

DEISE BARBIERI

**Padronização de método utilizando  
a cromatografia líquida de alta  
eficiência para a determinação de  
nicotina e cotinina em plasma de  
tabagistas**

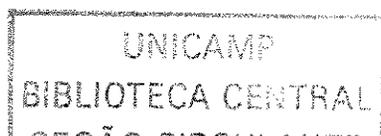
200505410

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Deise Barbieri.*

*Campinas, 26 de fevereiro de 2003.*

*Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior  
- Orientador -*

CAMPINAS  
2003



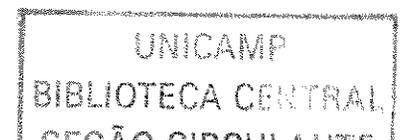
DEISE BARBIERI

**Padronização de método utilizando a  
cromatografia líquida de alta  
eficiência para a determinação de  
nicotina e cotinina em plasma de  
tabagistas**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Farmacologia da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas, para a obtenção do título de  
Mestre em Farmacologia**

Orientador: Prof. Dr. Heitor Moreno Jr.

**CAMPINAS  
2003**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

B234p Barbieri, Deise  
Padronização de método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de nicotina e cotinina em plasma de tabagistas / Deise Barbieri. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Heitor Moreno Júnior  
Dissertação ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

I. Farmacocinética. 2. Validação de métodos. .I. Heitor Moreno Júnior. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp
	B234p
V	EX
TOMBO BC/	62203
PROC.	16-86-09
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	29/10/05
Nº CPD	

Bibid: 341562



---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

---

**Orientador:**

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

---

---

**Membros:**

---

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

---

Prof. Dr. José Eduardo Tanus-Santos

---

Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

---

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 26/02/2003

---

“ Houve um tempo em que se fazia ciência a partir de quatro elementos: água, terra , fogo e ar. Naquele tempo não se sabia que era possível fazer qualquer coisa com apenas dois: vontade e imaginação...”

Marta Reis

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Nair e Pedro, que em nome dos filhos nunca hesitaram diante de esforços pessoais, por incentivarem a continuidade dos meus estudos, e por servirem de exemplo de que disciplina, amor e dedicação são os segredos das grandes conquistas.

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Dr. Heitor Moreno Jr., pela dedicação, paciência, amizade e principalmente pela confiança em meu trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu noivo Paulo pelo exemplo de amor, carinho, apoio e compreensão incondicionais, e por ser a luz em meu caminho.

Aos meus irmãos Daniela e Rafael pelo carinho, incentivo e compreensão.

Aos meus avós Adélia e Ermínio, por serem exemplos de determinação, união e carinho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP pela concessão do equipamento e financiamento do estudo.

À amiga e querida companheira Sueli Moreira de Melo, por ter sido essencial no desenvolvimento do trabalho e pelos seus conselhos valiosos que jamais esquecerei.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Gisele, Joaquim, Juan, Lílian, Maria Ondina, Patrícia, Sílvia, Valéria, Themys e Valnéia, pela colaboração, incentivo, amizade e pela recordação dos bons momentos que compartilhamos.

Ao amigo e companheiro Márcio Gonçalves de Souza, pela amizade, e pelo apoio no desenvolvimento do trabalho. Que este seja um vínculo de eterna amizade.

Ao amigo Adilson Thomaz, pela amizade, e principalmente pela colaboração e pela presença constante em meu dia a dia. Meu muito obrigado.

Aos amigos do Labcrom, pela atenção, em especial a Zahra, meu anjo da guarda e a Joseane pelos valiosos conselhos.

Aos amigos e funcionários do departamento de Farmacologia, pela atenção e auxílio.

Aos funcionários do Instituto de Cardiologia de Rio-Preto, pela atenção e gentileza. Em especial a D. Aparecida pelo carinho.

À enfermeira Ana Maria do HC da Unicamp pela amizade e apoio.

Ao Prof. Stefen pelo auxílio e colaboração técnica.

## AGRADECIMENTOS

---

À amiga Alessandra Stroka, pela colaboração e amizade.

À amiga Raquel pela atenção e carinho.

Ao amigo Ericleison pela alegria e companherismo que deixará saudade.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

---

RESUMO .....	31
1. INTRODUÇÃO .....	36
1.1. HISTÓRICO DO TABACO.....	36
1.2. EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO DO TABAGISMO NA SOCIEDADE ....	36
1.3. CONSTITUINTES DA FUMAÇA DO TABACO.....	38
1.4. NICOTINA .....	39
1.4.1 Características químicas.....	39
1.4.2. Farmacocinética da nicotina .....	40
1.4.3. Absorção .....	40
1.4.4. Distribuição .....	41
1.4.5. Metabolização .....	43
1.4.6. Eliminação .....	44
1.5. AÇÕES FARMACOLÓGICAS .....	45
1.6. EFEITOS TÓXICOS DA NICOTINA .....	46
1.7. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICOS .....	47
1.8. ASPECTOS ANALÍTICOS GERAIS .....	48
2. OBJETIVOS .....	56
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	57
3.1 MATERIAS .....	58
3.1.1 Padrões .....	58
3.1.1.1. Solução padrão estoque .....	58
3.1.1.2. Solução de trabalho .....	58
3.1.2. Equipamentos, acessórios e suprimentos .....	59
3.1.3. Soluções, solventes e reagentes .....	59
3.1.4. Fase móvel .....	60
3.2. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....	60
3.3. SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS .....	61
3.4. AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	61

## SUMÁRIO

3.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	61
3.6. CONSENTIMENTO DOS VOLUNTÁRIOS .....	61
3.7. AMOSTRAS .....	62
3.8. MÉTODO DE ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	62
3.8.1. Padronização cromatográfica por CLAE .....	62
3.8.2. Otimização das condições cromatográficas .....	62
3.8.3. Estudo da linearidade da resposta do detector .....	63
3.8.4. Curva analítica .....	63
3.8.5. Recuperação .....	63
3.8.6. Precisão .....	63
3.8.7. Limite de detecção .....	64
3.8.8. Limite de quantificação .....	64
3.8.9. Exatidão .....	64
3.8.10. Interferência da matriz .....	64
3.8.11. Estabilidade .....	64
3.8.12. Controle de qualidade .....	64
3.9. PROCEDIMENTO ANALÍTICO .....	65
4. RESULTADOS .....	67
4.1. PADRONIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM CLAE .....	68
4.1.1. Otimização das condições cromatográficas .....	68
4.1.2. Estudo da linearidade da resposta do detector .....	69
4.1.3. Curva analítica .....	69
4.1.4. Recuperação .....	71
4.1.5. Precisão .....	71
4.1.6. Precisão inter-ensaio .....	72
4.1.7. Limite de detecção .....	72
4.1.8. Limite de quantificação .....	73
4.1.9. Exatidão .....	73
4.1.10. Interferência da matriz .....	73
4.1.11. Estabilidade .....	75

## SUMÁRIO

---

4.2. MEDICAMENTOS E HÁBITOS INTERFERENTES NOS NÍVEIS DE NICOTINA E COTININA .....	76
4.3. ANÁLISE DE NICOTINA E COTININA .....	76
5. DISCUSSÃO.....	80
5.1 APLICABILIDADE DA TÉCNICA .....	88
6. CONCLUSÕES .....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
ANEXOS.....	100

## LISTA DE TABELAS

---

TABELA 01: Métodos para análise de nicotina e cotinina em fluidos biológicos .....	52
TABELA 02: Linearidade e limite de detecção do detector .....	69
TABELA 03: Equações da reta e coeficientes de determinação ( $r^2$ ) para as curvas analíticas de nicotina e cotinina .....	71
TABELA 04: Recuperação da nicotina e da cotinina .....	71
TABELA 05: Precisão intra-ensaio da nicotina e cotinina .....	72
TABELA 06: Precisão Inter-ensaio da nicotina e cotinina .....	72
TABELA 07: Limite de quantificação do método para a nicotina e cotinina ....	73
TABELA 08: Exatidão do método .....	73
TABELA 09: Equações da reta e dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) dos gráficos do estudo de interferência da matriz .....	75
TABELA 10: Estabilidade .....	75
TABELA 11: Quantificação de nicotina e cotinina do grupo tabagista .....	78

## LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA 01:	Fórmula estrutural da nicotina .....	39
FIGURA 02:	Gráfico de absorção da nicotina .....	41
FIGURA 03:	Metabolização da nicotina .....	44
FIGURA 04:	Fluxograma da extração da nicotina e cotinina .....	66
FIGURA 05:	Cromatograma representativo da análise de padrões .....	68
FIGURA 06:	Estudo de linearidade do detector .....	69
FIGURA 07:	Curva analítica da nicotina em plasma de tabagistas .....	70
FIGURA 08:	Curva analítica da cotinina .....	70
FIGURA 09:	Curva analítica de nicotina em plasma e em água .....	74
FIGURA 10:	Curva analítica de cotinina em plasma e em água .....	74
FIGURA 11:	Cromatograma do extrato "branco" extraído .....	76
FIGURA 12:	Cromatograma da amostra de um voluntário não tabagista .....	77
FIGURA 13:	Cromatograma da amostra de um voluntário tabagista .....	77
FIGURA 14:	Curva de cinética da nicotina no grupo de tabagistas .....	78
FIGURA 15:	Curva de cinética da cotinina no grupo de tabagistas .....	79

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

<b>A. C</b>	Antes de Cristo
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pKa</b>	Potencial de ionização
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration-</i> Agência de controle de medicamentos
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>nAChRs</b>	Receptores nicotínicos de acetilcolina
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>LC-MS</b>	Cromatografia líquida com espectômetro de massa
<b>ng</b>	Nanograma
<b>ml</b>	Mililitro
<b>µg</b>	Micrograma
<b>mM</b>	Milimol
<b>mg</b>	Miligrama
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>pi</b>	Padrão interno
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinação
<b>C.V.</b>	Coefficiente de variação
<b>N=5</b>	Número de replicatas
<b>D.P.</b>	Desvio padrão
<b>U-V</b>	Ultra-violeta
<b>v/v</b>	Volume/volume
<b>min</b>	Minuto
<b>u.m.a</b>	Unidade de massa atômica
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>cm</b>	Centímetro

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

mm	Milímetro
ATN	Adesivo transdérmico de nicotina
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
HCl conc.	Ácido clorídrico concentrado

**RESUMO**

O tabagismo é considerado um problema de saúde pública, uma vez que é responsável por cerca de 4 milhões de morte anualmente em todo o mundo. Nos últimos anos tem ocorrido um aumento dramático na procura por métodos de quantificação da nicotina e outros derivados do tabaco, na intenção de se avaliar as terapias de cessação do hábito de fumar.

Nesse trabalho foram feitas a padronização e a validação de uma metodologia para a quantificação da nicotina e de seu principal metabólito, cotinina, em 1 mL de plasma de tabagistas com adesivo transdérmico de nicotina, após submetidos a um período de abstinência ao tabaco de 24 horas. O plasma foi extraído com diclorometano e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema cromatográfico da Shimadzu, Japão, em coluna LUNA (Phenomenex, USA), 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de partícula.

Nas condições padronizadas a nicotina, a cotinina e o 2-fenilimidazol (padrão interno) eluíram em  $4,6 \pm 0,1$  min.,  $6,2 \pm 0,1$  min. e  $15,2 \pm 0,1$  min., respectivamente. A linearidade do método foi observada com amostras de plasma adicionadas com padrões nas concentrações de 10 a 50 ng/mL para a nicotina e de 10 a 500 ng/mL para a cotinina, mostraram-se adequadas aos propósitos do estudo, com coeficientes de determinação de 0,9928 para a nicotina e 0,9978 para a cotinina. A recuperação média do estudo foi de 75,8% e 77,7% para a nicotina e a cotinina, respectivamente. A precisão intra-ensaio teve coeficiente de variação médio de 6,3% ( $\pm 0,01$ ) para a nicotina e 7,0% ( $\pm 0,01$ ) para a cotinina, e a precisão interensaio apresentou coeficientes de variação médios de 7,1 ( $\pm 0,02$ ) e 7,6 ( $\pm 0,02$ ) para a nicotina e a cotinina, respectivamente. Os limites de detecção foram 5 e 3 ng/mL e de quantificação 10 e 5 ng/mL para a nicotina e a cotinina. O método mostrou-se adequado aos estudos de exatidão por apresentar variação entre a concentração teórica e a calculada pelo método inferior a 10%. O estudo de estabilidade comprovou que as amostras podem ser armazenadas em geladeira por um período de até 3 meses sem apresentarem perdas dos princípios ativos maior que 10%.

## RESUMO

---

O método forneceu uma separação adequada da cafeína, considerada o principal contaminante da amostra.

A técnica padronizada e validada permitiu a análise de amostras de tabagistas com adesivo transdérmico de 21 mg e a possibilidade de realização de estudos futuros correlacionando a farmacocinética e a farmacodinâmica da nicotina com o ritmo circadiano da pressão arterial.

## **1. INTRODUÇÃO**

### 1.1. HISTÓRICO DO TABACO

O uso do tabaco surgiu aproximadamente no ano 1000 A.C., nas sociedades indígenas da América Central, em rituais mágico-religiosos com o objetivo de purificar, proteger e fortalecer os ímpetus guerreiros. A planta, cientificamente chamada *Nicotiana tabacum*, chegou ao Brasil provavelmente pela migração de tribos tupis-guaranis. [GOODMAN, 1993]

A partir do século XVI, seu uso disseminou-se pela Europa, introduzido por Jean Nicot, diplomata francês vindo de Portugal, com o propósito de curar as enxaquecas de Catarina de Medici, rainha da França [GOODMAN, 1993; SLADE, 1992]. Em 1893, A. Pinner apresentou a estrutura da nicotina à Sociedade de Química da Alemanha. [PINNER, 1893]

No final do século XIX, iniciou-se sua industrialização sob a forma de cigarro e em meados do século XX, espalhou-se de forma epidêmica por todo o mundo. A partir de 1960, surgiram os primeiros relatórios médicos relacionando o consumo do cigarro ao aparecimento de doenças, sendo também o hábito de fumar considerado dependência a um dos principais componentes do cigarro, a nicotina. [GOODMAN, 1993; SLADE, 1992]

### 1.2. EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO DO TABAGISMO NA SOCIEDADE

O consumo de cigarros é uma das maiores causas evitáveis de doenças e mortes prematuras da história da humanidade. O consumo do tabaco atingiu a proporção de uma epidemia global. [ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002]

A Organização Mundial de Saúde – OMS – estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1,2 bilhão de pessoas (dentre as quais 200 milhões de mulheres) sejam tabagistas. A cada ano os produtos derivados do tabaco são responsáveis pela morte de 4 milhões de pessoas em todo o mundo (sendo que destas 50% ocorrem em países em desenvolvimento), traduzindo-se 10 mil mortes por dia ou 1 morte a cada 8 segundos. Baseando-se em tendências

## INTRODUÇÃO

atuais, esses números aumentarão para 10 milhões durante os anos de 2020 e 2030, com 7 milhões dessas mortes ocorrendo em países em desenvolvimento. [ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE,2002]

De acordo com o Banco Mundial, o consumo de tabaco gera uma perda anual de 200 bilhões de dólares em todo o mundo. Esta perda é causada por diversos fatores, como sobrecarga do sistema de saúde com tratamento de doenças causadas pelo fumo, mortes precoces de cidadãos em idade produtiva, maior índice de aposentadoria precoce, aumento de 33 a 45% no índice de faltas ao trabalho, gastos com seguros, limpezas e incêndios, além da redução da qualidade de vida do tabagista e de sua família. [INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1996].

No Brasil, a população de tabagistas compreende um terço da população adulta, cerca de 30,3 milhões de tabagistas, sendo 11,2 milhões de mulheres e 16,7 milhões de homens. Aproximadamente 90% dos tabagistas tomam-se dependentes da nicotina entre 5 e 19 anos de idade. Atualmente, existem no país 2,4 milhões de tabagistas nessa faixa etária. A maior incidência compreende a faixa etária que varia dos 20 aos 49 anos de idade. Os homens fumam em maior proporção que as mulheres em todas as faixas etárias; porém, a participação das mulheres vem aumentando significativamente nas últimas décadas. [INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1996]

Dados do Ministério da Saúde apontam o cigarro como o fator responsável por cerca de 80 mil mortes anuais no Brasil; 25% relacionadas à doenças vasculares e cardiovasculares (angina e infarto agudo do miocárdio); 45% das mortes causadas por doença coronariana (na faixa etária abaixo dos 45 e 60 anos); 90 % dos casos de câncer de pulmão (entre os 10% restantes, um terço é de tabagistas passivos) e 30% dos óbitos decorrentes de outros tipos de cânceres como boca, laringe, esôfago, rins, bexiga e cólon de útero. [ MINISTÉRIO DA SAÚDE]

A exposição ativa e passiva da fumaça do tabaco é uma importante causa de mortalidade nos Estados Unidos, sendo projetada como contribuinte para mais de 400.000 mortes anualmente. [GIDDING,et al., 1994] *A American Heart*

*Association* formalmente concluiu que o tabagismo passivo é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares em crianças e adultos.[TAYLOR,et al., 1992; GIDDING,et al., 1994].

### 1.3. CONSTITUENTES DA FUMAÇA DO TABACO

Dos milhares de componentes químicos existentes na fumaça do cigarro, suspeita-se que os potencialmente responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares sejam a nicotina, o monóxido de carbono, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e glicoproteínas do tabaco. [BANYASZ, 1999]

Embora a fumaça do cigarro contenha mais de 4000 componentes, a maioria das investigações restringe-se ao estudo da nicotina e seu principal metabólito, a cotinina [JAMES, et al., 1998].

A composição química da fumaça depende da qualidade do tabaco, de como é embalado, das características do papel e do filtro, da temperatura em que é queimado e da maneira de fumar. No entanto, duas fases fundamentais podem ser diferenciadas: a gasosa e a particulada. As substâncias se distribuem nessas fases segundo suas características físico-químicas. A fase gasosa é composta de gases e vapores como o monóxido de carbono, óxido de nitrogênio, amônia, aldeídos (acroleína, acetaldeídos, etc.) nitrosaminas voláteis e nitrilas (ácido cianídrico e acetonitrila).

A fase particulada, também chamada de condensado, é constituída de um aerosol contendo substâncias voláteis incluídas na fase de dispersão. Os constituintes mais importantes dessa fase são; alcatrão, nicotina e água. O alcatrão é constituído principalmente por hidrocarbonetos policíclicos, alguns dos quais são altamente carcinogênicos, como o benzopireno. Outros compostos como fenóis, cresóis, nitrosaminas não voláteis, íons metálicos (ferro, cádmio, cromo, manganês e zinco) e compostos radioativos (polônio 210) também constituem o alcatrão. Algumas substâncias são adicionadas ao tabaco para melhorar suas características organolépticas, como agentes umectantes,

## INTRODUÇÃO

flavorizantes e aglutinantes. Outros compostos também podem aparecer como contaminantes do alcatrão, como por exemplo os fertilizantes. [CROOKS e Byrd, 1999].

### 1.4. NICOTINA

#### 1.4.1 Características químicas:

A nicotina é um alcalóide volátil, de baixa massa molar, extraída das folhas da *Nicotiana tabacum* e corresponde à aproximadamente 5% da massa da planta. É uma amina terciária, composta por um anel piridina ( $pK_{a2}= 3,12$ ) e um anel pirrolidina ( $pK_{a1}= 8,2$ ) [HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, 1995], sendo desta forma uma parte da molécula hidrofílica e uma parte hidrofóbica [CROOKS e DWOSKIN, 1997]. A nicotina é o maior alcalóide do tabaco e o mais ativo farmacologicamente. [ABOOD, et al., 1981] É uma base fraca, apresenta-se sob a forma de óleo incolor a amarelo pálido e adquire cor castanha em contato com o ar, possui odor característico do cigarro e gosto amargo. A nicotina é o único agente farmacológico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para ser usado na terapia de cessação do hábito de fumar. [DASH e WONG, 1996]

A nicotina é conhecida quimicamente, como 3-(1-metil-2-pirrolidina) piridina; 1-metil-2-(3-piridil) pirrolidina ou  $\beta$ -piridil- $\alpha$ -N-metilpirrolidina. [DOMINO, 1999]

Sua massa molar é igual a 162,23 u.m.a. e tem como fórmula molecular  $C_{10}H_{14}N_2$ . [THE MERCK INDEX, 1996]

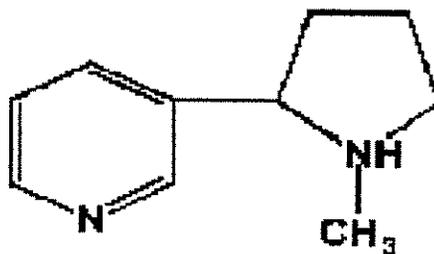


FIGURA 1 – Fórmula estrutural da nicotina

### 1.4.2. Farmacocinética da nicotina

A nicotina pode ser administrada por diversas vias sendo estas: nasal sob a forma de *spray* nasal; oral na forma de goma de mascar e transdérmica na forma de adesivo transdérmico de nicotina, além de endovenosa. [OKUYEMI, et al., 2001]

### 1.4.3. Absorção

A fumaça do cigarro é inspirada para os pulmões, onde inúmeros componentes da mesma são absorvidos, para que em seguida, atinja a circulação sistêmica. A absorção da nicotina ocorre através da superfície alveolar, camadas endotelial e epitelial alveolar fina, e uma rede capilar extensa. [BENOWITZ, 1990]

A fumaça do cigarro, por ter caráter ácido ( pH 5.5-6.5 ) e estar no seu estado ionizado, não é bem absorvida pela boca, por não ser capaz de atravessar as membranas plasmáticas rapidamente, com exceção da fumaça dos cachimbos e charutos que têm pH 8.5 e praticamente são absorvidas pela boca. A concentração plasmática da nicotina aumenta progressivamente, atingindo um valor máximo dentro de 10 minutos após o fumo. [BENOWITZ, 1999]

A quantidade de nicotina absorvida através do cigarro é difícil de ser quantificada, uma vez que depende da quantidade de tragadas, da profundidade com que é inalada, do filtro e até do ambiente. [LEHOUEZEC, et al., 1991]

O pico de concentração plasmática da nicotina, estimado após fumar um cigarro, pode variar de 5 a 50 ng/mL e de cotinina de 50 a 300 ng/mL [HURT, et al., 1993]

A goma de nicotina e o fumo de mascar são tamponados com uma substância alcalina para facilitar a absorção da nicotina pelas membranas das mucosas. A nicotina é fracamente absorvida pelo estômago, por se encontrar na forma protonada devido à acidez gástrica.

## INTRODUÇÃO

O pH da nicotina na forma de *spray* nasal é alcalino, assim a absorção da nicotina após a insuflação é rápida. Concentrações de picos arteriais são alcançadas entre 5 a 10 minutos após a dose aplicada. [GOURLAY e BENOWITZ, 1997]

Os adesivos transdérmico de nicotina (ATN) tem por propósito permitir a liberação sistêmica transdérmica de drogas meia vida biológica curta e/ou com alto efeito de primeira passagem para alcançar uma ação terapêutica constante, aumentando a adesão e diminuindo os efeitos colaterais associados com os picos plasmáticos da droga. A seqüência de eventos pela qual a droga percorre até atingir a circulação é bastante complexa, incluindo a dissolução da droga, inúmeras etapas de difusão e partição, a formação de um depósito, metabolismo e finalmente a droga alcança os capilares dos vasos. [MERKLE, 1989]

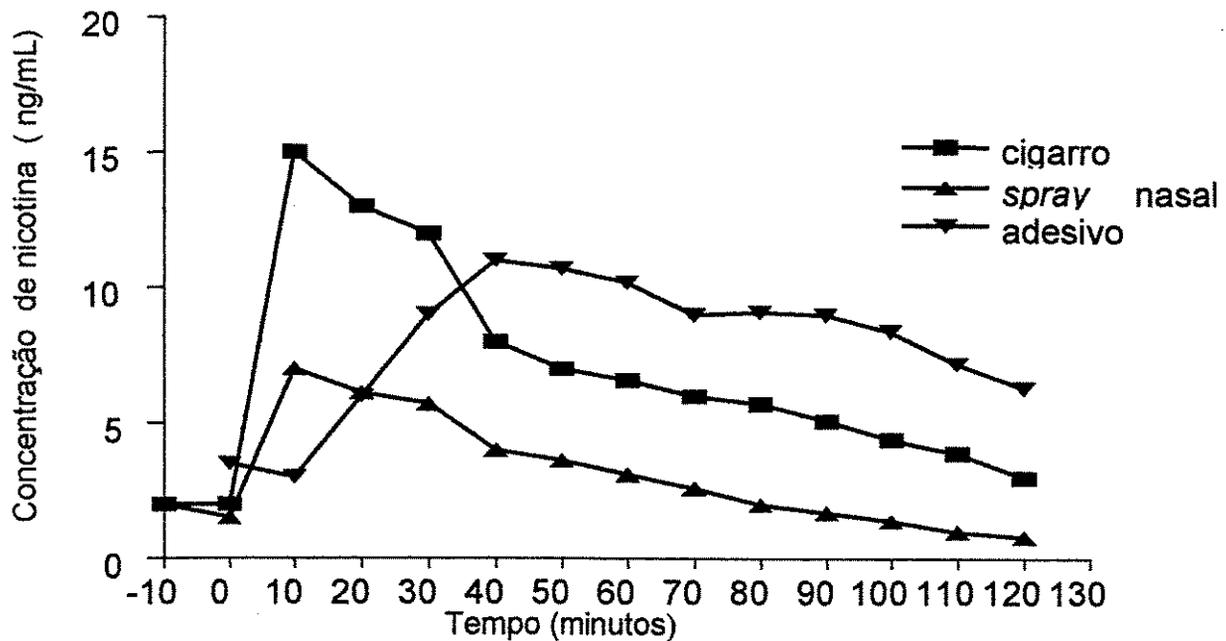


FIGURA 02: Gráficos das diferentes formas de absorção da nicotina

### 1.4.4. Distribuição

A nicotina da fumaça do cigarro suspensa em diminutas partículas de alcatrão é rapidamente absorvida pelo pulmão quase que com a mesma

## INTRODUÇÃO

---

velocidade que quando administrada pela via intravenosa. O composto atinge o cérebro dentro de 8 segundos após a inalação [BENOWITZ, 1999]

Os tabagistas tendem a ajustar o comportamento de fumo para compensar as mudanças na disponibilidade da nicotina ou na faixa de eliminação do corpo, a fim de manter constantes os níveis de concentração de nicotina [BENOWITZ, 1985]

A nicotina entra rapidamente no cérebro, porém seus níveis diminuem após ser distribuída pelos tecidos corporais periféricos e devido a sua eliminação do organismo. Inicialmente o cérebro e a medula espinhal contém altas concentrações de nicotina, em 15 minutos existe somente uma pequena parte, enquanto a concentração no fígado aumenta. Em 30 minutos, a maioria da nicotina está presente no fígado, adrenais, estômago e ossos. [DOMINO, 1999]

Como resultado da absorção, a nicotina, a partir dos espaços alveolares, rapidamente atinge a circulação sistêmica. O alto fluxo sanguíneo nos capilares pulmonares, contribui para uma maior absorção. Assim, após a absorção pulmonar, as concentrações da nicotina no sangue crescem rapidamente e atingem o máximo, ao final de cada cigarro consumido. [BENOWITZ, 1992 ]

A nicotina tem pouca ligação a proteínas plasmáticas, inferior a 5%, sendo rápida e amplamente distribuída aos órgãos e tecidos. Atravessa a barreira placentária [CROOKS e BYRD, 1999]

O cigarro contém cerca de 8 a 9 mg de nicotina, e cerca de 1 mg alcança a circulação sistêmica do tabagista, essa biodisponibilidade pode aumentar dependendo da intensidade e do número de tragadas.[BENOWITZ, et al., 1994] Um cigarro fumado durante dez minutos, produz elevação da concentração plasmática de nicotina para 20-30 ng/ mL que cai para cerca da metade em dez minutos e, a seguir, mais lentamente no decorrer de 1-2 horas.

A biodisponibilidade oral da nicotina é baixa, cerca de 25 a 30% da quantidade ingerida alcança a circulação sistêmica, porque é extensa a biotransformação hepática decorrente da primeira passagem pelo fígado. [BENOWITZ, et al., 1991]

### 1.4.5. Metabolização

A nicotina é metabolizada principalmente no fígado (80-90%), nos pulmões, rins e pele, quando administrada na forma de adesivo transdérmico. [MERKLE, 1989]

O metabolismo da nicotina é complexo com pelo menos dezoito metabólitos já descritos. No entanto, a maioria dos estudos de farmacocinética focaliza quase que exclusivamente a nicotina e/ou seu dois metabólitos principais, a cotinina e a nicotina-1'-N-óxido. [QARE-ABU e MOHAMED, 2001] O metabólito da nicotina denominado 3-hidroxicotinina é o mais abundante na urina de tabagistas ativos ou passivos, correspondendo a aproximadamente 40% da excreção total de nicotina. A 3-hidroxicotinina tem meia vida biológica bem mais curta que a cotinina. [JACOB, et al., 1992]

A nicotina é principalmente metabolizada em cotinina pela C-oxidação, e esta posteriormente é oxidada a *trans*-3'-hidroxicotinina. [JACOB, 1988] Cerca de 70 a 80% da nicotina é metabolizada em cotinina através de uma reação de duas etapas. A primeira etapa é a catálise da nicotina através da citocromo microssomal P450 (CYP) para nicotina- $\Delta^{1(5)}$ -íon imínio, e o segundo passo é a catálise da para nicotina- $\Delta^{1(5)}$ -íon imínio para cotinina através da aldeído oxigenase citosólica. [KYEREMATEN e VESSEL, 1991] A cotinina é o metabólito da nicotina oxidado em maior quantidade e estruturalmente é muito similar a este. No entanto, a cotinina tem uma meia vida de eliminação longa, de cerca de 20 horas, e pode ser usada para quantificar a absorção da nicotina. [DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1983]

Outros caminhos da metabolização da nicotina incluem N-oxidação, N-demetilação e glucorinidação. [KYEREMATEN e VESSEL, 1991] Inúmeras enzimas do complexo CYP-450 fazem parte do metabolismo da nicotina: CYP2A6, 2B6, 2C9, 2D6, e 2E1, bem como as moxigenase flavinas, mas a CYP2A6 é considerada a principal enzima envolvida no metabolismo da cotinina a *trans*-3'-hidroxicotinina [NAGASHIMA, et al., 1996]

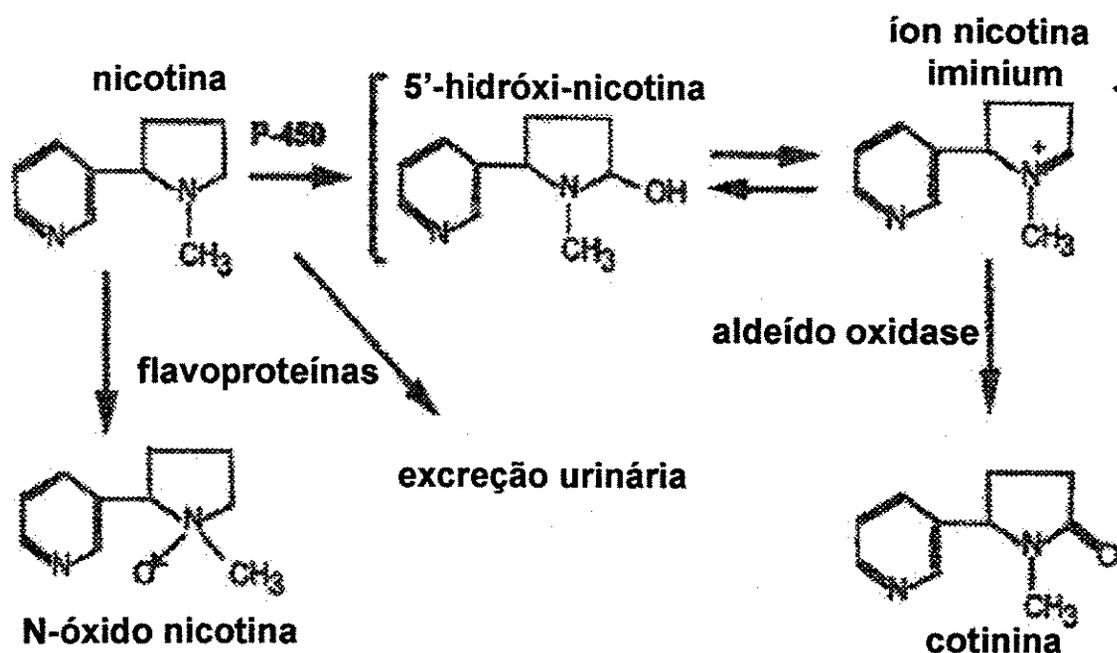


FIGURA 03: Esquema representativo da metabolização da nicotina

#### 1.4.6. Eliminação

A nicotina é excretada por filtração glomerular e secreção tubular, com uma reabsorção variável dependendo do pH urinário. Em condições ácidas da urina, o *clearance* renal é distintamente maior. A nicotina também é excretada no leite materno. [BENOWITZ e JACOB, 1993]

A meia-vida de eliminação é dependente do acúmulo de nicotina durante o uso do tabaco ou produtos de nicotina, variando em média entre 2 a 3 horas. Os níveis séricos de nicotina podem se acumular até o tempo máximo de 6-8 horas durante o fumo regular de cigarros. Existe uma meia vida terminal longa da nicotina de 20 horas ou mais, refletindo a liberação da nicotina impregnada nos tecidos corporais

As concentrações mais altas de nicotina encontram-se no cérebro, estômago, rins e fígado. [BENOWITZ, 1999]

### 1.5. AÇÕES FARMACOLÓGICAS

A nicotina é uma droga que pode influenciar na transmissão colinérgica ao atuar sobre os receptores de acetilcolina e imitar as ações de ativação simpática e diminuição do tono parassimpático . [BENOWITZ, 1999]

A nicotina exerce sua ação fisiológica e comportamental por se ligar aos receptores nicotínicos no cérebro. Esses "receptores nicotínicos acetilcolina " (nAChRs) podem afetar a função das células nervosas, atuando como "portões" para a passagem de íons sódio positivamente carregado, potássio, e cálcio através das membranas das células. Este fluxo de íons pode aumentar a excitabilidade das células nervosas e, mais notavelmente, resultar em aumento da liberação de neurotransmissores incluindo acetilcolina, norepinefrina, dopamina, serotonina, beta-endorfina e outros.[GRAY et al., 1996; McGEHEE et al., 1995] Fora do cérebro, os receptores nicotínicos são encontrados em células musculares e em células nervosas do sistema nervoso autônomo simpático. Esses receptores também são ativados pela nicotina e contribuem para as respostas fisiológicas do cigarro. Os receptores nicotínicos são canais iônicos compostos por cinco subunidades, e estas por sua vez possuem inúmeras distinções. Os diferentes tipos de receptores são responsáveis pelas diferentes ações farmacológicas da nicotina e pelos inúmeros efeitos produzidos pelo cigarro no fumante. [FATTINGER e BENOWITZ, 1997; McGEHEE e ROLE, 1995]

As complexas e imprevisíveis alterações que ocorrem no corpo após a administração de nicotina se devem não apenas às suas ações em vários locais neuroefetores e quimiossensíveis, mas ao fato de que o alcalóide é capaz de estimular e dessensibilizar receptores, ou seja, a nicotina estimula, e em dose suficiente, deprime subseqüentemente os centros autonômicos no sistema nervoso central; os gânglios autônomos; as terminações sensoriais, especialmente as vagais do tórax e as células quimiorreceptoras dos corpos carotídeo e aórtico. Libera ainda, a norepinefrina e epinefrina das terminações nervosas pós-ganglionares simpáticas e da medula adrenal respectivamente. A resposta final de

## INTRODUÇÃO

---

qualquer sistema representa o somatório dos vários efeitos diferentes e opostos da nicotina.[CRYER, 1976]

Em fumantes, os efeitos primários da nicotina no SNC são o relaxamento (particularmente em situações de *stress*), o melhoramento do humor, da atenção, alívio do sono, e melhoria do desempenho motor e sensorial. Em pequenas doses tende a causar hiperatividade, mas em doses maiores tem efeito inverso. [FATTINGER e BENOWITZ 1997] A nicotina reprime o apetite e aumenta a taxa metabólica, resultando em diminuição de massa corporal em tabagistas, se comparados a não tabagistas.[PONTIERI, et al.,1996]

Os efeitos periféricos de pequenas doses de nicotina resultam da estimulação dos gânglios autonômicos e de receptores sensoriais periféricos, principalmente no coração e nos pulmões. A estimulação desses receptores desencadeia diversas respostas reflexas autônomas, que causam taquicardia, elevação do débito cardíaco e da pressão arterial, redução da motilidade gastrointestinal e sudorese.[BENOWITZ, 1997; MINAMI e MATSUOKA, 1999] Quando doses maiores da droga são aplicadas, a estimulação inicial é seguida muito rapidamente por um bloqueio da transmissão de impulsos. [BENOWITZ e SHARP, 1989]

A cotinina é considerada um metabólito inativo, com mínimas atividades farmacológicas [BENOWITZ, et al., 1983]. Porém, segundo o trabalho de Keenan, [KEENAN, et al., 1994], a cotinina possui atividade farmacológica maior do que as anteriormente previstas, uma vez que reduziu significativamente, dependendo da dose, a pressão arterial e a frequência cardíaca, além de produzir melhora na tensão e ansiedade, insônia, quando injetada subcutaneamente, em indivíduos sob abstinência ao tabaco de 48 horas. Assim, a cotinina tem um importante papel no complexo processo de dependência à nicotina.

### 1.6. EFEITOS TÓXICOS DA NICOTINA

A nicotina é, em termos farmacológicos, o componente mais ativo do cigarro, sendo ainda um dos agentes tóxicos mais potentes e rapidamente fatais

## INTRODUÇÃO

que se conhece. A dose letal média para o homem situa-se entre 40 a 60 mg, porém doses de 4 mg já podem provocar reações graves. [BENOWITZ, 1997]

Doses maiores de nicotina podem causar convulsões, por estimular acentuadamente o sistema nervoso central, sendo posteriormente seguido de depressão. A morte resulta de insuficiência respiratória, oriunda de paralisia central e bloqueio periférico dos músculos da respiração.

A instalação dos sintomas de envenenamento agudo e grave da nicotina é rápida; os sintomas incluem náuseas, salivação, dores abdominal, confusão mental, sudorese, cefaléia, alteração na audição e na visão e fraqueza acentuada. [BENOWITZ, 1985]

### 1.7. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICOS

A nicotina é bem absorvida dos sistemas de liberação transdérmicos, promovendo uma concentração relativamente estável durante um período prolongado de tempo [DUBOIS, et al., 1989]. Segundo Benowitz et al., 1991, o máximo de absorção ocorre entre 6-12 horas, com um declínio subsequente para um platô entre 16-24 horas [BENOWITZ, et al., 1991]. A nicotina tem absorção de 10% da dose após a remoção do adesivo transdérmico. Isto deve-se à existência de reservatórios de nicotina na pele, que explicam o prolongamento da fase na qual a nicotina é acumulada.

O tratamento com nicotina transdérmica é de grande importância na redução de alguns sinais de abstinência ao tabaco, e conseqüentemente na cessação ao fumo. [LAWSON, et al., 1998]

No estudo recentemente publicado por Benowitz et al. [BENOWITZ, 2002], foi demonstrado que o adesivo de nicotina, que é absorvido lentamente, fornecendo ao paciente uma concentração relativamente estável da droga durante um certo período de tempo, apresenta efeito menos nocivos à saúde dos tabagistas nos marcadores de risco cardiovasculares como frequência cardíaca, pressão arterial e concentrações de catecolaminas, quando comparados ao

cigarro, e ao *spray* nasal , onde a absorção de nicotina rápida e os níveis plasmáticos da droga são flutuantes durante o dia.

Segundo Hurt et al., 1993, os níveis de nicotina e cotinina permaneceram constantes três dias após a aplicação do adesivo transdérmico de 21 mg, e revelaram grande variabilidade entre os diversos indivíduos estudados, porém não encontraram variações na absorção de nicotina relacionadas ao sexo dos indivíduos. As concentrações encontradas foram relativamente menores do que as regularmente encontradas nos tabagistas habituais, além disso, com a ocorrência dos sintomas de abstinência nesses pacientes demonstram que a terapia de reposição de nicotina com adesivo transdérmico de nicotina deve ser individualizada, de modo a permitir maior alívio aos pacientes. [HURT, et al., 1993]

### 1.8. ASPECTOS ANALÍTICOS GERAIS

A dosagem de medicamentos ou drogas em plasma e soro humanos é rotina em grandes centros de pesquisa do mundo, sendo a procura por métodos mais simples, sensíveis e específicos uma constante .[FDA, 1998]

A qualidade e a credibilidade de um bom trabalho analítico se fundamentam nos cuidados com os quais os analistas se cercam para produzir dados que expressem o valor real da medida obtida. Para que os dados tenham significados reais, são necessários que sejam estabelecidos parâmetros de validação. [CHASIN, et al., 1994]

A validação de um método é um dos elementos básicos de sistema de qualidade laboratorial, como propõe as Boas Práticas de Laboratório (BPL), e compreende o desenvolvimento e controle de determinado método analítico implantado em um laboratório que possibilita garantir que os dados gerados estão inseridos em um limite analítico específico. Validar o método visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou à inexatidão de um dado.

Para que os resultados sejam confiáveis, é fundamental que as variações analíticas sejam mantidas dentro de limites pré-estabelecidos por critérios

## INTRODUÇÃO

---

baseados na finalidade da análise, sistemas analíticos e estudos estatísticos [CHASIN, et al., 1998]

Os resultados dos estudos de validação podem indicar que uma mudança é necessária no processo de fabricação e armazenamento da droga. Para minimizar estudos repetitivos e assegurar que os dados da validação são gerados em condições equivalentes aos procedimentos a que serão submetidas as drogas em análise, recomenda-se que sejam analisados parâmetros como: linearidade, especificidade, estudos de precisão e estabilidade.[LIMA e MÍDIO, 1997]

Esses sistemas de qualidade enfatizam a importância da capacitação do analista, da adequação dos equipamentos e das condições laboratoriais, de protocolos bem definidos e elaborados, de procedimentos padronizados, de cuidados na documentação desses procedimentos e dos dados obtidos e da validação da metodologia utilizada. [CHASIN, et al., 1998]

Diferentes métodos são aplicados na quantificação de drogas e/ou medicamentos em matrizes biológicas humanas, havendo no entanto diferença na sensibilidade e especificidade nos níveis de concentração mínimos de medicamento para sua determinação em cada matriz biológica. Novas metodologias empregadas para esse fim têm conseguido aumentar a sensibilidade e a rapidez da quantificação, acarretando uma diminuição na concentração mínima da droga para a sua determinação.

O método analítico de separação que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas que mais tem sofrido avanço nos últimos anos. Uma das vantagens da CLAE é que pode ser empregada em um número maior de amostras se comparado com a cromatografia gasosa (CG), uma vez que esta exige que o analito seja volátil, ao passo que na CLAE, o analito deve ser solúvel na fase móvel. Muitos metabólitos do cigarro não se volatizam, sendo por isso utilizada a CLAE para grande parte das análises de derivados do tabaco. [CROOKS e BYRD, 1997]

Inúmeras matrizes estão disponíveis para a análise de drogas, sendo as mais comuns sangue total, urina, plasma e soro. As duas últimas são as mais

## INTRODUÇÃO

recomendadas pela facilidade de coleta, manuseio, e devido ao menor número de interferentes.

O solvente usado na extração da droga é extremamente importante, pois deve ser suficientemente eficiente para extrair a maior quantidade de droga possível da matriz, deixando o menor número de interferentes para a análise. [CHAMBERLAIN, 1995]

O principal problema em se trabalhar com amostras de plasma é devido a grande quantidade de proteínas que essa matriz biológica contém, uma vez que as drogas têm grande afinidade por estas proteínas, sendo, portanto, necessário a quebra dessas ligações a fim de que seja possível a análise da droga presente no plasma. No entanto, muitos autores realizam a extração da droga sem fazer o processo de precipitação de proteínas, uma vez que a ligação droga-proteína apesar de forte é reversível. Desse modo com um pH apropriado extraem a droga da amostra com um solvente orgânico. Se a partição no solvente para a forma não ionizada da droga for suficientemente alta, a ligação de equilíbrio pode ser quebrada para permitir uma extração eficiente da droga pelo solvente. [CHAMBERLAIN, 1995; CROOKS e BYRD, 1999]

Para drogas fracamente ácidas ou básicas a partição pode ser ajustada por alteração do pH da fase aquosa com soluções tampão. Pequenas quantidades de ácido (geralmente fosfórico ou nítrico) são adicionadas à fase móvel aquosa, causando assim, um aumento no tempo de retenção de ácidos orgânicos, devido a supressão da ionização, e uma diminuição no tempo de retenção de bases devido a forma iônica ser a predominante. Um controle mais preciso de pH pode ser alcançado com fases móveis usando tampão fosfato ou acetato em combinação com metanol ou acetonitrila [CHAMBERLAIN, 1995]

Há vários métodos descritos para análise de nicotina e cotinina em material biológico, utilizando: cromatografia a gás (CG) [JAMES, et al., 1998; FEYERABEND, 1990; CURVALL, et al., 1982; NYSTROM, et al., 1997], cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) [QARE-ABU e MOHAMED, 2001; NAKAJIMA, et al., 2000], cromatografia líquida acoplada a espectro de massas (LC-MS) [TUOMI, et al., 1999] e radioimunoensaio [PERKINS, et al., 1993]

## INTRODUÇÃO

---

A determinação de nicotina e cotinina no plasma ou na urina de tabagistas é de fundamental interesse para se estudar a correlação entre os efeitos biológicos do tabaco e a farmacodinâmica e a farmacocinética da nicotina, o principal componente do tabaco farmacologicamente ativo. [ODDOZE, et al., 1998]

Devido a rápida meia-vida da nicotina (2 horas), a cotinina tem sido considerada o melhor marcador para o consumo do cigarro, uma vez que por ter meia-vida mais longa (20 horas) possui menor flutuação na concentração plasmática no decorrer do dia. [MACHACEK e JIANG, 1986]

As desvantagens em se analisar a nicotina deve-se à sua meia vida curta, grande diferencial entre picos e nos níveis de absorção durante o dia , além de ser encontrada em quantidades muito menores no plasma, não descartando ainda a grande dificuldade de análise por alguns laboratórios. [CROOKS e BYRD, 1999]

A determinação da nicotina em plasma é muito sensível à ação de contaminantes, podendo a nicotina ser seu próprio contaminante. [FEYERABEND, 1979] A cafeína também tem um importante papel nas análises, pois é capaz de co-eluir com a nicotina. Assim, é fundamental a separação da cafeína para se obter quantificação acurada de nicotina plasmática. [PICHINI, et al., 1991]

A TABELA 01 mostra alguns métodos propostos para a quantificação de nicotina e cotinina em material biológico descritos na literatura.

TABELA 01: Métodos descritos na literatura para determinação de nicotina e do metabólito cotinina em amostras biológicas

Amostra biológica e molécula detectada	Volume de amostra $\mu\text{L}$	Extração preliminar	Deteção nm	Coluna	Fase Móvel	pH	Vazão mL/min	Padrão interno	Limite de detecção	Referência
Cotinina e cafeína em plasma	500	Extrelut 1 coluna de vidro eluída com diclorometano:pentano 1:2 v/v	254	$\mu\text{bondapack C18}$ 300 x 4,6 mm, 10 $\mu\text{m}$	Água- metanol 0,1 molL <sup>-1</sup> acetato de sódio acetonitrila 72:21:5:6:1,4 v/v	4,1	1,4	Efedrina	5 ng mL <sup>-1</sup>	Pichini et al., 1991
Nicotina, cotinina e nicotina-1-N óxido em plasma		Alcalinização pH 13 eluição em diclorometano	254	Coluna IBM ciano FR analítica 25 cm X 4,5 mm, 5 $\mu\text{m}$	Água- metanol 0,1 molL <sup>-1</sup> tampão acetato pH4- acetonitrila 65:29:4:2	4	2		50 dpm	Kyerematen e Taylor, 1987
Nicotina, cotinina e nicotina-1-N óxido em urina				Coluna IBM Optima ciano FR 15 cm X 4,5 mm, 5 $\mu\text{m}$	Solvente A: água- metanol - 0,1 molL <sup>-1</sup> tampão acetato pH 4,0- acetonitrila 187,5:11:1:0,5 Trifetilamina 0,10%	5	2		20 dpm	

Amostra biológica e molécula detectada	Volume de amostra $\mu\text{L}$	Extração preliminar	Deteção nm	Coluna	Fase Móvel	pH	Vazão mL/min	Padrão interno	Limite de deteção	Referência
Nicotina e cotinina em goma de mascar	2	Dissolver em n-hexano e extrair com fase móvel	260	PC18 15cm X 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$	Metanol, tampão citrato-fosfato 15:85 v/v	2,4	0,7	Cloridrato de lidocaína	0,12 ng/mL	Dash e Wong, 1996
Nicotina e cotinina em adesivo transdérmico										
Nicotina e cotinina em plasma	1000	Precipitação de proteínas com ácido tricloroacético e eluição em pH básico com diclorometano	256	ODS Hypersil 15cm X 2 mm, 3 $\mu\text{m}$	Tampão fosfato dibásico, citrato de sódio, heptanosulfonato de sódio e acetonitrila 90:10 v/v	6,1	0,3	2-fenilimidazol	1 ng/mL	Hanharan et al., 1988
Nicotina em plasma	1000	Diclorometano em pH básico (NaOH) e adição de HCl antes da injeção	260	Hichrome 5C18 15 cmX 4,6 mm 5 $\mu\text{m}$	Tampão citrato-fosfato ácido fosfórico, metanol e heptanosulfonato de sódio		1	acetanilida	0,2 ng/mL	Nakajima et al., 2000
Cotinina em urina	1000	Diclorometano em pH básico (NaOH)	260	Capcell Pak C18 UG 120 25 cm X 4,6 mm, 4 $\mu\text{m}$	Tampão fosfato ácido fosfórico, metanol e heptanosulfonato de sódio		1		1 ng/mL	

Amostra biológica e molécula detectada	Volume de amostra $\mu\text{L}$	Extração preliminar	Deteção nm	Coluna	Fase Móvel	pH	Vazão mL/min	Padrão interno	Limite de detecção	Referência
Nicotina e metabólitos em plasma e urina	500 1000	Colunas SepPak C18 acetoneitrila e ácido acético	260-280	$\mu$ -Bondapak C18 30 cm X 3,9 mm 10 $\mu\text{m}$	Metanol, acetoneitrila e água	3	0,8	2-fenilimidazol	20-150 ng/mL	Abu-Qare e Abu-Donia, 2001
Cotina em plasma	1000	Colunas SepPak C18 extração com clorofórmio: 2- propanol: 95:5 v/v	262	Supelconsil LC- 18 DB 15 cm X 4,6 mm, 3 Mm	Tampão fosfato citrato e acetoneitrila 90:10 v/v	6	1		10 ng/mL	Perkins et al., 1993
Nicotina cotina e metabólitos em plasma e urina	2000	Coluna Baker sílica gel, extração com amônia/metanol	254	$\mu$ -Bondapak C18 30 cm X 3,9 mm 5 $\mu\text{m}$	Água: metanol: tampão acetato: acetoneitrila 65:29,4:2 v/v	6,8	1,5	acetanilida	5 ng/mL	Kyerematen e Vesell, 1991

**2. OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

---

Padronizar e validar um método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de Ultra-violeta (U-V) para a determinação de nicotina e cotinina em plasma de tabagistas submetidos a utilização de adesivo transdérmico de nicotina.

**3. MATERIAL E MÉTODOS**

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### 3.1. MATERIAS

#### 3.1.1. Padrões

Os padrões (-)- nicotina, cafeína e cotinina foram obtidos da Sigma (MO, USA) com grau de pureza superior a 97,5 % e foram usados sem purificação prévia. O padrão interno usado foi o 2-fenilimidazol (Aldrich, WI, USA). Todos os solventes apresentavam grau de pureza *HPLC* e foram obtidos da Mallinckodt, (Edo. de Mex., Mex.)

##### 3.1.1.1. Solução padrão estoque

A partir dos padrões foram preparadas soluções de cafeína 5% (5 mg/100mL), cotinina 5% (5mg/100mL), e nicotina 5% (5mg/100mL) em metanol previamente filtrado em membrana de 0,45  $\mu$ m. A solução estoque do padrão interno (2-fenilimidazol) foi preparada em metanol na concentração de 50  $\mu$ g/mL.

##### 3.1.1.2. Solução de trabalho

A partir da solução estoque, foi preparada uma solução intermediária contendo 1 $\mu$ g/mL de nicotina, cotinina e cafeína em metanol em balão volumétrico de 10 mL.

As soluções injetadas para as curvas analíticas e estudos de linearidades foram preparadas diariamente por diluição da solução intermediária em plasma de indivíduos não tabagistas.

A solução de trabalho do padrão interno (2- fenilimidazol) foi feita através da diluição da solução estoque em metanol na concentração de 5  $\mu$ g/mL.

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### 3.1.2. Equipamentos, acessórios e suprimentos

- Cromatógrafo líquido da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan), composto por sistema controlador SCL-10 Avp, auto-amostrador SIL- 10ADvp , duas bombas injetoras de alta pressão LC-10 Advp, detector UV- SPD -10 Advp com comprimento de onda variável e forno CTO-10.
- Coluna LUNA (Phenomenex, CA, USA) LC18 nas dimensões 0,46 mm x 150 mm com partículas de 5  $\mu$ m
- Coluna de guarda de 5 cm de comprimento (Phenomenex, CA, USA) LC18, com 0,46 mm de diâmetro interno.
- Cateter venoso JELCO\* Plus 20G , Johnson&Johnson - Brussels, Belgium.
- Torneiras descartáveis de três vias, Mark Med, SP -Brasil
- Micropipetas (100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L ) Coming, NY-USA
- *Clear shell vials* 8x 40 mm- Alltech, IL,USA
- Reservatório de vidro 250 mL -Supelco ,PA, EUA
- Funil vidro- Supelco, PA, EUA
- Membranas filtrantes 47mm, com poros de 0,45  $\mu$ m- Supelco, PA, EUA
- Ponteiros de plástico, LabTips: Labtips Blue ( 200-1000 $\mu$ L ) e LabTips Yellow (5-200 $\mu$ L), Unilab, SP - Brasil.
- Centrífuga Excelsa Baby I Modelo 206- Fanem, SP- Brasil
- Tubos Eppendorf, Unilab , SP, Brasil.
- Medidor de pH Hanna Instruments - HI 9321, PD, Italy
- Agitador magnético Modelo 258- Fanem, SP- Brasil
- Agitador mecânico de KAHN 107- Nova Ética, SP- Brasil
- Balança analítica Denver Instruments Company, CO, USA
- Computador Pentium LG, NY, USA.

### 3.1.3. Soluções, solventes e reagentes

- (-)- Nicotina (tartrato de nicotina), Sigma Chemical, MO, USA
- (-)-Cotinine, Sigma Chemical, MO, USA

## MATERIAL E MÉTODOS

---

Cafeine, Sigma Chemical, MO, USA

Acetonitrila AR- HPLC, Mallinckrodt, Paris, França.

Ácido fosfórico 85 % AR, Mallinckrodt, Paris, França

Água purificada pelos sistemas Mili-Q, Millipore, Molshelm, França

Diclorometano AR- HPLC, Mallinckrodt, Edo Mex, México.

Fosfato de potássio dibásico AR, Mallinckrodt, Edo Mex, México.

Fosfato de potássio monobásico AR, Mallinckrodt, Edo Mex, México.

Titriplex III EDTA, Merck, RJ, Brasil

Trietilamina 99% , Sigma, MO,USA

2- Fenilimidazol 98% Aldrich, WI, USA

Sulfato de sódio anidro AR, Mallinckrodt, Edo Mex, México.

Hidróxido de sódio AR, Mallinckrodt, Edo Mex, México.

### 3.1.4. Fase móvel

A solução tampão usada como fase móvel na análise foi preparada pela diluição em água Milli-Q de 20 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato dibásico de potássio, 20 mmol.L<sup>-1</sup> de fosfato monobásico de potássio e 0,1 % de solução de trietilamina. O pH da solução foi ajustado a 6,3 com ácido fosfórico 85%. A fase móvel constituiu-se de acetonitrila: tampão pH 6,3 na proporção 10:90 (v/v).

Condicionou-se a coluna por 1 hora antes da corrida com vazão de 1mL/min.

### 3.2. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) conforme demonstrado no anexo 1.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.3. SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS**

Os participantes foram selecionados no Instituto de Cardiologia Rio Preto em São José do Rio Preto.

O grupo de estudo foi composto por 18 voluntários de ambos os sexos com idades entre 18-50 anos divididos em dois grupos:

Grupo 1- Controle- Constituído de indivíduos sadios normotensos, não tabagistas e não dislipidêmicos.

Grupo 2 – Tabagistas- Constituído por tabagistas com mais de 10 anos de hábito, sem evidências clínicas de doenças hipertensiva ou dislipidemia.

### **3.4. AVALIAÇÃO CLÍNICA**

Todos os voluntários foram submetidos à avaliação clínica e exame médico completo. Esses indivíduos foram inicialmente cadastrados através de um questionário no qual constava idade, peso, altura, número de cigarros consumidos diariamente, além dos resultados de exames bioquímicos de sangue. Os participantes não receberam qualquer medicação nos últimos sete dias, e foram instruídos a não ingerir bebidas alcoólicas e café, bem como derivados de cafeína nas 48 horas precedentes ao estudo.

### **3.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Qualquer anormalidade na avaliação prévia ao estudo (anamnese, exame físico, ou exames bioquímicos), o indivíduo era informado e encaminhado ao serviço de assistência médica público ou privado.

### **3.6. CONSENTIMENTO DOS VOLUNTÁRIOS**

Os voluntários que participaram do estudo assinaram um termo de consentimento informado, o qual obrigatoriamente, foi avaliado e aprovado pelo

## MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, e do Instituto de Cardiologia Rio Preto, e foram, extensivamente, informados da natureza do mesmo (anexo 2).

### 3.7. AMOSTRAS

Amostras de plasma “branco” foram obtidas a partir de um “pool” de plasma dos indivíduos que não ficaram expostos à fumaça do tabaco por um período mínimo de 1 semana.

Amostras do grupo tabagista foram coletadas após terem sido submetidos a um período de abstinência ao tabaco de 24 horas, e posteriormente receberam adesivo transdérmico de nicotina de 21 mg por mais 24 horas. As coletas de sangue seriadas foram realizadas nos períodos de 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 18 e 24 horas após a colocação do adesivo. Foram coletados 5 mL de sangue nos tempos previstos, através de cateter venoso previamente lavado com heparina e fixado ao braço do voluntário. O material coletado foi transferido para tubos de vidro de 10 mL contendo solução anticoagulante de EDTA 5%. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 2000 rpm e o plasma separado e congelado à  $-20^{\circ}$  C até a análise.

### 3.8. MÉTODO DE ANÁLISE DAS AMOSTRAS

*3.8.1. Padronização cromatográfica por CLAE:* a proposição da metodologia analítica foi feita através do estudo das publicações referentes à análise de nicotina e cotinina por CLAE, considerando-se a finalidade da análise e a disponibilidade de reagentes e equipamentos disponíveis no laboratório.

*3.8.2. Otimização das condições cromatográficas:* as condições cromatográficas foram estabelecidas a partir da injeção de soluções metanólicas dos padrões de nicotina, cotinina, cafeína e 2- fenilimidazol. Foram testadas diferentes composições de fases móveis, comprimentos de onda e de vazões da fase móvel além dos parâmetros de integração. A análise qualitativa foi realizada pela determinação do tempo de retenção relativo ao padrão interno (2- fenilimidazol).

3.8.3. *Estudo da linearidade da resposta do detector:* a linearidade da técnica cromatográfica definida pelo intervalo de concentração na qual a intensidade da resposta do detector é diretamente proporcional à concentração da amostra, foi verificada através da injeção de soluções de trabalho de nicotina e cotinina em metanol entre as faixas de concentrações de 10 a 1000 ng/mL, e padrão interno (pi) na concentração 50 ng/mL, com posterior cálculo das equações das retas e seus respectivos coeficientes de determinações.

3.8.4. *Curva analítica:* foi determinada através da adição de padrões de nicotina e cotinina e padrão interno em amostras de plasma humano de voluntários não tabagistas nas concentrações de 10 a 50 ng/mL para nicotina e 10 a 500 ng/mL para a cotinina, submetidas à técnica de extração. A linearidade foi estudada através do cálculo de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e equação da reta das áreas relativas (nicotina/pi e cotinina/pi) nas respectivas faixas de concentrações estipuladas. A curva analítica foi feita diariamente.

3.8.5. *Recuperação:* foi calculada através da comparação das áreas relativas de nicotina/pi e cotinina/pi injetados diretamente (sem extração) com as áreas relativas de nicotina/pi e cotinina/pi obtidas após extração em plasma nas concentrações 10, 30 e 50 ng/mL para nicotina e 10, 50 e 200 ng/mL para cotinina. O estudo de recuperação foi realizado em dois dias.

3.8.6. *Precisão:* foi avaliada através do coeficiente de variação de áreas relativas de cinco replicatas analisadas no mesmo dia, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo método proposto (precisão intra-ensaio) e em dias três diferentes consecutivos (precisão inter-ensaio) nas concentrações 10, 30 e 50 ng/mL para nicotina e 10, 50 e 200 ng/mL para cotinina.

## MATERIAL E MÉTODOS

3.8.7. *Limite de detecção*: foi considerado o menor valor de concentração de nicotina e cotinina adicionados em plasma, extraídos e cujas áreas dos picos pudessem ser diferenciadas do ruído e integradas nas condições padronizadas como área mínima e limiar de detecção do pico .

3.8.8. *Limite de quantificação*: foi considerado o menor valor de concentração de nicotina e cotinina adicionados em plasma, extraídos e cujos coeficientes de variação das áreas relativas de cinco replicatas fossem menores que 10%.

3.8.9. *Exatidão*: foi calculada, através da fórmula abaixo, a partir da porcentagem de inexatidão de amostras de plasma adicionadas, nas concentrações 10, 30 e 50 ng/mL para nicotina e 10, 50 e 200 ng/mL para cotinina.

$$\% \text{ inexatidão} = \left[ \frac{\text{concentração obtida} - \text{concentração adicionada}}{\text{concentração adicionada}} \right] * 100$$

3.8.10. *Interferência da matriz*: foi feita pela comparação de uma curva analítica proveniente de amostras de plasma adicionadas de padrão e submetidas ao procedimento de extração com uma proveniente de padrões adicionados em água, também submetidas ao procedimento de extração. As curvas foram sobrepostas e comparadas.

3.8.11. *Estabilidade*: estabilidade da amostra foi avaliada pela quantificação da nicotina e da cotinina adicionadas em plasma nas concentrações de 30, 50 e 200 ng/mL, armazenadas em geladeira (4° C) e em freezer (-20° C), por um período de até 3 meses. O cálculo da estabilidade foi feito através da inexatidão, sendo consideradas estáveis as amostras que mantivessem seus resultados dentro de uma margem de até 10% de inexatidão.

3.8.12. *Controle de qualidade*: foi feita a análise de uma amostra de plasma "branco" adicionado com nicotina e cotinina preparada em metanol, a partir de

## MATERIAL E MÉTODOS

---

uma solução estoque diferente das demais nas concentrações de 25 ng/mL para a nicotina e 250 ng/mL para a cotinina, analisada em triplicata com as amostras dos voluntários.

### 3.9. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

A extração do analito foi feita a partir de 1 mL de plasma em um tubo de polietileno com tampa ao qual foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da solução de padrão interno, 50  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  e 4 mL de diclorometano; após agitação (agitador horizontal) por 10 minutos, a amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos; a fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica lavada com 1 mL de NaOH 0,1 mmol  $\text{L}^{-1}$ . Após agitação em vórtex por 30 segundos, a amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos, sendo a fase orgânica transferida para outro tubo contendo 100 mg de sulfato de sódio anidro. Após, adicionados 25  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico concentrado, os tubos foram agitados brevemente, sendo, então, o solvente evaporado sob nitrogênio em temperatura ambiente. O resíduo foi retomado em 100  $\mu\text{L}$  de fase móvel e transferido para o recipiente do amostrador automático e programada a injeção para 20  $\mu\text{L}$ .

## MATERIAL E MÉTODOS

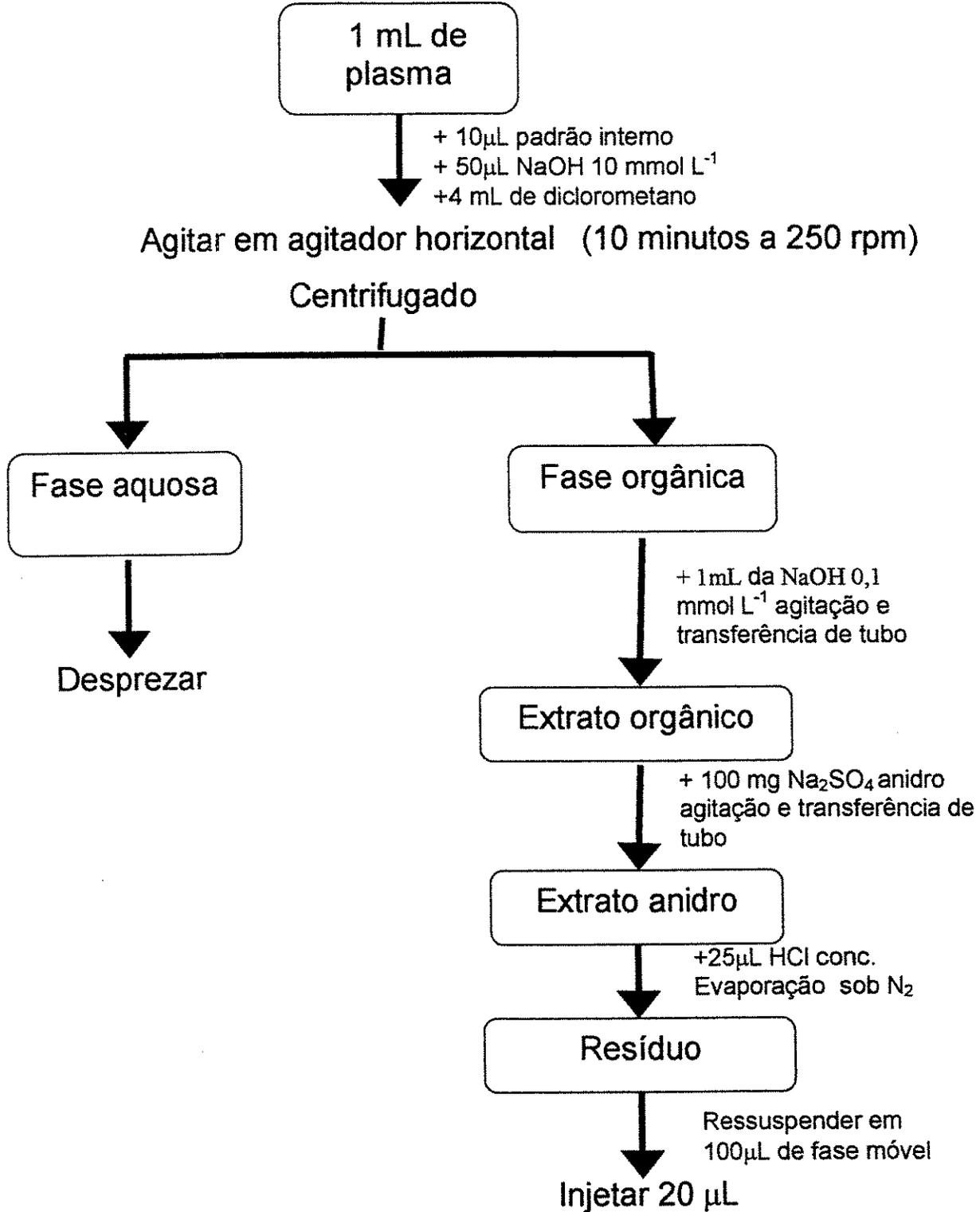


FIGURA- 04 Fluxograma analítico do procedimento de extração da nicotina e cotinina em amostras de plasma

**4. RESULTADOS**

#### 4.1. PADRONIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM CLAE

4.1.1. *Otimização das condições cromatográficas:* a fase móvel otimizada foi acetonitrila 10% e trietilamina 0,1% em tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> com pH 6,3. A vazão determinada foi de 1 mL/ minuto. O forno foi utilizado à temperatura de 40 °C e o comprimento de onda foi de 260 nm. Foram estipulados como área mínima o valor 1000 e como limiar de detecção do pico (*slope*) 200 para os parâmetros de integração.

O tempo de corrida foi estabelecido em 18 minutos, de modo que as substâncias endógenas pudessem ser eluídas sem interferir no cromatograma seguinte. Os picos de nicotina, cotinina, cafeína e 2- fenilimidazol apresentaram-se bem separados, e com resolução adequada, conforme demonstrado na FIGURA 05 . O fator de assimetria dos picos de nicotina (1,2) e cotinina (1,1) estão dentro dos limites considerados aceitáveis pelo FDA [ FDA, 1998 ]. O tempo de retenção da cafeína (8,88 min.) foi diferente dos demais componentes analisados, não interferindo portanto na análise, conforme demonstrado na FIGURA 05.

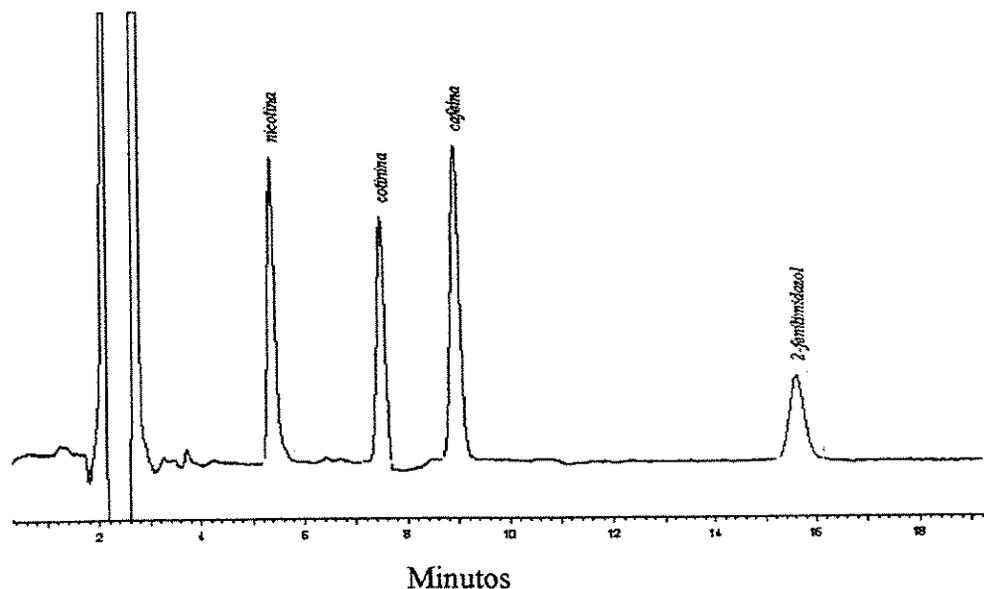


FIGURA 05: Cromatograma representativo dos padrões de nicotina , cotinina e 2- fenilimidazol em plasma, com fase móvel 10% de acetonitrila, 90% tampão fosfato, vazão de 1 mL/min e comprimento de onda de 260 nm.

## RESULTADOS

4.1.2. *Estudo da linearidade da resposta do detector:* o detector mostrou-se linear para as concentrações de 10 a 1000 ng/mL tanto de nicotina como de cotinina, sendo as equações das retas  $y = 0,002x + 0,0123$  e  $y = 0,0025x - 0,0028$  e os coeficientes de determinação 0,9993 e 0,9996 para a nicotina e cotinina, respectivamente (FIGURA 06).

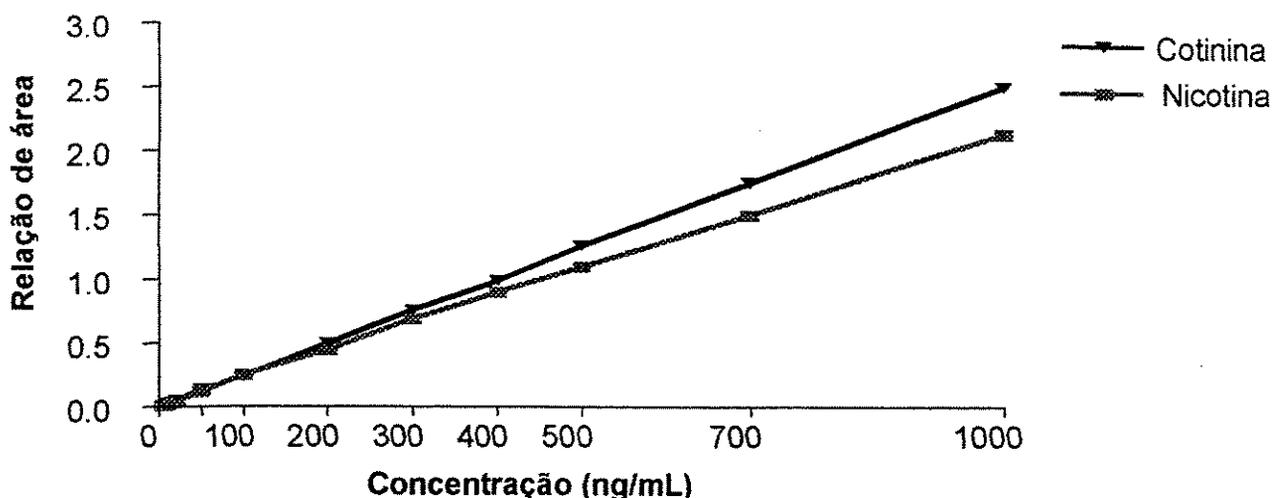


FIGURA 06: Estudo de linearidade do detector

TABELA 2: Linearidade (expressa através do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e equação da reta) e limite de detecção do detector de UV para nicotina e cotinina.

Parâmetros	Nicotina	Cotinina
$r^2$	0,9993	0,9996
Equação da reta	$y = 0,0021x + 0,0123$	$y = 0,0025x - 0,0028$
Limite de detecção	10 ng/mL	5 ng/mL

### 4.1.3. Curva analítica:

As FIGURAS 07 e 08 mostram graficamente a linearidade do método para determinação de nicotina nas concentrações de 10 a 50 ng/mL e cotinina nas concentrações de 10 a 500 ng/mL em plasma humano.

## RESULTADOS

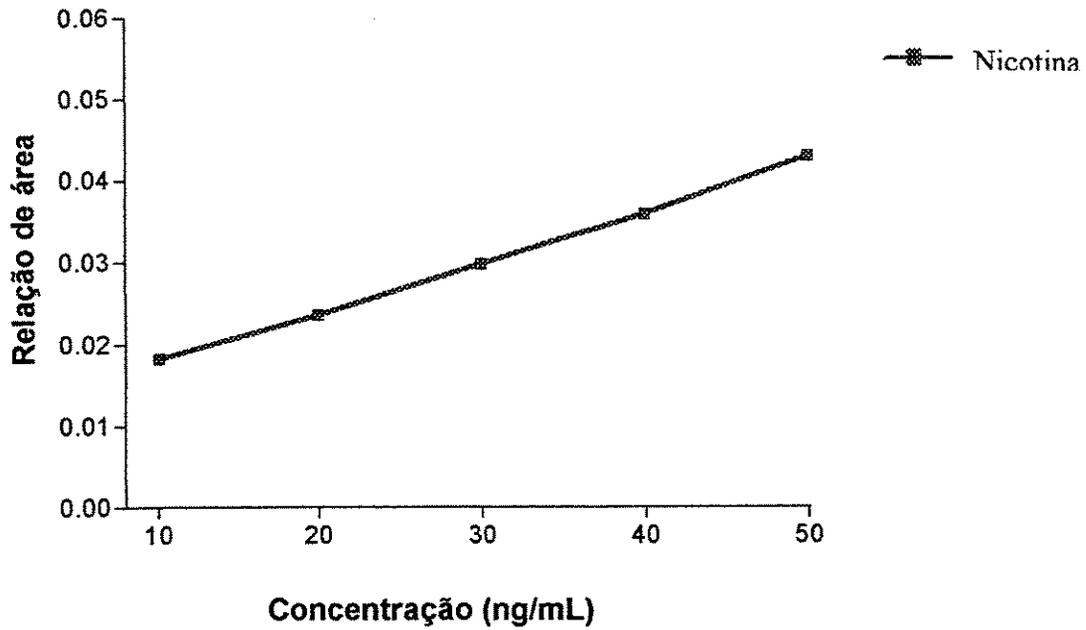


FIGURA 07: Curva analítica da nicotina em plasma de tabagistas submetidas ao procedimento de extração.

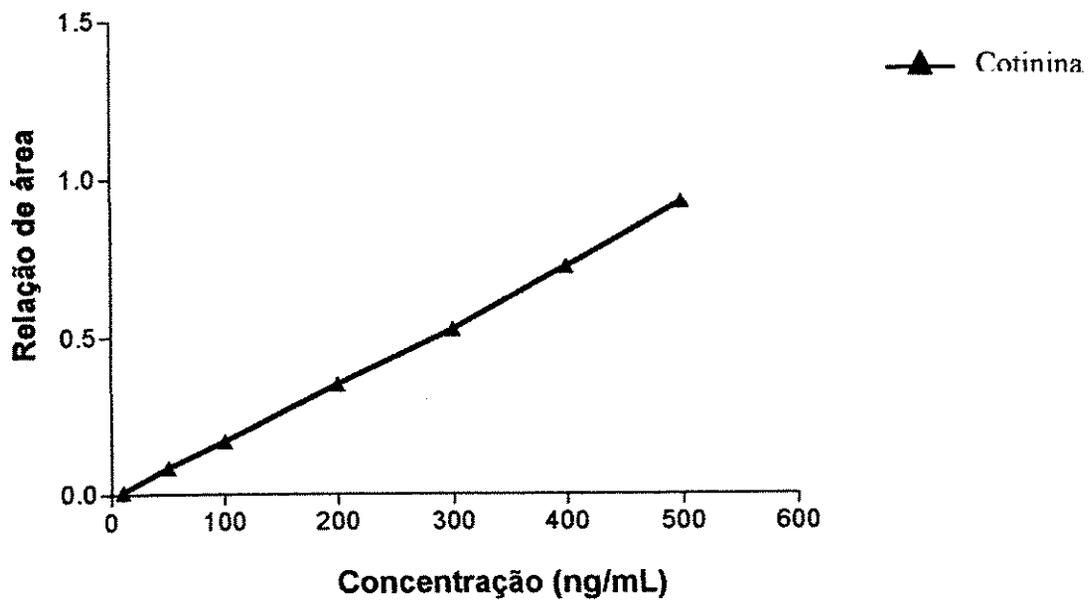


FIGURA 08: Curva analítica da cotinina em amostras de plasma de tabagistas submetidas ao procedimento de extração.

## RESULTADOS

TABELA 03: Equações da reta e coeficientes de determinação ( $r^2$ ) para as curvas analíticas de nicotina e cotinina obtidas em amostras de plasma submetidos ao processo de extração.

Parâmetros	Nicotina	Cotinina
$r^2$	0,9928	0,9978
Equação da reta	$y = 0,0006x + 0,0119$	$y = 0,0018x - 0,0082$
Concentração	10 - 50 ng/mL	10 - 500 ng/mL

4.1.4. *Recuperação*: a TABELA 4 mostra as porcentagens de recuperação para a nicotina e cotinina.

TABELA 4 – Recuperação da nicotina e da cotinina em amostras de plasma humano.

Concentração (ng/mL)	Recuperação da nicotina (%)	Recuperação da cotinina (%)
10	72 ( $\pm 13$ )	86 ( $\pm 2$ )
30	87 ( $\pm 2$ )	79 ( $\pm 1$ )
50	69 ( $\pm 9$ )	70 ( $\pm 4$ )
200	76 ( $\pm 4$ )	75 ( $\pm 2$ )

N=5 Recuperação média da determinação em 2 dias

4.1.5. *Precisão*:

Precisão intra-ensaio: Os resultados do estudo de precisão intra-ensaio para nicotina (CV médio de 6,3%) e cotinina (CV médio 7,0%) estão mostrados na TABELA 5.

## RESULTADOS

TABELA 5 – Precisão intra-ensaio da nicotina e cotinina expressa em função dos valores de estimativa de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Concentração (ng/mL)	Nicotina		Cotinina	
	DP	CV (%)	DP	CV (%)
10	0,01	8,4	0,01	9,0
30	0,01	7,9	0,02	8,5
50	0,02	6,6	0,01	6,0
200	0,014	2,2	0,015	4,5

N=5

4.1.6. *Precisão inter-ensaio:* Os resultados obtidos no estudo da precisão inter-ensaio em três dias diferentes, para nicotina (CV médio 7,1%) e cotinina (CV médio 7,6%) estão representados na TABELA 6.

TABELA 6- Precisão inter-ensaio da nicotina e cotinina expressa em função dos valores de desvio padrão ( DP) e coeficiente de variação (CV)

Concentração (ng/mL)	Nicotina		Cotinina	
	DP	CV (%)	DP	CV (%)
10	0,04	9,5	0,03	9,4
30	0,01	7,0	0,01	8,0
50	0,04	7,2	0,05	7,3
200	0,01	4,7	0,01	5,8

N=5 D.P e C.V. calculados em três dias consecutivos

4.1.7. *Limite de detecção:* os limites de detecção para determinação de nicotina e cotinina em plasma humano pelo método proposto foram de 5 e 3 ng/mL, respectivamente.

## RESULTADOS

4.1.8. *Limite de quantificação*: Os resultados para a determinação dos limites de quantificação da nicotina e cotinina estão expostos na TABELA 7. Os limites de quantificação foram de 10 ng/mL para a nicotina e 5 ng/mL para a cotinina, tendo como aceitável o menor valor de concentração com coeficiente de variação 10 %.

TABELA 7- Resultados do estudo do limite de quantificação do método para a nicotina e cotinina.

Concentração (ng/mL)	CV da nicotina	CV da cotinina
5	15 %	10 %
10	8 %	9%
15	7 %	9%

N=5

4.1.9. *Exatidão*: A TABELA 8 representa os valores de exatidão determinados.

TABELA 8- Porcentagem de inexatidão do método proposto, em estudo com amostras adicionadas de nicotina e cotinina.

Concentração (ng/mL)	Inexatidão da nicotina (%)	Inexatidão da cotinina (%)
10	-1	4
30	-2	-4
50	-11	7
200	-2	-1

N=5

4.1.10. *Interferência da matriz*: as FIGURAS 10 e 11 mostram respectivamente os resultados dos estudos da interferência da matriz biológica para nicotina e cotinina. As equações da reta e os coeficientes de determinação estão representados na TABELA 9.

## RESULTADOS

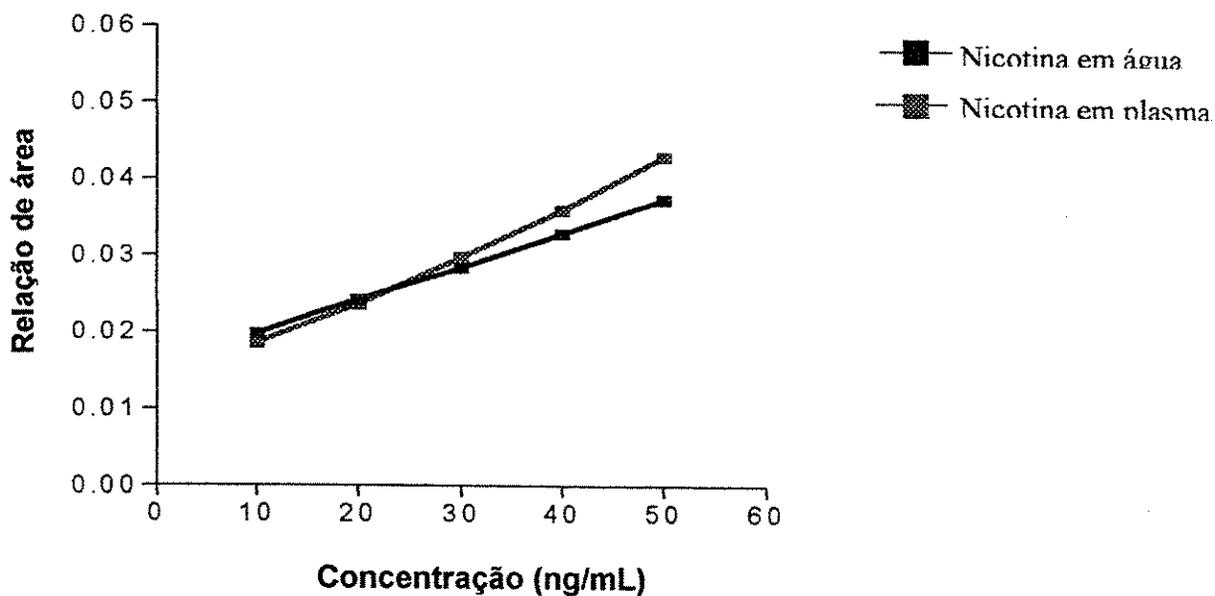


FIGURA 09: Curva analítica de nicotina em plasma (■) e em água (■) para estudo de interferência da matriz biológica.

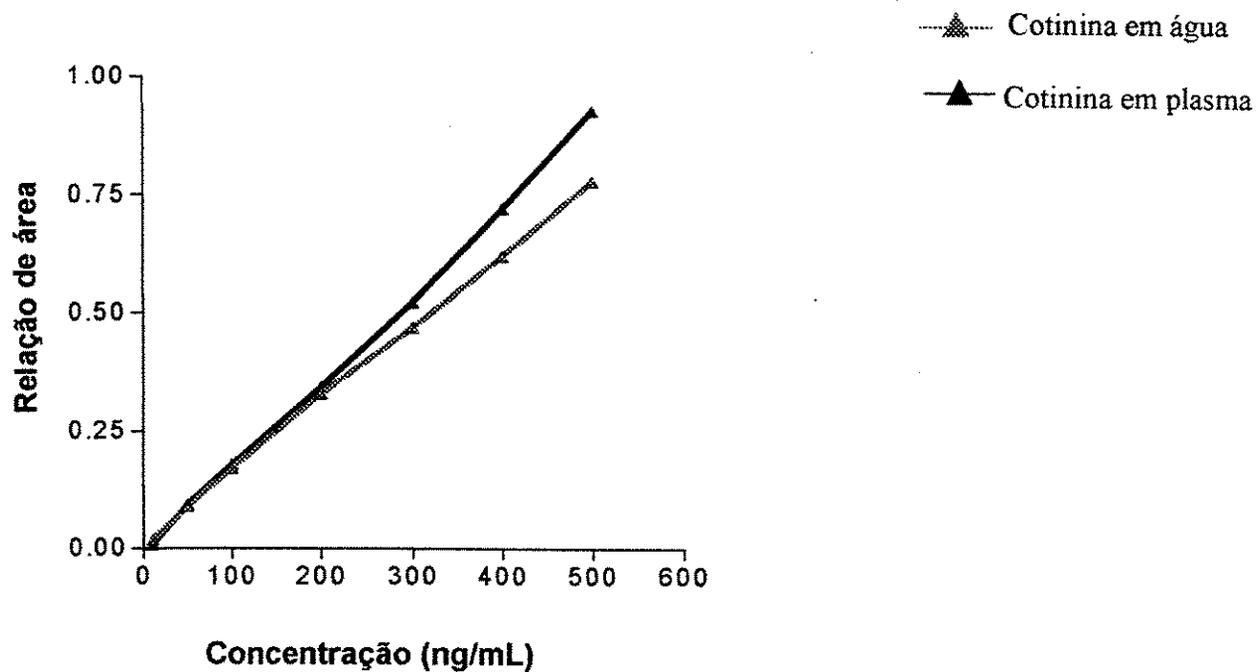


FIGURA 10: Curva analítica de cotinina em plasma (▲) e em água (▲) para estudo de interferência da matriz biológica.

## RESULTADOS

TABELA 09: Representação das equações da reta e dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) dos gráficos acima representados:

Curva analítica	Equação da reta	$r^2$
Nicotina em plasma	$y = 0,0006x + 0,0119$	0,9928
Nicotina em água	$y = 0,0004x + 0,0154$	0,9997
Cotina em plasma	$y = 0,0004x + 0,0145$	0,9911
Cotina em água	$y = 0,0017x + 0,0495$	0,994

4.1.11. *Estabilidade:* A TABELA 10 mostra os resultados do estudo da estabilidade, avaliada através do aumento da porcentagem de inexatidão.

TABELA 10: Avaliação da estabilidade através da porcentagem de inexatidão da nicotina e da cotinina em análise realizada em amostras de plasma adicionadas com os padrões e armazenadas em freezer (-20° C) e em geladeira (4° C).

Concentração ng/mL	Local	Nicotina (%)			Cotinina (%)		
		1 sem	1 mês	3 meses	1 sem	1 mês	3 meses
30	"Freezer"	-4	-5	7	3	8	8
	Geladeira	8	-12	-17	10	24	32
50	"Freezer"	1	-8	-10	-8	-8	10
	Geladeira	-9	15	23	-9	-16	-26
200	"Freezer"	-0,5	1	3	-3	-6	-7
	Geladeira	10	16	22	-2	-4	9

### 4.2. MEDICAMENTOS E HÁBITOS INTERFERENTES NOS NÍVEIS DE NICOTINA E COTININA

Não foi verificado entre os voluntários o consumo regular de bebidas alcoólicas. Além disso, todos relataram apresentar alimentação saudável e prática de exercícios físicos pelo menos uma vez por semana. Nenhum voluntário estava fazendo uso de qualquer medicação regular, ou fez na semana que antecedeu ao estudo. As mulheres, em sua maioria, eram hysterectomizadas, e as demais não faziam uso de hormônios. As amostras dos voluntários tabagistas demonstraram a presença de cafeína, provavelmente consumida nos dias precedentes ao estudo, porém o método permitiu boa separação deste composto, não causando interferência nos resultados.

### 4.3. ANÁLISE DE NICOTINA E COTININA

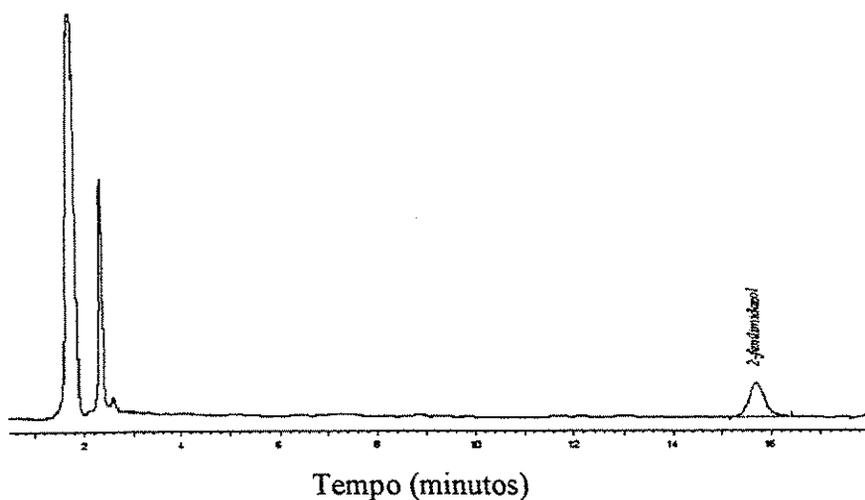


FIGURA 11: Cromatograma branco extraído.

## RESULTADOS

---

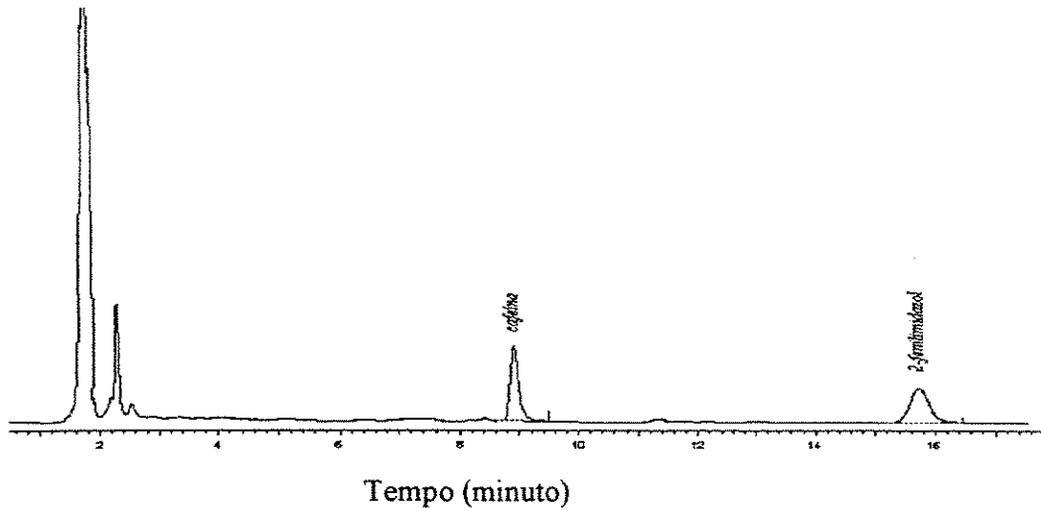


FIGURA 12: Cromatograma representativo da análise da amostra de um voluntário não tabagista.

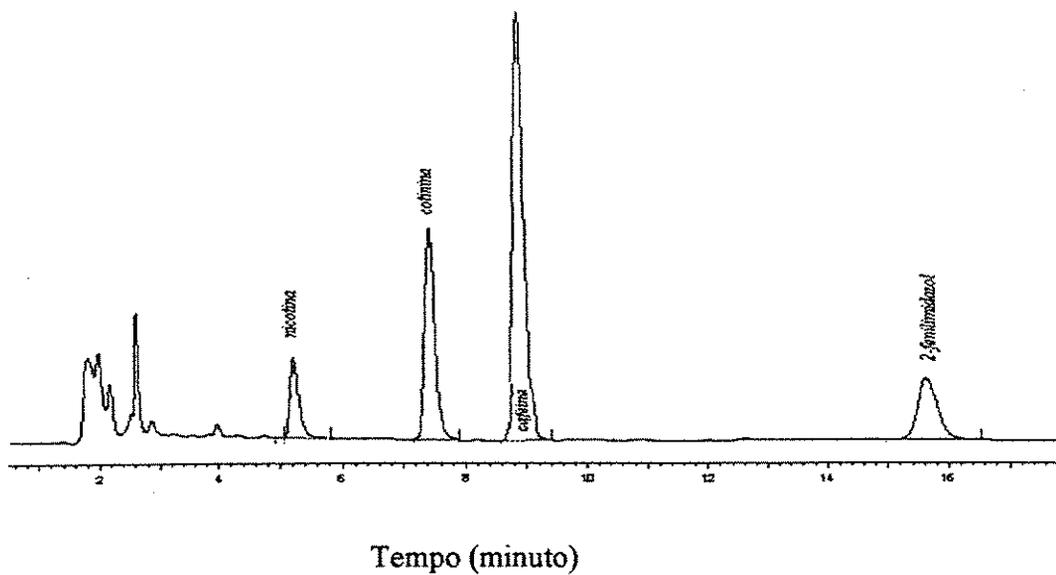


FIGURA 13: Cromatograma representativo da análise da amostra de um voluntário tabagista com adesivo transdérmico de nicotina de 21 mg submetida ao processo de extração.

## RESULTADOS

A TABELA 11 mostra os resultados da quantificação de nicotina e cotinina nos diferentes períodos de coletas dos indivíduos do grupo tabagista. Os resultados estão expressos sob a forma de média  $\pm$  DP.

TABELA 11: A tabela mostra os valores da quantificação de nicotina e cotinina na forma de média  $\pm$  DP no grupo de tabagistas com adesivo transdérmico.

Tempo (horas)	Nicotina (ng/mL)	Cotinina (ng/mL)
0	0	25 $\pm$ 35
0.5	15 $\pm$ 2	55 $\pm$ 41
1	20 $\pm$ 85	54 $\pm$ 31
3	27 $\pm$ 9	102 $\pm$ 37
5	32 $\pm$ 14	88 $\pm$ 40
7	33 $\pm$ 6	105 $\pm$ 37
9	32 $\pm$ 11	117 $\pm$ 38
11	30 $\pm$ 6	127 $\pm$ 35
18	26 $\pm$ 9	93 $\pm$ 29
24	22 $\pm$ 2	141 $\pm$ 32

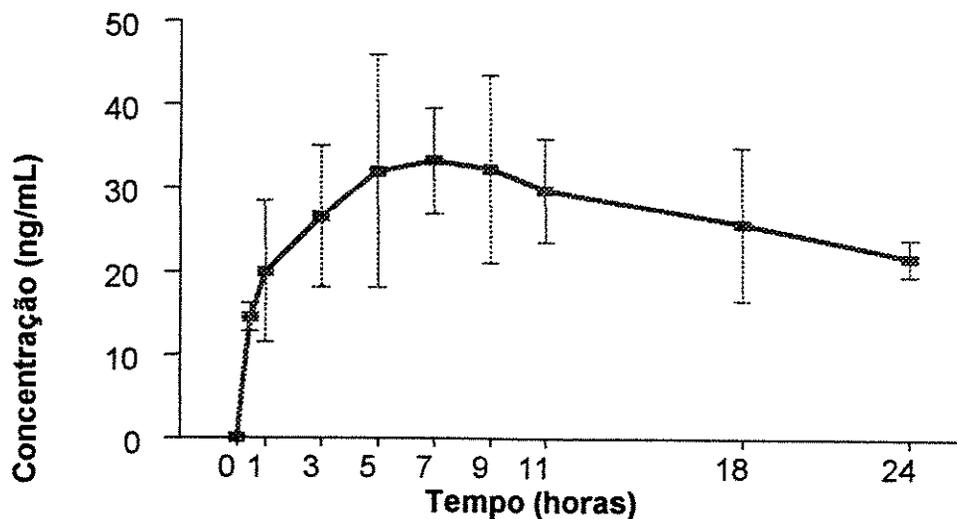


FIGURA 14: Figura representativa da curva de cinética da nicotina no período de 24 horas no grupo de tabagistas com adesivo transdérmico de nicotina de 21mg.

## RESULTADOS

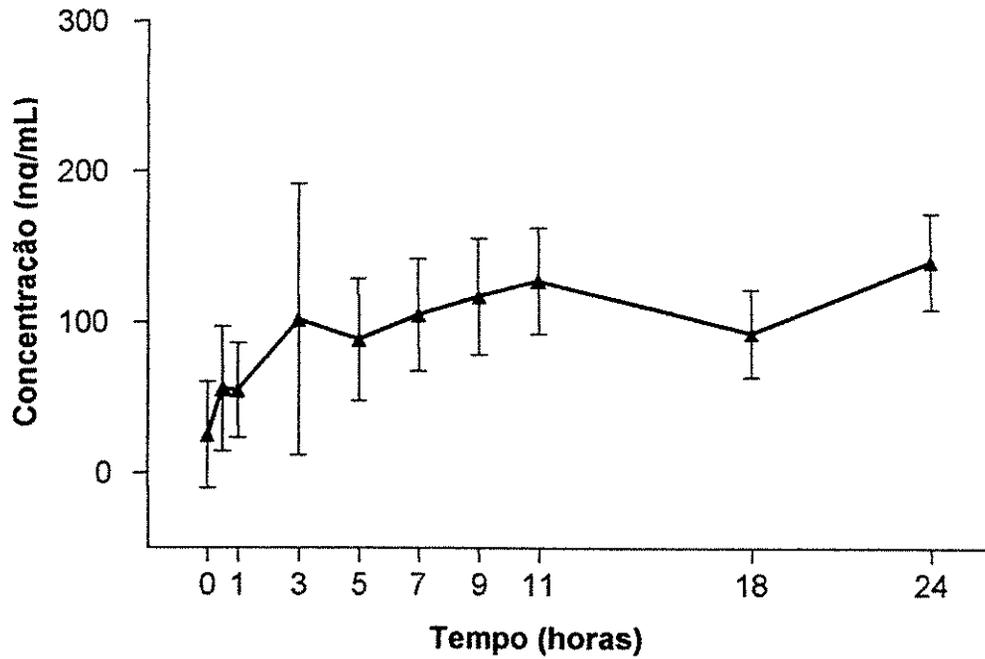


FIGURA 15: Figura representativa da curva de cinética da cotinina no período de 24 horas no grupo de tabagistas com adesivo transdérmico de nicotina de 21mg.

## **5. DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

A quantificação de uma droga inicia-se pela avaliação do melhor método de extração da matriz biológica, seja ela plasma, soro, sangue total ou qualquer outro fluido biológico. [CHAMBERLAIN, 1995]

De acordo com as características de cada fármaco, como  $pK_a$ , coeficiente de partição e estabilidade no meio de extração, é avaliada a eficiência da extração (recuperação). Esse estudo avalia a eficiência do método de tratamento da amostra [CHASIN, 1998]. A partir dos resultados obtidos, um método de maior recuperação, reprodutibilidade e de boa estabilidade, é então escolhido. [HENION, 1998]

Anteriormente ao estudo do procedimento de extração, foram verificados os limites de detecção e quantificação, a linearidade do detector e a reprodutibilidade, e a partir dos resultados foram selecionados o volume da amostra utilizada e o volume na qual a amostra seria retomada.

O principal objetivo de se utilizar a técnica cromatográfica da CLAE é de se obter suficiente retenção do analíto aumentando a seletividade e sensibilidade da análise, de modo que os resultados apresentados sejam confiáveis através da análise pela metodologia proposta.

O detector mostrou linearidade adequada para uma ampla faixa de concentração (TABELA 2) e quantificação de concentrações baixas, satisfatórias para o objetivo proposto.

O método de extração líquido-líquido (FIGURA 05) foi selecionado a partir de trabalhos descritos na literatura, com adaptações, de modo a obter-se uma técnica de extração com baixo custo e baixa complexidade e que tomasse possível a obtenção de um cromatograma com o menor número de interferentes possível. A amostra de plasma foi escolhida em função do grande número de trabalhos já descritos e da facilidade de coleta e transporte ao local de análise, além de ser muito utilizada para estudos de farmacocinética da droga.

O solvente extrator utilizado foi o diclorometano, que é considerado o mais eficiente para a extração simultânea de ambas as bases nicotina e cotinina de amostras biológicas [HARIHARAN, 1988]. Porém, assim como outros solventes halogenados produzem danos ao sistema cromatográfico, sendo por isso utilizada

a técnica da evaporação do solvente e a posterior reconstituição com fase móvel. Esse sistema de evaporação do solvente consiste em concentrar a amostra de interesse, aumentando a detectabilidade da análise. A quantidade de solvente extrator, bem como os demais procedimentos do processo de extração seguiram os publicados anteriormente por Nakajima et al., [NAKAJIMA, 2000] porém com modificações, como a realização de uma lavagem prévia com NaOH  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  à fase orgânica antes da evaporação, que permitiu a retirada de impurezas do plasma que ainda estariam presentes no solvente orgânico, prejudicando a qualidade dos cromatogramas. A agitação dessa mistura foi realizada em vórtex com agitação branda por aproximadamente 20 segundos, mas não descartou a ocorrência de emulsão em algumas amostras, que foram descartadas e posteriormente suas análises foram repetidas.

A evaporação da fase orgânica, foi feita sob nitrogênio em temperatura ambiente, pela maior facilidade e disponibilidade de equipamento no laboratório, além de evitar a possível oxidação da nicotina, cotinina e seu padrão interno.

Durante a extração do plasma, a agitação em vórtex foi descartada devido à formação de emulsão estável, assim adotou-se a agitação mecânica horizontal com velocidade mais lenta por um período mais prolongado. A centrifugação após a agitação proporcionou boa separação das fases aquosa e orgânica, permitindo que a fase aquosa fosse descartada por sucção em bomba de vácuo sem perda da fase orgânica. A adição do sulfato de sódio anidro ao tubo contendo o extrato orgânico permitiu a retirada da fase aquosa restante, e conseqüentemente a retirada dos possíveis compostos hidrossolúveis que poderiam interferir na análise, e prolongar o processo de evaporação do solvente.

A adição de HCl concentrado ao solvente orgânico impediu a evaporação da nicotina com o nitrogênio. Poucos autores citam essa perda da nicotina [NAKAJIMA, 2000] porém foi possível verificar que sem a adição do HCl conc. algumas amostras de tabagistas, bem como amostras adicionadas de nicotina apresentaram perdas, ou ainda a ausência de picos nos cromatogramas após serem submetidas ao processo de extração.

## DISCUSSÃO

Foram injetadas entre as amostras programadas igual volume de acetonitrila e de fase móvel para retirar os possíveis interferentes do plasma que poderiam ficar aderidos à coluna e interferir na coleta seguinte. O injetor foi lavado com metanol:água 50:50 v/v antes e depois de se realizar as injeções das amostras. A coluna cromatográfica e o equipamento foram lavados após as análises com solução de acetonitrila:água 10:90 v/v por 1 hora para a retirada da solução tampão, na vazão de 1 mL/minuto e 1 vez por semana foi realizado um gradiente de lavagem variando de 10:90 v/v à 90:10 v/v de acetonitrila:água.

O método apresentou boa capacidade de resolução e separação tanto entre os analitos de interesse quanto entre interferentes endógenos (presentes normalmente no plasma) e exógenos. Os picos também apresentaram valores de assimetrias aceitáveis. A cafeína um dos principais interferentes exógenos presentes no plasma de tabagistas, eluiu em tempo próximo ao da cotinina, porém sem interferir ou prejudicar a separação. A presença da cafeína nos permitiu avaliar a especificidade do método.

Os cromatogramas apresentaram-se livres de drogas que eventualmente poderiam ter sido utilizadas pelos voluntários. O tempo de corrida foi estabelecido em 18 minutos, sendo considerado um tempo relativamente curto e viável para a realização da análise.

O 2-fenilimidazol foi escolhido como padrão interno por três razões principais: 1-) a eficiência de sua extração com diclorometano a partir de amostras de plasma é similar as da nicotina e cotinina; 2-) absorve bem no ultra-violeta no comprimento de onda de 260 nm; 3-) possui tempo de retenção relativamente curto, e bem diferenciado dos compostos analisados. O padrão interno foi adicionado a cada amostra em quantidade fixa e conhecida (50 ng/mL) para auxiliar na avaliação da eficiência do método e eventual perda que poderia ocorrer durante o processo de extração, secagem ou ainda na injeção das amostras.

A detectabilidade do método foi suficiente para analisar quantitativamente a nicotina, a cotinina e a cafeína em plasma de indivíduos tabagistas com adesivo transdérmico de 21 mg de nicotina. A reprodutibilidade do tempo de retenção da nicotina ( $4,6 \pm 0,1$ ) min., da cotinina ( $6,2 \pm 0,1$ ) min. e do 2-fenilimidazol ( $15,2 \pm$

0,1) min. foi determinada a partir de 10 injeções consecutivas de padrões adicionados em plasma e extraídos.

A curva analítica foi construída com os padrões adicionados ao plasma, em concentrações que abrangeram desde o limite de quantificação ( 10 ng/mL) até 5 vezes esse valor ( 50 ng/mL) para os estudos da nicotina e até 50 vezes (500 ng/mL) para as análise de cotinina, e ambos apresentaram linearidade aceitáveis, com coeficiente de determinação superior a 0,98 [FATINGER e BENOWITZ,1997]. O método mostrou-se linear para ambos os compostos até 1000 ng/ml, porém as curvas analíticas foram feitas a partir dos valores de quantificação dos analitos até os máximos valores encontrados na literatura para nicotina e cotinina. Para a definição da curva analítica, CHASIN et al. [CHASIN et al., 1994], em revisão sobre validação de métodos cromatográficos, recomenda a utilização de no mínimo cinco pontos de concentração. A curva foi construída com cinco pontos para a nicotina devido a estreita faixa de linearidade e com sete pontos para a cotinina. As curvas analíticas foram repetidas todos os dias de análise, uma vez que foram programadas e injetadas juntamente com as amostras no período noturno, não sendo, nesse caso, o tempo de análise um fator de interferência.

As amostras dos controles de qualidade eram extraídas juntamente com as amostras dos pacientes e analisadas com as curvas analíticas, sendo consideradas aceitáveis as curvas analíticas que apresentassem variações inferiores a 20%. [CHASIN, 1994]

As análises do estudo inter-ensaio e intra-ensaio mostraram estar dentro de valores aceitáveis, ou seja apresentaram CV inferiores a 10 %. Esses valores de precisão refletem os erros aleatórios na análise, que podem produzir flutuações ocasionais nos resultados [TIBIRIÇÁ, 1994], o que se preconiza evitar ao limitar como critério CV inferior a 10%.

A análise do teste de exatidão reflete a concordância entre o valor real da substância na amostra e o estimado pelo processo analítico, e deste modo, nossos resultados mostraram que os valores de exatidão, compreendidos até 10%, indicaram a existência de uma baixa porcentagem de erros sistemáticos

que contribuem para desvios (*bias*) nos resultados. Não houve disponibilidade de amostras certificadas para o estudo de exatidão, e por isso, foram adicionados padrões de nicotina e cotinina em concentrações conhecidas ao plasma, quantificados, e os resultados comparados com os valores reais.

Nas condições padronizadas os limites de detecção (LD) foram respectivamente 5 ng/mL para a nicotina e 3 ng/mL para a cotinina. Compreende o LD a menor concentração da substância em análise que o processo analítico pode diferenciar, com confiança, dos níveis relacionados à linha de base. [HENDERSON, 1993] Concentrações inferiores puderam ser diferenciadas do ruído de base, porém não puderam ser integradas nas condições otimizadas.

Em relação ao limite de quantificação, os valores foram de 10 ng/mL para a nicotina e de 5 ng/mL para a cotinina, foram considerados confiáveis, uma vez que foram aceitos resultados que apresentassem valores de CV menores ou iguais a 10%.

O método de análise individual dos compostos resulta em técnicas mais sensíveis, ou seja, com limites de detecção e quantificação bem menores, porém exige maior volume de amostra e tempo para otimizar e validar ambas as técnicas de análise. Além disso não era viável a análise separada das amostras em função do grande número de coletas de sangue que foram realizadas durante todo o período do estudo. O aumento no volume de injeção de amostra poderia resultar em diminuição na vida útil da coluna e do equipamento. Porém dados encontrados na literatura comprovaram que os valores encontrados condizem com os valores publicados anteriormente. [MOYER, 2002]

O estudo de recuperação absoluta, onde as áreas relativas da nicotina e da cotinina adicionadas ao extrato, sem serem submetidas ao procedimento de extração, foram comparadas com as áreas relativas destes analitos obtidos de extratos adicionados que sofreram o processo de extração, apresentou resultados satisfatórios e de acordo com os encontrados na literatura. Qare-Abu e Mohamed [QARE-ABU e MOHAMED, 2001] obtiveram porcentagem de recuperação semelhantes às encontradas nesse estudo, porém como limite de quantificação muito superior, pelo fato do autor analisar seis compostos em uma única corrida

## DISCUSSÃO

cromatográfica. O trabalho de Nakajima et al. [NAKAJIMA et al., 2000], no entanto, forneceu valores de recuperação superiores aos determinados nesse estudo, e com limites de quantificação bem inferiores, porém o autor analisou os compostos separadamente, o que para o objetivo do trabalho não seria uma alternativa viável.

No estudo da interferência da matriz biológica na análise, pode ser verificado que a curva analítica não poderia ser realizada em água pelo fato de não expressar resultados exatos, uma vez que as curvas não se sobrepueram, apesar de ambas serem lineares. As curvas analíticas preparadas em água apresentam uma menor inclinação se comparadas com a curva de plasma, o que demonstra menor sensibilidade. Uma possibilidade para a maior inclinação da curva em plasma poderia ser atribuída a algum pico interferente, que estaria superestimando os valores de concentração de nicotina e cotinina, porém esta hipótese foi descartada pelo estudo de especificidade da amostra através da análise do plasma branco.

A estabilidade dos analitos foi avaliada pelo aumento da inexatidão, sendo consideradas estáveis amostras que mantivessem seus resultados com uma margem de inexatidão de até 10% após o período de armazenamento. Optou-se por verificar a estabilidade das amostras tanto armazenadas em geladeira quanto em freezer, uma vez que os padrões foram armazenados em geladeira. Porém não se encontram relatos anteriores de estocagem de amostras de plasma em geladeira para testes quantitativos de drogas, uma vez que as amostras mantidas em geladeira apresentaram-se estáveis para a nicotina e a cotinina por um período de no máximo 1 semana, ao passo que as amostras armazenadas em freezer mantiveram-se estáveis por até 3 meses, prazo suficiente para a coleta e análise das amostras.

As coletas das amostras inicialmente foram feitas através de dispositivos intravenosos, heparinizados, porém devido a dificuldade de mantê-los nos pacientes, uma vez que estes apresentavam-se muito inquietos e ansiosos pela abstinência ao tabaco, exigiu a substituição por cateter venoso do tipo Jelco, que apesar de exigir maior experiência do manipulador na aplicação e na coleta das amostras, além de causar ao paciente maior incômodo na aplicação e de

apresentar maior custo, demonstrou ser ideal para estudos onde se realizam coletas seriadas de amostras, permitindo maior liberdade e segurança aos movimentos dos voluntários.

Os exames bioquímicos dos voluntários foram feitos previamente ao início do estudo, não sendo encontrado qualquer anormalidade nos pacientes incluídos na pesquisa.

A abstinência ao tabaco durante 24 horas e durante as 24 horas com adesivo transdérmico foram garantidas pelo fato dos pacientes terem permanecido internados em uma clínica, supervisionados durante todo o experimento. Também não foi permitido aos voluntários o uso de bebidas alcoólicas, café e derivados de cafeína.

Em relação a concentração plasmática de nicotina e cotinina, foi observado que o  $t_{max}$  da nicotina em indivíduos tabagistas com adesivo transdérmico de nicotina de 21 mg ocorreu no período de 5-7 horas conforme relatado em literatura [BENOWITZ, 1999]

O trabalho de Hurt et al, [HURT et al., 1993] mostrou que os valores séricos de nicotina e cotinina em indivíduos tabagistas com adesivo transdérmico de nicotina variam de 10,5 a 50 ng/mL para nicotina e de 94 a 444 ng/mL para cotinina no primeiro dia de adesivo. Porém os níveis médios de nicotina e cotinina foram menores nos dias subseqüentes. As diferenças entre os indivíduos eram esperadas, e foram atribuídas à variabilidade farmacocinética da nicotina.

Os altos desvios padrão encontrados nas amostras dos tabagistas analisadas devem-se a uma série de fatores, dentre estes pode-se citar a não distinção dos tabagistas quanto ao número exato e marcas de cigarros consumidos diariamente, uma vez que existem diferenças na quantidade de nicotina presente nas diferentes marcas de cigarro. Além disso, o período de abstinência ao tabaco de 24 horas não foi suficiente para que ocorresse a eliminação da nicotina e de seu principal metabólito, a cotinina, armazenada no organismo dos indivíduos tabagistas, sendo, de acordo com estudos anteriores, necessários para isso o prazo de 7 a 10. dias, o que impossibilitaria a realização do estudo.

Não foram realizados cálculos de área sob a curva para a análise da curva de cinética encontrada para os indivíduos tabagistas com adesivo de nicotina, pelo fato de que os valores de nicotina e de cotinina não atingiram, ao final do período de coleta, níveis próximos aos basais.

Não foram encontrados valores quantificáveis de nicotina e cotinina nos indivíduos não tabagistas. O adesivo transdérmico não foi utilizado nesses indivíduos por apresentar sintomas de intoxicação tais como: náuseas, vômitos e dores de cabeça.

### 5.1 APLICABILIDADE DA TÉCNICA

Foram realizados a monitorização de pressão arterial e frequência cardíaca através de MAPA (SpaceLabs, USA) nos indivíduos tabagistas com adesivo de nicotina.

Estes resultados possibilitaram a avaliação comparativa entre a variação da pressão arterial e a concentração plasmática de nicotina no período de 24 horas.

O gráfico no ANEXO VI mostra que não ocorreu variação da pressão arterial e da frequência cardíaca acompanhando a variação na concentração de nicotina plasmática. O ligeiro aumento na frequência cardíaca foi atribuído à ansiedade resultante da internação, e da abstinência ao tabaco.

Esses dados comprovam os achados de Benowitz, [BENOWITZ, 2002], de que os adesivos transdérmicos de nicotina, devido a sua lenta absorção, apresentam menores fatores de riscos cardiovasculares como interferência na pressão arterial, frequência cardíaca do que quando comparados ao cigarro.

A quantificação de nicotina e cotinina pelo método apresentado permitirá a realização de estudos futuros combinando sua farmacocinética e farmacodinâmica.

## **7. CONCLUSÕES**

- 1- O método proposto mostrou ser adequado para a análise simultânea de nicotina e cotinina, com baixo limite de detecção e tempo de retenção curto, possibilitando a análise de um grande número de amostras.
- 2- O procedimento de extração permitiu a obtenção de cromatogramas praticamente sem interferentes e portanto com menor tempo de análise ( $\pm 1$  hora/ amostra).
- 3- Os indivíduos não tabagistas não apresentaram níveis detectáveis de nicotina e cotinina.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABOOD , L.G., REYNOLDS, D.T., BOOTH, H., BIDLACK, J.M. Sites and mechanisms for nicotine's action in the brain. **Neurosci Biobehav Rev**; 5:479-486, 1981.
- ABU-QARE, A. W., ABOU-DONIA, M.B. Quantification of nicotine , chlorpyrifos and their metabolites in rat plasma and urine using high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr. B**; 757: 295-300, 2001.
- BANYASZ, J.L. The Physical Chemistry of Nicotine. In: Gorrod JW, Jacob, PIII., editor. **Analytical Determination of Nicotine and related compounds and their metabolites**. Amsterdam: Elsevier, 149-190, 1999.
- BENOWITZ, N.L, JACOB, PIII. Nicotine and cotinine elimination pharmacokinetics in smokers and nonsmokers. **Clin Pharmacol Ther**; 53:316-323, 1993.
- BENOWITZ, N.L., SHARP, D.S. Inverse relation between serum cotinine concentration and blood pressure in cigarette smokers. **Circulation**; 80(5):1309-1312, 1989.
- BENOWITZ, N.L. Cigarette smoking and nicotine addiction. **Med Clin North Am**; 76:415, 1992.
- BENOWITZ, N.L. Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: implications in understanding nicotine dependence. In: Chiang CN, Hawks, R.L., editor. **Research findings on smoking of abused substances**. Washington DC: NIDA Res Monogr, 1990:12, 2002.
- BENOWITZ, N.L. Nicotine addiction. In: Spangler JG, editor. Primary Care. London: W.B. Saunders Company : 611-631, 1999.
- BENOWITZ, N.L. Nicotine renal excretion rate influences nicotine intake during cigarette smoking. **J Pharmacol Exp Ther**; 234:153, 1985.
- BENOWITZ, N.L. The role of nicotine in smoking-related cardiovascular disease. **Preventive Medicine**; 26:412-417, 1997.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- BENOWITZ, N.L.K., F., JACOB, P.III, JONES, R.T., OSMAN, A.L. Cotinine disposition and effects. **Clin Pharmacol Ther**; 34:604-611,1983.
- BENOWITZ, N.L., CHAN, K., DENARO, C.P., JACOB, P III. Stable isotope method for studying transdermal drug absorption: the nicotine patch. **Clin Pharmacol Ther**; 50:286-293, 1991.
- BENOWITZ, N.L.H., A., JACOB, P.III. Cardiovascular effects of nasal and transdermal nicotine and cigarette smoking. **Hypertension**; 39:1107-1112, 1994.
- CHAMBERLAIN, J. High-performance liquid chromatography in: **The analysis of drugs in biological fluids**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1995:139-161.
- CHAMBERLAIN, J. Special problems with biological fluids. **The analysis of drugs in biological fluids**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1995:35-66.
- CHASIN, A.A.M., CHASIN,M., SALVADOR,M. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev Farm Bioquim Univ S Paulo**; 30(2):49-53, 1994.
- CHASIN, A.A.M., NASCIMENTO, E.S., RIBEIRO-NETO, L.M., et al. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev Bras de Toxicol**; 11(2):1-6, 1998.
- Clinical and pharmacokinetic properties of a transdermal nicotine patch. **Clin Pharmacol Ther**;47:331-337, 1990.
- CRC Handbook of chemistry and physics**. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- CROOKS, P.A, BYRD, G.D. Use of high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric (LC-MS) techniques for the determination of nicotine and its metabolites. In: Gorrod JW, Jacob, P.III., editor. **Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites**. Amsterdam: Elsevier, 1999:772.
- CROOKS, P.A, DWOSKIN, L.P. **Biochem Pharmacol**; 54:743, 1997

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- CURVALL, M., KAZEMI-VALA, E., ENZELL, C.R. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma using capillary column gas chromatography with nitrogen-sensitive detection. **J Chromatography**; 232:283-293,1982.
- DASH, A.K. , WONG, S.T. Liquid chromatographic method for the determination of nicotine in pharmaceutical formulations. **J Chromatography A**; 749:81-85, 1996.
- DOMINO, E.F. Pharmacological significance of nicotine. In: Gorrod JW, Jacob, PIII., editor. **Analytical Determination of Nicotine and related compounds and their metabolites**. Amsterdam: Elsevier: 772,1999.
- DUBOIS, J.P., SIOUTI, A., MULLER, P., MAULI, D., IMHOF, P.R. Pharmacokinetics and bioavailability of nicotine in health volunteers following single and repeated administration of different doses of transdermal nicotine systems. **Meth Find Exp Clin Pharmacol.**; 11: 187-195, 1989.
- FATTINGER K. V, D. BENOWITZ, N.L. Pharmacodynamics of acute tolerance to multiple nicotinic effects in humans. **J Pharmacol Exp Ther**; 281:1238, 1997.
- FEYERABEND CR, M. A. H. A rapid gas-liquid chromatographic method for the determination of cotinine and nicotine in biological fluids. **J Pharm Pharmacol**; 42:450-452,1990.
- FEYERABEND CR, M. A. H. Assay of nicotine in biological materials: sources of contamination and their elimination. **J Pharm Pharmacol**; 32:178-181,1979.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry, bioanalytical methods validation for human studies,1998. Disponível em [www.fda.gov/cder/guidance/1221\\_dft.pdf](http://www.fda.gov/cder/guidance/1221_dft.pdf). Acesso em 18 dez. 2002.
- GIDDING, S.S., MORGAN, W., PERRY, C., ISABEL-JONES, J. B., BRICKER, J.T. Active and passive tobacco exposure: a serious pediatric health problem. A statement from Committee on Atherosclerosis and Hypertension in Children, Council, on Cardiovascular Disease in the young, American Heart Association. **Circulation**; 90:2581-2590, 1994.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GOODMAN, J. **Tobacco in history: the cultures of dependence**. London: Routledge, 1993.
- GOURLAY, S.G., BENOWITZ, N.L. Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray, and intravenous nicotine. **Clin Pharmacol Ther**; 62:453,1997.
- GRAY, R., RAJAN, A. S., RADCLIFFE, K. A., et al. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. **Nature**; 383:713, 1996.
- HARIHARAN, M., VANNOORD, T., GREDEEN, J.F., A high performance liquid chromatographic method for routine simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma. **Clin Chem**.; 34/4: 724-729, 1988.
- HENDERSON, A.R., Chemistry with confidence: should clinical chemistry require confidence intervals for analytical and other data ?. **Clin Chem**, 39: 929-935, 1993.
- HENION, J.B., E. RULE, G., Sample preparation for LC/MS/MS: analysing biological and environmental samples. **Anal Chem**., 70: 650A-656A, 1998.
- HURT, R.D., DALE, L.C., OFFORD, K. P., et al. Serum nicotine and cotinine levels during nicotine-patch therapy. **Clinical pharmacology & therapeutics**; 54(1):98-106, 1993.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER/ FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS. A economia do tabaco no Brasil: análise e proposta para a redução do consumo. Rio de Janeiro, 1996.
- JACOB, P., BENOWITZ, N.L. Recent studies of nicotine metabolism in humans. **Pharmacol Biochem Behav**; 30:249-253,1988.
- JACOB, P., SHULGIN, A.T., YU, L. BENOWITZ, N.L. Determination of the nicotine metabolite trans-3-hidroxicotinine in urine of smokers using gas chromatography with nitrogen-selective detection or selected ion monitoring. **J Chromatography**; 583:145-154,1992.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JAMES, H., YOUSEF, T., TAYLOR, R. Rapid method for the simultaneous measurement of nicotine and cotinine in urine and serum by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatography B**; 708:87-93, 1998
- Keenan, R.M, HATSUMAKI, D.K., PAUL,R.P., TIMOTHY, N. ,THOMPSON, MICHAEL, S. GRILLO. Pharmacodynamic effects of cotinine in abstinent cigarette smokers. **Clin Pharmacol Ther**; 1994(55):581-590, 1994.
- KYEREMATEN, G.A, VESELL, E.S. Metabolism of nicotine. **Drug Metab Rev**; 23:3-41,1991.
- KYEREMATEN, G.A., TAYLOR, L.H. Radiometric-high performance liquid chromatographic assay for nicotine and twelve of its metabolites. **J Chromatogr**; 419:191-201, 1987.
- LAWSON, G.M., HURT, R.D., DALE, L.C.,et al., Application of urine and cotinine excretion rates to assessment of nicotine replacement in light, moderate and heavy smokers undergoing transdermal therapy. **J Clin Pharmacol**, 38: 510-516,1998.
- LEHOUEZEC, J., HALLIDAY, R., BENOWITZ, N.L., et al. Basic and clinical psychopharmacology of nicotine. **Clinics in Chest Medicine**;12:681,1991.
- LIMA IV, MÍDIO, A.F. Validação de um método cromatográfico em fase gasosa-head space para determinação de álcool etílico em fluidos biológicos de interesse forense. **Rev Bras de Toxicol.**; 10(2):21-21,1997.
- MACHACEK, D.A., JIANG, N. S. Quantification of cotinine in plasma and saliva by liquid chromatography. **Clin Chem**; 32(6):979-982,1986.
- McGEHEE, D.S., HEATH, M.J.S., GELBER,S., et al. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in: CNS by presynaptic receptors. **Science**; 269:1692, 1995.
- McGEHEE, D.S., ROLE, L.W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. **Annu Ver Physiol**; 57:521, 1995.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Measurement in the analysis and treatment of smoking behavior. In: GRABOWSKI; J. B., C.S., editor. Drug abuse research. Rockville: US Department of Health and Human Services, 1983.
- MERKLE, H.P. Transdermal delivery systems. **Meth and find exp clin pharmacol**; 11(3):135-153,1989.
- MINAMI, J.I., T., MATSUOKA, H. Effects of smoking cessation on blood pressure and heart rate variability in habitual smokers. **Hypertension**; 33(2):586-590,1999.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação nacional de controle de tabagismo e prevenção primária, 2000. Disponível em [www.portal.saude.gov.br/tabagismo](http://www.portal.saude.gov.br/tabagismo). Acesso em 20 jan. 2003.
- MOYER, T.P., CHARLSON, J.R., et al, Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass sepectrometry, with clinically relevant metabolic profiles. **Clin Chem**, 48(9): 1460-1471, 2002.
- NAGASHIMA, M. YAMAMOTO, T., NUNOYA, K.I., et al. Characterization of CYP2A6 involved in 3'hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. **J Pharmacol Exp Ther**; 77:1010-1015,1996.
- NAKAJIMA, M., YAMAMOTO, T., KUROIWA, Y., TSUYOUSHI, Y. Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography. **J Chromatography B**; 742:211-215, 2000.
- NYSTRO, M. L., PETTERSSON, M., RANGEMARK, C. Simple and sensitive method for determination of nicotine in plasma by gas chromatography. **J Chromatography B**; 701:124-128,1997.
- 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. **J Chromatography B**; 708: 95-101,1998.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- OKUYEMI KS, AHLUWALIA, J.S., WADLAND, W.C. The evaluation and treatment of tobacco use disorder. **The journal of the family**; 50(11), 2001.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em WWW.OPAS.ORG.BR/TABACO.HTML. Acesso em 12 jan 2003.
- PERKINS, L.S., LIVESEY, J.F., ESCARES,E.A., BELCHER, J.M., DUDLEY, D.K. High-performance liquid chromatographic method compared with a modified radioimmunoassay of cotinine in plasma. **Clin Chem**; 37(11):1989-1993, 1993.
- PICHINI, S, ALTIERI, I., PACIFICI, R., ROSA, M., ZUCCARO, P. Elimination of caffeine interference in high-performance liquid chromatographic determination of cotinine in human plasma. **J Chromatography**; 568:267-269, 1991.
- PINNER, A. Die constitution des alkaloids. **Chemische Berichte**; 26: 292-305, 1893.
- PONTIERI, F.E., TANDA, G., ORZI, F., et al. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. **Nature**; 382:255, 1996.
- QARE-ABU AW, MOHAMED, B. Quantification of nicotine, chorphyrifos and their metabolites in rat plasma and urine using high-performance liquid chromatography. **J Chromatography B**; 757:295-300, 2001.
- SLADE J. The tobacco epidemic: lessons from history. **J Psychoactive Drugs**, 312(2):99-109,1992
- TAYLOR, A.E., JOHNSON, D.C., KAZEMI, H. Enviromental tobacco smoke and cardiovascular disease: a position paper from the Council on Cardiopulmonary and Critical Care, American Association. **Circulation**; 86:699-702,1992.
- THE MERCK INDEX.** 12 ed. New Jersey: Merck, 1996.
- TIBIRIÇÁ, A.M., Erros e fontes de erros em análises químicas. **Rev Bras de Saúde Ocup.**; 22(81): 51-55,1994.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

TUOMI, T., JOHNSON, T., REIJULA, K. Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine and caffeine in urine of passive smokers by HPLC-tandem mass spectrometry. **Clin Chem**; 45(12):2164-2172, 1999.

## **9. ANEXOS**



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111  
13083-970 Campinas-S.P.  
☎ 0 \_\_ 19 7888936  
fax 0 \_\_ 19 7888925  
✉ [cep@head.fcm.unicamp.br](mailto:cep@head.fcm.unicamp.br)

CEP, 27/09/00

PARECER PROJETO: Nº 233/2.000

-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CORRELAÇÃO FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA DA NICOTINA NA PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EM HUMANOS."

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Heitor Moreno Júnior

INSTITUIÇÃO: Departamento de Farmacologia/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP : 12/07/2.000

I - OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da nicotina sobre a pressão arterial sistêmica (PAS) em abagistas e não tabagistas. Correlacionar os níveis plasmáticos de nicotina e cotinina por cromatografia líquida de alta performance (farmacocinética) com o ritmo circadiano da PA nos grupos experimentais.

I - SUMÁRIO

Serão estudados 28 indivíduos voluntários, de ambos os sexos, com idade entre 8 e 65 anos, divididos em dois grupos sendo cada grupo composto de 2 subgrupos com 7 indivíduos cada. Grupo 1- controle-indivíduos saudáveis, não tabagistas tratados com adesivo transdérmico de nicotina e adesivo placebo de nicotina. Grupo 2- indivíduos abagistas pesados que façam uso de mais de 20 cigarros por dia por mais de 10 anos, sem evidências clínicas de doença cardíaca hipertensiva e/ou diabetes com adesivo transdérmico de nicotina e adesivo placebo de nicotina. Cada estudo tem duração de 3 dias. No primeiro dia o fumante deverá abster-se de fumar e serão feitas coletas seriadas de sangue. No segundo dia receberão os adesivos de nicotina e de placebo e serão feitas novas coletas seriadas de sangue e no terceiro dia será feita a retirada do adesivo. A pressão arterial será monitorizada durante todo o período do experimento. No total serão colhidos 80 ml de sangue.

## V - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

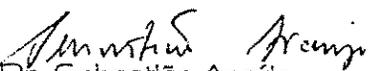
O projeto está bem estruturado. Estão claros os critérios de inclusão e exclusão. A relação risco/benefício está bem colocada, sendo esta positiva. Todo o procedimento está bem claro no termo de Consentimento, favorecendo uma decisão consciente do voluntário. Recomendamos a aprovação do projeto.

## VI - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

## VII - DATA DA REUNIÃO

A ser homologado na IX Reunião Ordinária do CEP, em 17 de outubro de 2000

  
Prof. Dr. Sebastião Araújo  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

**Padronização de método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de nicotina e cotinina em plasma de tabagistas**

**CARTA DOS DIREITOS DO VOLUNTÁRIO EM PESQUISA MÉDICA**

Os indivíduos que participam em pesquisa médica adquirem certos direitos.

Estes direitos incluem:

a) Informações e explicações a respeito:

- Dos procedimentos, aparelhos e drogas a serem utilizados;
- Da natureza e proposta da pesquisa;
- De possíveis desconfortos e riscos que possam possivelmente ocorrer ou estarem sujeitos;
- De possíveis benefícios advindos da pesquisa;
- Outras alternativas de tratamento que possam lhes ser vantajosas;
- Da evolução da pesquisa e dos resultados referentes a si próprio;

b) Encaminhamento a tratamento médico caso complicações ocorram;

c) Fazer questões a respeito dos experimentos ou procedimentos envolvidos;

d) Ser instruído de que o consentimento para participar do estudo pode ser retirado a qualquer momento, inclusive sem justificativas, sem prejuízo do tratamento/seguinto do voluntário por parte da instituição de saúde.

e) Receber uma cópia deste consentimento datada e assinada pelo pesquisador responsável ou seus auxiliares autorizados para tal;

f) Consentir ou não em participar do estudo sem qualquer coerção ou outro tipo de influência por parte de elementos envolvidos na pesquisa;

---

Assinatura do voluntário

---

Data

---

Assinatura do investigador ou testemunha

---

**Padronização de método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de nicotina e cotinina em plasma de tabagistas**

*CONSENTIMENTO INFORMADO*

Você está convidado a participar de um estudo para quantificar a nicotina presente no sangue após a cessação do fumo e após aplicação de um adesivo de nicotina na pele.

Nós estudaremos a presença desta substância nos sangue de pacientes tabagistas e não tabagistas. Se você decidir participar do estudo, o Dr. Heitor Moreno Jr ou outros médicos da equipe descreverão detalhadamente o estudo a você.

Cada estudo dura 3 dias. É feito com a coleta de amostras de sangue (20 ml cada; total por estudo=360 ml) durante o estudo. A pressão arterial será monitorada durante todo o período de experimento através de uma aparelho denominado MAPA, que consiste de um manguito com um sistema portátil que grava as medidas de PA realizadas em intervalos de 15 minutos durante o dia e 30 minutos durante a noite.

NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTE ESTUDO.

A SUA ASSINATURA EM CADA PÁGINA DESTE DOCUMENTO SIGNIFICA QUE: VOCÊ LEU E ENTENDEU AS INFORMAÇÕES ACIMA; VOCÊ DISCUTIU O ESTUDO COM O INVESTIGADOR PRINCIPAL E/OU SUA EQUIPE; VOCÊ DECIDIU PARTICIPAR DO ESTUDO COM BASE NAS INFORMAÇÕES FORNECIDAS; (UMA CÓPIA DESTE CONSENTIMENTO FOI DADA A VOCÊ).

---

Assinatura do voluntário

Data \_\_\_\_\_

---

Assinatura do investigador  
ou testemunha

---

### ANEXO III

---

Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade, entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade dos voluntários envolvidos nela.

Você receberá ao término de cada dia de estudo a quantia de R\$ 30.00 (trinta reais) . Para estudos adicionais, se necessários, você também receberá a quantia de R\$ 30.00 (trinta reais) por dia de estudo.

Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Dr. Heitor Moreno Júnior (telefone 3788 9540, residencial 3206 0442), do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP; teremos satisfação em esclarecê-la. O telefone da Comissão de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP é 3289 8656.

Todos os tipos de tratamento ou diagnóstico médico, experimental ou não, envolvem algum risco de prejuízo à saúde. O estudo será realizado no Instituto de Cardiologia de Rio Preto, portanto com os recursos disponíveis para atendimento de possíveis emergências. Apesar de todas as precauções, complicações podem ocorrer decorrentes de sua participação no estudo. Neste caso, você será encaminhado para assistência médica.

A SUA ASSINATURA EM CADA PÁGINA DESTE DOCUMENTO SIGNIFICA QUE: VOCÊ LEU E ENTENDEU AS INFORMAÇÕES ACIMA; VOCÊ DISCUTIU O ESTUDO COM O INVESTIGADOR PRINCIPAL E/OU SUA EQUIPE; VOCÊ DECIDIU PARTICIPAR DO ESTUDO COM BASE NAS INFORMAÇÕES FORNECIDAS; (UMA CÓPIA DESTE CONSENTIMENTO FOI DADA A VOCÊ).

---

Assinatura do voluntário

Data

---

Assinatura do investigador ou testemunha

---

**Ficha cadastral do pacientes**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

1.Nome: \_\_\_\_\_

2.Idade: \_\_\_\_\_ 3.Sexo: \_\_\_\_\_ 4.Raça: \_\_\_\_\_

5.Peso: \_\_\_\_\_ kg 6.Altura: \_\_\_\_\_ cm 7.IMC: \_\_\_\_\_ kg/m<sup>2</sup>

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Fone: ( \_\_\_\_ ) \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

8.Escolaridade:

(a) primário (b) 1oGrau (c) 2oGrau (d) 3oGrau (e) Pós-graduação

9.É hipertenso(a)? (a) sim (b) não

10.Faz uso de bebida alcoólica regularmente? (a) não (b) sim

10a. Que tipo?

(a) destilada (pinga, uísque) (b) fermentada( cerveja) (c) vinho (d) conhaque

10b. Regularidade?

(a) todo dia (b) 5x /semana (c) 4x/sem (d) 3x/sem (e) fim de semana

10c. Quantidade? \_\_\_\_\_

11.Fuma? \_\_\_\_\_

12.Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos \_\_\_\_\_ meses

13. Quantidade diária de cigarros \_\_\_\_\_

14.Qual teor de nicotina tem o seu cigarro? (a) alto (b) médio (c) baixo

15.Qual a marca do seu cigarro? \_\_\_\_\_

16 Tem familiares fumantes no convívio diário (more na mesma casa)?

(a) sim (b) não

17.Quantos cigarros fumou nas últimas 24 horas? \_\_\_\_\_ cigarros

18. É Diabético? (a) sim (b) não

## ANEXO IV

19 Está tomando algum remédio ?(a) sim (b) não Se sim, quais?  
\_\_\_\_\_ dose \_\_\_\_\_ mg \_\_\_\_\_ cps/dia

20. Faz algum tipo de atividade física REGULARMENTE, como caminhadas, hidroginástica ou outras ( pelo menos 30 minutos por dia):

(a) sim (b) não CITE, qual : \_\_\_\_\_

21. Quantas vezes por semana?

- (a) 1 vez por semana (d) 4 vezes por semana  
(b) 2 vezes por semana (e) 5 vezes ou mais por semana  
(c) 3 vezes por semana

22. Já ficou internado(a)? Cite: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Cite: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Cite: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Já fez alguma cirurgia? Cite: \_\_\_\_\_

23. Tem algum problema de saúde? Cite \_\_\_\_\_

Tabela das características clínicas dos voluntários estudados

	<b>Controle</b>	<b>Tabagista Placebo</b>	<b>Tabagista Nicotina</b>
<b>Idade (anos)</b>	31,0±10,0	41,0 ± 8,4	43,0± 9,5
<b>Peso (Kg)</b>	63,5±13,9	59,7± 9,2	61,8± 8,2
<b>Altura (cm)</b>	170,2± 6,0	164,2± 8,1	164,3± 8,7
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	21,6± 3,6	22,2± 3,7	22,9± 3,0
<b>PAS (mmHg)</b>	116,6±11,6	137,0±30,7	137,6± 7,6
<b>PAD (mmHg)</b>	73,4±11,3	82,8±20,5	85,1±15,8
<b>FC (bpm)</b>	56,8±12,1	62,2± 5,3	62,4± 4,2
<b>Tabagismo (cigarros/dia)</b>	0	27,0± 8,3	24,4± 7,2
<b>N<sup>o</sup> voluntários</b>	9	9	9
	5H,4M	4H,5M	4H,5M

Os valores são expressos em média ± DP

Comparação da variação da PAM e da FC em relação a variação da concentração de nicotina em plasma de tabagistas com adesivo transdérmico de 21mg, no período de 24 horas.

