



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e
no fluido crevicular – estudo piloto

Orientador: Prof^a Doutora Isabel Poiares Baptista
Co-orientador: Prof. Doutor António Rocha Gonçalves

Ana Cristina Aguiar dos Santos
Coimbra 2012

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular –
estudo piloto

Santos AC^{*}, Poiars Baptista ICM^{**} Rocha Gonsalves AR^{***}

^{*}Aluna do 5.º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária pela
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

^{**}Professora Auxiliar, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra –
Área de Medicina Dentária

^{***}Professor Catedrático, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Coimbra – Departamento de Química

Endereço: Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de
Coimbra, Avenida Bissaya Barreto, Bloco de Celas

3000-075 Coimbra

Telf: +351 239484183

Fax: +351 239402910

Coimbra, Portugal

Endereço electrónico: cristina@ibili.uc.pt

Sumário

1. Resumo	?
2. <i>Abstract</i>	?
3. Lista de Abreviaturas.....	?
4. Introdução.....	?
5. Material e Métodos	??
6. Resultados	??
7. Discussão	??
8. Conclusões	??
9. Agradecimentos	??
10. Referências Bibliográficas	??
Anexo I	??
Anexo II	??

1. Resumo

Nas duas últimas décadas têm-se obtido evidências, quer a partir de estudos epidemiológicos quer de estudos básicos, que suportam uma associação causa-efeito entre o consumo de tabaco e a doença periodontal.

Entre os efeitos deletérios do tabaco na saúde devem ter-se em conta as respostas negativas, consistentemente referidas, aos tratamentos das doenças orais. Além disso, a recorrência de doença periodontal é mais frequente em fumadores durante os tratamentos periodontais de manutenção do que em não-fumadores. No entanto, tem sido relatado que a recuperação da saúde periodontal é, embora mais lenta que a normal, semelhante nos doentes que deixaram de fumar. Neste contexto, recentemente, o consumo de tabaco foi também correlacionado com a perda dentária.

A população mais jovem mostra tendência para um aumento do consumo de tabaco a nível mundial, o que poderá levar a doença periodontal crónica precocemente, representando um problema de saúde pública.

Têm-se tentado encontrar parâmetros facilmente identificáveis que sejam indicadores de uma possível correlação entre o consumo de tabaco e a severidade da doença periodontal.

Os alcalóides cotinina e anabasina são metabolitos da nicotina que permanecem no organismo por um período mais prolongado do que esta, sendo possíveis de detectar no soro e na urina.

As técnicas de LC-MS (cromatografia líquida – espectrometria de massa) e de GC-MS (cromatografia gasosa – espectrometria de massa) são técnicas analíticas usadas em circunstâncias que exigem uma grande sensibilidade e selectividade. Geralmente são utilizadas para a detecção e potencial identificação de substâncias químicas numa mistura complexa, mesmo estando presentes em quantidades muito reduzidas.

Pretende pesquisar-se a presença destes dois metabolitos alcalóides na saliva/fluido crevicular de dentes de fumadores e tentar correlacioná-los com a (gravidade) doença periodontal.

Palavras-chave: nicotina, cotinina, anabasina, saliva, LC-MS, doença periodontal

2. Abstract

In the last two decades evidence has been obtained, both from epidemiological and basic studies, supporting the cause-effect association between smoking and periodontal disease.

Among the deleterious effects of tobacco in health, negative responses to oral treatment should be taken into account. Besides, periodontal disease recurrence is more frequent in smokers while performing periodontal maintenance treatments. Nevertheless, it has been reported that periodontal health recovery is, although slower than in normal's, similar in stopping-smokers patients. In this context, smoking has been correlated with tooth loss.

Nowadays, young people show a higher tobacco consumption, which may lead to chronic periodontal disease early, representing a public health problem.

Researchers are trying to find parameters that are easily identifiable indicators of a possible correlation between tobacco consumption and severity of periodontal disease.

Cotinine and anabasine are alkaloid metabolites of nicotine, which remain in the organism for a longer period than nicotine, being possible to be detected in serum and urine.

LC-MS (liquid chromatography – mass spectrometry) and GC-MS (gas chromatography – mass spectrometry) are analytical methods used in cases requiring great sensibility and selectivity. Usually they are used to detect and potentially identify chemical substances in complex mixtures, even though present in very low concentration.

It is intended to detect the presence of these alkaloid metabolite in saliva/crevicular fluid and to try to correlated this with the severity of periodontal disease.

Key-words: nicotine, cotinine, anabasine, saliva, LC-MS, periodontal disease

3. Lista de Abreviaturas e Nomenclatura (?)

GC-MS – *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

LC-MS – *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*

MA – *Mass Spectrometry*

ESI - ionização de *electrospray*

HPLC -

LC - *Liquid Chromatography*

MS - *Mass Spectrometry*

ACN – acetoneitrilo

.....

4. Introdução

A relação entre o consumo de tabaco e uma série de patologias tem sido objecto de estudo por muitos grupos de investigação. Entre as patologias estudadas neste contexto salientam-se os cancros do pulmão, do estômago, da bexiga, doença cardíaca, bronquite e enfisema e cirrose hepática [1,19]. De acordo com os estudos citados pelo *EU-Working Group (Europe Against Cancer Program)*, o tabaco é responsável por cerca de 30% das doenças tumorais e mortes, cerca de 90% dos tumores pulmonares, 30% dos casos de isquemia cardíaca e acidentes vasculares, cerca de 80% de enfartes do miocárdio antes dos 50 anos e 70% de doenças pulmonares crónicas [19].

Dados deste grupo de estudos do Reino Unido revelam que, em média, a esperança de vida de um fumador diminui 7,5 anos, independentemente do tipo de tabaco consumido e da quantidade/dia. A proporção de fumadores que atingem os 70 anos de idade é de 59% para 80% nos não fumadores [19].

O alcatrão presente no tabaco está directamente ligado ao desenvolvimento de cancro, sendo o mais frequente o cancro do pulmão, com uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 5 – 10% [19]. Mais de 300 agentes carcinogénicos foram identificados no tabaco e nos seus componentes solúveis que passam para a saliva R[1]. Os agentes mais estudados são o benzopireno, um hidrocarboneto aromático, e as nitrosaminas específicas do tabaco, que produzem adutores de DNA, nomeadamente 6-metilguanina, interferindo com a replicação do DNA. Deste modo, ocorrem danos nas células replicativas e na resposta imunitária R[1]. Os agentes carcinogénicos do tabaco actuam ao nível do gene tumoral supressor p53, que é responsável pela transcrição de uma proteína nuclear fundamental para a reparação do DNA, transcrição e replicação R[2] Taxas elevadas de mutações no gene p53 têm sido identificadas em fumadores R[2-3].

Várias meta-análises demonstraram que o fumo passivo também pode causar o aparecimento de cancro do pulmão e doença cardíaca isquémica. No entanto, o risco é muito menor do que nos fumadores activos. O fumo passivo pode também aumentar o número de reações alérgicas contra alérgenos específicos, reduzir a função pulmonar e aumentar os ataques em doentes asmáticos [19].

Consumir tabaco durante a gravidez pode levar a consequências graves para o feto e para o bebé durante os primeiros anos de vida (por ex: bronquite asmática e infecções respiratórias) [19].

O hábito de fumar induz descoloração dentária e das restaurações e próteses dentárias mais intensa do que o consumo de café ou chá [19]. No início fumar aumenta a produção de saliva, mas a longo prazo a quantidade de saliva diminui, embora vários autores não tenham encontrado diferenças significativas entre fumadores e não-fumadores [19].

Em relação à presença de cárie não há ainda evidência suficiente que comprove uma correlação etiológica, embora haja mais cáries nos fumadores [19]. Na saliva dos fumadores há um aumento de tiocianato, o que poderia levar à existência de menos cárie, por outro lado o abaixamento do pH e da capacidade tampão da saliva e a alteração da microbiologia (*Lactobacillus* e *Streptococcus*) poderia contrariar esta tendência [19].

Entre os fumadores a halitose é frequente, referindo ainda alterações de gosto e da acuidade do olfacto [19]. Por outro lado, vários estudos referem uma maior dificuldade de cicatrização intraoral nos fumadores (por ex: após cirurgia periodontal, extracções dentárias, raspagem radicular) [4].

As referências à relação entre o consumo de tabaco e doença periodontal remontam a 1859 [1]. No final dos anos 40, Pindborg reportou uma relação significativa entre o acto de fumar e a deposição de cálculos e também com a gengivite [36-38]. Desde aí muitos estudos têm sido feitos no sentido de perceber os mecanismos de associação entre o hábito de fumar e a prevalência e a gravidade de doenças periodontais. Muitos dados foram recolhidos e analisados sugerindo que o tabaco é um importante factor de risco na doença periodontal [1-2,5-9,11,14-27,29,31-34].

O tabaco é um dos factores de risco passível de ser modificado, de modo a tentar prevenir o aparecimento de lesões periodontais e melhorar a resposta ao tratamento. É muito importante sensibilizar os doentes para esta problemática.

O estudo de substâncias químicas e seus derivados requer um conhecimento adequado da natureza dos compostos envolvidos, do seu metabolismo e das capacidades dos métodos analíticos utilizáveis.

O método analítico a escolher deverá ter em consideração a necessidade de detecção e quantificação de quantidades extremamente pequenas das substâncias a estudar. A espectrometria de massa é particularmente eficiente, sendo uma técnica bastante usada no contexto farmacêutico. Assim, justifica-se efectuar uma breve descrição da técnica e da teoria por detrás dela, instrumentação, vantagens e desvantagens e métodos desenvolvidos [2].

A degradação química das amostras começa imediatamente após a recolha, dada a sua origem biológica e composição, principalmente devido à presença de enzimas e microrganismos e à temperatura (cerca de 37°C) do material colhido. Por este motivo as amostras devem ser colocadas em contentores opacos no frio e congeladas a -80°C o mais rápido possível. É ainda importante conhecer o tipo de reacções químicas que ocorrem mais frequentemente na degradação das amostras. Devido à exposição a factores ambientais as alterações mais correntes são: hidrólise, oxidação e fotodegradação [5 da Alex]. É importante também realçar que há a possibilidade de alguns grupos funcionais poderem sofrer mais do que uma reacção de degradação (Anexo II).

Espectrometria de massa

O princípio básico da espectrometria de massa (MS) é gerar iões a partir de compostos inorgânicos ou orgânicos através de um método adequado, separar estes iões pela sua razão massa – carga (m/z) e detectá-los qualitativa e quantitativamente através da sua m/z e abundância [38 alex].

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

A espectrometria de massa permite determinar a massa de uma molécula medindo a relação massa-carga (m/z) dos seus iões. Isto significa que para realizar uma experiência deste tipo é necessário ionizar as moléculas, separar estes iões e detectá-los. Todos os espectrómetros de massa têm em comum o conjunto básico de: fonte de iões, analisador de massa e detector (Fig. ??).

5. Material e Métodos

A degradação química das amostras começa imediatamente após a recolha, dada a sua origem biológica e composição, principalmente devido à presença de enzimas e microrganismos e à temperatura ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) do material colhido. Por este motivo as amostras devem ser colocadas em contentores opacos no frio e congeladas a -80°C o mais rápido possível.

O espectro de massa obtido é uma representação gráfica em 2D da intensidade do sinal *versus* m/z . A intensidade de um pico, tal como os sinais são geralmente designados, reflecte a abundância das espécies iónicas de uma relação m/z que foram criadas a partir do analito dentro da fonte de iões. A relação massa-carga, m/z , por definição não tem dimensões, uma vez que se calcula a partir do nº de massa, m , (sem dimensões) de um determinado ião e do número das suas cargas, z . A abundância relativa apresenta-se geralmente como uma percentagem, tendo o ião mais abundante um valor de 100% [43 alex].

Com a ionização de *electrospray* (ESI) conseguem transferir-se os iões da solução para a fase gasosa. A solução é composta por um solvente volátil e por um analito iónico em concentração muito baixa, tipicamente 10^{-6} - 10^{-3} M [38 alex]. Ao líquido que passa através de um tubo capilar com um fluxo reduzido (1 - $10\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$) é aplicado um forte campo eléctrico (3-4 kV), sob pressão atmosférica, induzindo uma acumulação de carga na superfície do líquido na extremidade do capilar, que formará gotículas carregadas [44, 46 alex].

As gotículas são conduzidas e vaporizadas com a ajuda de um gás neutro aquecido (geralmente N_2). Nestas condições, as gotículas, ao atravessarem a fonte, vão diminuindo de tamanho. Eventualmente, as forças repulsivas - forças de *Coulomb* - entre os iões da superfície das gotículas tornam-se muito grandes. Estas forças excederão a tensão superficial do solvente, produzindo iões que passam para a fase gasosa. Este princípio da formação de iões pelo ESI é denominado método de evaporação de iões e pensa-se que favorece iões com valores relativamente baixos de m/z . Uma teoria alternativa, que supostamente é dominante em caso de iões com

valores m/z muito altos, é o modelo de cargas residuais, que envolve uma evaporação contínua do solvente acompanhada pela fragmentação das gotículas, de modo a que um só ião seja formado no final do processo [44, 47 alex].

O analisador é o componente essencial do aparelho de MS, mas nem todos funcionam do mesmo modo, enquanto alguns separam os iões em relação às coordenadas espaciais, outros separam-nos em relação ao tempo. Assim, a característica comum entre os analisadores de massa é o local onde os iões são separados, baseado nos seus valores de m/z [38-39, 44, 46-47 alex]. O analisador usado neste trabalho foi a armadilha de iões (*ion trap*).

Um “ion trap” quadrupole consiste num eléctrodo cilíndrico em anel, ao qual é aplicado um campo quadrupolar, e em dois eléctrodos terminais (*end-cap*), eléctrodos hiperbólicos (Fig. ??). Um dos terminais possui orifícios para a introdução de iões na armadilha, enquanto o outro tem orifícios para os iões ejectados da armadilha em direcção ao multiplicador de electrões. Os terminais estão ligados electricamente e entre eles são aplicados os potenciais de corrente (DC - *Direct current potential*) e de radiofrequência (RF- *Radiofrequency potential*) e o eléctrodo em anel [38 alex]. A correlação entre a voltagem aplicada e a massa detectada permite obter o espectro de massa da amostra [39 alex].

Para analisar misturas, um analisador cromatográfico gasoso ou líquido precede o espectrómetro de massa para separar os componentes. A cromatografia é um método de separação físico no qual os componentes a ser separados são selectivamente distribuídos entre duas fases não miscíveis: uma fase móvel atravessa uma fase estacionária. O processo cromatográfico ocorre como resultado de uma série de passos repetidos de retenção/libertação durante o movimento dos analitos ao longo da fase estacionária. A separação ocorre devido a diferenças nos coeficientes de distribuição dos analitos da amostra. A separação dá-se na coluna, onde a fase estacionária, devido a interacções intra e intermoleculares entre os analitos e as fases móvel e estacionária. Quanto maiores as forças, entre as moléculas de soluto e da fase estacionária, mais o soluto será retido. Por outro lado, quanto maiores as forças as moléculas de soluto e a fase móvel, mais rápido o soluto passa através da coluna. Estas interacções podem ser classificadas como polares, iónicas ou dispersivas [50 alex].

As separações LC são baseadas em quatro mecanismos de retenção: fase normal, fase reversa, troca iónica ou exclusão de tamanho. A LC de fase reversa é a mais utilizada, provavelmente por ser a mais versátil e mais adequada para ser aplicada ao sistema de LC-MS [36, 47 alex]. As interações específicas analito-solvente e os efeitos de solubilidades são os factores mais importantes para este tipo de separação. A retenção diminui com o aumento da polaridade dos analitos. Misturas de água ou tampões aquosos e um modificador orgânico, geralmente o metanol e o acetonitrilo, são usados como eluentes [47 alex]. É vantajosa a mudança do sistema convencional de HPLC para LC/MS uma vez que será conhecida a identidade de impurezas *minor* [36 alex].

A preparação da amostra tem um impacto directo na precisão e limites quantitativos e é muitas vezes o passo limitante para muitos métodos analíticos. Amostras aquosas geralmente têm de ser processadas para isolar ou concentrar os analitos orgânicos e produzir um extracto adequado para a análise. Usando LC-MS, tal como na HPLC, é muitas vezes necessário recorrer a métodos de extracção para remover impurezas e purificar a amostra. As técnicas clássicas de isolamento e purificação são: filtração, recristalização, sublimação, extracção por solvente, destilação e cromatografia [54 alex]. A escolha do processo de purificação dependerá em grande parte das propriedades físico-químicas do produto [55 alex].

Podem ser usados vários métodos de pré-tratamento da amostra em combinação com LC-MS, tais como extracção líquido-líquido ou extracção de fase sólida [47 alex]. Compostos orgânicos são normalmente mais solúveis em solventes orgânicos do que em água. Este método é eficaz para remover não-voláteis, sendo os analitos extraídos por solventes tais como o diclorometano, etilacetato, metil-t-butil éter ou hexano e também promove uma boa limpeza [56 alex]. Amostras sólidas podem ser extraídas usando um solvente adequado tal como a acetona, metanol ou acetonitrilo [47, 54 alex].

Foi elaborado um protocolo para recolher amostras de saliva de voluntários, fumadores e não-fumadores, e de doentes, fumadores e não-fumadores, seguidos na consulta de Periodontologia na Medicina Dentária.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

Foram preenchidos impressos de história clínica, normalmente utilizados na instituição, de todos os voluntários e doentes incluídos neste estudo (Anexo I), bem como um breve exame oral.

Inicialmente recolheram-se 2 amostras de saliva nos voluntários, fumadores e não-fumadores, através da colocação de um pequeno cilindro de algodão na zona dos dentes 43 a 45, por lingual, e outro por vestibular na zona dos dentes 34 a 36, com a ajuda de uma pinça. De imediato cada algodão foi colocado num frasco de vidro (revestido com papel de alumínio) e com rolha de rosca (2 ml *clear vial, screw top, solid cap w/ PTFG liner*, Supelco, USA, refª 27134), devidamente identificado com a sigla correspondente ao impresso dos dados clínicos. O frasco foi selado com *parafilm* (Parafilm “M”, American National Com™, USA) e colocado no frio o mais rápido possível e depois congelado a -80°C até à sua análise. Foram adquiridos estes frascos uma vez que neles próprios se podem preparar as amostras para levar ao LC-MS, não havendo perda de amostra por transferência de contentor.

A recolha da saliva nos doentes, fumadores e não-fumadores, efectuou-se segundo o mesmo protocolo. Adicionou-se uma terceira colheita numa zona com presença de bolsa periodontal (de acordo com a história clínica de Periodontologia efectuada na consulta desta área), friccioando com o algodão a zona exposta das superfícies radiculares deste(s) dente(s). A amostra foi acondicionada da mesma forma.

De acordo com a pesquisa bibliográfica efectuada foram seleccionados e adquiridos por nós três compostos que serão os padrões a utilizar neste estudo: nicotina (Figura ?) e dois dos seus metabolitos: cotinina (Figura ?) e anabasina (Figura ?).

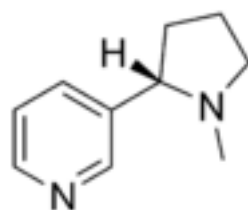


Figura ? – Fórmula química de estrutura da nicotina (MW = 162,23) (500 mg, LGC Standards S.L.U., Spain; refª MM 0517.00).

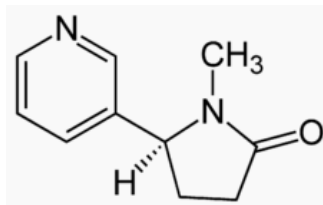


Figura ? – Fórmula química de estrutura da cotinina (MW = 176,22) (100 mg, *nicotine impurity C* (EP). LGC Standards S.L.U., Spain; ref^a MM 0517.03).

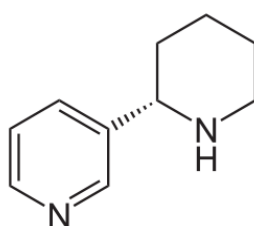


Figura ? – Fórmula química de estrutura da anabasina (MW = 162,23) (100 mg, *nicotine impurity G* (EP). LGC Standards S.L.U., Spain; ref^a MM 0517.01).

Foi efectuada uma solução de $\pm 2,2$ mg/ml em metanol para cada composto (nicotina, cotinina e anabasina).

Nos primeiros estudos utilizou-se uma coluna cromatográfica Zorbax 300SB-C18, 1 x 150 mm; 3,5 μ m, condicionada com metanol na semana anterior aos ensaios.

De cada solução preparada retiraram-se 100 μ l e juntaram-se 900 μ l de uma mistura metanol: água (80:20), com 0,2% de TFA e fez-se injeção directa.

Optimização do método cromatográfico

Método 1

100 μ l de cada solução padrão dissolvidos em 1% TFA (1 ml), obtendo-se uma concentração de $\pm 0,22$ mg/ml.

Forno aquecido a 30°C e injeção de um volume de 10 μ l.

Deteção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

Programa:

	0,4% TFA	0,4% TFA: metanol (80:20)
0	95	5
8	95	5
10	50	50
12	50	50
13	95	5
16	95	5

Obteve-se um pico PDA aos 6,06 min e dois picos UV (260 nm) aos 2,43 e ,06 min.

Método 2

	0,4% TFA	0,4% TFA: metanol (80:20)
0	50	50
12	50	50

Muito mau.

Método 3

Igual ao Método 1, mas foi alterada a temperatura ($T_{col} = 40^{\circ}C$).

Método 4

	0,4% TFA	0,4% TFA: metanol (80:20)
0	50	50
12	50	50

Linha de base 5, mistura nicotina-cotinina-anabasina método 4: os compostos parecem estar todos a sair sobrepostos a 2,16 min. Foi tentado com metanol para ver se se separavam os picos para cada fragmentação.

Noutro ensaio foi mantido o Método 4 e criadas as condições de MS. Foram escolhidas as massas dos três compostos e feito MS/MS para verificar se se conseguiam separar os picos.

Método 4.2

Foi efectuado SRM.

Linha de base 2.mistura nicotina-cotinina-anabasina método 4.2. Mistura diluída com 1 ml de metanol:água (80:20), 0,2% TFA (concentração $\pm 0,11$ mg/ml).

Branco = algodão

Testada amostra 51a (recolha de saliva por lingual) e 51b (recolha de saliva por vestibular) (fumador), diluídas em 500 μ l metanol:água (80:20), 0,2% TFA.

Testada amostra 52a (recolha de saliva por lingual), 52b (recolha de saliva por vestibular) (fumador), diluídas em 250 μ l metanol:água (80:20), 0,2% TFA.

A pressão ficava muito elevada ao injectar a amostra de 10 μ l, passou-se a 5 μ l. No entanto a pressão aumentou bastante, o que fazia slatar o capilar e levava o fluxo da bomba para a coluna.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

A amostra 54b não conseguiu ser corrida por este método. Alterou-se para acetonitrilo em vez de metanol.

Método 5

	ACN	Água (0,4% TFA)
0	80	20
12	80	20

Pressão: 207 bar; 4 min 235 bar.

Volume injectado: 1 µl.

Linha de base 2. Mistura diluída.

Branco (algodão)	B4
Amostra 51a	B5
Amostra 51b	B6
Amostra 52a	B7
Amostra 52b	B8
Amostra 53a	B9
Amostra 53b	B10
Amostra 54a	B11
Amostra 54b	B12
Amostra 58a	B13
Amostra 58b	B14
Amostra 59a	B15
Amostra 59b	B16

13 x 12 min = 156 min

Linha de base 1.

Amostra 10a
Amostra 10b
Amostra 23a
Amostra 23b
Amostra 23c
Amostra 24a
Amostra 24b
Amostra 24c
Amostra 25a
Amostra 25b
Amostra 25c

Dadas a dificuldades experimentais e os resultados que estavam a ser obtidos elaborou-se uma outra abordagem para o estudo.

Recolheu-se saliva de um voluntário não-fumador, por lingual na zona dos dentes 33 a 43, usando uma pipeta esterilizada.

Uma amostra desta saliva foi liofilizada e serviu como branco.

Preparam-se outros conjuntos de amostras para serem “contaminadas” com uma mistura de nicotina-cotina-anabasina a três concentrações:

- 0,11 mg
- 0,0505 mg
- 0,011 mg

Foram estudadas três condições experimentais para cada uma destas concentrações:

- saliva + compostos – estudo imediato,
- saliva + compostos – incubação 30 min a 37° C,
- saliva + compostos – incubação 4 h a 37° C.

Obtiveram-se espectros para todas estas condições experimentais que se mostram no capítulo dos Resultados.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

Dado que, na realidade, o que entra na cavidade oral é o fumo do tabaco (não vai ser considerado nenhum caso de tabaco mascado) idealizaram-se novas experiências.

Procedeu-se ao fabrico de uma “máquina de fumar” (Figura ??) usando tubos Linex, Boro 3.3 para o corpo do sistema e tubos de vidro e conectores ligados através de um tubo de silicone à esquerda e um tubo de borracha à direita. O sistema possui ainda uma rolha de vidro esmerilado.

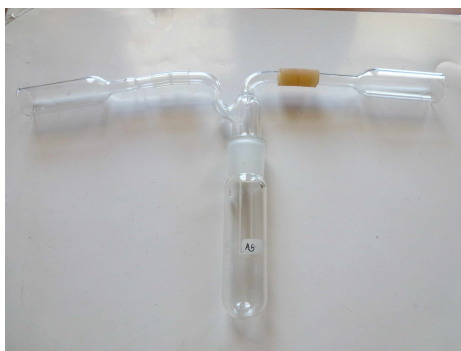


Figura ? – “Máquina de fumar”.

Este sistema é montado numa haste de metal com garra de metal e mergulhado na base do tubo numa tina de vidro (Schott Duran, 250 ml) com água destilada. A temperatura do banho é controlada com um termómetro de laboratório (até 150° C), montado noutra haste com garra de metal, devendo manter-se a $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Para aquecer o banho de água destilada e manter a sua agitação utilizou-se uma placa quente magnética (Heidolph MR3001, Germany) (Figura ??)

Todos os procedimentos foram realizados dentro de uma *hotte* para extracção de fumos.



Figura ?* – Sistema montado dentro da *hotte* de extracção de fumos.

O operador utilizou sempre uma máscara de protecção (Figura ??)



Figura ? – Máscara de protecção MolDEX.

Através desta construção é possível colocar no tubo de vidro do lado esquerdo o cigarro que vai ser “fumado”. Para simular o acto de fumar foi utilizada uma bomba de vácuo para aquário (Sera air 110 Italy, 110 l/h) acoplada a um tubo de silicone que se encosta ao filtro do cigarro, que é simultaneamente comprimido e descomprimido entre os dedos indicador e polegar da mão esquerda do operador. O fumo vai progredir no sistema e vai preencher o tubo central, que pode conter um líquido no fundo e é expelido através do tubo do lado direito para o ambiente da *hotte* que está a funcionar (Figura ?*).

Foram utilizados três tipos diferentes de cigarros (*light* = 0,6 mg nicotina; normal = 0,8 mg nicotina; cigarros produzidos manualmente pelos utilizadores a partir de tabaco normal). Após uma breve pesquisa de Mercado, foram seleccionadas as marcas de cigarros mais vendidas no momento de realização do estudo.

Será efectuada a determinação da concentração média/cigarro de nicotina numa amostragem de cigarros produzidos manualmente.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

Quadro ?? – Experiências realizadas com a “máquina de fumar”.

material a testar	volume	tabaco <i>light</i>	tabaco para fabrico manual	tabaco normal
água	500 µl	1 cigarro	1 cigarro	1 cigarro
ultra-pura		2 cigarros*	2 cigarros*	2 cigarros*
		4 cigarros*	4 cigarros*	4 cigarros*
saliva	500 µl	1 cigarro	1 cigarro	1 cigarro
não-fumador		2 cigarros*	2 cigarros*	2 cigarros*
		4 cigarros*	4 cigarros*	4 cigarros*

* - “fumados” em sequência

Um cigarro é “fumado” em 5 a 7 min. Dois cigarros em sequência são “fumados” em cerca de 12 min. Quatro cigarros em sequência são “fumados” em 21-25 min.

É necessário ter cuidado para que a cinza do(s) cigarro(s) não seja arrastada pelo sistema para dentro do tubo central, nem deixar apagar o cigarro. As paredes do tubo onde se coloca(m) o(s) cigarro(s) aquecem bastante, é necessário cuidado para não queimar os dedos do operador.

No final de cada experiência a amostra foi recolhida com uma micropipeta e colocada nos tubos de vidro de tampa roscada anteriormente descritos (para acondicionar as amostras recolhidas dos voluntários e dos doentes) e congeladas a -20^a C.

Neste momento estas amostras estão congeladas a -20^o C, para posterior estudo por LC-MS.

Outra experiência programada, utilizando este sistema, é fazer circular através da tubagem o fumo que é aspirado pelo fumador a cada vez e que será expirado para o seu interior, saindo pelo tubo do lado direito. Aos fumadores será solicitado que fumem 1 ou 2 cigarros em sequência, de acordo com os três tipos de tabaco em estudo: *light*, para confecção manual e normal. As amostras serão congeladas a -20^o C para posterior estudo por LC-MS.

Depois destas análises e de ser estabelecido e validado o protocolo mais adequado, serão efectuadas novas colheitas em doentes fumadores e não-fumadores, mas desta vez usando a técnica da pipeta esterilizada (caso haja uma boa produção de saliva) ou utilizando uma *Salivette*® (Sarstedt, ref^a SAR-511534, Germany) se a produção estiver diminuída (Figuras ??-??).



Figura ? – Salivette® e pipeta esterilizada.



Figura ? – Vários componentes da Salivette® (retirado de <http://www.google.pt/imgres?q=salivette+sarstedt&hl=pt>).



Figura ? – Demonstração de colheita de saliva usando uma Salivette® (retirado de <http://www.scimart.com/product/detail/salivette-cotton-swab-wo-prep>).

As amostras serão congeladas a -80° ou -20° C.

Ir-se-á igualmente tentar recolher fluido crevicular de doentes fumadores e não-fumadores, através da inserção de “periopaper” (Figura ??) em bolsas periodontais até se sentir um pouco de pressão, mas com muito cuidado para tentar não contaminar a amostra com sangue. O “periopaper” será depois colocado dentro de um *ependorf* estéril e congelado a -20° C.



Figura ? – “Periopaper” (retirado de <http://www.oraflow.com/Product1.html>).

Dos voluntários será também recolhida urina que será analisada para pesquisar a presença dos três compostos em estudo, dado que é o *gold standard* referido na literatura. Não se farão colheitas de sangue.

Todos os dados obtidos por esta metodologia de LC-MS srão posteriormente analisados estatisticamente. De acordo com o tipo de dados que se irão recolher e comparações entre eles a escolher, assim serão seleccionados os testes estatísticos mais adequados. O programa a utilizar será o Estatística® versão 7.1.

6. Resultados

Foram realizados espectros LC-MS dos compostos a testar.

No espectro da nicotina obtiveram-se vários picos [162,93; 131,93; 120,0; 105,93 (100); 83,93], tendo-se seleccionado os mais abundantes: 131,93 e 105,93 (100).

Para a cotinina, obtiveram-se os picos de 177; 160; 149,13; 145,93 (100); 118; 97,93; 79,93. Foram escolhidos os de 146,07 e 119,93.

Para a anabasina, que apresentou os picos de 163 (100); 146,07; 134; 119,93; 93,93; 79,87 escolheram-se os de 145,93 e 97,93.

Na sequência dos primeiros ensaios, utilizando as amostras de saliva recolhidas em voluntários e em doentes da área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, dadas as dificuldades encontradas, foram então delineados novos ensaios, anteriormente descritos (pp ??).

Após liofilização e preparação das amostras, tal como foi referido no cap. Material e Métodos, analisou-se a saliva recolhida de um voluntário não-fumador por LC-MS e obteve-se o espectro de massa da Figura ?, sendo considerado como “branco”.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

D:\Trabalhos Orgânica\...\Brancofullms
MeOH:H2O (80:20) 0.2%TFA

05/23/12 01:21:37 PM

Operator: Alexandra Gonsalves

Brancofullms #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.52E4
T: + p Full ms [50.00-2000.00]

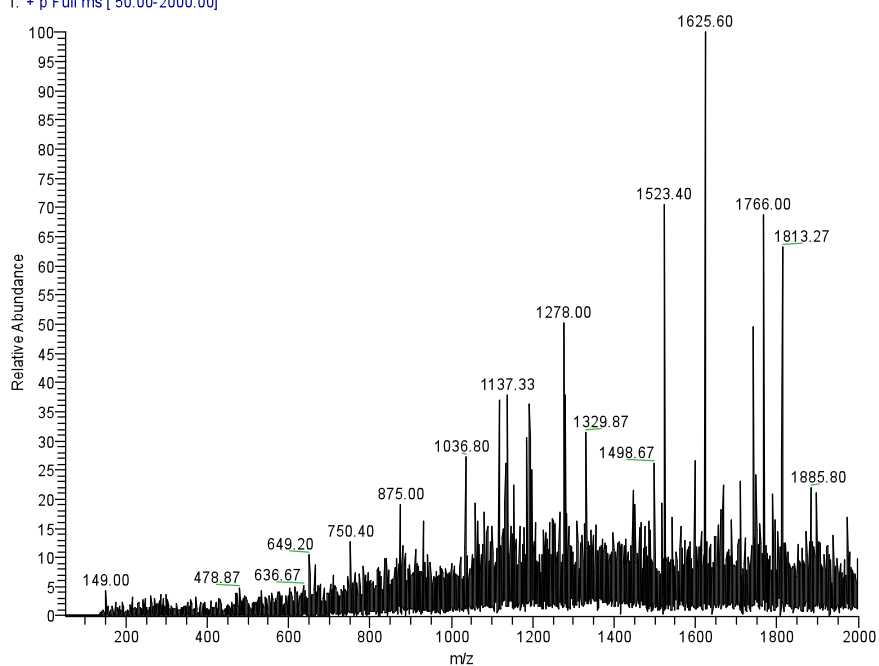


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – branco *full MS*.

Foram efectuados igualmente espectros de saliva (“branco”) no modo *selected reaction monitoring* (SRM), que permite observar o íão e os seus fragmentos, de modo a pesquisar a existência destes compostos na saliva de controlo (**Figuras ??-??**).

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

D:\Trabalhos Orgânica\...\Branconicotina
MeOH:H2O (80:20) 0.2%TFA

05/23/12 01:23:05 PM

Operator: Alexandra Gonsalves

Branconicotina #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.00E1
T: + p SRM ms2 163.00@28.00 [105.43-132.43]

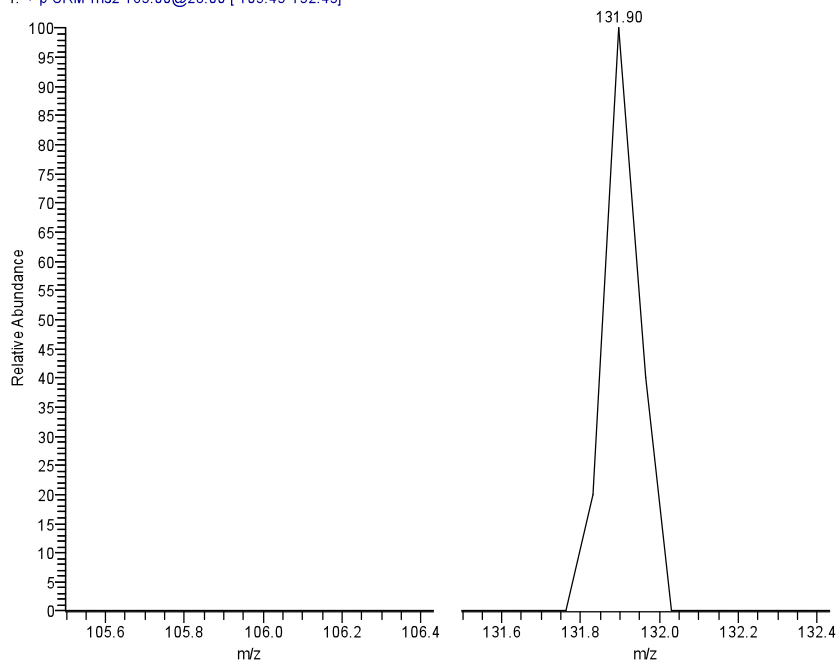


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – branco nicotina em modo SRM.

D:\Trabalhos Orgânica\...\Branconicotina
MeOH:H2O (80:20) 0.2%TFA

05/23/12 01:25:06 PM

Operator: Alexandra Gonsalves

Branconicotina #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 0
F: + p SRM ms2 177.00@34.00 [97.43-146.43]

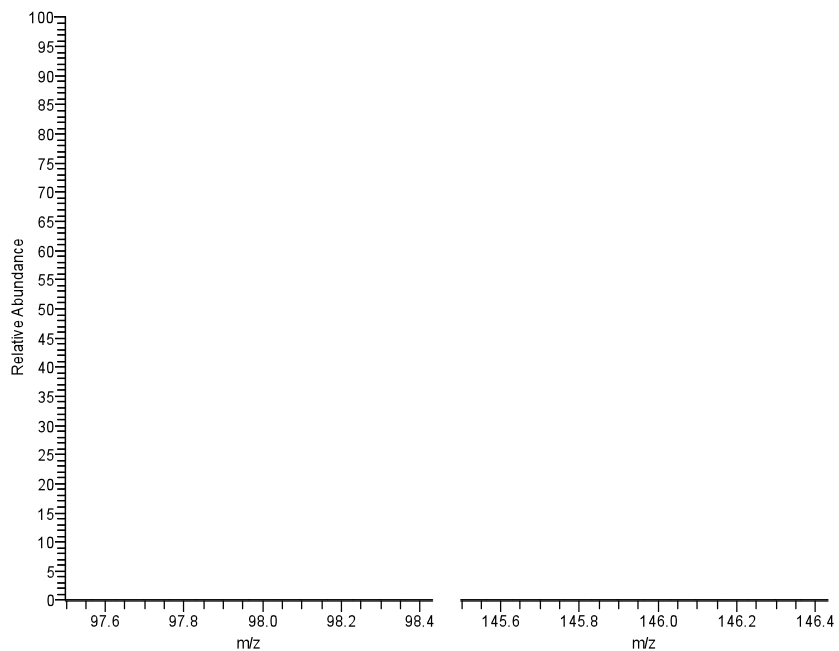


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – branco cotinina em modo SRM.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

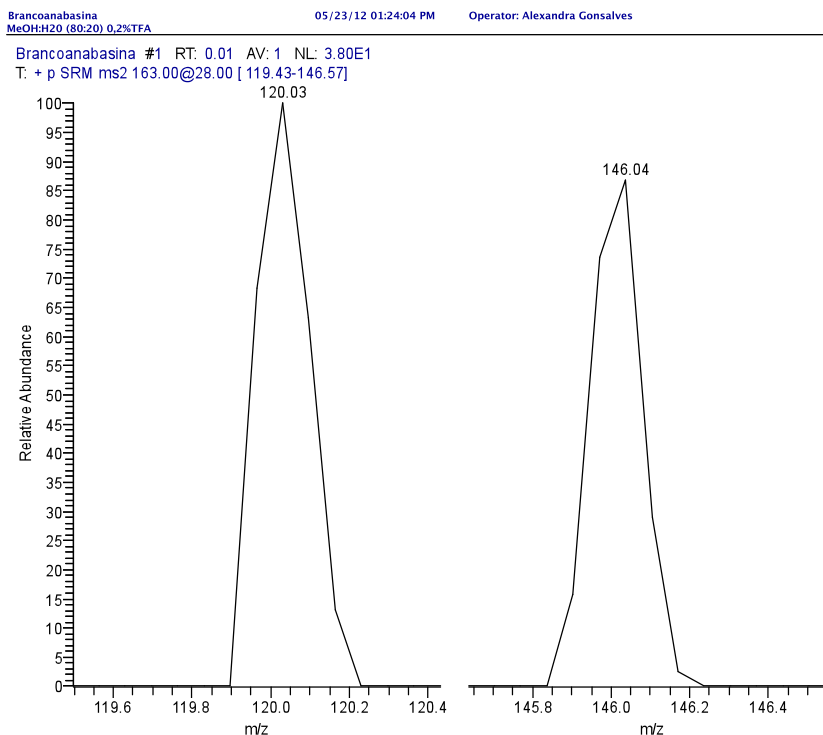


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – branco anabasina em modo SRM.

Foram igualmente analisadas amostras desta saliva “contaminada” (em simultâneo) com 0,11 mg de cada um dos compostos em estudo: nicotina, cotinina e anabasina, imediatamente após a incubação. Obtiveram-se os espectros das figuras seguintes, respectivamente para a mistura da saliva com os três compostos em modo *full MS* (Figuras ??), saliva + compostos – nicotina, cotinina e anabasina em modo SRM (Figuras ??-??),

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

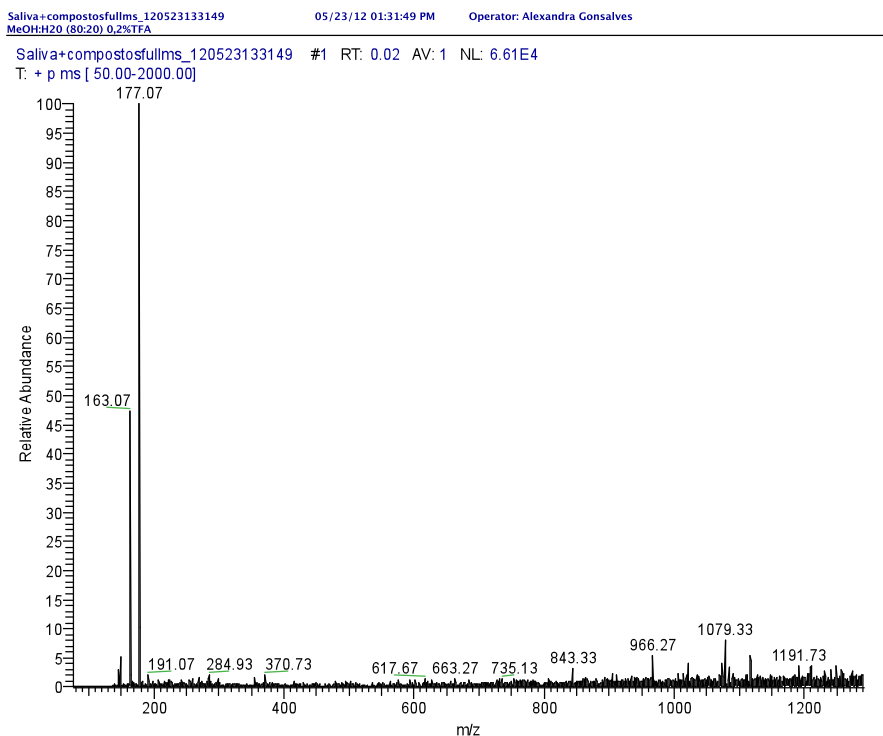


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos (nicotina, cotinina e anabasina – [0,11 mg]) *full MS*.

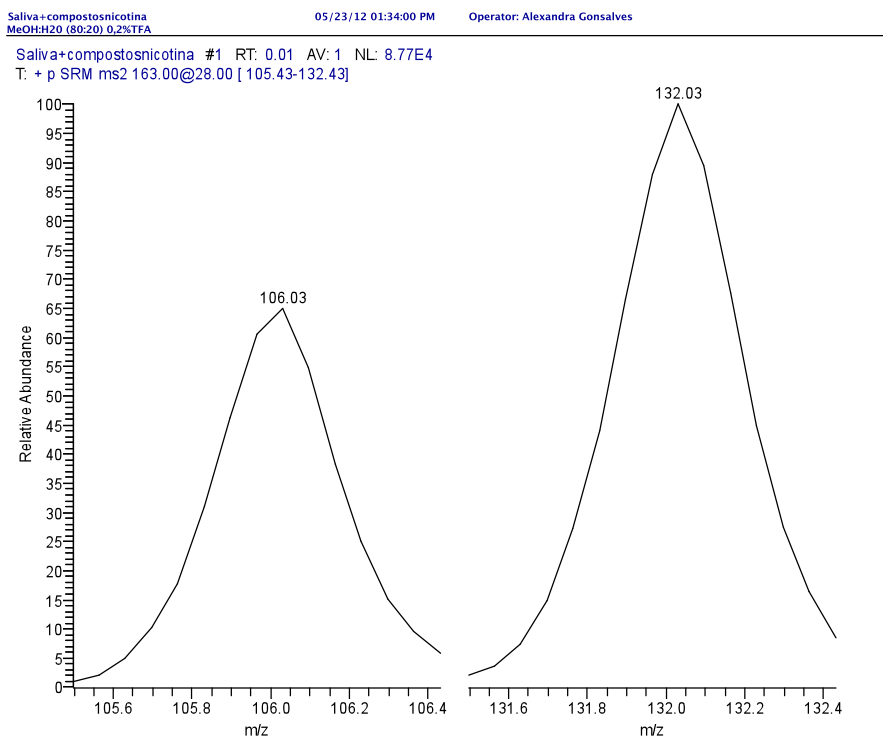


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos:nicotina 0,11 mg, em modo SRM.

Deteccão de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

Saliva+compostoscotina
MeOH:H2O (80:20) 0.2%TFA

05/23/12 01:32:51 PM

Operator: Alexandra Gonsalves

Saliva+compostoscotina #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 6.39E4
T: + p SRM ms2 177.00@34.00 [97.43-146.43]

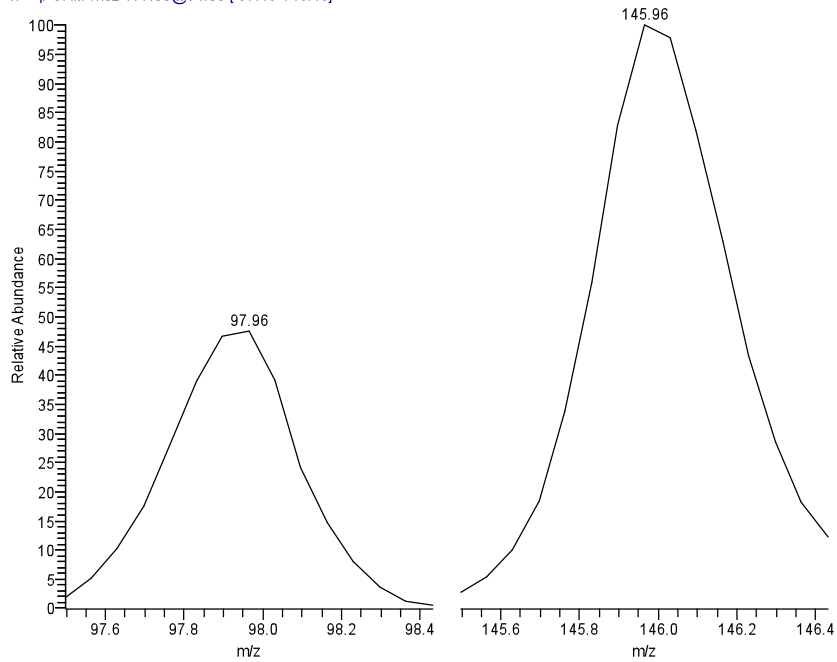


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: cotinina 0,11 mg, em modo SRM.

Saliva+compostosanabasina
MeOH:H2O (80:20) 0.2%TFA

05/23/12 01:35:17 PM

Operator: Alexandra Gonsalves

Saliva+compostosanabasina #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 7.03E4
T: + p SRM ms2 163.00@28.00 [119.43-146.57]

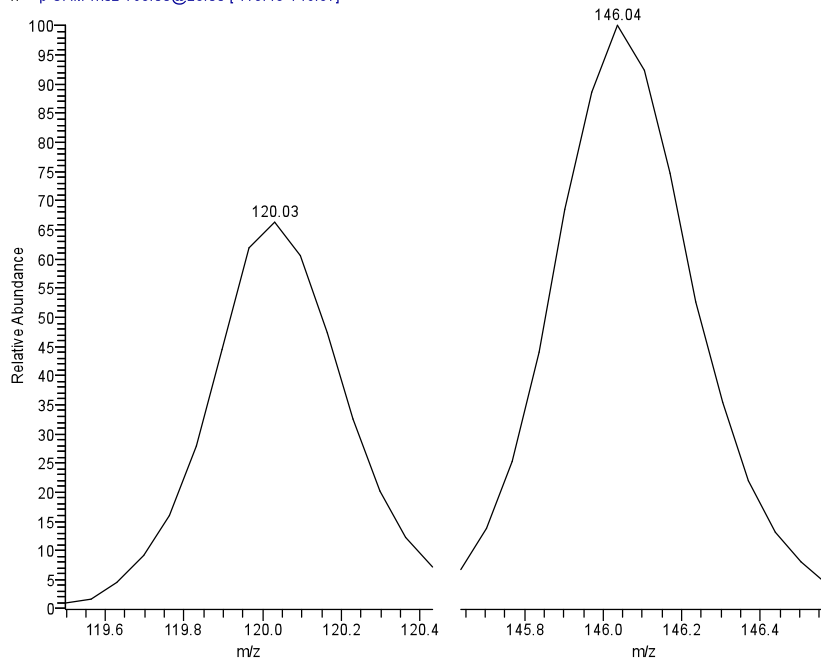


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: anabasina 0,11 mg, em modo SRM.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

Fizeram-se estudos das amostras desta saliva “contaminada” (em simultâneo) igualmente com 0,11 mg de cada um dos três compostos após 30 min de incubação a 37°C, obtendo-se os espectros das figuras seguintes, respectivamente para a mistura da saliva com os três compostos em modo *full MS* (Figura ??), saliva + compostos – nicotina, cotinina e anabasina em modo SRM (Figuras ??-??),

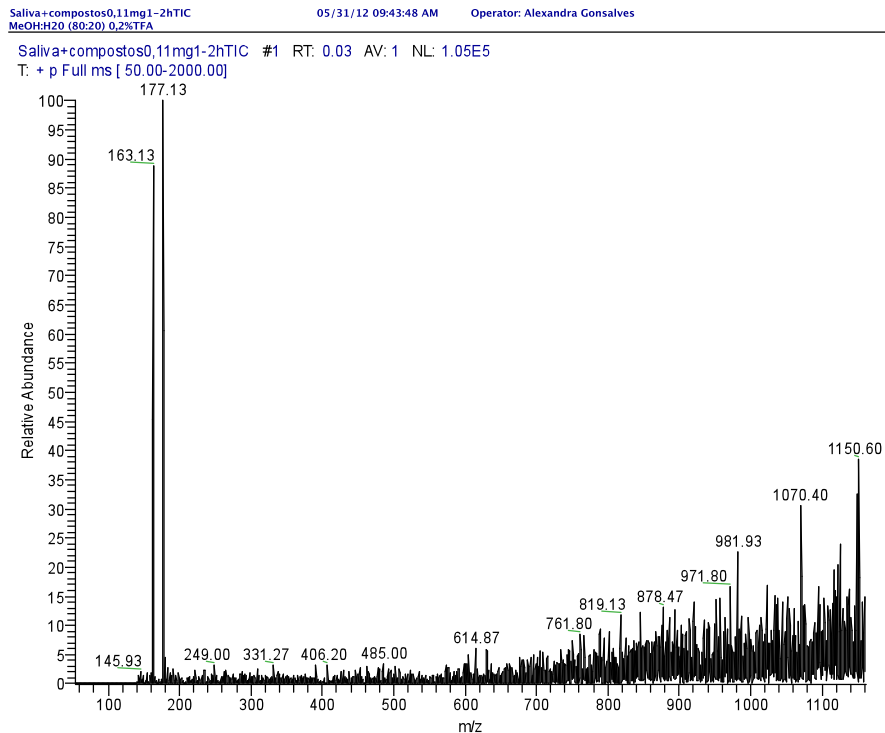


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos (nicotina, cotinina e anabasina – [0,11 mg]), 30 min de incubação a 37°C *full MS*.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

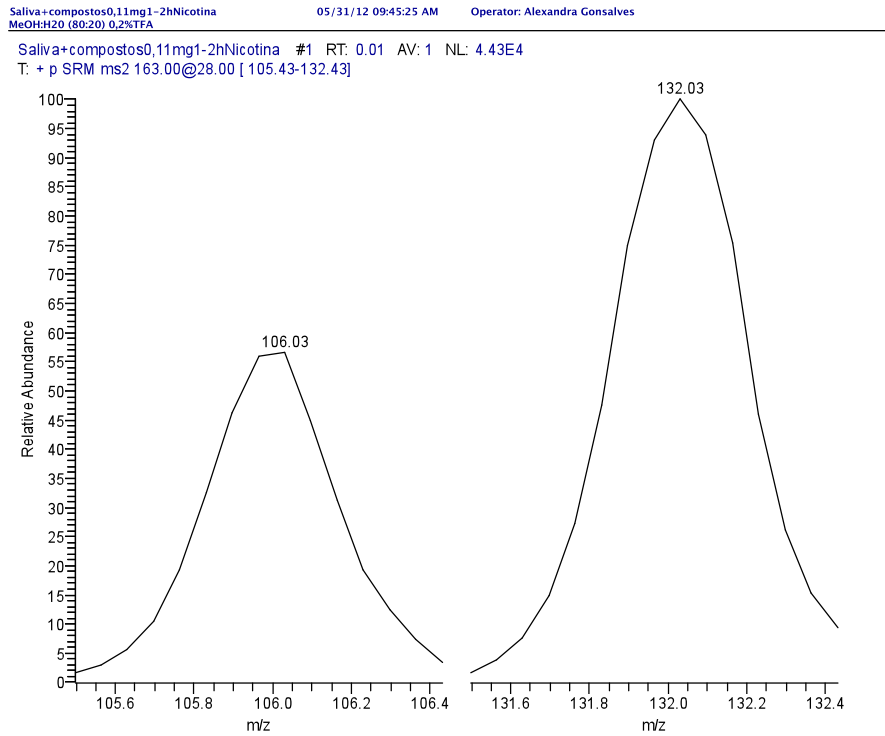


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: nicotina 0,11 mg, 30 min de incubação a 37° C em modo SRM.

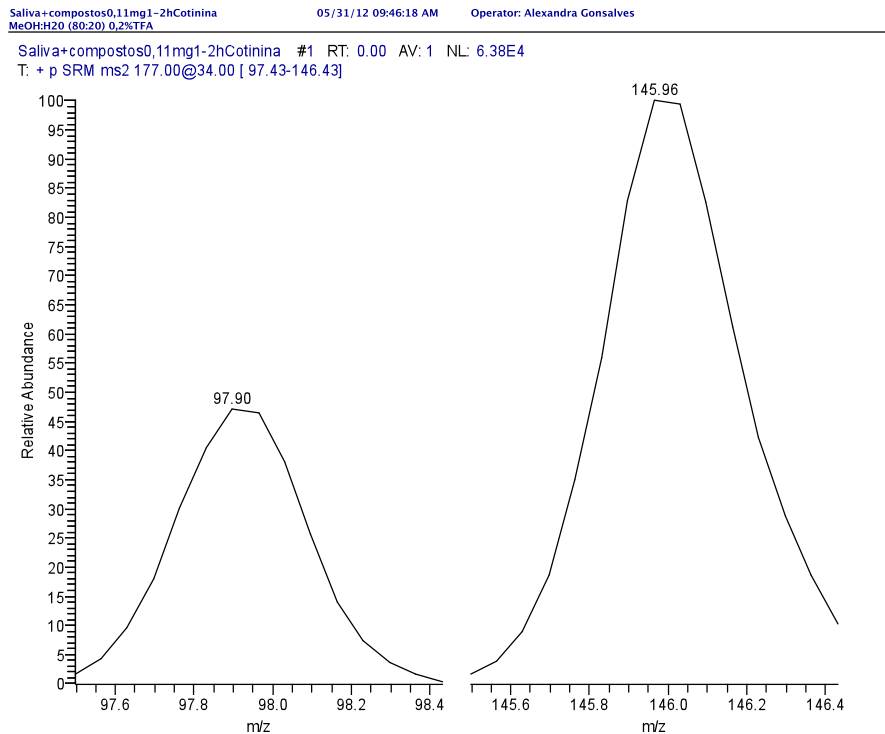


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: cotina 0,11 mg, 30 min de incubação a 37° C em modo SRM.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

Saliva+compostos0,11mg1-2hAnabasina
MeOH:H2O (80:20) 0,2%TFA

05/31/12 09:44:49 AM

Operator: Alexandra Gonsalves

Saliva+compostos0,11mg1-2hAnabasina #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 6.01E4
T: + p SRM ms2 163.00@28.00 [119.43-146.57]

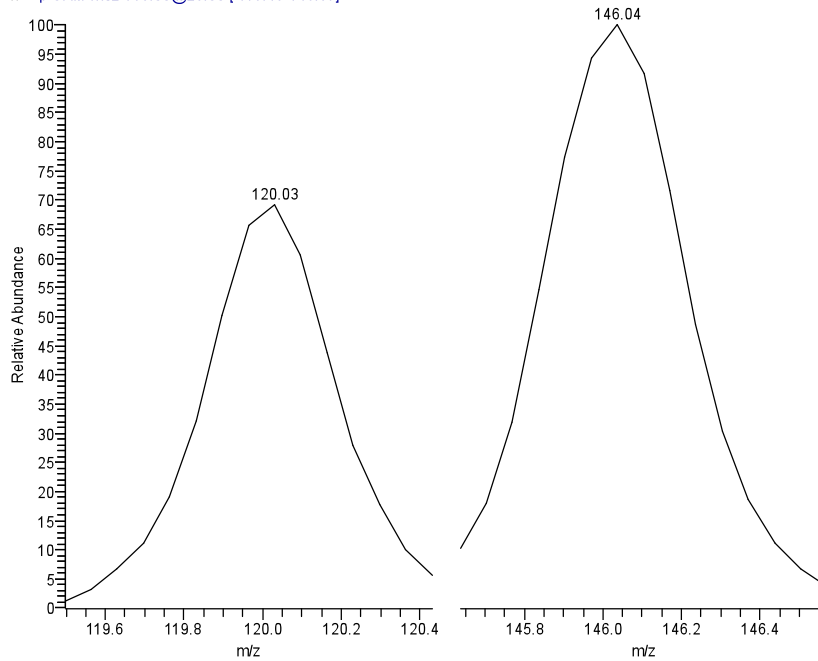


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: anabasina 0,11 mg, 30 min de incubação a 37° C em modo SRM.

Após uma incubação da saliva com os três compostos durante 4 h a 37°C, obtiveram-se igualmente espectros de massa, nas mesmas condições dos anteriores **(Figuras ??-??)**.

Deteccão de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

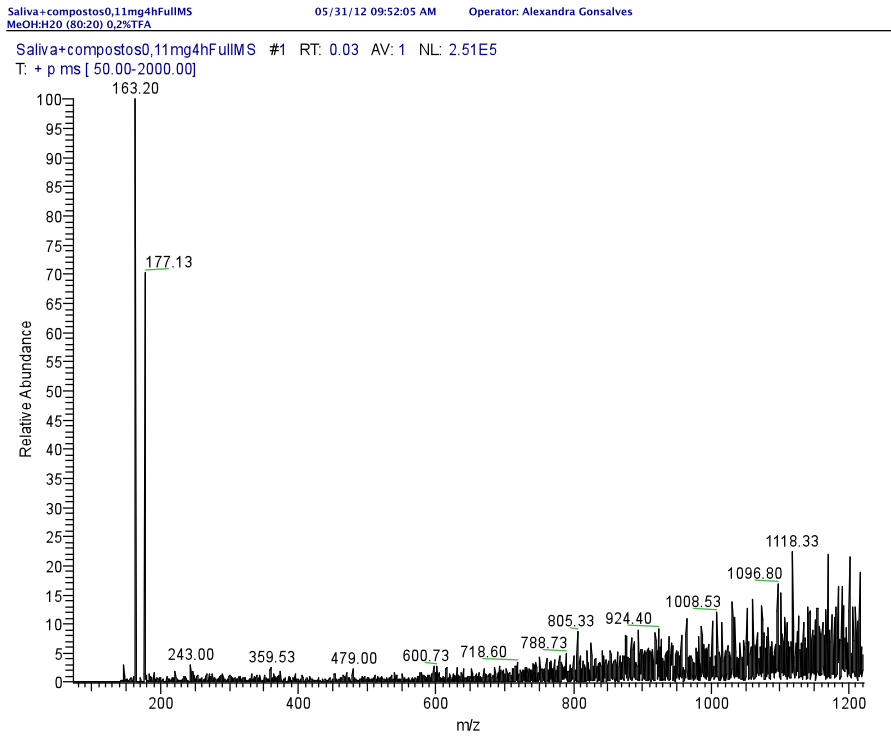


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos (nicotina, cotinina e anabasina – [0,11 mg]), 4 h de incubação a 37° C *full MS*.

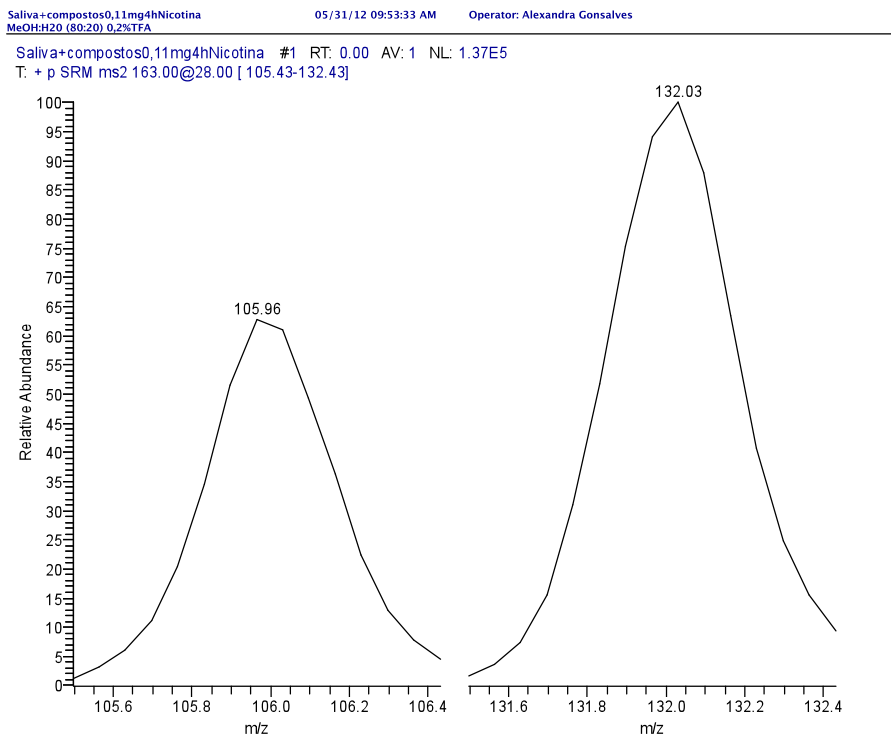


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: nicotina 0,11 mg, 4 h de incubação a 37° C em modo SRM.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

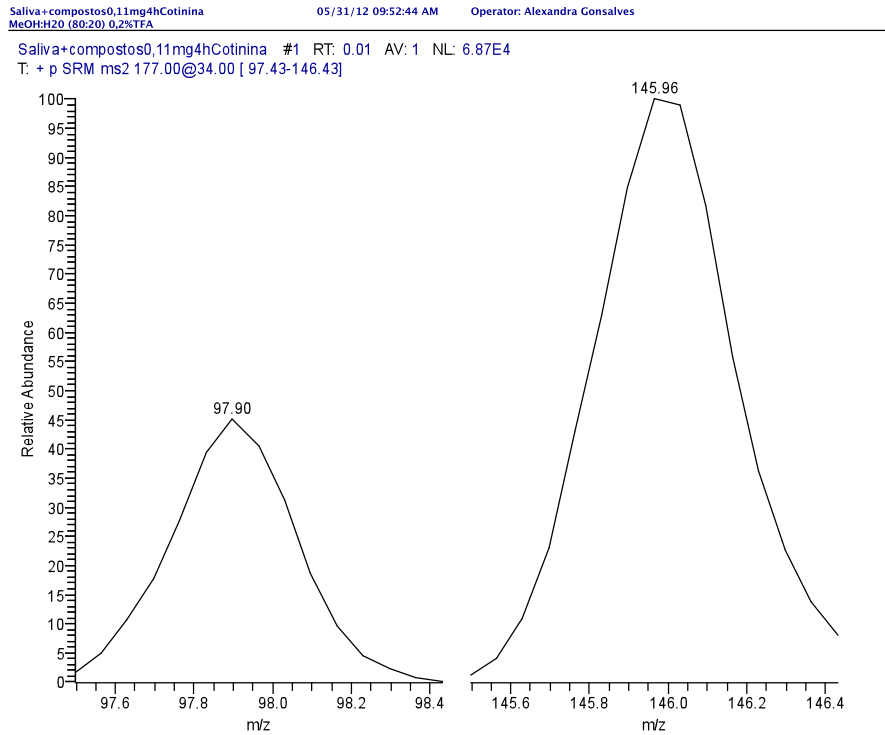


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: cotinina 0,11 mg, 4 h de incubação a 37° C em modo SRM.

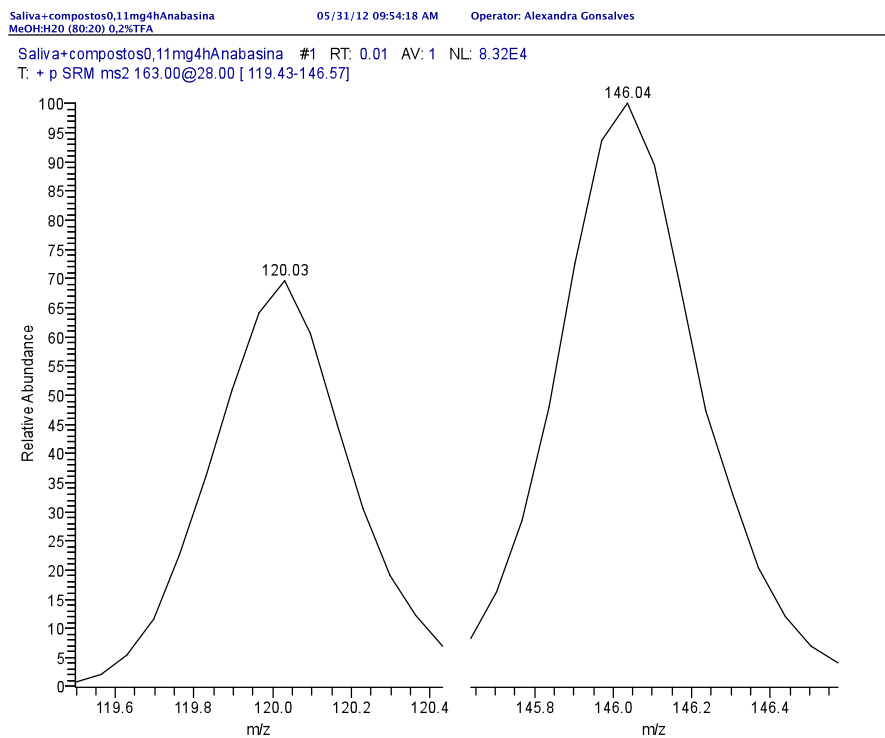


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: anabasi 0,11 mg, 4 h de incubação a 37° C em modo SRM.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

Tal como foi referido no capítulo Material e Métodos, pretende construir-se uma curva de calibração, pelo que se efectuaram mais duas concentrações: 0,0505 mg (Figuras ??-??) e 0,011 mg (Figuras ??-??), nas mesmas três condições experimentais.

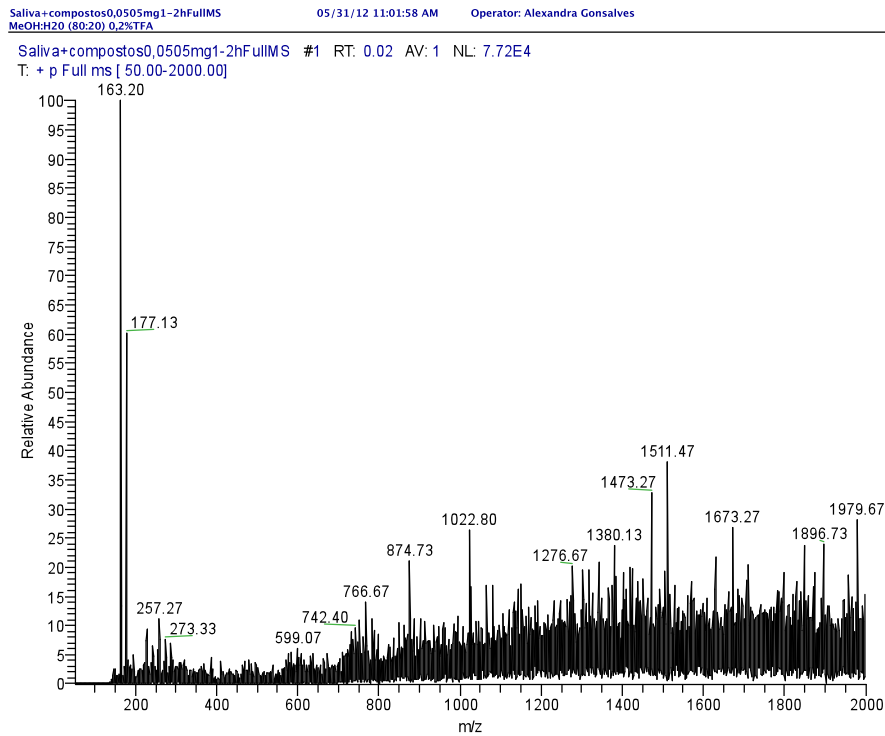


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos (nicotina, cotinina e anabasina – [0,0505 mg]), 30 min de incubação a 37° C full MS.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

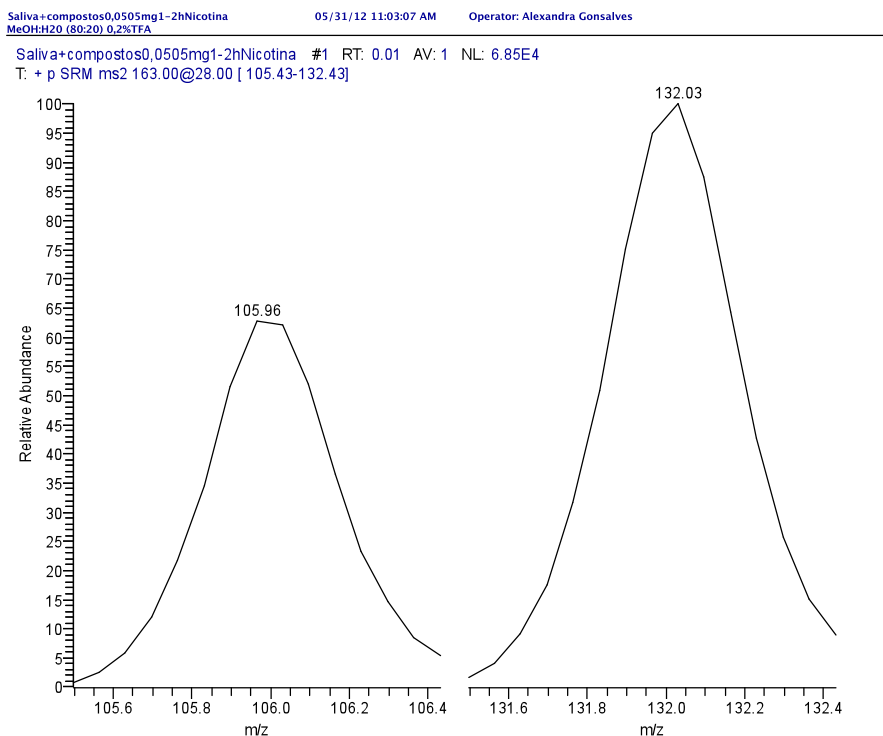


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: nicotina 0,0505 mg, 30 min de incubação a 37° C em modo SRM.

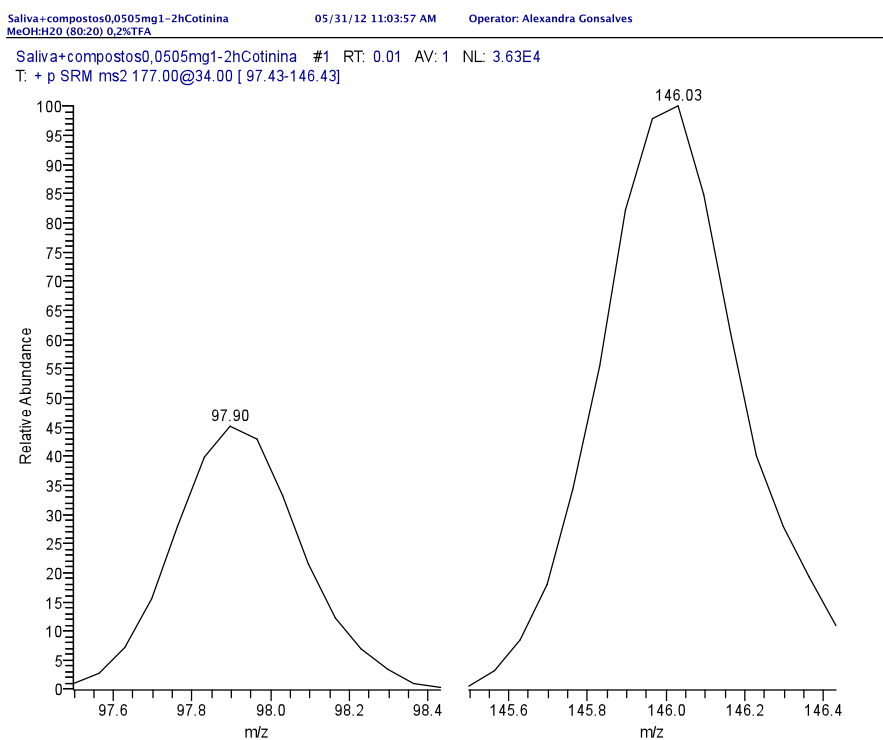


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: cotinina 0,0505 mg, 30 min de incubação a 37° C em modo SRM.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

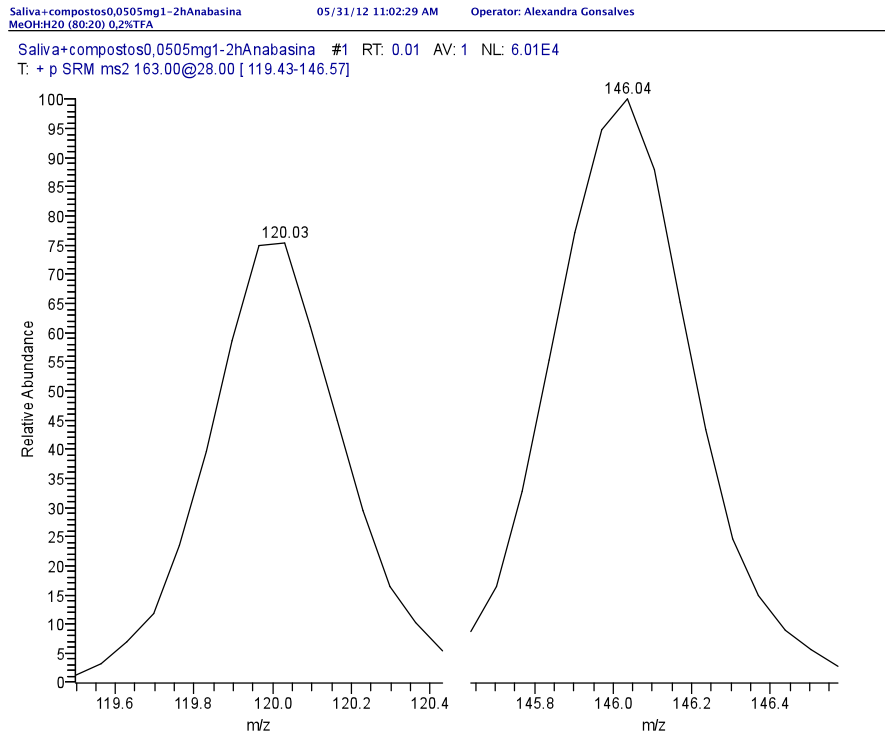


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: anabasina 0,0505 mg, 30 min de incubação a 37° C em modo SRM.

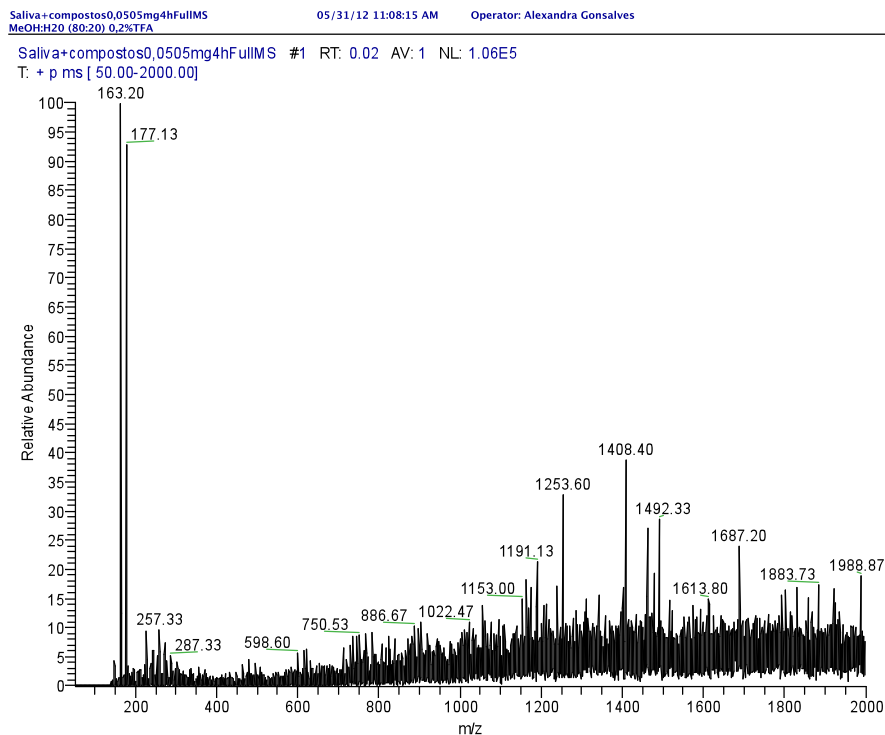


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos (nicotina, cotinina e anabasina – [0,0505 mg]), 4 h de incubação a 37° C *full MS*.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

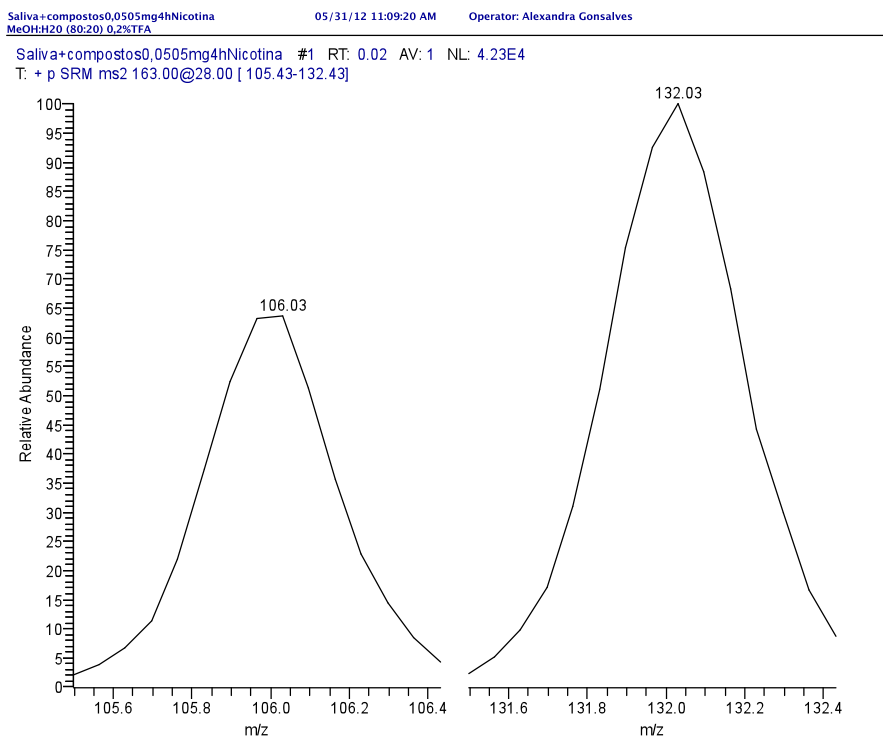


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: nicotina 0,0505 mg, 4 h de incubação a 37° C em modo SRM.

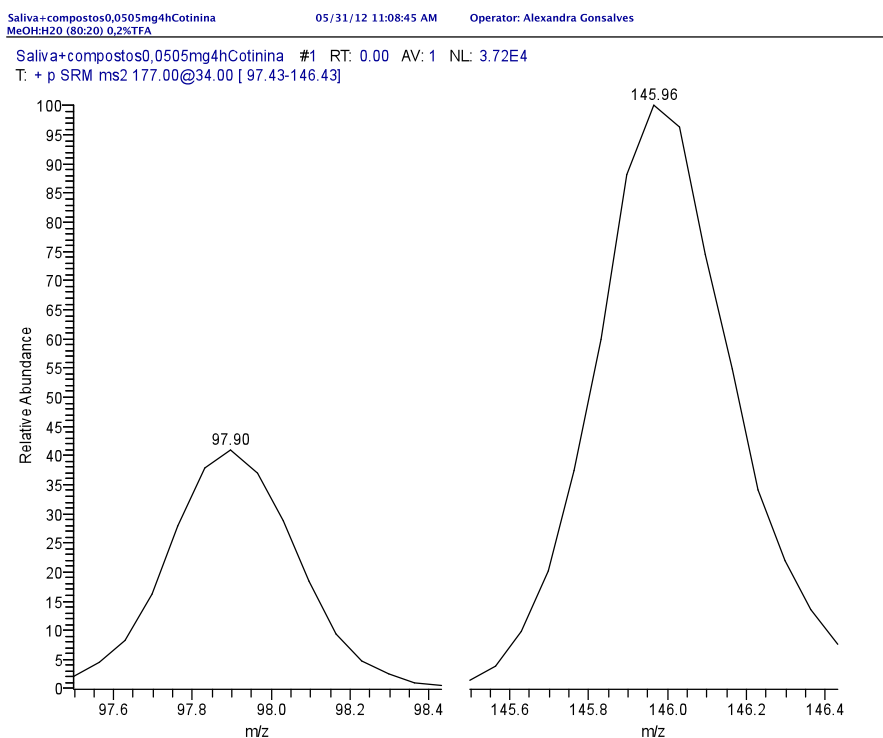


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: cotinina 0,0505 mg, 4 h de incubação a 37° C em modo SRM.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

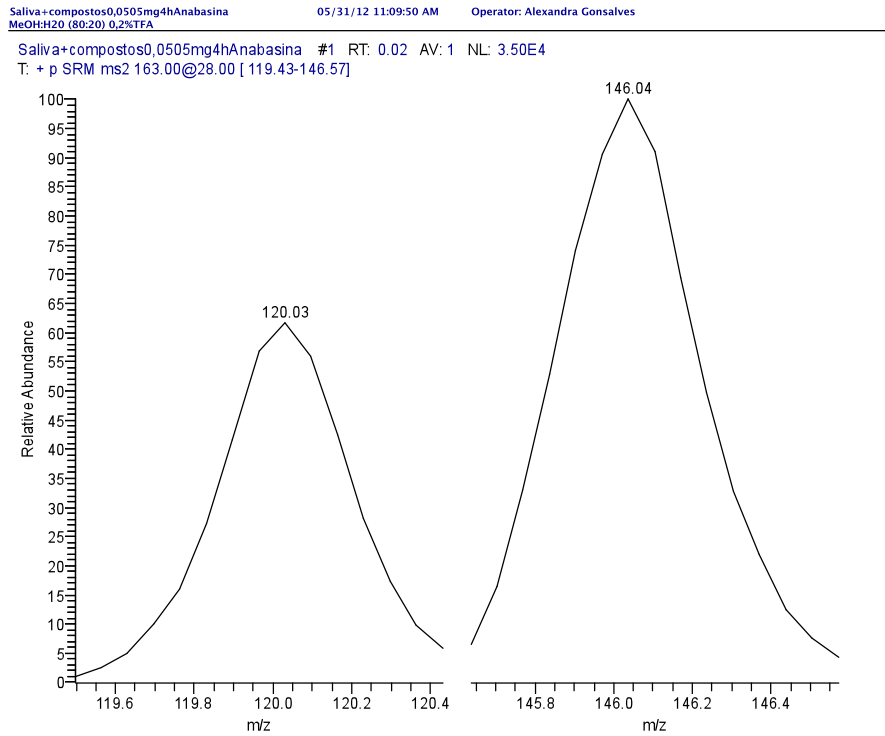


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: anabasi... 0,0505 mg, 4 h de incubação a 37° C em modo SRM.

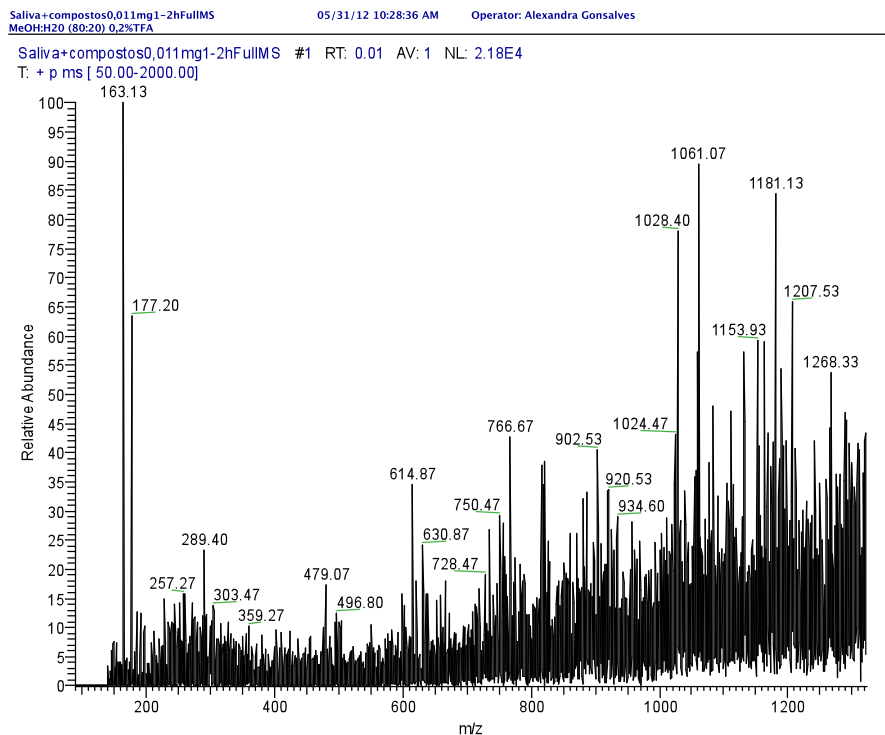


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos (nicotina, cotinina e anabasi... [0,011 mg]), 30 min de incubação a 37° C full MS.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

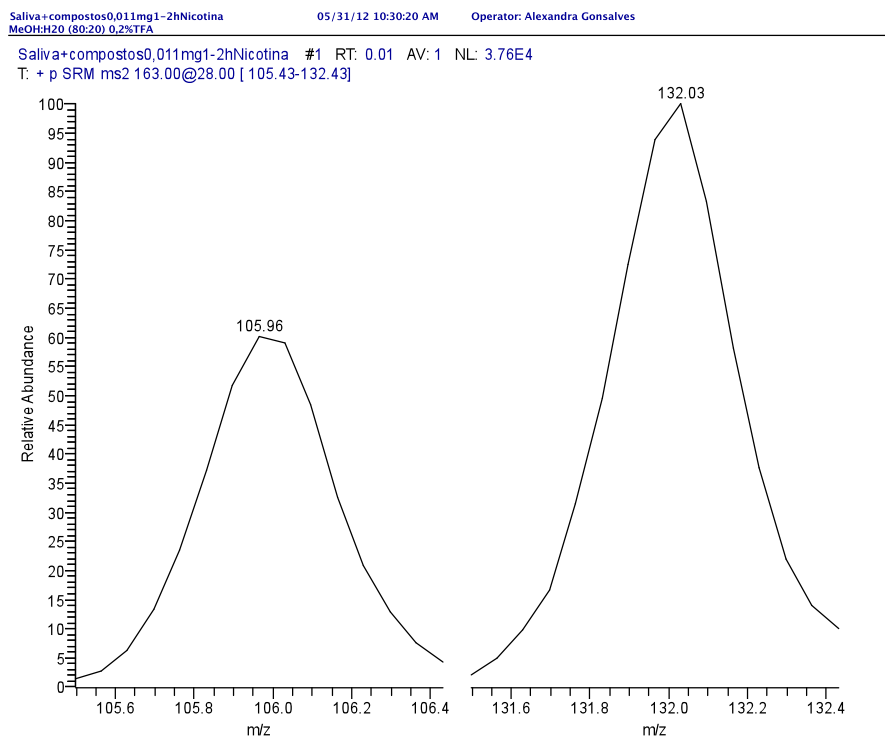


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: nicotina 0,011 mg, 30 min de incubação a 37° C em modo SRM.

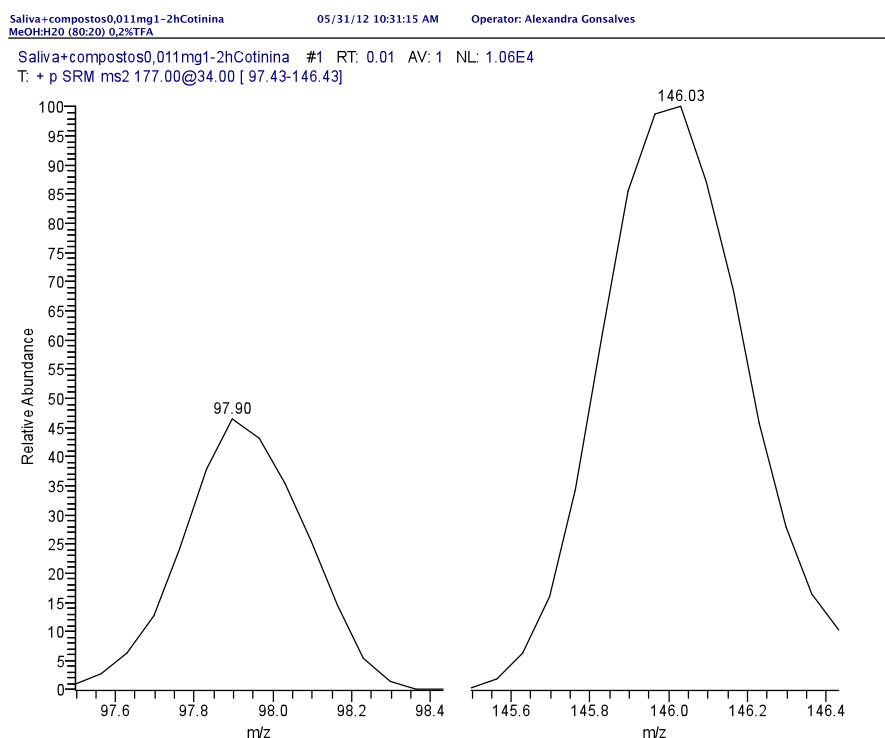


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: cotina 0,011 mg, 30 min de incubação a 37° C em modo SRM.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

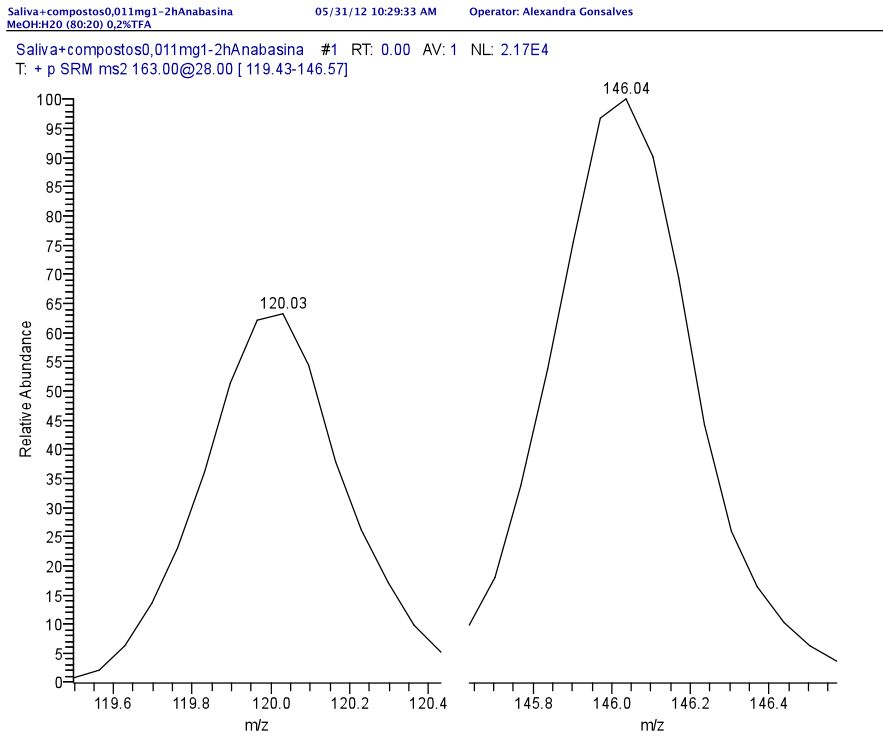


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: anabasi na 0,011 mg, 30 min de incubação a 37° C em modo SRM.

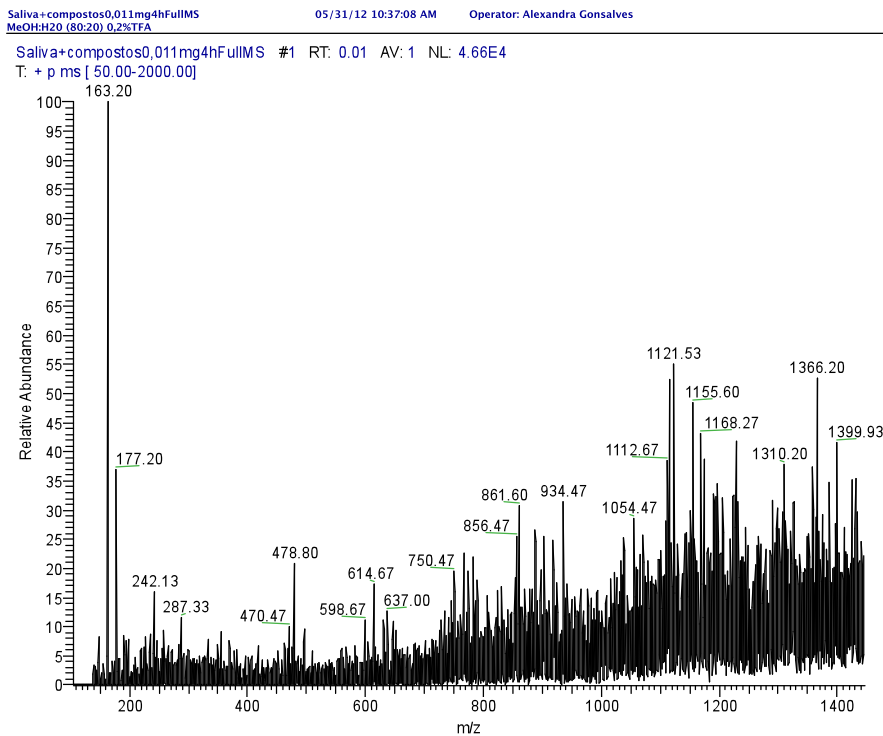


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos (nicotina, cotinina e anabasi na [0,011 mg]), 4 h de incubação a 37° C full MS.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

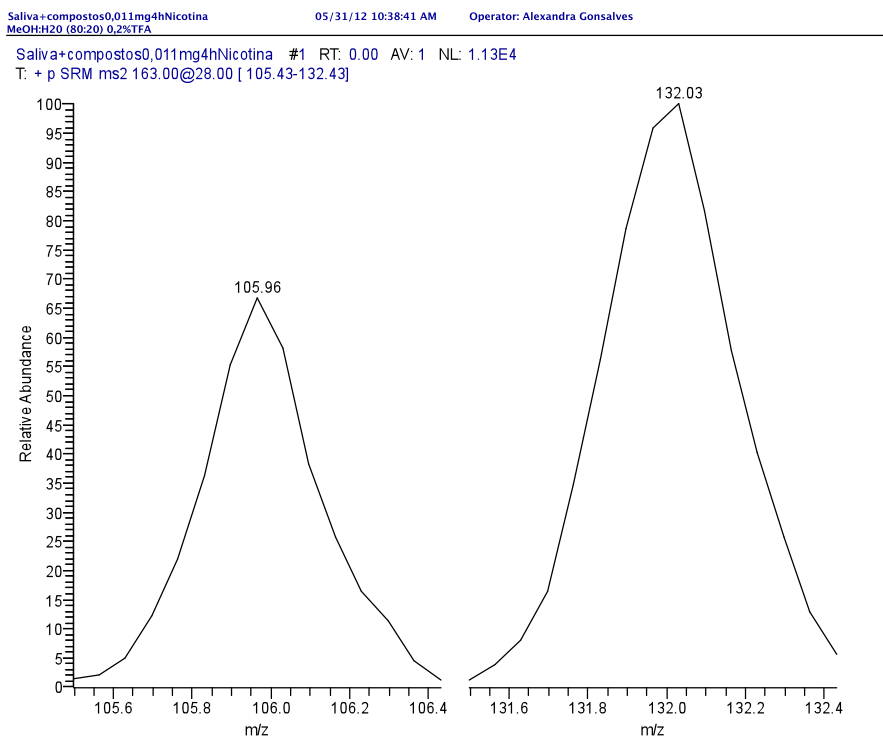


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: nicotina 0,011 mg, 4 h de incubação a 37° C em modo SRM.

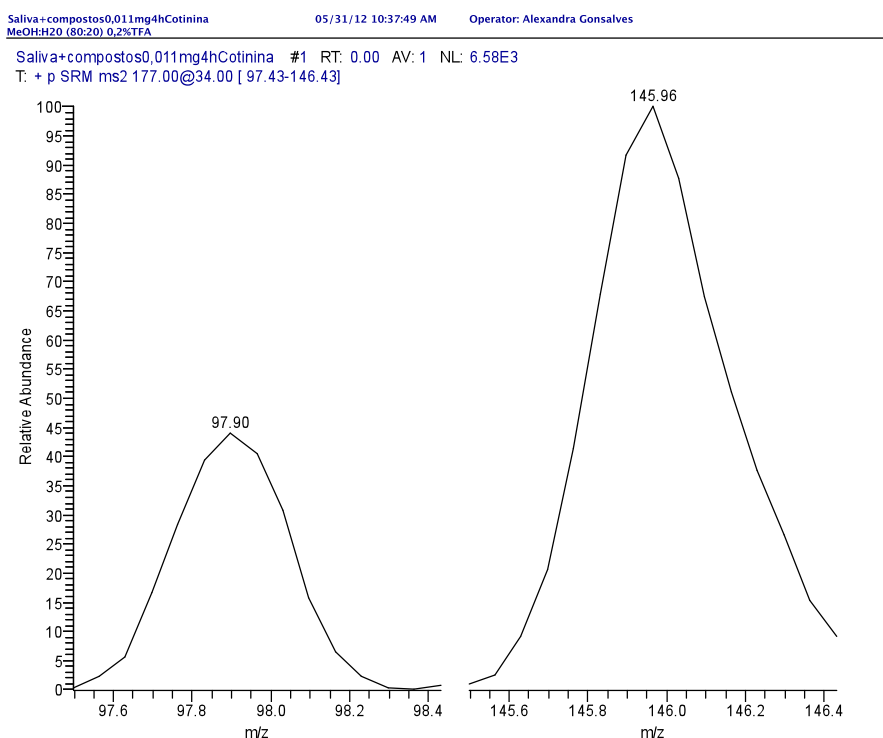


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: cotina 0,011 mg, 4 h de incubação a 37° C em modo SRM.

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

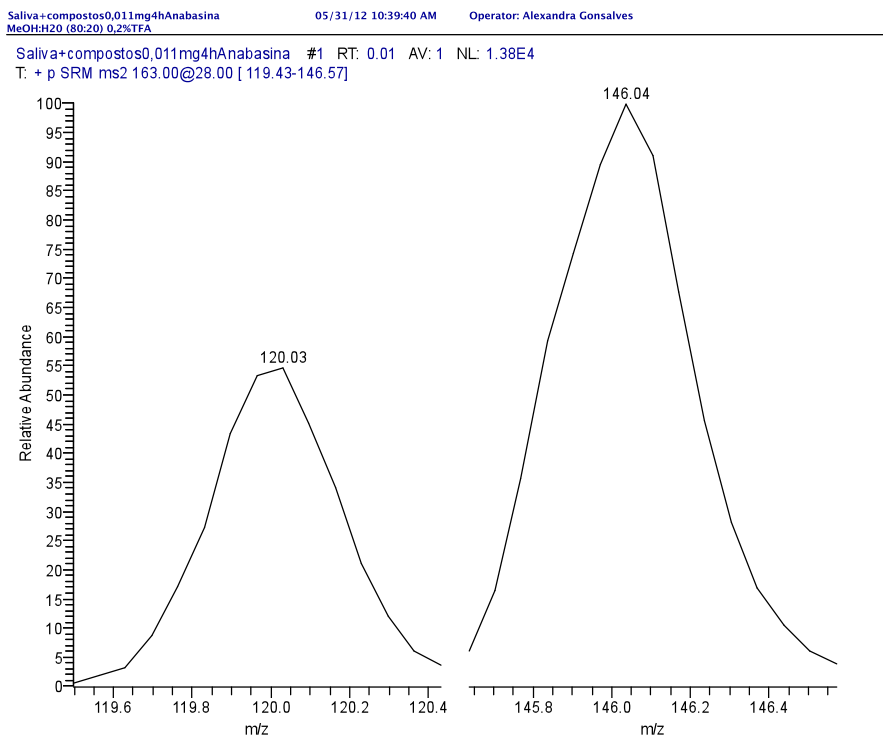


Figura ? – Espectro de LC-MS da saliva de um não-fumador – saliva+compostos: anabasina 0,011 mg, 4 h de incubação a 37° C em modo SRM.

Todo o trabalho até agora efectuado, com a excepção da recolha das amostras de saliva dos voluntários e dos doentes e sua congelação a -80°C, decorreu desde o final do mês de Maio. O equipamento chave deste trabalho esteve avariado de finais de Setembro de 2011 até Maio de 2012. Dada a dedicação que é necessário dispensar ao trabalho experimental não foi possível avançar muito na sua execução. Além disso, como trabalho experimental que é, tem inerente uma problemática de planeamento de experiências e solução sucessiva de problemas.

Está equacionada a continuação do trabalho experimental durante o mês de Agosto.

7. Discussão

O consumo de tabaco é comumente ligado ao aparecimento de problemas periodontais, embora a população em geral não demonstre estar muito alertada para este facto [32,34].

A pesquisa bibliográfica efectuada demonstra cientificamente uma importante influência principalmente do conteúdo de nicotina, sendo uma área de investigação bastante activa para comprovar uma correlação com a saúde oral.

Foi seleccionada a nicotina já que é um dos principais componentes do tabaco que se correlaciona com problemas de saúde oral [4,6,8-9,17,21]. Foram ainda escolhidos dois alcalóides, metabolitos da nicotina: a cotinina e a anabasinina, também eles bastante estudados por outros métodos analíticos no sangue, urina e saliva [4,6,8-9,17,21]. A nicotina possui uma massa molecular de 176,22, enquanto a cotinina e a anabasinina têm a mesma massa (162,23), podendo mesmo assim diferenciar-se nos espectros SRM de LC-MS.

As colheitas de saliva efectuadas com os cilindros de algodão não deram os resultados pretendidos devido ao pequeno volume de saliva obtido. Além de que a saliva fica muito concentrada em proteínas e restos celulares que se desprenderão, principalmente nos fumadores, devido à pressão que é necessário exercer durante a colheita. Os fumadores têm um débito de produção de saliva muito baixo, o que dificulta os objectivos do trabalho.

O protocolo foi alterado, tendo-se começado por efectuar determinações de espectros de massa de amostras de saliva de não-fumador para funcionar como “branco”. O modo SRM permite observar a presença do ião + fragmentos. Verificou-se que existia um pico correspondente a um dos picos mais abundantes da nicotina. Não foi encontrada cotinina na amostra, mas foram encontrados dois picos

correspondentes a anabasina. Estes resultados são consistentes com a literatura [7,10-11].

“Contaminou-se” propositadamente a saliva com três concentrações conhecidas dos três compostos seleccionados. Escolheram-se três tempos diferentes: de imediato, 30 min e 4 h depois da “contaminação” e à temperatura fisiológica. Pretendia observar-se se haverá correlação com o tempo, dada a acção das enzimas e dos microrganismos presentes na saliva.

Quando se “contaminou” a saliva do dador não-fumador com uma concentração de 0,11 mg cada um dos três compostos e se estudou de imediato, o pico de massa da nicotina (177,07) correspondia ao máximo da escala de abundância relativa (100), enquanto o pico de 163,07 (massa da cotinina e da anabasina) era de cerca de 50. Passados 30 min o valor do pico de massa 163,07 aumentou para cerca de 90, mantendo-se o de 177,07 em 100. No entanto, às 4 h pós-contaminação a 37° C o pico de 163,20 aumentou para 100 e o da nicotina (177,13) diminuiu para 70. Estes resultados estão consistentes com a literatura dada a metabolização da nicotina [7,10-11].

Para se construir uma curva de calibração efectuaram-se, para já, mais duas diluições: 0,0505 mg e 0,011 mg.

Diminuindo a concentração da nicotina e dos seus metabolitos em estudo para 0,0505 mg, aos 30 min o pico correspondente à massa da cotinina e anabasina está no máximo e o da nicotina em cerca de 60. Às 4 h o valor da nicotina aproximou-se dos 93. Provavelmente será conveniente verificar este resultado.

No estudo com 0,011 mg o valor do pico da nicotina é semelhante ao obtido para a diluição anterior, enquanto às 4 h desce para os 38.

Parece haver um efeito de concentração para valores mais altos e mais baixos. Terá de se calcular a área dos picos para se fazer a interpretação dos resultados.

Até ao momento os produtos das experiências já realizadas estão congeladas a -20°C e aguardam para ser estudados.

9. Conclusões

É possível observar os compostos escolhidos em amostras de saliva.

Os resultados obtidos estão de acordo com os dados da literatura no que diz respeito à diminuição da nicotina e aumento de um ou dois outros dois compostos: cotinina e anabasina.

O trabalho orienta-se no sentido, pelo menos assim parece, de podermos conseguir atingir o objectivo principal deste trabalho que é elaborar um protocolo de estudo de um fluido biológico de fácil colheita e sem tantos problemas de manipulação laboratorial e obtenção de resultados fiáveis e sensíveis através de uma técnica qualitativa e quantitativa de alta precisão.

O trabalho exige uma grande dedicação mas é extremamente aliciante e, se obtivermos bons resultados, poderá ser importante científica e clinicamente.

Caso seja possível gostaríamos de poder publicar resultados deste trabalho, em colaboração com todos os intervenientes e Instituições respectivas.

O tabaco é um dos factores de risco passível de ser modificado, de modo a prevenir o aparecimento de lesões periodontais.

10.Agradecimentos

À minha Orientadora, Profª Doutsabel Poiares Baptista,

Ao meu Co-orientador, Prof. Doutor António da Rocha Gonçalves,

À Profª Doutora Alexandra

À Mestre Bárbara Oliveiros pela ajuda no estudo estatístico dos resultados.

À Mestre Catarina Santos

À Mestre Sílvia Gramacho ...

Ao Dr. Francisco Marques, da área de Medicina Dentária da FMUC, à Drª Hilda ??? e Profª Doutora Isabel Carreira, do Instituto de Biologia Médica da FMUC, pelos esclarecimentos prestados e cedência de material indispensável à concretização da recolha de amostras.

Ao Prof. Doutor António Cabrita, regente da disciplina de Projecto de Investigação, pelo seu apoio na resolução de todas as situações burocráticas.

Aos meus amigos e voluntários!! ...

À Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pelo material bibliográfico disponibilizado.

10. Referências Bibliográficas

Estão por ordem de ano e por área – a mudar no final

- 1- Solomon HA, Priore RL, Bross IDJ. Cigarette smoking and periodontal disease. *JADA*1968, **77**(11):1081-84.
- 2- Bastiaan RJ (1979). The effects of tobacco smoking on periodontal Tissues. *J Wes Soc Period Period Abst* 1979, **27**(4):120-25.
- 3- Herning RI, Jones RT, Benowitz NL, Mines AH. How a cigarette is smoked determines blood nicotine levels. *Clin Pharmacol Ther*1983,**33**(1):84-90.
- 4- Baab DA, Öberg PÄ. The effect of cigarette smoking on gingival blood flow in humans. *J Clin Periodontol* 1987,**14**:418-24.
- 5- Palmer RM. Tobacco smoking and oral health. *BDJ* 1988, **23**:258-60.
- 6- Cuff MJA, McQuade MJ, Scheidt MJ, Sutherland DE, Van Dyke TE. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Peridontol* 1989, **60**(1):564-69.
- 7- McGuire JR, McQuade MJ, Rossmann JA, Garnick JJ, Sutherland DE, Scheidt MJ, Van Dyke TE. Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. *J Peridontol* 1989, **60**(4):176-81.
- 8- Hanes PJ, Schuster GS, Lubas S. Binding, uptake, and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Peridontol* 1991, **62**:147-52.
- 9- Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Peridontol* 1993, **64**(1):16-23.
- 10- Jacob III P, Yu L, Liang G, Shulgin AT, Benowitz NL. Gás chromatographic-mass spectrometric method for determination of anabasine, anatabine, and other tobacco alkaloids in urine of smokers and smokless tobacco users. *J Chromat* 1993, **619**:49-61.
- 11- González YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, De Nardin E. Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res*1996, **75**(2):796-802.
- 12- Benowitz NL. Cotinine as a biomaker of environmental tobacco exposure. *Epidemiol Rev*1996, **18**(2):188-204.

- 13- Benowitz NL. Biomarkers of cigarette smoking. *Smoking and Tobacco Control Monographs*, nº7, Chap. 7, 19??,??, USA, pp 93-111.
- 14- Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Ann Periodontol* 1998, **3**:88-101.
- 15- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999, **4**:1-6.
- 16- Gelskey SC. Cigarette smoking and periodontitis: methodology to assess the strength of evidence in support of a causal association. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999, **27**:16-24.
- 17- Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1999, **26**:353-57.
- 18- Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000, **71**:1874-81.
- 19- Johnson NW, Bain CA and co-authors of the EU-Working group on Tobacco and Oral Health. Tobacco and oral disease. *BDJ* 2000, **189**(4):200-6.
- 20- Bergström J, Eliasson S, Dock J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol* 2000, **71**:1338-47.
- 21- Chang YC, Lii CK, Tai KW, Chou MY. Adverse effects of arecoline and nicotine on human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol* 2001, **28**:277-82.
- 22- Chen X, Wolff L, Aeppli D, Guo Z, Luan W-M, Baelum V, Fejeskov O. Cigarette smoking, salivary/gingival crevicular fluid cotinine and periodontal status: a 10-year longitudinal study. *J Clin Periodontol* 2001, **28**:331-39.
- 23- Gamal AY, Bayomy MM. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol* 2002, **29**:763-70.
- 24- Jansson L, Lavsted S. Influence of smoking on marginal bone loss and tooth loss – a prospective study over 20 years. *J Clin Periodontol* 2002, **29**:750-56.
- 25- Calsina G, Ramon J-M, Echeverria J-J. Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol* 29:771-976.
- 26- Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2004, **34**:9-21.
- 27- Petropoulos G, McKay IJ, Hughes FJ. The association between neutrophil numbers and interleukin-1 concentration in gingival crevicular fluid of smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004, **31**:390-95.

- 28- Nakazawa A, Shigeta M, Ozasa K. Smoking cigarettes of low nicotine yield does not reduce nicotine intake as expected: a study of nicotine dependency in Japanese males. *BMC Public Health* 2004, **4**:28-36.
- 29- Razali M, Palmer RM, Coward P, Wilson RF. A retrospective study of periodontal disease severity in smokers and non-smokers. *BDJ* 2005, **196**:495-98.
- 30- Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005, **32**(Suppl 6):180-95.
- 31- Yamamoto Y, Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Matsuse R, Nakayama K, Morimoto E, Shizukuishi S. Association between passive and active smoking evaluated by salivary cotinine and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005, **32**:1041-46.
- 32- Martinez AET, Silvério KG, Fogo JC, Kirkwood KL, Rossa Jr C. Root surface conditioning with nicotine or cotinine reduces viability and density of fibroblasts in vitro. *Clin Oral Invest* 2005, **9**:180-86.
- 33- Lung ZHS, Kelleher MGD, Porter RW, Gonzalez J, Lung RFH. Poor patient awareness of the relationship between smoking and periodontal diseases. *BDJ* 2005, **199**:731-37.
- 34- Leow N, Morel-Kopp MC, Chen Q, Tofler G, Taylor B. The relationship between smoking, cotinine and periodontal disease in an Australian population. *Eur J Oral Sci* 2007: **manuscript copy, courtesy of the AA**.
- 35- Rosseel JP, Jacobs JE, Hilberink SR, Maassen IM, Allard RHB, Plasschaert AJM, Grol RPTM. Summary of: what determines the provision of smoking cessation advice and counselling by dental care teams? *BDJ* 2009, **206**:376-7.
- 36- Pindborg JJ. Tobacco and gingivitis. *J Dent Res* 1947, **26**:261-4.
- 37- Pindborg JJ. Tobacco and gingivitis.II. Correlation between consumption of tobacco, ulceromembranous gingivitis and calculus. *J Dent Res* 1949, **28**:460-3.
- 38- Frandsen A, Pindborg JJ. Tobacco and gingivitis. III. Difference in the action of cigarette and pipe smoking. *J Dent Res* 1949, **28**:464-5.
- 39-

R:

- 1- Johnson N. Tobacco Use and Oral Cancer: A Global Perspective. *Journal of Dental Education* 2001 April; 65 (4): 328-328.

- 2- Robert A, Blanchart RH, editors. Oral Cancer – The Dentist`s Role in Diagnosis, Management, Rehabilitation and Prevention. Quintessence Publishing Co Inc 2000.
- 3- Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM. Dual-agent Molecular Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Combining Anti-EGFR Antibody with Tyrosine Kinase Inhibitor. American Association for Cancer Research 2012 January 7; 5355-5362.
- 4- Pelucchi C, Silvano G, Garavello W, Bosetti C, Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. Alcohol Research & Health 2006; 29 (3): 193-198.

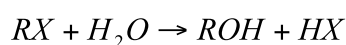
Anexo I

Anexo II

Dada a sua origem biológica e composição, principalmente devido à presença de enzimas e microrganismos e à temperatura (cerca de 37°C) do material colhido, há várias reacções de degradação possíveis dos compostos.

Hidrólise

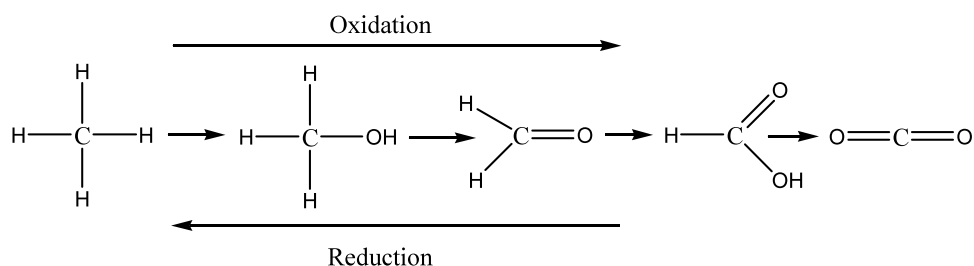
A hidrólise é a reacção de degradação mais comum, tanto em solução como no estado sólido.



Embora as reacções de hidrólise possam ocorrer apenas na presença de água pura, são geralmente catalisadas por ácidos e por bases [1, 5 Alex]. A hidrólise ocorre principalmente quando existe um átomo electrofílico, geralmente um carbono carbonílico ligado a um grupo facilmente eliminável.

Oxidação

Os processos de oxidação correspondem a uma importante via de degradação, tanto em amostras líquidas como em sólidas [5, 22 Alex]. A presença de oxigénio atmosférico pode levar à conversão em espécies de estado de oxidação superior como se ilustra a seguir para compostos carbonados, sendo alguns grupos funcionais mais sensíveis do que outros:



Fotodegradação

A fotodegradação, como a designação implica, é a reacção de degradação pela acção da luz, isto é, de uma radiação electromagnética. A exposição à luz ultravioleta ($\lambda \sim 200\text{-}400\text{nm}$) ou visível ($\lambda \sim 400\text{-}800\text{nm}$) pode induzir uma série de reacções químicas como resultado da quebra de ligações covalentes [5 alex], uma vez que a energia destes fótons tem uma magnitude comparável à das ligações das moléculas orgânicas [31 alex].

Espectrometria de massa – revisão histórica

O princípio básico da espectrometria de massa (MS) é gerar iões a partir de compostos inorgânicos ou orgânicos através de um método adequado, separar estes iões pela sua razão massa – carga (m/z) e detectá-los qualitativa e quantitativamente através da sua m/z e abundância [38 alex].

A primeira experiência que originou esta técnica, hoje designada espectrometria de massa, foi efectuada por J.J. Thomson, prémio Nobel da Física em 1906, para estudar a condução eléctrica em gases enquanto investigava as propriedades dos raios positivos. Nesta experiência foi feita a ionização de átomos de Ne, tendo sido separados os isótopos ^{22}Ne e ^{20}Ne [39, 40 alex]. Estes foram os primeiros passos de uma metodologia actual, que se tornou extremamente importante do ponto de vista analítico e estrutural.

A ionização electrónica e a focagem magnética foram desenvolvidas por Dempster (1918) e Aston (1919) para medir massas atómicas através de MS [41 alex]. Nas primeiras três décadas do séc XX, Aston et col. redesenharam os equipamentos para aumentar a resolução e começaram a usá-los para separar e provar a existência de isótopos dos elementos. Até 1940's os físicos dominaram o campo da MS, usando a técnica principalmente para resolver questões relacionadas com a natureza fundamental do átomo. Só pelos anos 40 a MS foi comercializada e se tornou útil para os físicos e químicos industriais [42 alex].

Nos anos 1980's, pequenas moléculas orgânicas eram analisadas por rotina através de MS. O grande desafio era analisar moléculas mais pesadas, tais como proteínas, ácidos nucleicos e glúcidos complexos. No entanto, para conseguir tais resultados seria necessário "fazer voar elefantes moleculares", como disse John Fenn, Prémio Nobel da Química em 2002, devido ao desenvolvimento do *electrospray* (ESI). Em 1983, Tanaka, Karas e Hillenkamp desenvolveram a técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI). Estas duas técnicas, ESI e MALDI tornaram então possível a análise de grandes biomoléculas [41, 42 alex].

Espectrometria de massa – teoria

A espectrometria de massa permite determinar a massa de uma molécula medindo a relação massa-carga (m/z) dos seus iões. Isto significa que para realizar uma experiência deste tipo é necessário ionizar as moléculas, separar estes iões e detectá-los. Todos os espectrómetros de massa têm em comum o conjunto básico de: fonte de ionização, analisador de massa e detector (Fig. ??).

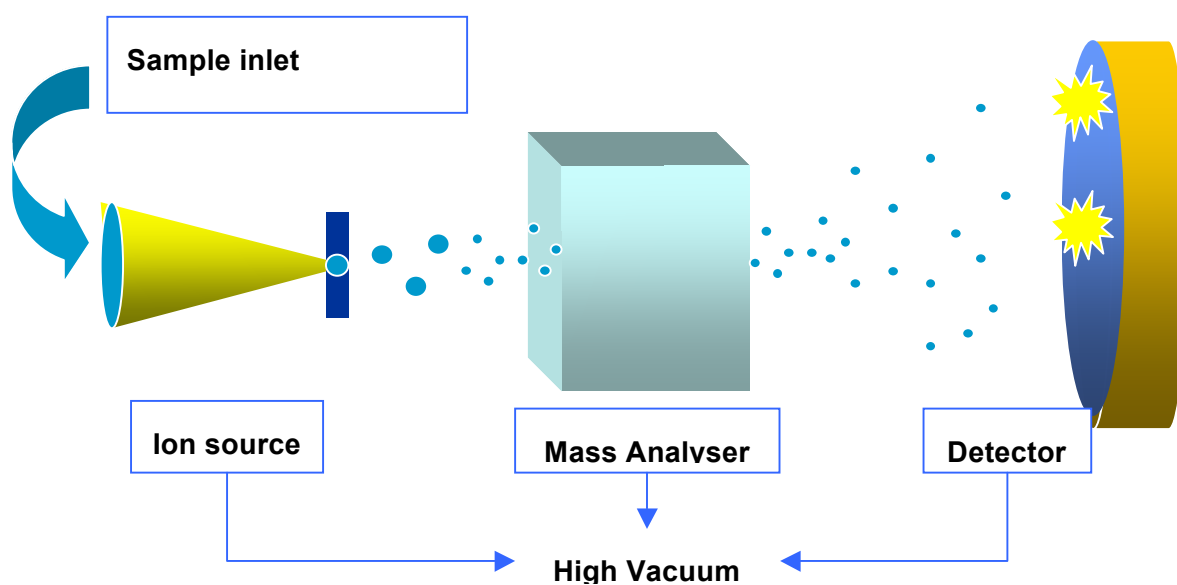


Fig.?? – *Setup* básico de um espectrómetro de massa.

Alguns equipamentos combinam a entrada e a fonte de ionização, enquanto outros combinam o analisador de massa e o detector. A amostra sofre, no entanto, o mesmo tratamento independentemente da configuração do instrumento. As moléculas têm de ser introduzidas no equipamento através de uma entrada, são convertidas em iões antes de serem propulsionadas electrostaticamente para o analisador. Aí, os iões são separados de acordo com a relação m/z . O detector converte a energia dos iões em sinais eléctricos que são transmitidos ao computador. É necessário alto vácuo para que exista um caminho livre de colisões para permitir que os iões cheguem ao detector sem colisões indesejáveis [39 alex].

O espectro de massa obtido é uma representação gráfica em 2D da intensidade do sinal *versus* m/z . A intensidade de um pico, tal como os sinais são geralmente designados, reflecte a abundância das espécies iónicas de uma relação m/z que foram criadas a partir do analito dentro da fonte de iões. A relação massa-carga, m/z por definição não tem dimensões, uma vez que se calcula a partir do nº de massa, m , (sem dimensões) de um determinado ião e do número das suas cargas. A abundância relativa apresenta-se geralmente como uma percentagem, tendo o ião mais abundante um valor de 100% [43 alex].

Espectrometria de massa – fontes iónicas

Como atrás referido, existem várias fontes de ionização, dependendo a sua escolha da polaridade da amostra. A polaridade de uma substância é inversamente proporcional à sua volatilidade. Regra geral, para massa moleculares relativamente grandes os grupos funcionais também aumentam e, assim, a decomposição térmica sob vaporização torna-se mais provável [40 alex]. O vasto leque de características e comportamentos das moléculas levou à criação de vários tipos de fontes de ionização: ionização de impacto de electrões (EI), ionização química (CI), ionização de *electrospray* (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI), ionização de dessorção por *laser* assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization* - MALDI) [45-46 alex].

Durante vários anos existiram problemas de compatibilização no acoplamento de sistemas de LC com MS, tais como as grandes diferenças entre a pressão usadas nas duas técnicas e a necessidade de descartar a maior parte do fluxo do LC. A fonte de

ESI conseguiu ultrapassar muito bem estes problemas. Com a ESI conseguem transferir-se os iões da solução para a fase gasosa. A solução é composta por um solvente volátil e por analito iónico em concentração muito baixa, tipicamente 10^{-6} - 10^{-3} M [38 alex]. Ao líquido que passa através de um tubo capilar com um fluxo reduzido (1 - $10 \mu\text{l min}^{-1}$) é aplicado um forte campo eléctrico (3 - 4kV), sob pressão atmosférica, induzindo uma acumulação de carga na superfície do líquido na extremidade do capilar, que formará gotículas carregadas [44, 46 alex]. A Figura ?? é um diagrama de uma fonte ESI [38-39, 46 alex]:

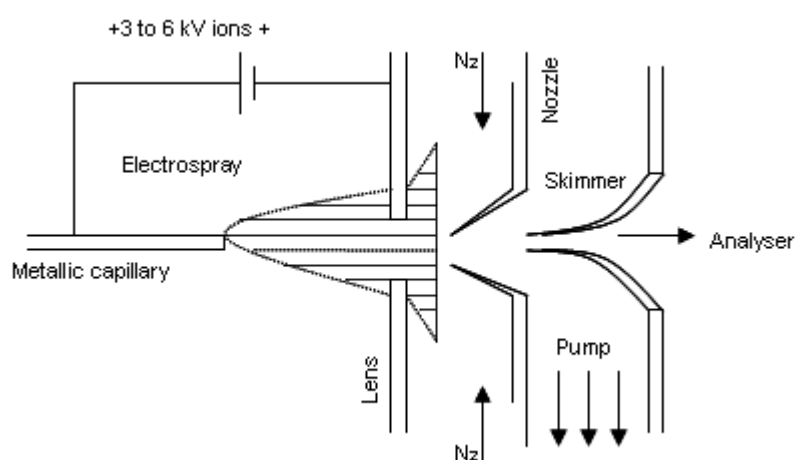


Figura ?? – Diagrama de uma fonte ESI.

As gotículas são conduzidas e vaporizadas com a ajuda de um gás inerte aquecido (geralmente N_2). Nestas condições, as gotículas, ao atravessar a fonte, vão diminuindo de tamanho. Eventualmente, as forças repulsivas, forças de *Coulomb*, entre os iões da superfície das gotículas tornam-se muito grandes. Estas forças excederão a tensão superficial do solvente, produzindo iões que passam para a fase gasosa. Este princípio da formação de iões pelo ESI é denominado método de evaporação de iões e pensa-se que favorece iões com valores relativamente baixos de m/z . Uma teoria alternativa, que supostamente é dominante em caso de iões com valores m/z muito altos, é o modelo de cargas residuais, que envolve uma contínua evaporação do solvente acompanhada pela fragmentação das gotículas, de modo a que um só ião seja formado no final do processo [44, 47 alex]. Estas duas teorias estão representadas na Figura ??.

Como todas as fontes de ionização, a ESI tem vantagens e desvantagens que se podem resumir no Quadro?? [47 alex].

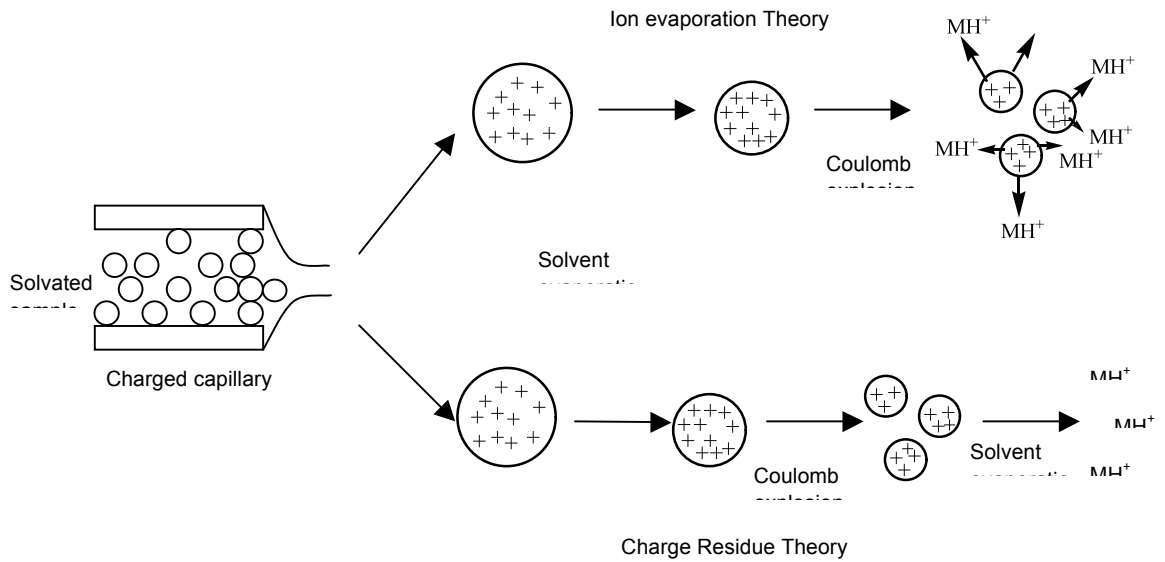


Figura ?? – Mecanismos de ionização por electrospray.

Quadro ?? - Vantagens e desvantagens de ESI.

Advantages	Disadvantages
Practical mass range of up to 70,000 Da	The presence of salts and ion-pairing agents like TFA can reduce sensitivity
Good sensitivity with femtomole to typical low picomole sensitivity	Complex mixtures can reduce sensitivity
Softest ionization method, capable of generating noncovalent complexes in the gas phase	Simultaneous mixture analysis can be poor
Easily adaptable to liquid chromatography	Multiple charging can be confusing
Easily adaptable to tandem mass analyzers such as ion traps and triple quadrupole instruments	Sample purity is important
Multiple charging allows for analysis of high mass ions with a relatively low m/z range instrument	Carryover from sample to sample
No matrix interference	Some molecules tend to show multimer formation $[M+Adduct]^+$ where the adduct can be H, Na; NH_4 or otherwise

Espectrometria de massa - analisadores

O analisador é o componente essencial do aparelho de MS, mas nem todos funcionam do mesmo modo, enquanto alguns separam os iões em relação às coordenadas espaciais, outros separam-nos em relação ao tempo. Assim, a característica comum entre os analisadores de massa é o local onde os iões são separados, baseado nos seus valores de m/z . Dependendo das propriedades dos analitos, diferentes analisadores com diferentes princípios de funcionamento podem ser usados [38-39, 44, 46-47 alex].

As três principais características de um analisador são: o limite superior de massa, a transmissão e a resolução. O limite de massa determina o maior valor de m/z que pode ser medido. Expressa-se m/z para um ião com uma carga elementar, i.e. $z = 1$. A transmissão é a razão entre o número de iões que atingem o detector e o número de iões produzidos na fonte. O poder de resolução é a capacidade de produzir dois sinais distintos para dois iões com pequena diferença de massa [46 alex]. Assim, uma maior resolução corresponde directamente à maior capacidade para diferenciar iões. A definição de resolução é comunmente dada por:

$$\text{Resolução} = m/\Delta m$$

Onde m corresponde a m/z e Δm representa a largura máxima a metade do máximo (*full width at half maximum* - FWHM). O poder de resolução de um analisador determina, nalguma medida, a precisão de um determinado instrumento.

O analisador usado neste trabalho foi a armadilha de iões (*ion trap*), pelo que o seu funcionamento se descreve brevemente a seguir.

Um “ion trap” quadrupolar consistem em eléctrodo cilíndrico em anel, ao qual um campo quadrupolar é aplicado, e em dois eléctrodos terminais (*end-cap*), eléctrodos hiperbólicos (Fig. ??). Um dos terminais possui orifícios para a introdução de iões na armadilha, enquanto o outro tem orifícios para os iões ejectados da armadilha em direcção ao multiplicador de electrões. Os terminais estão ligados electricamente e são aplicados entre eles os potenciais de corrente (DC - *Direct current potential*) e de radiofrequência (RF - *Radiofrequency potential*) e o eléctrodo em anel. O princípio de funcionamento do QIT baseia-se na criação de trajectórias estáveis para iões de uma determinada m/z ou faixa de m/z , enquanto os iões indesejados são removidos por colisão com as paredes ou por ejeção axial a partir da armadilha devido às suas trajectórias instáveis [38 alex].

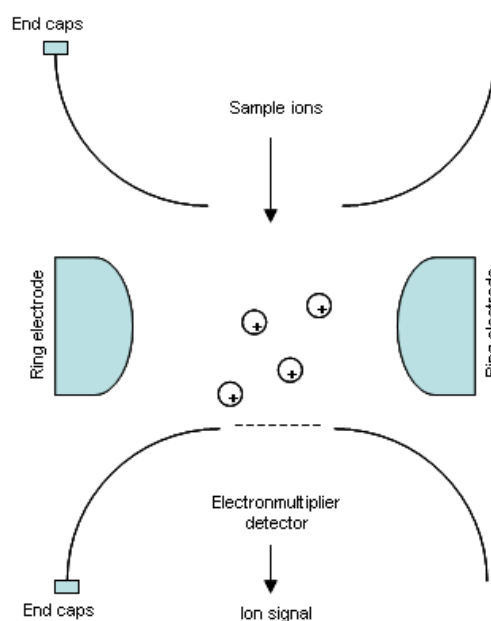


Figure ?? - Analisador de massa de armadilha de iões.

A correlação entre a voltagem aplicada e a massa detectada permite obter o espectro de massa da amostra [39 alex].

Há quatro procedimentos básicos na operação da armadilha de iões: armadilhar os iões, isolá-los, excitá-los e ejectá-los. Após recolha, todos os iões, independentemente da sua massa, podem entrar na armadilha de iões e são retidos. Depois a sequência de passos é processada até que os iões sejam eventualmente ejectados da armadilha para o sistema de detecção. No caso mais simples de *scan* total, todos os iões são recolhidos e ejectados, resultando num espectro que mostra a contagem de iões de cada massa que entra na armadilha [47 alex].

Espectrometria de massa- acoplamento à cromatografia

Para analisar misturas, um analisador cromatográfico gasoso ou líquido precede o espectrómetro de massa para separar os componentes. A cromatografia é um método de separação físico no qual os componentes a ser separados são selectivamente distribuídos entre duas fases não miscíveis: uma fase móvel que atravessa uma fase estacionária. O processo cromatográfico ocorre como resultado de uma série de passos repetidos de retenção/libertação durante o movimento dos analitos ao longo da

fase estacionária. A separação ocorre devido a diferenças nos coeficientes de distribuição dos analitos da amostra. A separação dá-se na coluna, onde a fase estacionária, devido a interacções intra e intermoleculares entre os analitos e as fases móvel e estacionária. Quanto maiores as forças entre as moléculas de soluto e da fase estacionária, mais o soluto será retido. Por outro lado, quanto maiores as forças entre as moléculas de soluto e a fase móvel, mais rápido o soluto passa através da coluna. Estas interacções podem ser classificadas como polares, iónicas ou dispersivas [50 alex].

As separações LC são baseadas em quatro mecanismos de retenção: fase normal, fase reversa, troca iónica ou exclusão de tamanho. A LC de fase reversa é a mais utilizada, provavelmente por ser a mais versátil e mais adequada para ser aplicada ao sistema de LC-MS [36, 47 alex]. As interacções específicas analito-solvente e os efeitos de solubilidades são os factores mais importantes para este tipo de separação. A retenção diminui com o aumento da polaridade dos analitos. Misturas de água ou tampões aquosos e um modificador orgânico, geralmente o metanol e o acetonitrilo, são usados como eluentes [47 alex]. É vantajosa a mudança do sistema convencional de HPLC para LC/MS uma vez que será conhecida a identidade de impurezas *minor* [36 alex].

A preparação da amostra tem um impacto directo na precisão e limites quantitativos e é muitas vezes o passo limitante para muitos métodos analíticos. Amostras aquosas geralmente têm de ser processadas para isolar ou concentrar os analitos orgânicos e produzir um extracto adequado para a análise. Usando LC-MS, tal como na HPLC, é muitas vezes necessário recorrer a métodos de extracção para remover impurezas e purificar a amostra. As técnicas clássicas de isolamento e purificação são: filtração, recristalização, sublimação, extracção por solvente, destilação e cromatografia [54 alex]. A adopção de um determinado processo de purificação dependerá em grande parte das propriedades fisico-químicas do produto [55 alex].

Podem ser usados vários métodos de pré-tratamento da amostra em combinação com LC-MS, tais como extracção líquido-líquido ou extracção de fase sólida [47 alex]. Compostos orgânicos são normalmente mais solúveis em solventes orgânicos do que em água. Este método é eficaz para remover não-voláteis, sendo os analitos extraídos por solventes tais como o diclorometano, etilacetato, metil-t-butil éter ou hexano e também promove uma boa limpeza [56 alex]. Amostras sólidas podem ser extraídas usando um solvente adequado tal como a acetona, metanol ou acetonitrilo [47, 54 alex].

Detecção de nicotina e derivados alcalóides na saliva e no fluido crevicular – estudo piloto

As maiores desvantagens desta técnica são o uso de grandes quantidades de solventes, a possível formação de emulsões e a necessidade de evaporação do solvente no final da extracção [54, 56 alex].