

Validación de un método para la determinación de cotinina en saliva

Blanco Alvarez, Federico^{1a}; Zar, Gamaliel^{2a}; Tisocco, Sebastián^{2a3}

- 1- Bioquímico
- 2- Bioquímico, Especialista en Toxicología y Bioquímica Legal
- 3- Farmacéutico
- a- Servicio de Toxicología, LACE S.A.

Resumen:

El consumo de tabaco trae aparejado la incorporación de sustancias tóxicas al organismo y potencialmente adictivas. En el presente trabajo se desarrolló y validó un método analítico para determinar cotinina (COT) en saliva humana utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de arreglo de diodos. El procedimiento puede ser utilizado para evaluar exposición a nicotina a través de la medición de su principal metabolito en diferentes poblaciones de interés. El método incluye una extracción líquido-líquido con cloroformo, evaporación de la fase orgánica, reconstitución del analito en fase móvil, y posterior detección a 205 nm. La curva de trabajo presentó un rango lineal entre (15-200) ng/mL, un límite de detección (4,76 ng/mL) y un límite de cuantificación de (15,8 ng/mL). Se propone la aplicación de este método analítico para valorar la exposición a nicotina usando saliva como matriz alternativa.

Palabras claves: Cotinina - Tabaco - Nicotina - Saliva - Validación.

Introducción:

El consumo de tabaco es una práctica que tiene sus orígenes en el continente americano durante las civilizaciones precolombinas y que a lo largo del tiempo se ha expandido hacia otros continentes. Es considerada la causa más importante de morbilidad y mortalidad prevenible en el mundo, siendo responsable de 8 millones de muertes anuales¹, de las cuales más de un millón son consecuencia de la exposición involuntaria. En Argentina está asociada a más de 40 mil muertes por año, con costos sanitarios superiores a los 20.000 millones de pesos².

En relación a su composición, el humo del cigarrillo es una mezcla compleja de más de 4000 químicos que contienen al menos 60 sustancias consideradas tóxicas, incluyendo nicotina, cadmio, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos nitrosos y aminas aromáticas existiendo evidencias experimentales que lo vinculan con la etiología de cáncer en por lo menos 18 sitios de órganos diferentes. (American Cancer Society, 2009; IARC, 2004; USDHHS, 2004).³

La exposición al humo del tabaco está asociada a un gran número de patologías, destacándose enfermedades cardiovasculares y pulmonares^{4,5}, siendo especialmente importante durante el neurodesarrollo. Durante esta etapa el sistema nervioso central es extremadamente vulnerable a eventos adversos que ocurren durante el embarazo, la niñez o adolescencia, como déficits nutricionales de la madre, exposición a agentes tóxicos o a drogas de abuso^{3,4}.

La nicotina, un alcaloide natural, es el principal componente psicoactivo del tabaco y es agente responsable de sus propiedades adictivas^{6,7}. Se absorbe principalmente por vía

respiratoria y en menor medida a través de la mucosa bucal, plexos sublinguales y nasofaríngea. El pH alcalino del pulmón favorece la absorción de su forma no ionizada, la cual alcanza la circulación sistémica y atraviesa la barrera hematoencefálica, llegando rápidamente al sistema nervioso central. Allí ejerce su toxicidad mediante la activación de receptores colinérgicos de tipo nicotínico, ubicados en diversas áreas de los sistemas nerviosos central y periférico, particularmente en el haz pro encefálico medio, que se proyecta desde el área tegmento ventral hasta la corteza pre-frontal, pasando por el núcleo accumbens⁶. Estas vías límbicas son fundamentalmente dopaminérgicas y están asociadas a circuitos de recompensa.

El metabolismo de nicotina se produce en el hígado mediante enzimas microsomales, principalmente CYP2A6 y en menor medida CYP2B6 y CYP2E10, dando como resultando metabolitos inactivos: cotinina (70-80%) y nicotina-1-N-óxido⁸. Existen además dos vías de metabolización de nicotina no oxidativas que generan metabolitos en menor proporción, por un lado, la metilación del nitrógeno de la piridina que genera iones isometonio de nicotina y por otro la glucuronidación para dar glucurónido de nicotina.³

En base a estas consideraciones el metabolito cotinina es considerado un buen biomarcador de exposición a nicotina ya que presenta una vida media de 16-20 horas en contraste con las 2-3 horas de vida media de nicotina⁹. Sin embargo, sus niveles en estado estacionario reflejan no solo la absorción de nicotina, sino también el grado de metabolismo de nicotina a cotinina y la tasa de eliminación de cotinina. Esta eliminación se produce principalmente por el metabolismo oxidativo a 3-hidroxicotinina (50-60%), un metabolito con una vida media más corta⁸. Es importante destacar que existen bebidas y alimentos, provenientes de la familia de las solanáceas (tomate, papa, berenjena, pimientos, entre otras), que contienen cantidades marginales de nicotina, en un rango que va desde 2 µg/kg a 7 µg/kg.

En el laboratorio la determinación de cotinina puede realizarse en diversas matrices biológicas, como suero, orina y saliva, con muy buena correlación entre ellas. La saliva es una matriz que resulta de elección puesto que permite una recolección fácil y no invasiva para el paciente. Por otra parte, se ha reportado que niveles mayores a 14,7 ng/mL de cotinina se relacionan con exposición a nicotina¹⁰.

Objetivo:

Se pretende validar un método para determinación de cotinina en saliva, considerada una matriz alternativa. Se realizarán ensayos de selectividad, especificidad, linealidad, precisión, recuperación, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) de cotinina en saliva siguiendo la guía para validación de métodos bioanalíticos M10 de ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use).

Materiales y métodos:

Instrumento:

Se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent 1100, con bomba cuaternaria (G1311A), inyector automático (G1313A), compartimento de columna con temperatura controlada (G1316A) y detector con arreglo de diodos (G1315B).

La separación cromatográfica se realizó en una columna LiChrospher 100 RP-18 5 μm , 3 mm x 125 mm (Agilent Technologies). Los datos fueron recolectados mediante el software ChemStation (versión 10.2.0.275) analizados a 205 nm del espectro.

Reactivos y soluciones:

Se utilizó (-)-Cotina (Sigma-Aldrich), 7- β -OH-etil teofilina (estándar interno, SI), Acetonitrilo grado UHPLC (Panreac), Cloroformo grado p.a. (Cicarelli), NaOH 4M y buffer fosfato (25 mM $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) pH= 6.

Preparación de las muestras:

Para la validación del método se utilizó un pool de saliva obtenido de personas no fumadoras ni expuestas a humo de cigarrillo en al menos 7 días anteriores a la recolección de la muestra. La extracción se realizó de la siguiente manera: a 5 mL de saliva alcalinizada con 120 μL de NaOH 4M, se le añadieron 150 μL de estándar interno y 4 mL de cloroformo. Se agitó durante 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3.000 rpm. Se extrajeron 3,5 mL de la fase inferior. El procedimiento fue repetido una vez.

Las fracciones obtenidas de la fase orgánica fueron juntadas y evaporadas a sequedad para luego reconstituir el residuo en 250 μL de fase móvil.

Condiciones cromatográficas:

La fase móvil estuvo compuesta de buffer fosfato pH= 6: Acetonitrilo (90:10), flujo de 0,8 mL/minuto, temperatura de columna de 40°C, tiempo de corrida de 7 minutos.

RESULTADOS:

Parámetros de Validación.

1- Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para diferenciar y medir el analito en presencia de sustancias posiblemente interferentes en la matriz biológica. La evaluación de la selectividad se realizó mediante corridas cromatográficas de un pool de saliva (blanco), obtenido de diferentes personas no fumadoras, no encontrándose componentes que interfieran en el tiempo de retención del analito ni del estándar interno.

2- Especificidad

La especificidad es la capacidad de un método analítico para detectar y diferenciar el analito de otras sustancias, incluidas sustancias que son

estructuralmente similares, metabolitos, productos de degradación formados durante la preparación de la muestra, etc. Se evaluaron potenciales interferentes como cafeína, teofilina y teobromina no encontrándose interferencias en los tiempos de retención del analito ni del estándar interno.

3- Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método, de dar resultados proporcionales a la cantidad de analito presente en una muestra, dentro de un rango determinado. Para determinar el rango de linealidad, se procesaron 6 niveles por triplicado en la matriz, obteniéndose un rango de medición del método de 15 a 200 ng/mL. Del análisis de regresión (Fig.1) se obtuvo la curva de calibración, graficando concentración del estándar (x) vs relación Cotinia/SI (y); la ecuación de la recta obtenida fue: $0,0062x - 0,0330$, $r^2: 0,9985$. Se evaluó estadísticamente el procedimiento con la prueba t de student como indicador del modelo lineal, dando como resultado un valor de $t_{experimental} (56,7) > t_{critico} (2,01)$, lo que permite concluir que existe correlación lineal significativa con un nivel de confianza del 95%.

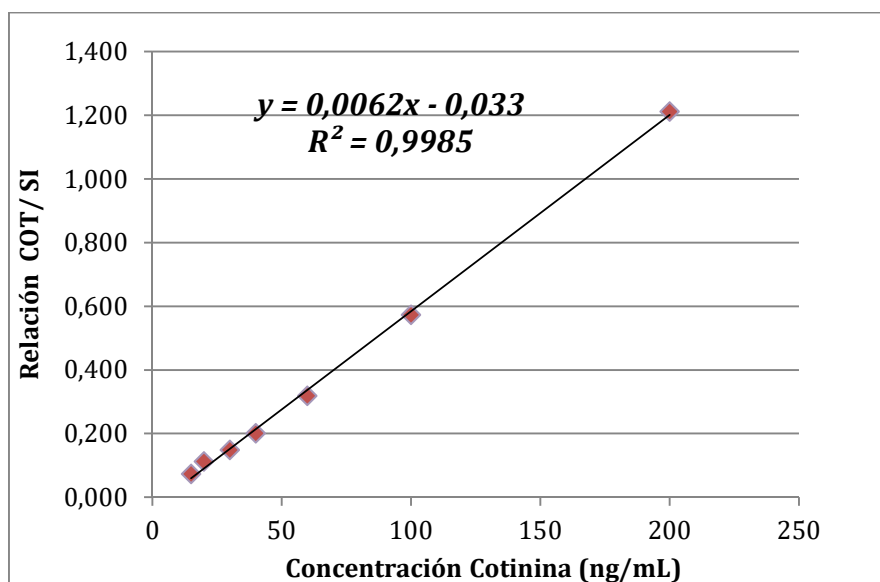


Figura 1: Curva relación (COT/SI) vs concentración de cotinina (ng/mL).

4- Precisión

La precisión se estableció en términos de repetibilidad y precisión intermedia, expresando el grado de imprecisión en valores de desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

Para el ensayo de repetibilidad se utilizaron 7 puntos medidos por quintuplicado, los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla I, no encontrándose en ningún punto un CV mayor al 15%. La precisión intermedia se evaluó utilizando 3 puntos medidos por quintuplicado, en el mismo instrumento y por distintos analistas en días no consecutivos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla II. Se realizó un test de significancia F para varianzas desiguales, obteniendo $F_{experimental} (1,46) < F_{critico} (2,13)$ y una prueba t para varianzas iguales, obteniendo $T_{experimental} (-0,24) < T_{critico} (2,12)$.

Medidas de resumen global.							
Nivel	15	20	30	40	60	100	200
Promedio	0,073	0,112	0,148	0,200	0,318	0,573	1,212
Varianza	9,3E-06	6,4E-05	2,3E-04	2,1E-04	8,1E-05	1,3E-04	3,2E-02
DE	0,0031	0,0080	0,0150	0,0145	0,0090	0,0116	0,1796
CV (%)	4,2	7,1	10,1	7,2	2,8	2,0	14,8

Tabla I: Parámetros de precisión por nivel de concentración.

	Analista 1			Analista 2		
Agregado (ng/mL)	15	40	100	15	40	100
Encontrado (x)	17,0	37,8	98,8	17,7	38,0	89,4
DE	0,48	2,39	1,83	0,45	1,47	2,83
CV (%)	2,80	6,31	1,85	2,55	3,88	3,17

Tabla II: Parámetros de precisión intermedia.

5- LOD – LOQ

Los límites de detección y de cuantificación se obtuvieron a partir de la curva de linealidad. El LOD, calculado como $3S_a/b$ fue de 4,62 ng/mL, mientras que el LOQ, calculado como $10S_a/b$ fue de 15,41 ng/mL, donde S_a es la desviación estándar de la ordenada al origen y b es la pendiente de la curva de calibración

6- Recuperación

Para determinar el rendimiento analítico del método en el proceso de extracción y la cantidad de analito existente en la muestra, se realizó un ensayo de recuperación de 5 puntos por triplicado dentro del rango de linealidad del método, mediante el agregado de estándar de cotinina de un 15, 30, 60, 140 y 200 % del valor (Fig. 2). Se obtuvo un valor de $t_{\text{experimental}} (0,002) < t_{\text{crítico}} (2,306)$, para un IC=99%.

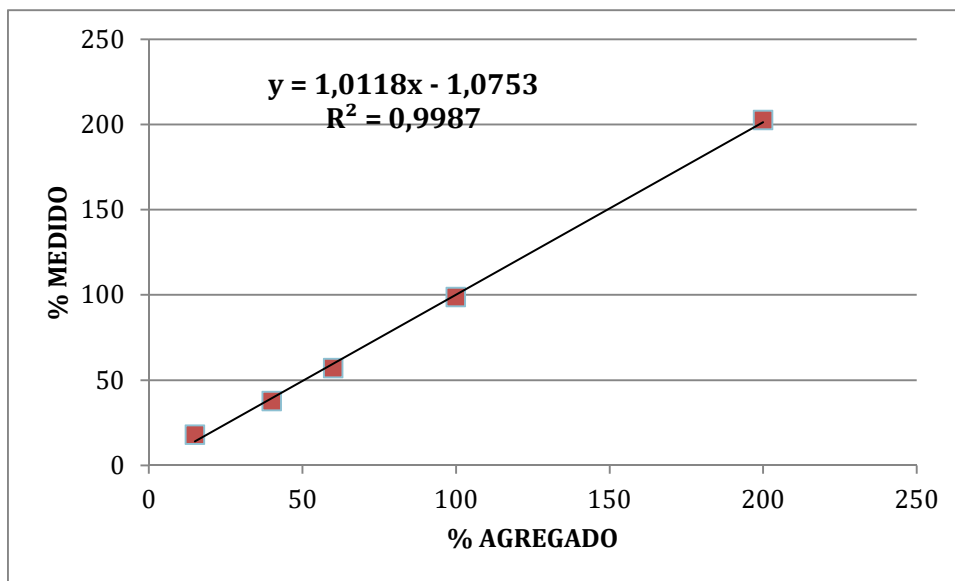


Figura 2: Curva de recuperación (% medido vs % agregado).

Discusión y Conclusión

En el presente trabajo se evidenció un buen desempeño metodológico mediante el análisis de diferentes parámetros analíticos. Por otra parte, el método desarrollado es simple, rápido, preciso y con una sensibilidad aceptable para la determinación de cotinina en saliva, lo cual le permite ser implementado en el laboratorio toxicológico de rutina. La utilización de saliva como matriz biológica genera un beneficio para el paciente, puesto que la toma de muestra es no invasiva y de simple recolección. Permite además que el paciente remita la muestra al laboratorio sin necesidad de que su obtención sea supervisada por un profesional.

Así, debido a los efectos adversos resultantes de la exposición al humo del tabaco, resulta de vital importancia determinar los niveles de exposición a nicotina. En el presente trabajo se validó un método analítico orientado a la determinación de cotinina, principal metabolito de nicotina. Así, mediante el conocimiento de los niveles de exposición al humo del tabaco y las sustancias potencialmente adictivas que este contiene se pretende disminuir su consumo, a fin de reducir posibles efectos futuros en la salud principalmente de poblaciones vulnerables como niños y embarazadas.

Bibliografía:

1. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025, third edition. Geneva: World health organization; 2019.
2. Pichon-Riviere A, Alcaraz A, Bardach A, Augustovski F, Caporale J, Caccavo Francisco. Carga de Enfermedad atribuible al Tabaquismo en Argentina. Documento Técnico IECS N° 7. Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria, Buenos Aires, Argentina. Mayo de 2013 (www.iecs.org.ar).

3. Robles, N., & Sabriá, J. (2011). Effects of ethanol and nicotine on human CNS development. En *Reproductive and Developmental Toxicology* (pp. 333–339). Elsevier.
4. Lazcano-Ponce, E., Sánchez-Zamorano, L. M., Benowitz, N., Barbosa-Sánchez, L., & Hernández-Ávila, M. (2007). Elevada concentración de metabolitos de cotinina en hijos de padres fumadores. *Salud pública de Mexico*, 49, s213–s223. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342007000800011>
5. Vacchino, Marta Noemí, & Velurtas, Susana María, & Salinas, Guillermo Pablo, & Garcialoredo, Héctor Hugo (2006). Determinación de cotinina y exposición a tabaco. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 40(2), 181-185 ISSN: 0325-2957. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53540204>
6. Pérez Cruz, Nuvia, Pérez Cruz, Hayvin, & Fernández Manchón, Eduardo J. (2007). NICOTINA Y ADICCIÓN: UN ENFOQUE MOLECULAR DEL TABAQUISMO. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 6(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2007000100006&lng=es&tlng=es.
7. Fu Balboa, M. (2011). Determinantes de las concentraciones de cotinina en saliva, dependencia a la nicotina y estadios del cambio en fumadores. Universitat de Barcelona.
8. Levi, M., Dempsey, D. A., Benowitz, N. L., & Sheiner, L. B. (2007). Prediction methods for nicotine clearance using cotinine and 3-hydroxy-cotinine spot saliva samples II. Model application. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 34(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/s10928-006-9026-0>
9. López, C. M., Sassone, A. H., Rodríguez Girault, M. E., Lenzken, C. S., Villaamil Lepori, E. C., & Roses, O. E. (2004). Quantification of Cotinine in Plasma and Urine by HPLC-UV Detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27(15), 2371–2379. <https://doi.org/10.1081/jlc-200028146>
10. McNEILL, A. D., JARVIS, M. J., WEST, R., RUSSELL, M. A. H., & BRYANT, A. (1987). Saliva Cotinine as an Indicator of Cigarette Smoking in Adolescents. *Addiction*, 82(12), 1355–1360. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1987.tb00439.x>