



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DIEGO DA SILVA VASCONCELLOS

**DETERMINAÇÃO DE COTININA URINÁRIA POR HPLC-UV PARA
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE PACIENTES ASMÁTICOS AO
TABAGISMO**

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Telles de Oliva

Salvador, BA

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DIEGO DA SILVA VASCONCELLOS

**DETERMINAÇÃO DE COTININA URINÁRIA POR HPLC-UV PARA
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE PACIENTES ASMÁTICOS AO
TABAGISMO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química analítica

Salvador, BA

2016

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

DA SILVA VASCONCELLOS, DIEGO
DETERMINAÇÃO DE COTININA URINÁRIA POR HPLC-UV PARA
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE PACIENTES ASMÁTICOS AO
TABAGISMO / DIEGO DA SILVA VASCONCELLOS, MICHEL ERIK. --
SALVADOR, 2016.
80 f. : il

Orientador: LEONARDO SENA GOMES TEIXEIRA.
Coorientador: SERGIO TELLES DE OLIVA.
Dissertação (Mestrado - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA) -- Universidade Federal da Bahia, INSTITUTO DE
QUÍMICA, 2016.

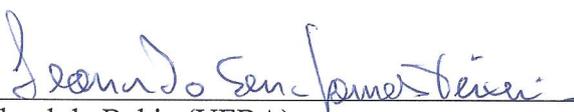
1. TABAGISMO. 2. BIOMONITORAMENTO. 3. COTININA. 4.
ASMA. II. ERIK, MICHEL. I. SENA GOMES TEIXEIRA,
LEONARDO. II. TELLES DE OLIVA, SERGIO . III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

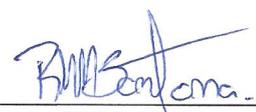
DIEGO DA SILVA VASCONCELLOS

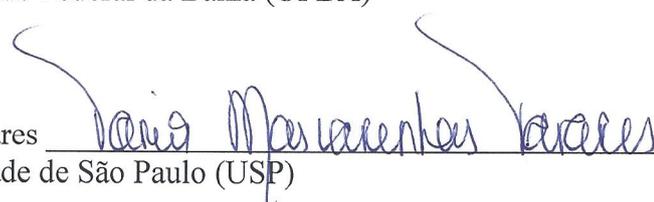
“DETERMINAÇÃO DE COTININA URINÁRIA POR HPLC-UV PARA AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE PACIENTES ASMÁTICOS AO TABAGISMO”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Sérgio Telles de Oliva 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Rodolfo de Melo Magalhães Santana 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof^a. Dr^a. Tania Mascarenhas Tavares 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 13 de dezembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, sabedoria e entendimento.

À minha família que sempre me incentivou e deu apoio nos momentos mais difíceis. Em especial a minha mãe sempre presente e a quem eu tenho maior admiração, meu maior exemplo de força e determinação, às minhas irmãs Maira e Michelle pelo incentivo e pela força, principalmente nos momentos mais difíceis e aos meus sobrinhos Alice e Pedro que enchem minha vida de amor e alegria.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo por confiar na minha capacidade de realizar o trabalho.

Ao meu co-orientador e grande amigo Prof. Dr. Sérgio Oliva, sempre presente em todos os momentos, a quem eu sempre pude contar.

Aos amigos, quase irmãos, Yvonbergues e Ives, pela grande ajuda na execução do trabalho e por tornarem essa missão menos árdua e mais descontraída.

À Gabriela, Andreia e Lira pelo comprometimento e disposição a ajudar sempre que preciso.

Ao NEA em nome de Prof. Dr. Álvaro pela confiança na análise das amostras.

Aos amigos do LAQUAM pela amizade e momentos de descontração no final da tarde.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que participaram direta ou indiretamente na execução do trabalho,

Muito obrigado.

Resumo

Embora o hábito de fumar seja bem antigo, a preocupação a respeito dos malefícios trazidos pelo uso do cigarro é recente, sendo relatada na literatura pela primeira vez na década de 70. A fumaça do cigarro é uma mistura complexa, composta por material particulado e gás, na qual mais de 4000 substâncias já foram identificadas, sendo que, pelo menos, 50 destas apresenta algum potencial cancerígeno. A nicotina presente em maior concentração nesta fumaça é o alcaloide responsável pela dependência. O tabagismo afeta de maneira direta enfermidades do trato respiratório, principalmente indivíduos que apresentam quadro de asma, pois além de agravar os sintomas, traz efeito negativo sobre o tratamento. Nesse sentido, a avaliação do grau de exposição se faz necessário para estimar como este fator está influenciando a resposta do tratamento do asmático. Para tanto, é imprescindível o biomonitoramento do indivíduo à exposição a fumaça de cigarro, através da determinação do metabólito da nicotina mais estável e de maior concentração, a cotinina, eliminada pela urina. Este trabalho teve como objetivo determinar os níveis de exposição de pacientes do Núcleo Excelência de Asma (NEA) através da quantificação da cotinina na urina. Foram analisadas 1317 amostras de pacientes com diferentes graus de quadro asmático (grupo controle, asma leve e asma grave). Os níveis de cotinina foram determinados através da implantação e validação de um método já descrito na literatura que combina a utilização de um padrão interno (PI), 2-fenilimidazol, extração do PI e da cotinina presentes na urina com diclorometano e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV ($\lambda = 260 \text{ nm}$). A validação consistiu na avaliação de alguns parâmetros descritos pela resolução n° 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA: linearidade, seletividade, precisão (intermediária e repetitividade), exatidão, limites de detecção e quantificação. O método em questão apresentou uma boa linearidade na faixa de trabalho ($0\text{-}1500 \mu\text{g.L}^{-1}$), mostrou-se seletivo ao analito em questão, além de apresentar percentagens de desvio padrão relativo (DRP) aceitáveis para os parâmetros precisão intermediária e repetitividade (8,4 e 6,4% respectivamente para um padrão de cotinina em urina de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$). A exatidão foi avaliada através da percentagem de recuperação de um padrão de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ cotinina em urina, sendo encontrado um valor de 103,4%. Os limites de detecção e quantificação foram 6,46 e $19,59 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Em geral, os pacientes do NEA apresentaram baixos índices de exposição à fumaça do cigarro. Cerca de 86% destes apresentaram concentrações de cotinina urinária abaixo do limite de detecção. Na comparação entre as respostas obtidas pela aplicação de um questionário padrão e os níveis de cotinina que caracterizou o paciente como fumante ativo nos pacientes do grupo controle, asma leve e asma grave verificou-se um percentual de contradição de 1,42, 0,73 e 6,0% respectivamente. Este fato indica que uma parte dos pacientes com asma grave omitem a sua condição de fumante por medo de não ser aceito no programa.

Palavras chaves: tabagismo; biomonitoramento; cotinina; Asma.

Abstract

Although cigarette smoking is very old, concern about the harm caused by cigarette smoking is recent and has been reported in the literature for the first time in the 1970s. Cigarette smoke is a complex mixture of particulate matter and gas, in which more than 4000 substances have already been identified, and at least 50 of them have some carcinogenic potential. The nicotine present in the highest concentration in this smoke is the alkaloid responsible for the dependence. Smoking directly affects diseases of the respiratory tract, mainly individuals presenting with asthma, because besides aggravating the symptoms, it has a negative effect on the treatment. In this sense, the evaluation of the degree of exposure is necessary to estimate how this factor is influencing the treatment response of the asthmatic. Therefore, it is essential to biomonitor the individual to exposure to cigarette smoke, by determining the most stable nicotine metabolite and higher concentration, cotinine, eliminated by urine. The aim of this study was to determine the exposure levels of patients from the Nucleus Excellence of Asthma (NEA) by quantifying cotinine in urine. 1317 samples from patients with different degrees of asthmatic disease (control group, mild asthma and severe asthma) were analyzed. Cotinine levels were determined through the implantation and validation of a method already described in the literature that combines the use of an internal standard (IS), 2-phenylimidazole, extraction of IS and cotinine present in the urine with dichloromethane and determination by High pressure liquid chromatography (HPLC) with UV detection ($\lambda = 260 \text{ nm}$). The validation consisted of the evaluation of some parameters described by ANVISA resolution n° 899 of May 29, 2003: linearity, selectivity, precision (intermediate and repeatability), accuracy, limits of detection and quantification. The method in question showed a good linearity in the working range ($0\text{-}1500 \mu\text{g.L}^{-1}$), was selective to the analyte in question, besides presenting percentages of relative standard deviation (RSD) acceptable for the parameters intermediate precision and Repeatability (8.4 and 6.4%, respectively, for a cotinine urine standard of $100 \mu\text{g.L}^{-1}$). Accuracy was assessed by the percentage recovery of a standard of $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ cotinine in urine, being found a value of 103.4%. The limits of detection and quantification were 6.46 and $19.59 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. In general, NEA patients had low rates of exposure to cigarette smoke. About 86% of these had urinary cotinine concentrations below the limit of detection. In the comparison between the responses obtained by applying a standard questionnaire and the levels of cotinine that characterized the patient as an active smoker in the control, mild asthma and severe asthma patients, a contradiction percentage of 1.42, 0.73 and 6.0% respectively. This fact indicates that some patients with severe asthma omit their smoking status for fear of not being accepted into the program.

Key words: smoking; biomonitoring; cotinine; Asthma.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biomarcadores para algumas substâncias orgânicas presentes em urina e faixa de concentração encontrada em seis diferentes laboratórios da Alemanha.....	19
Tabela 2. Tempo de meia-vida e volume de distribuição para a nicotina e cotinina em fumantes e não-fumantes.....	22
Tabela 3. Faixas de concentração da cotinina em diferentes matrizes biológicas.....	23
Tabela 4. Características da extração líquido-líquido da cotinina urinária utilizando diferentes solventes.....	25
Tabela 5. Características da extração em fase sólida da cotinina urinária utilizando diferentes tipos de fase estacionária e solventes.....	26
Tabela 6. Limites de detecção da cotinina em matrizes biológicas, utilizando diferentes métodos cromatográficos de determinação.....	30
Tabela 7. Parâmetros cromatográficos utilizados na determinação de cotinina.....	35
Tabela 8. Volumes adicionados do padrão de cotinina no preparo dos padrões de calibração para análise de cotinina em urina.....	38
Tabela 9. Curvas analíticas utilizadas na validação do método.....	49
Tabela 10. Valores de repetitividade, descritos em desvio padrão relativo (DPR) nas concentrações estudadas.....	50
Tabela 11. Valores de precisão intermediária, descritos em desvio padrão relativo (DPR) nas concentrações estudadas.....	50
Tabela 12. Porcentagens de recuperação nas concentrações estudadas.....	50
Tabela 13. Parâmetros para determinação dos limites de detecção e quantificação.....	51
Tabela 14. Comparação ente os parâmetros de validação obtidos neste trabalho e reportados por Cattaneo e colaboradores.....	52
Tabela 15. Características sociodemográficas dos participantes do estudo.....	53
Tabela 16. Porcentagem de classificação em grau de exposição dos grupos de indivíduos estudados.....	59
Tabela 17. Porcentagem de contradições entre o questionário e análise das amostras.....	60
Tabela 18. Fumantes autodeclarados e concentração de cotinina urinária.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Pulmão de um indivíduo não fumante. B) Pulmão de um indivíduo fumante.....	13
Figura 2. Porcentagens de fumantes nas capitais brasileiras.....	14
Figura 3. Esquema de biotransformação da nicotina no organismo humano.....	21
Figura 4. Ilustração do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (A) e coluna utilizada (B).....	36
Figura 5. Processo de extração e análise da cotinina.....	39
Figura 6. Esquematização ilustrada do procedimento para a determinação de cotinina em urina.....	41
Figura 7. Cromatograma de urina sem presença da cotinina.....	47
Figura 8. Cromatograma de urina com concentração de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cotinina (verde) e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cotinina (azul).....	48
Figura 9. Distribuição da concentração de cotinina nos pacientes do NEA por faixa de concentração.....	55
Figura 10. Dendogramas obtidos da análise de agrupamento hierárquico utilizando como variável principal a concentração de cotinina em amostra de urina.....	58

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
1.1.	TABAGISMO.....	13
1.2.	ASMA E O TABAGISMO.....	16
1.3.	BIOMONITORAMENTO HUMANO.....	17
1.4.	NICOTINA E COTININA.....	21
1.5.	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA COTININA EM URINA.....	24
1.5.1.	EXTRAÇÃO DA COTININA EM URINA.....	24
1.5.2.	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA COTININA EM URINA.....	26
1.5.2.1.	TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS.....	27
1.5.2.2.	TÉCNICAS IMUNOQUÍMICAS.....	27
1.5.2.3.	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	28
2.	OBJETIVOS.....	31
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	31
2.1.1.	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	31
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	32
3.1.	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS DE LABORATÓRIO.....	32
3.1.1.	MATERIAL PARA ANÁLISE POR HPLC.....	32
3.1.2.	MATERIAL DE SUPORTE E EQUIPAMENTOS.....	32
3.1.3.	REAGENTES.....	33
3.2.	PREPARO DE SOLUÇÕES.....	33
3.2.1.	PREPARO DO ELUENTE PARA DETERMINAÇÃO DE COTININA.....	33
3.2.2.	SOLUÇÃO PADRÃO DE COTININA E 2-FENILIMIDAZOL.....	34
3.2.3.	DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	34
3.3.	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	35
3.4.	CURVA ANALÍTICA.....	36
3.5.	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	40
3.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	42
3.6.1.	SELETIVIDADE	42

3.6.2.	LINEARIDADE.....	42
3.6.3.	PRECISÃO E EXATIDÃO.....	43
3.6.3.1.	PRECISÃO.....	43
3.6.3.2.	EXATIDÃO.....	44
3.6.4.	LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
4.1.	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO.....	46
4.1.1.	SELETIVIDADE.....	46
4.1.2.	CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE.....	49
4.1.3.	PRECISÃO.....	49
4.1.4.	EXATIDÃO.....	50
4.1.5.	LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	51
4.2.	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	52
5.	CONCLUSSÕES.....	63
6.	REFERÊNCIAS.....	64
	Anexos.....	71

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas enfrentados pela população em grandes centros urbanos é a sua exposição a contaminantes presentes no ar que impactam diretamente na saúde humana a curto ou longo prazo. Dentre os poluentes presentes na atmosfera, destacam-se aqueles que são potencialmente cancerígenos, como alguns compostos orgânicos aromáticos da classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) provenientes da queima de combustível fóssil, emissões de origem industrial e presentes na fumaça de cigarro.

A relação entre a concentração desses compostos e o dano a saúde da população é cientificamente comprovada (NETTO et al., 2000). O risco atribuído à poluição atmosférica nos casos de câncer de pulmão está entre 1 a 10 %, sendo que as pessoas expostas a HPA's aumentam em 15 vezes a chance de desenvolver o câncer (ZAMBONI et al., 2002). Presentes na fumaça de cigarro, o ato de fumar provoca um efeito deletério a saúde, de uma forma mais rápida, contribuindo para alterações genéticas e, conseqüentemente, desenvolvimento de câncer de pulmão, dentre outros malefícios. Outra população diretamente afetada, consiste nas pessoas que não tem o hábito de fumar, mas que convivem com fumantes, ou seja, os fumantes passivos. Resultados de uma pesquisa publicada por MUKHERJEE et al., (2011), indicam que a promoção de danos ao DNA pode ocorrer logo após a fumaça chegar ao pulmão.

Embora o hábito de fumar seja bem antigo entre os europeus, a folha de tabaco tem origem americana e foi inicialmente cultivada entre os povos indígenas, ressaltando que a primeira máquina de confeccionar cigarros foi inventada em 1881, quando o comércio do mesmo cresceu por todo mundo, inicialmente por multinacionais estadunidenses. No Brasil, a produção de cigarros foi estabelecida pela empresa British American Tobacco, fundadora da Souza Cruz, empresa que controla o comércio de cigarros no Brasil, desde 1914 (BARBOSA et al.,2011).

A fumaça do cigarro é uma mistura heterogênea complexa, apresenta em sua composição gases e material particulado, contém mais de 4000 substâncias identificadas, sendo que pelo menos 50 destas apresentam potencial

carcinogênico. A nicotina, presente em maior concentração, é o principal alcaloide presente na folha de tabaco (MALAFATTI e MARTINS, 2009; TYRPIEN et al., 2000). O número de cigarros fumados além da exposição a longo período de tempo tem uma ligação diretamente proporcional ao risco de adquirir, entre outras moléstias, o câncer e é responsável por uma em cada dez mortes registradas no mundo (DJORDJEVIC et al., 1997; MATSUMOTO et al., 2013). A Figura 1 ilustra o pulmão de um não fumante (A) e uma pessoa fumante (B). A região em preto representa o material particulado presente na fumaça, que fica retido nas paredes do pulmão.

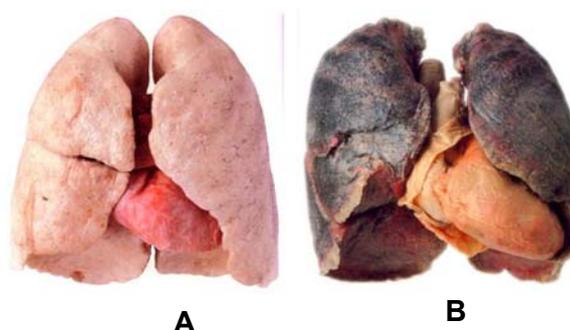


Figura 1. A) Pulmão de um indivíduo não fumante. B) Pulmão de um indivíduo fumante.

Fonte: <http://pneumologia.med.br/site/wp-content/uploads/pulmoes.gif>, acessado 14/10/2016.

1.1. TABAGISMO

O risco relacionado ao hábito de fumar não está restrito aos efeitos provocados pela nicotina, sabido que é relatada a existência de várias substâncias tóxicas presentes no mesmo (PETERSEN et al., 2010). Existem duas formas distintas de exposição tabágica: exposição direta à fumaça principal, inalada diretamente do cigarro (fumantes ativos), e a exposição à fumaça secundária do cigarro, ou fumaça ambiental (fumantes passivos) (MELLO et al., 2005 e KOWALSKI et al., 2007).

Em uma avaliação com dados de 187 países, estimou-se que ocorreu uma diminuição na porcentagem de fumantes, no período de 2002 a 2009, com idade superior a 15 anos, de 41,2% para 31,1% para homens e de 10,6% para 6,2%

para as mulheres, apesar do número de fumantes ter aumentado de 721 milhões para 967 milhões, fato devido ao aumento populacional (GARCIA et al., 2015). Segundo Ministério da Saúde do Brasil, em dados de 2014, das capitais brasileiras, São Luís é a com menor índice de fumantes com 5,5 % e Porto Alegre é a capital com maior índice de fumantes, com 16,4%. Salvador ocupa a quinta posição empatada com Belém com menores índices de fumantes, 7,0%, como observado na Figura 2.

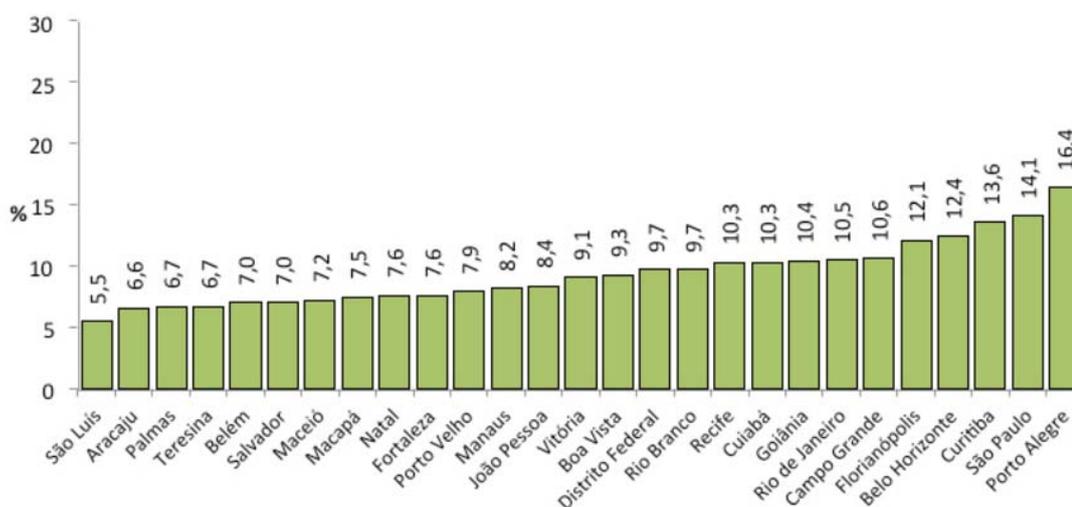


Figura 2. Porcentagens de fumantes nas capitais brasileiras.

Fonte: <http://promocaodasaude.saude.gov.br/promocaodasaude/assuntos/controle-ao-tabagismo/males-do-tabagismo/noticias/perfil-dos-usuarios-do-tabaco-no-brasil> acessado em 29/09/2016.

Observa-se uma maior prevalência de pessoas do sexo masculino relacionado ao hábito de fumar. Em 2002, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou que a mortalidade relacionada ao tabagismo, principalmente pelo agravamento de doenças crônicas, era de 13,1% para os homens contra 3,8% para as mulheres, sendo este principal responsável por 90% dos casos de câncer de pulmão nos homens e 70% nas mulheres (WHO, 2015). O tabagismo apresenta fator de risco para doenças cardiovasculares e câncer de orofaringe, esôfago, bexiga e laringe, e em mulheres, também câncer do colo do útero (NUNES e CASTRO, 2011). Em trabalho realizado com ratos expostos a fumaça

do cigarro, observou-se que apresentaram evidente perda de peso, além de enfisema pulmonar induzido pela fumaça do cigarro (KOZMA et al., 2014).

Estudos apontam para uma correlação positiva entre o consumo de cigarros e a mortalidade por câncer de próstata, além de ser um dos fatores primários para a progressão do mesmo. Fumantes têm um maior risco no desenvolvimento de metástase, ou seja, formação de um novo agrupamento tumoral (STEINBERGER et al., 2015).

Em estudo para avaliar o efeito do uso de cigarros no transporte mucociliar, principal mecanismo para defesa das zonas aéreas superiores e inferiores à agentes patogênicos e toxinas, demonstrou-se que a frequência do hábito diminuiu esse transporte após 8 horas da prática da ação, quando comparado com indivíduos que não fizeram uso de cigarros (PROENÇA et al., 2011).

A exposição à fumaça de cigarro é prejudicial em qualquer proporção. Estudos apontam para uma maior probabilidade de asma precoce, bem como anormalidades cardíacas em crianças que são expostas à fumaça de cigarro antes e/ou após a gestação (VIVEKANANDARAJAH et al., 2007). Em mulheres grávidas observou-se uma maior resistência no fluxo sanguíneo na placenta, diretamente proporcional ao uso do cigarro (MACHADO et al., 2011).

Implementado entre 2006-2014 pelo governo federal, o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL), teve como principal objetivo fazer o monitoramento de doenças de risco. Entre os principais riscos destacam-se os associados ao uso do cigarro. Tal programa visava a orientação e redução do tabagismo por meio de políticas públicas, além do recolhimento de dados relacionados a esse público (MALTA et al., 2010). O Brasil possui destaque mundial de combate ao tabagismo, tendo aprovado leis que regulam o uso em espaços públicos, meios de propaganda, um aumento no imposto e uso de aditivos (principalmente substâncias broncodilatadoras), além da substituição da cultura de tabaco por outros tipos de produtos. Estas ações tiveram como principal impacto a queda estatística no hábito de fumar entre os brasileiros nas últimas décadas (Ministério da Saúde, 2015).

Em geral observa-se maiores gastos com cigarros nas famílias brasileiras de baixa renda e menores graus de escolaridade, havendo um aumento do gasto médio com cigarros nos anos de 2002 a 2009, devido ao aumento da população. Entretanto, nota-se uma diminuição no número de famílias que apresentaram esses gastos, fato este explicado pelo aumento nos impostos referentes aos cigarros, reflexo das políticas públicas antitabagismo no Brasil (MALTA et al., 2010; GARCIA et al., 2015).

A exposição à fumaça de cigarro, antes e após o nascimento, é um dos principais fatores de risco para desenvolvimento da asma. Crianças com mães fumantes apresentam quatro vezes mais chances de apresentar a enfermidade. O tabagismo é também apontado como parâmetro negativo, tanto no desenvolvimento da doença quanto na resposta ao tratamento. Indivíduos com asma e fumantes apresentam sintomas mais severos, além de maiores riscos de mortalidade, quando comparados a indivíduos não fumantes que apresentam a moléstia (POLOZA e THOMSON, 2013).

1.2. ASMA E O TABAGISMO

A asma é uma das doenças que apresenta maior quantidade de variações, classificadas, geralmente, pela intensidade da enfermidade. É caracterizada por uma inflamação das vias aéreas, causada pelo estreitamento da árvore traqueobrônquica (Ministério da Saúde, 2010). Os sintomas são chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse. Em geral, uma pessoa com asma apresenta mais de um desses sintomas, variando de intensidade e tempo, ocorrendo na maioria dos casos ao anoitecer ou ao acordar (Pocket Guide For Asthma Management And Prevention, 2016).

Estudo desenvolvido por vários pesquisadores brasileiros apontam uma proporção de 16 a 29 % de crianças com idade entre 6 e 7 anos e 12 a 31% de adolescentes de 13 e 14 anos com sintomas de asma. Vale ressaltar que 12% dos adultos apresentam asma no Brasil, sendo a principal causa de morte de 1 em cada 700 destes (ZORZETTO e MOURA, 2009).

O tratamento da asma utiliza como paliativo medicamentos à base corticoesteróides, mas o ato de fumar reduz a resposta a tais medicamentos. Observa-se uma maior probabilidade de desenvolvimento de asma em fumantes ativos do sexo feminino (POLOSA e THOMSON, 2013). Estudos apontam que cerca de 40% dos pacientes asmáticos escondem a condição de fumante, o que dificulta o tratamento dessa enfermidade (STELMACH et al., 2015). Contudo, faz-se necessário avaliar o grau de exposição ao tabaco desses indivíduos. Para tal deve-se fazer o monitoramento biológico, determinando o metabólito de maior concentração e estabilidade bem como a matriz biológica mais apropriada para tal (LLAQUET et al., 2010).

1.3. BIOMONITORAMENTO HUMANO

O biomonitoramento humano tem como principal objetivo avaliar o grau de exposição e o risco à saúde humana pela presença de algumas substâncias químicas, por meio da determinação desta ou de algum de seus metabólitos em fluidos humanos, gordura corporal, unhas e cabelos. A avaliação do grau de exposição é de extrema importância nos dias atuais devido às diferentes fontes de emissão de produtos químicos, sejam emissões antropogênicas ou naturais. Também serve como avaliação da interação de certos medicamentos *in vivo* (CLEWELL et al., 2008). Portanto, é necessário uma avaliação repetitiva ou a comparação com dados que forneçam níveis seguros de exposição. O biomonitoramento humano pode ser entendido como o complemento do monitoramento ambiental, ou seja, monitoramento de substâncias químicas presentes em diferentes compartimentos ambientais (WILHERM, EWES e SCHULZ, 2004).

É indispensável um estudo prévio, visto que o biomonitoramento humano requer uma matriz biológica adequada ao estudo, que reflita o grau de exposição interna, bioquímica e efeitos biológicos. Também é indispensável um método analítico adequado e confiável para que seja mantida a garantia da qualidade. Dos tipos de matrizes, sangue e urina, destacam-se como as mais utilizadas, na determinação do grau de exposição a compostos inorgânicos, substâncias orgânicas e parâmetros para efeito biológico (ANGERER et al., 2007).

O biomonitoramento é de suma importância e depende da determinação de um analito específico que caracterize a exposição a um determinado agente tóxico. Para tanto faz-se uso de biomarcadores ou indicadores biológicos.

Os biomarcadores ou indicadores biológicos são definidos por COELHO e AMORIM, 2003, como:

“qualquer substância, ou os produtos de sua biotransformação, bem como toda alteração bioquímica precoce sofrida, da qual sua quantificação nos fluidos biológicos, tecido ou ar exalado, sirva como determinação da intensidade de exposição e o risco para a saúde”

portanto, deve haver uma relação proporcional à intensidade de exposição e o efeito biológico associado a tal substância.

Os biomarcadores podem ser classificados como biomarcador de exposição, biomarcador de efeito e biomarcador de suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição, também chamados de biomarcadores de dose interna, servem para estimar quantitativamente a substância ou seu produto de biotransformação em fluido, ar exalado ou tecido, dando uma relação direta sobre o grau de exposição. O biomarcador de efeito tem por finalidade avaliar quaisquer alterações adversas à saúde. Já o biomarcador de suscetibilidade serve para avaliar as diferentes respostas dadas por cada indivíduo após a exposição a determinada substância química (COELHO e AMORIM, 2003).

Dentre as matrizes utilizadas para biomonitoramento humano, a urina é a segunda maior em concentração de substâncias utilizadas para avaliar o grau de exposição, perdendo apenas para o sangue. Porém é a mais preferida por apresentar característica de ser não invasiva (ESTEBAN e CASTAÑO, 2009). A Tabela 1 traz algumas substâncias utilizadas como biomarcadores em urina, para avaliar o grau de exposição a substâncias orgânicas.

Tabela 1. Biomarcadores para algumas substâncias orgânicas presentes em urina e faixa de concentração encontrada em seis diferentes laboratórios da Alemanha.

Biomarcador	Agente de exposição	Faixas de concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1-Hidroxipireno	HPA's	0,3-1,5
Br₂-CA	Deltametrim	0,3-0,66
cis-Cl₂-CA	Inseticidas piretróides	0,5-8,9
trans-Cl₂-CA	Inseticidas piretróides	0,6-9,8
3-PBA	Inseticidas piretróides	1,1-16,0
2,5-Diclorofenol	Paradiclorobenzeno	9-59
2,4,6-Triclorofenol	Paradiclorobenzeno	2-91
PCP	Fenilciclidina	1,5-16,5
Dimetilfosfato	Inseticida fosfatado	18-190
Dimetiltiofosfato	Inseticida fosfatado	15-550
Dimetilditiofosfato	Inseticida fosfatado	7-91
Dietilfosfato	Inseticida fosfatado	8-91
Dietiltiofosfato	Inseticida fosfatado	10-59
Dietilditiofosfato	Inseticida fosfatado	7-56
Cotinina	Cigarro	30-1250
Nicotina	Cigarro	30-1250
5-OH-MEHP	Ftalatos	10-230
5-OXO-MEHP	Ftalatos	8-220
5-Carboxy-MEPP	Ftalatos	15-330

Fonte: Adaptação de "ANGERER, J.; EWERS U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: State of the art, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v.210, p.201-228, 2007".

Vários estudos apontam para a necessidade da escolha de uma técnica adequada, que englobe a faixa de concentração em estudo que seja sensível e, ao mesmo tempo, seja apropriada para a determinação do analito em questão empregado como biomarcador.

Vários biomarcadores são apontados como avaliadores do grau de exposição ao tabaco: tiocianato, monóxido de carbono, carboxihemoglobina, nicotina e seus derivados e a hidroxiprolina. Destes, apenas a nicotina pode ser diretamente ligada à exposição a fumaça de cigarro. Apesar de encontrar-se em maior concentração na folha do fumo (OLIVEIRA et al., 2010), não é o biomarcador mais indicado para a avaliação do grau de exposição ao tabaco, visto que apresenta um baixo tempo de meia vida, sendo rapidamente biotransformado em seus metabólitos.

Alguns trabalhos utilizam a carboxihemoglobina e o monóxido de carbono expirado, geralmente associados com nicotina ou algum de seus metabólitos, como biomarcador de exposição tabágica. Entretanto, a mensuração de monóxido de carbono sofre influências ambientais, visto que está presente em diferentes compartimentos ambientais. Assim sendo, a cotinina por ser restrita à exposição a fumaça do cigarro e apresentar maior tempo de meia vida, quando comparada a nicotina, é o biomarcador mais indicado na avaliação exposição ao tabaco (HAUFROID e LISON, 1998 e MELLO et al., 2005).

A Figura 3 traz o esquema de biotransformação da nicotina no organismo. Apesar de não ser o produto majoritário, de maior porcentagem de concentração, este é um dos que apresenta maior estabilidade.

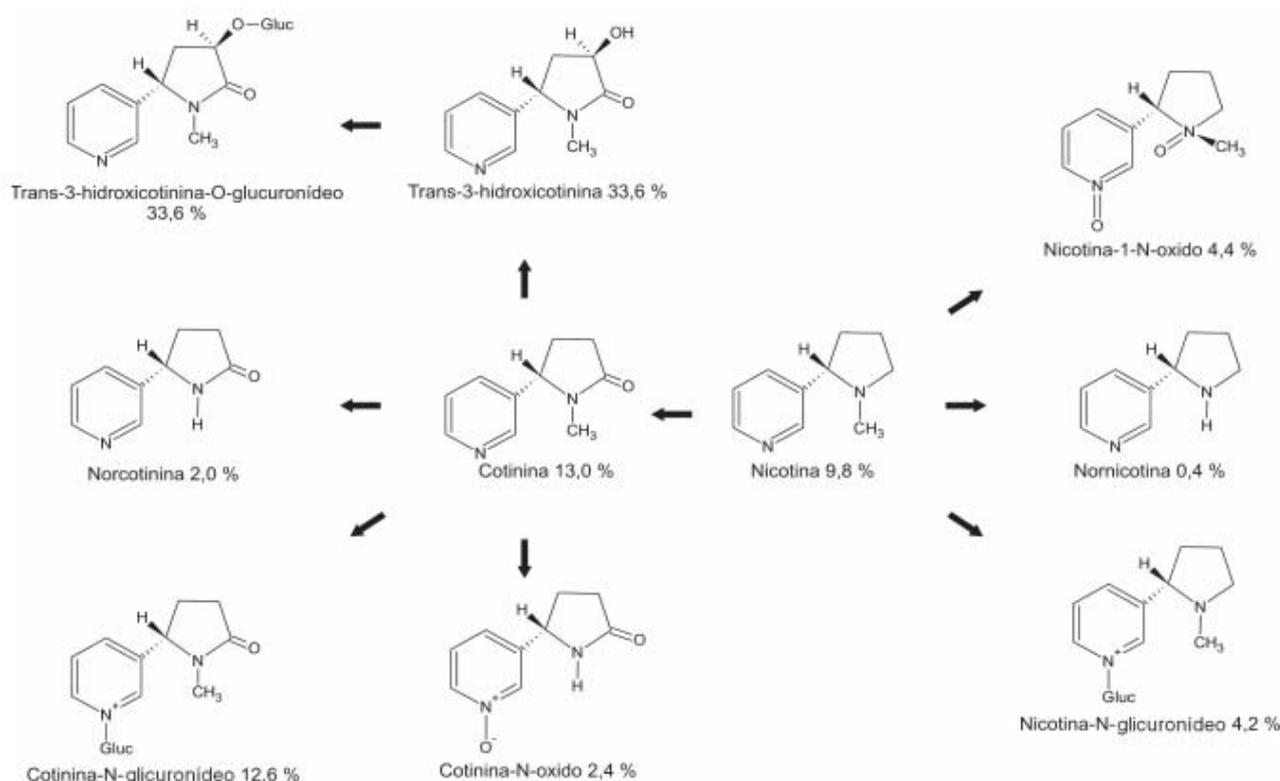


Figura 3. Esquema de biotransformação da nicotina no organismo humano.

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

1.4. NICOTINA E COTININA

A nicotina é o alcaloide responsável pela dependência ao cigarro, sendo um dos compostos de maior concentração no mesmo (MEGER et al., 2002). É uma amina terciária composta por uma piridina e um anel pirrolidina, que é rapidamente metabolizada. Estima-se que 80% da nicotina absorvida é biotransformada em cotinina, seu principal metabólito, por ação enzimática, que ocorre principalmente no fígado. Além de vários fatores tais como raça, taxa de excreção renal, entre outros, o maior hábito de fumar interfere no metabolismo da nicotina, esta é metabolizada mais rapidamente em indivíduos não fumantes quando comparado a indivíduos fumantes, fato devido a diminuição da atuação do CYP2A6, uma das enzimas responsáveis pela oxidação da nicotina (TUTKA, MOSIEWICZ e WIELOSZ, 2005).

A 1- metil-3- (2-piridinil) -2-pirrolidinona, ou simplesmente cotinina, é uma amina aromática cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{12}N_2O$. Apresenta-se como um dos principais metabólitos da biotransformação da nicotina, sendo esta sua única fonte. A cotinina tem um tempo de meia vida no organismo humano de 19 a 40 horas contra 2 horas referentes a nicotina e apresenta-se, devido ao pH levemente básico do sangue em torno de 7,4, na forma de base livre, ou seja, não ionizada, sendo fracamente solúvel em lipídios (MALAFATTI e MARTINS, 2009). A cotinina também apresenta baixa taxa de excreção renal quando comparada a nicotina, ratificando o seu maior emprego como biomarcador à exposição ao fumo (MELLO et al.,2005, HAUFROID e LISON,1998). Uma estimativa do tempo de meia-vida e no volume de distribuição da nicotina e cotinina em fumantes e não fumantes é descrita na Tabela 2, onde pode-se observar um menor volume de distribuição para a cotinina; fato este devido a sua menor solubilidade em lipídios.

Tabela 2. Tempo de meia-vida e volume de distribuição para a nicotina e cotinina em fumantes e não-fumantes.

	Nicotina		Cotinina	
	Fumante	Não Fumante	Fumante	Não Fumante
Meia-vida (min)	157 ± 78	122 ± 45	1047 ± 304	1012 ± 259
Volume de distribuição¹ (L)	196 ± 74	185 ± 63	54 ± 16	58 ± 12

Fonte: Adaptação de “TUTKA, P.; MOSIEWICZ, J.; WIELOSZ, M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacol Rep*, v. 57, p. 143-153, 2005”.

Presente em vários fluidos humanos como sangue, urina e saliva, a cotinina salivar e cotinina urinária são as mais utilizadas, principalmente por apresentar qualidade de amostragem não invasiva, na determinação de exposição ao tabaco. Entretanto, estudos apontam para uma correlação mais significativa nas concentrações de cotinina urinária em detrimento da salivar, tanto por causa da quantidade amostral disponível, quanto pela concentração mais baixa desse

¹ Termo utilizado para quantificar a distribuição de uma substância no corpo.

metabólito na saliva, afetando principalmente a avaliação de exposição ambiental (ODDOZE, PAULI e PASTOR, 1997; KUO, YANG e CHIU, 2001; ODDOZE et al., 1999).

A cotinina urinária é geralmente o analito escolhido para mensurar o grau de exposição à fumaça de cigarro visto que apresenta a qualidade de conter uma concentração considerável do analito, sendo apropriada para avaliar a exposição ativa, contato direto à fumaça pelo ato de fumar bem como a exposição ambiental, inalação da fumaça presente no ambiente (PETERSEN et al., 2010). A Tabela 3 mostra as faixas de concentração da cotinina em diferentes matrizes biológicas, observa-se maiores concentrações para exposição ativa na urina.

Tabela 3. Faixas de concentração da cotinina em diferentes matrizes biológicas.

Matriz biológica	Tipo de exposição	Faixa de concentração de cotinina geralmente encontrada (μgL^{-1})
Urina	Ativa	73-6680*
		100-3500*
		1460*
		3054,61*
	Passiva	2700*
Saliva	Ativa	± 50
	Passiva	>100
Plasma	Ativa 10 cigarros/ dia	0,1-30
	Ativa 20 cigarros/dia	~137,7
	Passiva	~302
Leite Materno	Ativa	~2,1
		12-222

*Valores de concentração obtidos em diferentes trabalhos.

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

A determinação de cotinina urinária depende de parâmetros tais quais a função renal do indivíduo, taxa de fluxo e pH da urina. Após 24 horas da

exposição à fumaça de cigarro, em geral, os valores de cotinina encontrados, para avaliar a exposição passiva, estão abaixo do limite de detecção para a maioria das técnicas, sendo imprescindível que a amostra seja coletada em um período de tempo menor que 20 h (LLAQUET et al., 2010).

1.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA COTININA EM URINA

A determinação de cotinina em urina envolve inicialmente a extração da cotinina da fase aquosa para a fase orgânica e posterior análise, sendo descritas na literatura vários métodos de extração líquido-líquido e em fase sólida (CATTANEO et al., 2006). A sua análise pode ser realizada utilizando-se diferentes técnicas analíticas destacando-se as técnicas cromatográficas, geralmente cromatografia à gás com detector de nitrogênio e fósforo (GC-NPD), cromatografia à gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os imunoenaios (KUO, YANG e CHIU, 2001).

1.5.1. EXTRAÇÃO DA COTININA EM URINA

Devido a composição da urina ser muito complexa é imprescindível uma técnica de separação entre o analito e possíveis interferentes. Vários autores estudaram a extração da cotinina urinária, como parâmetro de otimizar a determinação da mesma e melhor avaliar o grau de exposição ao tabaco, destacando-se a extração líquido-líquido e extração em fase sólida. Na extração líquido-líquido o pH é um fator importante na obtenção da cotinina da urina. A alcalinização do meio, geralmente com hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e carbonato de sódio se faz necessária, visando uma maior recuperação do analito para a fase orgânica, com menor volume de solvente extrator. A cotinina presente na urina está na forma de íon hidratado, tornar o meio alcalino favorece a desprotonação e, conseqüentemente, maior afinidade ao solvente orgânico. Dentre os solventes extratores, destacam-se o uso de diclorometano, sendo em alguns trabalhos acrescentados de um outro solvente para aumentar a eficiência e

diminuir o volume do mesmo (MALAFATTI e MARTINS, 2009). A Tabela 4 mostra diferentes solventes extratores, os padrões internos utilizados e a porcentagem de recuperação da cotinina em urina.

Tabela 4. Características da extração líquido-líquido da cotinina urinária utilizando diferentes solventes.

Solvente extrator	Padrão Interno	Recuperação
Butanol	Não utilizado	107%
Clorofórmio	2-fenilimidazol	97%
Acetato de n-butila	N-etilnorcotinina	81%
Diclorometano	N-etilnorcotinina	99%
Éter dietílico	Cotinina-d3	104%
Clorofórmio e Metanol	Difenilamina	100,4%
Acetonitrila	Cotinina-d3	112%

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

Já a Tabela 5 mostra o uso de diferentes cartuchos com diferentes fases estacionárias, diferentes solventes extratores e a porcentagem de recuperação da cotinina em urina.

Tabela 5. Características da extração em fase sólida da cotinina urinária utilizando diferentes tipos de fase estacionária e solventes.

Cartucho	Padrão Interno	Solvente extrator	Recuperação
C₂ (100mg)	N-etilnorcotinina	Metanol	99%
Extrelut-1	N-etilnorcotinina	Diclorometano: Isopropanol (9:1v/v)	90-95%
Extrelut-20	2-fenilimidazol	Clorofórmio	92-100%
Coluna de vidro Extrelut-3 (Terra diatomácea)	N-etilnorcotinina	Diclorometano:Isopropanol : HCl metanólico	99%
Amberlite XAD-2	Não utilizado	Acetona: Diclorometano (1:3v/v)	80%
Drug test-1 (130mg/3 mL)	2-fenilimidazol	Diclorometano: propanol: amônia (96:2:2%,v/v)	82-89%

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

1.5.2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA COTININA EM URINA

No estudo envolvendo biomonitoramento humano, o método utilizado na análise de um determinado biomarcador é essencial na geração de dados confiáveis. Nos fluidos humanos, esses compostos se encontram, geralmente, em baixos níveis de concentração exigindo a utilização de métodos com sensibilidade compatível. Várias técnicas de determinação da cotinina são apresentadas na literatura, destacam-se as espectrofotométricas, imunoenaios e as cromatográficas.

1.5.2.1. TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

A espectrofotometria foi umas das primeiras técnicas de monitoramento humano para avaliar o grau de exposição à fumaça do cigarro, a partir da década de 70, quando iniciou-se o interesse em determinar a nicotina e seus metabolitos em fluidos. O ácido 2-tiobarbitúrico foi utilizado como reagente de derivatização mais específico para a determinação da nicotina e seus metabólitos (CATTANEO et al., 2006). A técnica em si carrega a vantagem de ser simples, de baixo custo e de tempo de análise relativamente baixo. Obtém-se a concentração de metabólitos totais, sendo o resultado relatado em cotinina equivalente (HAUFROID e LISON, 1997).

Apesar das vantagens citadas, essa técnica apresenta como desvantagens, além da não especificidade à cotinina, a interferência de compostos com o núcleo piridina. Portanto, em medicamentos que apresentem esse grupamento, os valores de concentração encontrados são relativamente mais altos do que os valores reais (DHAR, 2004). Contudo, a técnica espectrofotométrica entrou em desuso, visto que não possuem sensibilidade para avaliar a exposição ambiental à fumaça do cigarro.

1.5.2.2. TÉCNICAS IMUNOQUÍMICAS

Tendo origem na década de 50, por Yalow e Berson, em ensaio imunológico para detecção de insulina humana, as técnicas imunoquímicas para determinação de cotinina baseiam-se no uso de anticorpos, caracterizados por possuírem sítios de reconhecimento e suas interações, específicas, com os antígenos (NUNES, 2005). Fundamenta-se na competição entre os antígenos na amostra padrão e os antígenos marcados à um sitio específico do anticorpo (MALAFATTI e MARTINS, 2009).

Dentre os imunoenaios para a determinação de metabólitos da nicotina destacam-se os radioimunoenaios (RIA) e os imunoenaios de absorção ligado à enzima (ELISA). Os dois apresentam características bem peculiares, porém qualidades próximas no que diz respeito à resposta. A manipulação das amostras é pequena, visto que não requer uma etapa de extração no seu pré-

tratamento e o volume utilizado é pequeno, quando comparado com outras técnicas (SONG et al., 2005).

Os RIA envolvem o uso de dois radioisótopos, o iodo radioativo (^{125}I) e o trítio (^3H). É uma técnica de execução fácil e alta seletividade, sendo possível a determinação de cotinina com baixos limites de detecção. Entretanto, para a utilização dessa técnica se faz necessário a aquisição de anticorpos específicos para a nicotina e seus metabólitos, além de uma aparelhagem cara. A formação de resíduos contendo substâncias radioativas mostram algumas desvantagens da utilização dessa técnica (DHAR, 2004).

Diferente dos RIA, ELISA não demanda aparelhagem cara, mas também utiliza isótopos radioativos. Baseia-se em anticorpos unidos por um suporte sólido, cuja quantidade é conhecida, além de uma concentração constante de conjugados enzimáticos. Como resposta, a determinação fotométrica é diretamente proporcional à concentração do analito em questão, sendo o limite de detecção dependente do anticorpo empregado (NUNES, 2005;). ELISA apresenta como principais desvantagens a possibilidade de reação não específica entre antígeno e anticorpo devido a variações do pH, excesso de sais dissolvidos, principalmente quando a matriz é a urina e a existência de reações cruzadas entre produtos da cotinina, acarretando em uma incongruência na interpretação dos dados obtidos (DHAR, 2004; APINAN, CHOEMUNG e NA-BANGCHANG, 2010).

1.5.2.3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Quando comparadas as técnicas já citadas, as cromatográficas representam um número maior de trabalhos publicados na área de determinação de biomarcadores em fluidos. Tanto pela maior facilidade de implementação, quanto por apresentarem, na maioria dos casos, menores custos envolvidos, além de resultados confiáveis para faixas mais amplas de concentração, favorecendo a classificação em graus de exposição.

Dentre as técnicas cromatográficas destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV-VIS e detector arranjo de diodos (DAD)

e a cromatografia à gás (CG) usando detector nitrogênio-fósforo (DNP) ou acoplado a espectrômetro de massas. Trazendo grandes vantagens em detrimento das técnicas já mencionadas, as cromatográficas, apresentam alta sensibilidade e capacidade de determinar vários analitos em uma só análise (MALAFATTI e MARTINS, 2009).

CLAE-UV-VIS, em geral, é uma técnica rápida, sensível e seletiva no que diz respeito a avaliação do grau de exposição ao tabaco (CEPPA et al., 2000). A cafeína presente em amostras de urina é o principal interferente, principalmente em fumantes passivos, uma vez que, a sua concentração é maior que a cotinina. Porém, 80 - 97% desse interferente é eliminado durante o procedimento de extração e o restante é eliminado com um ajuste na fase móvel, mistura composta por metanol, acetonitrila e água, com trietilamina e o uso de tampão ácido acético- acetato de sódio para regular o pH em torno de 4,3 é suficiente para sanar tal interferência (THUAN et al., 1989; TUOMI, JOHNSON e REIJULA, 1999).

Tanto CLAE-UV-VIS quanto CG-DNP apresentam as mesmas vantagens no que diz respeito a sensibilidade, sendo as duas técnicas bem apropriadas na determinação de cotinina e outros metabólitos em fumantes ativos e passivos (HARIHARAN e VANNOORD, 1991).

A utilização da técnica de espectrometria de massas acopladas tanto a cromatografia a gás quanto a cromatografia líquida vem sendo bastante estudada e traz a vantagem de conferir menores limites de detecção e maior especificidade que as outras já citadas (MAN et al., 2006; JAMES, TIZABI e TAYLOR, 1997). Entretanto, as técnicas cromatográficas citadas, em geral, são adequadas tanto no quesito sensibilidade quanto em especificidade na avaliação ao grau de exposição ao tabaco.

A Tabela 6 descreve algumas faixas de limite de detecção para a cotinina em matrizes biológicas, fazendo-se uso de diferentes técnicas cromatográficas na determinação. Observa-se limite de detecção mais baixo na cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Tabela 6. Limites de detecção da cotinina em matrizes biológicas, utilizando diferentes métodos cromatográficos de determinação.

Técnica analítica	Limite de detecção (µgL⁻¹)
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Ultravioleta –Visível (CLAE-UV-VIS)	0,5-20
Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas/ Espectrometria de Massas (CL-EM/EM)	0,3-1
Cromatografia Gasosa- Espectrometria de Massas (CG-EM)	0,16-20
Cromatografia Gasosa- Detector de Nitrogênio e Fósforo (CG-DNP)	0,1-50

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

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Implementar e validar método para determinação de cotinina urinária HPLC-UV para aplicar em amostras de pacientes do Núcleo de Excelência a Asma (NEA) e avaliar quanto ao grau de exposição ao tabagismo;

2.1.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Implementar e validar método;
- Determinar a concentração de cotinina presente em amostras de urina de pacientes do NEA;
- Comparar os dados obtidos por questionário com os obtidos experimentalmente;
- Separar as amostras de urina em graus de níveis de exposição, comparando aos existentes na literatura;
- Fazer tratamento estatístico multivariado, a fim de demonstrar a formação de grupos de exposição;

3. PARTE EXPERIMENTAL

O presente estudo faz parte de uma pesquisa realizada pelo ProAR (Programa de controle a asma e rinite), um programa de extensão da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sendo este trabalho uma das linhas de pesquisa do NEA (Núcleo de Excelência em Asma) em conjunto com o Instituto de Química da UFBA. Esse trabalho envolve amostras biológicas (urina) de pacientes pertencentes ao NEA e está de acordo com a Resolução 466/12, que garante os direitos de proteção ética e bioética dos participantes do programa. A aprovação pelo comitê de ética encontra-se em anexo. A seguir será descrita a parte experimental do trabalho.

3.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS DE LABORATÓRIO

3.1.1. MATERIAL PARA ANÁLISE POR HPLC

- Coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6mm x 150mm x5µm);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent® Infinity 1290 com detector de UV, amostrador automático;

3.1.2. MATERIAL DE SUPORTE E EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Mettler A E 200 (cap. máx. 160 g);
- Bomba de vácuo Fanen, modelo CA;
- Centrífuga Janetzki, T32c, com capacidade para 4 tubos de centrifuga;
- Frascos Eppendorf em polipropileno, cap. 2000 µL, descartáveis;
- Inserts para vial em vidro, capacidade 200 µL;
- Membranas de filtração com 2 µm de poro, Millipore;
- Micropipetas Eppendorf de volume variável, capacidade 10 -100 µL, de 200 - 1000µL, de 0,5-5 mL, 1-10µL e de 30 – 300 µL, com ponteiras em polipropileno descartáveis;
- Medidor de pH de bancada OHAUS, modelo ST2100-F;
- Sistema de filtração a vácuo, em vidro, cap. 250 mL, Millipore XX 1004720;
- Sistema de purificação de água ELGA, Purelab option-Q;
- Tubos de centrífuga em poliproileno com fundo cônico capacidade de 15 mL;

- Viais de âmbar com capacidade de 2000 μL e septos de silicone;
- Vórtex Mixer, marca Labnet, modelo VX-200;

3.1.3. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza, em geral, grau HPLC. Utilizou-se reagente 2-fenilimidazol como padrão interno e o padrão de cotinina ambos adquirido da empresa Sigma-Aldrich[®], sendo este último uma solução metanólica com concentração de 1 mg.mL^{-1} . Fez-se uso de água ultrapura condutividade $18,2 \text{ M}\Omega$, obtida de equipamento de marca ELGA, Purelab option-Q, para preparo das soluções padrão e eluente. Abaixo lista-se todos os reagentes utilizados:

- 2-fenilimidazol, Sigma, 99%;
- Acetato de sódio PA, SYNTH, 98,5% ;
- Acetonitrila grau HPLC, JTBaker, 99,8;
- Ácido acético PA, Merck, 99,9%;
- Cotinina solução 1 mg.mL^{-1} , Sigma, 99%;
- Diclorometano HPLC, JTBaker, 99,9%;
- Hidróxido de sódio em lentilhas, Qhemis, PA;
- Metanol PA, Merck, 99,5%;
- Nitrogênio ultrapuro, Air liquide, 99,9%;
- Trietilamina, Sigma, 99,5%;

3.2. PREPARO DE SOLUÇÕES

3.2.1. PREPARO DO ELUENTE PARA DETERMINAÇÃO DE COTININA

O eluente utilizado na separação cromatográfica consiste em uma solução tampão acetato contendo ácido cítrico ($0,034 \text{ mol.L}^{-1}$), metanol, acetonitrila, trietilamina, responsável por evitar a co-eluição da cafeína e cotinina. O pH foi ajustado em torno de 4,3 através da adição de ácido acético glacial.

A sua preparação envolve adicionar em um béquer com capacidade de 2 L 500 mL de água ultrapura, em seguida, 250 mL de solução de acetato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, 150 mL de metanol e 100 mL de acetonitrila, respectivamente, sob

constante agitação com bastão de vidro. Com auxílio de uma pipeta adicionou-se 1 mL de uma solução de ácido cítrico $0,034 \text{ mol.L}^{-1}$ e 5 mL de trietilamina. O pH foi ajustado em 4,4, com adição de ácido acético. Essa solução foi filtrada utilizando membranas de celulose com $2 \mu\text{m}$ de poro e condicionada em um frasco âmbar.

3.2.2. SOLUÇÃO PADRÃO DE COTININA E 2-FENILIMIDAZOL

A solução estoque de cotinina foi preparada a partir do padrão de referência SIGMA-ALDRICH contido em uma ampola com cerca de 1 ml com concentração de 1000 mg.L^{-1} em metanol. Na preparação foi realizado uma diluição em um balão de 10 ml, em metanol, resultando em uma solução de 100 mg.L^{-1} de cotinina (solução estoque). A solução estoque foi armazenada a uma temperatura de $-12 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foi utilizado como padrão interno o 2-fenilimidazol, visto que apresenta propriedades próximas da cotinina em um tempo de retenção diferente, além de apresentar uma boa taxa de recuperação (CATTANEO et al., 2006). O 2-fenilimidazol foi pesado, e solubilizado em metanol obtendo-se uma concentração final de 1 mg.L^{-1} e condicionada sob refrigeração.

3.2.3. DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método empregado para a determinação de cotinina urinária seguiu procedimentos já fundamentados na literatura, sendo principalmente utilizado o proposto por Cattaneo e Alegretti (2006). A metodologia consiste na adição de $100 \mu\text{L}$ de padrão interno (2-fenilimidazol $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) na urina, extração da cotinina presente com 4 mL de diclorometano, seguido por secagem em fluxo de nitrogênio, reconstituição com $200 \mu\text{L}$ do eluente e posterior análise por CLAE. Maiores detalhes serão descritos nos capítulos seguintes.

3.3. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Para a separação e quantificação foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent® Infinity 1290, equipado com uma coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6mm x 150mm x5µm) e detector UV-Vis, cujo comprimento de onda foi mantido em 260 nm. Utilizou-se um volume de injeção de 20 µL e um fluxo isocrático da fase móvel de 0,4 mL.min⁻¹, correspondendo a uma pressão média do sistema de 160 bar. Esses parâmetros permitiram um tempo total de análise de 9 min e uma boa separação dos componentes como pode ser visualizado na Figura 8. A Tabela 7 descreve os parâmetros cromatográficos utilizados para a determinação de cotinina e a Figura 4 mostra de forma ilustrativa o equipamento (A) e a coluna (B) utilizados.

Tabela 7. Parâmetros cromatográficos utilizados na determinação de cotinina.

Parâmetro	Descrição
Equipamento	Agilent® Infinity 1290
Detector	UV-Vis ($\lambda = 260$ nm)
Coluna	Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6mm x 150mm x5µm Agilent®).
Fase Móvel	Água:metanol: acetato de sódio 0,1mol.L ⁻¹ :acetonitrila (50:15:25:10,v/v) e adição de 5 mL de trietilamina e 1 mL de ácido cítrico 1 mol.L ⁻¹
Fluxo	0,4 mL min ⁻¹
Tempo de corrida	9 min
Volume injetado	20 µL
Pressão	Máx. 400 bar
Amostrador	Automático
Tempo de retenção da 2-fenilimidazol	6,26 min
Tempo de retenção da cotinina	7,26 min



Figura 4. Ilustração do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (A) e coluna utilizada (B).

3.4. CURVA ANALÍTICA

A curva analítica foi construída a fim de avaliar a linearidade do método proposto e correlacionar o sinal analítico à concentração da cotinina presente na urina. Para tanto, foi utilizado o método de padronização interna, ou seja, foi adicionado uma quantidade fixa do padrão interno. Devido a grande variabilidade de concentração da cotinina encontrada na urina dos pacientes, foi necessário trabalhar com curvas em duas faixas de concentrações distintas. A obtenção dos valores de concentração dos pontos da curva analítica, seguiu as seguintes etapas:

1 – Preparação da solução trabalho - A partir da solução estoque de 100 mg.L⁻¹ de cotinina fez-se diluições sucessivas em tubos eppendorf de 2 mL, com auxílio de uma micropipeta, em água ultrapura, que resultou em duas soluções de trabalho de 1 e 10 mg.L⁻¹.

2 – Soluções padrões de cotinina em urina - Foram preparados a partir da urina centrifugada de indivíduo não exposto à fumaça de cigarro. Foram adicionados 10 µL de NaOH 25 mol.L⁻¹, 100 µL da solução do padrão interno 1 mg. L⁻¹ e quantidades pré-determinadas da solução trabalho de 1 mg.L⁻¹ para a curva na faixa de 0 – 100 µg.L⁻¹ e da solução trabalho de 10 mg.L⁻¹ para a curva

na faixa de 0-1500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A Tabela 8 traz as descrições de volumes adicionados no preparo de cada padrão a depender da faixa de concentração pretendida. A ordem de adição seguiu a ordem descrita nas Tabelas.

3 – Extração da cotinina – A cada solução padrão de cotinina em urina foi adicionado aproximadamente 5,3120 g de diclorometano, pesado em balança analítica para compensar a perda por volatilidade, o que corresponde a 4 mL e agitada por 40 min em agitador do tipo vortex VX-200, como mostrado pela Figura 5.

4 – Separação da fase orgânica/aquosa - Após agitação, os tubos contendo a mistura bifásica foram centrifugados (Figura 5) durante um período de 10 min a 3000 rpm, para promoção da separação entre a fase orgânica na parte inferior e aquosa na parte superior. Um volume de 2 mL da fase orgânica foi transferido para um microtubo com capacidade de 2 mL previamente identificado.

5 – Processo de secagem - O diclorometano foi evaporado utilizando-se um manifold (tubo de distribuição de ar) com pipetas Paster que permitiu a passagem de um pequeno fluxo de nitrogênio ultrapuro e ou hélio na superfície da solução. O fluxo do gás foi cuidadosamente ajustado com o objetivo de evitar perdas por respingamento. Esse manifold permitiu a secagem de até 9 tubos simultaneamente.

6 – Análise cromatográfica - Após a secagem completa do extrato, foi feita a reconstituição com 200 μL do eluente o qual foi transferido para um microvial, com capacidade de 400 μL e por fim foi levado para injeção no equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 5), obtendo-se a área equivalente a cada solução padrão de cotinina em urina.

Vale ressaltar que as variáveis referentes a quantidade de diclorometano adicionado e ou retirado, tempo de agitação e centrifugação foram controlados para proporcionar um processo reprodutível nas diferentes fases das análises.

Para a análise das amostras, o sistema foi calibrado no início da semana e 2 pontos da curva de calibração foram injetados juntamente com as amostras para checagem diária da calibração.

Tabela 8. Volumes adicionados do padrão de cotinina no preparo dos padrões de calibração para análise de cotinina em urina.

SOLUÇÃO TRABALHO DE COTININA (1 mg . L⁻¹)				
FAIXA DA CURVA: 1 – 100 µg.L⁻¹				
Concentração da cotinina na urina (µg.L⁻¹)	Volume de urina (µL)	Volume da solução de cotinina (µL)	Volume da solução de NaOH 10 mol.L⁻¹ (µL)	Volume de 2-fenilimidazol 1 mg.L⁻¹(µL)
0,0	1875	0	25	100
5,0	1865	10	25	100
10	1855	20	25	100
20	1835	40		100
30	1815	60	25	100
50	1775	100	25	100
70	1735	140	25	100
90	1715	180	25	100
SOLUÇÃO TRABALHO DE COTININA (10 mg.L⁻¹)				
FAIXA DA CURVA: 100 – 1500 µg.L⁻¹				
100	1855	20	25	100
200	1835	40	25	100
400	1795	80	25	100
600	1755	120	25	100
800	1715	160	25	100
1000	1695	200	25	100
1200	1655	240	25	100
1500	1595	300	25	100

Na Figura 5 pode-se visualizar as principais etapas do processo de extração da cotinina.

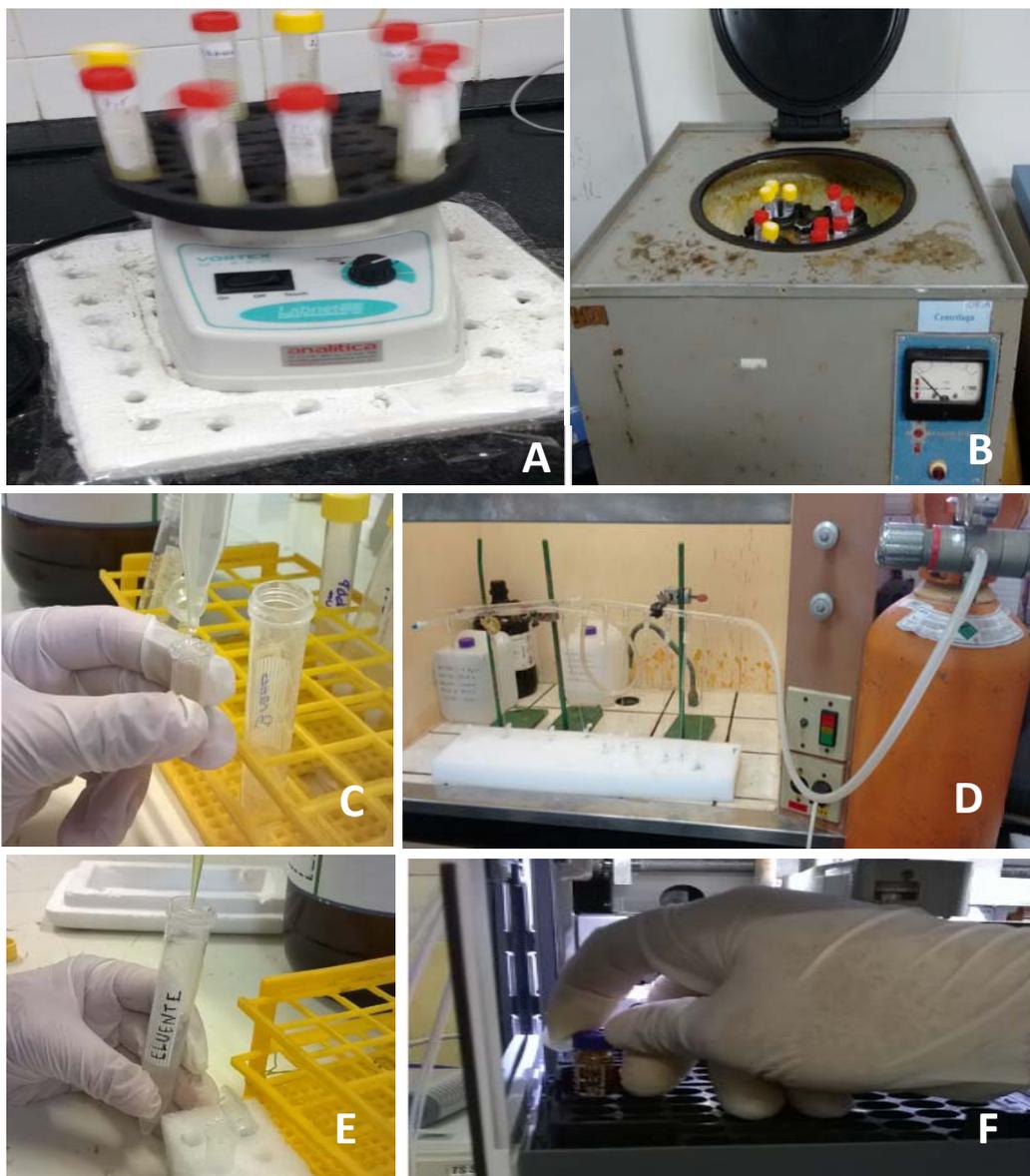


Figura 5. Processo de extração e análise da cotinina. (a) Agitação das amostras (B) Centrifugação da solução para separação da fase aquosa/orgânica; (c) Retirada de 2 ml do diclorometano; (d) Processo de vaporização do diclorometano até a secagem completa; (e) Adição de 200 μ L do eluente; (f) Análise cromatográfica.

3.5. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras foram entregues por pacientes do ProAr, sendo sugerido que após higienização fosse coletada a primeira urina do dia desprezando-se o primeiro jato. O autorrelato foi feito em dois momentos, primeiro pelo preenchimento de questionário em entrevista com pneumologista e o segundo após preenchimento do segundo questionário² (em anexo), ambos a respeito dos tipos de exposição a fumaça de cigarro, bem como tempo de exposição e tempo de não exposição. As amostras foram congeladas em freezer sob uma temperatura de -70 °C, sendo descongelada apenas no período de análise. Essas amostras foram transportadas para o LAQUAM usando uma bolsa térmica com quantidades que seriam analisadas por dia, geralmente entre de 30 e 50, recebidas por pessoa autorizada mediante assinatura de documento contendo a sigla e código das amostras. Após recebimento, seguiu-se o tratamento descrito a seguir.

Após a completa liquefação (visto que as amostras eram armazenadas a temperatura de -70 °C), a urina foi centrifugada por um período de 10 min, a fim de decantar qualquer material sólido presente. Transferiu-se cerca de 1870 µL de urina para um tubo de centrifuga de capacidade de 5 mL, ao qual foi acrescentado 25 µL de uma solução de hidróxido de sódio 10 mol.L⁻¹ e 100 µL da solução estoque do padrão 2-fenilimidazol. A extração da cotinina seguiu as mesmas etapas descritas anteriormente. O esquema resumido das etapas envolvidas na análise das amostras pode ser visualizado na Figura 6.

² Os questionários são uma adaptação do questionário do Ministério da Saúde do Brasil, utilizado pelo programa VIGITEL (2010) e pelo IBGE no censo de 2010.

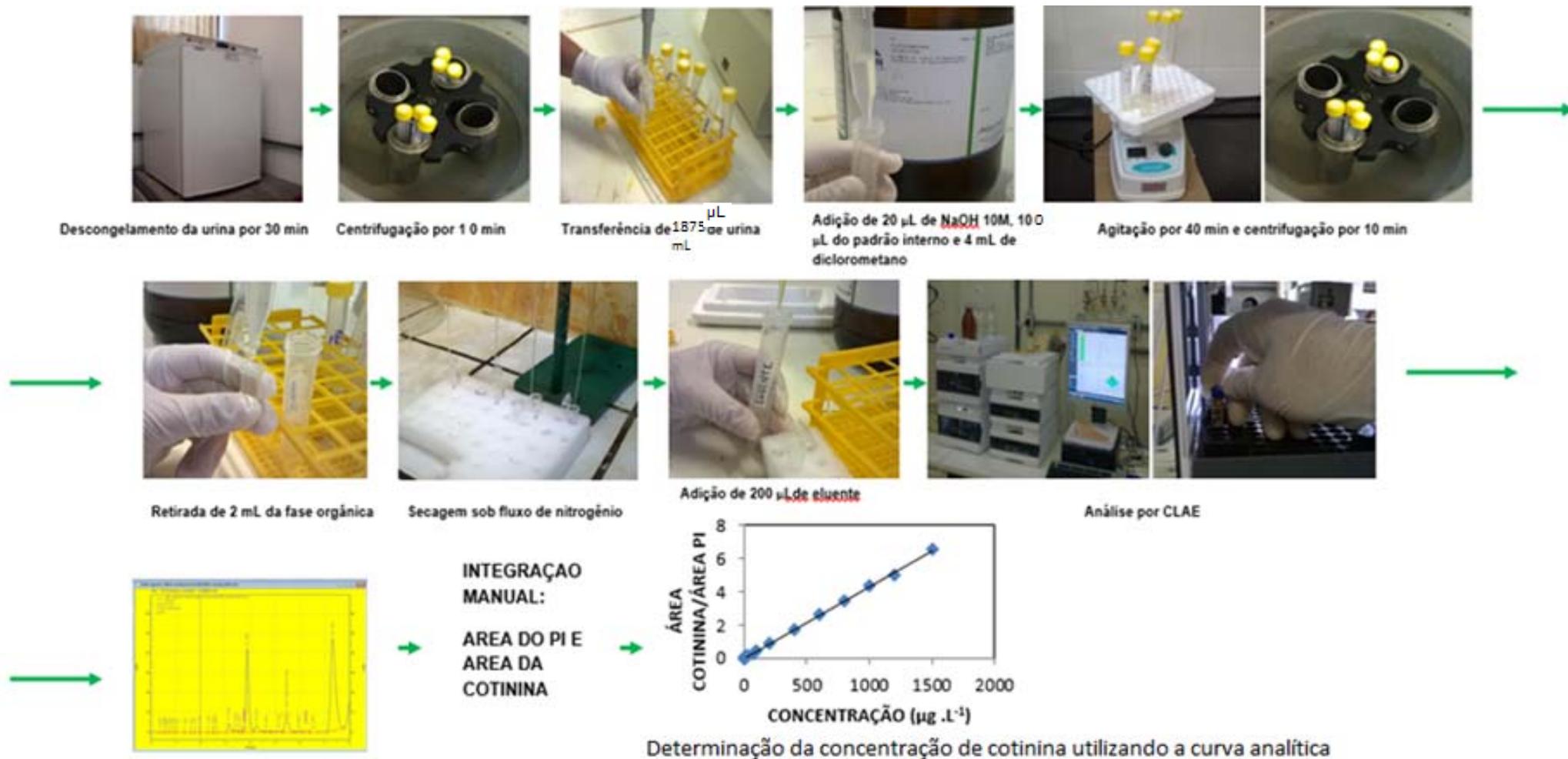


Figura 6. Esquematisação ilustrada do procedimento para a determinação de cotinina em urina.

3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método proposto seguiu os parâmetros descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os quais são encontrados na resolução RE n° 899 de 29 de maio de 2003. A descrição experimental utilizada na obtenção da seletividade, linearidade, precisão e limites de detecção e quantificação encontra-se no item 4.1.

3.6.1. SELETIVIDADE

Com a finalidade de avaliar a seletividade do método proposto, foi feito todos os procedimentos de análise na matriz sem a presença do analito, ou amostra branco e com adição independente de duas concentrações conhecidas do analito. Assim sendo, pode-se averiguar se haveria coeluição de algum composto no mesmo tempo de retenção da cotinina, ou seja, avaliar a separação da cotinina de outros constituintes da matriz. De modo semelhante, todas as amostras foram comparadas ao padrão de urina utilizado, assegurando a separação e tempo de retenção da cotinina no período de análise.

3.6.2. LINEARIDADE

A linearidade está relacionada com a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na matriz estudada, em uma determinada faixa de concentração. Após extração e injeção dos padrões foram construídas as curvas analíticas (descrita em 3.4.), as quais relacionam a razão do sinal da cotinina com o sinal do padrão interno e a concentração da cotinina. Segundo a ANVISA (RE n° 899 de 29 de maio de 2003), as curvas analíticas devem apresentar coeficientes de correlação acima de 0,99, para apresentarem uma boa linearidade.

3.6.3. PRECISÃO E EXATIDÃO

Com a finalidade de avaliar a precisão e a exatidão do método, utilizou-se três níveis diferentes de concentração de cotinina em urina, preparados a partir da adição da solução estoque em urina de indivíduo sem exposição ao cigarro, sendo elas, 50, 100 e 1000 µg.L⁻¹ para avaliar a precisão e 50, 500 e 1000 µg.L⁻¹ para avaliar a exatidão, injetadas seis vezes no equipamento, possibilitando o cálculo do desvio padrão relativo e da porcentagem de recuperação.

3.6.3.1. PRECISÃO

A precisão tem o propósito de avaliar o quanto os valores obtidos experimentalmente se dispersam, em uma múltipla amostragem (ANVISA, RE n° 899 de 29 de maio de 2003). A precisão foi determinada utilizando-se dois parâmetros, a saber: repetitividade (medidas sucessivas dos padrões, utilizando as mesmas condições de análise) e a precisão intermediária (determinações realizadas em diferentes dias). Ambas foram expressas como desvio padrão relativo (DPR), sendo este definido como a porcentagem da razão do desvio padrão (DP) pela média da concentração determinada (CMD), como mostrado pela equação 1.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad 1$$

O ensaio de repetitividade foi realizado com 6 injeções sequenciais dos padrões 50, 100 e 1000 µg.L⁻¹ e a precisão intermediária foi realizada com injeções desses padrões, preparados em dias consecutivos. A reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) não foi possível ser realizada devido a inexistência de outro laboratório com a metodologia de determinação de cotinina implantada. Os valores de repetitividade e precisão intermediária devem estar abaixo de 2% para substâncias em escala macro e 20% em escala traço, segundo a ANVISA (RE n° 899 de 29 de maio de 2003)

3.6.3.2. EXATIDÃO

É a concordância entre o valor encontrado e um valor tido como verdadeiro (CHASIN et al., 1998). De modo a avaliar se os resultados encontrados experimentalmente condiziam com os valores teóricos de concentração da cotinina, fez-se o teste de exatidão do método, o qual foi calculado pela taxa de recuperação do analito, em amostras enriquecidas com quantidades conhecidas do mesmo.

A exatidão ou porcentagem de recuperação é a porcentagem da razão entre a concentração média determinada (CMD) e a concentração teórica (CT), como ilustrado pela equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad 2$$

Segundo a ANVISA (RE n° 899 de 29 de maio de 2003) esses valores de recuperação devem estar entre 70 e 120 %. Utilizou-se urinas enriquecidas com concentração de cotinina de 50, 500 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, as quais foram injetadas 6 vezes cada com finalidade de obter a média das concentrações. Vale ressaltar que não foi possível a obtenção de amostras de referência de cotinina em urina.

3.6.4. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da substância de interesse detectada, entretanto, não necessariamente quantificada fazendo-se uso de uma determinada metodologia (RIBANI et al., 2004). O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da substância de interesse que pode ser quantificada com valores de precisão e exatidão aceitáveis em um determinado procedimento experimental (ANVISA RE N°899, 2003).

Devido a ausência de sinais do analito nos ensaios branco, utilizou-se as curvas analíticas relacionadas ao seu desvio de variação (Miller e Mille, 6° ed, 2010). A equação 3 é proposta por Miller e Miller para cálculo do desvio de distribuição em y , sendo este igual a raiz da razão do somatório do quadrado dos resíduos em y ($y_i - \hat{y}$), pelo número de pontos subtraído duas unidades ($n-2$).

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad 3$$

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi calculado para cada curva analítica construída, efetuando-se a divisão do desvio proposto por Miller e Miller pelo coeficiente angular (s) da referida curva e multiplicando-se o resultado pelo fator 3 e 10 respectivamente, como pode ser visualizado nas equações abaixo.

$$LD = 3 \cdot \frac{S_{y/x}}{s} \quad 4$$

e,

$$LQ = 10 \cdot \frac{S_{y/x}}{s} \quad 5$$

Segundo a ANVISA (resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003), a determinação do limite de detecção se faz pela injeção de concentrações decrescentes do analito até o menor nível detectável. Escolheu-se o método estatístico, pois os resultados obtidos representam um valor médio ao longo de todo o processo de análise das amostras. O valor de LD calculado por esse método será maior do que o recomendado pela ANVISA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Com intuito de validar o método de determinação de cotinina em urina, fez-se uso dos parâmetros da ANVISA, segundo “guia de validação para métodos analíticos e bioanalíticos” resolução RE n° 899 de 29 de maio de 2003.

4.1.1. SELETIVIDADE

Na comparação dos cromatogramas obtidos pelo preparo de padrões de urina (branco, 500 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) observou-se a ausência de pico, associado ao tempo de retenção da cotinina em 7,26 min obtido a partir do cromatograma referente ao branco (Figura 7). Nos cromatogramas sobrepostos (padrão 500 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) ilustrados pela Figura 8, observou-se que o pico referente a cotinina apresenta uma boa separação dos outros picos presentes na matriz e do padrão interno 2-fenilimidazol cujo tempo de retenção é de 6,26 min. Saliencia-se que a área do pico do padrão interno permanece constante em ambas as análises, visto que a quantidade adicionada é a mesma para todos os padrões. Esses resultados indicam que nenhuma outra substância presente na matriz co-eluiu com ambas as substâncias. O método em questão, portanto, apresentou uma boa seletividade no que diz respeito a determinação da cotinina.

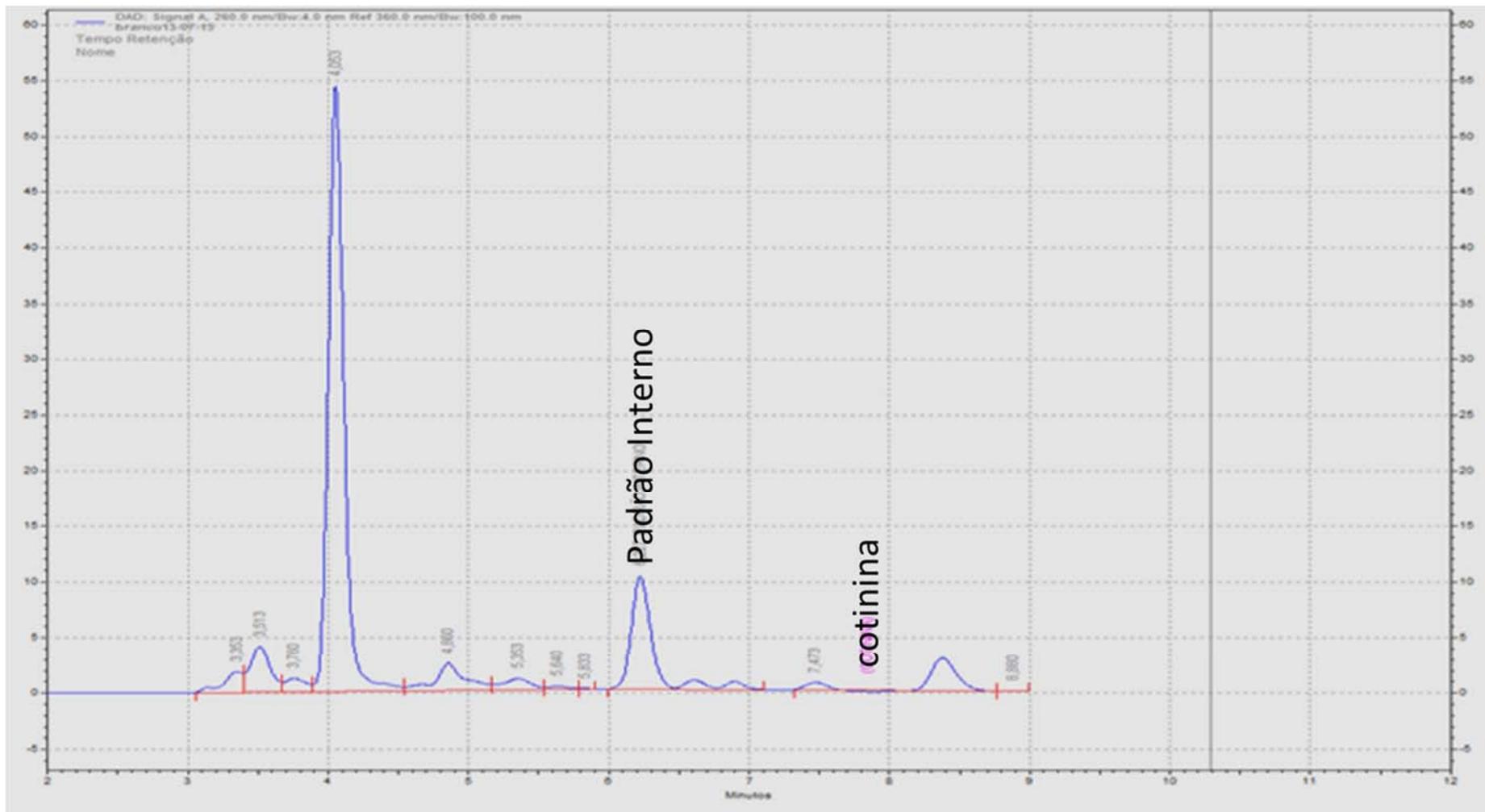


Figura 7. Cromatograma de urina sem presença da cotinina.

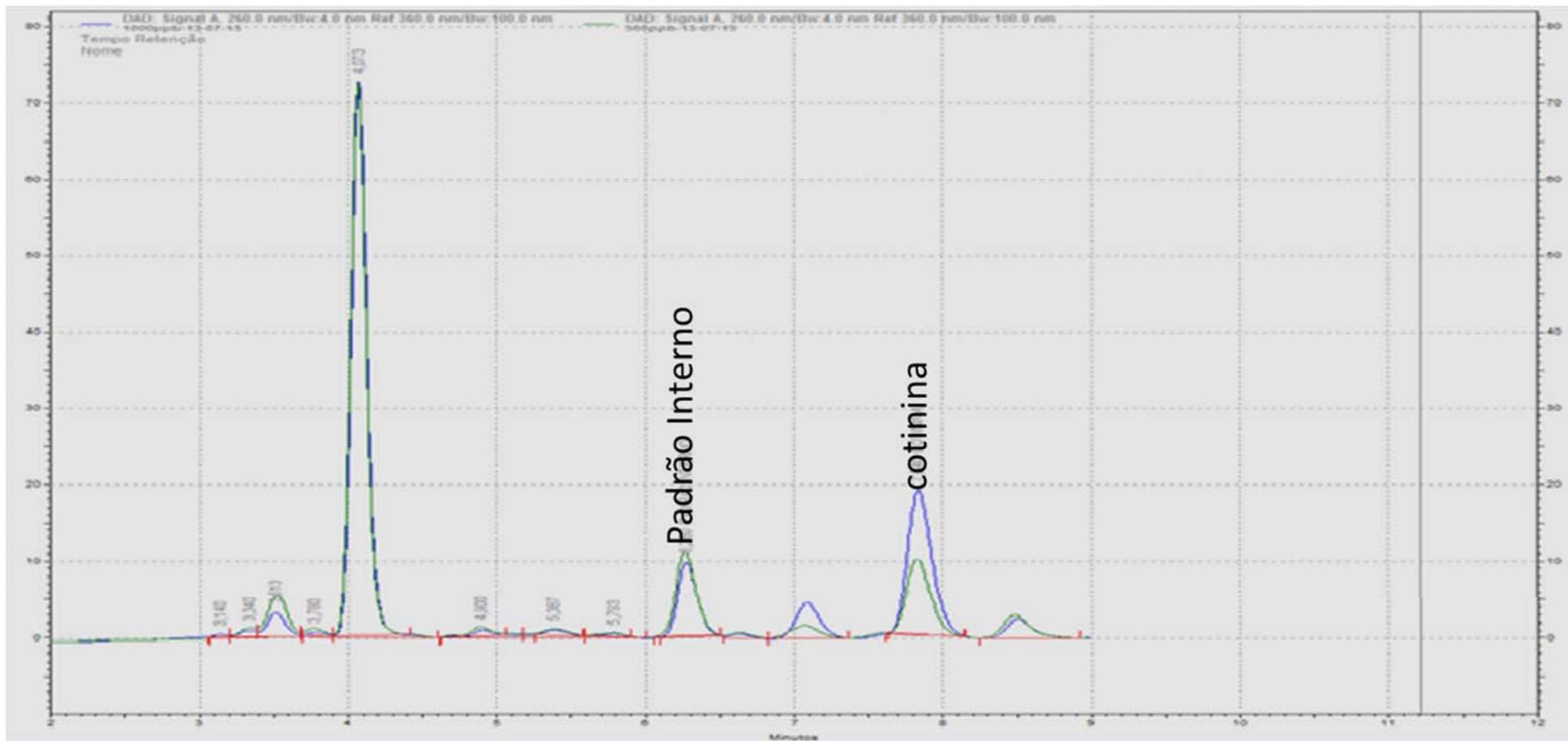


Figura 8. Cromatograma de urina com concentração de 500 µg.L⁻¹ de cotinina (verde) e 1000 µg.L⁻¹ de cotinina (azul).

4.1.2. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE

Afim de avaliar a linearidade construiu-se curvas analíticas com pontos entre 0 e 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Segundo a ANVISA (RE n° 899 de 29 de maio de 2003), coeficientes de correlação acima de 0,99 denotam uma boa linearidade. O método proposto apresenta boa linearidade, a partir dos valores de coeficiente de correlação (R) apresentados na Tabela 9, na qual lista-se as curvas analíticas utilizadas na validação do método. Os coeficientes angulares das curvas ao longo do tempo demonstram que a sensibilidade permaneceu praticamente constante atestando a estabilidade do sistema. Os coeficientes lineares relacionam-se com a linha de base e o ruído presentes no cromatograma.

Tabela 9. Curvas analíticas utilizadas na validação do método.

CURVAS ANALÍTICAS		
Equação da reta	(R²)	(R)
y = 0,0022x+0,0026	0,9965	0,9982
y = 0,0019x-0,0028	0,9976	0,9987
y = 0,0022x-0,0008	0,9981	0,9990
y = 0,0021x+0,001	0,9983	0,9991
y = 0,0028x+0,0025	0,9993	0,9996
y = 0,0024x+0,0023	0,9975	0,9987
Correlação linear média	0,9976	0,9987

4.1.3. PRECISÃO

Os valores de repetitividade foram de 3,2% para a concentração de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 8,4% para 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 4,3% para 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Tabela 10). Os valores de precisão intermediária foram de 6,4% para 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 2,8% para 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,8% para 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Tabela 11). Os resultados obtidos estão dentro do estabelecido pela ANVISA, ou seja, abaixo de 20%

Tabela 10. Valores de repetitividade, descritos em desvio padrão relativo (DPR) nas concentrações estudadas.

Concentração Teórica (µg.L ⁻¹)	Concentração Média determinada (µg.L ⁻¹)	DPR
50	53,50	3,2%
100	108,8	8,4%
1000	1103	4,3%

Tabela 11. Valores de precisão intermediária, descritos em desvio padrão relativo (DPR) nas concentrações estudadas.

Concentração Teórica (µg.L ⁻¹)	Concentração Média determinada (µg.L ⁻¹)	DPR
50	47,21	6,4%
100	99,45	2,8%
1000	1016	0,8%

4.1.4. EXATIDÃO

A Tabela 12 traz os valores obtidos de porcentagem de recuperação para cada concentração estudada. As porcentagens de recuperação foram de 102,1, 101,4 e 102,4% para 50, 500 e 1000 µg.L⁻¹, respectivamente, o que se encaixa nos parâmetros descritos pela resolução da ANVISA.

Tabela 12. Porcentagens de recuperação nas concentrações estudadas.

Concentração Teórica (µg.L ⁻¹)	Concentração Média determinada (µg.L ⁻¹)	Recuperação	DPR
50	50,23	102,1%	7,20%
500	507,2	101,4%	3,82%
1000	1024	102,4%	5,97%

4.1.5. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os resultados (Tabela 13) foram de $6,46 \pm 1,42$ e $19,59 \pm 4,35 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os limites de detecção e quantificação respectivamente.

Tabela 13. Parâmetros para determinação dos limites de detecção e quantificação.

$S_{y/x}$	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
0,0055	8,25	25,17
0,0043	7,47	22,63
0,0039	5,85	17,73
0,0033	5,19	15,72
0,0062	7,31	22,14
0,0034	4,67	14,16
Média	6,46	19,59
Desvio	1,42	4,35

A Tabela 14 traz uma comparação entre o método existente na literatura e o descrito no presente estudo. Observa-se similaridade entre os resultados obtidos no presente trabalho quando comparado ao trabalho desenvolvido por Cattaneo e colaboradores (2006).

Tabela 14. Comparação ente os parâmetros de validação obtidos neste trabalho e reportados por Cattaneo et al.

Parâmetro Avaliado	Cattaneo et al.	Presente Estudo
Linearidade	0,9979	0,9976
LD	5 µg.L ⁻¹	6,46 ± 1,42 µg.L ⁻¹
LQ	10 µg.L ⁻¹	19,59 ± 4,35 µg.L ⁻¹
Exatidão	P50= 107,0%	P50=100,5%
	P500=101,7%	P500=101,4%
	P1000=97,0%	P1000=102,4%
Precisão	P50=11,2%	P50=3,2%
	P500=12,3%	P100=8,4%
	P1000=8,1%	P1000=4,3%

4.2. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Após completa validação do método, procedeu-se a extração de 1317 amostras reais, divididas em 422 amostras do grupo controle (sem asma), 411 do grupo com asma leve e 484 do grupo com asma grave, sendo seguindo procedimento descrito no subitem 3.4. As amostras foram analisadas de terça a sexta feira e as segundas era feita a calibração do sistema. Diariamente, essa calibração era checada pela injeção de 2 padrões de calibração preparados no dia.

As características sociodemográficas dos participantes do presente estudo são descritas pela tabela 15. Observa-se que a maioria dos participantes são do sexo feminino, cerca de 80%. Vale ressaltar que os indivíduos componentes do grupo de asma grave, em geral, apesentam maiores médias de idade e menores níveis de escolaridade, quando comparado aos participantes dos grupos de asma leve e grupo sem asma. A raça foi atribuída aos participantes mediante autodefinição, ou seja, cada participante relatou a sua raça, mediante preenchimento de questionário.

Tabela 15. Características sociodemográficas dos participantes do estudo.

Características	Asma grave	Asma leve/moderada	Sem asma
	%	%	%
Sexo			
Feminino	81,7%	77,2%	87,3%
Média de Idade (anos) ± DP	52,0 ± 13,4	36,8±12,8	44,0±12,3
Nível de escolaridade			
Sem instrução	7,0%	0,7%	1,4%
Primário	23,5%	5,5%	11,0%
Ginásio	23,7%	13,2%	23,0%
2º grau	39,5%	51,5%	54,5%
Superior	6,2%	29,0%	10,1%
Cor autorreferida			
Preta	39,0%	44,1%	40,1%
Parda	51,6%	47,0%	51,6%
Outras	9,4%	8,9%	8,1%
Renda Familiar (R\$)			
Média ± DP	1206,01±1315,72	1413,74±1065,53	1289,85±1494,57

Após integração dos cromatogramas e aplicação da equação, que relaciona a área da cotinina pela área do padrão interno, obtida por regressão linear da curva de calibração, foi possível montar um banco de dados com valores de concentração da cotinina para cada paciente contido no registro do NEA. Os dados brutos permitem o seu tratamento para diferentes cenários, são eles: 1 - Distribuir graficamente os valores de cotinina encontrados experimentalmente; 2- Determinar a linha de corte para a formação de grupos de exposição, a partir da análise do componente hierárquico (HCA); 3 - Calcular a percentagem de indivíduos, separando em não expostos, fumantes passivos e ativos, considerando a concentração de cotinina encontrada experimentalmente e as respostas obtidas no questionário sobre os hábitos tabagistas; 4- Avaliar a percentagem de respostas contraditórias, ou seja,

respostas onde o paciente indica que não é fumante, mas que a análise da sua urina indica que é fumante ativo; 5 - Quantificar o percentual de acertos, indivíduos fumantes autodeclarados com valores acima da linha de corte para fumantes ativos.

A distribuição das amostras em função das faixas de concentração de cotinina presente nas amostras de urina são mostradas na figura 9. O gráfico mostra uma maior densidade de indivíduos em torno do LD demonstrando que a maioria dos pacientes analisados, cerca de 80 %, podem ser considerados como não fumantes ou com baixos graus de exposição à fumaça do cigarro nas últimas 40 h. A faixa da concentração de cotinina nas amostras de urina foi de abaixo do limite de detecção (<6,46) a 1658 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Observou-se uma média de concentração de cotinina maior para o grupo controle (sem asma) quando comparado aos demais grupos, além de uma maior faixa nos valores de cotinina urinária. Nos pacientes com asma grave a média de concentração foi a segunda maior, entretanto observou-se menor faixa de concentração que os demais grupos.

A dispersão dos dados pode ser entendida como a influência dos inúmeros fatores que interferem individualmente no grau de exposição do indivíduo, ou seja, para as pessoas que não fumam o contato com fumantes em ambiente de convívio e para os que fumam o número de cigarros consumidos por dia, marca do cigarro, tipo do cigarro e maneira de fumar (HAUFROID e LISON, 1998).

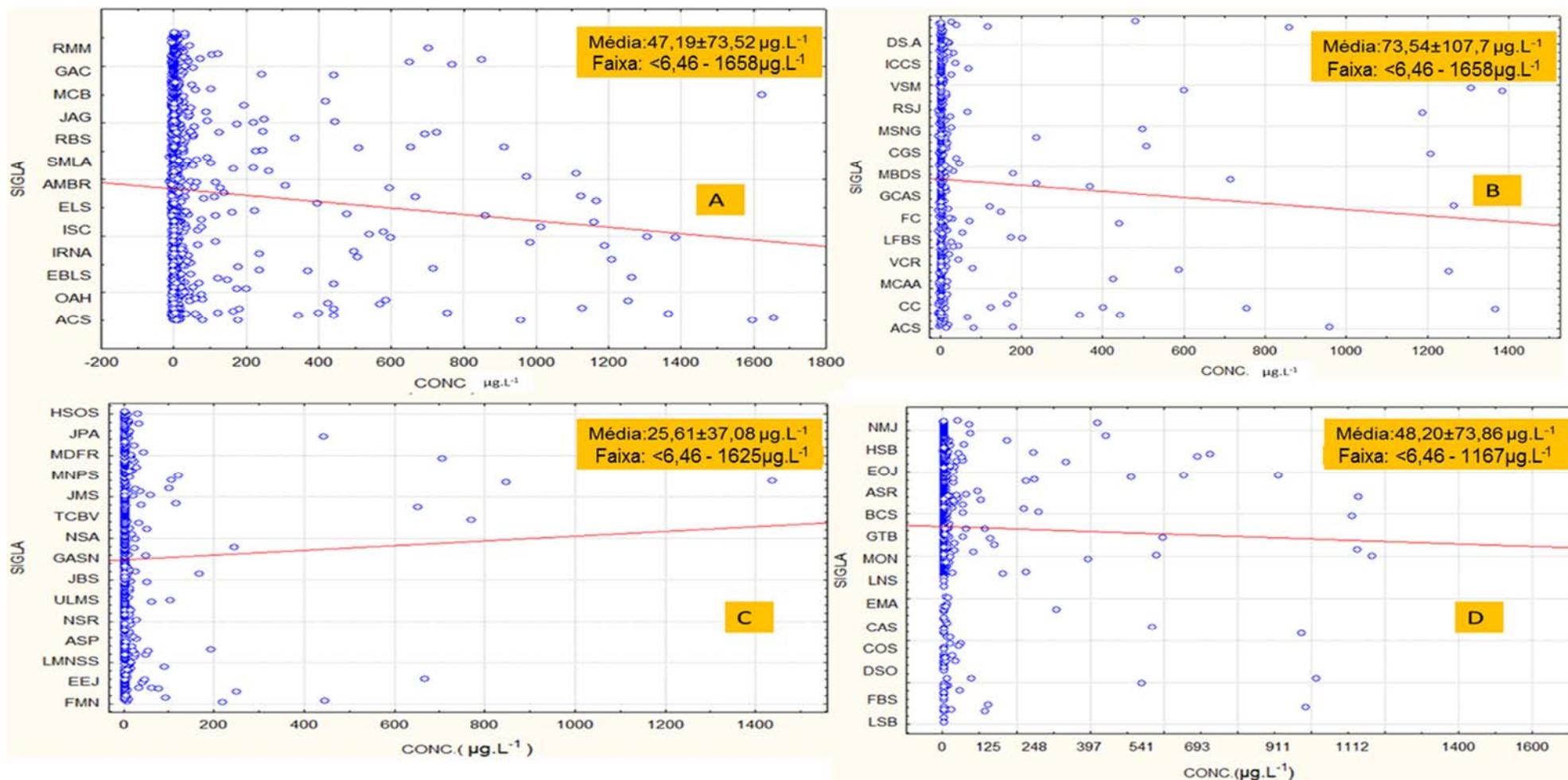


Figura 9. Distribuição da concentração de cotinina nos pacientes do NEA por faixa de concentração. (A) Distribuição total; (B) Distribuição indivíduos do grupo sem asma; (C) Distribuição indivíduos do grupo asma leve; (D) Distribuição indivíduos do grupo asma grave.

As análises quimiométricas são de suma importância no que tange a avaliação da correlação existente entre eles. Nesse sentido, foi aplicado a Análise do Agrupamento Hierárquico (HCA) com o objetivo de se verificar a unificação dos dados em grupos maiores, por utilização de medidas de similaridade ou distância entre eles, resultando em uma árvore hierárquica.

A Figura 10 ilustra os dendogramas obtidos da análise de agrupamento hierárquico utilizando como variável principal a concentração de cotinina. Observa-se baixa similaridade entre os dados, ou seja, altas distâncias Euclidianas entre eles, o que pode ser entendido pela diferença entre as concentrações de cotinina nos diferentes graus de exposição. Nota-se a formação de três grupos principais e distintos entre eles. O primeiro, representado pelo número 1, composto pelos indivíduos com baixo ou nenhum grau de exposição a fumaça do cigarro, o segundo, representado pelo número 2, caracterizado pelos indivíduos que apresentam uma exposição passiva a fumaça ambiental e o terceiro representado pelo número 3, caracterizado pela exposição ativa dos indivíduos que o compõe.

A faixa de concentração de cotinina, obtido pelos dendogramas, no primeiro agrupamento (nenhuma ou baixa exposição à fumaça) foi de abaixo do limite de detecção até aproximadamente $21 \mu\text{g.L}^{-1}$, para todos os grupos de exposição analisados, o segundo agrupamento (exposição passiva à fumaça) foi caracterizado por apresentar uma faixa de aproximadamente 21 a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e o terceiro agrupamento (exposição ativa à fumaça) foi iniciado em todos os dendogramas da figura 10 em torno de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$.

A literatura descreve faixas de concentração de cotinina em urina, a qual determina o grau de exposição à fumaça de cigarro. Tuomi e colaboradores (1999), descrevera que valores entre $22,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ qualificam o indivíduo em fumantes passivos e valores de concentração de cotinina acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ qualificam em fumantes ativos, estudo realizado na Finlândia. Vários autores utilizam parâmetros de concentração diferentes no que diz respeito a classificação em grupos de exposição, Mateos-Vílchez e colaboradores, 2014, classificaram que concentrações abaixo de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ caracterizavam indivíduos não fumantes, $20\text{-}125 \mu\text{g.L}^{-1}$ fumantes passivos e ocasionais, $125\text{-}500 \mu\text{g.L}^{-1}$ fumantes moderados e acima de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ fumantes severos, em estudo realizado em Andaluzia entre os anos de 2007 a 2012. Kim e colaboradores, 2013, descreveram que valores de cotinina urinária

acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ classificavam os indivíduos em fumantes ativos, em trabalho realizado na Coreia. Já Campo e colaboradores, 2016, destacaram que valores abaixo de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$, descreviam indivíduos não expostos à fumaça do cigarro, em estudo realizado no Brasil. Apseloff e colaboradores, 1994, destacam que valores abaixo de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ são mais apropriados para qualificar o indivíduo como não fumante. Man e colaboradores, 2006, publicaram que níveis de cotinina urinária acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ são apropriadas para qualificar o indivíduo em fumante ativo enquanto que valores menores que $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ em não exposto.

Os valores dos limites dos grupos principais formados pelos dendogramas, indicam as seguintes faixas para classificação da exposição ao tabagismo: Indivíduos não expostos (concentração de cotinina $\leq 23,0 \mu\text{g.L}^{-1}$), fumantes passivos (concentração de cotinina entre $23,0 - 100 \mu\text{g.L}^{-1}$) e fumantes ativos (Concentração de cotinina $\geq 100 \mu\text{g.L}^{-1}$). Estas faixas corroboram aos valores já descritos na literatura, e são os valores de corte utilizados no presente trabalho para classificar os participantes do estudo de acordo com o seu grau de exposição.

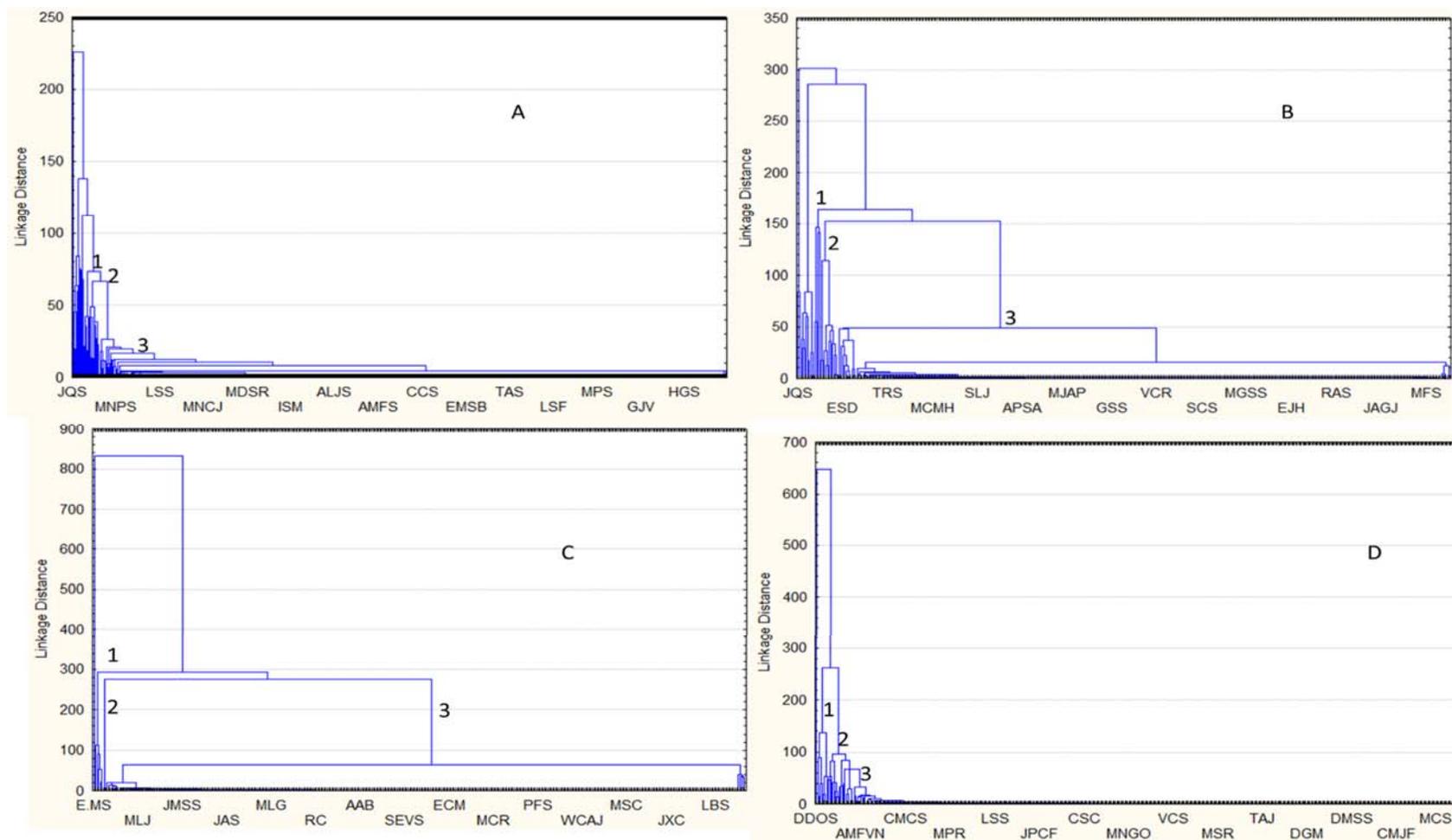


Figura 10. Dendogramas obtidos da análise de agrupamento hierárquico utilizando como variável principal a concentração de cotinina em amostra de urina, (A) Dendograma total, de 1317 indivíduos, (B) Dendograma do grupo controle, de 422 indivíduos, (C) Dendograma do grupo asma leve ou provável, de 411 indivíduos e (D) Dendograma do grupo asma grave, de 484 indivíduos.

Após a classificação em grupos de exposição seguindo os agrupamentos formados pelos dendogramas, ilustrados na figura 10, foi possível classificar os participantes no estudo pelo grau de exposição à fumaça do cigarro. A Tabela 16 traz as porcentagens de fumantes ativos, passivos e não fumantes para cada grupo estudado de acordo com o levantamento feito pelo questionário e pela análise das amostras de urina.

Tabela 16. Porcentagem de classificação em grau de exposição dos grupos de indivíduos estudados.

Grupo de estudo	% fumantes ativos	% fumantes passivos	% não fumantes
Porcentagem obtida pela análise das amostras			
Grupo controle	9,00%	5,93%	85,1%
Asma leve	4,13%	7,30%	88,6%
Asma grave	7,45%	7,87%	85,3%
Total	6,91%	6,91%	86,0%
Porcentagem obtida pela resposta do Questionário			
Grupo controle	7,60%	9,24%	83,2%
Asma leve	3,41%	7,54%	89,1%
Asma grave	1,45%	7,45%	91,1%
Total	4,0%	7,1%	88,9%

O tratamento estatístico mostra uma maior prevalência de indivíduos com baixos graus de exposição à fumaça de cigarro. Aproximadamente 86,0% das amostras continham valores abaixo do limite de quantificação ($19,59 \pm 4,35 \mu\text{g.L}^{-1}$), cerca de 6,9% apresentavam concentração de cotinina entre 21 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e 6,9% apresentavam concentrações acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. A percentagem de 6,9% das pessoas analisadas são fumantes ativos e concorda com dados divulgados pelo ministério da saúde (2014) onde mostra que a cidade de Salvador possui um dos menores índices de fumantes dentre as capitais brasileiras, com cerca de 6% da população acima de 18 anos.

Considerando os dados percentuais obtidos pela análise das amostras e apresentados na Tabela 16, pode-se observar que o maior percentual de fumantes ativos se encontra no grupo controle que não possui sintomas associados a asma, seguido do grupo de asma grave e leve respectivamente. Era de se esperar que pacientes com asma grave tivessem menor índice de fumantes ativos devido a piora dos sintomas pelo hábito do fumo. Infelizmente, não foi possível relacionar os dados obtidos com os sintomas clínicos desse grupo.

Quando comparados as percentagens obtidas através das análises dos pacientes divididos por grupo e a percentagem obtida pelas respostas dadas pelo questionário observa-se uma clara discrepância em todos os grupos. Essa discrepância foi maior no grupo de pacientes com asma grave onde 1,45% declararam serem fumantes ativos, mas as análises mostram que na realidade 7,45% apresentaram valor de cotinina compatível com fumantes ativos.

Tabela 17. Percentagem de contradições entre o questionário e análise das amostras.

Grupo de estudo	Percentual de contradições
Grupo controle	1,42%
Asma leve	0,73%
Asma grave	6,00%

A Tabela 17 traz os valores de discrepância entre o cruzamento dos dados obtidos a partir das análises das amostras individuais e as obtidas pelo questionário. Observa-se que cerca de 6,00% dos indivíduos com asma grave apresentaram contradições nas respostas dadas no questionário e a concentração de cotinina encontrada experimentalmente, contra 1,42% dos indivíduos do grupo controle e 0,73% do grupo de asma leve ou provável. Nesse caso, a possibilidade de não ser aceito no programa e conseqüentemente não ser beneficiado pelos exames e assistência médica gratuita pode ter conduzido a omissão de sua real condição de fumante ativo. Esse dado revela que a utilização do questionário como fonte de informação primária tem que ser criteriosa e pode não refletir a realidade.

Dos 1317 participantes no estudo 52 destes se autodeclararam fumantes, considerando-se como verdadeira a resposta dada no questionário, pode-se calcular o percentual de acerto do método proposto. A tabela 18 relaciona o código referente a cada indivíduo fumante autodeclarado com a concentração de cotinina presente na urina deste.

Tabela 18. Fumantes autodeclarados e concentração de cotinina urinária.

Código	Cotinina	Código	Cotinina	% Acertos
108956	1598,1910491	784570	600,20	71%
160703	<LD	787022	1308,50	
162942	1367,6	795973	716,58	
168324	179,03	872839	<LD	
214257	959,33	905578	1161,8	
219488	180,41	975677	859,15	
241914	14,624	253453	1014,6	
263742	425,79	253778	84,09	
281341	1254,3	481923	1112,1	
281373	<LD	744808	654,82	
286702	588,07	752276	911,48	
393476	441,67	834617	336,96	
404158	149,642	885520	<LD	
430476	1266,2	105535	<LD	
446258	755,412	122277	249,66	
481072	369,62	151761	41,508	
487375	236,42	245285	195,17	
582580	1209,3	452781	16,104	
593866	16,057	466575	167,33	
598659	507,49	494285	<LD	
619216	<LD	526269	48,944	
675861	499,12	520993	244,30	
690986	<LD	660702	770,00	
692217	402,05	694513	652,27	
727818	1188,7	711909	20,505	
783757	1385,3	886227	<LD	

Na tabela 17 em verde estão os valores acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, considerado valor de corte para classificação como fumante ativo, em amarelo valores de concentração de cotinina que caracterizam o indivíduo como fumante passivo e em vermelho descreve os indivíduos com valores de cotinina que denotam baixa exposição ao cigarro. A partir desta constata-se um percentual de 71% de acerto nas análises, considerando apenas os valores acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Vale ressaltar que não existe informação a respeito do último horário que os participantes do estudo fumaram antes da coleta da urina, podendo esse fator conduzir a uma concentração de cotinina na urina que o classifique em fumante passivo. Além disso, a concentração de cotinina na urina e a atuação da enzima responsável pela metabolização da nicotina no organismo dependem de vários fatores tais como raça, grau de exposição, idade, tipo de alimentação, taxa de excreção renal, entre outros (HAUFROID e LISON, 1998), que também não foram considerados no presente estudo.

Os resultados mostram que o método validado, no trabalho presente, apresentou-se apropriado na avaliação de amostras de urina dos pacientes do NEA. Esses dados foram encaminhados para pesquisadores do mesmo, onde serão avaliadas a real influência da exposição a fumaça de cigarro e do tratamento fornecido aos pacientes, com os sintomas apresentados por estes.

5. CONCLUSÕES

- O método proposto foi implementado e validado segundo a ANVISA (RE nº 899 de 29 de maio de 2003), apresentando seletividade e linearidade à cotinina. Os valores de precisão, calculado como desvio padrão relativo e exatidão, calculado como percentual de recuperação, estão dentro dos parâmetros estabelecidos pela ANVISA, para as concentrações estudadas. Os limites de detecção e quantificação foram $6,46 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $19,59 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente;
- Os valores de cotinina em 1317 indivíduos variaram de concentrações abaixo do limite de detecção a $1658 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- Segundo tratamento multivariado HCA, observou-se uma baixa correlação dos valores obtidos experimentalmente nos grupos controle, asma leve e asma grave, ratificando a existência de grupos distintos de exposição a fumaça do cigarro. O limite de formação de cada grupo foi o parâmetro utilizado para classificação dos indivíduos em grau de exposição;
- Os dados foram separados por grau de exposição à fumaça do cigarro, levando em consideração as faixas encontradas nos agrupamentos formados pelos dendogramas. Observou-se uma maior prevalência de indivíduos com baixa ou nenhuma exposição a mesma;
- Com base nas informações encontradas no questionário, observou-se incoerências nos dados fornecidos pelos pacientes do NEA e os encontrados experimentalmente, estas mais pronunciadas nos pacientes que apresentavam asma grave. O questionário não constitui de um instrumento conclusivo para uma avaliação correta da real exposição destes indivíduos;
- A partir da avaliação de fumantes autodeclarados observou-se que a maioria tinha valores acima de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, porém é imprescindível uma melhor avaliação nas variáveis responsáveis pela concentração de cotinina na urina;
- Os resultados obtidos, encaminhados ao NEA, serão de suma importância para que os pacientes com diagnóstico de asma e com classificação de fumante tenha um tratamento mais adequado;

6. REFERÊNCIAS

ANGERER, J.; EWERS U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: State of the art, **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.210, p.201-228, 2007.

ANVISA, Brasil. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE nº 899.2003**.

APINAN, R.; CHOEMUNG, A.; NA-BANGCHANG, K. A sensitive HPLC-ESI-MS-MS method for the determination of cotinine in urine, **J. of Chromatographic Science**, v.48, p.460-465, 2010.

APSELOFF, M.D.; HOLLY M. ASHTON, M.S.; M.B.A.; HYLAR FRIEDMAN, M.D.; NICHOLAS GERBER, M.B.B.S. The importance of measuring cotinine levels to identify smokers in clinical trials. **Pharmacoepidemiology and drug utilization**, v.56, n.3, p.460-462, 1994.

BARBOSA, M.R.; CASTRO, M.L.; LACERDA, D.K.; NETO, M.A.S. Cessação do tabagismo no Brasil: Revisão da literatura, **Revista Eletrônica Univar**, n.6, p. 76-81, 2011.

CAMPO, L.; POLLEDRI, E.; BECTHTOLD, P.; GATTI, G.; RANZI, A.; LAURIOLA, P.; GOLDONI, C. A.; BERTAZZI, A.; FUSTINONI, S. Determinants of active and environmental exposure to tobacco smoke and upper reference value of urinary cotinine in not exposed individuals, **Environmental Research**, v.148, p. 154-163, 2016.

CATTANEO, R.; ALEGRETTI, A.P. Validação do método para determinação de cotinina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. bras. toxicol**, v. 19, n. 1, p. 25-31, 2006.

CEPPA, F.; JAHIRI, Y.E.; MAYAUDON, H.; DUPUY, O.; BURNAT, P. High-performance liquid chromatographic determination of cotinine in urine in isocratic mode, **Journal of Chromatography B**, v.746, p.115-122, 2000.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E.S.; NETO, L.M.R.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADOR, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

CLEWELL, H.J.; TAN, Y.M.; CAMPBELL, J.L.; ANDERSEN, M.E. Quantitative interpretation of human biomonitoring data. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.231, p. 122-133, 2008.

COELHO, L.; AMORIM, A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais, **Revista Brasileira em Epidemiologia**, v.6, n.3, p.158-170, 2003.

DHAR, P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 35, n. 1, p. 155-168, 2004.

DJORDJEVIC, M.V.; HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I. Nicotine regulates smoking patterns. **Preventive medicine**, v. 26, n. 4, p. 435-440, 1997.

ESTEBAN, M.; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review, **Environmental International**, v. 35, p. 438-439, 2009.

FERNANDES, K. G.; MORAES, M.; NETO, J.A.G.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. Padronização interna em espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 249-252, 2003.

GARCIA, L.P.; SANT'ANNA, A.C.; FREITAS, L.R.S.; MAGALHÃES, L.C.G. A política antitabagismo e a variação dos gastos das famílias brasileiras com cigarro: resultados das Pesquisas de Orçamentos Familiares, 2002/2003 e 2008/2009, **Caderno de Saúde Pública**, v. 31, n.9, p.1894-1906,2015.

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

HAUFROID, V.; LISON, D. Urinary cotinine as a tobacco-smoke exposure index: a minireview. **International archives of occupational and environmental health**, v. 71, n. 3, p. 162-168, 1998.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. **DOQ-CGCRE-008**, p.05-19 Revisão 02- Junho/2007.

JAMES, H.; TIZABI, Y.; TAYLOR, R. Rapid method for the simultaneous measurement of nicotine and cotinine in urine and sérum by gas chromatography-mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, v.708, p.87-93, 1998.

KIM KH, LEE CM, PARK SM, CHO B, CHANG Y, PARK SG. Secondhand smoke exposure and osteoporosis in never-smoking postmenopausal women: the Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey. **Osteoporos Int.**, v.24, n.2 :523-532, 2013.

KOWALSKI, P.; MARSZATT, M.; OLEDZKA, I.; CZARNOWSKI, W. Comparative evaluation of CE and HPLC for determination of cotinine in human urine. **Chromatographia**, v. 66, n. 5-6, p. 357-361, 2007.

KOZMA, R.L.H.; ALVES, E.M.; OLIVEIRA, V.A.B.; LOPES, F.D.T.Q.S.; GUARDIA, R.C.; BUZO, H.V.; FARIA, C.R.; YAMASHITA, C.; CAVAZZANA JÚNIOR, M.; FREI, F.; PAES, M.J.O.R.; PAES, J.T.R. Um novo modelo experimental de enfisema: enfisema induzido pela fumaça do cigarro em ratos Wistar, **J. Bras. Pneumol.**, v.40, n.1, p. 46-54, 2014.

KUO, H.W.; YANG, J.S.; CHIU, M.C. Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Chromatography B**, v. 768, n. 2, p. 297-303, 2002.

LLAQUET, H.; PICHINI, S.; JOYA, X.; PAPASEIT, E.; VALL, O.; KLEIN, J.; GARCIA-ALGAR, O. Biological matrices for the evaluation of exposure to environmental tobacco smoke during prenatal life na childhood. **Anal Bioanal Chem**, 396, p.379-399, 2010.

MACHADO, J.B.; CHATKIN, J.M.; ZIMMER, A.R.; GOULART, A.P.S.; THIESEN, F.V. Cotinine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in the amniotic fluid and fetal cord at birth and in the urine from pregnant smokers, **J.PLOS**, p.1-12, 2014.

MACHADO, J.B.; FILHO, P.V.M.; PETERSEN, G.O.; CHATKIN, J.M. Quantitative effects of tobacco smoking exposure on the maternal-fetal circulation, **Bio Med Central**, 11:24, 2011.

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

MALTA, D.C.; MOURA, E.C.; SILVA, S.A.; OLIVEIRA, P.P.V.; SILVA, V.L.C. Prevalência de tabagismo em adultos residentes nas capitais dos estados e no Distrito Federal, Brasil, 2008, **Jornal Brasileiro de pneumologia**, v.36, n.1, p. 75-83, 2010.

MAN, C. N. ; GRAN, L.H.; ISMAIL, S.; LAJIS, R.; AWANG, R. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry, **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v.844, n.2, p. 322-327, 2006.

MAN, C.N.; GAN, L.H.; ISMAIL, S.; LAJIS, R.; AWANG, R. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography- mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, v.844, p.322-327, 2006.

MATEOS-VÍLCHEZ PM, ARANDA-REGULES JM, DÍAZ-ALONSO G, MESA-CRUZ P, GIL-BARCENILLA B, RAMOS-MONSERRAT M,.Smoking prevalence and associated factors during pregnancy in Andalucía 2007-2012. **Rev Esp Salud Publica**, v.88, n.3 p.369-381, 2014.

MATSUMOTO, M.; INABA, Y.; YAMAGUCHI, I.; ENDO, O.; HAMMOND, D.; UCHIYAMA, S. SUZUKI, G. Smoking topography and biomarkers of exposure among Japanese smokers: associations with cigarette emissions obtained using machine smoking protocols. **Environ Health Prev Med**, v.18, p. 95-103, 2013.

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

MELLO, P.R.B.; OKAY, T.S.; DORES, E.F.G.C.; BOTELHO, C. Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. **Pulmão RJ**, v.14, n.3, p.228-236, 2005.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C., Statistics and chemometrics for analytical chemistry, **Ed. Pearson**, 6ª ed., 2010.

MINISTERIO DA SAÚDE. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: O cuidado da pessoa tabagista, **Cadernos de Atenção Básica**, n. 40, 2015.

MUKHERJEE, J.J.; KUMOR, S. GOCINSKI, R.; WILLIAMS, J. Phenolic fraction of tobacco smoke inhibits BPDE-induced apoptosis response and potentiates cell transformation: role of attenuation of p 53 response, **Chemical Research Toxicology**, v. 24, n. 5, p. 698-705, 2011.

NETTO, A.D.P.; DIAS, A.E.X.O.; MOREIRA, J.C.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A.S.; BAREK, J. Avaliação de contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) e seus derivados nitrados (NHPA's): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, n.6 p. 766-773, 2000.

NUNES, G.S.. Métodos imunológicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 462-471, 2005.

NUNES, S.O.V.;CASTRO, M.R.P. Tabagismo: Abordagem, prevenção e tratamento. **Eduel**, p. 17-20, 2011.

ODDOZE, C.; DUBUS, J.C.; BADIÉ, M.; THIRION, X.; PAULI, A.M.; PASTOR, J.; BRUGUEROLLE, B. Urinary cotinine and exposure to parental smoking in a population of children with asthma, **Clinical Chemistry**, v.45, n.4, p.505-509, 1999.

ODDOZE, C.; PAULI, A. M.; PASTOR, J. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of nicotine and cotinine in nonsmoker human and rat urines. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 708, n. 1, p. 95-101, 1998.

OLIVEIRA, P.P.V. First reported outbreak of green tobacco sickness in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 12, p. 2263-2269, 2010.

PETERSEN, G. O.; LEITE, C. E.; CHATKIN, J. M.; THIESEN, F. V. Cotinine as a biomarker of tobacco exposure: Development of HPLC method and comparison of matrices, **Journal of separation science**, v. 33, p. 516-521, 2010.

Pocket Guide for Asthma Management and Prevention, **Global Initiative for Asthma**, 2016.

POLOSA, R.; THOMSON, N.C. Smoking and asthma: dangerous liaisons. **European Respiratory Journal**, v.41, n.3, p.716-726, 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, CAROL.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

SONG, L.; DAVIS, W.; ABRAMS, S.M.; HEMIUP, J.; KAZIM, A.L.; CUMMINGS, K.M.; MAHONEY, M.C. Sensitive and rapid method for the determination of urinary cotinine in non-smokers: an application for studies assessing exposures to second hand smoke (SHS), **Analytica Chimica Acta**, v.545, p.200-208, 2005.

STEINBERGER,E.; KOLLMEIER, M.; MCBRIDE, S.; NOVAK, C.; PEI, X.;ZELEFSKY, M.J. Cigarette smoking during external beam radiation therapy for prostate cancer is associated with an increased risk of prostate cancer-specific mortality and treatment-related toxicity, **BJU International**, 116, p. 596-603, 2015.

STELMACH,R.; FERNANDES, F.L.B.; PINTO, R.M.C.; ATHONozIO, R.A.; RACHED,S.Z.; PRADO, G.F.; CUKIER, A. Comparação entre medidas objetivas do tabagismo e tabagismo autodeclarado em pacientes com asma ou DPOC: Será que nossos pacientes dizem a verdade, **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.41, n.2, p. 124-132, 2015.

THUAN, N.T.L.; MIGUERES, M.L.; ROCHE, D.; ROUSSEL, G.; MAHUZIER, G.; CHRETIEN, J.; EKINDJIAN, O.G. Elimination of caffeine interference in HPLC determination of urinary nicotine and cotinine, **Clinical Chemistry**, v.35, n. 7, p.1456-1459, 1989.

TUOMI, T.; JOHNSON, T.; REIJULA, K. Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine, and caffeine in urine of passive smokers by HPLC-tandem mass spectrometry. **Clinical chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2164-2172, 1999.

TUTKA, P.; MOSIEWICZ, J.; WIELOSZ, M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. **Pharmacol Rep**, v. 57, p. 143-153, 2005.

TYRPIEN, K.; WIELKOSZYNSKI, Y.; JANOSZKA, B.; DOBOSZ, C.; BODZEK, D.;STEPLEWISKI, Z. Application of liquid separation techniques to the determination of the main urinary nicotine metabolites. *Journal of chromatography A*,870, p.29-38,2000.

VIVEKANANDARAJAH, A.; CHAN, Y.L.; CHEN, H.; MACHAALANI, R. Prenatal cigarette smoke exposure effects on apoptotic and nicotinic acetylcholine receptor expression in the infant mouse brainstem, **Neurotoxicology**, v. 53, p. 53-63, 2016.

WILHELM, M.; EWERS, U.; SCHULZ, C. Revised and new reference values for some race elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine, **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.207, p.69-73, 2004.

ZAMBONI, M. Epidemiologia do câncer de pulmão, **J.Pneumol**, p.41-47, 2002.
ZORZETTO, R.; MOURA, M. Variações sobre um tema sufocante. **Pesquisa Fapesb**, 165, p.17-21, 2009.

ANEXOS

ANEXO I
QUESTIONÁRIO SUBMETIDO AOS PACIENTES DO ESTUDO

Data ___/___/___

Iniciais e registro do paciente: _____

QUESTIONÁRIO DE FUMO

1. EXPOSIÇÃO DE FUMO ATIVO

Q60. O(a) sr(a) fuma?

() não – (pule para Q63 e marque "Não se aplica" em Q61 e Q62)

() sim, diariamente

() sim, ocasionalmente (menos que diariamente)

Q61 e Q62: Apenas para fumantes (resposta "1" ou "2" na questão Q60)

Q61. Quantos cigarros o(a) sr(a) fuma por dia? _____ cigarros (99) Não se aplica (Não fuma)

(0) 1-4 (1) 5-9 (2) 10-14 (3) 15-19 (4) 20-29 (5) 30-39 (6) 40 ou + (9) Não se aplica (Não fuma)

Q62. O(a) senhor(a) já tentou parar de fumar?

() sim

() não

() Não se aplica (Não fuma)

1.2 FUMO NO PASSADO

Q63. O(a) sr(a) já fumou?

() Não (pule para "Exposição domiciliar" e marque " Não se aplica" nos próximos 6 itens)

() Sim

() Não se aplica (Ainda fuma)

Q64. Que idade o(a) sr(a) tinha quando começou a fumar regularmente? _____ anos

Q65 e Q66: Apenas para ex-fumantes (Resposta "1" na questão Q63)

Q65. Que idade o(a) sr(a) tinha quando parou de fumar? _____ anos

Q66. Quantos cigarros o (a) sr(a) fumava por dia? _____ cigarros

1.3 NÚMERO DE ANOS DE TABAGISMO

Atual _____ anos

Passado _____ anos

Anos/maço _____ anos

EXPOSIÇÃO PASSIVA:

2.1 EXPOSIÇÃO DOMICILIAR(mede exposição sim/não; intensidade exposição; duração da exposição)

1. Quantas pessoas fumam dentro de sua residência? (Apenas moradores)

() Zero

() Uma

() Duas ou +

() Não sabe/Não respondeu

2. É permitido fumar em todos os lugares dentro de seu domicílio? (Moradores e visitantes)

() Não

() Sim

() Não sabe/Não respondeu

3. Qual a frequência com que alguém fuma dentro de seu domicílio?

() Diária

() Semanal

() Mensal

() < que mensal

() Nunca

() Não sabe/Não respondeu

Obs.: Se "(4) Nunca ", pule para "**TRABALHO/ESCOLA**" e assinale " Zero" nos 4 próximos itens.

4. Durante a última semana, quantos cigarros você estima que foram fumados dentro de sua residência? EM DIAS DE SEMANA

() Zero

() até 10

() 10 a 20

() + de 20

() Não sabe/Não respondeu

5. Durante a última semana, quantos cigarros você estima que foram fumados dentro de sua residência? EM FINAIS DE SEMANA OU FERIADOS

() Zero

() até 10

() 10 a 20

() + de 20

() Não sabe/Não respondeu

6. Quanto tempo você estima que fica exposto à fumaça de tabaco em seu domicílio?

- <1h/dia
- de 1 a 4h/dia
- > 4h/dia
- Zero
- Não sabe/Não respondeu

7. Nas últimas 24h, quanto tempo você esteve exposto à fumaça de tabaco?

- <1h
- de 1 a 4h
- > 4h
- Zero
- Não sabe/Não respondeu

2.2 EXPOSIÇÃO NO TRABALHO / ESCOLA - APENAS SE TIVER ATIVIDADE EXTRA DOMICILIAR.

O indivíduo tem atividade extra domiciliar (trabalha ou estuda fora do lar)?

- Não (Pule para "OUTRAS EXPOSIÇÕES")
- Sim

1. Existem normas sobre fumar em ambientes fechados em seu local de trabalho?

- Sim
- Não há norma
- Não se aplica
- Não sabe/Não respondeu

2. Quantas pessoas fumam perto de você?

- Zero
- Uma
- Duas ou +
- Não se aplica
- Não sabe/Não respondeu

Obs.: Se "(0) Zero", então pule para "OUTRAS EXPOSIÇÕES" e assinale "(3)Zero" próximos itens.

3. Quantas horas você estima estar exposto à fumaça de tabaco? Considere perto o suficiente para ficar com cheiro de fumaça no cabelo e/ou nas roupas.

- <1h/dia
- 1 a 4h/dia
- > 4h/dia
- Zero
- Não se aplica

Não sabe/Não respondeu. Nas últimas 24h, quanto tempo você esteve exposto à fumaça de tabaco?

- <1h
- 1 a 4h
- > 4h
- Zero
- Não se aplica
- Não sabe/Não respondeu

2.3 OUTRAS EXPOSIÇÕES

1. Durante a última semana, você esteve exposto à fumaça em algum tipo de transporte público?

- Não
- Sim, < de 1h/dia
- de 1 a 4h/dia
- > 4h/dia
- Não se aplica (não usa transporte público)
- Não sabe/Não respondeu

Obs.: Se marcar "(8) Não se aplica", finalize e assinale "(0) Nunca" no item 2 e "(3)Zero" no item 3.

2. Com que frequência você está exposto à fumaça de tabaco além do seu domicílio e do trabalho/escola?

- Nunca
- < 1 vez/semana
- >1 vez/semana
- Sim, diário
- Não sabe/Não respondeu

3. Nas últimas 24h, quanto tempo você esteve exposto à fumaça de tabaco?

- <1h
- 1 a 4h
- > 4h
- Zero
- Não sabe/Não respondeu

Assinatura _____
Digitado por: _____

ANEXO II
APOVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Augusto Viana, s/r, Canela – Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1.º andar
 Cep: 40.110-100 – Salvador-Bahia telef.: (71) 3283-8043 e-mail: cepmco@ufba.br homepage: www.cepemco.ufba.br

PARECER/RESOLUÇÃO N.º 099/2009

Registro CEP. 095/09. (Este número, bem como o do Parecer acima devem ser citados nas correspondências referentes a este projeto).

Título do Projeto. “Fatores de Risco, biomarcadores e endofenótipos da asma grave.”

Patrocínio/Financiamento. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Pesquisador Responsável. Professor, Doutor, **Álvaro Augusto Souza da Cruz Filho**, Médico, Professor, Doutor com Pós-Doutorado na Universidade *Johns Hopkins* (EUA). Pesquisadores Principais e “Currícula Vitae” apensos, 04 (quatro), Médicos e Dentista, Professores, Doutores, e, mais, 32 (trinta e dois) colaboradores, entre os quais Pesquisadores Científicos de alta expressividade Nacional/Internacional.

Instituição. Programa de Controle da Asma e da Rinite Alérgica da Bahia (ProAR), Unidade/Órgão do Departamento de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia (ProAR/DMFAMEB/UFBA).

Área do Conhecimento. 4.00, Ciências da Saúde; 4.01, Medicina; Nível T, Grupo I.

Objetivos. Geral — caracterizar os endofenótipos da asma grave e identificar seus fatores de risco. **Específicos** — formalizar o Núcleo de Excelência em Asma, NEAB/UFBA em colaboração com a Universidade de Feira de Santana (UEFS); identificar potenciais biomarcadores dos endofenótipos da asma grave em adultos na Bahia; identificar fatores de risco ambientais para a asma grave, incluindo poluição do ar, exposição e agentes infecciosos, ambiente de trabalho, ambiente domiciliar e padrões de dieta e; identificar fatores de risco individuais.

Resumo. Após justificada a imperiosa necessidade do aporte financeiro para ampliação das instalações físicas e instrumentais, com a conseqüente e plena funcionalidade para o NEAB/UFBA — este descrito desde sua origem até sua situação atual — e, após proposição acadêmica junto ao *NIH/EUA* aprovada com encômios mas financeiramente não deferida por critérios de prioridade, está sendo feita a presente solicitação. Também encontram-se registradas as sólidas interrelações mantidas com entidades científicas e assistenciais, governamentais, públicas e particulares, além das alentadas e meritorias produtividades científicas dos seus principais componentes, ao par das respectivas credenciais de suas formações e exercícios docente-profissionais.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Av. Augusto Vasquez s/n, Casa 4 - Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1.º andar
Cap. 40.110-100 - Salvador-Bahia - telef. (71) 3383-8043 - e-mail: cep@ufba.br - Assesores: cep@ufba.br

Estabelecidos os parâmetros e objetivos que nortearão a pesquisa propriamente dita, após consolidação dos meios e plenamente justificada sua procedência médico-assistencial garantida pelas formações dos respectivos executores e entidades envolvidas, passa-se à correta **Metodologia** processante para todas as modalidades apresentadas pela ASMA e suas co-morbididades mantenedoras e/ou desencadeantes vastas Referências Bibliográficas encerram a proposição de trabalho em todos seus aspectos considerados. Toda esta complexidade executória será gerenciada por duas estruturas de Direção e Apoio: o Conselho Científico e o Comitê Executivo, cujas finalidades, composições e normas de ação estão precedentemente normatizadas e expostas

Serão estudados 500 (quinhentos) pacientes com **asma grave**, de ambos os sexos e idade igual ou superior a 18 (dezoito) anos, divididos em grupos segundo o grau de controle obtido após 01 (um) ano de acompanhamento, observados por 02 (dois) "experts". Igualmente outros 500 (quinhentos) com **asma leve** ou **intermitente**, também moradores em Salvador, serão acompanhados para valorização das informações clínicas, ambientais e biológicas. Finalmente, outros 500 (quinhentos) indivíduos sem história progressiva de asma e residência equivalente por vizinhança aos anteriores, serão igualmente estudados e acompanhados, inclusive geneticamente avaliados. Avaliação da Saúde Oral, Mental, das Vias Aéreas, Imunológica, Genética, Ambiental, Tabagismo e Nutrição, sob a objetividade Geral e Específica, constituem a **Amostra a ser estudada**, donde serão gerados o **Poder de Amostra** e o **Plano de Análise Estatística** cujos resultados, para melhoria da população específica, serão divulgados à sua constatação. Com base nos resultados parciais e finais esperados haverá impactos científicos, tecnológicos, sociais, ambientais e econômicos que exercerão influências e respostas individuais e comunitárias sobre a compreensão e o tratamento da patologia especificada. Outro resultado considerável será a formação de 20 (vinte) Mestres e 10 (dez) Doutores, com as respectivas publicações de suas Dissertações e Teses, apresentação de 50 (cinquenta) trabalhos ou comunicações em Congressos e 20 (vinte) publicações de Artigos em periódicos indexados. Cronograma exposto com duração prevista de 48 (quarenta e oito) meses, com demarcações de objetivos diversos e inúmeros a serem alcançados, desde a reorganização da Unidade até as várias etapas científicas e docentes. **Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido** sintético, inteligível à futura clientela e suficientemente esclarecedor encerra a longa, complexa e explícita proposição.

Comentários. Trabalho docente-assistencial que se traduz pela reestruturação e capacitação física, instrumental e docente de um Núcleo de Estudo e Pesquisa específico para a compreensão da terceira patologia que demanda a diuturna assistência médica geral e específica no Sistema Único de Saúde e, também, pela execução da pesquisa sobre os fatores individuais, sociais, ambientais e genéticos que presidem a sua ocorrência, evolução e persistência. A colaboração a ser prestada pela "Pesquisadora" da *Universidade Johns Hopkins* e por outros dois da "Universidade de São Paulo" e uma da *London School Hygiene and Tropical Medicine*, agregam e asseguram a



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Av. Augusto Vasquez, s/n, Ondina - Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1ª andar
Cep: 40110-100 - Salvador-Bahia - telef: (71) 3283-8003 e-mail: cep@ufba.br homepage: www.cep@ufba.br

validação genética e a experiência clínica à presente Propositura, dando-lhe, inclusive, a característica de colaboração estrangeira, esta restrita apenas ao aspecto processual — revisão liminas genéticas — reduzidíssima quando comparada ao todo, porém não menos valiosa, fundamentada e certamente referencial. **Protocolo aprovável.**

AR/AR

Salvador, 11 de Novembro de 2009


Professor, Doutor Antônio dos Santos Barata,
Coordenador - CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas "Recomendações Adicionais" apenas, bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

IORG0003460. Assurance FWA00002471, expira em 13 de Fev/2019
IRB00004123, expira em 14 de Fev/2017

Rua do Limeiro, nº 157 – Nazaré Cep: 40.005-150 – Salvador-Bahia
Telefax: (71) 3203-9210/9211 e-mail: cepmco@gmail.com

PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA N.º 032/2014

Para análise e deliberação deste Institucional o Professor, Doutor **Álvaro Augusto Souza da Cruz Filho**, Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado “Fatores de Risco, biomarcadores e endofenotipos da asma grave” aprovado em 14 de Abril de 2010 através do Parecer/Resolução Nº 099/2009, encaminhou, em 19 de Novembro de 2014, os “Relatórios Parciais de Janeiro de 2013 a Outubro de 2014, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Fatores de risco, biomarcadores e endofenotipos da asma grave (para pessoas com asma), versão IV, datado de 06 de Novembro de 2012 e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Fatores de risco, biomarcadores e endofenotipos da asma grave (para pessoas sem asma), versão IV, datado de 06 de Novembro de 2012”.

Inexistindo nas referidas proposições conflitos administrativo, processual e ético que contra-indiquem a conseqüente execução da pesquisa, fica a mesma **aprovada** por mais 1 ano por esta Instância.

Salvador, 19 de Novembro de 2014.

Professor, Doutor, Eduardo Martins Netto
Coordenador CEP/MCO/UFBA

Observação importante. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste ao (ã) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução Aditiva e nas “Recomendações Adicionais” apenas, **bem como a imposterável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).