

Michelle Barcellos

**ELETROFORESE CAPILAR NA DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE
NITRATO E NICOTINA EM DIFERENTES AMOSTRAS**

Dissertação submetida ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barcellos, Michelle

ELETROFORESE CAPILAR NA DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE NITRATO
E NICOTINA EM DIFERENTES AMOSTRAS [dissertação] / Michelle
Barcellos ; orientador, Gustavo Amadeu Micke -
Florianópolis, SC, 2012.
122 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Nicotina. 3. Nitrato. 4. Eletroforese
capilar. 5. Análise rápida simultânea. I. Micke, Gustavo
Amadeu . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Este trabalho é dedicado ao meu
marido e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Vida, por me dar força e sabedoria para trilhar um caminho de bem com alegria e satisfação;

Aos meus pais e irmão, por me guiarem com seus exemplos de união, caráter e alegria;

Ao meu marido Marcio, por me apoiar, com amor, segurança e confiança;

Às minhas avós, que me iluminam com sua fé e perseverança;

À toda minha família, pela convivência e harmonia;

Aos meus amigos, que torceram por minhas lutas e vibraram por minhas conquistas;

Ao Prof. Dr. Gustavo Micke, por todas as oportunidades e sugestões;

À Prof^a. Ana Carolina, pelos ensinamentos e opiniões sinceras;

Aos Profs Luiz Augusto dos Santos Madureira e Marcone Augusto Leal de Oliveira, pela contribuição atenciosa e estímulo;

Aos colegas de laboratório, pelos bons momentos e aprendizados compartilhados;

Ao INCT-catálise, ao CNPq, à CAPES e à FARMA Service pelo suporte financeiro.

Foi uma etapa de grande crescimento e muitos aprendizados!

Vivendo para aprender a jogar, mas sem medo de ser feliz!

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein

RESUMO

No presente trabalho foi desenvolvida uma metodologia para a determinação de nitrato e nicotina utilizando a eletroforese capilar de zona. A proposta foi utilizar a injeção da amostra em lados opostos do capilar de forma sequencial promovendo uma análise rápida e simultânea de ambos os analitos em diferentes matrizes, com tempos de análise inferiores à 2 minutos. Esta estratégia de injeção favorece a migração dos analitos para os eletrodos de carga oposta durante a aplicação de voltagem e até que alcancem o detector. Para esta análise, o eletrólito de corrida foi composto de 25 mmol L⁻¹ de Tris-(hidroximetil)-aminometano - TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH ajustado até 8,1 com H₂SO₄. O pré-condicionamento do capilar foi otimizado em 5 minutos de NaOH 1 mol L⁻¹, 10 minutos de água desionizada e 20 minutos de eletrólito de corrida. A avaliação da metodologia desenvolvida apresentou parâmetros que confirmam sua seletividade em relação a outros compostos de interesse e/ou impurezas. Os limites de detecção e quantificação do nitrato em padrões foram de respectivamente 0,2 mg L⁻¹ e 0,6 mg L⁻¹ e enquanto que para as amostras chegaram a 2,3 mg L⁻¹ e 7,8 mg L⁻¹. Para a nicotina os limites de detecção e quantificação em padrões foram de respectivamente 0,8 mg L⁻¹ e 2,6 mg L⁻¹ e enquanto que para as amostras chegaram a 9,5 mg L⁻¹ e 31,8 mg L⁻¹. O método mostrou boa precisão instrumental e repetibilidade com coeficiente de variação inferior a 5% para os valores de área relativa de padrão/padrão interno e inferiores a 1% para os valores de tempo de migração. A extração dos analitos foi procedida em solução aquosa acidificada com 5% (v/v) de H₂SO₄, seguida de centrifugação em centrífuga Eppendorf, modelo MiniSpin[®] Plus à 10.000 rpm por 5 minutos. Por fim o sobrenadante foi coletado e diluído em diferentes proporções para análise de nitrato e nicotina de acordo com os níveis dos analitos em cada conjunto de amostras. Para as amostras de fumo e cigarro a determinação de nitrato, nicotina e seus respectivos padrões internos os ensaios de extração apresentaram concentrações independentes do volume de solução extratora para diferentes massas de amostra seca, porém com tempos de extração elevados para a nicotina. A avaliação estatística dos dados proporcionou o entendimento prévio da distribuição dos teores de nitrato e nicotina no conjunto de amostras.

Palavras chaves: Nitrato. Nicotina. Eletroforese Capilar

ABSTRACT

In this work was developed a methodology for the determination of nitrate and nicotine using capillary zone electrophoresis. The purpose was to use the injection of sample on opposite sides of the capillary sequentially promoting a rapid and simultaneous analysis of both analytes in different samples with analysis times less than 2 minutes. This injection strategy facilitates migration of the analyte to the electrode of opposite charge during the application voltage until they reach the detector. For this analysis, the background electrolyte was composed of 25 mmol L⁻¹ Tris-(hydroxymethyl) aminomethane - TRIS and 5 mmol L⁻¹ H₂SO₄, with pH adjusted to 8.1 with H₂SO₄. The preconditioning of the capillary was optimized at 5 minutes of NaOH 1 mol L⁻¹, 10 minutes of deionized water and 20 minutes of running electrolyte. The assessment methodology presented parameters that confirm its selectivity over other compounds of interest and / or impurities. The limits of detection and quantification standards nitrate were respectively 0.2 mg L⁻¹ and 0.6 mg L⁻¹ and as for the samples reached 2.3 mg L⁻¹ and 7.8 mg L⁻¹. Nicotine to the limits of detection and quantification standards were respectively 0.8 mg L⁻¹ and 2.6 mg L⁻¹ and as for the samples reached 9.5 mg L⁻¹ and 31.8 mg L⁻¹. The instrumental method showed good accuracy and repeatability with a coefficient of less variation 5% for values of relative area of standard / internal standard and less than 1% for values of migration time. The extraction was performed for analytes in aqueous solution acidified with 5% (v / v) of H₂SO₄, followed by centrifugation in Eppendorf centrifuge, model MiniSpin[®] Plus at 10,000 rpm for 5 minutes. Finally the supernatant was collected and diluted in various proportions to analyze nitrate and nicotine in accordance with the levels of analytes in each set of samples. For the samples of cigarette smoke and the determination of nitrate, nicotine and their internal standards extraction tests had concentrations independent of the volume of extraction solution to different mass of dry sample, but with high extraction times for nicotine. Statistical evaluation of data provided prior knowledge of the distribution of levels of nitrate and nicotine in all samples.

Keywords: Nitrate. Nicotine. Capillary Electrophoresis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura do cigarro eletrônico	30
Figura 2 - Substâncias químicas presentes no cigarro.....	31
Figura 3 : Representação esquemática da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas das plantas.....	33
Figura 4 : Biossíntese do íon 1-metil-1, 2-pirrolidinil, precursor da nicotina no <i>N. tabacum</i>	35
Figura 5 : Biossíntese da S-nicotina no <i>N. tabacum</i>	36
Figura 6 : Nitrosação da nicotina para formação de nitrosaminas específicas.....	37
Figura 7 : Produção de tabaco no Brasil – Período: 1990-2010.....	39
Figura 8 : Produção anual de maços de cigarros no Brasil entre 2000 e 2011.....	40
Figura 9 : Consumo oficial aparente de cigarros <i>per capita</i> no Brasil – Período: 1980/2010	41
Figura 10 : Conteúdo informativo da lateral das embalagens de cigarro.....	43
Figura 11 : Frase sobre venda proibida a menores de 18 anos	44
Figura 12 : Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar	55
Figura 13 : Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.....	57
Figura 14 : Representação da variação do FEO em função do pH..	57
Figura 15 : Representação esquemática da condução de analitos catiônicos, neutros e aniônicos pelo FEO.....	58
Figura 16 : Esquema dos modos de análise de nitrato e nicotina monoprotionada. a) Polaridade positiva na extremidade da injeção; b) Polaridade negativa na extremidade da injeção.....	60
Figura 17 : Esquema do modo de injeção para análise simultânea de nitrato e nicotina monoprotionada.....	61
Figura 18 : Descrição do gráfico boxplot. Divisão de um conjunto de dados em <i>quartis</i> , <i>Q</i>	63
Figura 19 : Ilustração dos padrões comuns de gráficos de dispersão.....	65
Figura 20 : (1) Nicotina neutra; (2) nicotina monoprotionada; (3) nicotina diprotionada	71
Figura 21 : Curva de carga vs. pH para o analito nicotina e seu padrão interno lidocaína.....	72

Figura 22: Gráfico de mobilidade eletroforética vs. pH para o nitrato, seu padrão interno iodeto e para os componentes do eletrólito, TRIS e sulfato	73
Figura 23: Esquema dos modos de análise de nitrato e nicotina monoprotionada. a) Polaridade positiva na extremidade da injeção; b) Polaridade negativa na extremidade da injeção.....	74
Figura 24: Esquema do modo de injeção para análise simultânea de nitrato e nicotina monoprotionada.....	74
Figura 25: Eletroferograma da análise simultânea da mistura de padrões de 1,325 mg L ⁻¹ de iodeto, 5 mg L ⁻¹ de nitrato, 65 mg L ⁻¹ de nicotina e 11,6 mg L ⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L ⁻¹ de TRIS e 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV	76
Figura 26: Esquema representativo do fenômeno de eletrodispersão causado pela diferença de condutividade elétrica entre analito e eletrólito, formando como resultado gráfico desta dispersão cauda nas bandas eletroforéticas	77
Figura 27: Eletroferogramas sobrepostos de 10 análises sequenciais do ponto médio da curva de calibração para o teste de precisão instrumental com condicionamento de X minutos de hidróxido de sódio 1 mol L ⁻¹ , Y minutos de água e Z minutos de eletrólito de corrida. A) 5X, 5Y, 5Z; B) 10X, 10Y, 20Z; C) 5X, 10Y, 20Z. A composição analisada foi de 1,325 mg L ⁻¹ de iodeto, 5 mg L ⁻¹ de nitrato, 65 mg L ⁻¹ de nicotina e 11,6 mg L ⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L ⁻¹ de TRIS e 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. Destaque no quadro vermelho para a variação dos tempos de migração do nitrato nos conjuntos de análises apresentados.....	79
Figura 28: Eletroferogramas comparativos em 200 nm das amostras de folhas de fumo desidratadas (F2), cigarro comercial (C2), e cigarro comercial aromatizado (CA2). A injeção foi hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L ⁻¹ de TRIS e 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. 2. Nitrato e 3. Nicotina.....	82
Figura 29: Eletroferogramas comparativos em 200 nm das amostras de adesivo transdérmicos para reposição de nicotina	

(Adesivo) e goma mastigável (Goma). A injeção foi hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L ⁻¹ de TRIS e 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. 3. Nicotina	83
Figura 30: Eletroferogramas paralelos da curva de padrões para a análise simultânea da mistura de padrões de 1,325 mg L ⁻¹ de iodeto, 1 a 9 mg L ⁻¹ de nitrato, 13 a 117 mg L ⁻¹ de nicotina e 11,6 mg L ⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L ⁻¹ de TRIS e 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. 1. Iodeto; 2. Nitrato; 3. Nicotina e 4. Lidocaína	84
Figura 31: Curva de calibração da mistura de padrões de A) 1,325 mg L ⁻¹ de iodeto, 1 a 9 mg L ⁻¹ de nitrato e B) 13 a 117 mg L ⁻¹ de nicotina e 11,6 mg L ⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L ⁻¹ de TRIS e 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV	85
Figura 32: Curva de extração simultânea em função do tempo para os analitos das amostras A) extrato de tabaco em pó e B) extrato de cigarro comercial. Análise das amostras com adição de 1,325 mg L ⁻¹ de iodeto e 11,6 mg L ⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L ⁻¹ de TRIS e 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV	89
Figura 33: Curva de extração simultânea em função da massa de amostra para os analitos A) extrato de tabaco em pó e B) extrato de cigarro comercial. Análise das amostras com adição de 1,325 mg L ⁻¹ de iodeto e 11,6 mg L ⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L ⁻¹ de TRIS e 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV	90
Figura 34: Eletroferogramas comparativos da análise simultânea de diferentes amostras de fumo ao natural (F1 e F3) e amostras de fumo seco (FS1, FS2, FS3 e FS4). Em cada amostra foi adicionada uma mistura dos padrões internos de 1,325 mg L ⁻¹ de iodeto e 11,6 mg L ⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica de 50 mbar pelas duas extremidades do capilar, eletrólito de corrida	

composto de 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. **1.** Iodeto; **2.** Nitrato; **3.** Nicotina e **4.** Lidocaína..... 92

Figura 35: Eletroferogramas comparativos da análise simultânea de diferentes amostras de cigarros comerciais (C1, C2, C3 e C4) e amostras cigarros comerciais aromatizados (CA1, CA2). Em cada amostra foi adicionada uma mistura dos padrões internos de 1,325 mg L⁻¹ de iodeto e 11,6 mg L⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica de 50 mbar pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. **1.** Iodeto; **2.** Nitrato; **3.** Nicotina e **4.** Lidocaína..... 94

Figura 36: Eletroferogramas comparativos da análise simultânea para a amostra de adesivo transdérmico e para a goma de mascar apresentada na mesma escala do adesivo e com zoom. Em cada amostra foi adicionada uma mistura dos padrões internos de 1,325 mg L⁻¹ de iodeto e 11,6 mg L⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica de 50 mbar pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. **1.** Iodeto; **2.** Nitrato; **3.** Nicotina e **4.** Lidocaína..... 96

Figura 37: Eletroferogramas sobrepostos para a análise simultânea de diferentes espécies vegetais da família das solenáceas e outros chás. Em cada amostra foi adicionada uma mistura dos padrões internos de 1,325 mg L⁻¹ de iodeto e 11,6 mg L⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica de 50 mbar pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. **1.** Iodeto; **2.** Nitrato; e **4.** Lidocaína 97

Figura 38: Análise descritiva para os dados autoescalonados da concentração de nitrato em amostras de fumo. A. Histograma; B. Box e Whisker..... 103

Figura 39: Análise descritiva para os dados autoescalonados da concentração de nitrato em amostras de cigarros comerciais e cigarros comerciais aromatizados. A. Histograma; B. Box e Whisker..... 104

Figura 40: Análise descritiva para os dados autoescalonados da concentração de nicotina em amostras de fumo. A. Histograma;

B. Box e Whisker	105
Figura 41: Análise descritiva para os dados autoescalonados da concentração de nicotina em amostras de cigarros comerciais e cigarros comerciais aromatizados. A. Histograma; B. Box e Whisker	106
Figura 42: Gráfico de dispersão para o grupo de amostras de fumo (folhas de tabaco - F1 a F3 e extrato seco de tabaco - FS1 a FS17). Dados autoescalonados da concentração de nitrato e nicotina nas amostras	107
Figura 43: Gráfico de dispersão para o grupo de amostras de produtos industrializados (cigarros comerciais - C1 a C4; cigarros comerciais aromatizados - CA1 e CA2; adesivo transdérmico para uso em TRN e goma de mascar contendo nicotina. Dados autoescalonados da concentração de nitrato e nicotina nas amostras.....	108
Figura 44: Gráfico de análise de componentes principais para o grupo de amostras de fumo (folhas de tabaco - F1 a F3 e extrato seco de tabaco - FS1 a FS17). Dados autoescalonados da concentração de nitrato e nicotina nas amostras	109
Figura 45: Gráfico de análise de componentes principais para o grupo de amostras de produtos industrializados (cigarros comerciais - C1 a C4; cigarros comerciais aromatizados - CA1 e CA2; adesivo transdérmico para uso em TRN e goma de mascar contendo nicotina. Dados autoescalonados da concentração de nitrato e nicotina nas amostras	110

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Desvio padrão de precisão intermediária	81
Equação 2: Autoescalamento de conjunto de dados.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentual das pessoas de 15 anos ou mais de idade usuários de tabaco fumado – 2008	46
Tabela 2: Preço mínimo de cigarros	47
Tabela 3: Gasto médio mensal com cigarros industrializados – 2008.....	48
Tabela 4: Coeficientes de variação (CV) para área e tempo de migração das diferentes estratégias de condicionamento, A, B e C, apresentadas na Figura 27 para 10 análises simultânea de nitrato e nicotina	80
Tabela 5: Figuras de mérito obtidas na validação da metodologia desenvolvida	87
Tabela 6: Valores obtidos para a quantificação de amostras diversas, apresentados em mg Kg ⁻¹ de massa seca de amostra	98
Tabela 7: Dados originais das concentrações de nitrato e nicotina nas amostras de tabaco seco ao natural (F), seco na estufa e macerado (FS), cigarros comerciais (C), e cigarros aromatizados (CA).....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT - Aliança de Controle de Tabagismo
ADE - Ato Declaratório Executivo
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANVISATAB - Sistema para Cadastro dos Produtos Derivados do Tabaco
CG – Cromatografia a Gás
CMF - Centro de Melhoramento de Fumo
CONFAR – Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins a as Respectivas Matérias-Primas
CQCT - Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco
CV - Coeficiente de Variação
EC – Eletroforese Capilar
ECZ - Eletroforese Capilar de Zona
EEI - Estação Experimental de Itajaí
FEO - Fluxo Eletrosmótico
FID - Detector de Ionização em Chamas, do inglês *Fire Ionization Detector*
GATS - Global Adult Tobacco Survey
GLN - Glutamina
GLU - Glutamato
GOGAT - Sintase do Glutamato
GPDTA - Gerência de Produtos Derivados do Tabaco
GS - Sintase da Glutamina
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Pressure Liquid Chromatography*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA – Instituto Nacional do Câncer
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial
INTTaRR - International Network for Tobacco Testing and Research for Regulation
IV – Infravermelho
LACEN - Laboratórios Centrais de Saúde Pública OS
LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MECK – Cromatografia Eletrocínética Micelar, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*

NNN – N^o-nitrosonornicotina; NAB – N^o-nitrosoanabasina; e NAT – N^o-nitrosoanabatina

NPD - Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCA – Análise de Componentes Principais, do inglês *Principal Component Analysis*

PETAB - Pesquisa Especial de Tabagismo

PROERB - Programa Educacional de Resistência às Drogas

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada da Anvisa

RN - Redutase do Nitrato

RNi - Redutase do Nitrito

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Micro Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*

TRIS - Tris-(hidroximetil)-aminometano

TRN -Terapias de Reposição de Nicotina

UV - Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 O TABACO E A ORIGEM DO CIGARRO	27
1.1.1 História do cigarro - dos índios ao cigarro eletrônico	27
1.1.2 Componentes do cigarro	30
1.1.3 Farmacodinâmica do nitrato e da nicotina	32
1.2 PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE FUMO E CIGARROS	38
1.2.1 Processo de produção - manufatura e industrialização	38
1.2.2 Pesquisa e desenvolvimento	41
1.2.3 Agências reguladoras do setor - Controle de qualidade do cigarro	42
1.3 MERCADO CONSUMIDOR, SAÚDE PÚBLICA E ASPECTOS MORAIS.....	45
1.3.1 Mercado consumidor - dados estatísticos	45
1.3.2 Política social antitabagista	47
1.4 AÇÃO BENÉFICA DA NICOTINA E FORMAS DE OBTENÇÃO.....	49
1.4.1 Ação benéfica da nicotina	49
1.4.2 Outras formas de obtenção do fármaco	49
1.5 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE NICOTINA E NITRATO.....	51
1.5.1 Revisão Bibliográfica	51
1.5.2 Eletroforese Capilar	53
1.5.2.1 Desenvolvimento da técnica	53
1.5.2.2 Instrumentação	54
1.5.2.3 Fluxo eletrosmótico	56
1.5.2.4 Eletroforese Capilar de Zona	59
1.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	62
1.6.1 Análise estatística univariada	62
1.6.2 Análise estatística multivariada	64
2 OBJETIVOS	67
2.1 OBJETIVO GERAL	67
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	68
3.1 PREPARO DOS PADRÕES E SOLUÇÕES.....	68
3.2 PREPARO DE AMOSTRAS	68

3.3 EQUIPAMENTOS	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE SIMULTÂNEA DE NITRATO E NICOTINA.....	70
4.2 FIGURAS DE MÉRITO	77
4.2.1 Conformidade do sistema	78
4.2.2 Testes de seletividade	81
4.2.3 Linearidade e curva de calibração	84
4.2.4 Limites de detecção e de quantificação	86
4.2.5 Precisão	86
4.2.5.1 Precisão instrumental	86
4.2.5.2 Repetibilidade	87
4.2.5.3 Precisão intermediária	87
4.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS	89
4.3.1 Estudos de extração simultânea de nitrato e nicotina em amostras de fumo e cigarro comercial	89
4.3.1.1 Avaliação do tempo de extração	89
4.3.1.2 Avaliação do volume extrator	91
4.3.2 Quantificação de nitrato e nicotina em diferentes amostras.....	93
4.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	100
4.4.1 Pré-tratamento de dados	101
4.4.2 Análise estatística univariada	103
4.4.3 Análise estatística multivariada	108
5 CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 O TABACO E A ORIGEM DO CIGARRO

1.1.1 História do cigarro - dos índios ao cigarro eletrônico

A história do cigarro remete primeiramente a história do tabaco e, conforme a Cunha (2007) e Souza Cruz (2012), esta planta originou-se nos Andes e viajou junto com os índios aborígenes americanos através da América Central, onde eles consumiam a erva durante as cerimônias religiosas. Para Rosemberg (2003, p. 13),

É um enigma que tantas culturas indígenas espalhadas neste continente, as quais dificilmente podiam contactar-se, vivenciassem ritual semelhante mágico-religioso, sagrado, no qual o sacerdote, cacique ou pajé e seus circunstantes entravam em transe aspirando o fumo do tabaco.

A Aliança de Controle de Tabagismo – ACT (2012) expõe que a folha do tabaco plantada por todo o continente espalhou-se pela Europa em função do comércio com os colonizadores. Lá chegando, descontextualizou a política econômica daqueles governos, transformando-se na maior fonte de renda dos cofres públicos, sendo que no século XVII a Espanha detinha uma parte expressiva do comércio de tabaco daquele Continente. Porém, a Inglaterra e a Holanda reprimiram qualquer monopólio que aquele país quis praticar, dominando as importações e exportações do produto. Neste período, algumas empresas chegaram a ser grandes potências como a Companhia das Índias e a Virgínia Company, da Inglaterra.

No Brasil, conforme a Souza Cruz (2012), a produção de tabaco começou nas regiões de Salvador e Recife. Mas, durante a ocupação holandesa em Pernambuco na primeira metade do século XVII, o cultivo do produto teve uma importância relevante na carteira comercial da Companhia das Índias Ocidentais. Após a expulsão dos holandeses, surgiram as primeiras legislações reguladoras da atividade produtiva e,

em 1674, foi criada a Junta de Administração do Tabaco, que estabeleceu regras para todas as colônias portuguesas. A partir de 1850 sobressaíram as províncias de Minas Gerais, Bahia e, com a vinda dos imigrantes alemães, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Já em 1917, foi instalada a empresa Brazilian Tobacco Corporation em Santa Cruz do Sul, no Rio Grande do Sul.

O empreendimento partiu da empresa britânica British American Tobacco, e foi o passo inicial para a transformação da cidade em um pólo nacional da indústria fumageira. Em 1920, a empresa passa a se chamar Companhia Brasileira de Fumo em Folha e em 1955 é adquirida pela Souza Cruz. (SOUZA CRUZ, 2012)

Conforme Rosemberg (2003), em 1560 o embaixador francês em Portugal, Jean Nicot, recebeu a planta do tabaco e enviou-a para a França. Após muitos estudos, em 1737, Linneu batizou o tabaco de *Nicotiana tabacum* em homenagem a Nicot, na primeira classificação científica das plantas. Já em 1818, Posselt e Reimann descobriram o princípio ativo do tabaco e o chamaram de “nikotin”, sendo que, neste mesmo ano, os dicionários franceses já registravam o verbete “nicotine”.

A evolução do uso do tabaco pode ser conhecida através de Rosemberg (2003) e Cunha (2007), onde o autor explica que partindo do século XVIII houve uma disseminação do uso de rapé – tabaco em pó -, para aspirar. Já os nobres se utilizavam as tabaqueiras, muitas delas de ouro com diamantes. Porém, aqueles sem posses usavam o rapé aspirando-o no dorso do polegar. A partir do século XIX surgiu o charuto e com ele o status econômico-social de quem o ostentava.

Já no que diz respeito ao cigarro, este surgiu em meados do século XIX. Porém, os espanhóis já fumavam tabaco enrolado em papel, chamado “papelete”. Acredita-se que o termo espanhol “cigarrillos” procede de cigarral, isto é, plantações que foram invadidas por cigarras. Conforme Rosemberg (2003, p.17), “o nome generalizou-se: cigarette em francês, inglês e algumas outras línguas; zigarett em alemão; sigaretta em italiano e cigarro em português”.

A difusão do cigarro aconteceu em 1860 em Paris e, na década de 1880, nos Estados Unidos, quando foi inventada uma máquina que produzia duzentas unidades por minuto. Além disso, o cigarro era

considerado mais econômico e fácil de carregar e usar do que os charutos e cachimbos. Mas, a grande explosão mundial se deu após a Primeira Guerra Mundial, isto é, de 1914 a 1918, principalmente no sexo masculino, sendo que o crescimento junto ao público feminino viria com a Segunda Guerra Mundial, de 1939 a 1945 (ROSEMBERG, 2003).

A generalização do cigarro, segundo Rosenberg (2003), se deu também através transculturação, ou seja, através de manifestações culturais como peças teatrais, músicas eruditas e populares, poesias, literatura, filmes, entre outros.

Com a popularização em massa do cigarro e com os diversos combates ao consumo da nicotina, surgem os cigarros eletrônicos, os quais, conforme a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2012), também são conhecidos como *e-cigarette*, *e-ciggy*, *e-cig*, *MiniCiggy*, *e-pipe*, *e-cigar*, entre outros nomes e “visualmente parece um cigarro ou um charuto, ou uma cigarrilha ou ainda um cachimbo”.

A ANVISA (2012) age na regulamentação, no controle e na fiscalização dos produtos e serviços que possuem risco à saúde pública, abrangendo assim os produtos derivados do tabaco, conforme a Lei 9782/1999.

É importante esclarecer que

A ponteira do dispositivo funciona como piteira e contém um cartucho substituível, preenchido com um líquido composto de propileno glicol, nicotina e substâncias aromatizantes, se o usuário desejar. O usuário aspira uma névoa contendo pequenas gotículas do líquido e a nicotina que necessita para manter a dependência. A comercialização de cigarros eletrônicos no Brasil está proibida, por meio da Resolução de Diretoria Colegiada da Anvisa, RDC 46, de 28 de agosto de 2009. (ANVISA, 2012)

De acordo com o PROERB - Programa Educacional de Resistência às Drogas (2012), a comercialização de cigarros eletrônicos no Brasil foi proibida pela ausência de prova científica sobre a eficácia e segurança do produto.

Na Figura 1 é possível visualizar um cigarro eletrônico e seus elementos, bem como informações de equivalência entre a quantidade de pitadas e de cigarros, além da quantidade de cartuchos e de cigarros.



Figura 1 – Estrutura do cigarro eletrônico
Fonte: PROERB (2012)

A PROERB (2012) declara que o cigarro eletrônico, conforme apresentado na Figura 1, foi desenvolvido por uma empresa na China objetivando ser mais um produto a ajudar os fumantes a deixarem o vício do tabagismo, junto com os adesivos e chicletes de nicotina já existentes, sendo que seu uso simula ser um cigarro comum, pois “quando tragado, o ar flui pelo dispositivo, e ativa um atomizador, que injeta microgotículas de nicotina líquida no ar. A sensação de estar fumando um cigarro normal é a mesma, pois até o vapor produzido imita a fumaça liberada”.

1.1.2 Componentes do cigarro

Muitos não acreditam que o fumo e a fumaça do cigarro contém 4.720 substâncias, porém elas foram identificadas em 1998 por Dietrich Hoffman, Diretor do Instituto para a Prevenção do Câncer dos Estados Unidos (SANTOS, 2007).

Na Figura 2, algumas substâncias nocivas que são encontradas no filtro e no corpo do cigarro, como por exemplo, metais pesados

potencialmente cancerígenos, além de outras substâncias com ação cancerígena comprovada. Dentre tantas, a nicotina é a substância que causa a dependência química. Durante a combustão do cigarro são produzidos outros compostos, como alguns gases tóxicos (FÉDÉRATION FRANÇAISE DE CARDIOLOGIE, 2012).



Figura 2: Substâncias químicas presentes no cigarro
 Fonte: Adaptado de Fédération Française de Cardiologie (2012).

De acordo com a Fédération Française de Cardiologie (2012) e a Figura 2, além da nicotina, molécula biologicamente ativa, e as dimetilnitrosaminas, potencializadoras da ação cancerígena, as principais substâncias presentes no cigarro e reconhecidas como cancerígenas são: alcatrão, benzopireno, cádmio, cloreto de vinila, dibenzacridina, naftilamina, pireno, polônio 210, toluídina, uretano. Além destes compostos, outras substâncias nocivas à saúde humana são

acetona, amoníaco, arsênio, chumbo, fenol, mercúrio, monóxido de carbono, naftaleno e tolueno.

Santos (2007) esclarece que a fumaça, proveniente da queima das substâncias encontradas no cigarro, é composta por gases, vapores e partículas em suspensão que, para estudar a composição química e propriedades biológicas, a fumaça é separada em duas fases: particulada e gasosa. Além disso,

A análise da composição química é realizada em máquinas de fumar, nas quais grande número de cigarros são aspirados simultaneamente de forma que simule hábitos de fumantes; um condensado marrom-amarelado conhecido como alcatrão do tabaco é coletado e resfriado à temperatura do gelo seco (-70°C) ou nitrogênio líquido (-196°C). Nessa forma o alcatrão contém toda a fase particulada da fumaça, assim como os componentes condensáveis da fase gasosa. A quantidade de alcatrão da fumaça de um cigarro é de entre 3 e 40 mg, variando essa quantidade de acordo com as condições de queima e de condensação, do tamanho do cigarro, uso ou não de filtro, porosidade do papel, conteúdo do cigarro, peso e tipo do tabaco. A fase gasosa representa cerca de 60% do total da fumaça do cigarro. (SANTOS, 2007, p. 8)

1.1.3 Farmacodinâmica do nitrato e da nicotina

Um dos elementos essenciais para o crescimento das plantas é o nitrogênio, porém ele está em constante mobilidade no solo e, portanto, é limitado. Além disso, sua absorção se dá através do nitrato (NO_3^-) e do amônio (NH_4^+) pela membrana das células da epiderme e córtex da raiz. (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000).

A Figura 3 representa um esquema para a assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas.

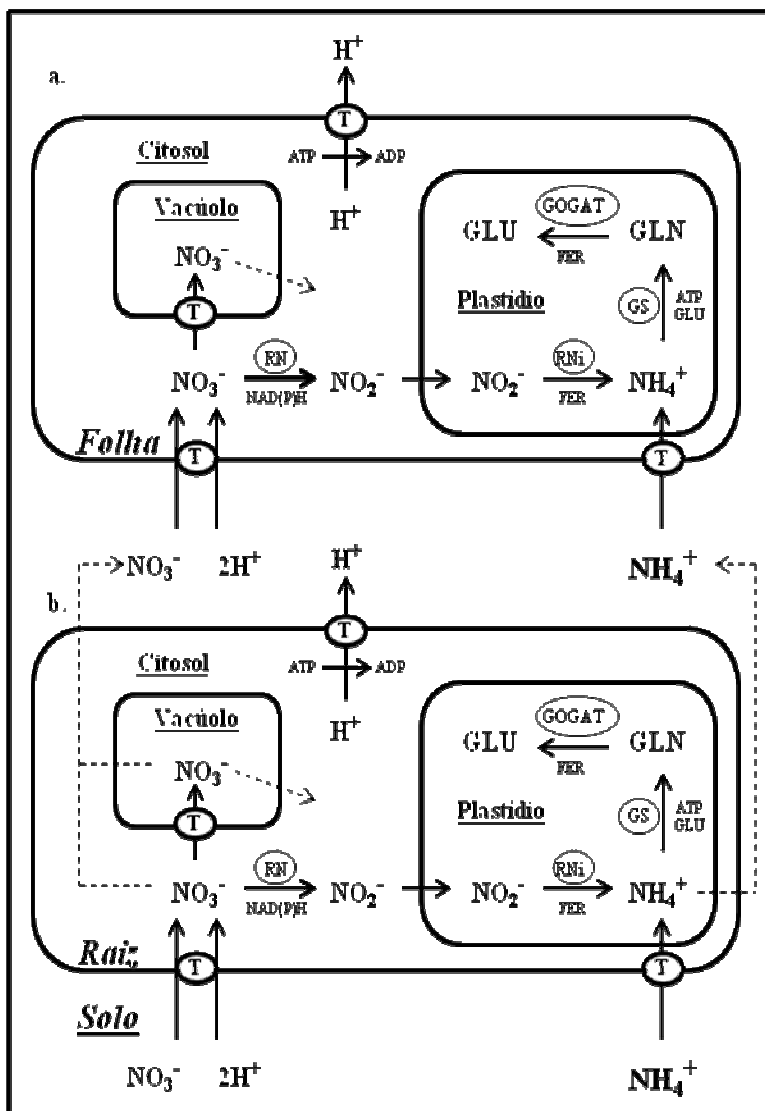


Figura 3 – Representação esquemática da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas das plantas

Fonte: Adaptado de BREDEMEIER & MUNDSTOCK (2000, p. 366)

Esclarecimentos de Bredemeier e Mundstock (2000, p. 366) acerca do esquema da Figura 3 mostram alguns dos principais processos envolvidos na formação de compostos nitrogenados nas plantas,

A passagem de nitrato ocorre através de transportadores específicos para essas formas de nitrogênio [...], após a sua entrada na célula, o nitrato pode ser reduzido a nitrito (NO_2^-), no citosol, através da enzima redutase do nitrato (RN) e, logo a seguir, convertido a amônio (NH_4^+) no plastídio, através da enzima redutase do nitrito (RNi). O amônio é, então, incorporado em aminoácidos pelas enzimas sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato (GOGAT), formando glutamina (GLN), glutamato (GLU) e outros aminoácidos e seus metabólitos [...].

Alternativamente, o NO_3^- e o NH_4^+ podem ser transportados por carregadores específicos através do tonoplasto e armazenados no vacúolo, para posteriormente serem reduzidos no citosol da mesma célula ou serem translocados inalterados para a parte aérea da planta [...]. Nos colmos e folhas [...], o nitrato é reduzido a nitrito pela ação da enzima RN, e o amônio, através da enzima RNi. O amônio é então incorporado em aminoácidos pelas enzimas GS e GOGAT. Estes elementos também são armazenados no vacúolo das células para posterior redução e utilização [...].

Uma das funções do nitrogênio é a síntese de compostos essenciais, como os aminoácidos, as proteínas, os ácidos nucleicos, entre outros componentes celulares, necessários para o desenvolvimento da planta (RUIZ, 1999).

A Figura 4 mostra o esquema da biossíntese do íon 1-metil-1,2-pirrolidinil, precursor da molécula de nicotina, através de subseqüentes reações entre os aminoácidos arginina e ornitina.

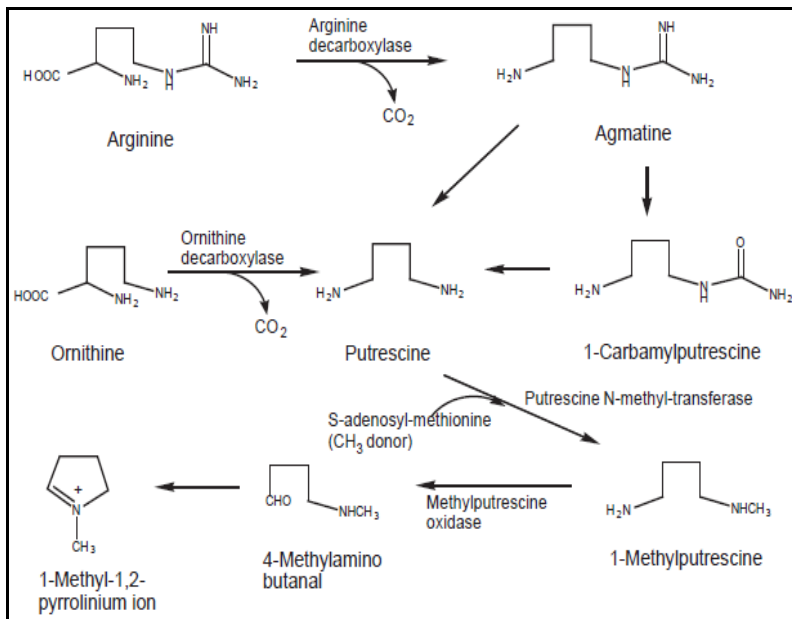


Figura 4 – Biossíntese do íon 1-metil-1, 2-pirrolidínio, precursor da nicotina no *N. tabacum*.

Fonte: Wei et al (2005, p. 496)

O aminoácido arginina, segundo a Figura 4, é descarboxilado à sua respectiva amina formando a agmatina, que sob diferentes mecanismos gera a putrescina, que simultaneamente pode ser formada pelo processo de descarboxilização do aminoácido ornitina. A putrescina formada interage com compostos metil-doadores, formando a 1-metilputrescina, que através de oxidação enzimática origina o 4-metilamino butanal. Este, por sua vez promove um ataque nucleofílico do nitrogênio sobre o carbono mais eletrofílico, formando o anel de cinco membros, o íon 1-metil-1,2-pirrolidínio (WEI et al, 2005).

Conforme a Figura 5, o isômero óptico S da nicotina é biossintetizado através da interação em meio ácido entre o íon precursor 1-metil-1,2-pirrolidínio e o ácido nicotínico.

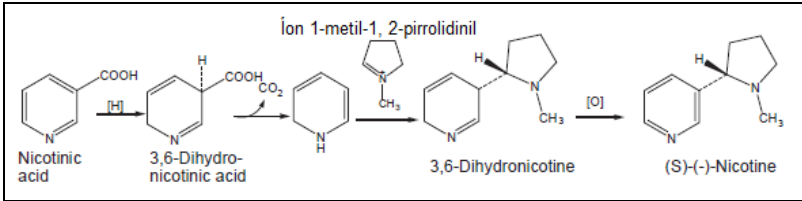


Figura 5 – Biossíntese da S-nicotina no *N. tabacum*.

Fonte: Wei et al (2005, p. 496)

A Figura 5 mostra que, em pH baixo, o ácido nicotínico é descarboxilado, formando o anel aminídico de seis membros, que interage com o íon 1-metil-1,2-pirrolidínico para a formação da nicotina. Esta nicotina, depois de formada, é transportada da raiz para outras partes da planta (WEI et al, 2005). Ligada ao metabolismo secundário das plantas, a nicotina tem função inseticida, prevenindo a planta contra o ataque de insetos (LOCHMANN et al, 2001).

No que tange a farmacodinâmica, que estuda a “inter-relação da concentração de uma droga e a estrutura alvo, bem como o respectivo mecanismo de ação” (VILAS BOAS, 2004, p.3), a nicotina é um alcaloide primário que atua nos gânglios autônomos do sistema nervoso central, principalmente nos receptores colinérgicos do cérebro, facilitando a produção de diferentes neurotransmissores, tais como dopamina, noraefedrina, serotonina, acetilcolina, vasopressina e beta-endorfina (MILLER, NORRIS et al, 2010).

A nicotina durante a queima do cigarro, é volatilizada pela combustão e absorvida pela pele, vias respiratórias e mucosas orais de forma rápida, entrando na corrente sanguínea e se espalhando pelos tecidos do corpo, chegando ao cérebro entre 10 e 19 segundos (CUNHA, 2007).

Este alcaloide não possui ação oncogênica direta, porém atua como molécula intermediária no processo de nitração para a formação de compostos oncogênicos específicos do tabaco denominados nitrosaminas, conforme apresentado no esquema da Figura 6.

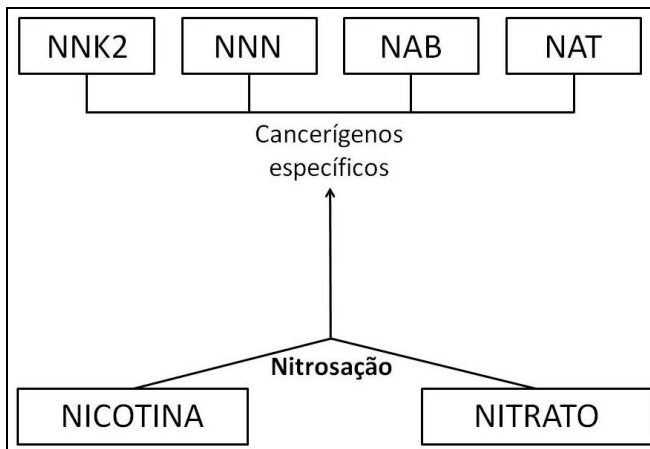


Figura 6 - Nitrosação da nicotina para formação de nitrosaminas específicas.
 Fonte: Adaptado de Rosemberg (2003, p. 82)

A Figura 6 ilustra, conforme Rosemberg (2003), a interação entre nitrato e nicotina, que promove a produção de nitrosaminas. Estas se formam durante o procedimento da cura do tabaco e são, portanto, encontradas na fumaça do cigarro. As principais nitrosaminas específicas do tabaco são NNK2 (4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona); NNN – N^o-nitrosornicotina; NAB – N^o-nitrosoanabasina; e NAT – N^o-nitrosoanabatina.

Para Torres (2005, p. 101),

[...] a nicotina também atua como potente cancerígeno, considerado hoje como um dos maiores mutagênicos produzidos na natureza, atuando na oncogênese, que governam a proliferação celular, dirigindo o desenvolvimento do câncer, e também como supressores das respostas antagonistas dos organismos nas formações dos tumores. Essas ações duplas, tanto na oncogênese quanto na protooncogênese (supressores de tumor) o caracterizam como cancerígeno completo.

1.2 PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE FUMO E CIGARROS

1.2.1 Processo de produção - manufatura e industrialização

As indústrias de cigarro iniciam sua fabricação a partir das lâminas (parte tenra da folha) e talos de diferentes tipos de fumo que foram processados separadamente nas usinas. Eles são desmanchados e passam por cilindros onde recebem água e vapor para ficarem maleáveis, formando o que os produtores chamam de *blend*, isto é, uma grande mistura, ou extrato bruto. Todo o processo é acompanhado por técnicos especializados que controlam a temperatura e a umidade do fumo. Alguns ingredientes são adicionados, como: melhorantes (melhoram o aroma da fumaça), umectantes, açúcares e algumas vezes aglutinantes. As características sensoriais requeridas pelos consumidores do mercado brasileiro são conseguidas com a combinação desses ingredientes. Em seguida, são adicionadas essências, as quais darão o sabor e o aroma característicos a cada marca. A partir desta etapa, o produto sai direto para as máquinas de fazer cigarros, que produzem 16 mil cigarros por minuto. No que diz respeito a qualidade dos cigarros, as próprias máquinas possuem sensores eletrônicos que eliminam automaticamente os produtos com defeito (SOUZA CRUZ, 2012).

No que tange a produção brasileira de cigarros e conforme o Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco (2012), criado a partir do INCA – Instituto Nacional do Câncer, cujo objetivo é agrupar, organizar e disponibilizar informações e conhecimentos atualizados sobre a implementação da Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco no Brasil,

O Brasil é o segundo maior produtor de fumo em folha, atrás da China. Em comparação com os dez principais países produtores, a produção nacional de fumo é superior em 66% em relação à Índia e em 160% em relação aos EUA, terceiro e quarto colocados, respectivamente.

A Figura 7 apresenta dados do Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco sobre a produção de tabaco no período compreendido entre 1990 e 2010.

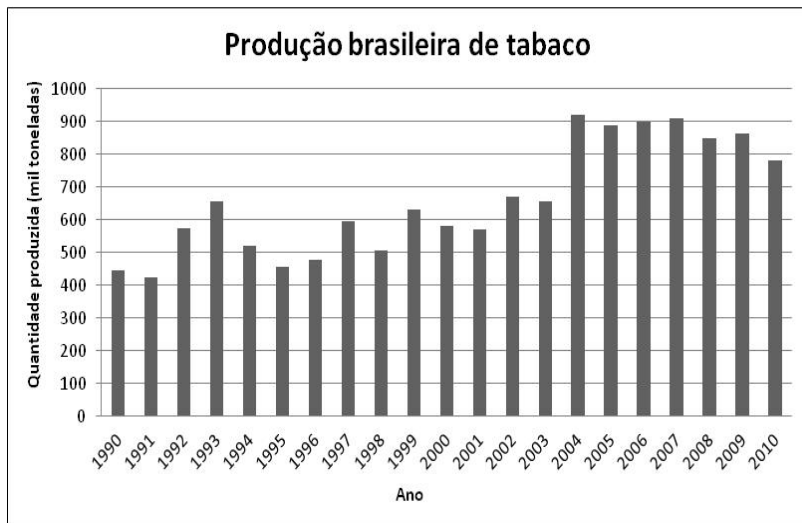


Figura 7 – Produção de tabaco no Brasil - Período: 1990-2010.

Fonte: Adaptado de Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco (2012)

Os dados de produção brasileira de tabaco na década compreendida entre 1990 e 1999, apresentou um crescimento de 41% conforme mostra a Figura 7. Já nos 10 anos seguintes (2000 a 2009), este percentual passou para 49% na produção da planta. Comparando-se esses dois períodos, chegou-se a conclusão que a média anual da produção de tabaco em folha cresceu 48%, e o volume em todo o período cresceu 76% (OBSERVATÓRIO DA POLÍTICA NACIONAL DE CONTROLE DO TABACO, 2012).

Já na Figura 8 a plotagem de um gráfico a partir dos dados da Secretaria da Receita Federal mostra a produção de maços de cigarro no Brasil entre 2000 e 2011.

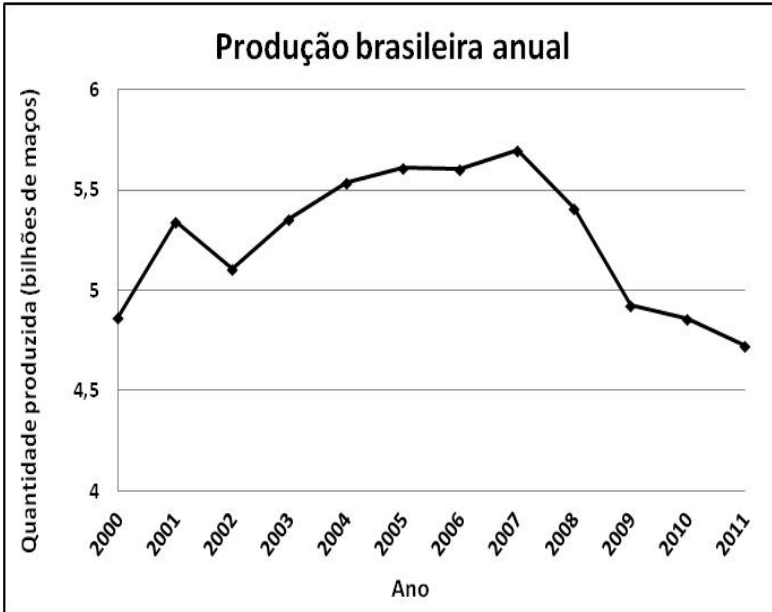


Figura 8 – Produção anual de maços de cigarros no Brasil entre 2000 e 2011

Fonte: Adaptado da Secretaria da Receita Federal (BRASIL, 2012)

A produção de cigarro no Brasil (embalagens com vinte unidades), conforme a Figura 8 e os números do Observatório (2012), teve uma variação no período entre 2007 e 2010, com números de aproximadamente 5,70 e 4,86 bilhões, respectivamente, isto é, uma diferença superior a 840 milhões de maços a menos no mercado consumidor, permanecendo na faixa entre 4 e 5 bilhões de maços inclusive durante o ano de 2011.

O consumo oficial aparente de cigarro *per capita*, por sua vez, pode ser observado na Figura 9.



Figura 9 – Consumo oficial aparente de cigarros *per capita* no Brasil – Período: 1980/2010

Fonte: Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco (2012)

Na Figura 9 é perceptível a redução de 65% do consumo oficial aparente *per capita* no período entre 1980 e 2010. O Brasil registrou em 2010 o menor consumo de cigarros *per capita* (682 unidades) em todo o período.

1.2.2 Pesquisa e desenvolvimento

Diante de tantas análises realizadas anualmente, as empresas do ramo tabagista investem em pesquisas, visando minimizar alguns efeitos nocivos do cigarro, principalmente no que diz respeito a espécies nitrosaminadas, e/ou criar novos produtos. Pode-se verificar esse tipo de investimento através das patentes registradas no INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial, conforme exemplos abaixo (PATENTE ONLINE, 2012):

- Redução de nitrosaminas em tabaco e em produtos de tabaco;
- Método de preparação de um material de tabaco com níveis reduzidos de lignina e de compostos nitrogenados;

- Processo para tratar tabaco, aparelhagem para extração de nitrosaminas e produto obtido;
- Métodos de produção de um material de fumar e um material contendo tabaco com níveis reduzidos de compostos nitrogenados;
- Desnitração termófila de tabaco; e

1.2.3 Agências reguladoras do setor - Controle de qualidade do cigarro

Uma das instituições reguladoras do setor tabagista é a ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a qual foi criada em 1999 pela Lei n.º 9.782, tendo por finalidade proteger e promover a saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a estes relacionados. Dentre os produtos e substâncias controlados estão medicamentos, alimentos, saneantes, cosméticos, hemoderivados, imunobiológicos, equipamentos e insumos médico-hospitalares, portos, aeroportos e fronteiras, sendo que o controle dos produtos derivados do tabaco foi incluído posteriormente (BRASIL, 2012).

O controle exercido pela ANVISA diz respeito

[...] ao controle das diferentes formas de divulgação e propagação dos produtos, principalmente aquelas destinadas aos mais jovens; a redução gradativa da exposição aos componentes tóxicos presentes na fumaça gerada pelo tabaco; e a redução progressiva do consumo de tabaco. (BRASIL, 2012).

Em 2000, o governo cria a GPDTA - Gerência de Produtos Derivados do Tabaco, a fim de colocar em prática as atribuições como: estabelecer normas e padrões para a produção e comercialização de produtos derivados do tabaco; estabelecer novos critérios de controle da propaganda dos produtos derivados do tabaco e divulgação junto à sociedade; promover e divulgar as ações de vigilância sanitária; regulamentar continuamente dos novos produtos derivados do tabaco;

gerenciar o cadastro anual das empresas de tabaco e o Sistema para Cadastro dos Produtos Derivados do Tabaco – ANVISATAB; orientar as empresas de tabaco quanto aos procedimentos para cadastro, quanto à legislação em vigor e, também, à população sobre as ações do Governo na área de tabagismo; controlar as empresas que estejam em desacordo com a legislação em vigor, notificando e autuando as empresas infratoras (BRASIL, 2012).

Além da ANVISA e da GPDTA, houve também a criação do Laboratório Oficial para Análise e Pesquisa dos Produtos Derivados do Tabaco, associado à rede brasileira de Laboratórios Centrais de Saúde Pública – LACEN, a fim de realizar pesquisas relativas à exposição aos derivados do tabaco e a novos métodos analíticos; realizar análises fiscais e de controle - verificando a veracidade das informações cadastrais; reduzir o alto custo das análises; e realizar análises e pesquisas para outros governos, integrando a rede mundial de laboratórios – INTTaRR (International Network for Tobacco Testing and Research for Regulation) (BRASIL, 2012). No que diz respeito a esfera estadual e municipal, também foram criados núcleos para controle e fiscalização do tabaco.

Algumas Resoluções foram publicadas para regulamentar, controlar e fiscalizar o conteúdo e embalagem do produto, bem como a propaganda, conforme Brasil (2012):

- **Resolução - RDC n. ° 46**, de 28 de março de 2001, que limitou os teores máximos de Alcatrão, Nicotina e Monóxido de Carbono e proibiu o uso dos termos *light*, suave, baixos teores e outros, nas marcas de cigarros comercializados no País;
- **Resolução - RDC n. ° 104**, de 31 de maio de 2001, determinando a inserção de imagens nas embalagens dos produtos sobre os malefícios causados, e restringindo a publicidade aos pontos de venda;
- **Resolução - RDC n.º14**, de 17 de janeiro de 2003, que alterou o conteúdo informativo da lateral da embalagem para:

**“Este produto contém mais de 4.700 substâncias tóxicas,
e nicotina que causa dependência física ou psíquica.
Não existem níveis seguros para consumo destas substâncias”.**

Figura 10: Conteúdo informativo da lateral das embalagens de cigarro
Fonte: BRASIL (2012)

E proibiu o uso de frases do tipo “Somente para Adultos”, passando a ser substituída pela informação:

**“Venda proibida a menores de 18 anos.
Lei 8.069/1990 e Lei 10.702/2003”.**

Figura 11: Frase sobre venda proibida a menores de 18 anos
Fonte: BRASIL (2012)

- **Resolução - RDC n.º335**, de 17 de janeiro de 2003, que determinou que a partir de 24/08/04 passam a vigorar as seguintes alterações: inserção de novas imagens de alerta sanitário, de forma a atualizar a informação à população; exigência da impressão da imagem de alerta sanitário também no material de propaganda; a informação dos teores passa a ser facultativa e deve ser impressa fora da área de alerta sanitário, uma vez que, sendo esta uma informação incompleta, pode conduzir o consumidor a interpretações equivocadas quanto aos riscos associados; a associação dos teores ao nome de marca, bem como a impressão isolada de um de seus valores fica proibida.
- **Resolução - RDC n.º304**, de 07 de novembro de 2002, proibindo a comercialização de produtos alimentícios que simulem os derivados do tabaco, bem como as suas embalagens.
- **Resolução - RDC n.º 15**, de 17 de janeiro de 2003, que regulamenta a propaganda comercial dos produtos derivados do tabaco e sua proibição em jornais e revistas; internet (páginas de domínio nacional) e eventos culturais nacionais. A propaganda está permitida apenas por meio de pôsteres, painéis e cartazes no ponto interno de venda e em eventos esportivos internacionais.

Outras Resoluções também foram publicadas para regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos (BRASIL, 2012):

- **Resolução n.º105**, 31 de maio de 2001, que determinou o cadastro anual de todos os produtos derivados do tabaco e instituiu o Sistema para Cadastro dos Produtos Derivados do Tabaco, incluindo aqui os cigarros, os charutos, as cigarrilhas, os kreteks (cigarros com cravo), os bidis (cigarros de Bali) e o tabaco mascável.

- **Resolução n.º346**, de 02 de dezembro de 2003, que altera dispositivos da resolução 105/2001 aprimorando-a no que diz respeito aos dados do cadastro que passam a ser: dados da empresa (endereço, representante legal, CNPJ, porte); comprovação de porte (Declaração de Imposto de Renda ou Balanço Patrimonial); cópia colorida da embalagem, cumprindo as determinações da legislação em vigor; Ato Declaratório Executivo - ADE emitido pela Receita Federal para as marcas de cigarros; pagamento da Taxa de Fiscalização por marca (R\$ 5.000,00 a R\$ 100.000,00, de acordo com o porte da empresa); composição do produto (tipos de fumo, ingredientes e aditivos usados na fabricação de cada marca); tipo de filtro e composição; e análises químicas de constituintes tóxicos presentes nas fumaças e no tabaco (97 análises/marca).

1.3 MERCADO CONSUMIDOR, SAÚDE PÚBLICA E ASPECTOS MORAIS

1.3.1 Mercado consumidor - dados estatístico

É de conhecimento da sociedade que tanto os 1,3 bilhão de fumantes no mundo, quanto os 100 mil jovens que começam a fumar a cada dia, 80% são de países em desenvolvimento. No Brasil, bem como em muitos outros países, a dependência do tabaco tem sido concentrada cada vez mais nos grupos de baixa renda e de menor escolaridade, comprometendo a renda familiar e reduzindo o acesso do trabalhador e de sua família a alimentos e a outros itens de necessidade básica. (BRASIL, 2004).

O mercado de cigarros, bem como o de bebidas alcoólicas, apresenta algumas características distintas referente a demanda em relação aos demais mercados de bens e serviços. “O bem estar percebido pelo consumidor não leva, literalmente, em consideração o mal estar que causa à sua própria saúde e a de terceiros”. (RIZZIERI, 2008, p.6)

Nesse contexto e conforme a Tabela 1, o governo brasileiro apresentou os resultados da Pesquisa Especial de Tabagismo - PETAB em 2009, a qual teve como base a pesquisa internacional GATS (*Global Adult Tobacco Survey*). A PETAB visou à produção de dados sobre o uso do tabaco e seus derivados, gerando uma base de dados para subsidiar a aplicação de políticas relacionadas à Convenção-Quadro para

o Controle do Tabaco, da qual o governo brasileiro é signatário (IBGE, 2009).

Tabela 1 - Percentual das pessoas de 15 anos ou mais de idade usuários de tabaco fumado – 2008

Grandes Regiões	Percentual das pessoas de 15 anos ou mais de idade usuários de tabaco fumado (%)				
	Grupos de idades				
	Total	15 a 24 anos	25 a 34 anos	35 a 64 anos	65 anos ou mais
Brasil	17,2	10,7	18,3	22,7	12,9
Norte	16,8	10,5	18,0	21,6	18,2
Nordeste	17,2	9,5	17,0	24,7	19,4
Sudeste	16,7	10,8	18,1	22,1	8,6
Sul	19,0	12,6	21,6	23,0	13,0
Centro-Oeste	16,6	12,0	17,8	20,6	11,6

Fonte: Adaptado de IBGE (2009)

A pesquisa em questão foi aplicada a uma subamostra de 51 mil domicílios da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios de 2008, com seleção de informante específico, cerca de 24,6 milhões de brasileiros de 15 anos ou mais de idade fumavam derivados de tabaco naquele ano - ou seja, 17,2% da população nessa faixa etária. Alguns números apontaram algumas características interessantes, como por exemplo: 21,6% de fumantes eram do sexo masculino; 22,7% tinham entre 45 a 64 anos de idade; 19,0% eram moradores da região Sul do país; 20,4% viviam na área rural; 25,0% eram menos escolarizados (sem instrução ou com menos de um ano de estudo); e 19,9% tinham menor rendimento domiciliar per capita (entre os sem rendimento ou com menos de ¼ de salário mínimo). A pesquisa mostrou ainda que 93,0% dos fumantes sabiam que o cigarro poderia causar doenças graves, e 52,1% pensava ou planejava parar de fumar (IBGE, 2009).

Hoje, a ANVISA possui o registro e autorização de quatorze empresas, as quais podem comercializar o produto no País, como as conhecidas: Philip Morris Brasil e Souza Cruz S.A., sendo esta última com mais de 60% do mercado no País (ANVISA, 2010).

1.3.2 Política social antitabagista

As empresas autorizadas a comercializarem produtos derivados do tabaco no Brasil estão sujeitas a outras regras, além das citadas nas Resoluções já mencionadas. Uma delas diz respeito ao preço mínimo do cigarro que, conforme a Receita Federal (BRASIL, 2012), foi outorgado na Lei nº 12.546, de 14 de dezembro de 2011, estabelecendo que “o Poder Executivo poderá fixar preço mínimo de venda no varejo de cigarros, válido em todo o território nacional, abaixo do qual fica proibida sua comercialização”. Esta Lei pretende restringir o escoamento tributário que ocorre no setor de fabricação de cigarros pela prática irregular de preços que incitam a concorrência desleal no setor e não incluem os tributos, federais e estaduais, os quais são necessários para enfrentar os gastos com a saúde pública dos consumidores destes produtos (Tabela 2).

Tabela 2 – Preço mínimo de cigarros

Vigência	Valor (por vintena)
01/05/1012 a 31/12/2012	R\$ 3,00
01/01/2013 a 31/12/2012	R\$ 3,50
01/01/2014 a 31/12/2014	R\$ 4,00
A partir de 01/01/2015	R\$ 4,50

Fonte: Adaptado de Receita Federal (BRASIL, 2012)

Conforme a Tabela 2 pode-se constatar que a partir de maio de 2012 o valor mínimo cobrado por 20 cigarros deverá ser de R\$ 3,00 (três reais) aumentando R\$ 0,50 (cinquenta centavos de real) anualmente até atingir R\$ 4,50 (quatro reais e cinquenta centavos) em 2015.

Com esses preços em vigor a partir de maio de 2012, é possível avaliar os próximos números a serem arrecadados em função da quantidade de cigarros fumados em 2008 (Figura 9) ou pelo valor médio gasto mensalmente por fumantes de 15 anos ou mais, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Gasto médio mensal com cigarros industrializados – 2008

Algumas características demográficas	Gasto médio mensal com cigarros industrializados das pessoas de 15 anos ou mais de idade que fumavam diariamente cigarros industrializados (R\$)					
	Brasil	Grandes Regiões				
		Norte	Nordeste	Sudoeste	Sul	Centro-Oeste
Total	78,43	59,97	59,14	78,39	98,99	93,42

Fonte: Adaptado de IBGE (2009)

Essas medidas relativas a preços e impostos, segundo o Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco (2012) e de acordo com a Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco,

[...] são meios eficazes e importantes para que diversos segmentos da população, em particular os jovens, reduzam o consumo de tabaco. E nesse sentido, os Estados Partes se comprometem a aplicar aos produtos do tabaco políticas tributárias e, quando aplicável, políticas de preços para contribuir com a consecução dos objetivos de saúde tendentes a reduzir o consumo do tabaco.

Sobre a Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco - CQCT, é importante destacar que foi o primeiro tratado internacional de saúde pública da história da OMS – Organização Mundial de Saúde, entrando em vigor em 2005, compreendendo 173 países membros que lutam contra o tabagismo no mundo, tendo como objetivo “proteger as gerações presentes e futuras das devastadoras consequências sanitárias, sociais, ambientais e econômicas geradas pelo consumo e pela exposição à fumaça do tabaco” (OBSERVATÓRIO DA POLÍTICA NACIONAL DE CONTROLE DO TABACO, 2012).

Cabe dizer que o tabagismo é a principal causa de morte evitável em todo o mundo, conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo que ela estima que um terço da população mundial adulta (1 bilhão e 200 milhões de pessoas) sejam fumantes. Além disso, o total de mortes devido ao uso do tabaco atingiu a cifra de 4,9 milhões de mortes anuais, o que corresponde a mais de 10 mil mortes por dia. Caso as atuais tendências de expansão do seu consumo sejam mantidas, esses

números aumentarão para 10 milhões de mortes anuais por volta do ano 2030, sendo metade delas em indivíduos em idade produtiva (entre 35 e 69 anos) (INCA, 2012).

1.4 AÇÃO BENÉFICA DA NICOTINA E FORMAS DE OBTENÇÃO

1.4.1 Ação benéfica da nicotina

Alguns dados da literatura mostram estudos sobre um outro lado do uso da nicotina, isto é, os benefícios do seu uso em pacientes com determinadas doenças, como por exemplo, doenças neurodegenerativas, esquizofrenia e depressão, para as quais causa certo alívio, atuando através dos respectivos receptores. A terapia com nicotina poderia reduzir os danos sobre a via dopaminérgica nigroestriatal estimulando a liberação de dopamina que competiria com a toxina para a entrada no terminal nervoso envolvido no controle motor. Além disso, a nicotina também pode atuar como um antioxidante e/ou inibir o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, com uma consequente redução nos níveis de espécies reativas de oxigênio (POGOCKI et al, 2007).

Conforme Barros et al (2007), a nicotina possui efeitos estimulantes que apresentam segundo alguns relatórios, que seu uso em doses melhora funções de memória, aprendizado e cognição, enquanto que doses acima de 1 mmol L^{-1} prejudicam tais funções.

Taylor e Maloney (2009) divulgam que pesquisas têm mostrado que a nicotina pode aumentar a precisão, os tempos de resposta e as taxas de aprendizagem com efeitos diferentes em homens e mulheres.

1.4.2 Outras formas de obtenção do fármaco

Quando se fala em nicotina lembra-se imediatamente do tabaco, porém a nicotina é uma dos mais de quatro mil compostos que podem ser encontrados naquela planta, muitos dos quais contribuem para o sabor, aroma e também efeitos fisiológicos. Porém, os metabólitos secundários produzidos pelas plantas servem como defesa de herbívoros e são frequentemente encontrados no néctar floral, para evitar a degradação microbiana de néctar (HERRERA ET AL, 2010 apud

KÖHLER; PIRK e NICOLSON, 2012), atuando como um filtro de visitantes florais ladrões de néctar (JOHNSON, 2006 apud KÖHLER; PIRK e NICOLSON, 2012), e incentivar os polinizadores a mover-se mais rapidamente entre as flores, assim, possivelmente aumentar a polinização cruzada (ADLER, 2000; KESSLER e BALDWIN, 2006 apud KÖHLER; PIRK e NICOLSON, 2012). Além disso, é descrito que as abelhas preferem baixas concentrações de compostos fenólicos e alcaloides para modular as concentrações de açúcar, enquanto que altas concentrações destes metabólitos inibem a ingestão do néctar (HAGLER e BUCHMANN, 1993; SINGARAVELAN et al, 2005 apud KÖHLER; PIRK e NICOLSON, 2012).

Além do tabaco, outras plantas possuem o alcaloide nicotina em seus sistemas, como por exemplo, Golden Potho (*Epipremnum aureum*), planta ornamental da Ásia (WEIDNER, 2005); e *Nicotiana glauca*, solanácea conhecida como fumo-bravo e cujo cigarro feito das folhas secas é usado contra odontalgias (SILVA, 2007).

Não somente as plantas, mas algumas frutas e vegetais possuem nicotina, conforme referenciado por Leyden, Leitner e Siegmund (1999), incluindo espécies de solanáceas, produtos de seu processo e chás. Os mais conhecidos são tomate, batata, berinjela e algumas pimentas. Nos tomates foram encontradas concentrações médias de 8 µg/kg no estágio 1 (verdes) e 2,6 µg/kg no estágio 12 (maduros); nas batatas cruas, 4,5 µg/kg; nas berinjelas, 2 µg/kg; e nas pimentas, 6,5 µg/kg.

Em alguns produtos processados também foram encontradas concentrações médias de nicotina dependendo do processamento da matéria prima. Alonso, Montero e Catalán (2011) detectaram concentrações dessa substância em 5 de 10 garrafas de água mineral produzidas na Espanha, que variam de 7 ng L⁻¹ a 15 ng L⁻¹. Já as concentrações médias em folhas secas de chás é bem maior, isto é, 737,4 µg/kg em chá preto e 370,4 µg/kg em chá verde.

Para tomates processados, tomates sem casca vendidos em latas apresentam 2,85 µg/kg de nicotina enquanto que tomates com casca homogeneizados vendidos em caixas de papelão apresentam 5,75 µg/kg de nicotina, isto devido a função inseticida da nicotina que promove uma distribuição ao longo de toda superfície externa do fruto, além disso para os produtos como molho de tomate pronto para consumo, 5,45 µg/kg e polpa de tomate concentrada, 42,95 µg/kg as diferenças de teor estão associadas à extração da água e concentração do analito no produto final.

O mesmo ocorre com os teores de nicotina em batatas cozidas, 3,45 µg/kg; e batatas fritas, 9,25 µg/kg, onde este último produto passa por processamentos térmicos que diminuem o teor de água, e portanto aumentam o teor do analito no produto final.

Outras formas de obtenção de nicotina são através de Terapias de Reposição de Nicotina (TRN), onde são usados medicamentos nicotínicos e não nicotínicos. Dentre os nicotínicos pode-se destacar o uso de adesivo transdérmico e a goma-nicotina de mascar, ambas comercializadas no Brasil. A goma de mascar, batizada de “polacrilex”, apresenta-se em tabletes com 2 mg e 4 mg e, por ser alcalina, facilita a absorção da nicotina na mucosa bucal. Já o adesivo apresenta-se em um sistema de discos com dosagens de 24 mg, 14 mg ou 7 mg. Este método se sobressai ao da goma-nicotina “pela facilidade de seu uso, por produzir concentrações elevadas uniformes de nicotina no plasma e por desencadear poucas reações colaterais indesejáveis” (ROSEMBERG, p. 133-134, 2003).

1.5 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE NICOTINA E NITRATO

1.5.1. Revisão Bibliográfica

Dentre as técnicas aplicadas à análise de nicotina, as principais são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa com detecções via espectrometria UV, fluorescência e espectrometria de massas (MS), e a cromatografia à gás (CG) com detectores de ionização em chamas (FID), detector de nitrogênio-fósforo (NPD) e e espectrometria de massas (MS) (PAKHALE, MARU, 1998; LOURENCO, MATOS et al, 2000; MILLER, NORRIS et al, 2010). A espectroscopia infravermelha (IV) (GARRIGUES, PEREZ-PONCE et al, 1998) e a espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) também são utilizadas em análises de nicotina e demais alcaloides (WILLITS, SWAIN et al, 1950; FIGUEIREDO, DE OLIVEIRA et al, 2009). Análises por eletroforese geralmente ocorrem por cromatografia eletrocinética micelar (MECK) (YANG, SMETENA et al, 1996; HUANG, HSIEH 2007).

Apesar de a cromatografia ser extensivamente usada em análises de nicotina, em geral a técnica apresenta alto custo, e elevado tempo de análise. As amostras geralmente são extrato de fumo, alimentos como

vegetais e cogumelos (SHRIVAS, PATEL, 2010; MULLER, BRACHER et al, 2011), e fluídos biológicos, todos considerados amostras complexas, sendo normalmente acompanhados por cromatografia líquida (LC) ou CG e por métodos de extração e pré-concentração como extração e micro extração em fase sólida (SPE e SPME) (MILLER, NORRIS et al, 2010; MULLER, BRACHER et al, 2011).

O nitrato também está presente em amostras deste tipo e, para sua análise, a quantificação pode ser feita por colorimetria, potenciometria e UV-VIS, além das técnicas cromatográficas. Porém, quando se trata se extratos de plantas, alguns destes procedimentos não são eficientes devido por exemplo baixa sensibilidade do método para este tipo de amostras ou a presença de interferentes como o íon cloreto (MANTOVANI, CRUZ et al, 2005).

Na maioria dos trabalhos realizados no Brasil, a quantificação de nitrato em extratos de plantas é realizada por colorimetria, onde o nitrato é reduzido a nitrito. As vantagens da técnica, segundo os autores, são o baixo custo e a facilidade de execução. Na determinação de nitrato em carnes e demais alimentos, o método oficial estabelecido pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 1999 apud MANTOVANI, CRUZ et al, 2005) é o que promove a redução do nitrato a nitrito em meio alcalino pela passagem do extrato em coluna contendo Cd esponjoso, com posterior quantificação do N na forma de nitrito (N-NO_2^-) por colorimetria. Esse procedimento é apresenta desvantagens por ser trabalhoso, necessitar do uso de vários reagentes e expor o analista a eventuais riscos de saúde pelo contato com o cádmio (MANTOVANI, CRUZ et al, 2005). Há alguns anos o aumento do mercado consumidor em diversos setores tem exigido procedimentos de análise cada vez mais simples e que apresentem maior frequência analítica. A técnica de eletroforese capilar (EC) tem sido uma alternativa a estas metodologias, com completa automatização. Na análise de íons, em especial, a eletroforese vem apresentando inúmeras vantagens, como baixo tempo de análise, vasta aplicabilidade e tratamento simples da amostra (TAVARES COLOMBARA E MASSARO, 1997); VITALI, FÁVERE, MICKE, 2011).

Algumas alternativas para acelerar o tempo de análise deste tipo em EC têm sido empregadas. Além da injeção pela extremidade mais curta do capilar (VITALI, HORST et al, 2011), uma das alternativas é a modificação da superfície interna do capilar com surfactante catiônico, no caso de ânions (TAVARES COLOMBARA E MASSARO, 1997) e, o modo de injeções múltiplas das amostras (ou do padrão) (MICKE,

COSTA et al, 2009; PIOVEZAN, COSTA et al, 2010; VITALI, HORST et al 2011), que permite análises simultâneas numa mesma corrida eletroforética.

Métodos por EC para análise simultânea de cátions e ânions inorgânicos são possíveis (KUBÁŇ, KUBÁŇ et al, 1999; HOPPER, LECLAIR et al, 2005), no entanto, caso as condições não sejam escolhidas adequadamente, o tempo de análise pode ser longo e o método inviável. Alternativas para viabilizar a determinação de ambos simultaneamente devem ser estudadas, principalmente com utilidade em análises de cátions e ânions de diferentes naturezas, com comportamentos eletroforéticos totalmente distintos.

1.5.2. Eletroforese Capilar

1.5.2.1. Desenvolvimento da técnica

A eletroforese capilar é reconhecida como uma técnica de separação e identificação de espécies neutras, iônicas ou ionizáveis, devido à migração diferenciada dos analitos em uma solução tampão, frente à aplicação de um campo elétrico (HEIGER, 2000, LANDERS 1997, SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002, TAVARES, 1996; TAVARES, 1997).

Através da separação das proteínas do soro sanguíneo, a técnica desenvolvida por Arne Tiselius na década de 30, rendeu ao químico sueco o Prêmio Nobel no ano de 1948, além de incentivar a criação de diferentes métodos de separação para ânions, cátions, aminoácidos, drogas, vitaminas, carboidratos, proteínas, peptídeos, entre outros. A criação da técnica gerou interesse para a indústria de biotecnologia em um projeto de larga escala que utilizou a eletroforese como ferramenta no sequenciamento do DNA no Projeto Genoma Humano (HEIGER, 2000, SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

Modificações na instrumentação da técnica viabilizaram a implementação do formato capilar, permitindo assim uma dissipação eficiente do calor gerado pelo efeito Joule e favorecendo, desta forma, a aplicação de campos elétricos elevados (100 – 500 V/cm), que resultam em separações de alta eficiência (da ordem de 10^5 pratos) (TAVARES, 1996; TAVARES, 1997). Mais tarde, Jorgenson e colaboradores investigaram a viabilidade da EC ser utilizada como uma técnica

analítica instrumental ganhando, após sua completa automatização, o status de técnica analítica de rotina (TAVARES, 1996).

A apresentação de boas resoluções nas análises e a grande versatilidade da técnica (separação de moléculas orgânicas, inorgânicas, macromoléculas, etc.), foram os principais fatores de credibilidade durante sua criação. Além disso, a técnica apresenta baixo consumo de amostras, reagentes e solventes, automação completa da análise, e compatibilidade com detectores cromatográficos, que proporcionam um aumento da sensibilidade e reprodutibilidade da técnica (TAVARES, 1996; TAVARES, 1997; HELALI, 2008).

No que diz respeito à análise de fitoquímicos, o modo de separação eletroforético mais utilizado é a eletroforese capilar de zona (ECZ) (URBONAVIČIŪTŪ, 2006) que apresenta tempos de análise reduzidos, de grande importância para análises rotineiras em indústrias de fitoquímicos (TAVARES, 1997; HELALI, 2008; LIANG, 2004; URBONAVIČIŪTŪ, 2006).

1.5.2.2 Instrumentação

Uma das características da eletroforese capilar é a sua simplicidade instrumental, segundo mostra a representação esquemática da Figura 12. Essencialmente, o equipamento de eletroforese capilar é composto por uma fonte de alta tensão, um capilar disposto entre os eletrodos e um detector. Além destes, existem ainda o cartucho que comporta o capilar, os recipientes de solução e seu compartimento para armazenamento, e os sistemas de controle de injeção e temperatura.

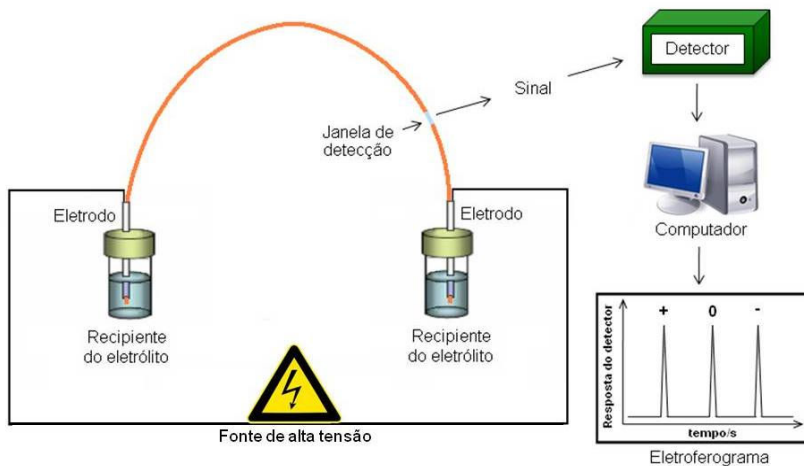


Figura 12: Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar.

Fonte: Adaptado de BARCELLOS, 2008.

Uma das principais partes do instrumento representado no esquema da Figura 12 é a fonte de alta tensão, que pode funcionar em voltagem e/ou corrente constante, gerando potenciais de até 30 kV e correntes superiores à 100 μ A. Ligados à fonte estão os dois eletrodos, em geral de platina, que criam a diferença de potencial para o estabelecimento da eletromigração (TAVARES, 1996; SILVA, 2007).

O capilar, onde ocorrerá a separação dos analitos, pode ser feito de vidro, teflon ou sílica, sendo protegido por um cartucho plástico com as extremidades próximas aos eletrodos. Seu diâmetro interno varia entre 10 e 300 μ m, com comprimento entre 27 e 150 cm, em equipamentos comerciais, que se estendem até os recipientes que contém o eletrólito de corrida ou da amostra. Os capilares de sílica fundida, com revestimento externo de poli-imida, possuem boa resistência mecânica, além de possibilitarem a retirada do revestimento externo, próximo a uma das extremidades do capilar, formando assim uma janela transparente que permite ao detector a visualização da passagem dos analitos (TAVARES, 1996; SILVA, 2007).

Ao se iniciar uma corrida eletroforética, é preciso primeiramente condicionar o capilar. Após isto, o eletrólito de corrida é introduzido no capilar por pressão, preenchendo toda sua extensão. Na sequência, a amostra é introduzida pelo mesmo sistema, mas com uma pressão menor

e com um volume dependente do tempo de injeção, da pressão aplicada, das dimensões do capilar e da viscosidade da solução. Suas extremidades são então introduzidas nos recipientes do eletrólito, onde é aplicada uma diferença de potencial que faz com que as moléculas migrem em direção à janela de detecção (TAVARES, 1996).

Dentre os modos de detecção mais empregados em EC, destaca-se o espectrofotométrico no UV/VIS, por possibilitar a detecção quase universal e por possibilitar o acoplamento de um multiplicador de sinais do tipo arranjo de diodos, possibilitando a geração de espectros para cada substância detectada (HEIGER, 2000, LANDERS 1997). Capilares de sílica são detectados abaixo de 200 nm, permitindo uma ampla faixa de detecção UV/VIS acima deste comprimento de onda (HEIGER, 2000).

1.5.2.3 Fluxo eletrosmótico

Capilares de sílica fundida são extensivamente utilizados em eletroforese capilar, por apresentarem boa condutividade térmica e transparência no UV. Um fenômeno muito importante que ocorre durante a execução da técnica é o fluxo eletrosmótico (FEO). Ele ocorre devido à presença de grupos silanóis na parede interna do capilar (Figura 13), que apresentam um caráter ácido, e se ionizam quando em contato com soluções com pH superior a 3. Com isto, a parede interna do capilar torna-se carregada negativamente, gerando uma diferença de potencial próximo à parede do capilar denominada potencial zeta (HEIGER, 2000, SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002; TAVARES, 1996; SILVA, 2007).

Os íons H^+ provenientes da parede do capilar são solvatados por moléculas de água e migram para o seio da solução. A partir de uma determinada distância da parede, chamada de plano de cisalhamento, essas moléculas de água não sofrem mais atração pela parede do capilar e migram em direção ao eletrodo de carga oposta, quando submetidas à um campo elétrico, gerando assim, um fluxo com um perfil plano por toda a solução, denominado fluxo eletrosmótico. Por convenção, o fluxo que migra do ânodo para o cátodo é chamado de fluxo eletrosmótico normal (HEIGER, 2000, SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002; TAVARES, 1996; SILVA, 2007).

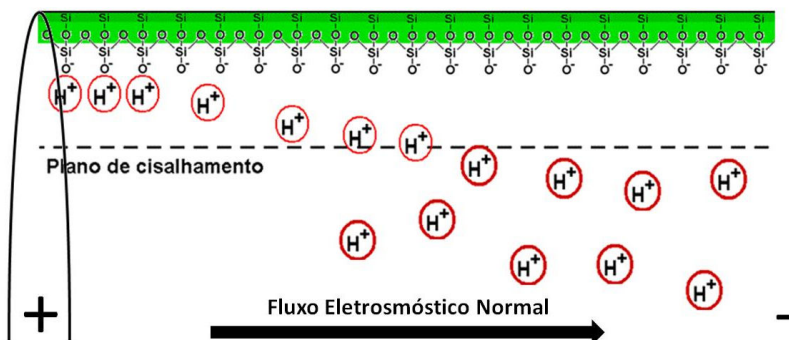


Figura 13: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.

Fonte: BARCELLOS, 2008.

Este fluxo é responsável pelo transporte diferenciado de todas as espécies presentes na amostra até o detector. No entanto, como depende do grau de ionização da parede do capilar, conforme mostrado na Figura 13, o eletrólito utilizado deve ser tamponado para que não haja variações da velocidade dos analitos, estabelecida durante uma análise. Uma solução tampão de pH inferior 2 gera um FEO desprezível (Figura 14), pois grande parte dos grupos silanóis ainda estão protonados (HEIGER, 2000).

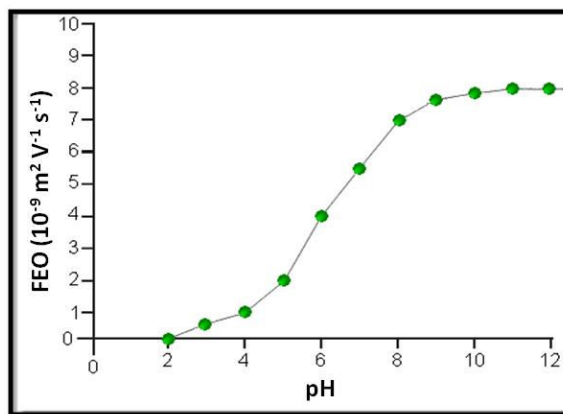


Figura 14: Representação da variação do FEO em função do pH.

Fonte: BARCELLOS, 2008.

Já em pH superior a 8 o fluxo eletrosmótico apresenta magnitude próxima de máxima para capilares de sílica, Figura 14. Isto ocorre porque o grau de ionização da parede do capilar é maior, e portanto, o fluxo é mais intenso (HEIGER, 2000, SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002; TAVARES, 1996).

Outra característica deste fluxo intenso é a condução dos analitos em direção ao detector, independente de sua carga, conforme mostra a Figura 15.

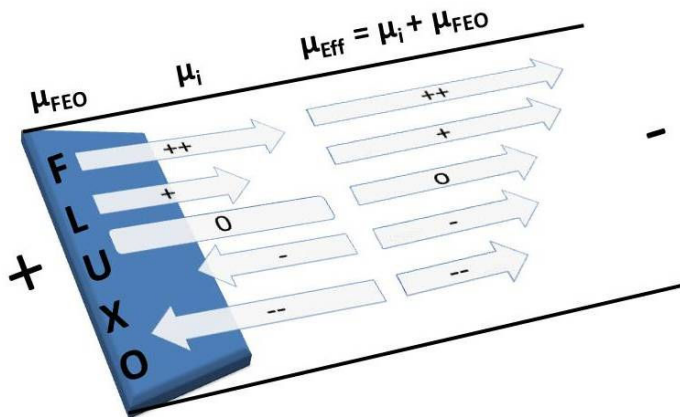


Figura 15: Representação esquemática da condução de analitos catiônicos, neutros e aniônicos pelo FEO.

A mobilidade efetiva, μ_{Eff} , de um analito em uma solução tamponada submetida a um campo elétrico, é resultante da mobilidade iônica ou eletroforética, μ_i , do analito em relação à mobilidade das moléculas que compõem a solução tampão e promovem a formação do fluxo eletrosmótico, μ_{FEO} , conforme Figura 15.

O fluxo eletrosmótico é direcionado para o polo de carga oposta ao contraíon da parede do capilar, sendo sua magnitude dependente da ionização da parede em função do pH da solução, conforme descrito anteriormente. Já para os analitos iônicos ou ionizáveis, a direção da migração é determinada pela carga iônica efetiva do mesmo, enquanto que a velocidade da migração dos analitos é determinada pelo seu grau

de ionização no pH de trabalho, ou seja, o analito possui uma porcentagem de sua mobilidade iônica máxima (HEIGER, 2000).

O fluxo eletrosmótico normal ocorre do polo positivo para o polo negativo e todos os íons que migrarem eletroforéticamente nesta mesma direção terão suas mobilidades somadas as do fluxo. Já os íons que migram contra o fluxo eletrosmótico intenso têm sua mobilidade eletroforética vetorialmente subtraída da mobilidade do FEO, sendo possível sua completa anulação ou até mesmo uma mobilidade efetiva positiva em direção ao detector (HEIGER, 2000).

Esta estratégia possibilita a utilização de metodologias de análises simultâneas de cátions e ânions de uma mesma amostra. Além disso, a eletrosmose, fenômeno decorrente da movimentação, através do capilar, da solução submetida a campo elétrico, produz um fluxo constante com perfil radial, que minimiza efeito de alargamento de bandas eletroforéticas (SILVA, 2007).

Esses possíveis alargamentos de bandas podem ser descritos a partir dos diferentes mecanismos de dispersão, que podem ocorrer dentro de uma zona de amostra no interior do capilar. O principal efeito de dispersão é causado pela difusão longitudinal ao longo do capilar, no entanto a eletrodispersão causada pelas diferentes condutividades apresentadas entre as zonas do eletrólito e do analito podem ser um fator decisivo na formação de picos deformados, com presença de caudas. Outros fatores que possibilitam desvios na distribuição gaussiana das zonas eletroforéticas, bem como o alargamento das mesmas, são os volumes de amostra injetados, modos de injeção, tipos de matriz. Além disso, a separação depende ainda da temperatura de separação e da escolha do sistema tampão que forneça o pH satisfatório para efetivar a separação, minimizando possíveis fenômenos de adsorção na superfície interna do capilar (SILVA, 2007).

1.5.2.4 Eletroforese Capilar de Zona

A eletroforese capilar possui vários modos de análise que envolve separações com aplicação de campo elétrico em um capilar preenchido de solução eletrolítica ou tampão, sendo a eletroforese capilar de zona, ECZ, ou simplesmente EC, o modo mais simples e amplamente utilizado (HEIGER, 2000, SILVA, 2007).

Este modo eletroforético se baseia somente nas diferenças de velocidade de migração que os analitos apresentam frente à solução

tampão, quando submetidos à um campo elétrico, ou seja, nas diferentes mobilidades eletroforéticas, definidas pela razão carga/volume em um determinado pH. A separação dos analitos é resultado da maximização das diferenças de mobilidade dos analitos atrelado a minimização das causas de alargamento das zonas (TAVARES, 1996, TAVARES, 1997).

Além disso, o eletrólito utilizado na separação pode estar acrescido de aditivos, alterando as mobilidades eletroforéticas dos analitos, modificando o fluxo eletrosmótico, solubilizando compostos presentes na amostra ou ainda reduzindo a interação de algumas espécies com a parede do capilar, melhorando assim a separação dos analitos (HEIGER, 2000, SILVA, 2007, TAVARES, 1997)

Na Figura 16, são representadas as possibilidades de aplicação de tensão com polaridade positiva na Figura 16A e polaridade negativa na Figura 16B, em diferentes possibilidades analíticas para a determinação de cátions de baixa mobilidade e ânions de alta mobilidade.

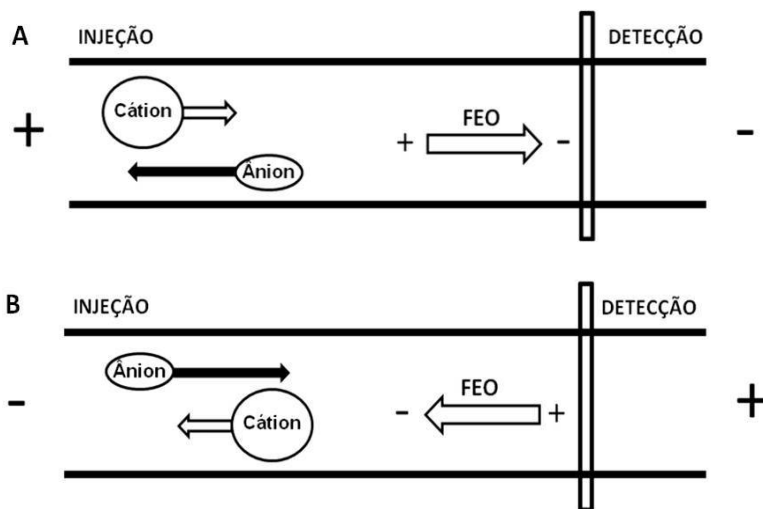


Figura 16: Esquema dos modos de análise de nitrato e nicotina monoprotonada. a) Polaridade positiva na extremidade da injeção; b) Polaridade negativa na extremidade da injeção.

A separação de cátions pode ser efetuada sob aplicação de polaridade positiva, fluxo eletrosmótico normal e análise em modo coeletrosmótico, conforme mostra a Figura 16A. Já um ânion de alta mobilidade, como o nitrato, tende a migrar no sentido contrário ao FEO, em direção ao eletrodo de carga oposta, com mobilidade eletroforética alta suficiente para impossibilitar sua passagem através do detector, ficando, portanto, com sua detecção comprometida.

Se a polaridade for invertida, conforme a Figura 16B, o ânion migra no mesmo sentido do fluxo em direção ao detector, enquanto que o cátion que se encontra no modo contraeletrosmótico e não consegue apresentar mobilidade suficiente para atingir a janela de detecção, permanece indetectável durante toda análise.

Combinando as duas alternativas anteriores é possível o desenvolvimento da análise simultânea de nitrato e nicotina em diferentes amostras, através da injeção da amostra por ambas as extremidades do capilar, conforme apresentado na Figura 17.

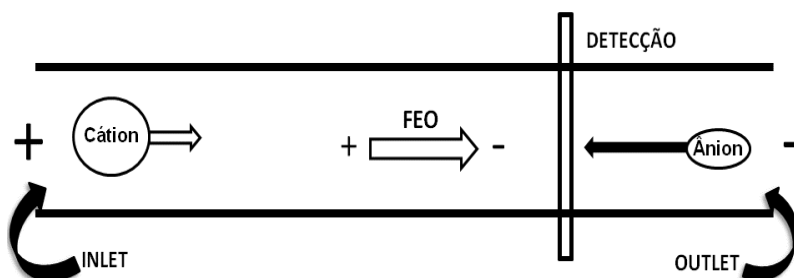


Figura 17: Esquema do modo de injeção para análise simultânea de nitrato e nicotina monoprotonada.

A Figura 17 apresenta o esquema ilustrativo de injeções em ambos os lados do capilar. Neste caso, a nicotina é injetada pela extremidade do capilar mais distante do detector, sendo analisada no modo coeletrosmótico e tendo, portanto, sua mobilidade somada a do fluxo, enquanto que o nitrato é injetado pela extremidade do capilar mais próxima do detector, e tem sua mobilidade diminuída da mobilidade do fluxo, devido sua análise no modo contraeletrosmótico (KUBÁŇ, KUBÁŇ et al, 1999; HOPPER, LECLAIR et al, 2005).

Esta estratégia de injeção visa diminuir o tempo das metodologias eletroforéticas para análises simultâneas de cátions de baixa mobilidade e ânions de alta mobilidade. Com isto, sua aplicação pode ser útil na

análise de plantas em estudos agronômicos para determinação das condições de plantio e colheita, estudos fitoquímicos para avaliação do teor dos componentes majoritários, farmacológicos que estimam a ação de um fármaco no corpo humano, além de controle de qualidade.

1.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A aplicação de uma metodologia analítica envolve uma série de análises e variáveis. A implementação de tratamentos estatísticos ajuda na exposição e avaliação das características do grupo amostras em estudo através da construção de gráficos.

1.6.1 Análise estatística univariada

Uma forma preliminar de se descrever e avaliar o comportamento de uma variável em certo grupo de amostras é utilizar a estatística descritiva univariada. Para variáveis quantitativas, a visualização de cada uma das variáveis pode ser avaliada de forma independente através de gráficos do tipo histogramas e *boxplot*. Histograma é uma forma simples de representação gráfica de um conjunto de valores. A metodologia tem como objetivo mostrar, através de retângulos adjacentes, a frequência relativa (eixo y) com que certa faixa de concentração (eixo x) do analito em estudo aparece no conjunto de dados analisado (STATTREK.COM, 2012).

Semelhante aos histogramas, o gráfico do tipo *boxplot*, também chamado de diagrama Box e Whisker, apresenta uma forma concisa de se avaliar padrões em um conjunto de dados. O gráfico divide o conjunto de dados em quartis, Q, sendo uma caixa formada entre o quartil inferior (Q_1), e o quartil superior a (Q_3) com (Q_2) sendo fixado no valor da mediana, conforme é apresentado na Figura 18 (STATTREK.COM, 2012).

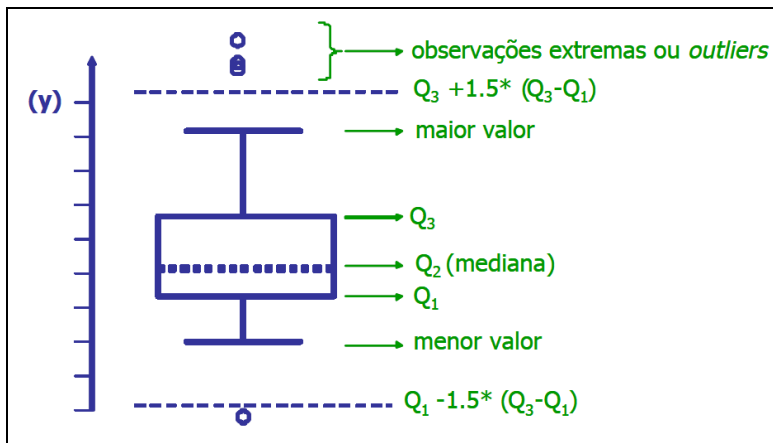


Figura 18: Descrição do gráfico *boxplot*. Divisão de um conjunto de dados em quartis, Q.

Fonte: (CONCEIÇÃO, p.8, 2012).

A Figura 18 apresenta a descrição do gráfico *boxplot*. Este gráfico está embasado na medida do quartil, explicado pela teoria das separatrizes. Esta teoria ajuda a classificar uma amostra ordenada que, através da técnica dos quartis aplicado aos dados de concentração, significa a divisão do conjunto de dados classificados em ordem crescente e divididos em quatro partes iguais, repartindo o conjunto em quatro níveis de concentração (STATTREK.COM, 2012).

Assim, a "caixa" do gráfico da Figura 18 apresenta 50% dos valores de um conjunto com um nível inferior, demarcando o valor que ocupa a posição do primeiro quartil ou quartil inferior (Q_1), referente a 25% do conjunto ordenado; e um nível superior definindo o valor do terceiro quartil ou quartil superior (Q_3), onde 75% dos valores do conjunto ordenado estão contidos. O valor da mediana, valor que ocupa a posição central dos dados ordenados, é representado pelo traço do interior da "caixa" (STATTREK.COM, 2012).

Os segmentos de reta simbolizam os valores mínimos e máximos obtidos dentro dos padrões do sistema. Valores discrepantes ou *outliers* podem ser observados quando estão abaixo do limite inferior $Q_1 - 1,5*(Q_3-Q_1)$ ou acima do limite superior $Q_3 + 1,5*(Q_3-Q_1)$ (STATTREK.COM, 2012).

1.6.2 Análise estatística multivariada

Além das análises univariadas, a estatística voltada ao estudo multivariado de um determinado conjunto de dados proporciona uma visualização comparativa do sistema avaliado e um melhor entendimento sobre a interação de duas substâncias presentes em uma amostra, no caso de sistemas bivariados (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2012; STATTREK.COM, 2012).

Uma ferramenta estatística utilizada quando se quer comparar a relação entre duas variáveis é o gráfico de dispersão ou *scatterplot*. Este gráfico possibilita o estabelecimento de uma provável causa e consequência, avaliando a correlação existente entre ambas as variáveis (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2012; STATTREK.COM, 2012).

O gráfico de dispersão consiste da representação gráfica de um conjunto de dados na forma de pontos dispersos em um plano x/y descritos por sua causa e consequência, respectivamente. Estes gráficos são utilizados como forma de se estabelecer certos padrões para um conjunto de dados bivariados. Alguns dos parâmetros que descrevem o conjunto de dados plotados são a linearidade, que avalia a existência de uma tendência linear no conjunto de dados; a inclinação com que ocorre a variação do sistema, podendo ser uma inclinação positiva, quando a variável consequência (Y) aumenta com o aumento da variável causa (X), ou uma inclinação negativa, quando há um decréscimo no eixo Y (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2012; STATTREK.COM, 2012).

Um terceiro parâmetro para a descrição de um conjunto de dados apresentados através de um gráfico de dispersão é justamente a força, intensidade com que o conjunto de dados se difunde. Dados bastante dispersos apresentam uma relação fraca entre as variáveis do sistema, enquanto que dados concentrados em torno de um segmento linear definem uma forte relação de dependência entre estas variáveis (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2012; STATTREK.COM, 2012).

Estes gráficos otimizam ainda a visualização de um espaço amostral heterogêneo, facilitando a identificação de conglomerados - *clusters*, lacunas - *gaps*, e pontos fora do sistema - *outliers*, do conjunto de dados em análise. A Figura 19 ilustra alguns padrões comuns para os

gráficos de dispersão (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2012; STATTREK.COM, 2012).

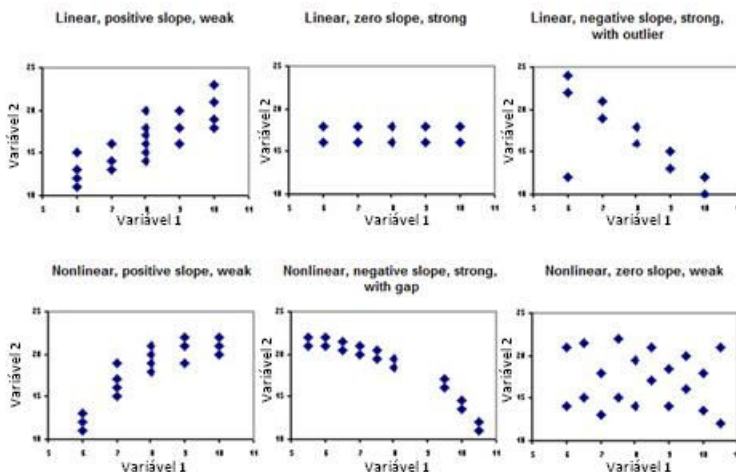


Figura 19: Ilustração dos padrões comuns de gráficos de dispersão.

Fonte: STATTREK.COM, 2012).

Dentre todos os padrões apresentados na Figura 19, o último deles é o único destes que representa a não correlação entre duas variáveis. Para todas as demais é possível o estabelecimento de um padrão entre as variáveis do sistema.

Outro tipo de análise multivariada que é cada vez mais frequente no tratamento de dados estatísticos é a análise de componentes principais - PCA. Sua utilização ajuda a reduzir o conjunto de informações em análise, permanecendo somente as variáveis de máxima informação do sistema (NETO et al, 1998; CORREIA et al, 2007; GUILLÉN-CASLA et al, 2011).

Aplicada através de ferramentas computacionais, esta análise quimiométrica promove um melhor entendimento sobre o conjunto de dados em estudo, possibilitando a exploração de similaridade de amostras de acordo com suas composições químicas. Esta análise foi proposta por Pearson em 1901 (NETO et al, 2006, CORREIA et al, 2007; GUILLÉN-CASLA et al, 2011).

Através das combinações lineares das variáveis originais é possível a obtenção, em forma decrescente de variância, dos componentes principais de máxima variância, ou seja, máxima

informação. A plotagem entre o primeiro e o segundo componente principal é feita de maneira ortogonal, onde o primeiro componente principal é atribuído ao eixo x e o segundo ao eixo y, possibilitando assim, o agrupamento de amostras similares, bem como a identificação de amostras fora do padrão estabelecido por um grupo (NETO et al, 2006; CORREIA et al, 2007). Uma das áreas da quimiometria no Brasil onde o PCA é aplicado é o reconhecimento de padrões, que utiliza a análise exploratória de dados para classificação de amostras, resolução de curvas, dentre outras finalidades. Este tipo de análise tem por objetivo detectar padrões, estabelecendo relações entre o objeto e suas variáveis. Através de algoritmos específicos é possível a elaboração de representações gráficas das maiores variâncias presentes em um conjunto de dados, estabelecendo assim o maior conjunto de informações relevantes (NETO et al, 2006; CORREIA et al, 2007).

Estas ferramentas estatísticas quando aplicadas em um conjunto de dados facilitam a caracterização do grupo de amostras com diferentes componentes em estudo, facilitando a visualização de padrões. Assim sendo, para a determinação, bem como para o controle de qualidade de constituintes químicos presentes em amostras vegetais, tais ferramentas proporcionam melhor entendimento e caracterização.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma metodologia eletroforética simultânea para avaliação dos teores de nicotina e nitrato em diferentes amostras vegetais e comerciais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar propriedades dos analitos nitrato e nicotina em diferentes pH's;
- Escolher padrões internos semelhantes aos analitos;
- Desenvolver metodologia eletroforética rápida e simultânea para determinação de nicotina e nitrato;
- Otimizar parâmetros instrumentais e metodológicos para obtenção de tempo de análise reduzido;
- Promover a extração eficiente dos analitos no preparo da amostra;
- Aplicar a metodologia desenvolvida à análises de extratos de tabaco em pó, cigarro comercial, adesivo transdérmico e goma de mascar contendo nicotina, além de espécies vegetais de pimenta - *Capsicum sp*, tomate - *Solanum lycopersicum*, cavalinha, - *Equisentum arvense* e erva de botão - *Eclipta alba*;
- Atestar parâmetros para validação do método;
- Executar testes estatísticos univariados e multivariados para avaliar padrões em conjuntos de amostras.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (desionizador Milli-Q, Millipore, Bedford, E.U.A.).

3.1 PREPARO DOS PADRÕES E SOLUÇÕES

Os padrões foram obtidos de diferentes empresas, a nicotina foi adquirida da Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), a lidocaína da CONFAR - Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins a as Respectivas Matérias-Primas (São Paulo, SP, Brasil), o nitrato de sódio da empresa Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha) e o iodeto de potássio da Cromato Produtos Químicos (São Paulo, SP, Brasil). Suas soluções foram preparadas em água desionizada, em soluções padrões estoque de aproximadamente 1000 mg L^{-1} cada.

Para compor o eletrólito foram utilizados Tris-(hidroximetil)-aminometano, TRIS, adquirido da empresa Fluka (São Paulo, SP, Brasil). O eletrólito de corrida foi preparado com água desionizada nas concentrações de 25 mmol L^{-1} de TRIS e 5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 , com pH ajustado até 8,1.

O ácido sulfúrico foi comprado da empresa Mallinckrodt (São Paulo, SP, Brasil). O ácido sulfúrico 12 mmol L^{-1} foi utilizado para acidificar a água de preparo das amostras na proporção de 5%.

3.2. PREPARO DE AMOSTRAS

O preparo das amostras para determinação simultânea de nitrato e nicotina em solução aquosa consistiu da extração dos analitos em meio ácido. Para todas as amostras foi utilizada solução aquosa acidificada com 5% (v/v) de H_2SO_4 , para promover a protonação da nicotina e facilitar sua extração em água. A mistura foi centrifugada em centrífuga Eppendorf, modelo MiniSpin[®] Plus (Barkhausenweg, Hamburgo, Alemanha) á 10.000 rpm por 5 minutos. Na sequencia o sobrenadante foi diluído em diferentes proporções para análise de nitrato e nicotina de acordo com os níveis dos analitos em cada conjunto de amostras.

As amostras de tabaco em pó foram cedidas pela empresa Souza Cruz, (CMF - Centro de Melhoramento de Fumo, Rio Negro - Paraná, Brasil), preparadas na concentração de 750 mg L^{-1} e diluídas na proporção 1:5 para a determinação da nicotina e 1:10 para o nitrato (v/v).

Amostras de espécies vegetais de pimenta - *Capsicum sp*, tomate - *Solanum lycopersicum*, cavalinha, - *Equisentum arvense* e erva de botão - *Eclipta alba* foram cedidas pela Epagri (EEI - Estação Experimental de Itajaí, Santa Catarina, Brasil). As amostras foram secas em estufa à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por cerca de 60 minutos e preparadas em soluções estoque de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ e 750 g.L^{-1} , sendo diluídas nas proporções de 1:5 e 1:10.

Amostras de cigarros, gomas de mascar e adesivos contendo nicotina foram adquiridos em comércio local. Os cigarros foram preparados na concentração de 750 mg L^{-1} , sendo diluídos nas proporções de 1:5 para a determinação da nicotina e 1:10 para o nitrato. A goma de mascar foi preparada a 1500 mg L^{-1} e o adesivo a 2000 mg L^{-1} , e diluídos respectivamente a 5 e 30 vezes para determinação de nicotina.

3.3. EQUIPAMENTOS

O equipamento de EC utilizado para as análises foi da marca Agilent Technologies, modelo 7100 CE[®] (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos. As medidas foram efetuadas a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em capilar de sílica fundida com revestimento externo de poli-imida (L_{tot} 48,5 cm e L_{det} 8,5 cm x 50 μm D.I. x 375 μm D.E.) procedente da empresa Polymicro Technologies (Phenix, E.U.A.).

O primeiro condicionamento do capilar foi realizado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ da seguinte forma: 30 minutos com uma solução de NaOH 1 mol L^{-1} , 30 minutos com água desionizada e 20 minutos com o eletrólito de corrida a ser utilizado na análise. O condicionamento entre as corridas foi de 1 minuto com o eletrólito de corrida.

Após o autozero, as soluções padrões e as amostras foram introduzidas em ambos os lados do capilar sob injeção hidrodinâmica, onde primeiramente foi aplicada uma pressão positiva de 50 mbar por 5 s na extremidade do capilar mais distante do detector, seguido da injeção de um plugue de eletrólito de 50 mbar por 6 s e, na sequência, uma

pressão negativa de 50 mbar por 5 s na extremidade do capilar mais próxima do detector (extremidade do capilar mais próxima do detector). A separação dos analitos foi efetuada sob aplicação de uma tensão de 30 kV com polaridade positiva, e detecção UV/VIS com monitoramento em 200 nm de comprimento de onda.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE SIMULTÂNEA DE NITRATO E NICOTINA

A determinação de diferentes tipos de substâncias em amostras vegetais mostra a necessidade de desenvolvimento de estratégias para análise deste tipo de matriz. Uma matriz vegetal que possui diferentes tipos de compostos de interesse industrial e é extensivamente analisada e consumida mundialmente é o tabaco.

A metodologia desenvolvida teve por objetivo a minimização de custo e tempo, optando-se, portanto, pelo desenvolvimento de uma metodologia no modo de separação mais comumente utilizado, chamado eletroforese capilar em solução livre ou eletroforese capilar de zona. Este modo de separação é um dos mais utilizados devido sua fácil implementação e otimização de condições experimentais. Para o desenvolvimento da metodologia de análise simultânea de nitrato e nicotina devemos considerar as características de ambos analitos que possibilitem suas determinações em uma mesma amostra (TAVARES, 1997).

A nicotina possui sua absorvidade e sua mobilidade dependentes do pH da solução tampão utilizada como eletrólito de corrida. Isto porque a nicotina é uma base diprótica com pKa 3,12 para o anel de piridina e pKa 8,02 para o anel de pirrolidina, podendo assim se apresentar sob as formas neutra, monoprotonada ou diprotonada, Figura 23, de acordo com o pH do meio onde o analito está inserido (RALAPATI, 1997; LOCHMANN, 2001; YANG, 1996).

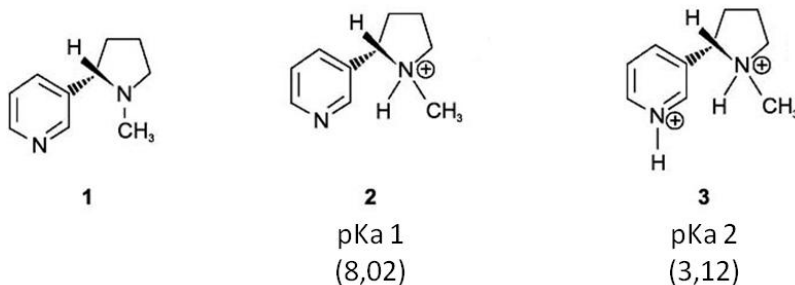


Figura 20: (1) Nicotina neutra; (2) nicotina monoprotonada; (3) nicotina diprotonada.

Fonte: Adaptado de Callicutt (2006, p. 2)

Apesar de a forma diprotonada ser a de maior absorvidade molar, proporcionando maior sensibilidade durante sua determinação, a molécula monoprotonada, quando analisada em tampões de força iônica moderada e capilares curtos, promove análises rápidas com até um minuto de corrida (RALAPATI, 1997; YANG, 1996). Como a proposta do estudo foi desenvolver uma separação rápida e simultânea, a análise do alcaloide será procedida com o analito na forma monoprotonada.

Não há registros na literatura da mobilidade eletroforética da nicotina. Sabe-se apenas que ela apresenta mobilidade positiva e, portanto, migrará no modo coeletrosmótico. Sabe-se também que a separação eletroforética depende da maximização das diferenças de mobilidade entre os analitos e a minimização das causas de alargamento das zonas (TAVARES, 1997).

Uma alternativa no desenvolvimento deste método foi a utilização de um padrão interno com estrutura semelhante e pKa próximo da nicotina, como a lidocaína, com pKa 7,85, mobilidade positiva de $23,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ e uma estrutura orgânica que favorece sua detecção direta por UV-Vis (HIROKAWA, 1983). Assim, através do gráfico de Carga vs. pH para ambos os compostos, escolheu-se o melhor pH de separação conforme mostrado na Figura 21.

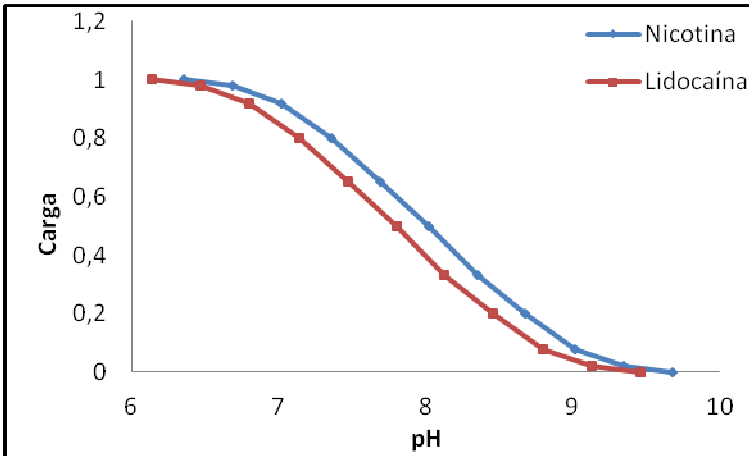


Figura 21: Curva de carga vs. pH para o analito nicotina e seu padrão interno lidocaína

A partir da Figura 21 foi possível escolher o pH onde a diferença de carga nos analitos seja máxima. Este procedimento está baseado na migração efetiva diferenciada, que compostos com distribuições de carga (α) distintas apresentam, quando imersos em soluções tampão.

O TRIS foi escolhido para compor o eletrólito de corrida como co-íon do alcaloide por apresentar boa capacidade tamponante em pH 8,1, conforme a Figura 22. Isto minimiza variações no pH do eletrólito, minimizando também possíveis variações no FEO e, conseqüentemente, na separação. Neste pH, o fluxo eletrosmótico é bastante intenso, sendo responsável pelo transporte indiscriminado dos analitos catiônicos, neutros e aniônicos em direção ao detector (TAVARES, 1996). Além disso, o TRIS possui mobilidade moderada de $29,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$, que proporciona calor por efeito joule de forma branda, e apresenta mobilidade próxima a do padrão interno da nicotina, minimizando prováveis efeitos de alargamento de bandas (TAVARES, 1997). O contra íon do TRIS, que por sua vez é o co-íon do nitrato, será escolhido com base nas características do próprio analito aniônico.

O nitrato absorve radiação UV-Vis e possui pKa negativo, apresentando-se sob a forma ânionica com alta mobilidade negativa, $-74,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$, conforme a Figura 22, sendo analisado diretamente em modo contraeletrosmótico (WILLIAMS, 2012; RIPIN, EVANS, 2012; HIROKAWA, 1983). Como padrão interno foi escolhido o iodeto por apresentar características semelhantes ao analito, como, absorver

radiação UV-Vis e ser um ânion inorgânico de pKa -2 com alta mobilidade negativa de $-79,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$, Figura 22 (HIROKAWA, 1983).

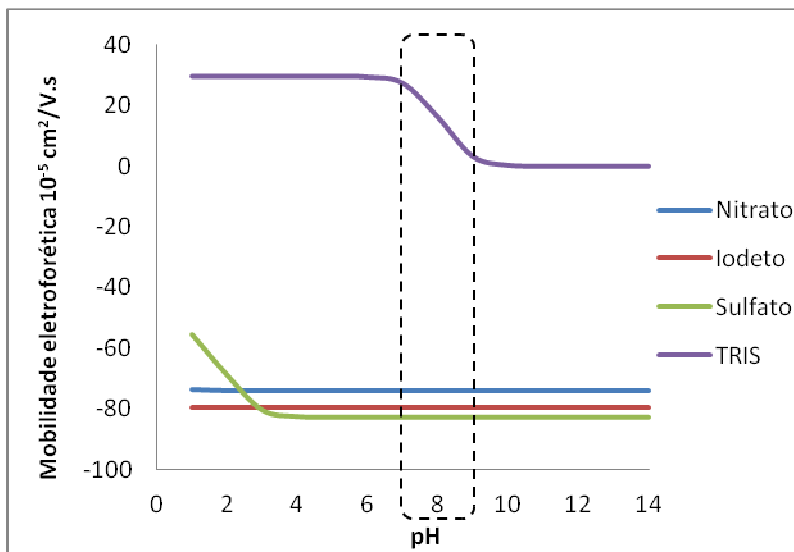


Figura 22: Gráfico de mobilidade eletroforética vs. pH para o nitrato e seu padrão interno e para os componentes do eletrólito, TRIS e sulfato.

O co-íon do nitrato no eletrólito de corrida deve possuir mobilidade semelhante a do analito nitrato e seu padrão interno iodeto para que os fenômenos de eletrodispersão sejam minimizados. A força iônica gerada deve ser mediana para reduzir o aquecimento por efeito joule, além de não absorver radiação UV-Vis próximo de comprimentos de onda de absorção dos analitos. A escolha do segundo componente do eletrólito de corrida foi o sulfato, que acima do pH 3 apresenta-se com mobilidade negativa de $-82,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$, conforme mostra a Figura 22.

Neste ponto do desenvolvimento do método deve-se definir qual o sinal da polaridade aplicada durante a análise (Figura 23).

A polaridade positiva aplicada na extremidade da injeção possibilita a migração da nicotina em direção ao detector, porém o nitrato que migra no modo contraeletromótico com alta mobilidade não consegue ser conduzido até o detector, conforme a Figura 23A.

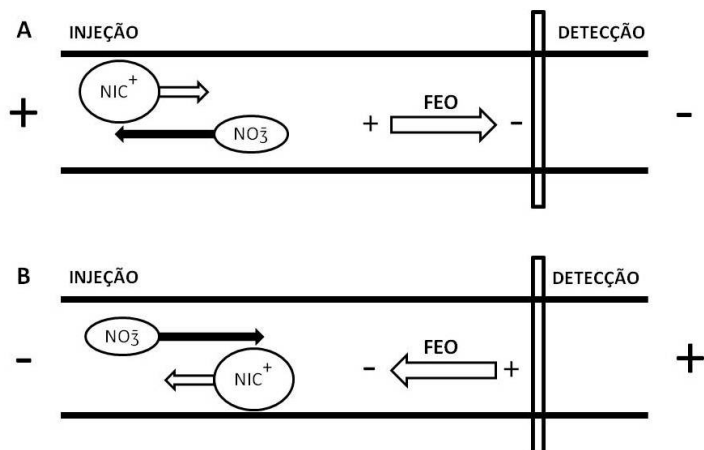


Figura 23: Esquema dos modos de análise de nitrato e nicotina. a) Polaridade positiva na extremidade da injeção; b) Polaridade negativa na extremidade da injeção.

Já, aplicando polaridade negativa na extremidade da injeção, possibilita-se a determinação do nitrato, que possui mobilidade maior que o FEO e migra contra ele até o detector. A nicotina, porém, permanece no pólo de carga negativa onde foi injetada sem migrar até o detector, Figura 26B.

A estratégia desenvolvida visou promover a injeção da amostra por ambas as extremidades do capilar, conforme mostra o esquema da Figura 24, promovendo a determinação rápida e simultânea dos analitos.

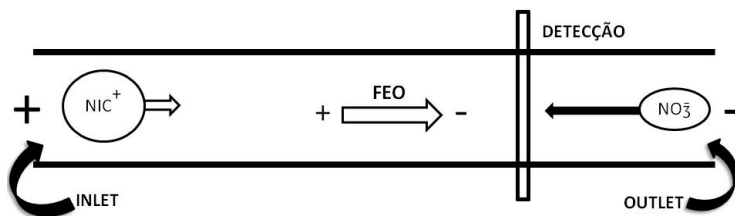


Figura 24: Esquema do modo de injeção para análise simultânea de nitrato e nicotina.

A Figura 24 mostra que a nicotina é injetada na extremidade do capilar mais distante do detector, e migra com mobilidade somada à do fluxo eletrosmótico. Este fluxo é bastante intenso em pH 8,1 e faz com que a nicotina, que possui baixa mobilidade, chegue ao detector de forma rápida. O nitrato, por sua vez, quando injetado pelo na extremidade do capilar mais próxima do detector, migra com alta mobilidade no modo contraeletrosmótico, chegando rapidamente ao detector.

O eletroferograma da Figura 25 é o resultado preliminar do método de análise simultânea de nicotina e nitrato desenvolvido e aplicado à mistura dos padrões dos analitos e seus respectivos padrões internos. Para esta análise, foi procedida a injeção da amostra em três etapas de injeção a 50 mbar de pressão em capilar de sílica fundida de 48,5 cm de comprimento total, com janela de detecção em 40 cm de comprimento. Inicialmente a amostra foi injetada na extremidade do capilar mais distante do detector por 5 segundos, seguida da injeção de um plugue de eletrólito de 6 segundos. Por fim, a mesma amostra foi injetada na extremidade do capilar mais próxima do detector por 5 segundos, fazendo com que parte do plugue de eletrólito seja expulso do capilar, sem prejudicar o plugue de amostra da extremidade do capilar mais distante do detector. A polaridade aplicada foi de 30 kV na extremidade do capilar mais distante do detector, o que implica em ganho de resolução, eficiência e tempo de análise.

Diferentes concentrações dos componentes do eletrólito de corrida foram avaliadas offline, utilizando o software Peakmaster para a separação do nitrato e seu respectivo padrão interno. Comparando informações geradas pelo software, como os tempos de migração dos analitos, bem como, a força iônica e a capacidade tamponante da solução eletrolítica, foi possível prever a composição do eletrólito de corrida que estabeleceu a separação analítica mais rápida e eficiente. A composição final do eletrólito de corrida foi 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1, força iônica 15 mmol L⁻¹ e capacidade tamponante de 14 mmol L⁻¹, obtendo finalmente a análise simultânea em menos de 1,8 minutos, conforme o eletroferograma da Figura 25.

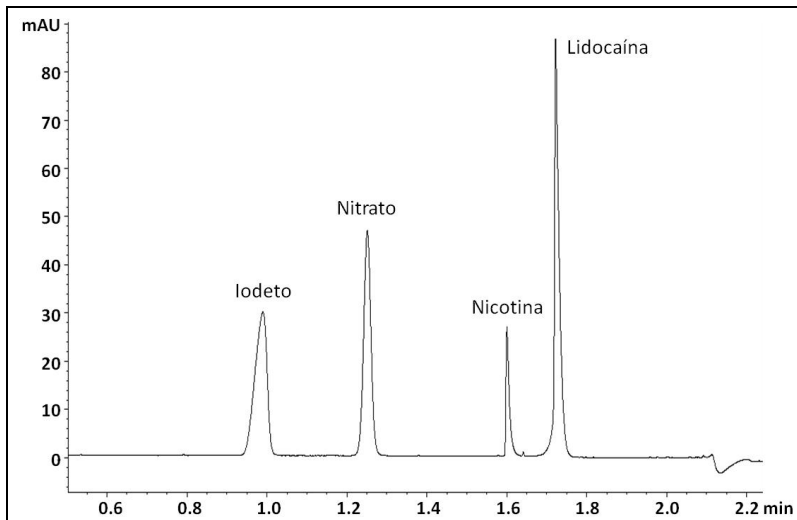


Figura 25: Eletroferograma da análise simultânea da mistura de padrões de $1,325 \text{ mg L}^{-1}$ de iodeto, 5 mg L^{-1} de nitrato, 65 mg L^{-1} de nicotina e $11,6 \text{ mg L}^{-1}$ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L^{-1} de TRIS e 5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV.

A Figura 25 comprova o sucesso da injeção em ambas as extremidades do capilar para análise simultânea de cátions de mobilidade moderada e ânions de alta mobilidade. O eletroferograma mostra ainda uma separação com boa resolução e eficiência, além de picos bastante simétricos, desviando pouco de uma distribuição gaussiana. Este desvio pode ocorrer devido a soma de fatores que contribuem para o alargamento e deformação das zonas eletroforéticas. Idealmente a causa de dispersão de uma zona seria apenas uma difusão longitudinal do analito pela solução eletrolítica. Contudo, o alargamento de bandas pode ocorrer devido a fenômenos de eletrodispersão, causados pelas diferenças de condutividade entre as zonas do eletrólito e da amostra, bem como variações na temperatura interna do capilar, escolha dos parâmetros de injeção, tipos de matriz e fenômenos de adsorção envolvidos (SILVA, 2007).

A diferença de condutividade entre o analito e o eletrólito podem ser as possíveis causas de formação de cauda apresentadas por suas

zonas eletroforéticas. A Figura 26 ilustra o esquema do possível fenômeno de eletrodispersão formador da cauda.

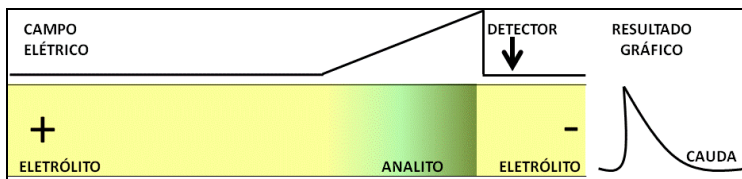


Figura 26: Esquema representativo do fenômeno de eletrodispersão causado pela diferença de condutividade elétrica entre analito e eletrólito, formando como resultado gráfico desta dispersão cauda nas bandas eletroforéticas.

A zona da nicotina no interior do capilar possui condutividade mais baixa que as zonas de eletrólito que o cercam. Dessa forma, quando os analitos que estão na interface eletrólito-nicotina se difundem para a região de eletrólito, sofrem uma queda em sua mobilidade iônica, devida a atuação de um campo elétrico menos intenso, provocando o afastamento destes analitos do centro de sua banda, formando assim a cauda visualizada no esquema da Figura 26. Na interface nicotina-eletrólito, por sua vez, quando um analito passa para a região do eletrólito, novamente ocorre o retardamento destes íons que com o tempo, são alcançados pelo centro da banda, e minimizam assim a distorção do tipo cauda frontal.

Para analitos como o iodeto e a lidocaína, suas zonas possuem maior condutividade que o eletrólito de corrida, fazendo com que os analitos presentes na interface eletrólito-nicotina apresentem mobilidade mais baixa que os analitos da interface analito-eletrólito que se difundem mais rapidamente, formando uma cauda frontal.

4.2 FIGURAS DE MÉRITO

Através de diferentes testes é possível avaliar alguns parâmetros de desempenho analítico, objetivando avaliar o grau de confiança dos resultados obtidos na aplicação de uma metodologia. Este é um processo importante em qualquer tipo de análise, sendo necessária sua aplicação em estudos quantitativos, e principalmente para o controle de qualidade

como o de produtos a base de matrizes vegetais (INMETRO, 2003; RIBANI, 2004; SILVA, 2007; VITALI, HORST et al. 2011; WILLIANS, 2012; RIPIN, EVANS, 2012).

O processo de validação aplicado teve como base a Resolução ANVISA RE no 899, de 29/ 05/2003, com a avaliação da conformidade do sistema, bem como a seletividade, linearidade, faixa de aplicação, limites de detecção e quantificação e testes de precisão da metodologia desenvolvida.

4.2.1 Conformidade do sistema

A conformidade do sistema foi obtida através da medida dos tempos de migração do analito, sendo útil na avaliação do instrumento em si, bem como na avaliação do sistema químico no interior do capilar ao longo das análises.

Os tempos de migração variam de acordo com a magnitude e abundância de interações entre o analito, o eletrólito de corrida e a parede do capilar. Diferentes tempos de condicionamento inicial com a solução tampão podem proporcionar variações na composição da parede do capilar, gerando tempos de migração divergentes entre si.

Em ensaios de precisão instrumental a composição do analito e do eletrólito não variam durante as análises sequenciais, bem como o tempo de condicionamento entre corridas, que ficou estabelecido em 60 segundos de eletrólito de corrida, sendo possível assim, avaliar mudanças na magnitude do fluxo eletrosmótico devido a composição química da parede do capilar após diferentes pré-condicionamentos do capilar antes de iniciar um conjunto de análises ou devida eletrólise do eletrólito de corrida após diversas análises.

Foram realizados três estudos de precisão instrumental utilizando diferentes estratégias de condicionamento, a fim de avaliar as variações de mobilidade dos analitos em função do condicionamento inicial do capilar. A maior variação de tempo de migração foi obtida para o nitrato, conforme mostra a Figura 27.

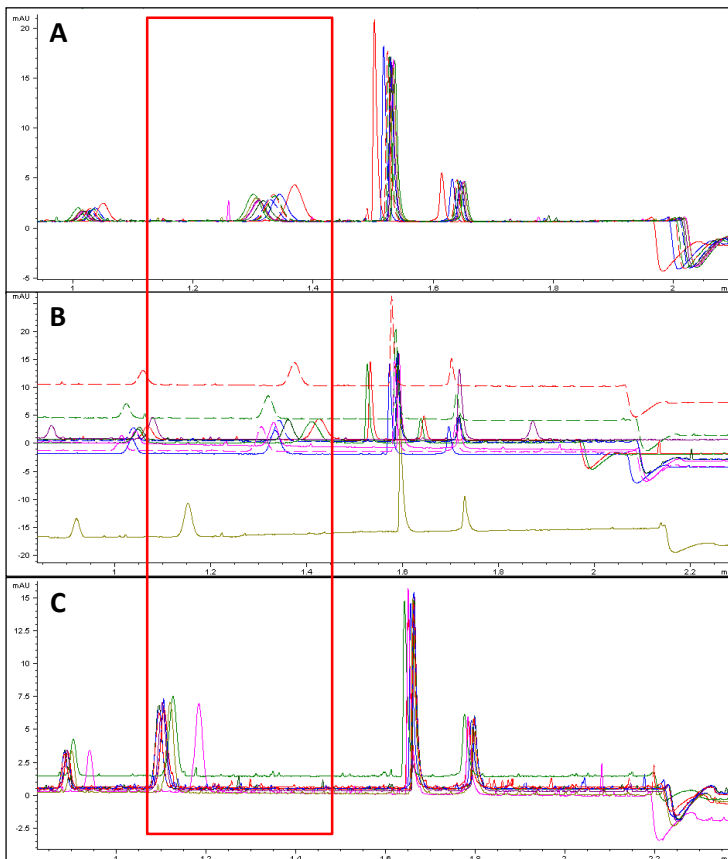


Figura 27: Eletroferogramas sobrepostos de 10 análises sequenciais do ponto médio da curva de calibração para o teste de precisão instrumental com condicionamento de X minutos de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} , Y minutos de água deionizada e Z minutos de eletrólito de corrida. A) 5X, 5Y, 5Z; B) 10X, 10Y, 20Z; C) 5X, 10Y, 20Z. A composição analisada foi de $1,325 \text{ mg L}^{-1}$ de iodeto, 5 mg L^{-1} de nitrato, 65 mg L^{-1} de nicotina e $11,6 \text{ mg L}^{-1}$ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de $48,5 \text{ cm}$ de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L^{-1} de TRIS e 5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV . Destaque no quadro vermelho para a variação do tempo de migração do nitrato nos conjuntos de análise.

Na Figura 27A o condicionamento inicial foi de 5 minutos de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} , 5 minutos de água e 5 minutos de

eletrólito de corrida, demonstrando a ineficiência do condicionamento e a variação do fluxo eletrosmótico durante as análises. Isto é mais facilmente visualizado para o nitrato que apresenta um tempo de migração maior por possuir alta mobilidade no contrafluxo e, portanto, é mais influenciado pela magnitude do mesmo.

No segundo experimento, Figura 27B, o capilar foi condicionado com 10 minutos de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} e 10 minutos de água, visando retirar o excesso de hidróxido de sódio do capilar e 20 minutos de eletrólito para promover um tempo maior de condicionamento no pH de trabalho, porém esta estratégia de condicionamento aumentou consideravelmente a variação do FEO.

Na terceira estratégia de condicionamento, Figura 27C, o capilar foi lavado com 5 minutos de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} e 10 minutos de água, a fim de restabelecer o capilar e retirar o excesso de sódio, e 20 minutos de eletrólito para promover o equilíbrio nas paredes do capilar no pH 8,1. Apesar dos resultados apontarem menores coeficientes de variação para a estratégia de condicionamento A, conforme mostra a Tabela 4, a estratégia de condicionamento C gera picos com maior sensibilidade e simetria e menores tempos de migração, aproximando o analito de seu padrão interno, com tempo de análise total abaixo de 1,2 minutos.

Tabela 4: Coeficientes de variação (CV) para área e tempo de migração das estratégias de condicionamento A, B e C, apresentadas na Figura 27 para 10 análises simultâneas de nitrato e nicotina.

Coeficientes de variação (CV %)	A	B	C
CV área Nitrato/Iodeto	5,42	7,26	5,45
CV área Nicotina/Lidocaína	0,89	2,36	2,95
CV tempo Nitrato/Iodeto	0,42	2,33	0,57
CV tempo Nicotina/Lidocaína	0,08	0,56	0,02

Após avaliar a melhor estratégia de condicionamento inicial do capilar, foram efetuados novamente os testes de precisão intermediária para atestar a validade das medições em diferentes dias de análise sob as condições atuais. O cálculo direto do desvio padrão de precisão intermediária foi possível segundo as orientações do INMETRO para

validação de métodos de ensaios químicos, conforme a Equação 1 (INMETRO, 2003).

$$Si_{(t)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

Equação 1

Onde: $Si_{(t)}$ - desvio padrão de precisão intermediária para tempos diferentes; t - número total de amostras avaliadas; n - número total de ensaios efetuados por amostra; j - número da amostra de 1 até t ; k - número do ensaio da amostra j , de 1 até n ; y_{jk} - valor do resultado k para a amostra j ; \bar{y}_j - representa a média aritmética dos resultados da amostra j .

Os valores de desvio padrão para as áreas relativas de nitrato e nicotina foram respectivamente 0,10% e $4,50 \cdot 10^{-3}\%$ e, para os tempos relativos foram, respectivamente, 0,06% e $3,38 \cdot 10^{-7}\%$, demonstrando que o condicionamento utilizado promove maior estabilidade para o equilíbrio químico no interior do capilar, minimizando flutuações na mobilidade do fluxo eletrosmótico e, portanto, nos tempos de migração dos analitos. A precisão estabelecida pelo método demonstra que a quantificação simultânea de nitrato e nicotina pode ser aplicada sequencialmente em diferentes amostras.

4.2.2 Testes de seletividade

Na impossibilidade de se analisar a matriz isenta do analito nas amostras estudadas, a seletividade foi avaliada através do detector de arranjo de diodos, que possibilita a análise do comprimento de onda máximo do composto de interesse, além de outros comprimentos de onda diferentes que possibilitem analisar a presença de interferentes na matriz, bem como possíveis compostos de degradação ao longo do estudo.

Na Figura 28 estão demonstrados os eletroferogramas referentes à análise das amostras sem adição de padrão interno, para o extrato de

folhas de tabaco secas e maceradas (F2), cigarro comercial (C2), cigarro comercial aromatizado (CA2).

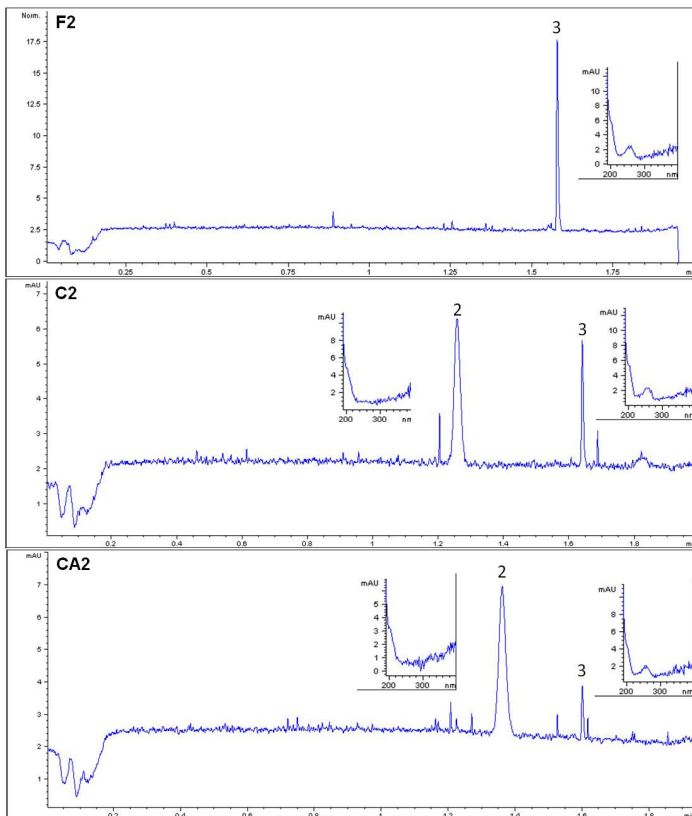


Figura 28: Eletroferogramas comparativos em 200 nm das amostras de folhas de fumo desidratada (F2), cigarro comercial (C2), e cigarro comercial aromatizado (CA2). A injeção foi hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. 2. Nitrato e 3. Nicotina.

A Figura 28 apresenta os eletroferogramas das amostras analisadas em comprimento de onda de 200nm, onde são visualizados picos referentes ao nitrato, nas amostras de cigarro comercial (C2) e cigarro comercial aromatizado (CA2), e à nicotina em todas as três

amostras. Os demais comprimentos de onda obtidos pelo equipamento foram avaliados para atestar a presença de possíveis compostos de degradação ou interferentes. Além disso, o software PeakMaster possibilita avaliar a pureza de cada um dos picos de um determinado eletroferograma, contribuindo para a caracterização de uma metodologia com boa seletividade.

Na Figura 29 são mostrados os eletroferogramas referentes à análise de nitrato e nicotina em adesivos e goma de mascar, usados na TRN - Terapia de Reposição de Nicotina, com a finalidade de redução e cessação do hábito de fumar.

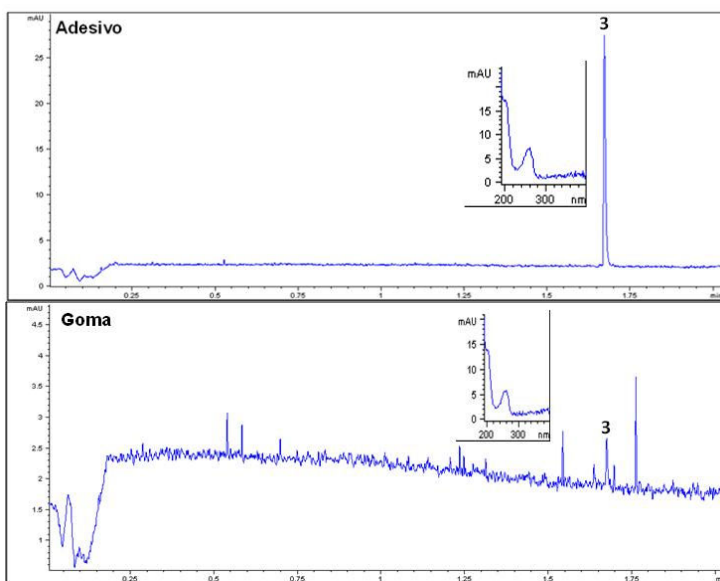


Figura 29: Eletroferogramas comparativos em 200 nm das amostras de adesivo transdérmicos para reposição de nicotina (Adesivo) e goma mastigável (Goma). A injeção foi hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. 3. Nicotina.

Os eletroferogramas da Figura 29 mostram que a nicotina foi detectada em ambas as amostras. A goma de mascar apresenta teores mais baixos de nicotina, próximos do limite de detecção do método. Isto

por que o teor de nicotina é menor cerca de dez vezes se comparado ao adesivo transdérmico. Além disso, o analito está impregnado no polímero da goma de mascar, e esta interação pode ser um fator determinante para a dessorção para a solução extratora.

4.2.3 Linearidade e curva de calibração

Os estudos de linearidade promovem, a partir da análise da curva de calibração, dados de correlação entre as concentrações dos analitos e suas respectivas propriedades medidas em forma de sinal analítico. Para o tratamento dos dados adquiridos foram utilizadas planilhas eletrônicas do software Microsoft Excel.

Visando minimizar possíveis erros atribuídos aos volumes de amostras injetados, utilizou-se um padrão interno para cada um dos analitos. A Figura 30 apresenta a sobreposição dos eletroferogramas referentes aos pontos da curva de calibração para os padrões de nitrato e nicotina e seus respectivos padrões internos.

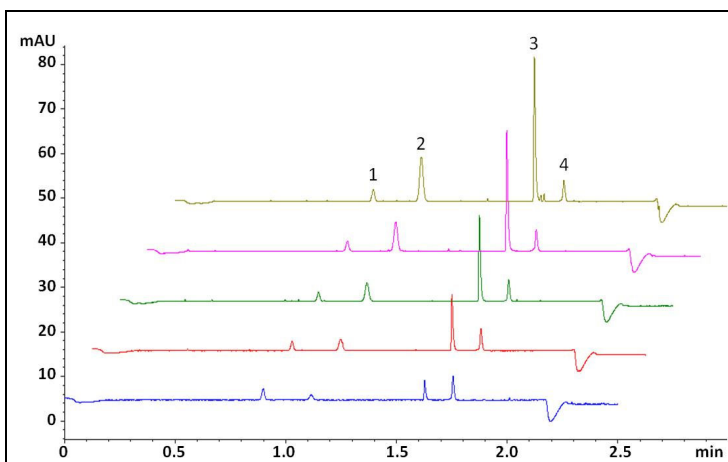


Figura 30: Eletroferogramas paralelos da curva de padrões para a análise simultânea da mistura de padrões de 1,325 mg L⁻¹ de iodeto, 1 a 9 mg L⁻¹ de nitrato, 13 a 117 mg L⁻¹ de nicotina e 11,6 mg L⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. **1.** Iodeto; **2.** Nitrato; **3.** Nicotina e **4.** Lidocaína.

As curvas de calibração de ambos analitos, Figura 31, mostram através de seus respectivos coeficientes de correlação, r , que o método apresenta baixa dispersão entre o conjunto de dados, diminuindo a incerteza dos valores obtidos para os coeficientes de regressão angular e linear.

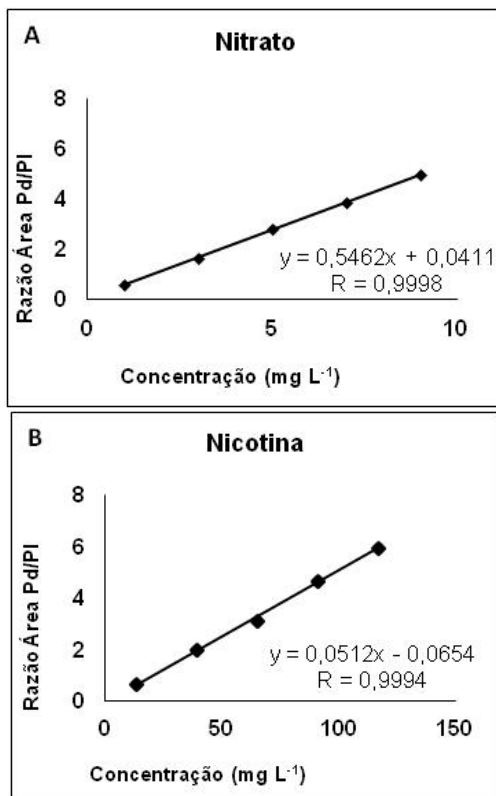


Figura 31: Curva de calibração da mistura de padrões de A) 1,325 mg L^{-1} de iodeto e 1 a 9 mg L^{-1} de nitrato e B) 13 a 117 mg L^{-1} de nicotina e 11,6 mg L^{-1} de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L^{-1} de TRIS e 5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV.

Em ambos os conjuntos de dados apresentados na Figura 31 há adequação das recomendações da ANVISA ($r > 0,99$), e do INMETRO ($r > 0,90$), assumindo um ajuste próximo ao ideal, com coeficientes de correlação acima de 0,999 (INMETRO, 2003; RIBANI, 2004; SILVA, 2007; VITALI, HORST et al. 2011; WILLIANS, 2012; RIPIN, EVANS, 2012).

4.2.4 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação para ambos analitos no método proposto foram obtidos a partir dos parâmetros das curvas analíticas. Para os padrões, os limites para o nitrato foram de $0,19 \text{ mg L}^{-1}$ para sua detecção e $0,65 \text{ mg L}^{-1}$ para sua determinação, enquanto que para a nicotina os limites foram de $0,80 \text{ mg L}^{-1}$ para sua detecção e $2,65 \text{ mg L}^{-1}$ para sua quantificação.

Para as amostras analisadas o método apresenta detectabilidade de $2,33 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato e $9,54 \text{ mg L}^{-1}$ de nicotina, e uma possibilidade de determinação de amostras com concentrações analíticas superiores a $7,77 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato e $31,78 \text{ mg L}^{-1}$ de nicotina.

4.2.5 Precisão

Os ensaios de precisão foram procedidos sobre as amostras em nível intra-laboratorial, sendo avaliadas a precisão instrumental, a precisão intra-ensaios, que mensura a conformidade do analista no estudo e a precisão intermediária, que avalia a variabilidade do método frente à mudanças de dias ou operadores.

4.2.5.1 Precisão instrumental

Para a precisão instrumental foram feitas injeções sequenciais da mesma amostra, garantindo através de seus coeficientes de variação que a precisão do método, no que diz respeito à instrumentação, possui valores adequados para a manutenção das condições eletrolíticas no interior do capilar, que promovem migração semelhante dos analitos em

injeções sequenciais. O desvio percentual apresentado para os dados de área relativa de padrão/padrão interno para o nitrato e nicotina ficou abaixo de 5%, com valores de 3,66% e 3,52%, respectivamente. Para os dados de tempo de migração relativos das espécies os coeficientes de variação ficaram acima ou próximos de 1%, com valores de 1,24% e 0,92%, respectivamente, indicando que o nitrato apresenta variações nos tempos de migração acima do recomendado.

4.2.5.2 Repetibilidade

A precisão intra-ensaios também chamada repetibilidade ou repetitividade, representa o grau de concordância entre medidas sucessivas de diferentes preparações analisadas em um curto intervalo de tempo, com o mesmo equipamento e local e o mesmo analista. Foram analisadas sete diferentes preparações do ponto médio da curva, com coeficiente de variação das áreas relativas de 2,38% para o nitrato e 2,68% para a nicotina, e coeficiente de variação dos tempos de migração relativos de 1,30% para o nitrato e 0,93% para a nicotina, o que mostra boa precisão em relação à concentração das amostras, porém novamente apresenta variação nos tempos de migração próximo ou acima de 1%.

4.2.5.3 Precisão intermediária

Um dos testes mais representativos dos possíveis erros sistemáticos dentro de um mesmo laboratório é o teste da precisão intermediária. Este teste apresenta a concordância entre os valores obtidos em três preparações procedidas em três dias diferentes, com um total de 12 análises, apresentando coeficiente de variação das áreas relativas de 2,61% para o nitrato e 2,67% para a nicotina, e coeficiente de variação dos tempos de migração relativos de 2,27% para o nitrato e 0,23% para a nicotina. Os valores demonstram que o método em si possui boa precisão nas concentrações injetadas, porém com alta variação nos tempos de migração do nitrato, mostrando uma possível variação na interação dos solutos no interior do capilar ou eletrólise da solução tampão utilizada como eletrólito de corrida.

A Tabela 5 apresenta o resumo dos parâmetros de mérito obtidos durante a validação da metodologia proposta.

Tabela 5: Figuras de mérito obtidas na validação da metodologia desenvolvida.

Parâmetros		Nitrato	Nicotina	
Pratos teóricos (N)		65069	432140	
Simetria		0,971	0,681	
		Pico		
Resolução (nitrato, iodeto)	Analito	adjacente	14,202	13,005
Precisão instrumental (CV%); área do pico	n=	11	3,667	3,521
Precisão instrumental (CV%); tempo de migração	n=	11	0,228	0,079
Precisão intra-ensaios (CV%); área do pico	n=	7	4,581	0,800
Precisão intra-ensaios (CV%); tempo de migração	n=	7	0,198	0,068
Precisão inter-ensaios (CV%); área do pico	n=	12	2,613	2,674
Precisão inter-ensaios(CV%); tempo de migração	n=	12	2,268	0,232
Linearidade - inclinação		0,546	0,051	
Desvio padrão da inclinação		0,006	0,000	
Linearidade - intercepto		0,041	-0,065	
Desvio padrão do intercepto		0,035	0,013	
Linearidade - Coeficiente de correlação		0,9998	0,9994	
F		7863	27016	
LD (mg L ⁻¹)*		0,194	0,795	
LQ (mg L ⁻¹)*		0,648	2,649	
LD (mg L ⁻¹) nas amostras		2,332	9,535	
LQ (mg L ⁻¹) nas amostras		7,774	31,784	

* Baseado em parâmetros da curva analítica

Segundo os dados apresentados na Tabela 5, a metodologia desenvolvida possui parâmetros que certificam sua validade e possibilitam sua aplicação à determinação de nitrato e nicotina em diferentes matrizes.

4.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS

4.3.1 Estudos de extração simultânea de nitrato e nicotina em amostras de fumo e cigarro comercial.

Foram realizados procedimentos para a avaliação dos tempos e volumes de extração de nitrato e nicotina em amostras de extrato seco de tabaco em pó e em cigarro comercial.

4.3.1.1 Avaliação do tempo de extração

Primeiramente foi procedida a extração de 7,5 g L⁻¹ e 750 g L⁻¹ de espécies vegetais de pimenta, tomate, cavalinha e erva de botão, 750 mg L⁻¹ de tabaco em pó e cigarros comerciais, 1500 mg L⁻¹ de goma de mascar e 2000 mg L⁻¹ de adesivo transdérmico, de forma simultânea para os analitos nicotina e nitrato em solução aquosa acidificada com 5% (v/v) de H₂SO₄. Este procedimento promove a protonação da nicotina, favorecendo assim a extração do analito para a solução acidificada. Posteriormente foi executada uma centrifugação à 10.000 rpm por cerca de 5 minutos. Por fim houve a diluição do sobrenadante em diferentes proporções para análise de nitrato e nicotina de acordo com os níveis dos analitos em cada conjunto de amostras.

A avaliação do tempo de extração foi procedido pela medida da concentração dos analitos ao longo de duas horas, para o extrato de folhas de tabaco maceradas, Figura 32A e extrato de cigarro comercial, Figura 32B.

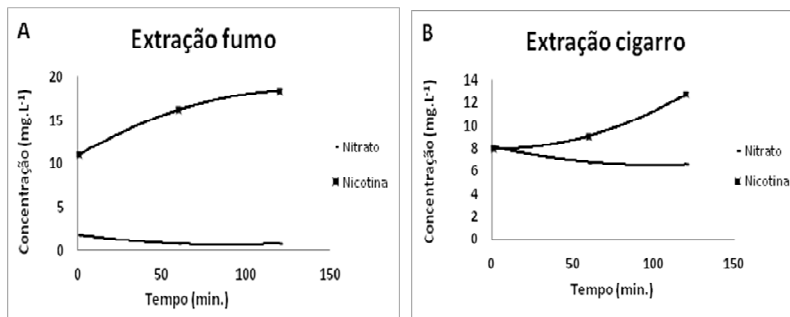


Figura 32: Curva de extração simultânea em função do tempo para os analitos das amostras A) extrato de tabaco em pó e B) extrato de cigarro comercial. Análise das amostras com adição de 1,325 mg L⁻¹ de iodeto e 11,6 mg L⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1 e aplicação de 30 kV.

Os gráficos da Figura 32 demonstram que o teor de nicotina extraída de ambas matrizes aumenta com o tempo. Durante a extração da nicotina do fumo ocorre um aumento do teor de nicotina a uma taxa decrescente, com um aumento de cerca de 46% no teor extraído durante a primeira hora e apenas 13,7% na segunda, mostrando que a extração está próxima do limite de tempo da ação do extrator para esta amostra. Já para o cigarro, esta taxa é crescente, com um aumento no teor de nicotina em 14,3% na primeira hora e cerca de 40% na segunda hora, mostrando uma tendência de aumento no teor extraído com o tempo.

Para o nitrato, ambos os estudos mostraram um decaimento perceptível somente na primeira hora de extração. Neste período a concentração de nitrato diminuiu mais de 50% para o extrato de fumo seco e de 16% para o cigarro. Uma das possíveis causas desta diminuição pode estar na degradação bacteriana do nitrato a nitrito para as amostras antigas de fumo em pó, que pode ocorrer principalmente nos extratos vegetais antigos em comparação com os cigarros que contém uma série de substâncias conservantes que podem minimizar sua degradação.

4.3.1.2 Avaliação do volume extrator

O estudo dos volumes extratores avaliou o teor de nicotina e nitrato, extraídos simultaneamente em 10 mL de extrator aquoso acidificado com 5% (v/v) de H_2SO_4 , em função de diferentes massas das amostras de tabaco em pó e de cigarro comercial, conforme a Figura 33.

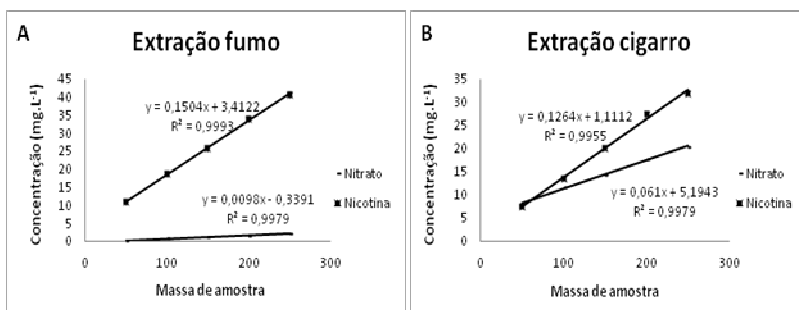


Figura 33: Curva de extração simultânea em função da massa de amostra para os analitos A) extrato de tabaco em pó e B) extrato de cigarro comercial. Análise das amostras com adição de $1,325 \text{ mg L}^{-1}$ de iodeto e $11,6 \text{ mg L}^{-1}$ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L^{-1} de TRIS e 5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV.

A partir da Figura 33 é possível avaliar o processo de extração dos analitos da matriz em função da massa de amostra extraída, podendo determinar se o volume de extração está atrelado a massa da amostra. As curvas de extração de cada um dos analitos para o fumo em pó é mostrada na Figura 33A. Apesar da concentração do nitrato presente na amostra ser muito baixa em relação à concentração de nicotina na mesma amostra, a linearidade destas curvas aponta uma baixa dependência do volume extrator com a massa de amostra.

Para a amostra de cigarro, conforme mostra a Figura 33B, a extração também se apresenta independente do volume de solvente para extrair diferentes massas de cigarros, tanto para a nicotina, quanto para o nitrato, que nesta amostra apresenta-se em maior concentração em relação ao extrato de fumo em pó.

Com a baixa dependência da massa extraída em 10 mL de solução extratora, optou-se pela massa média de 150 mg de amostra,

facilitando a pesagem das amostras de cigarro que se apresentam na forma de tiras de folhas de fumo.

4.3.2 Quantificação de nitrato e nicotina em diferentes amostras

Para a quantificação das amostras foi utilizada a construção da curva de calibração utilizando a calibração externa. A identificação da amostra foi realizada em triplicata para cada um dos diferentes grupos de amostras.

A análise comparativa da Figura 34 mostra a variação nas concentrações de nicotina e nitrato em diferentes amostras de folhas de fumo. Estas variações podem ser devido a diferenças durante o plantio e armazenamento da espécie, além de seu próprio metabolismo e interação com o ambiente.

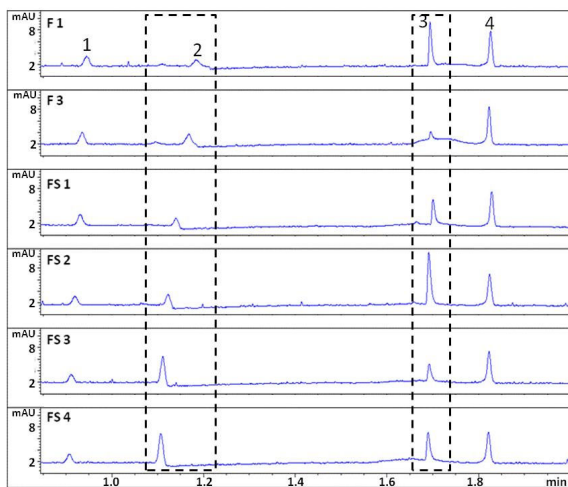


Figura 34: Eletroferogramas comparativos da análise simultânea de diferentes amostras de fumo ao natural (F1 e F3) e amostras de fumo seco (FS1, FS2, FS3 e FS4). Em cada amostra foi adicionado uma mistura dos padrões internos de $1,325 \text{ mg L}^{-1}$ de iodeto e $11,6 \text{ mg L}^{-1}$ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica de 50 mbar pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L^{-1} de TRIS e 5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. **1.** Iodeto; **2.** Nitrato; **3.** Nicotina e **4.** Lidocaína.

A Figura 34 mostra resultados de análises feitas para seis amostras de fumo. Para os extratos de folhas de tabaco, a amostra F1 apresentou aproximadamente 1454 mg de nitrato e 14465 mg de nicotina por quilograma de massa de amostra, enquanto que na amostra F3 foram determinados 1084 mg Kg⁻¹ de nitrato e 5282 mg Kg⁻¹ de nicotina.

As amostras de folhas de tabaco secas e maceradas também apresentaram variação nos teores de ambos os analitos, como mostra a Figura 34 para as amostras FS1, FS2, FS3 e FS4. Para as amostras FS1 e FS2, os teores de nitrato ficaram relativamente próximos, respectivamente, 1246 mg Kg⁻¹ e 1462 mg Kg⁻¹, enquanto que FS3 apresentou cerca de 4062 mg Kg⁻¹ e FS4 com 2633 mg Kg⁻¹ de nitrato. Para a nicotina quantificada no tabaco pela metodologia desenvolvida determinou-se cerca de 9000 mg Kg⁻¹ para a amostra FS1 e 9616 mg Kg⁻¹ para a amostra FS3. Já para a amostra FS4 o teor de nicotina foi de 17822 mg Kg⁻¹ e para a amostra FS2 cerca de 28460 mg Kg⁻¹.

Diferentemente das matrizes vegetais complexas apresentadas pelas amostras de tabaco, nas amostras de cigarro, o tabaco é processado e outros compostos são adicionados a sua matriz vegetal. Esta prática, em geral, tem por objetivo a adição de compostos conservantes, aromatizantes e flavorizantes, além de outros extratos vegetais incorporados a uma mistura de diferentes tipos de tabaco, permitindo assim um controle maior nos teores de nicotina, alcatrão e monóxido de carbono da mistura, conforme estabelecidos pelos órgãos de controle vigentes.

Esta tendência para a nicotina é percebida através dos eletroferogramas comparativos para diferentes marcas de cigarro comercial, como mostra a Figura 35.

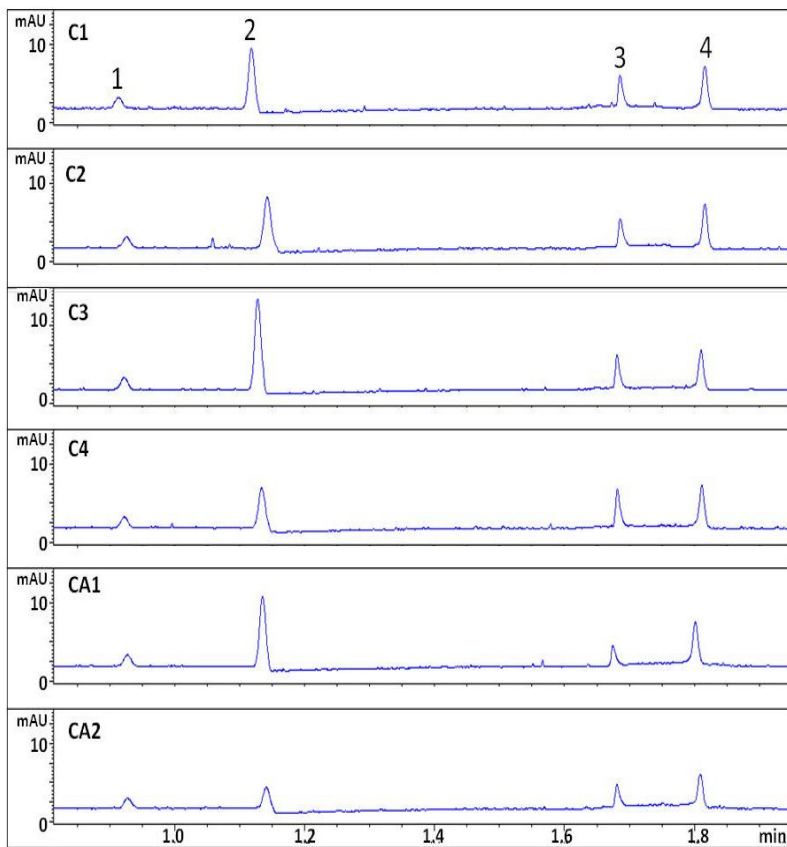


Figura 35: Eletroferogramas comparativos da análise simultânea de diferentes amostras de cigarros comerciais (C1, C2, C3 e C4) e amostras cigarros comerciais aromatizados (CA1, CA2). Em cada amostra foi adicionado uma mistura dos padrões internos de $1,325 \text{ mg L}^{-1}$ de iodeto e $11,6 \text{ mg L}^{-1}$ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica de 50 mbar pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L^{-1} de TRIS e 5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. 1. Iodeto; 2. Nitrato; 3. Nicotina e 4. Lidocaína.

Comparando os valores obtidos as análises dos diferentes tipos de cigarro, como mostrado na Figura 35, pode-se perceber teores aproximados de nitrato para três das amostras de cigarro comercial, amostras C1, C2 e C4, com uma média de 7250 mg Kg^{-1} da substância

em cada amostra, enquanto que a amostra C3 apresentou cerca de 11850 mg Kg⁻¹ de nitrato na amostra.

Os teores reais de nicotina nas diferentes marcas de cigarro estão relacionados às concentrações teóricas dos diferentes produtos de uma mesma marca, a antiga discriminação “red” e “light”, entre outras. Assim, as amostras C1 e C2 representam uma mesma marca de cigarro, sendo C1 a versão “light” e a amostra C2 a versão “red”. Para a amostra C1 o teor de nicotina chegou perto de 13844 mg Kg⁻¹ de massa seca, enquanto que a amostra C2 apresentou teor de aproximadamente 16224 mg Kg⁻¹.

Esse teores de nicotina pode também variar de marca para marca, como mostram as amostras C4 e C3, que também são versões “red”, sendo a C4 uma amostra com teor bastante semelhante à amostra C2, com aproximadamente 16500 mg Kg⁻¹, e C3 sendo o que apresentou a maior concentração de nicotina, com 19934 mg Kg⁻¹ deste analito na massa seca da amostra.

Para os cigarros comerciais aromatizados os teores de nitrato foram diferentes (Figura 35). Já os teores de nicotina em geral são menores quando comparados com cigarros não aromatizados, e conforme esperado para cigarros comerciais, sua concentração é modulada no processamento do tabaco. A amostra CA1 apresentou o menor teor de nitrato dentre todas as amostras de cigarro comercial analisadas, com apenas 2500 mg Kg⁻¹ do analito e cerca de 9932 mg Kg⁻¹ de nicotina na amostra. Já para a amostra CA2, o teor de nitrato foi de 6320 mg Kg⁻¹ enquanto que o teor de nicotina cerca de 8043 mg Kg⁻¹.

Além de amostras de fumo não processado e cigarros industrializados, foram analisadas amostras de adesivo transdérmico de nicotina de 21 mg, usados no tratamento de reposição de nicotina, e goma de mascar contendo 2 mg de nicotina, conforme apresentado na Figura 36.

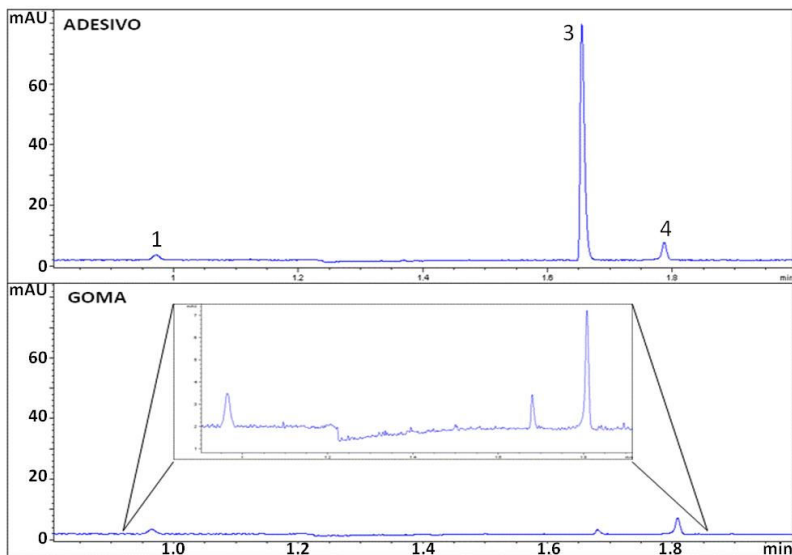


Figura 36: Eletroferogramas comparativos da análise simultânea para a amostra de adesivo transdérmico e para a goma de mascar apresentada na mesma escala do adesivo e com zoom. Em cada amostra foi adicionado uma mistura dos padrões internos de 1,325 mg L⁻¹ de iodeto e 11,6 mg L⁻¹ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica de 50 mbar pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L⁻¹ de TRIS e 5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄, com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. **1.** Iodeto; **2.** Nitrato; **3.** Nicotina e **4.** Lidocaína.

Ambas as amostra apresentadas na Figura 36 não apresentam nitrato em sua composição, ou este analito está abaixo do limite de detecção do método. Para a amostra de adesivo transdérmico observou-se alto teor de nicotina com uma média de 4807 mg Kg⁻¹. Já a goma de mascar em escala comparativa com o adesivo, apresenta níveis mais baixos de nicotina, com 1306 mg Kg⁻¹ do analito na massa seca de sua amostra.

A Figura 37 proporciona uma visão comparativa da análise de diferentes espécies vegetais da família das solanáceas, como a batata-doce, tomate e alguns tipos de pimenta. Além disso, foram analisados chás de cavalinha (*Equisentum arvense*) e de erva de botão (*Eclipta alba*).

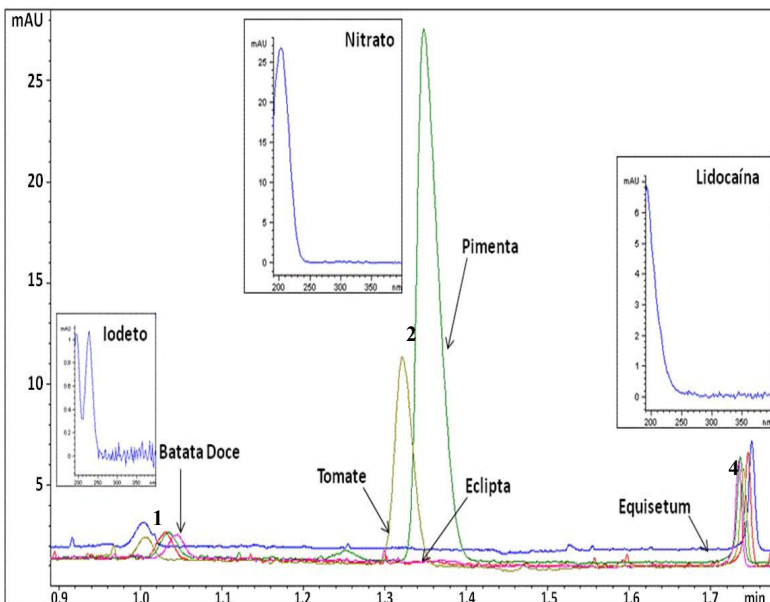


Figura 37: Eletroferogramas sobrepostos para a análise simultânea de diferentes espécies vegetais da família das solanáceas e outros chás. Em cada amostra foi adicionado uma mistura dos padrões internos de $1,325 \text{ mg L}^{-1}$ de iodeto e $11,6 \text{ mg L}^{-1}$ de lidocaína, com injeção hidrodinâmica de 50 mbar pelas duas extremidades do capilar de 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, eletrólito de corrida composto de 25 mmol L^{-1} de TRIS e 5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 , com pH 8,1 e aplicação de 30 kV. 1. Iodeto; 2. Nitrate; e 4. Lidocaína.

A Figura 37 confirma que, para as amostras de extratos vegetais de plantas da família das solanáceas e os chás de cavalinha e erva de botão, não foi possível a detecção de nicotina em suas matrizes. Já para a determinação de nitrato, as amostras de tomate e pimenta se destacaram apresentando, respectivamente, $75,86 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $237,54 \text{ mg Kg}^{-1}$, enquanto que as demais amostras não apresentaram picos referentes ao nitrato ou estavam abaixo do limite de detecção.

A Tabela 6 apresenta os valores médios de quantificação das amostras analisadas no método proposto.

Tabela 6: Valores obtidos para a quantificação de amostras diversas, apresentados em mg Kg⁻¹ de massa seca de amostra.

Amostras	Nitrato (mg Kg⁻¹ m.s.)	Nicotina (mg Kg⁻¹ m.s.)
F1	1454±207	14465±269
F2	nd	5957±808
F3	1084±274	5282±967
FS1	1247±223	8955±436
FS2	1462±200	28461±124
FS3	4062±78	9616±439
FS4	2633±113	17822±203
FS5	2626±116	8172±518
FS6	2232±136	9632±424
FS7	6071±52	8697±492
FS8	5460±57	7096±619
FS9	3441±89	10403±385
FS10	3715±83	10048±402
FS11	1785±171	15381±251
FS12	8731±37	16024±242
FS13	4308±74	10214±410
FS14	6290±50	13614±288
FS15	8970±36	12381±326
FS16	5118±63	11441±361
FS17	8371±38	14090±276
C1	7346±43	13844±280
C2	7296±44	16224±238

C3	11853±25	19934±173
C4	7113±45	16508±232
C5	10560±31	15462±252
C6	11201±28	11394±347
CA1	6321±49	8044±522
CA2	2505±120	9933±403
Goma	nd	1306±573
Adesivo	nd	4808±223
Pimenta	238±13	nd
Tomate	76±8	nd

Através da Tabela 6 é possível perceber que os teores de nitrato e nicotina possuem grande variabilidade dentre as amostras analisadas. As amostras pertencentes a um mesmo grupo também apresentam diferenças, como é o caso das amostras vegetais de fumo, que têm seus teores de nicotina e nitrato possivelmente influenciados pelas condições de plantio, e as amostras de cigarro que, mesmo tendo seus teores de nicotina controlados, apresentam pequenas variações no teor médio.

4.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Após a quantificação das amostras foi feita a análise estatística dos dados. Estas análises têm como objetivo expandir o conhecimento sobre o conjunto de dados em estudo, facilitando a avaliação das variáveis do sistema e suas influências sobre o mesmo (CONCEIÇÃO, 2012).

Ferramentas computacionais, como o software Statistica, foram utilizados para análise do conjunto de dados de teor de nitrato e nicotina em diferentes amostras. Após a inserção dos dados autoescalados, o programa possibilita a aplicação de diferentes análises estatísticas sobre o conjunto numérico, produzindo tabelas e gráficos que descrevem tendências, variações ou anomalias do sistema.

4.4.1 Pré-tratamento de dados

Neste estudo foram utilizados os resultados de quantificação para o nitrato e a nicotina, determinados em vinte amostras de tabaco e oito amostras de cigarro comercial, dentre os quais duas amostras são de cigarros aromatizados.

Estas vinte e oito amostras apresentaram composições distintas, possibilitando variações com diferentes efeitos sobre cada uma das variáveis, dificultando assim, a comparação dos teores dos analitos de forma direta. Uma alternativa é a utilização de tratamentos matemáticos prévios que visem a transformação no conjunto de dados, mantendo toda sua informação estatística.

Primeiramente, os dados devem ser organizados em forma de matriz. Os dados originais de n analitos (variáveis), determinados em m amostras (objetos) compõem uma matriz de dados D de formato $m \times n$. Assim, para o presente estudo foi obtida a matriz $D_{28 \times 2}$, contendo as vinte e oito amostras em análise, ordenadas nas linhas (i), e as variáveis de concentração de nitrato e de nicotina nas colunas (j) (CORREIA, 2007, NETO, 1998).

Na sequência, os dados de concentração foram autoescalados. Essa técnica objetiva centralizar os dados na média e os ajustar em uma escala única, atribuindo variância unitária e fazendo com que as variáveis tenham uma mesma influência sobre o sistema. Deve ser utilizada quando se deseja atribuir o mesmo grau de importância para as variáveis em estudo. No autoescalamento, cada um dos teores de nitrato e nicotina nas amostras foram subtraídos de sua média, com divisão posterior por seu desvio padrão, conforme mostra a Equação 2 (CORREIA, 2007, NETO, 1998).

$$\text{Autoescalamento (as)} \quad x_{ij(as)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{S_j} \quad \text{Equação 2}$$

Onde $x_{ij(as)}$ significa o conjunto de informações autoescaladas (as) compostas de j variáveis em i amostras; x_{ij} simboliza o dado

avaliado pela equação; \bar{x}_j é o valor médio do conjunto para a variável j ; s_j expressa o desvio padrão.

A Tabela 7 apresenta os dados autoescalados da concentração de nitrato e nicotina em diferentes amostras.

Tabela 7: Dados autoescalados das concentrações de nitrato e nicotina nas amostras de tabaco seco ao natural (F), seco na estufa e macerado (FS), cigarros comerciais (C) e cigarros aromatizados (CA).

Concentração Amostras	[Nitrato]	[Nicotina]
F1	-0,94	0,48
F2	-1,49	-1,14
F3	-1,08	-1,27
FS1	-1,00	-0,51
FS2	-0,93	3,23
FS3	0,03	-0,45
FS4	-0,48	1,20
FS5	-0,49	-0,70
FS6	-0,64	-0,42
FS7	0,79	-0,62
FS8	0,59	-0,91
FS9	-0,18	-0,27
FS10	-0,08	-0,34
FS11	-0,82	0,65
FS12	1,78	0,76
FS13	0,12	-0,35
FS14	0,87	0,32
FS15	1,86	0,07
FS16	0,41	-0,12
FS17	1,66	0,41
C1	-0,23	-0,04
C2	-0,26	0,52
C3	1,34	1,66

C4	-0,32	0,60
C5	0,76	0,33
C6	1,01	-0,63
CA1	-0,53	-1,46
CA2	-1,76	-0,98

Através da Tabela 7 é possível aplicar diferentes tratamentos estatísticos que possibilitem uma avaliação secundária das variáveis no sistema.

4.4.2 Análise estatística univariada

Uma forma de se descrever e avaliar o comportamento de uma variável em determinado grupo de um conjunto maior é utilizar a estatística descritiva como forma de apresentar os dados do grupo utilizando formas gráficas. Para avaliação dos teores de nitrato e nicotina, nos grupos de amostras de fumos e cigarros comerciais, utilizou-se ferramentas gráficas estatísticas como histogramas, que permitem visualizar a distribuição das amostras em relação á uma distribuição gaussiana e o gráfico *box* e *whiskes* ou *boxplot*, que permite visualizar a mediana do conjunto numérico, além possibilitar a caracterização de possíveis amostras fora da distribuição média do conjunto de amostras

A análise descritiva conduzida pela correlação entre ambas às técnicas estatísticas foi utilizada como ferramenta no tratamento dos dados analíticos autoescalonados, a fim de promover uma análise descritiva, possibilitando a avaliação comparativa dos teores de cada um dos analitos em diferentes matrizes.

A avaliação da presença de nitrato no grupo de amostras de fumo seco e macerado e no grupo de amostras de cigarros comerciais apresentou semelhanças quanto aos teores apresentados e diferenças na distribuição, como mostram as Figuras 38 para a análise de nitrato em fumo e Figura 39 para a análise de nitrato em cigarro.

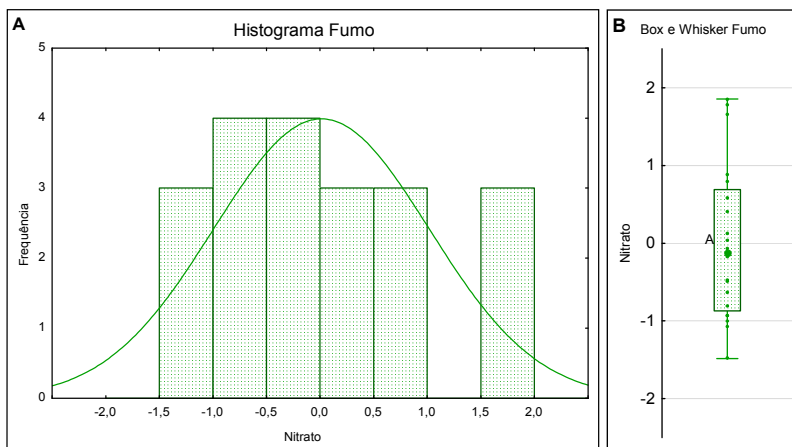


Figura 38: Análise descritiva para os dados autoescalados da concentração de nitrato em amostras de fumo. **A.** Histograma; **B.** Box e Whisker.

Através da avaliação da Figura 38A, percebemos primeiramente que este grupo de amostras não apresenta uma distribuição normal, conforme delimitada pela gaussiana traçada junto ao histograma. Além disso, é possível visualizar que o gráfico apresenta uma plataforma ou platô, caracterizando um grupo de amostras com teores divergentes entre si. Isto ocorre devido às diferentes médias de concentração que existem em um mesmo grupo, fazendo com que diferentes distribuições fiquem sobrepostas e gerem uma plataforma no lugar de um valor central de alta frequência.

O gráfico *box* e *whisker* apresentado na Figura 38B, complementa a descrição do sistema, mostrando que tanto a mediana quanto a "caixa", representativa de 50% dos valores do conjunto de dados em estudo, mostram uma tendência mais centralizada para o teor de nitrato nas amostras de fumo. Tal distribuição é inerente ao sistema vegetal, podendo apresentar certas variações, como mostrado pelo segmento de reta do limite superior, devido diferenças intrínsecas ao plantio e estocagem de cada espécie.

Apesar de não haver a correlação direta as diferenças de distribuição de nitrato nas amostras de fumo e de cigarro comercial estão atreladas a mistura de diferentes fumos e adição de uma série de compostos durante a fabricação do cigarro, bem como a falta de limite no teor deste componente nas amostras. A avaliação da Figura 39

colabora para a avaliação do sistema para diferentes tipos e marcas de cigarros.

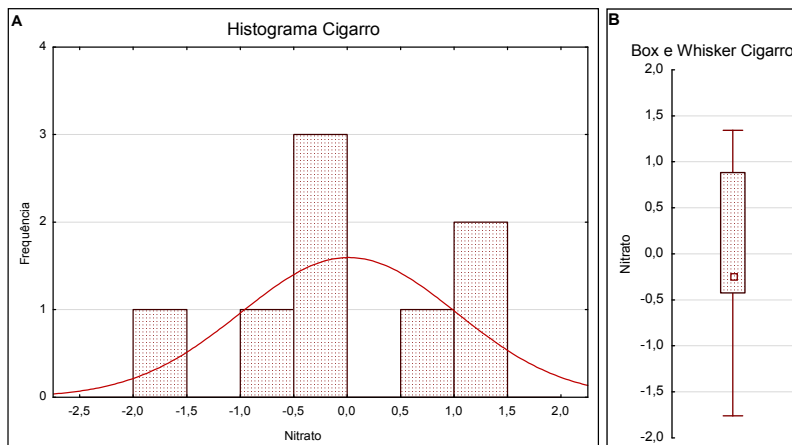


Figura 39: Análise descritiva para os dados autoescalonados da concentração de nitrato em amostras de cigarros comerciais e cigarros comerciais aromatizados. **A.** Histograma; **B.** Box e Whisker.

O histograma para a distribuição do nitrato em amostras de cigarros "light", "red" e aromatizados da Figura 39A, mostra uma distribuição que foge a normalidade do sistema, devido à divergência nos teores de nitrato do conjunto de amostras analisadas. Este resultado é reflexo do baixo controle nos teores de nitrato presentes nas amostras comercializadas, apresentando baixos teores para alguns tipos de amostras e altos teores para outros.

Esta falta de tendência é confirmada pelo gráfico da Figura 39B, que expressa a mediana do conjunto, porém com a distribuição da "caixa" para as amostras voltadas às concentrações superiores a média de nitrato na amostra e o segmento de reta indicando uma amostra com um valor bastante inferior, demarcando o limite inferior do gráfico.

Por fim, a análise descritiva do nitrato mostra sua constância em amostras vegetais, como era de se esperar, já que sua presença nas plantas é fator determinante para seu desenvolvimento, enquanto que nas amostras de produtos comerciais não há controle em seus níveis, podendo variar de acordo com a matriz em estudo.

Diferentes do nitrato, a análise de nicotina para os grupos de amostras de fumo e de amostras comerciais apresentou distribuição semelhante. Porém, o teor relativo de nicotina presente nas amostras comerciais é cerca de metade do teor apresentado pelas amostras de fumo, conforme observado na análise de amostras de fumo na Figura 40 e para amostras de produtos comerciais na Figura 41.

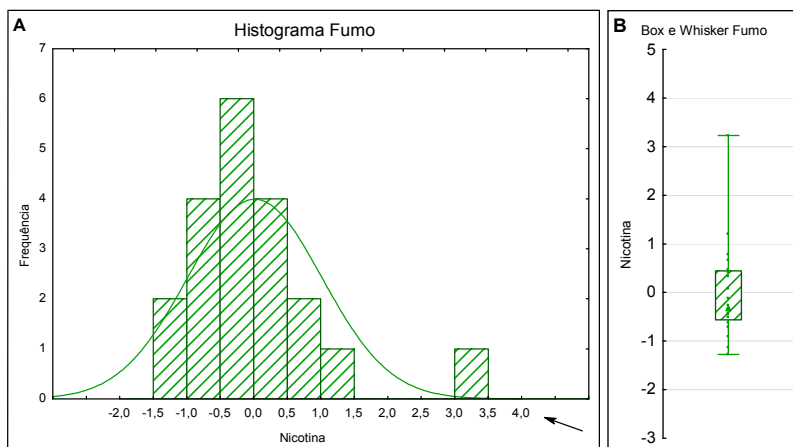


Figura 40: Análise descritiva para os dados autoescalados da concentração de nicotina em amostras de fumo. **A.** Histograma; **B.** Box e Whisker.

Na Figura 40A, o histograma da nicotina para as 20 amostras de fumo, exibe uma distribuição próxima à gaussiana para as amostras de fumo, com uma amostra dispersa da normalidade, apresentando teores elevados de nicotina. Esta distribuição é resultado da modulação da nicotina, devido aos teores irregulares de seus precursores na planta. Já o alto teor de nicotina pode significar uma espécie vegetal com maior teor do alcaloide ou simplesmente uma amostra dispersa do conjunto.

O gráfico *box e whisker* da Figura 40B mostra uma baixa dispersão da "caixa" ao redor da média relativa do sistema. Porém, devido à presença do valor divergente à distribuição normal, seu limite superior ficou bastante separado dos demais dados do conjunto.

O teor de nicotina nas amostras de cigarros industrializados pode ser analisado através da Figura 41. Sua concentração pode variar de acordo com as marcas e tipos de cigarros.

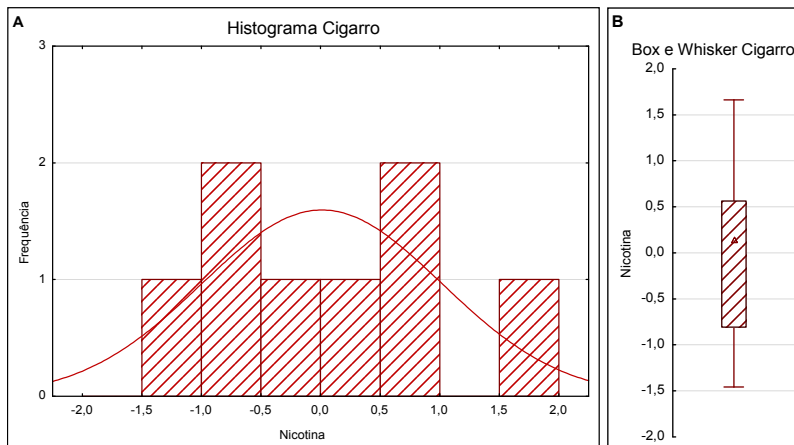


Figura 41: Análise descritiva para os dados autoescalados da concentração de nicotina em amostras de cigarros comerciais e cigarros comerciais aromatizados. **A.** Histograma; **B.** Box e Whisker.

A Figura 41A apresenta o histograma de diferentes amostras de cigarro comercial e cigarro comercial aromatizado. Análogo à distribuição da nicotina nas amostras de fumo, as amostras comerciais apresentaram distribuição com fuga da normalidade, com uma tendência a formação de dois picos, simbolizando médias diferentes, devida possíveis variações de concentração nos cigarros. Isto ocorre pela presença de amostras de cigarro "lights" e amostras de cigarro aromatizado com baixos teores relativos de nicotina, seguidos dos cigarros com alto teor de nicotina em relação ao conjunto de amostras.

O gráfico *boxplot* das amostras comerciais, Figura 41B, apresenta sua caixa com 50% dos valores do conjunto com baixa dispersão ao redor da média, porém com um limite superior significativo, devido à amostra fora da normalidade do conjunto analisado. Com o auxílio destes gráficos pode-se visualizar uma possível semelhança na composição relativa de nicotina dos diferentes tipos de cigarros.

4.4.3 Análise estatística multivariada

Uma avaliação multivariada dos dados autoescalados permite a plotagem de gráficos de dispersão e componentes principais de ambas as variáveis, apontando possíveis correlações entre as variáveis.

Através da construção de gráficos de dispersão, também chamados de *scatterplot*, é possível estabelecer uma comparação entre as variáveis do sistema para avaliar qualquer possível correlação entre elas. Para isto, na construção do gráfico, o eixo horizontal deve expor a variável causa, enquanto que o eixo vertical descreve a variável consequência. A Figura 42 apresenta o gráfico de dispersão para o conjunto de amostras de fumo, onde os segmentos de reta tracejados representam os limites de distribuição normal com intervalo de confiança de 95% para o conjunto.

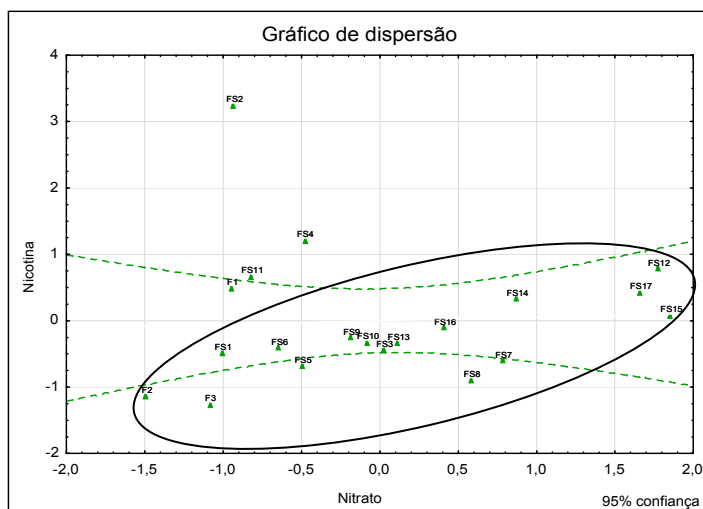


Figura 42: Gráfico de dispersão para o grupo de amostras de fumo (folhas de tabaco - F1 a F3 e extrato seco de tabaco - FS1 a FS17). Dados autoescalados da concentração de nitrato e nicotina nas amostras.

O grupo de amostras de fumo contido no interior da elipse no gráfico da Figura 42 apresenta linearidade crescente com aumento na concentração de nicotina, de acordo com o aumento no teor de nitrato. É

possível observar também a presença de um pequeno agrupamento de amostras com teor maior de nicotina, encontrando-se fora deste grupo linear uma amostra denominada *outlier* do grupo que apresenta concentrações de nicotina abaixo da média para o teor de nitrato expresso, fazendo com que o intervalo de confiança descrito para o conjunto seja deslocado para níveis superiores de nicotina.

Outro parâmetro pra descrever o conjunto de dados é a força do conjunto de dados, que descreve quão forte é a relação entre a variável causa, o nitrato, e a variável consequência, a nicotina. A faixa linear do conjunto apresenta força considerável, com algumas amostras mais dispersas para níveis inferiores de concentrações nesta faixa. Essa dispersão pode estar relacionada com as condições de plantio ou estocagem, fazendo com que parte das amostras apresente teores inferiores de nicotina para o teor de nitrato relacionado.

O gráfico de dispersão da Figura 43 apresenta os dados autoescalonados de sua composição de nitrato e nicotina em amostras industrializadas como cigarros comerciais, cigarros comerciais aromatizados, adesivo transdérmico e goma de mascar contendo nicotina. Novamente os segmentos de reta apresentam os limites de distribuição normal, com intervalo de confiança de 95%.

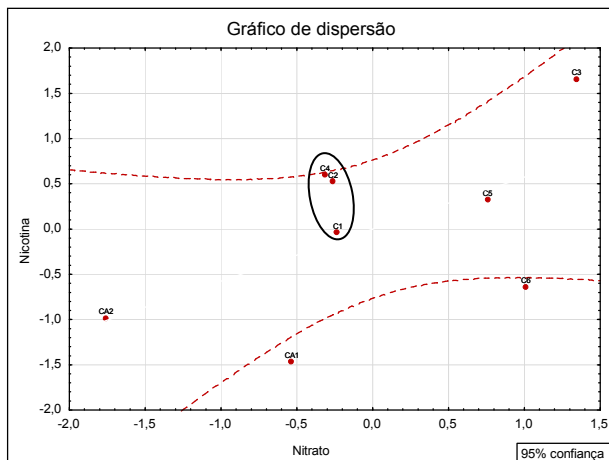


Figura 43: Gráfico de dispersão para o grupo de amostras de produtos industrializados (cigarros comerciais - C1 a C4; cigarros comerciais aromatizados - CA1 e CA2; adesivo transdérmico para uso em TRN e goma de mascar contendo nicotina. Dados autoescalonados da concentração de nitrato e nicotina nas amostras.

Para o conjunto de amostras de produtos industrializados, o estudo do gráfico de dispersão da Figura 43 é possível perceber um certo agrupamento nas amostras de cigarro "red" C2 e C4, simbolizando semelhanças nos teores relativos de nitrato e nicotina nestas amostras. As demais amostras não apresentam agrupamento.

O gráfico mostra também que o conjunto de dados apresenta-se disperso e com fraca correlação entre as variáveis, como é o caso das amostras C1 e C6 que são amostras de cigarros "lights" e estão bastante afastadas devido o teor de nitrato em suas composições. Esta conclusão era esperada já que as matrizes vegetais são utilizadas na fabricação dos cigarros e sofrem a adição de diferentes compostos, modificando sua composição relativa de nitrato e nicotina no produto final.

Através dos dados autoescalados do teor de nitrato e nicotina nas amostras de fumo e produtos industrializados, foi procedido o estudo de análise de componentes principais, com o objetivo de complementar o estudo de dispersão dos dados com a análise de 100% das informações do sistema, facilitando a visualização e interpretação das relações entre as variáveis do sistema, conforme a Figura 44.

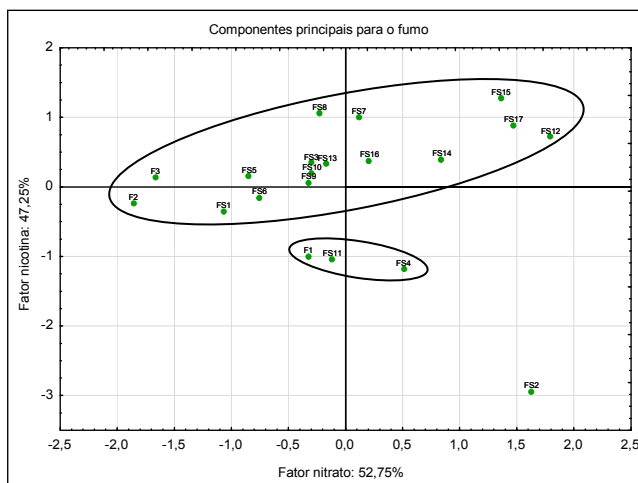


Figura 44: Gráfico de análise de componentes principais para o grupo de amostras de fumo (folhas de tabaco - F1 a F3 e extrato seco de tabaco - FS1 a FS17). Dados autoescalados da concentração de nitrato e nicotina nas amostras.

A Figura 44 mostra que a variância do sistema está bem distribuída entre as duas variáveis, apresentando 52,75% da variância atrelada à concentração de nitrato e 47,25% atrelada à concentração de nicotina nas folhas e extratos secos de fumo. Isto significa que o teor de ambos os analitos apresenta a mesma importância na distribuição do grupo no espaço amostral.

Complementando o gráfico da Figura 42, a Figura 44 mostra a existência de um padrão de distribuição para as amostras de fumo em relação às concentrações de nitrato e nicotina nas plantas das espécies de tabaco analisadas, mostrando uma pequena elevação no teor de nicotina em função da elevação na concentração de nitrato distribuído na amostra. Além disso, pode-se observar um agrupamento menor fora do conjunto linear e o extrato de fumo seco FS2, que aparece novamente como o *outlier* do grupo de amostras.

Para o conjunto de amostras de produtos industrializados, os dados apresentados no gráfico de análise de componentes principais da Figura 45 mostram forte dispersão, devido as diferenças nas composições de cada produto durante sua fabricação.

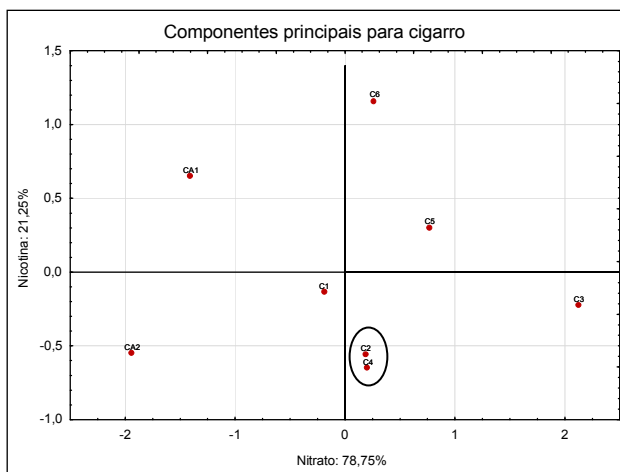


Figura 45: Gráfico de análise de componentes principais para o grupo de amostras de produtos industrializados (cigarros comerciais - C1 a C4; cigarros comerciais aromatizados - CA1 e CA2; adesivo transdérmico para uso em TRN e goma de mascar contendo nicotina. Dados autoescalados da concentração de nitrato e nicotina nas amostras.

No gráfico da Figura 45 pode-se atribuir mais de 78% da variância do sistema aos teores de nitrato nas amostras de cigarros, com aproximadamente 21% da variância estando atrelada aos teores de nicotina para os cigarros e demais amostras.

Assim como descrito no gráfico de dispersão da Figura 43, o conjunto de amostras de produtos industrializados não apresenta um padrão específico de distribuição no sistema analisado, devido a sua composição variada. Porém, no gráfico da Figura 45 é possível atribuir novamente o agrupamento das amostras de cigarro C2 e C4.

5 CONCLUSÃO

A metodologia eletroforética desenvolvida para a determinação simultânea de ânions inorgânicos de alta mobilidade e cátions inorgânicos apresentou tempos de análise reduzidos. Além disso, os resultados gráficos apresentaram boa simetria para o nitrato e simetria satisfatória para a nicotina, boa resolução, com baixo ruído e boa detectabilidade.

A avaliação da metodologia confirmou a linearidade do método para a quantificação de ambos os analitos, com coeficiente de correlação superior a 0,999 e sua precisão com coeficiente de variação inferior a 10%, em todos os ensaios.

O estudo de extração apresentou valores de extração independentes dos volumes de solução extratora, porém os tempos de extração mostraram-se elevados para a completa extração de nicotina nas amostras. Novos procedimentos de extração devem ser testados para cada tipo de amostra, visando otimizar o tempo total de análise e aumentar a frequência analítica da metodologia para sua aplicação satisfatória.

A utilização de softwares como o Statistica foi essencial para a aplicação de tratamentos estatísticos. Durante o tratamento estatístico dos dados, ferramentas estatísticas possibilitaram a análise conjunta das amostras, sendo possível a identificação de possíveis agrupamentos de tipos de cigarro comercial dentro de um sistema, além de possibilitar o estudo de perfis relacionados ao teor proporcional dos analitos presentes nas amostras de tabaco, facilitando a visualização e interpretação de conjunto de dados diversos.

REFERÊNCIAS

ACT – ALIANÇA DE COMBATE AO TABAGISMO. **A história do tabaco**. Disponível em: <<http://actbr.org.br/tabagismo/historico.asp>> Acesso em: 19 jan. 2012.

ALONSO, S. González; MONTERO, Y. Valcárcel J.C.; CATALÁ, M. Nicotine occurrence in bottled mineral water: Analysis of 10 brands of water in Spain. **Science of the Total Environment**, 2011.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Cigarro eletrônico**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/derivadostabaco>> Acesso em: 11 jan. 2012.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Registro de Produto Fumígeno**: dados cadastrais: relação de marcas de cigarros, 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 11/01/2012.

BARCELLOS, Michelle. **Otimização da separação eletroforética de flavonóides em extratos vegetais e cosméticos**. Trabalho de conclusão de curso da Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

BARROS, D.M. et al. The benefits and drawbacks of nicotine exposure in the cortex and hippocampus of old rats. **NeuroToxicology**, n. 28, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. **Tabaco e pobreza, um círculo vicioso** - a convenção-quadro de controle do tabaco: uma resposta. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. **A Anvisa na redução do tabagismo**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anvisa_reducao_tabagismo.pdf> Acesso em: 19 jan. 2012.

BRASIL. Secretaria da Receita Federal. **Preço mínimo de cigarros.**

Disponível em:

<<http://www.receita.fazenda.gov.br/DestinacaoMercadorias/ProgramaNacCombCigarroIlegal/PrecoMinimoCigarros.htm>> Acesso em: 15 jan. 2012.

BRASIL. Secretaria da Receita Federal. **Produção de cigarros no**

Brasil. Disponível em:

<<http://www.receita.fazenda.gov.br/DestinacaoMercadorias/ProgramaNacCombCigarroIlegal/Producao.htm>> Acesso em: 15 jan. 2012.

BREDEMEIER, Christian; MUNDSTOCK, Claudio Mario. Regulação da absorção e assimilação de nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2. Santa Maria, 2000. Disponível em:<

<http://www.scielo.br/pdf/cr/v30n2/a29v30n2.pdf>> Acesso em: 10 jan. 2012.

CALLICUTT, C.H. et al. The role of ammonia in the transfer of nicotine from tobacco to mainstream smoke. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. V. 46, p. 1-17, 2006.

CONCEIÇÃO, Gleice Margarete de Souza et al. **Noções básicas de estatística.** In: Curso de capacitação em epidemiologia básica e análise da situação de saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apostila_estatistica.pdf> Acesso em: 01 jan 2012.

CORREIA, P. R. M. et al. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, p.481-487, 2007.

CUNHA, Gilmar Holanda et al. Nicotina e tabagismo. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, vol. 1, n. 4, out/dez 2007.

FÉDÉRATION FRANÇAISE DE CARDIOLOGIE. **Refuser le Tabac.** In: Un coeur sans tabac Disponível em: <<http://www.fedecardio.com/pr%C3%A9vention/un-coeur-sans-tabac>> Acesso em: 01 nov 2011.

FIGUEIREDO, E. C., DE OLIVEIRA, D. M., et al. On-line molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, 2009.

GARRIGUES, J. M., PEREZ-PONCE, A., et al. Fourier-transform infrared determination of nicotine in tobacco samples by transmittance measurements after leaching with CHCl_3 . **Analytica Chimica Acta**. v. 373, 1998

GUILLÉN-CASLA, V. et al. Principal component analysis (PCA) and multiple linear regression (MLR) statistical tools to evaluate the effect of E-beam irradiation on ready-to-eat food. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p.456-464, 2011.

HEIGER, David. **High performance capillary electrophoresis: An introduction**. Agilent Technologies, 2000. Disponível em: <<http://www.colby.edu/chemistry/CH332/laboratory/Agilent%20CE%20Primer.pdf>>. Acesso em: 12 dez 2012.

HELALI, N. Capillary zone electrophoresis method for the determination of famotidine and related impurities in pharmaceuticals. **Talanta**, v. 74, p. 694, 2008.

HIROKAWA, T. KISO, Y. Complex-forming equilibria in isotachopheresis. - III. Estimation of optimum separation conditions of several organic acids by means of computer simulation. **Journal of Chromatography**. v. 257, p. 197-210, 1983.

HOPPER, K. G., LECLAIR, H., MCCORD, B. R. A novel method for analysis of explosives residues by simultaneous detection of anions and cations via capillary zone electrophoresis. **Talanta**. v. 67, 2005.

HUANG, H., HSIEH, S. Analyses of tobacco alkaloids by cation-selective exhaustive injection sweeping microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1164, 2007.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios: Tabagismo/2008**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009.

INCA. **Tabagismo: Dados e numeros.** Disponível em:

<<http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=dadosnum&link=mundo.htm>> Acesso em: 01 nov 2011.

INMETRO. **Metrologia científica.** Disponível em:

<<http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mrc.asp>> Acesso em: 14 jan. 2012.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** DOQ-CGCRE-008. Revisão 01, mar. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Global adult tobacco survey Brazil 2008.** Rio de Janeiro: INCA, 2010. Disponível em:

<http://www.who.int/tobacco/surveillance/en_tfi_gats_2010_brazil.pdf> Acesso em: 18 jan 2012.

KUBÁŇ, P., KUBÁŇ, P., KUBÁŇ, V. Simultaneous capillary electrophoretic separation of small anions and cations after complexation with ethylenediaminetetraacetic acid. **Journal of Chromatography A.** v. 836, 75-80, 1999.

KÖHLER, Angela; PIRK, Christian W.W.; NICOLSON, Susan W. Honeybees and nectar nicotine: Deterrence and reduced survival versus potential health benefits. **Journal of Insect Physiology**, n. 58, 2012.

LANDERS, James. **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques.** 3^a ed., Ed. CRC Press, 1997.

LEYDEN, Donald E.; LEITNER, Erich; SIEGMUND, Barbara. Determination of nicotine in pharmaceutical products and dietary sources. In: GORROD, John W.; JACOB III, Peyton (Ed.). **Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites.** Amsterdam: Elsevier, 1999.

LIANG, Y. Z. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B.** v. 812, p.56-57, 2004.

LOCHMANN, H. et al. Determination of tobacco alkaloids in single plant cells by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, n. 917, Germany: Elsevier, 2001.

LOURENÇO, M. G., MATOS, A., OLIVEIRA, M. C. Gas-liquid chromatographic determination of major tobacco alkaloids. **Journal of chromatography A**. v. 898, 235-243, 2000.

MANTOVANI, J. R., CRUZ, M. C. P., et al. Comparação de procedimentos de quantificação de nitrato em tecido vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 40, p. 53-59, 2005.

MICKE, G. A., COSTA, A. C. O., et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol - Total analysis time reduction strategies. **Journal of Chromatography A**. v. 1216, p. 7957-7961, 2009.

MILLER, E. I., NORRIS, H. K. et al. A novel validated procedure for the determination of nicotine, eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v. 878, p. 725-737, 2010.

MULLER, C., BRACHER, F., PLOSSL, F., Determination of nicotine in dried mushrooms by using a modified QuEChERS approach and GC-MS-MS. **Chromatographia**. v. 73, p. 807-811, 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Scatter plot**. In: Engineering Statistic Handbook. Disponível em: <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda33q.htm>> Acesso em: 01 jan 2012.

NETO, B. B. et al. 25 Anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, p.1401-1406, 2006.

NETO, José Machado Moita; MOITA, Graziella Ciaramella. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, p.467-469, 1998.

OBSERVATÓRIO DA POLÍTICA NACIONAL DE CONTROLE DO TABACO. **Preços e impostos**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/observatorio_controle_tabaco/site/status_politica/precos_impostos> Acesso em: 23 jan. 2012.

PAKHALE, S. S., MARU, G. B. Distribution of major and minor alkaloids in tobacco, mainstream and sidestream smoke of popular Indian smoking products. **Food and Chemical Toxicology**. v. 36, p1131-1138, 1998.

PATENTE ONLINE. **Redução de nitrosaminas em tabaco e em produtos de tabaco**. Disponível em:

<<http://www.patentesonline.com.br/reducao-de-nitrosaminas-em-tabaco-e-em-produtos-de-tabaco-135714.html>> Acesso em 03 jan. 2012.

PATENTE ONLINE. **Método de preparação de um material de tabaco com níveis reduzidos de lignina e de compostos nitrogenados**.

Disponível em: <<http://www.patentesonline.com.br/metodo-de-preparacao-de-um-material-de-tabaco-com-niveis-reduzidos-de-lignina-e-de-55064.html>> Acesso em 03 jan. 2012.

PATENTE ONLINE. **Processo para tratar tabaco, aparelhagem para extração de nitrosaminas e produto obtido**. Disponível em:

<<http://www.patentesonline.com.br/processo-para-tratar-tabaco-aparelhagem-para-extracao-de-nitrosaminas-e-produto-obtido-83599.html>> Acesso em 03 jan. 2012.

PATENTE ONLINE. **Métodos de produção de um material de fumar e um material contendo tabaco com níveis reduzidos de compostos nitrogenados**. Disponível em:

<<http://www.patentesonline.com.br/metodos-de-producao-de-um-material-de-fumar-e-um-material-contendo-tabaco-com-niveis-27618.html>> Acesso em 03 jan. 2012.

PATENTE ONLINE. **Desnitração termófila de tabaco**. Disponível em: <<http://www.patentesonline.com.br/desnitracao-termofila-de-tabaco-34142.html>> Acesso em 03 jan. 2012.

PIOVEZAN, M., COSTA, A. C. de O, et al. Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples. **Analytica Chimica Acta**. v. 673, p. 200-205, 2010.

POGOCKI, Dariusz et al. Application of nicotine enantiomers, derivatives and analogues in therapy of neurodegenerative disorders. **European Journal of Pharmacology**, n. 563, 2007.

PROERB – PROGRAMA EDUCACIONAL DE RESISTÊNCIA ÀS DROGAS. **Anvisa proibiu**. Disponível em:

<<http://www.proerdbrasil.com.br/drogas/drogas.htm>> Acesso em: 11 jan. 2012.

RALAPATI, S. Capillary electrophoresis as an analytical tool for monitoring nicotine in ATF regulated tobacco products. **Journal of Chromatography B**. v. 695, p. 117-129, 1997.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

RIPIN, D.H.; EVANS, D.A. **pKa's of Inorganic and Oxo-Acids**.

Disponível em:

<http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/MechOMs/evans_pKa_table.pdf> Acesso em: 25 jan. 2012.

RIZZIERI, Juarez. **A demanda brasileira de cigarros e o efeito da restrição para a veiculação de sua publicidade em meios de comunicação em massa**. Texto para discussão nº 11. São Paulo: FIPE, 2008. Disponível em:

<http://www.fipe.org.br/web/publicacoes/discussao/textos/texto_11_2008.pdf> Acesso: 18 jan. 2012.

ROSEMBERG, José. **Nicotina, droga universal**. São Paulo: Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica; 2003. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/nicotina.pdf>> Acesso em: 10 jan. 2012.

RUIZ, Juan M. et al. **Role of CaCl₂ in nitrate assimilation in leaves and roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.)**. Life Sciences, n.141. United States: Elsevier, 1999.

SANTOS, Sérgio Honorato dos. **Obrigado por não fumar: o cigarro não é sublime**. Ed. atual. e ampl. Rio de Janeiro: Editora Senac Rio, 2007. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=hr6BSd7-g4MC&printsec=frontcover&dq=obrigado+por+n%C3%A3o+fumar&hl=pt-BR&sa=X&ei=IO8VT4_4MIHAgAf94fjIAw&ved=0CDsQ6AEwAA#v>

=onpage&q=obrigado%20por%20n%C3%A3o%20fumar&f=false>
Acesso em: 12 jan. 2012.

SHRIVAS, K., PATEL, D. K., Liquid-phase microextraction combined with gas chromatography mass spectrometry for rapid determination of nicotine in one-drop of nighthshades vegetables and commercial food products. **Food Chemistry**. v. 122, p. 314-318, 2010.

SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.

SILVA, Kiriaki Nurit. Estudo farmacobotânico de folhas de *Nicotiana glauca* (*Solanaceae*). **Latin American Journal of Pharmacy**, n. 26, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. **Princípios de análise instrumental**. Tradução de Ignez Caracelli [et al.] 5. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 30.

SOUZA CRUZ. **História do tabaco**. Disponível em:
<<http://www.souzacruz.com.br/>> Acesso em: 10 jan. 2012.

SOUZA CRUZ. **Como é fabricado o cigarro?** Disponível em:
<<http://www.souzacruz.com.br/>> Acesso em: 19 jan. 2012.

STATTREK.COM. **AP statistics tutorial: scatterplots**. Disponível em:
<<http://stattrek.com/ap-statistics-1/scatterplot.aspx>> Acesso em: 01 jan 2012.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, p.173-180, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p.493-498, 1997.

TAVARES, M. F. M., COLOMBARA, R. e MASSARO, S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis. Evaluation of electrolyte systems for anion analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 772, 1997.

TAYLOR, George T.; MALONEY, Susan. Gender differences and the role of estrogen in cognitive enhancements with nicotine in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2009.

TORRES, Blancard Santos. **Tabagismo: o que você precisa saber**. Pernambuco: UFPe, 2005. Disponível em: <<http://books.google.com.br/>> Acesso em: 17 jan. 2012.

URBONAVIČIŪTŪ, A. et al. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 339-341, 2006.

VEJA.COM. **Componentes do cigarro prejudiciais à saúde**. 07 ago. 2009. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/noticia/saude/componentes-cigarro-prejudiciais-saude>> Acesso em: 11 jan. 2012.

VILAS BOAS, Olinda Maria Gomes da Costa. **Farmacologia**. Alfenas/MG, 2004. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/20531383/Farmacodinamica-farmacocinetica>> Acesso em: 13 jan. 2012. (Apostila).

VITALI, L., FÁVERE, V. T., MICKE, G. A. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, 2327–2333, 2011.

VITALI, L., HORST, B. L., et al.. Using multiple short-end injections to develop fast electrophoretic separations - Applications in iodide analysis. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, 2011.

WEI, Xiaochen et al. **Identification and synthesis of novel alkaloids from the root system of *Nicotiana tabacum***: affinity for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Life Sciences, n.78. United States: Elsevier, 2005.

WEIDNER, Manfred at al. Uptake, transport and accumulation of nicotine by the Golden Potho (*Epipremnum aureum*): the central role of root pressure. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, 2005.

WILLIAMS, R. **pKa data compiled**. Disponível em:
<http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf> Acesso em: 25 jan. 2012.

WILLITS, C. O., SWAIN, M. L. et al. **Spectrometric determination of nicotine**. Agricultural Research Service - Eastern Regional Research Center. Disponível em: <http://wyndmoor.arserrc.gov/Page/1950/448.pdf>. Acesso em 08 fev. 2012.

YANG, S. S., SMETENA, I., GOLDSMITH, A. I., Evaluation of micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of selected tobacco alkaloids. **Journal of Chromatography A**. v. 746, p. 131-136, 1996.