J., Aguera A., Mezcuca M., Hurtado J., Mocholí F., Fernández-Alba A.R. (2007). Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography-tandem mass spectrometry in wastewater. *Talanta.* 73: 314-320.

Goodman G. (2005). *As bases farmacológicas da terapêutica.* 11ª edição. Secção XV.

Gray T.R., Shakleya D.M., Huestis M.A. (2009). A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium. *Anal Bioanal Chem.* 393: 1977-1990.

Green C.R., Rodgman A. (1996). The tobacco chemist research conference a halfcentury forum for advances in analytical methodology of tobacco and products. *Recent Advances Tobacco Science.* 22: 131.

Hans H.M. (2005). Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. *Anal Bioanal Chem.* 381: 110-118.

Henningfield J.E., Keenan R. (2003). Nicotine delivery kinetics and abuses liability. *Journal Consult Clin Psychol.* 61: 743.

Henningfield J.E., Stapleton J.M., Benowitz N.L., Grayson R.F., London E.D. (1993). Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend.* 33: 23-29.

Hoffman A.F., Lupica C.R. (1978). Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. *Journal Neurophysiol.* 85: 72-83.

Hukkanen J., Jacob P.III., Benowitz N.L. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 57: 79-115.

Husgafvel-Pursiainen K. (2002). Biomarkers in the assessment of exposure and the biological effects of environmental tobacco smoke. *Journal Work Environ Health.* 28 (2): 21-29.

ICH (2005). "ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)."

INFOTABAC. (2009). Direcção-Geral da Saúde. Avaliação Intercalar do Impacte da Nova Legislação de Prevenção do Tabagismo (Lei 37/2007, de 14 de Agosto). Acedido a 5.1.2011. Disponível em: http://www.coppt.pt/attachments/106_200912_avalicao_aplicacao_lei.pdf.

Insook K., William D.D., Huestis A.M. (2004). Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine and trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography- mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 814: 233-240.

Jaakkola M.S., Jaakkola J.J.K. (1997). Assessment of exposure to environmental tobacco smoke. *Journal Eur Respir.* 10: 2384-2397.

Jacob P.III., Yu L., Duan M., Ramos L., Yturalde O., Benowitz N.L. (2011). 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.* 879: 267-276.

Jornal Público. (2011). Pedro Crisóstomo. Espanha endurece lei antitabaco para espaços fechados. Acedido a 2.1.2011. Disponível em: http://www.publico.pt/Mundo/espanha-endurece-lei-antitabaco-para-espacos-fechados_1473242.

Joya X., Pujadas M., Falcón M., Civit E., Garcia-Algar O., Vall O., Pichini S., Luna A., Torre R. (2010). Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. *Forensic Science International*. 196: 38-42.

Kataoka H. (2010). Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Anal Bioanal Chem*. 396: 339-364.

Kataoka H., Inoue R., Katsuharu Y., Keita S. (2009). 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 Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 49: 108-114.

Keithly L., Ferris Wayne G., Cullen D.M., Connolly G.N. (2005). Industry research on the use and effects of levulinic acid: a case study in cigarette additives. *Nicotine Tob Res*. 7: 761-771.

Koob G.F., Le Moal M. (2001). Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*. 24(2): 97-129.

Koob G.F., Le Moal M. (2006). *Neurobiology of addiction*. New York : Academic Press. 243-288.

Lafay F., Vulliet E., Flament-Waton M. (2010). Contribution of microextraction in packed sorbent for the analysis of cotinine in human urine by GC-MS. *Anal Bioanal Chem*. 396: 937-941.

Langel K., Engblom C., Pehrsson A., Gunnar T., Ariniemi K., Lillsunde P. (2008). Drug testing in oral fluid-evaluation of sample collection devices. *Journal Anal Toxicol*. 32: 393-401.

Lewan T. (2000). Why not just how a cigarette markers create more addictive tobacco. Associated Press. 13/09/1998. National cancer institute u.s. department of health an human services. Cigar, Monograph 9. Washington.

Longenecker G.L. (2002). *Drogas: ações e reações*. São Paulo. Market Books.

Marclay F., Saugy M. (2010). Determination of nicotine and nicotine metabolites in urine by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry: Potential use of smokeless tobacco products by ice hockey players. *Journal of Chromatography A*. 1217: 7528-7538.

Martinez A.F.C. (2009). Aplicação da espectrometria de massas na derreplicação de extractos brutos produzidos por actinobacterias isoladas da rizosfera do milho (*Zea mays* L). Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. McGraw-Hill, Rio de Janeiro.

Menezes A.M.B. (2004). A epidemiologia do tabaco. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 30 (2): 3-6.

Miller E.I., Norris H.K., Rollins D.E., Tiffany S.T., Moore C.M., Vincent M.J., Agrawal A., Wilkins D.J. (2010). Identification and quantification of nicotine biomarkers in human oral fluid from individuals receiving low-dose transdermal nicotine: a preliminary study. *Journal of analytical toxicology*. 34: 357-366.

Miller E.I., Norris H.K., Rollins D.E., Tiffany S.T., Wilkins D.G. (2010). A novel validated procedure for the determination of nicotine, eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 878: 725-737.

Moliner A. (2008). Optimização e validação de metodologia analítica empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para determinação de multiclassas de agrotóxicos e metabolitos em água de superfície de abastecimento público. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande. Brasil.

Moyer T.P., Joel R.C., Robert J.E., Lowell C.D., Jon O.E., Darrell R.S., Richard D.H. (2002). Simultaneous Analysis of Nicotine, Nicotine Metabolites, and Tobacco Alkaloids in Serum or Urine by Tandem Mass Spectrometry, with Clinically Relevant Metabolic Profiles. *Clinical Chemistry*. 48(9): 1460-1471.

Nakajima M., Yamamoto T., Nunoya K., Yokoy T., Ngashima K., Inoue K., Funae Y., Shimada N., Kamataki T., Kuroiwa Y. (1996). Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab*. 24: 1212-1217.

Navazesh M. (1993). Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci*. 20: 72-77.

NYBG. (2011). The new York botanical garden. *Nicotiana Tabacum*. Acedido a 25.5.2011. Disponível em: http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen_list.php.

Oliveira A.C.P. (2010). Desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de Zolpidem em plasma humano utilizando a técnica de cromatografia líquida

acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Dissertação de mestrado. Universidade São Francisco.

Pamplona P. (2007). In-patient smoker? - Providing appropriate intervention. *Revista portuguesa de pneumologia*. 13 (6): 801-826.

Pandey S.K., Kim K. (2010). A review of environmental tobacco smoke and its determination in air. *Trends in Analytical Chemistry*. 29 (8): 804-819.

Pedrouzo M., Borrull F., Pocurull E., Marce R.M. (2011). Drugs of abuse and their metabolites in waste and surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Sep Sci*. 34: 1091-1101.

Pellegrini M., Marchei E., Rossi S., Vagnarelli F., Durgbanshi A., Garcia-Algar O., Vall O., Pichini S. (2007). Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 21: 2693-2703.

Picciotto M.R., Calderone B.J., King S.L., Zachariou V. (2000). Nicotine Receptors in Brain: Links between Molecular Biology and Behavior. *Neuropsychopharmacology*. 22: 451-64.

Pirkle J.L., Flegal K.M., Bernet J.T. (1996). Exposure of the population to environmental tobacco smoke. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 275:1233.

Planeta C.S., Cruz F.C., Marin M.T., Delucia R. (2007). Farmacodependência. *Farmacologia integrada*. Rio de Janeiro: Revinter. 282-294.

Queiroz S.C.N., Collins C., Jardim I.C.S.F. (2001). Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*. 24(1): 8.

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K. (2004). *Farmacologia*. Tradução da 5ª edição. Tradutores: Patrícia Lydie Voeux; Antônio José Magalhães da Silva Moreira. Rio de Janeiro. Elsevier.

Rehim M.A. (2004). New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 801: 317-321.

- Repace J.L. (2006). Air pollution in Virginia's Hospitality industry .Repace Associates, Inc. Secondhand smoke Consultants. 804: 497-3151.
- Repace J.L., Hyde J.N., Brugge D. (2006) Air pollution in Boston bars before and after a smoking ban. BMC Public Health. 6: 266.
- Repace J.L. (2006). Exposure to Secondhand Smoke. Environmental science and technology. 9: 201-231.
- Rosemberg J. (1983). Tabagismo, sério problema de saúde pública. São Paulo:Almed EDUSP.
- Rosemberg J. (2002). Pandemia do Tabagismo. Enfoques históricos e atuais. Ed Secretaria de Saúde do Estado de S Paulo.
- Santos S., Studart F., Vinícius L. (2008). Marcadores biológicos do tabagismo Pneumologia Paulista. 21: 2.
- Shakleya D.M., Huestis M.A. (2009). Optimization and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine and norcotinine in human oral fluid. Anal Bioanal Chem. 395: 2349-2357.
- Shakleya D.M., Huestis M.A. (2009). Simultaneous and sensitive measurement of nicotine, cotinine, trans-3-hydroxycotinine and norcotinine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 877: 3537-3542.
- Simpson N.J.K. (2000). Solid-Phase extraction, Principles, Techniques and Applications. Harbor City, California, Marcel Dekker.
- Slade J. (1993). Nicotine delivery devices. In Orleans C Slade J. Nicotine Addiction. Principles and management. Oxford Univ Press Inc.
- SRNT. (2002). Sub-committee on biochemical verification. Biochemical verification of tobacco use and cessation. Nicotine Tob Res. 4(2): 149-59.
- Stolerman I.P., Jarvis M.J. (1995). The Scientific Case that Nicotine Is Addictive. Psychopharmacology. 117: 2-10.
- Telepchak M.J., August T.F., Chaney G. (2004). Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction. H. Press. Totowa, New Jersey.

Trullén A., Bartolomé C.B., Barrueco M., Herrero I., Jiménez C.A. (2006). Nuevas perspectivas en el diagnóstico y evolución del consumo de tabaco: marcadores de exposición. *Prev Tab.* 8(4): 164-173.

Tutka P., Jerzy M., Marian W. (2005). Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacological reports.* 57:143-153.

Tuulia H., Marja-Liisa R. (2008). Sorbent- and liquid-phase microextraction techniques and membrane-assisted extraction in combination with gas chromatographic analysis: A review. *Analytical chemical acta.* 614: 27-37.

Valle L.B.S., Oliveira-filho R.M., Delucia R., Oga S. (2007). *Farmacologia Integrada*, 3ª edição, Rio de Janeiro, Editora Revinter.

Volkow N.D. (2006). Tobacco Addiction. National Institute on Drug - Abuse Research Report Series 06: 4342.

(WADA) World Anti-doping Agency. (2004). International standard for laboratories: identification criteria for qualitative assays incorporating chromatography and mass spectrometry. Acedido a 12.5.2011. Disponível em: http://www.wada-ama.org/rte-content/document/criteria_1_2.pdf.

Waters (2010). Oasis sample extraction products.

Wendy M.B., Huestis M.H. (2009). Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse. *Clinical Chemistry.* 55(11): 1910-1931.

WHO. (2009). WHO REPORT on the global TOBACCO epidemic, 2009: Implementing smoke-free environments. Acedido a 7.10.2010. Disponível em: http://www.who.int/tobacco/mpower/2009/GTCR_2009-web.pdf.

Yildiz D. (2004). Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon.* 43: 619-632.

Yusuke I., Masato G., Keisuke M., Emi T., Rie I., Koichi S., Norihiro S., Tsunehisa M., Hiroyuki N. (2011). Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry for quantification of nicotine and its metabolites in human maternal and cord sera. *Biomed Chromatogr.* 25: 503-510.

Zelles T., Purushotham K.R., Macauley S.P., Oxford G.E., Humphreys- Beher MG. (1995). Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all. *Journal Dent Res.* 74: 1826-1832.

Zevin S., Gourlay S.G., Benowitz N.L. (1998). Clinical pharmacology of nicotine. *Clin Dermatol.* 16: 557-564.

Zevin S., Jacob P.III., Benowitz N.L. (1997). Cotinine effects on nicotine metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 68: 58-66.

Żwir-Ferenc A., Biziuk M. (2006). Solid Phase Extraction Technique - Trends, Opportunities and Applications. *Journal of Environ Stud.* 15(5): 677-690.

V. Anexos

1. Consentimento informado (para a obtenção do fluido oral)



Universidade
da Beira
Interior

CONSENTIMENTO INFORMADO



O presente estudo consiste no doseamento de **marcadores de consumo de tabaco em fumadores passivos, concretamente na população estudantil Portuguesa**. Este estudo está inserido no projecto de investigação da aluna Beatriz Marques da Fonseca, para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica pela Universidade da Beira Interior, sobre orientação da Professora Doutora Maria Eugenia Gallardo Alba.

Para a realização deste estudo será necessário a recolha de amostra de saliva, aproximadamente num volume de 1,5 mL. A totalidade da amostra será utilizada para a realização do mesmo, de forma que, a eventual possibilidade de excedente será totalmente destruído.

Esta amostra destina-se **exclusivamente** ao estudo de compostos do tabaco como poluentes atmosféricos em crianças, não havendo lugar a qualquer outro tipo de estudo, nomeadamente de índole genética. Destaca-se ainda que **não será preciso** a recolha de dados relativamente a identificação dos indivíduos doadores desta amostra.

Uma vez que se trata de uma população com idade inferior a 18 anos, solicita-se que o encarregado de educação do aluno ou o director da escola assine o presente documento de consentimento informado:

Eu, _____, abaixo assinado, consinto que o menor sobre a minha tutela possa fornecer de forma totalmente voluntária e anónima uma amostra de saliva. Mais declaro que fui devidamente informado acerca do facto de que esta amostra se destina exclusivamente ao estudo de compostos do tabaco como poluentes atmosféricos em crianças, não havendo lugar a qualquer outro tipo de estudo, nomeadamente de índole genética.

Este estudo está a ser realizado pelo grupo de Toxicologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior. Fui ainda informado de que será utilizada a totalidade da amostra fornecida, sendo o remanescente destruído.



Faculdade
de Ciências
da Saúde

fsaude@fcsaude.ubi.pt

Covilhã, _____ de Junho de 2011

2. Comunicações submetidas no âmbito desta tese

DETERMINACIÓN DE NICOTINA, COTININA Y TRANS-HIDROXICOTININA EN SALIVA POR CROMATOGRAFIA DE GASES/ESPECTROMETRIA DE MASAS EN TANDEM (comunicação oral aceite)

da Fonseca BM; Moreno IED; Magalhães AR; Geraldtes V; Queiroz JA; Calheiros J; Barroso M; Gallardo, E.

XIX Congreso Español de Toxicología, Vigo, Espanha, Julho de 2011.

ANALYTICAL APPROACH TO THE DETERMINATION OF BIOMARKERS OF TOBACCO EXPOSURE IN ORAL FLUID (comunicação oral aceite)

da Fonseca BM; Moreno IED; Magalhães AR; Queiroz JA; Calheiros J; Barroso M; Gallardo E. VI Annual CICS Symposium, Covilhã, Julho 2011.

GAS CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE QUANTITATION OF NICOTINE, COTININE AND TRANS-3-HIDROXICOTININE IN ORAL FLUID (comunicação em formato poster aceite)

B.M. da Fonseca, I.E.D. Moreno, A.R. Magalhães, J.A. Queiroz, J. Calheiros, M. Barroso, E. Gallardo

19th Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences, 9th Triennial Meeting of World Police Medical Officers and the 5th Meeting of the Mediterranean Academy of Forensic Sciences 2011 Joint Meeting, Funchal, Setembro de 2011.

3. Outras comunicações realizadas no decorrer desta tese

APLICAÇÃO DO DESIGN OF EXPERIMENTS (DOE) NA OPTIMIZAÇÃO DA EXTRACÇÃO DE PIPERAZINAS DE URINA POR MICROEXTRACÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA

Moreno I.E.D., da Fonseca B.M., Magalhães A.R., Geraldtes V., Queiroz J.A., Barroso M., Costa S., Gallardo E.

Jornadas Ibéricas de Toxicologia, Covilhã, Março de 2011.

DETERMINACIÓN DE PIPERACINAS EN MUESTRAS DE ORINA POR MICROEXTRACCIÓN EN ADSORBENTE EMPAQUETADO (MEPS) (comunicação oral aceite)

Moreno I.E.D., da Fonseca B.M., Magalhães A.R., Geraldtes V., Queiroz J.A., Barroso M., Costa S., Gallardo E.

XIX Congreso Español de Toxicología, Vigo, Espanha, Julho de 2011.

ANALYTICAL APPROACH FOR DETERMINATION OF PIPERAZINES BY UPLC-DAD USING MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT (comunicação oral aceite)

I.E.D. Moreno, B. M. da Fonseca, A.R. Magalhães, M. Barroso, S. Costa, J.A. Queiroz, E. Gallardo

19th Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences, 9th Triennial Meeting of World Police Medical Officers and the 5th Meeting of the Mediterranean Academy of Forensic Sciences 2011 Joint Meeting, Funchal, Setembro de 2011.

ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY - DIODE ARRAY FOR DETERMINATION OF PIPERAZINES IN URINE (comunicação oral aceite)

Moreno I.E.D., da Fonseca B. M., Magalhães A.R., Barroso M., Costa S., Queiroz J.A., Gallardo E.

VI Annual CICS Symposium, Covilhã, Julho 2011.

ANÁLISE DE PIPERAZINAS POR MICROEXTRACÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA E HPLC/DAD EM AMOSTRAS DE URINA

Moreno I.E.D., da Fonseca B.M., Magalhães A.R., Geraldés V., Queiroz J.A., Barroso M., Costa S., Gallardo E.

Jornadas Ibéricas de Toxicologia, Covilhã, Março de 2011.

MICROEXTRACÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA (MEPS), UMA NOVA METODOLOGIA PARA EXTRACÇÃO DE PIPERAZINAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE URINA

Moreno I.E.D., da Fonseca B.M., Magalhães A.R., Geraldés V., Queiroz J.A., Barroso M., Costa S., Gallardo E.

Conferência Ibero-americana das Faculdades de Farmácia, Lisboa 2011.

4. Trabalhos submetidos para publicação em revista indexada durante a realização deste trabalho

Determination of nicotine, cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in oral fluid using solid-phase extraction and gas chromatography- tandem mass spectrometry.

B.M. da Fonseca, I.E.D. Moreno, A.R. Magalhães, M. Barroso, J.A. Queiroz, J. Calheiros, S. Ravara, E. Gallardo

Submetido para o Journal of Chromatography A (16 Junho de 2011).

Analysis of piperazine-type stimulants in human urine by microextraction in packed sorbent: the power of the factorial design approach in optimizing the whole extraction procedure. I.E.D. Moreno, B.M. da Fonseca, A.R. Magalhães, V.S. Geraldes, J.A. Queiroz, M. Barroso, S. Costa, E. Gallardo

Submetido para o Journal of Chromatography A (15 Junho de 2011).

Development and validation of a method for the determination of piperazines in human urine by means of microextraction by packed sorbent and ultra high performance liquid chromatography-diode array detection.

I.E.D. Moreno, B.M. da Fonseca, A.R. Magalhães, M. Barroso, S. Costa, J. A. Queiroz, E. Gallardo

Submetido para o Analytical Chemistry (19 Junho de 2011).