

Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição

Evaluation of experimental tobacco exposure using cotinine and carboxyhemoglobin as exposure markers

Paulo Roberto Bezerra de Mello¹, Thelma Suely Okay²,
Eliana Freire Gaspar de Carvalho Dores³, Clovis Botelho⁴

Pulmão RJ 2005; 14(3): 228-236

RESUMO

Introdução: a dosagem da cotinina e da percentagem de carboxiemoglobina no sangue são utilizados como marcadores de exposição tabágica. O objetivo deste trabalho é quantificar a intensidade da exposição tabágica passiva em ratos, determinando a cotinina e a carboxiemoglobina em sangue animal. **Metodologia:** ratas virgens, divididas em grupos, foram expostas a fumaça de cigarro segundo o sistema de exposição descrito por Le Mesurier et al. (1981) e modificado por Silva et al. (1997), variando a quantidade de cigarros e o número de dias de exposição. A cotinina plasmática e a carboxiemoglobina foram determinadas pela técnica adaptada de Feyerabend et al. (1986) e pela técnica de Beutler e West (1984) respectivamente. **Resultados:** resultados mostram associação, através do coeficiente de correlação de Spearman, entre número de cigarros e níveis de cotinina e carboxiemoglobina, respectivamente 0,91 e 0,53 ($p < 0,05$) para exposição única, e 0,89 e 0,75 ($p < 0,05$) para exposição prolongada. Quando se variou o tempo, a intensidade de exposição constante, observou-se que apenas a cotinina, ao contrário da carboxiemoglobina, se correlacionou com o número de dias de exposição ($r_s = 0,696$; $p < 0,05$). **Conclusões:** para o modelo de exposição utilizado, a medida de carboxiemoglobina apresentou coeficientes de correlação maiores com a intensidade da exposição que a determinação de cotinina, e apenas a cotinina se correlacionou com o tempo da exposição.

Descritores: tabagismo, modelo experimental, cotinina, carboxiemoglobina, rato.

ABSTRACT

Introduction: cotinine and carboxyhemoglobin in blood are used as tobacco exposure markers. The objective of this paper is to correlate the intensity of tobacco exposure with cotinine and carboxyhemoglobin levels in experimental animals. **Methodology:** virgin rats, divided in groups, were exposed to tobacco smoke increasing intensity (number of cigarettes) and frequency (number of days), using an exposure model described by Le Mesurier et al. (1981) and modified by Silva et al. (1997). Plasma cotinine was determined as described by Feyerabend et al. (1986) adapted; for blood carboxyhemoglobin Beutler and West (1984) method was adapted for rat blood. **Results:** Spearman's correlation coefficient for number of cigarettes x cotinine and carboxyhemoglobin were 0.91 and 0.53 for single exposure and 0.89 and 0.75 for multiple exposures, respectively ($p < 0.05$). Time in days, at constant exposure, correlated with cotinine ($r_s = 0.696$; $p < 0.05$) but not with carboxyhemoglobin. **Conclusion:** for the exposure model used, carboxyhemoglobin showed better correlation than cotinine with intensity of exposure and only cotinine correlated with time of exposure.

Keywords: tobacco, experimental model, cotinine, carboxyhemoglobin, rat.

Introdução

A fumaça do cigarro é um aerossol complexo, produzido pela destilação e combustão dos componentes do tabaco e no qual foram identificadas cerca de cinco mil substâncias químicas^{1,2}. Aproximadamente 10% dessa fumaça é constituída pela fase particulada, composta principalmente de alcatrão, água e nicotina e os 90% restantes constituem a fase gasosa, que contém monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio e cianetos³⁻⁶.

A quantidade de nicotina absorvida pelos tabagistas depende de inúmeros fatores tais como características do cigarro, taxa de consumo e hábito de cada indivíduo (frequência de tragos, profundidade de inalação e duração). No entanto, os tabagistas são capazes de controlar a nicotemia com bastante precisão, de acordo com os efeitos psico-farmacológicos desejados^{3,7,8}.

A fumaça do cigarro liberada no meio ambiente é constituída por dois componentes: fumaça central ou principal, e fumaça periférica ou lateral. A fumaça central é gerada quando o fumante traga o cigarro, é produzida em altas temperaturas (acima de 950°C), e polui o ambiente após ter sido aspirada através do cigarro, entrado em contato com os pulmões e, em seguida, exalada^{9,10}. Constitui a fonte predominante de exposição dos indivíduos fumantes ativos.

A fumaça periférica é produzida em temperaturas mais baixas (cerca de 350°C), durante a queima lenta do cigarro que ocorre entre as tragadas. Oitenta e cinco por cento da fumaça de cigarro presente no ambiente é resultante da fumaça periférica produzida a partir da queima espontânea da extremidade do cigarro. Este componente difere da fumaça central inalada pelo tabagista ativo pelo fato de não ser filtrada e a despeito de diferenças quantitativas, a composição química da fumaça lateral é similar à da fumaça principal^{9,11,12}. A fumaça lateral apresenta concentrações de alcatrão, nicotina, monóxido de carbono, dióxido de carbono, benzopireno, e substâncias cancerígenas duas a dez vezes mais elevadas que a fumaça central, muito embora o fumante passivo inale uma concentração menor destas substâncias devido à diluição que ocorre

no ar ambiente^{13,14}. A fumaça periférica é a fonte de exposição de todos aqueles que inalam a fumaça presente no meio ambiente, os chamados fumantes passivos.

Os marcadores de exposição ao tabagismo permitem uma avaliação objetiva do grau de tabagismo e uma estimativa da quantidade inalada de fumaça de cigarro¹⁵. Os marcadores mais utilizados são: percentual de carboxiemoglobina no sangue, monóxido de carbono no ar expirado, as medidas das concentrações de tiocianato, nicotina e cotinina no plasma, saliva e urina¹⁶. A nicotina apresenta meia-vida curta (cerca de 1 a 2 horas), o que dificulta a detecção desta substância nos fluidos corporais para diagnóstico e quantificação da exposição tabágica, tanto ativa quanto passiva¹⁷.

A carboxiemoglobina é um marcador da fase gasosa do cigarro e também sofre influência dietética e da presença de monóxido de carbono no ambiente¹⁸, o que pode comprometer sua confiabilidade como marcador do tabagismo.

Por ser mais polar e menos lipofílica que a nicotina, a cotinina apresenta volume de distribuição relativamente restrito em comparação à nicotina¹⁹. Devido a baixa taxa de metabolismo e excreção renal, sua meia-vida na circulação é 10 vezes mais longa - 19 a 40 horas, (comparado com 30 a 110 minutos da nicotina) e sua concentração é relativamente estável durante todo o dia de um tabagista¹⁹⁻²¹.

Assim, por estar presente no sangue em maior concentração e por mais tempo que a nicotina²², e ainda, por ser específica para a exposição ao tabaco¹⁹, e possuir distribuição nos fluidos corporais mais restrita, a cotinina tem sido o marcador mais utilizado para avaliar o consumo de tabaco, bem como para controle de sua abstinência.

Modelos experimentais são particularmente úteis em toxicologia para o estudo de aspectos que não podem ser investigados de maneira adequada em seres humanos. Muito embora existam limitações metodológicas na toxicologia experimental, ela permite a estimativa do impacto que a exposição passiva ao tabaco causaria na saúde humana²³.

1. Professor Doutor do Departamento de Pediatria da FCM/UFMT.

2. Professora Doutora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP/SP.

3. Professora Doutora do Departamento de Química/ICET da UFMT.

4. Professor Doutor Titular do Departamento de Clínica Médica/FCM e do Instituto de Saúde Coletiva da UFMT.

Trabalho realizado na Faculdade de Ciências Médicas/UFMT (Experimentos), no Laboratório de Análise de Biocidas do Departamento de Química/UFMT (dosagem da cotinina) e no Laboratório Toxicon – São Paulo (dosagem da carboxiemoglobina) e no Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

Endereço para correspondência: Clovis Botelho. Rua Dr. Jonas Correa da Costa, 210, 78030-510 Cuiabá - MT. Fone/Fax: (65) 3637-1471. E-mail: fbotelho@terra.com.br

Artigo recebido para publicação no dia 28/08/2005 e aceito no dia 25/09/2005, após revisão.

Estudos em ratos de laboratório permitem analisar os efeitos nocivos do tabaco em períodos de tempo mais curtos, com custo reduzido. Além disso, os efeitos tóxicos da fumaça do tabaco sobre os animais podem ser amenizados, realizando-se adaptação gradativa dos animais às exposições de intensidade crescente, modificando-se o método de exposição, e ainda, adequando-se o tipo de animal ao objetivo do estudo²⁴.

Dentre os vários métodos que foram desenvolvidos para estudos em modelo animal dos efeitos do tabaco nas últimas décadas²⁵⁻²⁹, destacam-se aqueles que administram nicotina ao animal, e os métodos de exposição à fumaça do tabaco. Aparatos disponíveis para exposição à fumaça principal de cigarros foram devidamente testados quanto à eficiência e reprodutibilidade. Estas “máquinas de fumar” procuram mimetizar o ato humano de fumar e permitem o controle de algumas variáveis: tempo, duração, frequência, composição da mistura administrada (ar e fumaça dos cigarros), além dos intervalos entre os “puffs” de fumaça do tabaco³⁰.

Sistemas de exposição à fumaça lateral do cigarro, que mimetizam uma exposição passiva ao tabaco, utilizam câmaras de metragem cúbica definida, e o corpo do animal é exposto totalmente. A exposição é controlada por indicadores, como a contagem de material particulado, medida por meio de monitores óticos de dispersão de partículas, e pela mensuração do monóxido de carbono e nicotina no ar inalado analisados separadamente ou em conjunto^{31,32}.

Estudos experimentais têm sido realizados, em nosso meio, com sistemas simplificados de exposição passiva à fumaça do cigarro baseados no descrito por Le Mesurier et al.³³, modificado por Cendon Filha³⁴ e Silva et al.³⁵. No entanto, resta ainda testar esse modelo de exposição à fumaça lateral de cigarros em ratos, com a avaliação da exposição às fases gasosa e particulada do cigarro, procurando correlacionar a intensidade e a frequência da exposição tabágica passiva às concentrações dos marcadores de exposição, a saber, cotinina (fase particulada), e carboxiemoglobina (fase gasosa) com posterior aplicação do modelo em estudos específicos.

Metodologia

Este estudo está inserido em projeto de pesquisa de avaliação dos efeitos da exposição à fumaça lateral do tabaco desenvolvido em ratas, na qual parâmetros associados à nutrição, ao crescimento intra-uterino e à lactação foram analisados³⁶.

O modelo foi testado em ratas virgens submetidas a variações na frequência e intensidade da exposição

ao tabaco, utilizando-se como marcadores de exposição a carboxiemoglobina (fase gasosa) e a cotinina (fase particulada). Foram estudadas ratas virgens de quatro meses de idade (*Ratus Norvegicus*) da cepa Wistar fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso, e mantidas no Biotério do Laboratório de Investigação da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT, em temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade de 40 a 60% e ciclo de luz controlado (12 horas de claridade e 12 horas de escuridão). Os animais foram pesados à admissão e numerados por perfuração do pavilhão auricular. Foram aceitos animais com peso entre 230 e 260 gramas (balança analítica marca Marte A 500, com capacidade de 500 gramas, e variação de 0,01 g), alimentados com ração NUVILAB (NUVITAL, Curitiba, PR) e água *ad libitum*.

Para exposição dos animais foram utilizados cigarros da marca Marlboro (Phillip Moris), embalagem vermelha com 20 unidades, cada cigarro contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono (o rótulo do produto indica que estes valores foram aferidos, por amostragem, no Laboratório Labstat do Canadá).

O sistema de exposição utilizado foi baseado no descrito por Le Mesurier et al.³³ e Cendon Filha³⁴ modificado por Silva et al.³⁵, e consiste de caixa retangular de madeira revestida de fórmica, medindo 94,5 cm de largura, 36,2 cm de altura e 27,5 cm de profundidade, dividida em 2 compartimentos com portas individualizadas feitas em vidro: compartimento de combustão medindo 42 cm de largura e compartimento de inalação medindo 52,5 cm de largura, separados entre si por uma divisória na qual existem 4 orifícios centrais com 1,5cm de diâmetro cada um (Figura 1).



Figura 1- Sistemas utilizados para exposição dos animais ao ar comprimido (sistema inferior) e a fumaça do tabaco (sistema superior), constando de cilindro de ar comprimido, compartimento de combustão, parede fenestrada, compartimento de inalação e via de exaustão.

O compartimento de combustão dos cigarros contém em sua parede lateral externa uma abertura circular de dois centímetros de diâmetro na qual foi conectada uma mangueira ligada a um cilindro de ar comprimido. O fluxo de ar comprimido utilizado foi de 10 litros por minuto durante a queima dos cigarros, de forma a permitir tanto a combustão dos mesmos, quanto a condução da fumaça para o outro compartimento. Na parede lateral interna havia uma peça de madeira com cinco orifícios. Estes orifícios serviram para que os cigarros fossem imobilizados em posição vertical para sofrerem combustão.

O compartimento de inalação dispunha de abertura lateral de três centímetros de diâmetro, conectada a uma mangueira destinada à exaustão do conteúdo da câmara para o exterior (ar ambiente). Os animais eram trazidos do biotério anexo à sala de exposição, acomodados em pequenas gaiolas metálicas com três compartimentos cada, o que permitia a exposição de até três animais por gaiola, que eram colocadas diretamente dentro da câmara de inalação.

Os compartimentos de combustão e inalação possuíam portas individuais com janela de vidro transparente para permitir a visualização dos animais durante a exposição e durante a combustão dos cigarros. Estas portas fechavam-se sobre fitas de espuma de borracha densa para permitir a vedação do sistema.

Para a avaliação dos marcadores de exposição, amostras de sangue foram obtidas da veia cava dos animais anestesiados com pentobarbital na dose de 30 mg/kg por injeção intraperitoneal, imediatamente após a última exposição. Os animais foram distribuídos em grupos de acordo com o tempo e a intensidade de exposição:

Grupos 1 a 4: exposição única à fumaça de 1, 3, 5 ou 7 cigarros (4 grupos x 5 animais/grupo = 20 animais);

Grupos 5 a 8: exposição por 15 dias, 2 vezes ao dia, à fumaça de 1, 3, 5 ou 7 cigarros (total 4 grupos x 5 animais/grupo = 20 animais);

Grupos 9 a 13: exposição por 1, 3, 5, 10 ou 15 dias, 2 vezes ao dia, à fumaça de 5 cigarros (total 5 grupos x 5 animais/grupo = 25 animais);

Grupo 14: exposição por 15 dias, 2 vezes ao dia, à fumaça de 5 cigarros, exceto nas últimas 12 horas antes da coleta (total 5 animais).

Para dosagem da cotinina o sangue foi centrifugado por 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C, separado o plasma e armazenado em temperatura de -20°C até ao momento das análises.

Para determinação da cotinina plasmática foi adaptado o protocolo de Feyerabend et al.¹⁷. A cotinina foi mensurada em cromatógrafo gasoso Agilent HP 6890 com detector de nitrogênio e fósforo, usando nitrogênio

como gás de arraste e lignocaína como padrão interno. Foi utilizada coluna capilar HP-5 com 5% de fenil metil siloxano, medindo 30 metros de comprimento, 320 micrometros de diâmetro interno, 0,25 micrometros de espessura de fase.

O método consistiu na extração da cotinina dissolvida no plasma (fase aquosa) para diclorometano (fase orgânica), que foi posteriormente evaporado, sendo a cotinina re-suspensa em acetona. O método foi modificado pela utilização de coluna capilar e também para permitir a utilização de menor volume de amostra. Inicialmente a 500 microlitros da amostra de plasma de rato foram adicionados a 20µL de solução aquosa (60,4 ng/mL) de lignocaína (Sigma Aldrich, EUA), seguido da adição de 1,0 mL de hidróxido de sódio 5 M e 1,5 mL de diclorometano (Diclorometano nanograde para análise de resíduos Mallinckrodt) em tubo de ensaio de 15 mL. A mistura foi agitada a baixa velocidade em agitador do tipo vórtex por dois minutos, e centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur e o tubo foi agitado manualmente, para permitir melhor agregação da emulsão formada na interfase água/diclorometano, e novamente centrifugado na mesma velocidade por dois minutos. A fase de diclorometano foi aspirada, acondicionada em frascos de 1,5 mL para serem secadas com fluxo de nitrogênio, e posteriormente re-suspensas em 50 µL de acetona (Acetona Ultimar para cromatografia Mallinckrodt) e mantidas ao abrigo da luz em geladeira entre 4 e 8°C até o momento da injeção em cromatógrafo.

Para verificar a resposta cromatográfica a cotinina foram testadas as respostas cromatográficas de soluções padrão de cotinina (Sigma Aldrich, EUA) em acetona, em concentrações crescentes, variando de 4,47 ng/mL a 1.790 ng/mL. O coeficiente de correlação entre as concentrações de cotinina e as áreas abaixo da curva nas dos cromatogramas foi de 0,99 (Figura 2).

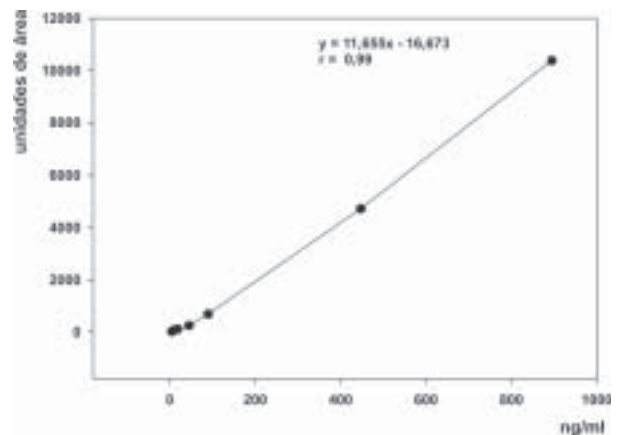


Figura 2 - Valores das áreas de cotinina obtidas em leitura cromatográfica em função da concentração de cotinina (ng/mL) em solução de acetona e equação de regressão correspondente (x = concentração de cotinina; y = área de leitura cromatográfica).

Para determinar o percentual de extração, amostras de plasma de rato receberam a adição de cotinina em diferentes concentrações, variando de 7,1 ng/mL a 227,2 ng/mL, utilizando-se quatro repetições por nível de "contaminação". As áreas das leituras cromatográficas das amostras elaboradas com a adição de concentrações conhecidas de cotinina foram comparadas com as áreas das soluções de cotinina em acetona e o percentual de extração médio obtido foi de 50,5%. A equação $y = 0,0165x - 0,1907$ foi utilizada para o cálculo das concentrações de cotinina em amostras desconhecidas, sendo y o valor da razão das áreas da leitura cromatográfica e x a concentração de cotinina a ser determinada (Figura 3). O coeficiente médio de variação das contaminações foi de 7,52%, o limite de detecção foi de 4,47 ng/mL, o limite de quantificação de 7,1 ng/mL. A variação intra-ensaio e entre ensaio das amostras de plasma de ratas fumantes foi de 10,1 e 10,2%, respectivamente. Para fins de cálculos e comparações estatísticas, os resultados de valores de cotinina "não detectados" pelo método foram expressos como o limite de detecção do mesmo (4,41 ng/mL).

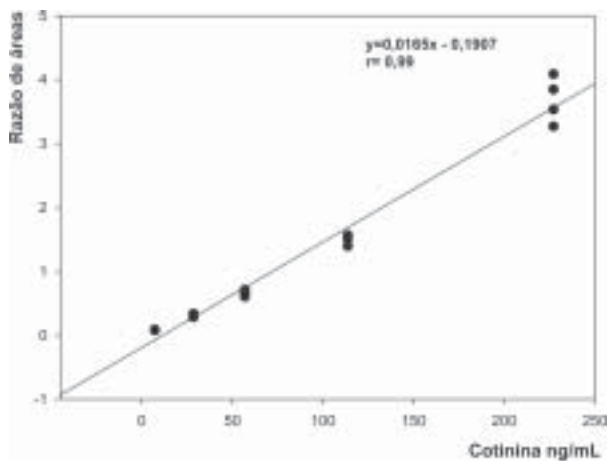


Figura 3 - Valores das razões das áreas das leituras cromatográficas de cotinina pelas áreas das leituras cromatográfica de lignocaina, em soluções de plasma de rato contaminadas com quantidades fixas de lignocaina e quantidades crescentes de cotinina

Para determinação da carboxiemoglobina em sangue de rato foi utilizada técnica descrita por Beutler e West³⁷ e um espectrofotômetro Milton Roy, modelo Stectronic Genezys monofeixe. Esta técnica mede a fração de carboxiemoglobina (COHb) a partir da relação de absorvância (Ar) da amostra a ser determinada reduzida em ditionito de sódio em 2 comprimentos de onda (420 e 432 nm) de acordo com a fórmula:

$$\text{Fração de COHb} = \frac{(1-[Ar]F1)}{Ar (F2-F1)-F3+1}$$

onde, Ar é a relação entre as absorvâncias da amostra lida a 420 e 432 nm e F1, F2 e F3 fatores de cálculo espécie-específica do espectrofotômetro utilizado.

Para a calibração espécie-específica do espectrofotômetro, foi inicialmente medida a absorvância de amostras hemolisadas de sangue de ratos não fumantes ventilados com monóxido de carbono (COHb) (n = 10) e oxigênio (n = 6) reduzidas (Hb) com ditionito de sódio e foram obtidos os fatores F1, F2 e F3 a partir da mensuração das razões das absorvâncias médias obtidas:

- F1 = AHb432/AHb420;
- F2 = ACOHb432/AHb420;
- F3 = ACOHb420/AHb420.

Onde: AHb420 e AHb432 são as absorvâncias médias das amostras hemolisadas ventiladas com oxigênio a 420 nm e 432 nm, respectivamente, e ACOHb420 e ACOHb432 são as absorvâncias médias das amostras hemolisadas ventiladas com monóxido de carbono. Os valores dos fatores espécie-específicos obtidos para ratos após os cálculos foram: F1 = 1,2643; F2 = 0,4493; F3 = 1,7891.

Para testar a linearidade da técnica de quantificação de carboxiemoglobina (COHb) com os fatores obtidos para sangue de rato, primeiramente foram misturadas amostras de solução hemolisada reduzidas com proporções crescentes de amostras de solução ventilada com monóxido de carbono (zero a 80%). Em seguida foi feita a leitura das razões de absorvância dessas amostras e determinado um percentual de COHb a partir da leitura. O coeficiente de correlação entre o percentual de COHb das misturas dos hemolisados (com os valores de F1, F2 e F3 obtidos) e o percentual calculado a partir da fórmula acima foi de 0,995 (p<0,001). A relação entre os percentuais de carboxiemoglobina das misturas e as razões de absorvância (AR) medidas em 420 e 432 nm está na Figura 4. A equação $y = 67,827 \ln x + 16,509$ permitiu calcular de forma simplificada os valores desconhecidos da COHb a partir da AR obtida em cada leitura, onde x é a razão de absorvância determinada e y é o percentual de COHb a ser determinado.

Os coeficientes de variação intra-ensaio e entre-ensaios do método foram de 8,27 % e 7,04%, respectivamente. A dose mínima detectável foi de 0,10%. Para fins de cálculos e comparações estatísticas, resultados de valores de COHb não

detectados pelo método foram expressos como o limite de detecção do mesmo, ou seja, 0,10%.

O estudo foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Médicas da UFMT (Experimentos), no Laboratório de Análise de Biocidas do Departamento de Química/UFMT (dosagem da cotinina) e no Laboratório Toxicon – São Paulo (dosagem da carboxiemoglobina).

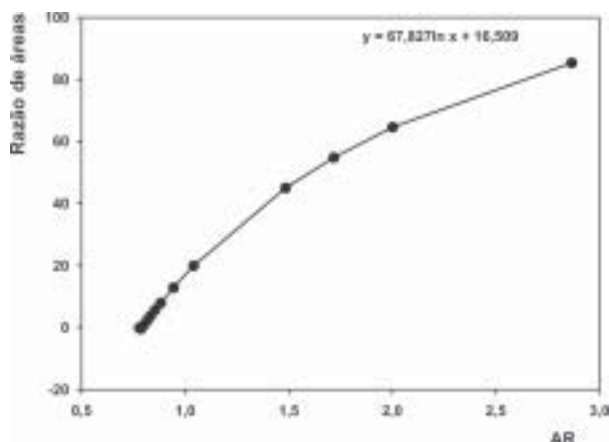


Figura 4 - Relação entre os percentuais de COHb de rato obtidos por mistura de soluções de COHb e hemoglobina reduzida e respectivas razões de absorvância obtidas por leitura espectrofotométrica.

A tabulação dos dados foi feita no programa Excel e as análises estatísticas com o programa SPSS versão 9.0 para Windows. O teste de Lavene foi utilizado para verificação do comportamento da distribuição das variáveis numéricas. Para medir a associação entre duas variáveis sem distribuição normal foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob nº 777/01 em 25 de outubro de 2001.

Resultados

Os resultados da associação entre os valores de cotinina e de carboxiemoglobina, e a intensidade de exposição ao cigarro, obtida após exposição única (grupos 1 a 4), ou após exposição prolongada (2 vezes ao dia, por 15 dias – grupos 5 a 8) estão apresentados na Tabela 1. Nota-se que houve associação positiva entre o número de cigarros e os marcadores de exposição tabágica utilizados. Nestas comparações, o coeficiente de correlação de Spearman foi mais elevado para a carboxiemoglobina que para a cotinina: 0,923 e 0,499, respectivamente ($p < 0,05$) para exposição única, e de 0,939 e 0,824, respectivamente ($p < 0,05$), para exposição prolongada.

Tabela 1 - Coeficientes de correlação de Spearman entre o número de cigarros (#) e os níveis de carboxiemoglobina (COHb) e cotinina em animais submetidos a fumaça do tabaco em exposição única (Grupos 1 a 4) e prolongada (2 vezes ao dia por 15 dias - Grupos 5 a 8).

Tipo de Exposição	N	COHb	N##	Cotinina
Única	20	0,923*	18	0,499*
15 dias	20	0,939*	17	0,824*

* $p < 0,05$, # Exposição a 1,3,5 e 7 cigarros, ## Redução do N por perda laboratorial.

Por outro lado, quando a mesma associação foi feita entre número de dias de exposição (1, 3, 5 10 e 15 dias) e os mesmos marcadores, mantendo fixa a quantidade de cigarros, apenas a cotinina apresentou associação com o número de dias de exposição (Tabela 2).

Tabela 2 - Coeficiente de correlação de Spearman entre o número de dias (#) e as concentrações de carboxiemoglobina (COHb) e cotinina em animais submetidos a fumaça de tabaco (5 cigarros – Grupos 9 a 13).

	N	COHb	N##	Cotinina
Número de dias	25	0,383	21	0,696*

* $p < 0,05$, Exposição por 1, 3, 4, 10 e 15 dias, ## Redução do N por perda laboratorial.

O grupo de 5 animais que foi exposto por 15 dias, 2 vezes ao dia, à fumaça de 5 cigarros, exceto nas últimas 12 horas antes da coleta (grupo 14), apresentou valores de mediana das concentrações de carboxiemoglobina iguais a 0,26% (mínimo 0,10% – máximo 0,61%), e de cotinina iguais a 25,15 ng/mL (mínimo 9,73 ng/mL – máximo 33,39 ng/mL).

Discussão

A obtenção de resultados confiáveis com a utilização de modelos experimentais de exposição tabágica não constitui tarefa fácil, uma vez que requer controle rigoroso de dose (número de cigarros) e tempo de exposição, de modo a tornar o estudo comparável a situações vividas pelos fumantes humanos. Desta forma se evita, ao mesmo tempo, exposição excessiva que pode levar à asfixia dos animais ou, ao contrário, a transformar a exposição em mero ato de fumigação³⁸.

O método escolhido para desenvolver este estudo foi o da exposição à fumaça lateral do cigarro, por ser o que mais se adaptava às condições de trabalho do Laboratório de Investigação da Faculdade de Ciências Médicas Medicina da UFMT. Além disso, trata-se de método não invasivo, que permite mimetizar o que ocorre em seres humanos expostos passivamente ao fumo. Esta técnica tem sido ampla-

mente utilizada para demonstração da toxicidade induzida pela fumaça do cigarro no trato respiratório, em estudos envolvendo neoplasias associadas ao tabaco, e igualmente em estudos sobre reprodução^{31,35,39-41}.

O presente estudo adotou o sistema preconizado por Le Mesurier³³, desenvolvido no Brasil por Cendon Filha³⁴, por Silva et al³⁵ e por Gurgel et al⁴², usando câmara de intoxicação simples e de fácil reprodutibilidade. A fumaça do tabaco é gerada pela queima espontânea da ponta do cigarro. Esta queima ocorre em temperaturas próximas a 300°C. Nesta condição, a fumaça produzida corresponde à fumaça lateral do cigarro, sendo inalada por via nasal pelos animais.

O uso de dispositivos diferentes de inalação pode causar variações na quantidade e na distribuição dos componentes do tabaco que entram em contato com o animal, o que dificulta a comparação de resultados obtidos em diferentes laboratórios⁴³. A detecção de substâncias, que funcionam como marcadores de exposição, pode ser feita pela determinação externa do agente administrado ao animal ou pelos níveis do elemento presente no plasma ou nos tecidos. Os marcadores presentes em fluidos corpóreos são dosados de maneira relativamente fácil e reprodutível, e guardam relação com a dose de exposição^{17,31}. No entanto, não são capazes de diferenciar o tabagismo ativo do passivo, mas revelam a eficácia da exposição à fumaça gerada no modelo, além de quantificar a intensidade da exposição⁴⁴.

Neste estudo foram utilizados dois marcadores de exposição, carboxiemoglobina e cotinina. A determinação de carboxiemoglobina foi feita pela técnica de Beutler e West³⁷, descrita para uso em humanos e animais de experimentação. Foram determinados os fatores específicos de cálculo (F1, F2 e F3) para a espécie animal - rato e o espectrofotômetro utilizado, seguindo a orientação do método. Estes fatores foram muito próximos daqueles do sangue humano, o que está de acordo com as semelhanças espectrais das hemoglobinas das duas espécies⁴⁵.

A determinação de cotinina foi feita pelo método de Feyerabend et al.¹⁷ de cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo. Diferentemente da técnica original, foi utilizada uma coluna capilar em substituição a coluna empacotada originalmente proposta. Os testes do método mostraram valores de variabilidade entre e intra ensaios satisfatórios por estarem em 10%. Já o percentual de extração de cada material biológico foi calculado pela comparação do valor obtido com o valor esperado de acordo com a curva de contaminação. Para o presente estudo, a

porcentagem de extração foi de apenas 50%, o que foi menor que o obtido em outras determinações cromatográficas de cotinina⁴⁶. Contudo, o coeficiente de variação médio das amostras contaminadas com diferentes concentrações, excluídos aos valores que caíram abaixo do limiar de detecção, foi de 7,52%, mostrando boa reprodutibilidade do método escolhido.

Os testes realizados com animais que foram submetidos a variação da intensidade e de tempo de exposição, mostraram índices de correlação significativos entre as determinações de carboxiemoglobina e cotinina e a intensidade e o tempo de exposição adotados. A medida de carboxiemoglobina apresentou níveis de correlação maiores com a intensidade da exposição que a determinação de cotinina, que diferentemente se correlacionou com o tempo da exposição. Essa diferença nos índices de correlação dos marcadores estudados possivelmente seja devida a maior estabilidade e duração dos níveis de cotinina no sangue animal em relação a carboxiemoglobina.

Em tabagistas a carboxiemoglobina é um marcador da fase gasosa do cigarro e a quantidade absorvida depende da gravidade e da duração da exposição e seu nível depende da quantidade de cigarros fumados nas últimas horas^{7,18,47}. Em animais de experimentação a afinidade pode ser diferente, como em camundongos, cuja hemoglobina apresenta baixa afinidade pelo monóxido de carbono (meia vida de aproximadamente meia hora) em oposição a meia vida (3 horas) em humanos⁴⁸.

Neste estudo, o encontro de níveis reduzidos de carboxiemoglobina e a detecção de cotinina em animais que não foram expostos nas últimas 12 horas antes de serem sacrificados sugerem maior estabilidade do marcador de fase particulada em relação ao marcador de fase gasosa.

Também em tabagistas, os níveis séricos de cotinina são mais estáveis e refletem o consumo dos últimos 2-3 dias antes da coleta do fluido corporal utilizado^{47,49}. Da mesma forma que a carboxiemoglobina, estudos em laboratório mostraram que ratos possuem valores de meia vida de cotinina cerca de 3 vezes menores que os de humanos (5,2 horas x 17 horas) assim como clearance plasmático maior (0,2 x 0,9 mL.min⁻¹.kg⁻¹)⁵⁰.

Em conclusão, este estudo mostrou a existência de associação entre intensidade e tempo de exposição com um marcador de fase particulada e de gasosa da fumaça do tabaco, o que sugere parâmetros de funcionalidade para uma metodologia que vem sendo utilizada no Brasil. A medida de carboxiemoglobina apresentou níveis de correlação maiores com a

intensidade da exposição que a determinação de cotinina, que diferentemente se correlacionou com o tempo da exposição. Isto sugere que o referido sistema de exposição pode ser utilizado em animais de experimentação para obtenção de efeitos decorrentes de ação da nicotina, visto que seu metabólito foi detectado.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar seus agradecimentos ao Prof. Dr. Ruy Curi do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo e à Prof^ª. Dra. Maria Elisa Siqueira do Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dube M, Gree CR. Methods of collections of smoke for analytical purposes. *Recent Adv Tobacco Sci* 1982;8:42-102.
- Churg DF, Prior WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985;64:111-26.
- Armitage AK, Dollery CT, George CF, Houseman TH, Lewis PJ, Turner DM. Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes. *Br Med J* 1975;4:313-6.
- Abel EL. Smoking during pregnancy: a review of effects on growth and development of offspring. *Hum Biol* 1980;52:593-625.
- Nash J, Persaud T. Embryopathic risks of cigarette smoking. *Exp Pathol* 1988;33:65-73.
- Byrd JC. Environmental tobacco smoke. Medical and legal issues. *Med Clin North Am* 1992;76:377-98.
- Russell MAH, Wilson C, Patel UA, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine levels after smoking cigarettes with high, medium, and low nicotine yields. *Br Med J* 1975;2:414-6.
- Plowchalk DR, Andersen ME, Debethizy JD. A physiological based pharmacokinetic model for nicotine disposition in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;116:177-88.
- Weiss ST, Tager IB, Schenker M, Speizer FE. The health effects of involuntary smoking. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:933-42.
- Scherer G, Conze C, Meyerinck LV. Importance of exposure to gaseous and particulate phase components of tobacco smoke in active and passive smokers. *Arch Occup Environ Health* 1990;62:459-66.
- Law RL, Hackshaw AK. Environmental tobacco smoke. *Br Med Bull* 1996;52:22-34.
- Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol* 1998;15;83:148-56
- U.S. Department of health and human services. Smoking and health. A report of the surgeon general. Washington (DC): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Assistant Secretary of Health, Office on Smoking and Health, 1979 [cited June 12 2004]. DHEW Publication No. (PHS) 79-50066. Available from: URL: http://www.cdc.gov/tobacco/sgr/sgr_1979/index.htm
- Schvartsman C. Exposição ao tabagismo domiciliar em lactentes com síndrome de sibilância, utilizando nível urinário de cotinina como indicador biológico [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1996.
- Barlow RD, Stone RB, Wald NJ, Puhakainen EVJ. The direct barbituric acid assay for nicotine metabolites in urine: a simple colorimetric test for the routine assessment of smoking status and cigarettes smoke intake. *Clin Chim Acta* 1987;165:45-52.
- Haufroid V, Lison D. Urinary cotinine as a tobacco-smoke exposure index: a minireview. *Int Arch Occup Environ Health* 1998;71:162-8.
- Feyerabend C, Bryant AE, Jarvis MJ, Russel MAH. Determination of cotinine in biological fluids of nonsmokers by packed column gas liquid chromatography. *J Pharm Pharmacol* 1986;38:917-9.
- Sepkovic DW, Haley NJ. Biomedical application of cotinine quantitation in smoking related research. *Am J Public Health* 1985;75:663-5.
- Benowitz NL, Kuyt F, Jacob PIII, Jones RT. Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther* 1983;34:604-11.
- Etzel RA, Greenberg RA, Haley NJ, Loda FA. Urine cotinine excretion in neonates exposed to tobacco smoke products in utero. *J Pediatr* 1985;107:146-8.
- Jacob PJ, Benowitz NL, Shulgin AT. Recent studies of nicotine metabolism in humans. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;30:249-53.
- Langonne JJ, Gijika HB, Van Vunaski H. Nicotine and its metabolites: radioimmunoassays for nicotine and cotinine. *Biochemistry* 1973;12:5025-30.
- Witschi H, Joad JP, Pinlerton KE. The toxicology of environmental tobacco smoke. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:29-52.
- Kendrick J, Nettersheim P, Guerin M, Caton J, Dalbey W, Griesemer R, Rubin I, Maddox W. Tobacco smoke inhalation studies in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976;37:557-67.
- Terkel J, Blake CA, Hoover V, Sawyer CH. Pup survival and prolactin levels in nicotine-treated lactating rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;143:1131-5.
- Guerin MR, Stokely JR, Higgins CE, Moneyhun JH, Holmberg RW. Inhalation bioassay chemistry – Walton horizontal smoking machine for inhalation exposure of rodents to cigarette smoke. *J Natl Cancer Inst* 1979;441-8.
- Erickson CK, Stavchansky SA, Koch KI, Mcginitly JW. A new subcutaneously-implantable reservoir for sustained release of nicotine in the rat. *Pharmac Biochem Behav* 1982;17:183-5.
- Griffith RB, Hancock R. Simultaneous mainstream-side stream smoke exposure systems I. Equipment and procedures. *Toxicology* 1985;34:123-38
- Murrin LC, Ferrer JR, Wanyun Z, Haley NJ. Nicotine administration to rats: methodological considerations. *Life Sciences* 1987;40:1699-708.
- Bruguerolle B, Roucoules X, Lorec AM. Cigarette smoke increases bupivacaine metabolism in rats. *Can J Anaesth* 1994;41:733-7.
- Zhu BQ, Sun YP, Sievers RE, Glantz SA, Parmlev WW, Wolfe CL. Exposure to environmental tobacco smoke increases myocardial infarct size in rats. *Circulation* 1994;1282-90.
- Subramaniam S, Srinivasan S, Bummer PM, Gairola CG. Perinatal sidestream cigarette smoke exposure and the

- developing pulmonary surfactant system in rats. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:206-11.
33. Le Mesurier SM, Stewart BW, Lykke AW. Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. *Environ Res* 1981;24:207-17.
 34. Cendon Filha SP. Enfisema pulmonar. Modelo experimental em ratos expostos à fumaça do cigarro [Dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1993.
 35. Silva RMVG, Santos MGL, Botelho C. Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos. *J Pneumol* 1997;23:124-9.
 36. Mello PRB. Efeito do tabagismo sobre a liberação de prolactina, produção láctea e componentes imunes do leite de ratas [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
 37. Beutler E, West C. Simplified determination of carboxyhemoglobin. *Clin Chem* 1984;30:871-4.
 38. Becker RF, Little CRD, King JE. Experimental studies on nicotine absorption in rats during pregnancy. *Am J Obst & Gynec* 1968;100:957-68.
 39. Joad JP, Chunmey J, Kott KS, Bric JM, Pinkerton KE. In utero and post natal effects of sidestream cigarette smoke exposure on lung function, hyperresponsiveness, and neuroendocrine cells in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;132:63-71.
 40. Floreck E, Marszalek A, Biczysko W, Szymanowski K. The experimental investigations of the toxic influence of tobacco smoke affecting progeny during pregnancy. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:245-51.
 41. Floreck E, Marszalek A. An experimental study of the influences of tobacco smoke on fertility and reproduction. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:272-8.
 42. Gurgel RSS, Botelho C. Influência da naloxona no peso corporal e consumo alimentar em ratos fumantes. *Pulmão RJ* 2000;9:31-7.
 43. Binns R, Beven JL, Wilton LV, Lugton WG. Inhalation toxicity studies on cigarette smoke III. Tobacco smoke inhalation dosimetry study on rats. *Toxicology* 1976;6: 207-17.
 44. Cendon Filha SP. Efeito do fumo passivo no aparelho mucociliar de ratos [Tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1994.
 45. Verma K, Penney DG, Helfman CC, Sutariya BB. Carboxyhemoglobin in the rat: improvements in the spectrophotometric measurement and comparison to other studies. *J Appl Toxicol* 1989;9:323-30.
 46. Luck W, Nau H. Nicotine and cotinine concentrations in serum and urine of infants exposed via passive smoking or milk from smoking mothers. *J Pediatr* 1985;107:816-20.
 47. Jarvis MJ, Russell MAH, Feyerabend C. Absorption of nicotine and carbon monoxide from passive smoking under natural conditions of exposure. *Thorax* 1983;38: 829-33.
 48. Watson ES, Jones AB, Ashfaq MK, Barret JT. Spectrophotometric evaluation of carboxyhemoglobin in blood of mice after exposure to marijuana or tobacco smoke in a modified Walton horizontal smoke exposure machine. *J Anal Toxicol* 1987;11:19-23.
 49. Nafstad P, Kongerud J, Botten G, Urdal P, Silsand T, Pedersen BS et al. Fetal exposure to tobacco smoke products: a comparison between self-reported maternal smoking and concentrations of cotinine and thiocyanate in cord serum. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:902-7.
 50. Kyerematen GA. Metabolism of nicotine. *Drug Metab Rev* 1991;23(1-2):3-41. ■
-