



## Exposição fetal ao álcool por meio dos biomarcadores ésteres etílicos de ácidos graxos em mecônio\*


Pillar Campos Prado<sup>1,2</sup>

 <https://orcid.org/0000-0001-8410-1746>


Humberto de Oliveira Simões<sup>1,2</sup>

 <https://orcid.org/0000-0003-3544-8262>

Fabiana Spinetti dos Santos<sup>3</sup>

 <https://orcid.org/0000-0002-0971-7900>

Erikson Felipe Furtado<sup>1</sup>

 <https://orcid.org/0000-0001-8006-7077>

**Objetivo:** identificar as evidências, na literatura, sobre métodos que quantifiquem os biomarcadores da exposição fetal ao álcool presentes na matriz biológica mecônio: ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs). **Metodologia:** busca realizada em três bases de dados utilizando as expressões fixas "fatty acid ethylester AND meconium". Foram selecionados artigos publicados até julho de 2018 que tinham como participantes gestantes que fizeram ou não o uso de álcool e que tiveram amostras de mecônio coletadas de seus recém-nascidos. **Resultados:** dentre as 201 referências encontradas, 27 artigos preencheram os critérios de inclusão. Os dados extraídos dos artigos selecionados foram método de ensaio (análise), método de extração, biomarcadores analisados, ponto de corte (*cut-off*), padrão interno e quantidade de mecônio utilizados. **Conclusão:** dentro da variabilidade dos biomarcadores FAEEs, linoleato de etila, palmitato de etila, estearato de etila e oleato de etila foram os mais prevalentes e em maiores concentrações. A somatória de FAEEs é mais adequada e confiável do que a análise individual.

**Descritores:** Transtornos Relacionados ao Uso de Álcool; Gravidez; Mecônio.

\* Artigo extraído da tese de doutorado "Diagnóstico da exposição fetal ao álcool através de biomarcadores em mecônio", apresentada à Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

<sup>3</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

### Como citar este artigo

Prado PC, Simões HO, Santos FS, Furtado EF. Fetal alcohol exposure through biomarker ethyl esters of fatty acids in meconium. SMAD, Rev Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog. 2023 jan.-mar.;19(1):103-111.

[cited \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_]; Available from: \_\_\_\_\_. <https://doi.org/10.11606/issn.1806-6976.smad.2023.190096>

ano    mês    dia

URL

## Fetal alcohol exposure through biomarker ethyl esters of fatty acids in meconium

**Objective:** to identify the evidence in the literature on methods that quantify the biomarkers of fetal alcohol exposure present in the biological meconium matrix: fatty acid ethyl esters (FAEEs).

**Methodology:** search carried out in three databases, using the fixed expressions "fatty acid ethylester AND meconium". Articles published until July 2018 were selected, whose participants were pregnant women who did or did not use alcohol and who had meconium samples collected from their newborns. **Results:** among the 201 references found, 27 articles met the inclusion criteria, extracting data from the selected articles, such as: test method (analysis), extraction method, analyzed biomarkers, cut-off point, internal standard and amount of meconium used.

**Conclusion:** within the variability of the biomarkers FAEEs, Ethyl Linoleate, Ethyl Palmitate, Ethyl Stearate and Ethyl Oleate, were more prevalent and in higher concentrations. The sum of FAEEs is more adequate and reliable than the individual analysis.

**Descriptors:** Alcohol-Related Disorders; Pregnancy; Meconium.

## Exposición al alcohol fetal a través de ésteres etílicos de biomarcadores de ácidos grasos en meconio

**Objetivo:** identificar la evidencia en la literatura sobre métodos que cuantifiquen los biomarcadores de exposición fetal al alcohol presentes en la matriz biológica de meconio: ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). **Metodología:** búsqueda realizada en tres bases de datos, utilizando las expresiones fijas "éster de éster graso y meconio". Se seleccionaron artículos publicados hasta julio de 2018, cuyos participantes eran mujeres embarazadas que consumían o no alcohol y a las que se les recogieron muestras de meconio de sus recién nacidos. **Resultados:** de las 201 referencias encontradas, 27 artículos cumplieron los criterios de inclusión, extrayendo datos de los artículos seleccionados, tales como: método de prueba (análisis), método de extracción, biomarcadores analizados, punto de corte, estándar interno y cantidad de meconio utilizado.

**Conclusión:** dentro de la variabilidad de los biomarcadores FAEEs, Etil Linoleato, Etil Palmitato, Etil Estearato y Etil Oleato, fueron más prevalentes y en mayores concentraciones. La suma de FAEE es más adecuada y confiable que el análisis individual.

**Descriptores:** Trastornos Relacionados con el Alcohol; Embarazo; Meconio.

## Introdução

O consumo de álcool por gestantes é um fato presente no cenário mundial. Muitas vezes, esse consumo passa despercebido por profissionais da saúde ou, quando questionado, pode ser negado por elas<sup>(1)</sup> e as consequências dessa exposição fetal ao álcool são inúmeras<sup>(2)</sup>. Se as intervenções, nos âmbitos médico e educacional, fossem mais eficazes, poder-se-ia prevenir o surgimento de complicações ao feto no decorrer de sua vida<sup>(3)</sup>.

O grande número de mulheres em idade reprodutiva que consomem álcool, aliado à gravidez não planejada, expõe a gestante a um elevado risco de alcoolizar-se em algum momento da gestação, principalmente no início do período gestacional, momento em que a maioria delas ainda não tomou ciência do fato<sup>(4)</sup>. O etanol, álcool presente nas bebidas alcoólicas, é teratogênico e as recomendações atuais do Ministério da Saúde são de abstinência total do consumo de álcool durante a gravidez. Uma vez que o etanol ingerido pela gestante é absorvido no trato gastrointestinal, chega à circulação sanguínea, atravessa a placenta por difusão passiva e faz com que o feto fique exposto às mesmas concentrações do sangue materno. Entretanto, a exposição fetal acaba por ser maior, devido à menor massa corporal e ao metabolismo de eliminação do feto ser mais lento, podendo levar a alterações em seu desenvolvimento, aborto espontâneo, parto prematuro, aumento da morbidade e mortalidade perinatais e Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF), acarretando complicações ao longo da vida do indivíduo<sup>(5)</sup>.

Esse transtorno pode ocasionar dificuldades de aprendizagem, de desenvolvimento, de atenção, das relações sociais e comportamento impulsivo. Nos sintomas mais graves do espectro, a Síndrome Fetal do Álcool (SFA) é caracterizada por restrição de crescimento intrauterino e redução do perímetro cefálico, com crescimento prejudicado no pós-natal e características craniofaciais típicas<sup>(6)</sup>.

A identificação da exposição fetal ao álcool pode ser realizada mediante relato materno, seja por meio de entrevistas ou questionários, e também pela análise de biomarcadores do álcool. Devido às dificuldades em se obter relatos do consumo materno de álcool, a determinação de biomarcadores no mecônio dos recém-nascidos, para avaliar a exposição fetal ao álcool, pode ser uma ferramenta importante para auxiliar na identificação de recém-nascidos potencialmente expostos e encaminhá-los a serviços especializados para que as intervenções sejam realizadas precocemente<sup>(7-8)</sup>.

Assim, a determinação dos biomarcadores ésteres etílicos de ácidos graxos, do inglês *fatty acid ethyl ester* (FAEEs), no mecônio tem sido proposta em muitos estudos como método de identificação dessa exposição fetal ao álcool. Os FAEEs são metabólitos não oxidativos produzidos pela esterificação do etanol com ácidos graxos livres presentes no sangue e na maioria dos tecidos<sup>(9-11)</sup>.

Os FAEEs presentes no sangue materno não atravessam diretamente a placenta e, portanto, não chegam ao feto. Os que são encontrados no mecônio são provenientes da esterificação do etanol que atravessou a placenta, representando assim a real exposição fetal ao álcool<sup>(9-13)</sup>. Portanto, as concentrações de FAEEs comumente encontradas no mecônio dos recém-nascidos parecem estar relacionadas com diferentes padrões de consumo de álcool (leve, moderado e pesado).

O mecônio constitui-se nas primeiras excreções intestinais do recém-nascido, é composto de 60 a 80% de água, com a eliminação do epitélio mucoso, bile, cabelo e por células epiteliais deglutidas com o líquido amniótico pelo feto<sup>(14-16)</sup>. É acumulado no intestino a partir da 12<sup>a</sup>-16<sup>a</sup> semana gestacional até o nascimento, apresentando uma ampla janela para a detecção da exposição fetal ao álcool. Além disso, a utilização da matriz biológica mecônio possui outras vantagens como a disponibilidade (em termos de quantidade disponível) e a facilidade da coleta quando comparada com outras matrizes<sup>(17-18)</sup>.

A análise dos FAEEs presentes no mecônio consiste na identificação e quantificação dos biomarcadores e, para isto, é necessário que se passe por uma etapa de preparo de amostras a fim de isolar os analitos de interesse da matriz para que, posteriormente, se possa quantificar e identificar os metabólitos dos FAEEs presentes no mecônio<sup>(12-13,16,19)</sup>.

No entanto, ainda existem poucos estudos que avaliam a eficácia desse método analítico em identificar os casos da exposição fetal ao álcool com a determinação adequada de um ponto de corte. Mais estudos são necessários para estabelecer um método simples que possa ser utilizado na prática clínica<sup>(19-21)</sup>.

Com o objetivo de identificar as evidências, na literatura, sobre métodos que quantifiquem biomarcadores FAEEs presentes na matriz biológica mecônio, foram identificados e especificados os procedimentos mais comumente utilizados, tais como: métodos de ensaio, métodos de extração dos FAEEs, FAEEs empregados como analitos e o ponto de corte. Dessa forma, este estudo contribui com a identificação dos métodos empregados e a comparação dos métodos mais eficazes e disponíveis para auxiliar na identificação de crianças que foram expostas ao álcool durante a fase gestacional.

## Metodologia

### Estratégia de busca

A revisão sistemática da literatura foi conduzida com a pesquisa sendo realizada em três bases de dados, com vasta abrangência de indexações de periódicos nacionais e internacionais. Foram elas PubMed, Scopus e *Web of Science*. Todas as referências de todos os artigos foram averiguadas para a inclusão nos critérios propostos.

Após algumas tentativas e revisões dos resultados de cada uma das bases de dados e considerando as perdas obtidas com o uso dos termos completos MESH e DeCS, optou-se pela utilização de expressões mais abrangentes para os termos do tipo e método para a detecção da amostra, os quais foram usados em todas as interfaces de busca.

As buscas realizadas nas bases de dados supracitadas foram utilizadas com os termos "fatty acid ethyl ester AND meconium" fixos a fim de atingir o maior número de artigos com a temática proposta e a localização deles foi realizada até 31 de junho de 2018. O ano de publicação dos trabalhos variou desde 1999 até o ano de 2018 e não foi possível observar um maior número de publicações em um ano específico.

Foram adotados como critérios de inclusão para a leitura dos resumos e artigos completos: a) gestantes que fizeram ou não a ingestão de álcool durante a gravidez; b) coleta do mecônio logo após o nascimento para a análise dos FAEEs; c) publicações sem limite inferior até a data de 31 de junho do ano de 2018; d) publicações em língua portuguesa, inglesa ou espanhola; e) estudos do tipo série de casos, longitudinais, transversais, caso-controle e ensaios clínicos.

Para a exclusão dos artigos, foram adotados os seguintes critérios: a) estudos *in vitro* e animais, com população do sexo masculino, crianças, mulheres não gestantes e idosos; b) estudos que quantificaram outras

amostras e não somente os FAEEs em mecônio, metodologia aplicada a outras substâncias químicas e não somente ao álcool; c) estudos de revisões narrativas, sistemáticas, metanálises, artigos de revisão, dissertações ou teses, cartas, editoriais, comentários e relatos de casos.

## Resultados

A partir dos termos selecionados, foram identificadas 201 referências, sendo que, a partir destas, 150 artigos eram repetidos e foram excluídos. Cinquenta e um artigos entre resumos foram examinados e, após a leitura e a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram restringidos a 27 artigos, posto que, durante a leitura dos resumos destes 51 artigos, 24 foram excluídos, dentre eles, estudos que não quantificaram os FAEEs (n=12), amostras com animais (n=2), artigos de revisão (n=8), metodologia aplicada a outras substâncias químicas e não somente ao álcool (n=2). Após a leitura, na íntegra, dos artigos selecionados (n=27), foi possível averiguar alguns dados extraídos dos estudos usando um padrão que incluía informações como: 1) método de ensaio; 2) método de extração; 3) biomarcadores analisados; 4) ponto de corte (*cut-off*); 5) padrão interno e 6) quantidade de mecônio. Feito isso, os dados foram extraídos de cada estudo e inseridos em figuras.

O fluxograma da triagem de referências nas bases de dados até a seleção final dos artigos científicos está exposto na Figura 1.

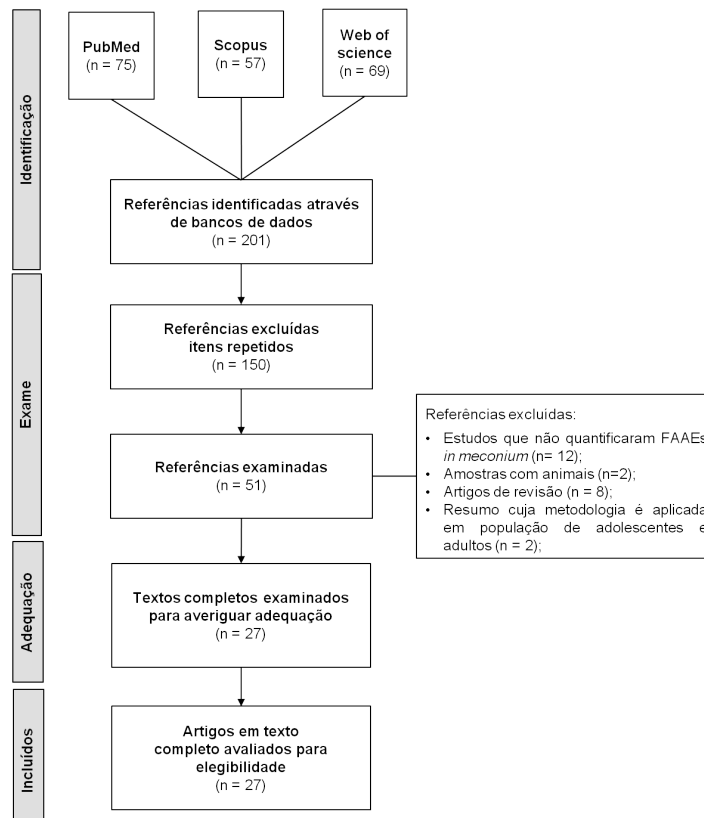


Figura 1 - Fluxograma de coleta nas bases de dados

### Métodos de ensaio de FAEEs

Entre os artigos, os métodos de ensaio mais utilizados foram: Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (GC-MS – 13 artigos) seguida de Espectroscopia de massa e cromatografia líquida (LC-MS – 12 artigos); cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chamas (GC-FID – três artigos) e um artigo não mencionou o método de ensaio. A maioria dos artigos (25 artigos) usou GC-MS ou LC-MS como método de ensaio.

### Métodos de extração de FAEEs

Os métodos de extração usados no estudo foram: *Microwave-Assisted Extraction* (MAE) – extração por micro-ondas (um artigo); *Liquid Liquid Extraction-Solid Phase Extraction* (LLE – SPE) – extração em fase líquida seguida por extração em fase sólida SPE – (17 artigos); *Headspace-Solid Phase Microextraction* (HS – SPME) – microextração em fase sólida por *headspace* (sete artigos) e apenas um artigo não mencionou o método de extração. Os métodos de extração mais utilizados foram: LLE – SPE e HS – SPME.

### Compostos FAEEs

Dez compostos diferentes de FAEEs foram encontrados no mecônio no total, tais como: laurato

de etila E12 (seis artigos); miristato de etila E14 (dez artigos); palmitato de etila E16 (15 artigos); palmitoleato de etila E16:1 (cinco artigos); estearato de etila E18 (15 artigos); oleato de etila E18:1 (14 artigos); linoleato de etila E18:2 (15 artigos); linolenato de etila E18:3 (oito artigos) e araquidonato de etila E20:4 (oito artigos).

Todos os estudos realizaram a determinação simultânea de mais de três FAEEs e as combinações mais frequentemente encontradas foram: quatro compostos E16, E18:0, E18:2, E18:1 e, posteriormente, mais cinco compostos: E14, E18:3, E20:4, E12, E16:1.

### Padrão interno e quantidade de mecônio

Os FAEEs deuterados ou o heptadecanoato de etila foram utilizados como padrão interno para a quantificação de FAEE em nove estudos e cinco estudos não mencionaram o padrão interno utilizado. A quantidade de mecônio nas análises variou entre 50 e 1000 mg.

Todos os métodos de ensaio e extração compostos de FAEEs, padrão interno e quantidade de mecônio dos estudos selecionados estão descritos na Figura 2.

Autor e ano	Método de análise	Método de extração	FAEEs* analisados	Ponto de corte	Padrão interno	Mecônio (mg)
Abernethy (2015)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	FAEEs*	600ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	--
Bakdash (2010)	GC-MS <sup>  </sup>	HS-SPME <sup>¶</sup>	E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup>	500ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	50
Baña (2014)	LC-MS/MS <sup>†</sup> e GC-MS <sup>  </sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	FAEEs*	500ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	1000
Cabarcos (2014)	GC-MS <sup>  </sup>	MAE <sup>**</sup>	E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup>	600ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	500
Chan (2004)	GC-MS <sup>  </sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	E12 <sup>***</sup> , E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E16:1 <sup>†††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup> , E18:3 <sup>†††</sup> , <sup>§§§</sup>	600ng/g	E:17 <sup>¶¶¶</sup>	500
Goecke (2014)	GC-MS <sup>  </sup>	HS-SPME <sup>¶</sup>	E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup>	600ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	50
Gross (2017)	GC-MS <sup>  </sup>	HS-SPME <sup>¶</sup>	E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup> , E18:3 <sup>†††</sup> , E20:4 <sup>§§§</sup>	--	--	50
Hastedt (2013)	GC-MS <sup>  </sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup> e HS-SPME <sup>¶</sup>	E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup> , E18:3 <sup>†††</sup>	0,5 ng/mg	D5-FAEEs <sup>§</sup>	50
Himes (2011)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	E18 <sup>§§</sup>	600ng/g	--	100
Klein (1999)	GC-FID <sup>    </sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup>	--	E:17 <sup>¶¶¶</sup>	--
Kwak (2014)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	E12 <sup>***</sup> , E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E16:1 <sup>†††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup> , E18:3 <sup>†††</sup> , E20:4 <sup>§§§</sup>	500ng/g	E:17 <sup>¶¶¶</sup>	500
Kwak (2010)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	E12 <sup>***</sup> , E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E16:1 <sup>†††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup> , E18:3 <sup>†††</sup> , E20:4 <sup>§§§</sup>	--	E:17 <sup>¶¶¶</sup>	500

(continua na próxima página...)

Autor e ano	Método de análise	Método de extração	FAEEs* analisados	Ponto de corte	Padrão interno	Mecônio (mg)
Manich (2012)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	FAEEs*	500ng/g	E:17 <sup>¶¶¶</sup>	1000
Min (2015)	GC-FID <sup>     </sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup> , E18:3 <sup>†††</sup> , E20:4 <sup>§§§</sup>	--	--	--
Ostrea (2006)	GC-MS <sup>  </sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	E12 <sup>***</sup> , E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup> , E18:3 <sup>†††</sup> , E20:4 <sup>§§§</sup>	--	D5-FAEEs <sup>§</sup>	500
Pichini (2008)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	FAEEs*	600ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	---
Pichini (2014)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	FAEEs*	600ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	--
Roehsig (2010)	GC-MS <sup>  </sup>	HS-SPME <sup>¶</sup>	E12 <sup>***</sup> , E14 <sup>††</sup> , E16 <sup>††</sup> , E16:1 <sup>†††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup> , E20:4 <sup>§§§</sup>	600 ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	100
Sanvisens (2016)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	FAEEs*	600 ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	100
Stillbirth (2015)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	FAEEs*	600 ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	50
Toutain (2010)	---	---	FAEEs*	600 ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	--
Yang (2015)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	E12 <sup>***</sup> , E14 <sup>††</sup> , E16:1 <sup>†††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup> , E18:3 <sup>†††</sup> , E20:4 <sup>§§§</sup>	600 ng/g	E:17 <sup>¶¶¶</sup>	500
Zarrei (2018)	LC-MS/MS <sup>†</sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup>	FAEEs*	--	D5-FAEEs <sup>§</sup>	--
Zelner (2010)	GC-MS <sup>  </sup>	HS-SPME <sup>¶</sup>	E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup>	600 ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	50
Zelner (2012)	GC-MS <sup>  </sup>	HS-SPME <sup>¶</sup>	FAEEs*	600 ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	--
Zelner (2012)	GC-MS <sup>  </sup>	LLE-SPE <sup>‡</sup> e HS-SPME <sup>¶</sup>	E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup>	600 ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	50
Zelner (2012)	GC-MS <sup>  </sup>	HS-SPME <sup>¶</sup>	E16 <sup>††</sup> , E18 <sup>§§</sup> , E18:1 <sup>   </sup> , E18:2 <sup>¶¶</sup>	600 ng/g	D5-FAEEs <sup>§</sup>	50

\*FAEEs = Biomarcadores ésteres etílicos de ácidos graxos (do inglês *fattyacidethylester*); <sup>†</sup>LC-MS/MS = Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; <sup>‡</sup>LLE-SPE = Extração em fase líquida seguida por extração em fase sólida; <sup>§</sup>D5-FAEEs = Ésteres etílicos de ácidos graxos pentadeuterados; <sup>||</sup>GC-MS = Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; <sup>¶</sup>HS-SPME = Microextração em fase sólida por *headspace*; <sup>¶¶</sup>MAE = Extração por micro-ondas; <sup>††</sup>E14 = Miristato de etila; <sup>†††</sup>E16 = Palmitato de etila; <sup>§§</sup>E18 = Estearato de etila; <sup>|||</sup>E18:1 = Oleato de etila; <sup>¶¶</sup>E18:2 = Linoleato de etila; <sup>\*\*\*</sup>E12 = Laurato de etila; <sup>††††</sup>E16:1 = Palmitoleato de etila; <sup>§§§</sup>E18:3 = Linolenato de etila; <sup>§§§</sup>E20:4 = Araquidonato de etila; <sup>|||||</sup>GC-FID = Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas; <sup>¶¶¶</sup>E:17 = Heptadecanoato de etila

Figura 2 – Súmula dos principais detalhamentos metodológicos e resultados dos estudos selecionados (n= 27). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018

## Discussão

Na literatura, apesar da existência de trabalhos sobre o desenvolvimento de métodos de análise dos FAEEs em mecônio, poucos avaliaram a eficácia do método analítico e não determinaram um limite de concentração (*cut-off*) dos FAEEs, que pode ser considerado positivo para a exposição fetal ao álcool. As concentrações parecem estar relacionadas com diferentes padrões de consumo (leve, moderado e pesado) e o tempo e a duração da exposição ao álcool. Dessa forma, esta revisão sugere uma comparação e a determinação de métodos analíticos que sejam mais práticos e confiáveis para extrair e quantificar biomarcadores do álcool e que também seja determinado um limite de concentração dos FAEEs no mecônio<sup>(12)</sup>, posto que não há, na literatura, um valor limite de quantidade de álcool ingerida que produza resultados positivos de FAEEs no mecônio e determinados valores de referência

para uma população específica contribuem com resultados e interpretações mais fidedignos.

Para que se possam realizar a identificação e a quantificação dos biomarcadores, é necessário que a matriz mecônio passe, primeiramente, por uma etapa denominada de preparo de amostra a fim de isolar os analitos de interesse (FAEEs) dos interferentes da matriz biológica<sup>(20)</sup>. Os principais métodos de preparo das amostras empregados são: microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME); extração em fase líquida seguida por extração em fase sólida (LLE-SPE); extração em fase sólida (SPE): extração por micro-ondas assistida (MAE). Assim, o método analítico mais utilizado pelos autores dos artigos consistiu na utilização de extração em fase líquida seguida da extração em fase sólida (LLE-SPE). O segundo método mais utilizado foi a microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) e apenas um autor utilizou a extração por MAE.



Após o preparo da amostra, os FAEEs podem ser identificados e quantificados em metabólitos FAEEs. O principal método de quantificação das amostras empregado na revisão consiste na utilização de procedimentos como: Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (GC-MS); Espectroscopia de massa e cromatografia líquida (LC-MS); Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chamas (GC-FID). A técnica mais comumente empregada pelos autores foi a Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (GC-MS)<sup>(21)</sup>. Na cromatografia gasosa, a amostra processada é vaporizada em altas temperaturas no injetor e introduzida dentro da coluna cromatográfica por meio da fase móvel (gás de arraste). A coluna cromatográfica é do tipo capilar e contém a fase estacionária na qual os analitos interagem de acordo com suas características físico-químicas, chegando em diferentes tempos (tempo de retenção) no analisador de massas (espectrômetro de massas). Ao chegar ao espectrômetro de massas, a molécula é ionizada e fragmentada, sendo que cada analito gera um padrão de fragmentação único, o qual é registrado em um espectro que consiste na identidade da molécula. Além disso, essa informação também é registrada em função do tempo na forma de picos cuja área é proporcional à quantidade de analitos na amostra<sup>(22)</sup>. O segundo método mais usado é a Cromatografia Líquida acoplada à Espectroscopia de Massa (LC-MS) cuja diferença da GC-MS consiste, simplificada, na não necessidade da vaporização da amostra e, na fase móvel, em ser líquida e não um gás. Ambas as técnicas, GC-MS e LC-MS, são as duas mais utilizadas, provavelmente, por empregarem o espectro de massas para identificar os analitos ao invés de identificá-los somente pelo tempo de retenção como na técnica GC-FID. Além disso, a utilização da espectrometria de massa fornece resultados analíticos precisos, exatos e com baixo limite de detecção e quantificação.

Após a padronização dos métodos mais comumente usados e confiáveis, estes devem ser validados a fim de demonstrar que seus resultados são seguros e reproduzíveis no processo de detecção dos FAEEs em mecônio<sup>(7-8,23)</sup>.

Os FAEEs possuem nomenclaturas que dizem respeito ao nome trivial desses compostos, que são a fonte de origem dos seus ácidos carboxílicos. A letra E representa a abreviação do radical etila, que vem da molécula do etanol. O primeiro número representa o número da cadeia de carbonos do ácido carboxílico e o número após os dois pontos representa o número de ligações duplas dessa cadeia de carbonos<sup>(13)</sup>.

Alguns FAEEs são encontrados, em maior ou menor frequência, em mecônio de recém-nascidos cujas mães reportaram um consumo "pesado" de álcool. Os FAEEs de menor cadeia carbônica, como o E12:0 e o E14:0,

foram detectados em baixas concentrações em mecônio de recém-nascidos. As baixas concentrações desses FAEEs podem ser provenientes da ingestão de alimentos e de medicamentos que contêm traços de álcool em sua composição ou formação de etanol endógeno<sup>(13)</sup>. A relação entre as concentrações de cada FAEE varia muito de indivíduo para indivíduo, sendo um fator ainda pouco esclarecido, mas que parece estar relacionado com as diferenças na concentração endógena de ácidos graxos, diferenças na dieta materna, diferenças na cinética de síntese dos FAEEs e variabilidade na concentração de etanol nesses sítios de síntese<sup>(18)</sup>. Assim, a determinação de vários FAEEs e o uso da somatória de suas concentrações para interpretações dos casos positivos provaram ser mais eficientes do que o uso de um único metabólito.

Dessa forma, neste estudo, foram escolhidos, como biomarcadores da exposição fetal ao álcool, quatro FAEEs que apresentaram maior cadeia carbônica e que foram associados ao consumo "pesado" de álcool durante a gestação. Os quatro biomarcadores são: E18:2 linoleato de etila; E16:0 palmitato de etila; E18:0 estearato de etila e E18:1 oleato de etila. A somatória da concentração desses FAEEs apresentou, na maioria dos estudos, como ponto de corte, 600 ng/g para o consumo "pesado" de álcool durante a gestação. Vale ressaltar que a determinação de valores de referência para uma população específica contribui com interpretações mais fidedignas, mas, mesmo assim, podem ser observadas variações nas concentrações de FAEEs entre os indivíduos.

## Conclusão

Apesar da variabilidade tanto interindividual quanto no perfil de distribuição dos FAEEs, linoleato de etila, palmitato de etila, estearato de etila e oleato de etila parecem ser os biomarcadores mais prevalentes encontrados e em maiores concentrações, entretanto, na maioria das vezes, podem ocorrer divergências entre os resultados de FAEEs e o consumo relatado pela mãe. A soma de FAEEs é mais adequada e confiável do que a quantidade de FAEE individual para a interpretação de casos positivos da exposição fetal ao álcool. Há também de se levar em conta uma variação considerável nos pontos de corte da concentração de FAEEs usados para a determinação de casos positivos da exposição fetal ao álcool, sendo um limite de 600 ng/g para a suposição de consumo excessivo de álcool na gravidez empregando os métodos de quantificação mais comumente utilizados na literatura: Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (GC-MS); Espectroscopia de massa e cromatografia líquida e de extração (LC-MS) LLE-SPE e HS-SPME. Em suma, este estudo ressalta a importância do emprego de métodos laboratoriais na identificação da exposição fetal ao álcool, porém, não

exclui a importância do uso concomitante de questionários e entrevistas para complementar as análises dos FAEEs no mecônio.

## Referências

1. Goecke TW, Burger P, Fasching PA, Bakdash A, Engel A, Häberle L, et al. Meconium Indicators of Maternal Alcohol Abuse during Pregnancy and Association with Patient Characteristics. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/702848>
2. Toutain S, Simmat-Durand L, Crenn-Hébert C, Simonpoli AM, Vellut N, Genest L, et al. Consequences for the newborn of alcohol consumption during pregnancy. *Arch Pediatr*. 2010;17(9):1273-80. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2010.06.018>
3. Baña A, Tabernero MJ, Pérez-Muñuzuri A, López-Suárez O, Dosal S, Cabarcos P, et al. Prenatal alcohol exposure and its repercussion on newborns. *J Neonatal Perinatal Med*. 2014;7(1):47-54. <https://doi.org/10.3233/NPM-1471413>
4. Sanvisens A, Robert N, Hernández JM, Zuluaga P, Farré M, Coroleu W, et al. Alcohol Consumption during Pregnancy: Analysis of Two Direct Metabolites of Ethanol in Meconium. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):417. <https://doi.org/10.3390/ijms17030417>
5. Zarrei M, Hicks GG, Reynolds JN, Thiruvahindrapuram B, Engchuan W, Pind M, et al. Copy number variation in fetal alcohol spectrum disorder. *Biochem Cell Biol*. 2018;96(2):161-6. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0241>
6. Abernethy C, McCall KE, Cooper G, Favretto D, Vaiano F, Bertol E, et al. Determining the pattern and prevalence of alcohol consumption in pregnancy by measuring biomarkers in meconium. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2018;103(3):F216-F20. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-311686>
7. Zelner I, Shor S, Lynn H, Roukema H, Lum L, Eisinga K, et al. Neonatal screening for prenatal alcohol exposure: assessment of voluntary maternal participation in an open meconium screening program. *Alcohol*. 2012;46(3):269-76. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2011.09.029>
8. Zelner I, Shor S, Lynn H, Roukema H, Lum L, Eisinga K, et al. Clinical use of meconium fatty acid ethyl esters for identifying children at risk for alcohol-related disabilities: the first reported case. *J Popul Ther Clin Pharmacol [Internet]*. 2012 [cited 2021 Aug 30];19(1):e26-31. Available from: <https://jptcp.com/index.php/jptcp/article/view/444>
9. Bakdash A, Burger P, Goecke TW, Fasching PA, Reulbach U, Bleich S, et al. Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. *Anal Bioanal Chem*. 2010;396(7):2469-77. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3474-5>
10. Chan D, Klein J, Karaskov T, Koren G. Fetal exposure to alcohol as evidenced by fatty acid ethyl esters in meconium in the absence of maternal drinking history in pregnancy. *Ther Drug Monit*. 2004;26(5):474-81. <https://doi.org/10.1097/00007691-200410000-00003>
11. Cabarcos P, Tabernero MJ, Otero JL, Míguez M, Bermejo AM, Martello S, et al. Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium for detection of alcohol abuse during pregnancy: Correlation study between both biomarkers. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;100:74-8. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.07.023>
12. Yang JY, Kwak HS, Han JY, Choi JS, Ahn HK, Oh YJ, et al. Linear Versus Non-Linear Dose-Response Relationship Between Prenatal Alcohol Exposure and Meconium Concentration of Nine Different Fatty Acid Ethyl Esters. *Dose Response*. 2015;13(1). [https://doi.org/10.2203/dose-response.14-056\\_Yang](https://doi.org/10.2203/dose-response.14-056_Yang)
13. Hastedt M, Krumbiegel F, Gapert R, Tsokos M, Hartwig S. Fatty acid ethyl esters (FAEEs) as markers for alcohol in meconium: method validation and implementation of a screening program for prenatal drug exposure. *Forensic Sci Med Pathol*. 2013;9(3):287-95. <https://doi.org/10.1007/s12024-012-9385-3>
14. Manich A, Velasco M, Joya X, García-Lara NR, Pichini S, Vall O, et al. Validity of a maternal alcohol consumption questionnaire in detecting prenatal exposure. *An Pediatr (Barc)*. 2012;76(6):324-8. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2011.09.016>
15. Min MO, Singer LT, Minnes S, Wu M, Bearer CF. Association of fatty acid ethyl esters in meconium and cognitive development during childhood and adolescence. *J Pediatr*. 2015;166(4):1042-7. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.12.008>
16. Himes SK, Dukes KA, Tripp T, Petersen JM, Raffo C, Burd L, et al. Clinical sensitivity and specificity of meconium fatty acid ethyl ester, ethyl glucuronide, and ethyl sulfate for detecting maternal drinking during pregnancy. *Clin Chem*. 2015;61(3):523-32. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.233718>
17. Gareri J, Klein J, Koren G. Drugs of abuse testing in meconium. *Clin Chim Acta*. 2006;366(1-2):101-11. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.10.028>
18. Ostrea EM Jr, Hernandez JD, Bielawski DM, Kan JM, Leonardo GM, Abela MB, et al. Fatty acid ethyl esters in meconium: are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect? *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30(7):1152-9. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00131.x>
19. Gross TS, Harris F, Brown LA, Gauthier TW. Ethyl linolenate is elevated in meconium of very-low-birth-weight neonates exposed to alcohol in utero. *Pediatr Res*. 2017;81(3):461-7. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.237>
20. Kwak HS, Kang YS, Han KO, Moon JT, Chung YC, Choi JS, et al. Quantitation of fatty acid ethyl esters in human



meconium by an improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(21):1871-4. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.05.001>

21. Roehsig M, Paula DM, Moura S, Diniz EM, Yonamine M. Determination of eight fatty acid ethyl esters in meconium samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2010;33(14):2115-22. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000118>

22. Pichini S, Morini L, Pacifici R, Tuyay J, Rodrigues W, Solimini R, et al. Development of a new immunoassay for the detection of ethyl glucuronide (EtG) in meconium: validation with authentic specimens analyzed using LC-MS/MS. Preliminary results. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(8):1179-85. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-1087>

23. Zelner I, Hutson JR, Kapur BM, Feig DS, Koren G. False-positive meconium test results for fatty acid ethyl esters secondary to delayed sample collection. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012;36(9):1497-506. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01763.x>


24. Hopkins RB, Paradis J, Roshankar T, Bowen J, Tarride JE, Blackhouse G, et al. Universal or targeted screening for fetal alcohol exposure: a cost-effectiveness analysis. *J Stud Alcohol Drugs.* 2008;69(4):510-9. <https://doi.org/10.15288/jsad.2008.69.510>

## Contribuição dos autores

**Concepção e desenho da pesquisa:** Pillar Campos Prado, Erikson Felipe Furtado, Humberto de Oliveira Simões. **Obtenção de dados:** Pillar Campos Prado, Erikson Felipe Furtado, Fabiana Spinetti dos Santos. **Análise e interpretação dos dados:** Pillar Campos Prado, Erikson Felipe Furtado, Fabiana Spinetti dos Santos, Humberto de Oliveira Simões. **Análise estatística:** Pillar Campos Prado, Erikson Felipe Furtado, Fabiana Spinetti dos Santos, Humberto de Oliveira Simões. **Redação do manuscrito:** Pillar Campos Prado, Erikson Felipe Furtado, Humberto de Oliveira Simões. **Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante:** Pillar Campos Prado, Erikson Felipe Furtado, Humberto de Oliveira Simões.

Recebido: 28.08.2021

Aceito: 02.12.2021

Autor correspondente:  
Pillar Campos Prado  
E-mail: [pillarprado@usp.br](mailto:pillarprado@usp.br)  
 <https://orcid.org/0000-0001-8410-1746>

**Copyright © 2023 SMAD, Rev Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog.**  
Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da Licença Creative Commons CC BY.

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original. É a licença mais flexível de todas as licenças disponíveis. É recomendada para maximizar a disseminação e uso dos materiais licenciados.