

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



DETERMINACIÓN DE NITRATO Y NITRITO EN TABACO SIN HUMO (CHIMÓ)

MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA IÓNICA

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por el Br. Jesús Agustín Valdivieso Saldivia, para optar por el título de Licenciado en Química, opción Tecnología.

Tutor:
Dr. Luis Gómez

Caracas, octubre de 2012.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“DETERMINACIÓN DE NITRATO Y NITRITO EN TABACO SIN HUMO (CHIMÓ) MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA IÓNICA”** presentado por el Br. Jesús Agustín Valdivieso Saldivia, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Luis Gómez
(Tutor)

Lic. Gustavo Pérez
(Jurado)

Dra. Rosa Amaro
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de este trabajo especial de grado ha sido uno de los logros más importantes de mi vida, por todo el tiempo invertido, aprendizaje logrado y sobre todo porque culmina mi etapa como bachiller y me convierte en licenciado en química.

Es una gran satisfacción y de gran orgullo haber estudiado en la Universidad Central de Venezuela, la casa que vence las sombras, que sin dudas es una de las mejores de todo el país. Parece ayer, cuando en septiembre de 2007 comencé a estudiar en la Facultad de Ciencias. Recuerdo todas las dificultades que pase durante mi primer semestre, sin embargo fui persistente y constante, lo que me permitió llegar a este punto a pesar de todos los obstáculos y dificultades.

No estuviese aquí, de no ser por el apoyo de toda mi familia durante estos años, en especial mi padre Gonzalo, madre Luzmila y hermano Gonzalo. Gracias por la compañía y apoyo de mis amigos, que estuvieron gran parte de estos años conmigo, en especial Francisco, Gregory, Stefanie, Nelson, Yennifer y Zolibetmar.

A todos los miembros del CQA, con los que siempre pude contar, en especial a Jackdin, Eloy, Fabi, Niwdy, María José y Oriana. A Laura y Ariday por su presencia y apoyo durante todo el tiempo que estuve en el Centro. Mil gracias a mis compañeros preparadores de instrumental, laboratorio de analítica y a todas esas personas, que a pesar que no menciono, siempre recordaré.

Por supuesto, que nunca podré olvidar al Profesor Chirinos y Profesora María de los Ángeles, el primero, que fue el que aumentó mi interés hacia la química analítica, haciéndola una de mis materias favoritas, mientras que la segunda, que fue la que me siguió incentivando en esta área, me permitió entrar al CQA y aprendí mucho con ella como preparador. También tengo que agradecer al Profesor Golding, por

ser excelente persona conmigo y porque aprendí mucho como preparador suyo por más de 2 años.

Siempre recordaré y estaré eternamente agradecido con mi tutor Luis Gómez, por su excelente tutoría durante este TEG. Por su paciencia conmigo y apoyo prestado. A mis dos jurados: el Profesor Gustavo y la Profesora Rosa, que más que eso, fueron unas excelentes personas conmigo y siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

RESUMEN

En los últimos años, el consumo de tabaco se ha incrementado en el mundo notablemente, ocupando una alta posición en el mercado en cuanto a su producción. El tabaquismo en la actualidad se ha convertido en un problema de salud pública, causando aproximadamente 5,4 millones de muertes al año. El tabaco está constituido por una mezcla de compuestos químicos, entre los cuales, los más importantes son los alcaloides, que son los componentes activos responsables de la adicción y las nitrosaminas, que son compuestos potencialmente cancerígenos, formados mediante la reacción conocida de N-nitrosación, que involucran aminas secundarias (nicotina, nor nicotina, anabasina, anatabina, etc), en presencia de nitrato o nitrito en medio ácido.

La manera más popular del consumo del tabaco es la inhalación de sus gases (fumado en forma de puros o cigarrillos), pero también puede ser inhalado por absorción nasal del tabaco pulverizado o absorción bucal por masticación, éstos dos últimos hábitos son conocidos como tabaco sin humo. El más comúnmente empleado en nuestro país es el chimó, el cual ha ido en aumento constante en los últimos 15 años, pasando de ser un hábito rural a incursionar con fuerza en las ciudades.

A pesar de que en los últimos años se han creado muchas restricciones para los cigarrillos, para el chimó no se disponen de normas regulatorias que pudieran controlar o dar información de los componentes químicos del chimó. Es por esta razón, que el Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela con el Instituto Nacional de Higiene, Rafael Rangel, han elaborado un proyecto para el desarrollo de métodos analíticos, hacia la futura caracterización química de los diferentes tipos de chimó de producción nacional. En el caso particular del presente trabajo, el objetivo consistió en desarrollar un método para la determinación por cromatografía iónica de nitrito y nitrato en chimó, como precursores en la formación de nitrosaminas.

En cuanto a la metodología de tratamiento de muestra, se desarrolló un método, que facilitó la fácil disgregación de la muestra y no hubo necesidad de pasos previos de limpieza. El tiempo total de análisis fue de tres horas por muestra.

Mediante la metodología desarrollada no se logró determinar el nitrito, debido a una fuerte interferencia en su banda. Mientras que para el nitrato arrojó una buena reproducibilidad y exactitud, medidas en función del coeficiente de variación y el porcentaje de recuperación respectivamente. Los resultados obtenidos en las diferentes marcas de chimó de producción nacional arrojaron valores de nitrato entre 1 y 3,5 %.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	- 9 -
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	- 2 -
II.1. Aspectos Generales del Tabaco.....	- 2 -
II.1.1. El Tabaco y el Tabaquismo.....	- 2 -
II.1.2. Historia del Tabaco en Venezuela.....	- 5 -
II.1.3. Tabaco sin Humo.....	- 8 -
II.1.3.1. Tipos de Tabaco sin Humo.....	- 10 -
II.1.4. El Chimó.....	- 11 -
II.1.5. Componentes del Chimó.....	- 13 -
II.2. Generalidades del Nitrato y Nitrito.....	- 17 -
II.2.1. Función en la naturaleza y Aplicaciones.....	- 17 -
II.2.2. Ingestión y Riesgos Tóxicos.....	- 19 -
II.2.3. Las Nitrosaminas.....	- 22 -
III. JUSTIFICACIÓN.....	- 24 -
IV. ANTECEDENTES.....	- 25 -
V. OBJETIVOS.....	- 34 -
VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	- 36 -
VI.1. Materiales y Equipos utilizados.....	- 36 -
VI.1.1. Equipos.....	- 36 -
VI.1.2. Reactivos Utilizados.....	- 40 -
VI.2. Acondicionamiento del Cromatógrafo Iónico y Condiciones Cromatográficas Preliminares.....	- 42 -
VI.2.1. Columna de Intercambio Aniónico IonPac AS4A-SC (2 x 250) mm.....	- 42 -
VI.2.2. Columna de Intercambio Aniónico IonPac AS4A-SC (4 x 250) mm.....	- 45 -

VI.2.3. Columna de Intercambio Aniónico IonPac AS11 (4 x 250) mm	- 46 -
<i>VI.4. Elaboración de la Curva de Calibración</i>	- 56 -
<i>VI.5. Método de tratamiento de muestra</i>	- 60 -
VI.5.1. Etapa de disgregado de la muestra y extracción del analito	- 61 -
VI.5.2. Etapa de extracción en fase sólida (SPE).....	- 63 -
VI.5.3. Optimización del tiempo de extracción asistida con ultrasonido	- 65 -
VI.5.4 Parámetros de calidad de la metodología completa de extracción-medida cromatográfica.....	- 67 -
<i>VI.6. Determinación de la concentración de nitrato en chimó</i>	- 69 -
VII. <i>DISCUSIONES</i>	- 72 -
VIII. <i>CONCLUSIONES</i>	- 74 -
IX. <i>RECOMENDACIONES</i>	- 78 -
X. <i>APÉNDICE</i>	- 79 -
<i>X.1. Términos desconocidos</i>	- 79 -
<i>X.2. Conceptos Analíticos</i>	- 81 -
X.2.1. Liofilización	- 81 -
X.2.2. Extracción	- 82 -
X.2.3. Instrumentación	- 85 -
XI. <i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	- 90 -

I. INTRODUCCIÓN

El tabaco lo consumen más de 1.300 millones de personas en todo el mundo, en el siglo XX causó la muerte de más de cien millones y durante el siglo XXI podría ocasionar el fallecimiento a más de un billón. Por el tabaquismo, aproximadamente 5,4 millones de personas mueren al año, más que la malaria, el VIH/SIDA y la tuberculosis juntos ^[1,2].

La manera más popular del consumo del tabaco es la inhalación de sus gases (fumado en forma de puros o cigarrillos), pero también puede ser inhalado por absorción nasal del tabaco pulverizado o absorción bucal por masticación, éstos dos últimos hábitos son conocidos como tabaco sin humo. El más comúnmente empleado en nuestro país es el chimó, el cual ha ido en aumento constante en los últimos 15 años, pasando de ser un hábito rural a incursionar con fuerza en las ciudades.

Uno de los compuestos potencialmente cancerígenos del tabaco y sus derivados son las nitrosaminas, las cuales se forman mediante la reacción conocida de N-nitrosación que involucran aminas secundarias (nicotina, nornicotina, anabasina, anatabina, etc), en presencia de nitrato o nitrito en medio ácido ^[3].

La siguiente investigación, formó parte de un proyecto integral del Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela con el Instituto Nacional de Higiene, Rafael Rangel, para el desarrollo de métodos analíticos, hacia la futura caracterización química de los diferentes tipos de chimó de producción nacional. En el caso particular del presente trabajo, el objetivo consistió en desarrollar un método para la determinación de nitrito y nitrato en chimó, como precursores en la formación de nitrosaminas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Aspectos Generales del Tabaco

II.1.1. El Tabaco y el Tabaquismo

El Tabaco es una planta herbácea de cosecha anual (*Nicotiana Tabacum*), del género *Nicotiana*, una de las divisiones más grandes de la familia de las Solanáceas (las Solanáceas incluyen las plantas de papas, pimienta y la belladona). Mide hasta dos metros de altura, posee una raíz fibrosa, con tallo cilíndrico vellosos, herbáceo y suave en la parte superior de la planta, con abundante tejido secundario o madera; tiene hojas alternas, grandes y estrechas en la base (Figura 1). Toda la planta tiene un olor fuerte debido a la nicotina, por consiguiente tiene propiedades narcóticas. [4, 5, 6]



Figura 1. Planta *Nicotiana Tabacum*

Se dice que su nombre proviene del idioma de los antiguos habitantes de Haití, ya que los indígenas caribeños denominaban como “Tobago” a una especie de pipa o caña alargada que utilizaban para fumar. Por otra parte, según el etimólogo español Joan Corominas, antes del descubrimiento del nuevo continente, las palabras de origen árabe “tabacco” y “atabaca” eran utilizadas en Europa, sobre todo en España e Italia, para nombrar diversas hierbas con efectos somníferos. Esto último resulta más verosímil, ya que los conquistadores españoles notaron que los indígenas antillanos usaban el tabaco para marearse. ^[7]

El consumo del tabaco es originario de la civilización maya, y se extiende en su cultura desde el año 2.000 a.C hasta el 987 d.C. Le dieron al fumar, un carácter religioso y ceremonial, como se demuestra en muchos de sus grabados, donde se observan sacerdotes fumando en actitud de adoración al sol. Los mayas y algunos pueblos de América, también utilizaron el tabaco, pero con fines curativos, pensaban que las enfermedades se debían a los malos espíritus que se apoderaban de la persona enferma, y éstos, podían ser expulsados por el humo del tabaco. También fue utilizado para placer y como estimulante. Los mayas lo comerciaban, junto con el cacao y henequén, por todo el Golfo de México, Cuba, República Dominicana, Jamaica, etc. El comercio del tabaco fue difundido a todo el norte de América. ^[8,9]

En Mesoamérica se cosechaban dos especies de la planta, *Nicotiana rustica* y *Nicotiana tabacum*. La *Nicotiana rustica* es una hoja estrecha, con un alto contenido de nicotina y muy amarga, por lo que se fumaba en pipa y era cultivada en México, al este de América y Canadá. La *Nicotiana tabacum* es alta, ancha, más suave que la anterior, y es el origen del tabaco como lo conocemos en la actualidad. Éstas fueron dispersadas por los indios americanos, a través de toda América. Hacia finales del siglo XII, los aztecas, que invadieron el pueblo maya, asimilaron la costumbre de fumar tabaco, pero con fines más sociales que religiosos. ^[9,10]

En lo que al viejo continente respecta, el tabaco fue descubierto por dos marinos españoles, al mando de Cristóbal Colón, el hallazgo fue en las playas de San Salvador, donde fueron recibidos por nativos que llevaban frutas, jabalinas y hojas secas que desprendían una peculiar fragancia. Francisco Hernández de Toledo llevó las semillas de tabaco a España en 1510, posteriormente Jean Nicot la cultivó en Francia (1560) y Francis Drake la introdujo a Inglaterra, en 1585.

Hacia el final del siglo XV, fuera del continente americano ya se tenía bastante conocimiento acerca de las variedades de esta planta. Durante los primeros años de establecimiento y exploración, la forma más popular de usar el tabaco era fumándolo en pipas. En el siglo XVII ya se había extendido por el resto de Europa, Rusia, China y Japón. La aspiración por la nariz del tabaco se desarrolló como un ritual en Francia, y durante la primera mitad del siglo XVIII se convirtió en la marca característica de los caballeros en Londres y Virginia, pero fue perdiendo popularidad, y a principios de 1800, los cigarrillos comenzaron a tomar impulso. [2, 7,11,12]

El cigarrillo se originó en las colonias españolas del nuevo mundo, haciéndose popular en la primera mitad del siglo XIX, primero en España, luego en Francia y en Rusia. Su popularidad creció aún más en el siglo XX, naciendo del hábito de fumar de los soldados en la Primera Guerra Mundial. Como consecuencia de esto, la producción de cigarrillos alcanzó los 36 billones en 1917, año en que Estados Unidos entró a la guerra, más del doble de la producción de 1914. Después de la guerra, el consumo de cigarrillos también llegó a la clase media, abriendo un nuevo mercado para esta industria. Casi al mismo tiempo, las mujeres comenzaron a fumar en público, lo que hizo a los cigarrillos más tolerables. ^[12]

En 1925, a pesar de las prohibiciones, las ventas de cigarrillos continuaron aumentando. En 1941, el presidente de Estados Unidos, Roosevelt, ordena la protección de los cultivos de tabaco, como parte de los esfuerzos de guerra de la

Segunda Guerra Mundial. Durante esta etapa, aumentó el hábito de fumar, más de la cuarta parte de las mujeres y más de la mitad de los hombres norteamericanos fumaban cigarrillos.

En 1952, dos investigadores británicos, Richard Doll y A. Bradford Hill, informaron los resultados de un estudio que se hizo comparando a 1.465 pacientes de cáncer pulmonar con igual número de pacientes de otras enfermedades, de la misma edad, sexo y región. Sus resultados indicaron que los pacientes fumadores tienen mayor probabilidad de padecer de cáncer pulmonar, y más acentuadas al ser fumadores empedernidos. En la década de los 60, emergen advertencias respecto a la salud pública y el Inspector General de Sanidad de los Estados Unidos publica un informe donde señala que el fumar cigarrillos es un peligro, y que es justificable hacer las medidas correctivas necesarias.

En la década del 2000, aumentaron las restricciones en la producción, consumo, publicidad y comercialización de los productos del tabaco. También subieron las campañas a nivel mundial para evitar que los menores fumen y orientar a los adultos para que abandonen el consumo de cigarrillos. Las compañías tabacaleras fueron obligadas a presentar programas de responsabilidad social con la finalidad de disminuir los impactos sobre la salud, promoviendo campañas divulgativas e indicando la peligrosidad de este tipo de hábito. ^[13]

II.1.2. Historia del Tabaco en Venezuela

En la Venezuela del período colonial, el tabaco originó importantes ingresos por su comercialización interna y externa. Se llegó a producir en grandes cantidades para la exportación y entidades de la época como la Provincia de Barinas se enriquecieron con este comercio. Su producto tuvo una buena aceptación en Europa y fue muy solicitado por su excelente calidad en países como Holanda, Prusia y Alemania.

El 24 de Junio de 1777 se promulgó la Real Cédula sobre el “*establecimiento del Estanco del Tabaco en la Provincias de Venezuela, Cumaná, Maracaibo y Guayana e Islas de Trinidad y Margarita*”. Esta medida pretendía aumentar las rentas reales mediante el monopolio de la actividad agrícola y manufacturera de este rubro, con la idea de solventar el creciente gasto hecho por la Corona en el aspecto militar y de defensa. En especial, para defender los territorios de Venezuela de las monarquías enemigas, como Inglaterra, las cuales buscaban poseer colonias en el continente americano y disfrutar de las riquezas que allí se encontraban.

Esta cédula monopolizaba el comercio de todas las ramas y derivados del tabaco, que se venían utilizando en los andes venezolanos desde tiempos prehispánicos. El Estanco causó diversas reacciones dentro de la población: revueltas, contrabando, desacuerdo entre las municipalidades. La oposición se hizo de manera violenta y en otros casos clandestina. ^[14]

Durante el proceso de independencia, el Estanco sufrió con las acciones de la guerra, el abandono de la monarquía hizo que entrara en crisis y los bandos en disputa intentaron sacar provecho sobre esta fuente de riqueza. Los gobernantes de la época lo vieron como un medio para cancelar las deudas en el exterior, sin embargo, la falta de mano de obra y cambios en el poder impidieron su reorganización durante este período. Desde la conformación de la Gran Colombia hasta la separación de la República de Venezuela, sufrió un gran declive y nunca se retomó la producción de ingresos que proporcionaba antes de la Independencia. Finalmente, se decretó abolir el estanco, por decisión del Congreso de la República de Venezuela, en el año 1833. ^[15]

A partir del siglo XX, Venezuela fue pionera en el control regulatorio de los productos derivados del tabaco. Fue promulgada la Ley de Impuesto sobre Cigarrillos y Manufacturas del Tabaco, en el año 1978 y luego una reforma del Reglamento en

1979. Esta ley fue usada como referencia para actuaciones similares posteriores en otros países de la región.

En el año 2000, de nuevo se actúa, emitiendo una resolución de prohibición de fumar en instalaciones administrativas y asistenciales, hospitales, ambulatorios y cualesquiera otros establecimientos o servicios de salud, tanto del sector público como privado. ^[16]

A mediados de 2005, una resolución gubernamental obligó a las empresas tabacaleras a estampar en las caras frontales de las cajas de cigarrillos, fotografías y textos con evidencias explícitas sobre los diversos daños al organismo que causa el consumo de tabaco.

En el año 2011, se aprobó la resolución de *Ambientes Libres de Humo de Tabaco*, que prohíbe fumar en el interior de lugares públicos y oficinas de trabajo. Además los propietarios o administradores de los lugares en los que está prohibido fumar, obligatoriamente deben colocar un aviso visible advirtiéndolo (Figura 2). ^[17]

Solo 5% de los países americanos ha tomado este tipo de medidas, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Venezuela ha ratificado el cumplimiento del convenio con la Organización Mundial de la Salud (OMS), firmado en 2003. El país se suma a otros países latinoamericanos como Colombia, Perú, Nicaragua, Honduras, Uruguay y México; y a países como China, España, Nueva Zelanda, Alemania, Francia, Italia entre otros, que ya tienen vigente una resolución encaminada a reducir el consumo de tabaco. ^[18]



Figura 2. Aviso de prohibición de fumar, de acuerdo a la Resolución de Ambientes Libres de Humo de Tabaco.

II.1.3. Tabaco sin Humo

El tabaco sin humo se refiere a la forma de consumirlo sin producir la combustión del tabaco y es ingerido de manera nasal u oral. En la primera mitad del siglo XX, el uso del tabaco sin humo en Europa y Norte América se vio eclipsado por el ascendente consumo de los cigarrillos, sin embargo, en el sur de Asia todavía es bastante usado. En las últimas décadas, ha habido un resurgimiento en el consumo del tabaco sin humo en algunos países europeos y en Estados Unidos. ^[19]

El uso del tabaco sin humo, desde sus comienzos, ha sido controversial. En la década de los 70 y 80, se empezó a tomar conciencia del daño causado por los humos producidos al fumar, por lo que el tabaco sin humo se vio como una opción más segura que el cigarrillo. Millones de personas creyeron del criterio errado, que solo el humo era el que ocasionaba daños a la salud, y el consumo del tabaco sin humo se expandió rápidamente, sobre todo en los adultos jóvenes y adolescentes masculinos. Sin embargo, causó desagrado en muchas personas, además que se comenzaba a demostrar que su consumo podía ser dañino para la salud, ocasionando enfermedades, y podía inducir a una adicción violenta a la nicotina, que es un estimulante venenoso. ^[20]

El tabaco sin humo es popularmente ingerido en África, América, el Sureste de Asia, Europa y el Medio Oriente. En la tabla 1 se muestran los distintos tabacos sin humo consumidos en las diferentes partes del mundo, tanto por su uso oral como nasal.

Tabla 1. Uso de los tipos de tabaco sin humo en el mundo y maneras de consumo. ^[19]

Tipo de Tabaco	África	América	Mediterráneo Oriental	Europa	Sureste de Asia	Pacífico Occidental
Uso oral (Chupado y/o masticado)						
<i>Chimó</i>		X				
Rapé Cremoso					X	
Rapé Seco	X	X		X		
Rapé Húmedo		X			X	
Betel Quid			X		X	X
<i>Gul</i>					X	
<i>Gutka</i>					X	
<i>Gudhaku</i>					X	
<i>Iq'mik</i>		X				
<i>Khaini</i>					X	
<i>Khiwam</i>					X	
De Hojas Sueltas		X		X		
<i>Mishri</i>					X	
<i>Maras</i>				X		
<i>Mawa</i>					X	
De enchufe		X				
Polvo de colmillo rojo					X	
<i>Shammah</i>			X	X		
Goma de mascar						X
Tabletas de tabaco		X				
<i>Toombak</i>	X					
<i>Tuibur</i>					X	
Rollo		X				
<i>Zarda</i>			X		X	
Uso Nasal						
Rapé seco	X		X	X	X	
Rapé líquido	X					

II.1.3.1. Tipos de Tabaco sin Humo

II.1.3.1.1. Rapé

El rapé es un preparado de tabaco molido (finamente dividido) y aromatizado, con sustancias como alcanfor, glicerina, mentol, etc. Los primeros en consumir el tabaco como rapé fueron los nativos de Brasil. Ellos usaban una copa y un mortero, convirtiendo las hojas de tabaco en un fino polvo. Puede ser expendido seco o húmedo.

En el rapé húmedo, el tabaco es finamente cortado, curado con aire y fuego, siendo la forma más popular en Estados Unidos, y también es bastante usado en Suecia. La razón de la alta popularidad en estos países, es que se ha convertido en la forma más agradable de usar. Los consumidores del rapé húmedo tradicional colocan un poco entre la encía y la mucosa bucal, pero el tabaco difícilmente se mantiene en su lugar y empieza a migrar por otras áreas de la boca de manera desagradable estéticamente. El rapé húmedo se vende en pequeñas porciones, similares a las bolsas de té y estos productos se mantienen estables, generando poco jugo, además que pueden ser usados de manera discreta.

El rapé seco es un tabaco fermentado, curado con fuego, que es pulverizado y su uso original es a través de la inhalación nasal. Las mujeres del sur de Estados Unidos han usado el rapé seco en forma oral desde los años 1800. Sin embargo, esta forma de consumo se ha visto disminuida, ya que sus ventas han caído en casi un 60 % en las últimas décadas. ^[19, 21]

II.1.3.1.2. Tabaco de mascar

Existen muchos tipos de tabaco sin humo que son usados de manera oral, como por ejemplo el rapé húmedo mencionado anteriormente. El *Khiwam* que consiste en un

extracto de tabaco, con especies y aditivos. El *Gutka* que está hecho de tabaco seco, molido, mezclado con nueces de areca, saborizantes y otros ingredientes. El *betel quid* que consiste en una pasta seca que a menudo incluye tabaco, nueces de areca, catechu y fragancia o aromatizantes. ^[19,22]

Para consumirlo se coloca un poco del tabaco en el surco mandibular y entonces lo chupan o mastican por un periodo de tiempo, de acuerdo a como se use. Se puede colocar una porción de tabaco del tamaño de una pelota de golf y generalmente es masticado, o se coloca una porción más pequeña que se mantiene en la boca, sin masticarlo. ^[19]

La manera más conocida de consumir tabaco sin humo en Venezuela, es en forma de una pasta densa que se disuelve lentamente en la boca, conocida popularmente como Chimó. Puede ser clasificado como un tabaco de mascar.

II.1.4. El Chimó

El chimó es el tabaco de mascar hecho en Venezuela, comúnmente de las zonas rurales del país. Es una sustancia pastosa, muy densa, producida mayormente del extracto acuoso de la hoja del tabaco, melaza y ciertos aditivos llamados “aliños”, como bicarbonato de sodio (sal de Urao), azúcar morena, cenizas del árbol de Mamón (*Melicocca bijuga*), y saborizantes. Estos últimos varían de acuerdo a la región.

En su preparación las hojas de tabaco curadas son hervidas durante varias horas, donde el almidón y la fibra se descargan. Seguidamente el extracto acuoso es mezclado con melaza y es hervido hasta producir una pasta espesa. La pasta ya madurada es sazonada con los ingredientes antes mencionados. El chimó es colocado en recipientes naturales o “taparas” (el fruto seco del árbol Tapara) o se envuelve en hojas de plátano para su maduración, luego son empacados en

pequeños enlatados o en cilindros pequeños, como los dulces (Ver Figura 3 y Figura 4). [19,23,24]



Figura 3. Chimo El Toro, empackado en una pequeña lata.



Figura 4. Uso del chimó.

Para su consumo, una cantidad pequeña de chimó es llevado a la boca con el dedo índice y colocado detrás de los incisivos inferiores, donde se adhiere y comienza a desleír lentamente por la salivación originada por su efecto picante. Esto conlleva a expectorar con frecuencia para no ingerir el poderoso tóxico.

El chimó es consumido como un sustituto del cigarrillo o como un complemento, entre otras cosas, la gente piensa que produce menos daño a la salud que el cigarrillo. Por otra parte, es empleado como medicina casera, junto a la grasa de vaca para tratamiento de enfermedades respiratorias, para prevenir picadas de serpientes y muchas personas creen que su uso de manera oral, protege contra las caries, debido a su acción antiséptica. [15, 24]

El sector campesino fue y sigue siendo el mayor consumidor de este producto, aunque actualmente los jóvenes en las ciudades lo consumen como un sustituto al cigarrillo, ya que contiene algunos de los elementos químicos del tabaco, a pesar del procesamiento que se le realiza, por esta razón hay una similitud en los efectos al

sistema nervioso de las personas que consumen ambos productos. El costo del chimó es mucho más accesible que el de una caja de cigarrillos, lo que también puede influenciar en el mayor consumo de éste.^[15]

El Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel desmintió que el chimó fuera benévolo y su uso podría evitar el consumo de cigarrillos entre niños y jóvenes. En el estudio “Consumo de chimó en los colegios”, realizado por la ONG Cátedra Libre Antidrogas, se realizaron estudios en personas de 13 a 25 años, las cuales indicaron que el consumo del chimó solos o en grupo, les producía la sensación de bienestar, satisfacción, embriaguez y placer. La última encuesta Mundial de Tabaquismo en Jóvenes realizada en Venezuela, arrojó que cinco de cada 100 estudiantes venezolanos van a la escuela con una cajetilla de chimó, una sustancia tan o más adictiva que el tabaco y que está al libre alcance en bodegas y quioscos que rodean las instituciones educativas.^[25]

El consumo de chimó ha sido asociado con ciertos cambios como el aumento en la presión arterial, alteraciones en la cavidad bucal como consecuencia de su utilización prolongada. Las lesiones producidas son: manchas en los dientes, gingivitis, recesión gingival, halitosis, sialorrea, leucoplasias, eritoplasias y hasta cáncer bucal. El Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) indicó que el chimó reporta no sólo lesiones odontológicas, sino enfermedades más graves aún, ya que tiene la posibilidad de producir seis tipos de cáncer, incluido el de estómago.
[25, 26, 27, 28]

II.1.5. Componentes del Chimó

Como se mencionó anteriormente, el chimó es una mezcla de extractos de las hojas de tabaco, sumo de caña (melaza) y una cantidad de aditivos, dependientes de la región donde se elabore. Se considera que el componente principal del chimó, es el

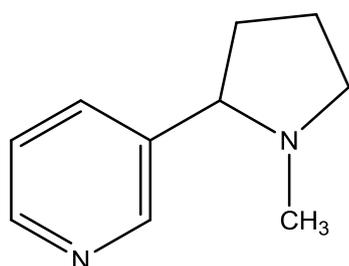
extracto de la hoja del tabaco, por lo tanto, es de especial interés conocer los componentes de dicha hoja.

Los compuestos químicos de la hoja del tabaco no tratado industrialmente, es una mezcla compleja, entre los cuales se encuentran: polisacáridos, proteínas, alcaloides, alcanos, terpenos, polifenoles, fitoesteroles, ácidos carboxílicos, nitratos alcalinos, almidones, productos celulósicos y minerales inorgánicos.

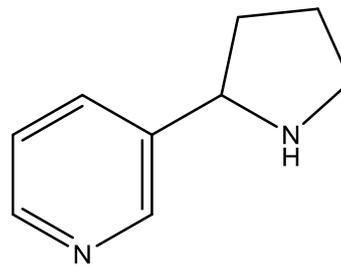
El tabaco procesado posee aproximadamente 50% de carbohidratos y cerca de 20% de proteínas, que son los componentes predominantes. Posee un (0,5-3,0) % de alcaloides, polifenoles (0,5-4,5) %, fitoesteroles (0,1-2,5) %, ácidos carboxílicos (0,1-7,0) %, alcanos (0,1-0,4) %, hidrocarburos aromáticos, aldehídos, cetonas, aminas, nitrilos, hidrocarburos heterocíclicos, pesticidas, nitratos alcalinos (0,01-5,00) %, compuestos metálicos y sales inorgánicas. Aproximadamente 28 agentes tumorigénicos han sido separados e identificados en los productos del tabaco de mascar. ^[3]

Los alcaloides son considerados los componentes activos del tabaco, y de ellos, la nicotina y sus relacionados son estimados como los de mayor importancia y por lo tanto los más estudiados, representando entre 0,2 al 9,0 % del tabaco, pero generalmente se encuentran del 1 al 2 %.

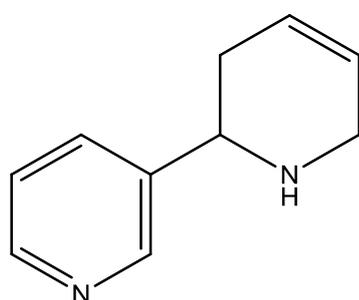
En el tabaco comercial o procesado, la nicotina puede alcanzar de un 85 a 95 % de la fracción total de los alcaloides, le siguen en abundancia la nornicotina y la anatabina que pueden estar entre un 2 a 3% y por último la anabasina en un 0,3% aproximadamente. En la Figura 5 se muestran la estructura química de los alcaloides típicos del tabaco. ^[29]



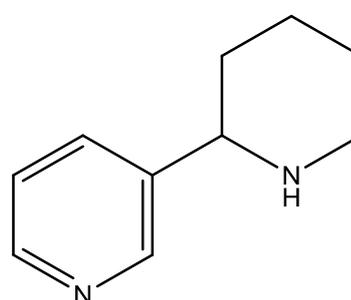
Nicotina



Nornicotina



Anatabina



Anabasina

Figura 5. Alcaloides presentes en el tabaco.

Desde un punto de vista sanitario, aparte del efecto adictivo de los alcaloides del tabaco, la siguiente acción de importancia es su transformación en N-nitrosaminas, las cuales son sustancias potencialmente carcinogénicas. Aunque ellas se hallan en muy baja concentración en la planta de tabaco no procesado, son formadas fundamentalmente durante el proceso de curado o tratamiento del tabaco. También se crean en el encendido del cigarrillo, encontrándose fundamentalmente en el humo generado, por consiguiente, es muy probable que pudieran formarse en la preparación en caliente del chimó.

En general, los compuestos N-nitrosos, son formados mediante la reacción química denominada N-nitrosación, en ella se incluyen la formación de las nitrosamidas y las

nitrosaminas, estas últimas son las de mayor interés debido a que después del procesamiento de los alimentos son mucho más estables.

Las nitrosaminas generalmente se originan debido a la reacción de una amina secundaria con el nitrito en un medio muy ácido (por ejemplo, dentro del estómago). Son compuestos químicos cuya estructura química se muestra en la figura 6.

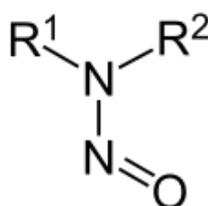


Figura 6. Estructura química de la nitrosaminas.

En el caso particular del tabaco, existen tres tipos principales de nitrosaminas:

- a) Los ácidos N-nitrosaminos: N-nitrososacosina (NSAR) ,3-(metilnitrosoamino) propionico (MNPA) y el ácido 4-(metilnitrosoamino) butírico (MNBA).
- b) Las N-nitrosaminas volátiles: N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosopirrolidina (NPYR), N-nitropipiridina (NPIP) y N-nitrosomofolina (NMOR).
- c) Las N-nitrosaminas no volátiles: también conocidas como las N-nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA, siglas en ingles de Tobacco Specific Nitrosamines, ya que solo se encuentran en el mismo). Entre las TSNA más comunes se encuentran: N-nitrosornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), N-nitrosoanabasina (NAB), N-nitrosoanatabina (NAT), 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil) butanol (NNA) y 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL). Sus estructuras se pueden observar en la figura 7. ^[19]

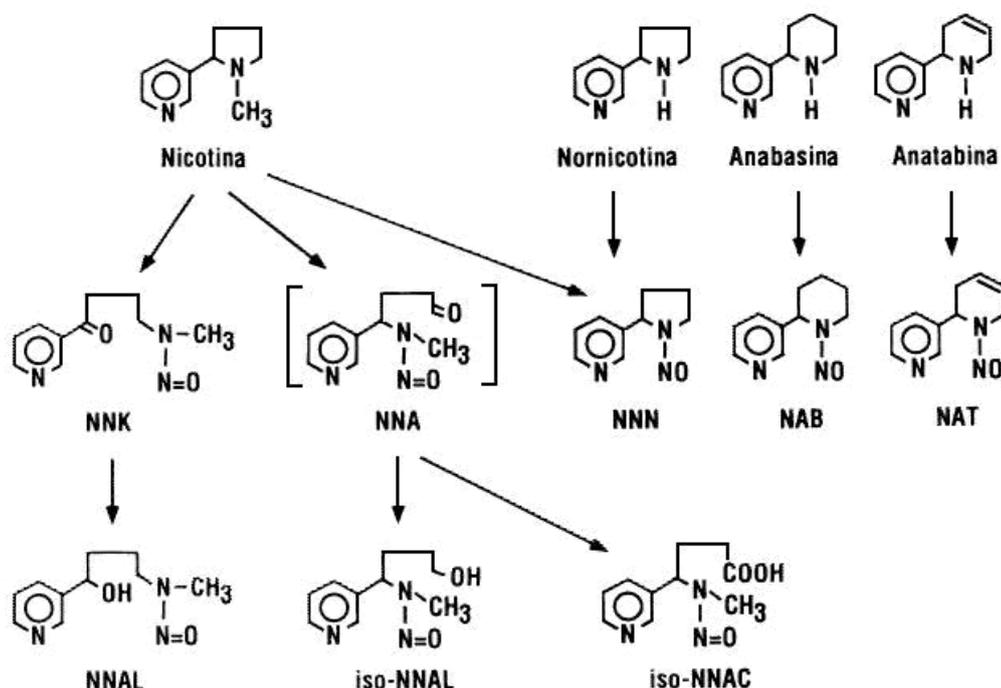


Figura 7. TSNA, nitrosaminas específicas del tabaco.

Del párrafo anterior, podemos denotar la importancia en la determinación del nitrito y nitrato, como precursores de compuestos cancerígenos en la fabricación del chimó.

II.2. Generalidades del Nitrato y Nitrito

II.2.1. Función en la naturaleza y Aplicaciones

El nitrato (NO_3^-) es la forma estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno, y a pesar de su baja reactividad química puede ser reducido por acción microbológica. Es la forma de nitrógeno más estable termodinámicamente en presencia de oxígeno, por lo tanto, en los sistemas acuáticos y terrestres, los compuestos nitrogenados tienden a transformarse en nitrato. El nitrito (NO_2^-), es oxidado con facilidad por procesos químicos o biológicos a nitrato, o bien reducido originando diversos

compuestos. El nitrato y nitrito son aniones inorgánicos de origen natural, formando parte del ciclo del nitrógeno, como se puede observar en la Figura 8. [30]

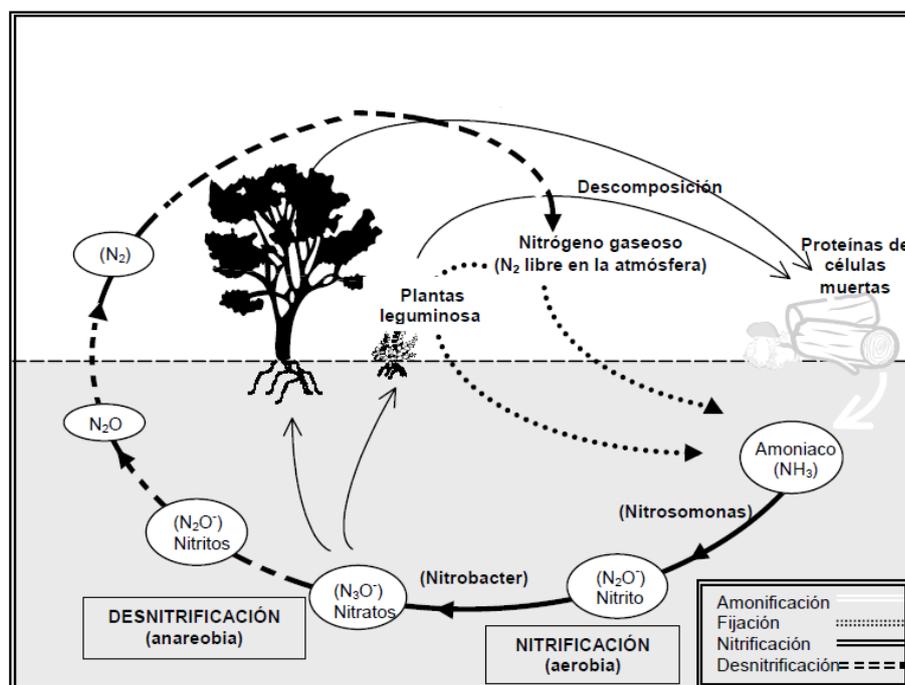


Figura 8. Ciclo de Nitrógeno. [30]

En los suelos, los fertilizantes y vertidos residuales que contienen nitrógeno orgánico son descompuestos, generando amonio (NH_4^+), que luego, pasa a ser oxidado a nitrito y luego a nitrato. Parte de este nitrato es absorbido por las plantas, que lo emplean para la síntesis de proteínas vegetales, mientras que el resto pasa a las aguas subterráneas.

En la atmósfera, la formación de compuestos nitrogenados se debe a la combinación de nitrógeno y oxígeno molecular a altas temperaturas producidas por fenómenos naturales, como las descargas eléctricas de las tormentas o la actividad volcánica, o producidas por combustiones de vehículos y procesos industriales. Los óxidos de nitrógeno así formados, se oxidan en nitrato. Los niveles de concentración de nitrato en la atmósfera varían entre $(0,1-0,4) \mu\text{g}/\text{m}^3$ en zonas de baja concentración y $(1-40) \mu\text{g}/\text{m}^3$ en zonas de mayor concentración. [30]

El nitrato es empleado principalmente en la industria de los fertilizantes, como oxidante en los explosivos y como sal purificada de potasio en la fabricación de cristal. Mientras que el nitrito es empleado principalmente como aditivo para los alimentos, sobre todo en las carnes curadas. Ambos son añadidos juntos en ocasiones, como conservante, ya que el nitrato sirve como reserva del nitrito, transformándose lentamente en éste.

Por otro lado, la carne se puede proteger de la putrefacción bacteriana mediante la adición de disoluciones concentradas de sal común. Pero esta carne, toma una coloración pardo-verdosa, por la conversión de la hemoglobina en metahemoglobina. Para mantener el color rojo de las carnes, se le agrega un poco de nitrato o nitrito al cloruro de sodio. El nitrito forma nitrosohemoglobina o nitrosohemocromógeno, de color rojo oscuro. Los nitratos se emplean como aditivos en la fabricación de productos como carnes, y en menor medida, en la conservación del pescado y en la producción de queso. Los nitritos también retrasan el proceso de oxidación de los lípidos, con la consecuente disminución del característico olor de enranciamiento, produce una mayor firmeza en la textura, y provee a los alimentos de un importante efecto antimicrobiano. ^[30]

II.2.2. Ingestión y Riesgos Tóxicos

El nitrato como sustancia de origen natural se puede encontrar en carnes frescas, leche y productos lácteos, cereales, frutas, bebidas alcohólicas y verduras. En la mayoría de estos alimentos se encuentran en bajas concentraciones, generalmente inferiores a 10 mg/kg y en escasos casos, exceden los 100 mg/kg. Sin embargo, las verduras, presentan unos contenidos que oscilan entre 200 y 2.500 mg/kg, variando en función del procesado del alimento, uso de fertilizantes y condiciones de crecimiento. ^[30]

La ingesta diaria de nitrato y nitrito de una persona varía mucho de acuerdo a dos factores: la dieta individual de la persona y el contenido de nitrato del agua potable de la zona de residencia. La ingesta total de nitrato de los alimentos oscila normalmente entre 50 y 150 mg/persona/día. Las dietas vegetarianas presentan un valor más elevado, del orden de 200 mg/persona/día. La Ingesta Diaria Aceptable (IDA) de nitrato recomendada por el comité conjunto de la FAO/OMS es de 0-3,7 mg/kg de peso corporal. La utilización de nitrito como aditivo en alimentos infantiles para niños menores de tres meses no está permitida. ^[30]

El nitrato puede transformarse en nitrito por reducción bacteriana tanto en el procesado y almacenamiento de los alimentos, como en el propio organismo (en la saliva y tracto gastrointestinal). Se estima que un 5% del nitrato ingerido se transforma en nitrito endógenamente.

La toxicidad del nitrato y nitrito se conoce desde finales del siglo XIX. En 1895, se describieron unas intoxicaciones del ganado y se les atribuyeron a la ingestión de nitrato. En 1945, se asoció por primera vez a la metahemoglobinemia fatal de un niño, con la ingesta de agua de pozo, contaminada con altas concentraciones de nitrato. Desde esa época hasta la década de los 80, se reportaron 2.000 casos similares, de los cuales, el 10% terminaron en muerte en los afectados. ^[29]

La toxicidad del nitrato viene determinada por su conversión a nitrito, que puede producir metahemoglobinemia por oxidación del Fe^{2+} de la hemoglobina, produciendo cianosis. La metahemoglobina no es capaz de transportar el oxígeno a los tejidos, pudiendo producir efectos tóxicos graves e incluso la muerte cuando su cantidad es superior al 70% de la hemoglobina total. Este efecto se produce casi exclusivamente en los niños en período de lactancia, debido a la menor acidez de su estómago, que favorece el crecimiento de microorganismos capaces de reducir el nitrato a nitrito, además de la presencia de hemoglobina fetal, que es más fácilmente oxidable por el nitrito, a la ingesta de agua en niños, que según su peso, es 10 veces

superior a la de los adultos por unidad de peso corporal y a la existencia de un cierto déficit del sistema enzimático capaz de reducir la metahemoglobina, que sin embargo es muy eficaz en un adulto.

Un factor determinante en la causa de estas enfermedades, es la concentración de nitrato en alimentos y en las aguas. El Global Environmental Monitoring System (GEMS) indicó que el 10% de los ríos que se estudiaron en el mundo tenían concentraciones más elevadas que las recomendadas por la OMS. En la tabla 2, se pueden observar los síntomas causados por la metahemoglobina, según su concentración. ^[29, 30, 31]

Tabla 2. Síntomas y Signos de la Metahemoglobina en base a su concentración. ^[29]

Concentración de Metahemoglobina	Síntomas y Signos
10-20 %	Cianosis central de tronco y extremidades, usualmente es asintomática.
20-45 %	Signos y síntomas de hipoxia, depresión del Sistema Nervioso Central (dolor de cabeza, mareo, fatiga, debilidad), síncope y disnea.
45-55 %	Coma, arritmia, colapso, convulsiones.
>70%	Alto riesgo de muerte.

A pesar de los efectos dañinos de estos dos iones, antes mencionados, también se han realizado estudios, que indican que el nitrato produce beneficios para la salud, ya que indican que la combinación de óxido nítrico (NO) y el ácido del estómago es muy efectiva para destruir muchas bacterias tóxicas, como la Salmonella y Shigella.

El principal riesgo del nitrato y del nitrito para la salud es que puede causar la formación endógena de nitrosocompuestos, que son agentes teratógenos, mutágenos y probables carcinógenos, altamente peligrosos para la salud humana, como es el caso de las nitrosaminas. ^[30]

II.2.3. Las Nitrosaminas

Las nitrosaminas se originan como consecuencia de la reacción de las aminas secundarias (aromáticas y alifáticas) con el ácido nitroso HONO (Figura 9).

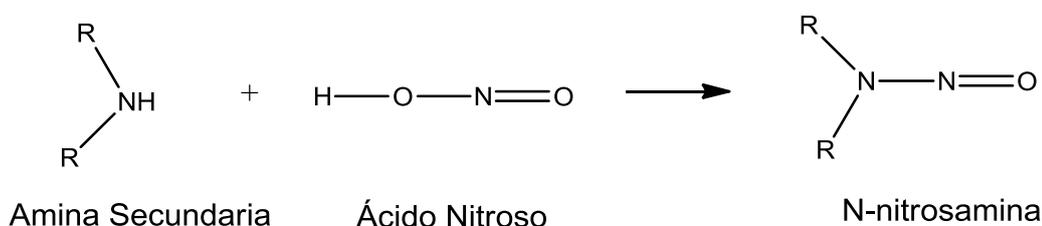


Figura 9. Reacción de nitrosación de una amina secundaria.

En general, los nitrosocompuestos tienen dos tipos de orígenes, de forma endógena y exógena. La formación endógena es la que ocurre de manera natural, en el estómago. El nitrato es reducido a nitrito por acción de los microorganismos de la cavidad bucal, para luego, transformarse en óxido nítrico, en el estómago, bajo las condiciones allí presentes. En ciertas circunstancias, como por ejemplo la gastritis crónica, el nitrito puede ser reducido en agentes nitrosantes, como el N_2O_3 y N_2O_4 , de esta manera, proceden a reaccionar para formar nitrosocompuestos.

La reacción de nitrosación ocurre con gran variedad de compuestos, como las aminas secundarias (presentes en el pescado, queso, huevos, carnes), algunos aminoácidos presentes en los alimentos, los alcaloides presentes en especias que

son empleadas para curar carnes (por ejemplo la pimienta negra), y otros precursores que aparecen en los alimentos como contaminantes (como plaguicidas, aditivos o medicamentos). Algunos estudios han determinado que la cantidad de nitrosocompuestos que se genera es lo suficientemente riesgosa para la salud en condiciones normales de ingesta de nitrato.

La formación exógena es causante de tumores y las fuentes principales son productos como el tabaco, cosméticos y productos alimenticios. El Comité conjunto de Expertos en Aditivos alimentarios FAO/OMS señaló algunos estudios que indican que se puede promover, en determinadas condiciones, la formación de N-nitrosocompuestos, durante las técnicas de preparación de alimentos para productos de carne y pescado, así como verduras deterioradas o mal almacenadas. En otros productos también se encuentra el riesgo de formar nitrosocompuestos, como algunos embutidos, leche, malta, entre otros.^[30]

La mayoría de los nitrosocompuestos son probables o posibles cancerígenos en el ser humano. Aunque aún no se ha demostrado una clara asociación entre la exposición a nitrosaminas y el cáncer humano, si se ha demostrado que son potentes agentes cancerígenos en animales, aproximadamente el 90% de 300 nitrosaminas que han sido analizadas han resultado cancerígenas en animales. Los efectos de las nitrosaminas se han demostrado en mucho órganos; la localización del tumor depende de la nitrosamina específica, las especies ensayadas y la vía de administración. Las nitrosaminas generadas pueden ejercer sus efectos carcinógenos mediante su poder alquilante: la unión de los grupos alquilo, incluso los metilos, son suficientes para interferir en el apareamiento de las bases en la doble hélice de ADN. La exposición a las nitrosaminas en las industrias no puede superar los 1 mg/m^3 .^[30,32]

III. JUSTIFICACIÓN

Considerando lo planteado en el desarrollo de las referencias bibliográficas, el chimó puede contener niveles relativamente elevados de nitrosaminas, las cuales son compuestos altamente cancerígenos. Estos compuestos son formados en presencia de nitrato y nitrito en medio ácido, por lo tanto, es de interés particular su determinación en la matriz de estudio, ya que a futuro, pudieran ser correlacionados con la presencia de las nitrosaminas.

En la siguiente sección, se realizará una revisión de los antecedentes, relativos a los análisis químicos de nitrato y nitrito en derivados del tabaco.

IV. ANTECEDENTES

IV.1. H. Burton, N. Dye, L. Bush, en Lexington, Kentucky, EEUU, Año 1992. ^[33]

Las hojas de una variedad de Tabaco oscuro, curado con aire, fueron divididas en 41 secciones. Determinaron los niveles de las nitrosoaminas específicas del tabaco, nitrato, nitrito, nicotina. El nitrato fue determinado utilizando un autoanalizador Technicon y el procedimiento Technicon (Método Industrial Technicon 100-70W/B). Mientras que las concentraciones de nitrito fueron determinadas usando el procedimiento de Griess. Estas técnicas son parecidas a las utilizadas por la normativa canadiense.

Como se observa en la figura 10, la concentración de nitrito fue mayor en la base de la hoja, con 4,46 $\mu\text{g/g}$ y fue disminuyendo hasta la punta de ésta. Mientras que la concentración de nitrato fue más elevada en el centro de la hoja, con 9250 $\mu\text{g/g}$ y las más bajas están en la punta y en la base. Se encontró que hay una mejor relación entre el nitrito y las nitrosaminas específicas del tabaco, que con el contenido de alcaloides.

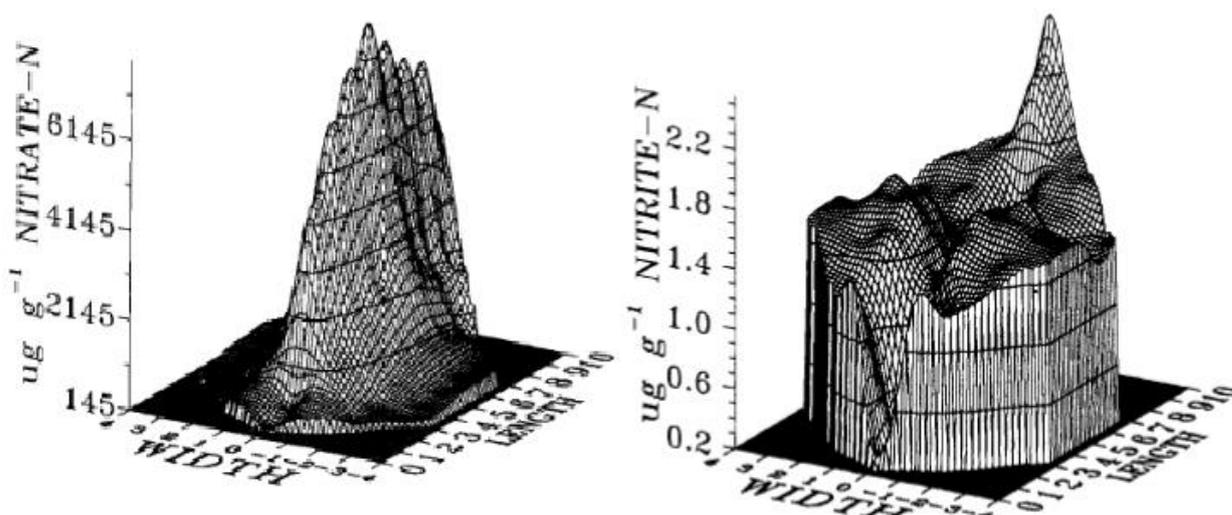


Figura 10. Distribución de nitrato y nitrito en la hoja de tabaco oscuro.

IV.2. Normativa canadiense para la determinación de nitrato en tabaco entero, Año 1999. [34]

Canadá ha hecho muchos avances en control de los productos de tabaco en los últimos años, más que otros países. Han elaborado métodos para la determinación de los diferentes componentes del tabaco que son dañinos para la salud.

Para la determinación de nitrato, pesan 0,5 g (con precisión de 0,1 mg) de las muestras de tabaco, para luego realizar una extracción con 50 mL de ácido acético 5 % (p/p), se colocan en agitación por 15 minutos y se filtra. El extracto es analizado mediante un sistema automático fotocolorimétrico de flujo continuo. El nitrato es reducido por reacción con hidracina a 37 °C, en presencia de cobre a pH = 10,2. El nitrito formado, reacciona con sulfanilamida, en medio ácido, con la que se diazota, para luego ser mezclado con N-(1-naftil)-etilendiamina, para formar un compuesto de color rojo, que es medido bajo una longitud de onda de 550 nm.

Este método no distingue entre el nitrato y el nitrito encontrado en el tabaco, ya que todo el nitrato es convertido en nitrito para el análisis.

IV.3. R. Pérez-Olmos, A. Ríos, J.R. Fernández, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, en Bilbao, España, Año 2000. [35]

Construyeron un electrodo selectivo para nitrato, con una sensibilidad mejorada, elaborado como un electrodo convencional, pero usando un amplificador operacional que suma los potenciales provenientes de cuatro membranas y se comparó con uno convencional. Los dos tipos de electrodos fueron construidos utilizando bromuro de tetraoctilamonio como sensor, dibutilftalato como solvente mediador y PVC como una matriz plástica, las membranas obtenidas se colocan sobre un soporte de resina conductora epoxídica.

Estos electrodos fueron utilizados para determinar la concentración de nitrato en derivados del tabaco. Una cantidad de 1,0 g (precisión de 0,1 mg) de cada muestra distinta de tabaco, previamente homogeneizada y secada, es pesada y se realiza una extracción en una mezcla de 100 mL de agua desionizada y solución acondicionadora. El extracto es filtrado y se enraza con agua desionizada en un balón aforado de 100 mL. Se tomó una alícuota de 50 mL de esta solución, se colocó en un beaker y se sumergieron los electrodos para realizar las mediciones.

A pesar de que el electrodo es selectivo para el nitrato, también responde para otros aniones, como el cloruro, bicarbonato, nitrito y ácidos orgánicos, si la cantidad es significativa con respecto a la concentración de nitrato presente. Para evitar este inconveniente, se utiliza una solución acondicionadora, que simultáneamente ajusta la fuerza iónica de la muestra. Esta solución está compuesta por óxido de plomo, acetato de plomo, ácido sulfámico y acetato de potasio. El acetato de plomo, junto al óxido de plomo, forma una solución básica de acetato de plomo, que funciona como floculante de los compuestos orgánicos y como agente precipitante del cloruro y el bicarbonato. El ácido sulfámico produce la destrucción del nitrito y el acetato de potasio es utilizado para ajustar la fuerza iónica. Se obtuvieron concentraciones de nitrato similares para los dos electrodos, como se observa en la tabla 5, sin embargo, el electrodo con cuatro membranas fue mucho más preciso. Como referencia para esta técnica, se utilizó el método espectrométrico de Brucina. No se aclaró que marcas se estaban analizando, solo el tipo de producto que era.

Tabla 3. Comparación de las medidas de nitrato y nitrito en la muestras de tabaco, con el uso de distintas técnicas.

Muestra	Método de referencia		Electrodo convencional		Electrodo selectivo	
	X ^a	CV ^b	X ^a	CV ^b	X ^a	CV ^b
Pipa						
1	3,49 ± 0,10	2,7	3,51 ± 0,06	1,6	3,48 ± 0,03	1,0
2	2,87 ± 0,06	2,1	2,86 ± 0,10	1,4	2,86 ± 0,02	0,7
Cigarrillo						
3	7,50 ± 0,13	1,8	7,41 ± 0,07	1,0	7,49 ± 0,04	0,6
4	11,58 ± 0,15	1,3	11,88 ± 0,09	0,8	11,38 ± 0,06	0,5
5	4,92 ± 0,08	1,7	4,82 ± 0,07	1,5	4,98 ± 0,02	0,4
6	4,06 ± 0,08	2,0	4,10 ± 0,07	1,8	4,09 ± 0,03	0,7
Tabaco (Puro)						
7	6,30 ± 0,12	2,0	6,16 ± 0,08	1,3	6,17 ± 0,04	0,7
8	5,95 ± 0,07	1,1	5,96 ± 0,06	1,1	5,97 ± 0,03	0,5

- a. Concentraciones de nitrato en mg/g.
b. Coeficiente de variación, en %.

IV.4. K. D. Brunemann, J. Qi, D. Hoffmann, en Nueva York, en EEUU, Año 2002. ^[36]

Determinaron la composición química de dos marcas de tabaco de mascar de EEUU. Las dos marcas de tabaco de mascar fueron compradas en cinco localizaciones distintas de EEUU (Nueva York (NY), Massachusetts (MA), Colorado (CO), California (CA) y Kentucky (KY)).

No se detalló el procedimiento utilizado para la determinación de nitrato y nitrito. Encontraron que los niveles de nitrito fueron muy variados, como se observa en la tabla 4, para la marca A, entre (12-30) mg/Kg y para la marca B, entre (210-812) mg/Kg. Estas variaciones fueron atribuidas a los diferentes procesos de almacenamiento, que pueden producir distintos consumos del nitrito en la reacción para producir nitrosaminas en diferentes concentraciones. Mientras que los niveles de nitrato también fueron muy distintos, de (8800-9300) mg/Kg en la marca A y de (20100-22700) mg/Kg en la marca B.

Tabla 4. Concentraciones de nitrato y nitrito en las dos marcas de tabaco, de acuerdo al estado en que se compraron.

Componente	Estado	Marca A	Marca B
Nitrato (mg/Kg)	NY	9100	20100
	MA	8800	22300
	CO	9300	22700
	CA	8900	22300
	KY	8900	22000
Nitrito (mg/Kg)	NY	12	5230
	MA	33	434
	CO	16	812
	CA	16	450
	KY	20	210

IV.5. I. Stepanov, S.S. Hecht, S. Ramakrishnan, P.C. Gupta, en Minneapolis, EEUU y en Mumbai, India, Año 2005. [37]

Determinaron cuantitativamente los niveles de concentración de cuatro (4) nitrosaminas específicas del tabaco: la N'-nitrosornicotina (NNN), N'-nitrosoanatabina (NAT), N'-nitrosoanabasina (NAB) y 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), en treinta y dos productos vendidos en la India. También se determinaron los niveles de nitrato, nitrito y nicotina. Los productos de tabaco sin humo de la India fueron comprados en tiendas minoristas en Gujarat, Karnataka y Mumbai, entre octubre y noviembre de 2003. Por 24 horas antes del análisis, el tabaco fue acondicionado en una cámara con humedad relativa de 60 %.

Para la determinación de nitrato y nitrito, se pesaron 100 mg de las distintas muestras de tabaco homogeneizado y se agregaron 10 mL de H₂O (Milli-Q, Millipore Corp) en un tubo de centrifuga de vidrio de 50 mL (Kimble). Los tubos se colocaron en ultrasonido por 30 minutos. Las suspensiones fueron centrifugadas y el extracto acuoso se hizo pasar por un cartucho C-18 SPE (Waters Corp., Milford, MA), previamente acondicionado con 2 mL de metanol. Los primeros 5 mL de muestra se descartaron y los siguientes 2 mL se recolectaron en un tubo de plástico y

guardados a -20 °C hasta el análisis. Se diluyó por un factor de 10 y se analizó por cromatografía iónica (Dionex ICS-2000). Se utilizó una columna de intercambio aniónico AS14 con guarda columna, un eluente de Na₂CO₃/NaHCO₃, un volumen de inyección de 50 mL y a un flujo de 1,0 mL/min. Los análisis fueron realizados en las Instalaciones de Análisis Geoquímico de la Universidad de Minnesota.

En la tabla 5, se presentan los resultados obtenidos en las distintas muestras analizadas. Como conclusión, se obtuvo que las concentraciones de nitrito no varían de manera considerable entre las diferentes muestras, obteniéndose concentraciones de 1,0 a 1,4 µg/g en las marcas Raja Khaini y Hans Chhap Khaini, respectivamente. Las concentraciones de nitrato varían de 7,5 a 2950 µg/g y los niveles de las nitrosaminas específicas del tabaco no se relacionan con los de nicotina y nitrato, sin embargo, se observó una relación con el nitrito ($r= 0,78$. $p < 0,0001$).

Tabla 5. Nitrato y Nitrito en tabaco sin humo de la India y productos relacionados

Producto	NO ₃ ⁻ (µg/g)	NO ₂ ⁻ (µg/g)	Producto	NO ₃ ⁻ (µg/g)	NO ₂ ⁻ (µg/g)
Khaini			Pan Parag	332	2,84
Raja	705	1,020	Zatpat	171	1,99
Hans Chhap	1,090	1,410	Vimal	268	1,58
Zarda			Josh	252	1,74
Goa 1000	966	2,20	Supari		
Moolchand Super	1,320	ND	Goa	7,5	4,71
Sanket 999	1,910	2,08	Moolchand	8,5	2,48
Baba 120	1,700	1,63	Rajanigandha	8,8	3,34
Shimla	1,360	2,53	Sanket	8,5	4,27
Otros Tabacos			Shimla	8,0	6,56
Hathi Chhap	2,760	1,97	Tabaco cremoso		
Gai Chhap	2,950	8,40	IPCO	580	ND
Miraj	1,420	13,6	Dentobac	232	ND
Mishri			Rapé		
Shahin	1,720	5,18	Click	2,260	ND

Gutka			Polvo dental		
Star 555	417	1,61	Baidyanath	48,6	ND
Manikchand	43,9	2,00	New Roshanjyot	11,6	1,25
Zee	62,3	3,42	Dabur	27,6	ND
Tulsi Mix	184	2,58	Rapé de referencia		
Wiz	215	2,82	Kentucky IS3	3,86	6,35

ND - No detectado

IV.6. I. Stepanov, S. Hecht, S. Mirvish, M. Gonta, en Moldova, Año 2005. ^[38]

En estudios anteriores, determinaron los niveles de las nitrosaminas específicas del tabaco y nitrosocompuestos, sin embargo, no se ha hecho en algunos productos derivados del tabaco. Compararon los niveles de las nitrosaminas específicas del tabaco, los nitrosocompuestos totales y sus precursores, en el tabaco de cigarrillos comprados en Moldova y en algunos tipos de tabaco usados comúnmente en la fabricación de cigarrillos de Moldova.

Los cigarrillos fueron comprados en Chisinau en 2001 y 2002, mientras que las muestras de tabaco comúnmente usadas para la fabricación de los cigarrillos de Moldova, fueron suministrados por la fábrica de tabaco "Tutun-CTC" (Chisinau, Moldova). Por 24 horas antes del análisis, el tabaco fue acondicionado en una cámara a temperatura ambiente a una humedad relativa de 60%.

La determinación de nitrato y nitrito se realizó por cromatografía iónica, de la misma manera que Stepanov en 2005. Sus resultados están representados en la tabla 7. Concluyeron que el nivel de las nitrosaminas específicas del tabaco que se encuentra en estos productos, depende de la cantidad de nitrato presente durante el curado y la fermentación. Se presume que esto ocurre porque el nitrato es reducido a nitrito por acción bacteriana. En base a esto, se encontró que los niveles de nitrito determinan los niveles totales de las nitrosaminas específicas del tabaco y los nitrosocompuestos.

Tabla 6. Contenido de nitrato y nitrito en los productos de tabaco de Moldova.

Tipo de tabaco	Nitrato ($\mu\text{g/g}$)	Nitrito ($\mu\text{g/g}$)
Tabaco curado al sol, para la manufactura de cigarrillos tradicionales de Moldova		
Moldovenesc 272		
Curado	2.400	2,8
Procesado posteriormente	2.100	ND
Moldovenesc 456		
Curado	7.600	4,4
Procesado posteriormente	7.000	1,8
Jubiliar 8		
Curado	8.900	4,2
Procesado posteriormente	8.900	1,4
Doina 211		
Curado	4.200	6,1
Procesado posteriormente	4.500	3,3
Tabaco utilizados en la manufactura de cigarrillos mezclados de Moldova		
Burley 320		
Curado con aire	8.900	8,2
Procesado posteriormente	8.100	1,2
Virginia 401		
Curado	17.000	46
Procesado posteriormente	16.000	4,2

ND - No detectado

IV.7. I. Stepanov, J. Jensen, D. Hatsukami, S.S. Hecht, en EEUU, Año 2007. [39]

Determinaron los niveles de las nitrosaminas específicas del tabaco, alcaloides, aniones, hidrocarburos aromáticos policíclicos y aldehídos volátiles en nuevas marcas de tabaco sin humo en EEUU, para compararlas con los tabacos de mascar tradicionales. Los productos fueron comprados en tiendas minoristas entre agosto de 2006 y agosto de 2007. Las nuevas marcas fueron compradas en Indianápolis, Dallas, Austin, y el producto sueco fue comprado en una empresa de ese país llamada "Snus Worldwide", mientras que los tradicionales fueron adquiridos de minoristas en Minneapolis. Un paquete o lata de cada producto fue comprado, sellado en una bolsa plástica y refrigerado hasta el análisis. La determinación de

nitrato, nitrito y otros aniones se realizó por cromatografía iónica, de la misma manera que Stepanov en 2005.

Como se observa en la tabla 7, los niveles de nitrito en los nuevos productos fueron en promedio de 0,003 mg/g, mientras que en el tabaco sin humo tradicional fueron diez veces mayores. En el caso del nitrato, sus niveles promedio en los tabacos sin humo tradicionales fueron de 6,82 mg/g, aproximadamente tres veces mayores al del promedio de los niveles de los nuevos productos.

Tabla 7. Nitrato y nitrito en distintas marcas de tabaco sin humo.

Producto	NO ₃ ⁻ (mg/g)	NO ₂ ⁻ (mg/g)	Producto	NO ₃ ⁻ (mg/g)	NO ₂ ⁻ (mg/g)
Productos Nuevos			Productos Tradicionales		
Taboka			Rapé General	4,62	0,004
Original	0,827	0,004	Rapé Copenhagen	6,60	0,011
Verde	1,09	0,004	Corte largo Copenhagen	7,93	0,055
Rapé Marlboro			Corte largo Skoal	7,96	0,045
Rico	1,71	ND	Kodiak verde de invierno	6,97	0,035
Dulce	1,54	ND			
Picante	1,69	0,003			
De menta	1,58	0,003			
Rapé Camel					
Original	3,79	ND			
Picante	3,79	0,007			
Helado	3,20	0,003			
Skoal seco					
Regular	1,59	0,001			
Cinnamon	1,42	0,001			
Mentol	1,25	0,0005			
Promedio de productos nuevos	1,96	0,003	Promedio de productos tradicionales	6,82	0,030

ND- No detectado

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método para la extracción y posterior cuantificación de nitrito y nitrato en muestras de tabaco sin humo de consumo nacional, conocidas como chimó. La importancia para la determinación de dichos aniones, radica en que son precursores de la formación de nitrosaminas, compuestos con características dañinas para la salud. Para su cuantificación, se empleó la cromatografía iónica, ya que es una técnica de análisis simultáneo, sensible y de fácil adaptación para el manejo de grandes cantidades de muestra.

V.2. Objetivos Específicos

- **Muestra modelo.** Ya que no se disponía de un estándar certificado de chimó, se preparó una muestra modelo, y en base a ella se hicieron las diferentes modificaciones del método de extracción y cuantificación, hasta lograr la optimización en la determinación. Para ello, se homogeneizó una cantidad lo suficientemente grande de la marca de mayor consumo nacional “El Tigrito”.
- **Condiciones cromatográficas preliminares.** En base a la bibliografía revisada, se estudiaron las particularidades cromatográficas de separación y cuantificación de nitrato y nitrito, para posteriormente adaptarlas a nuestras condiciones instrumentales, hasta lograr una separación exitosa. Para ello, se emplearon patrones puros de nitrito y nitrato.
- **Condiciones cromatográficas definitivas.** Con una extracción preliminar de la muestra modelo se evaluó la separación con las condiciones cromatográficas previamente establecidas, de manera de estudiar si existe

alguna interferencia en las bandas de interés. Se evaluaron las figuras de mérito para la separación cromatográfica.

- **Optimización de tratamiento de muestra.** En base a la bibliografía revisada, se estudiaron las diferentes condiciones de extracción y se adaptó aquella que se ajustó mejor a las condiciones operativas de nuestro laboratorio, en función de reactivos, tiempo, simplicidad, exactitud, reproducibilidad, etc. Se evaluaron las figuras de mérito del sistema tratamiento de muestra y medida.

- **Análisis de muestras.** Se determinaron las concentraciones de nitrato en doce marcas de chimó.

Una vez planteados los objetivos de esta investigación, a continuación se indicarán la instrumentación y equipos utilizados, además de los estudios realizados en la determinación de nitrato y nitrito en chimó.

VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

VI.1. Materiales y Equipos utilizados

VI.1.1. Equipos

- *Cromatógrafo Iónico*. Ensamblado con distintos módulos cromatográficos y la configuración de la adaptación de los mismos se muestra en la figura 11. Sus características instrumentales se señalan en la tabla 8.

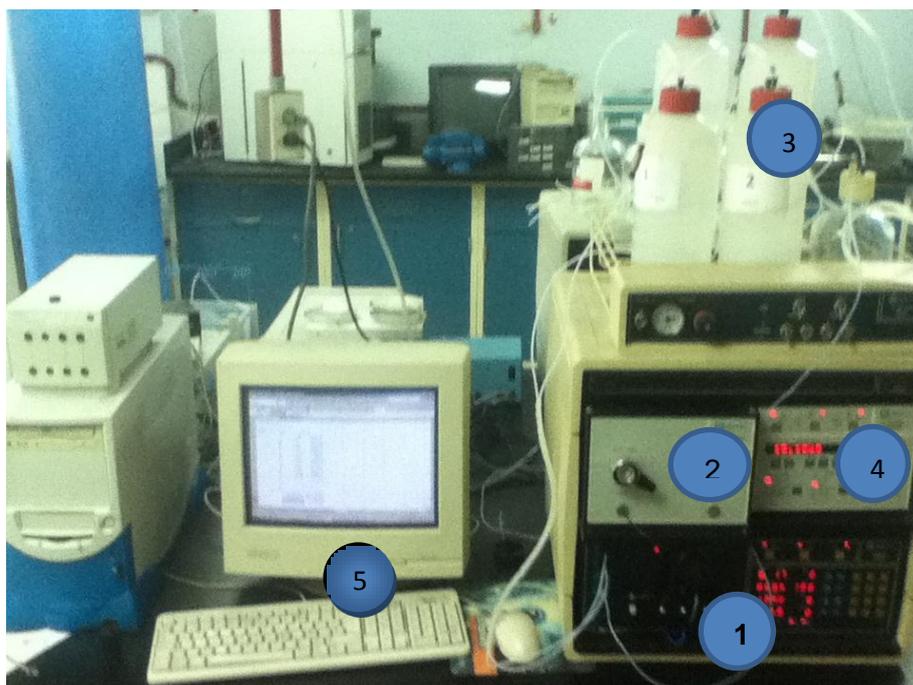


Figura 11. Cromatógrafo Iónico Dionex. 1- Bomba, 2- Sistema de Inyección, 3- Reservorios de Eluentes, 4- Detector de Conductividad, 5- Sistema de Adquisición de Data.

Tabla 8. Características del Cromatógrafo Iónico

Bomba	Bomba Avanzada de Gradiente. Dionex.
Sistema de Inyección	Inyección manual, Válvula Rheodyne (Modelo 9125) Volumen de inyección de material Peek
Supresión Química	Micromembrana aniónica (Modelo AMMS-II). Dionex. Flujo de 3 mL/min de H ₂ SO ₄ 50 mN.
Eluentes	1- Agua grado 18 MΩ, Tipo I. Especificaciones ASTM 1193. 2- NaHCO ₃ / Na ₂ CO ₃ (1,7 mM / 1,8 mM) 3- NaOH 5 mM
Detector	Detector Electroquímico de Pulso (PED-2). Modo de Conductividad. Dionex.
Sistema de Adquisición de los Data	Cromat V.1.2.0.13. Sistemas Xagasoftware C.A.

➤ *Columnas utilizadas*

Tabla 9. Columnas utilizadas en la investigación

Columna	Diámetro de Partícula (μm)	Capacidad de la columna (μeq/columna)	Grupo Funcional	Hidrofobicidad
Dionex IonPac AS4A-SC (2 mm de diámetro – 250 mm de largo)	13	20	Amonio Cuaternario	Media-Baja
Dionex IonPac AS4A-SC (4 mm de diámetro – 250 mm de largo)	13	5	Amonio Cuaternario	Media-Baja
Dionex IonPac AS11 (4 mm de diámetro – 250 mm de largo)	13	45	Amonio Cuaternario	Muy Baja

- *Ultrasonido*. Cole - Parmer. Modelo 8890. Figura 12.



Figura 12. Ultrasonido Cole-Parmer, Modelo 8890

- *Ultracentrífuga*, modelo ICE Central CL2. Thermo Electron Corporation. Figura 13.



Figura 13. Ultracentrífuga, modelo ICE Central CL2

- Desionizador de agua, Marca Barnstead, Modelo NANOpure. Figura 14.



Figura 14. Desionizador de agua

- Liofilizador Labconco, Modelo Freezone 6. Capacidad para 12 muestras, opera a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a una presión de 0,293 mbar. Figura 15.



Figura 15. Liofilizador de muestras

VI.1.2. Reactivos Utilizados

- Agua Grado 18 MΩ, Tipo I. Especificaciones ASTM 1193.
- Patrón de Nitrato de Sodio (NaNO_3) al 99,0 % de pureza. Merck.
- Patrón de Nitrito de Sodio (NaNO_2) al 99,0 % de pureza. Merck.
- Patrón de Cloruro de Sodio (NaCl) al 99,8 % de pureza. Fisher Scientific
- Patrón de Fluoruro de Sodio (NaF) al 99,0 % de pureza. BDH Chemicals Ltd.
- Patrón de Sulfato de Sodio (Na_2SO_4) al 99,0 % de pureza. Riedel-De Haen
- Patrón de Bromuro de Sodio (NaBr) al 99,5 % de pureza. J.T. Baker Chemical Co.
- Patrón de Hidrógenofosfato de Sodio (Na_3HPO_3) al 99,0 % de pureza. Químicas RB Lab. Biotecnoquímica.
- Patrón de Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3) al 99,5 % de pureza. Merck.
- Patrón de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) al 99,5 % de pureza. Riedel-De Haen.
- Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) al 85 %.
- Ampollas de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,1 M. Riedel-De Haen, Fixanal.
- Gas N_2 de alta pureza. AGA gases industriales de Venezuela.
- Material de Empacado de Columna C_{18} /Corasil de 37-50 microns, para cromatografía en fase inversa. Waters Associates, Inc.

VI.1.3. Muestras de chimó analizadas

- Marcas de chimó facilitadas por el Laboratorio de Análisis de Derivados de Tabaco de la Unidad de Fármaco y Toxicología del Instituto "Rafael Rangel" de la Universidad Central de Venezuela:

- **Matheus**

Marcelino Matheus D. La Fría, Edo. Trujillo RIF V- 048286292-5

- **San Benito (Caja y bolsita)**
Suarez Q. La Fría, Edo. Trujillo. RIF V-10038223-3
 - **Chain**
Sabor criollo. La Fría, Edo. Trujillo-Valera. RIF V-02614464-3
 - **San Francisco**
No posee información.
 - **Matheitos**
Luis Matheus, Valera, Edo. Trujillo. RIF V-04058878-3
 - **Tigrito**
Avelino Molina, Vía Quíbor, Edo. Lara. RIF J-09028158-4
 - **Tigrito Ice**
Avelino A. Molina, Barquisimeto, Edo. Lara. RIF J-09028158-4
 - **El Águila**
Mendoza. La Fría, Edo. Trujillo
- Marcas adquiridas en una distribuidora en San Felipe, Edo. Yaracuy:
- **Taparo**
Hnos. Gutiérrez Prado. Comercializado por Dist. El Cacique CA.
RIF J-30517242-0
 - **La Chinata**
La Chinata C.A. 0273-5325948, Edo. Barinas.

VI.2. Acondicionamiento del Cromatógrafo Iónico y Condiciones Cromatográficas Preliminares

Para el ensamble del cromatógrafo iónico se disponía de diversos módulos cromatográficos, tales como reservorios de eluentes, sistemas de presurización, tuberías, bombas, sistema de inyección, supresor y detector de conductividad iónica, interfaz, sistema de adquisición de datos, etc. Se escogieron los módulos más idóneos y se establecieron todas las conexiones eléctricas y de tuberías, asegurando la operatividad de los mismos, de manera tal que no existiesen fallas en el sistema acoplado. Una vez comprobadas todas las condiciones de operación se procedió a probar distintas columnas de intercambio aniónico.

El laboratorio disponía de tres tipos columnas para intercambio aniónico (Dionex IonPac AS4A-SC de 2 y 4 mm de diámetro interno respectivamente y Dionex IonPac AS11 de 4 mm de diámetro interno). Sin embargo, éstas habían sido previamente usadas y mantenidas inactivas por un período largo de tiempo. Al desconocer el estado de éstas, se procedió a evaluar sus condiciones operativas, a manera de escoger cual de ellas se adapta mejor para el análisis de las muestras.

VI.2.1. Columna de Intercambio Aniónico IonPac AS4A-SC (2 x 250) mm

Esta columna fue diseñada por la Dionex, para el análisis de aniones inorgánicos en un lapso relativamente corto (aproximadamente 8 minutos), usando eluentes de carbonato-bicarbonato de sodio.

La gran ventaja de estos eluentes es que no requieren tanta precaución para evitar la contaminación por dióxido de carbono proveniente del aire, en comparación con los otros eluentes empleados, como es el caso del hidróxido de sodio.

Se escogió primero la columna con el diámetro interno menor, ya que este parámetro es determinante en la carga y eficiencia de la columna. Una columna de diámetro interno menor se caracteriza por el aumento de la sensibilidad y la minimización del consumo de eluente.

Tomando como referencia el manual de la columna, se utilizó una elución isocrática con las condiciones para el test de columna. El eluente empleado fue 1,8 mM de Na_2CO_3 / 1,7 mM de NaHCO_3 a un flujo de 0,5 mL/min y un volumen de inyección de 12,5 μL . Los aniones a analizar en orden de elución fueron: 1. Fluoruro (F^-), 2. Cloruro (Cl^-), 3. Nitrito (NO_2^-), 4. Nitrato (NO_3^-), 5. Bromuro (Br^-), 6. Sulfato (SO_4^{2-}) y 7. Orto-fosfato (PO_4^{3-}).

El principal interés de nuestro análisis está enfocado en el nitrito y el nitrato, sin embargo, hicimos énfasis en los primeros 5 aniones, ya que de acuerdo a las condiciones de la columna pudieran interferirse, mientras que el sulfato y el orto-fosfato salen a tiempos de retención posteriores a los analitos de interés. El cromatograma del test de columna del fabricante se muestra en la figura 16.

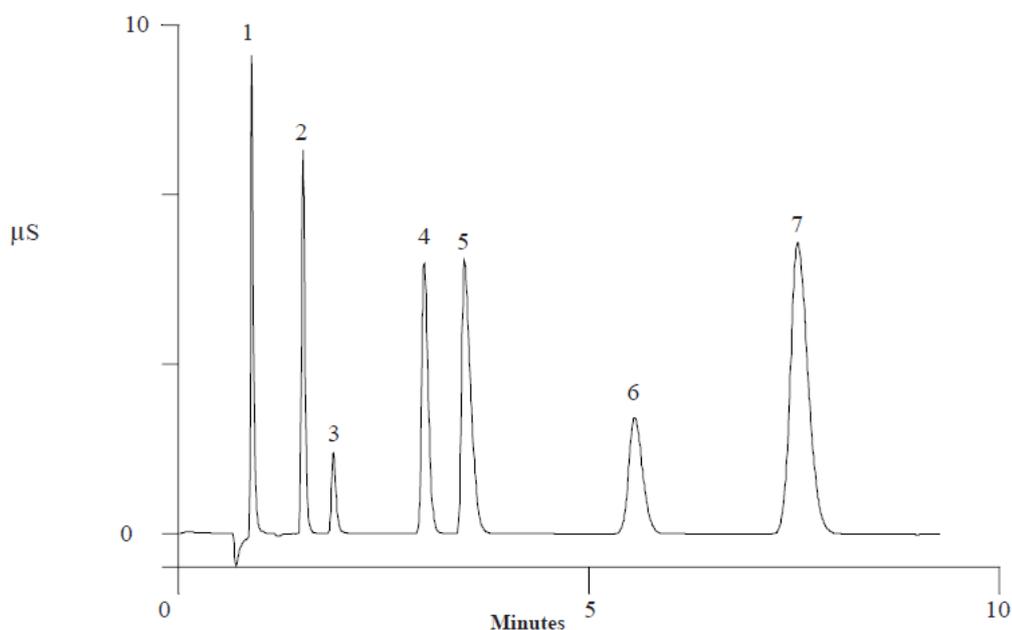


Figura 16. Cromatograma del Test de Columna

Seguidamente, se procedió a preparar un patrón multielemental con los siete aniones antes mencionados, a partir de estándares puros, a manera de evaluar el estado de la columna. Se obtuvo el cromatograma mostrado en la figura 17.

Las bandas cromatográficas presentaron tiempos de retención bajos en comparación al test, el tiempo total de análisis fue de 3 minutos aproximadamente en comparación con los 8 minutos del test, lo cual conllevó a una resolución baja. A pesar de que se inyectaron siete aniones, solo se observaron 5 bandas, de las cuales, las primeras tres están solapadas. Enfocándose en los aniones de interés, el nitrito presentó un completo solapamiento con el cloruro y el nitrato con el bromuro.

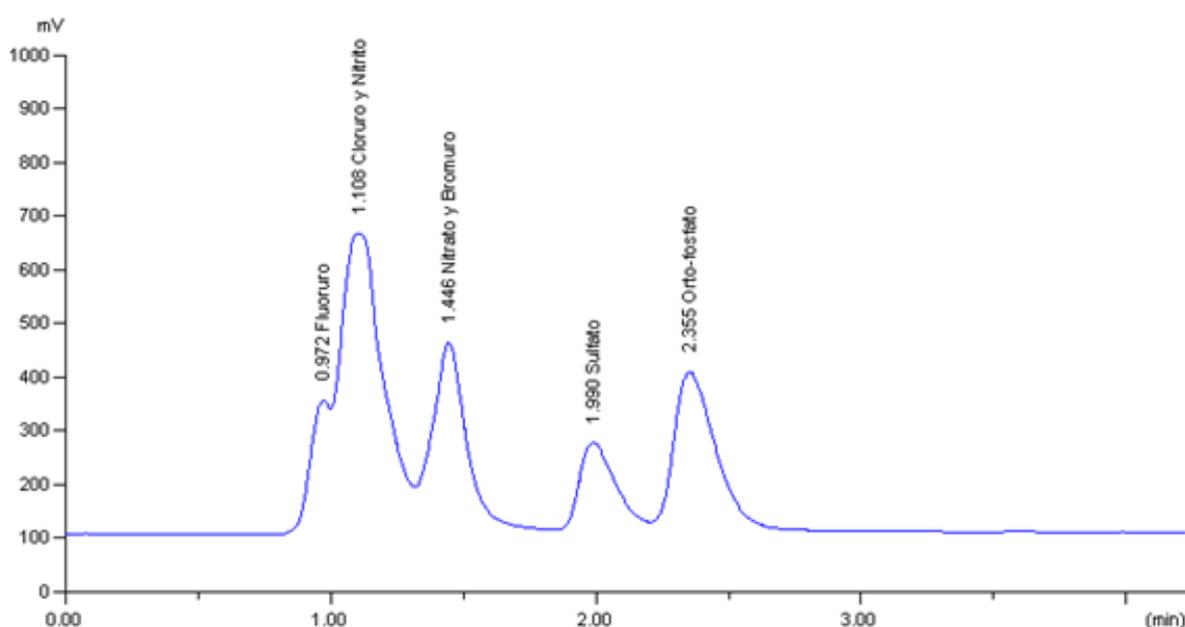


Figura 17. Cromatograma de muestra de varios aniones con columna AS4A-SC (2 mm)

Las variaciones en el flujo y composición de la fase móvil no condujeron a resultados mejores. Debido a la ineficacia mostrada por la columna, se realizó un procedimiento de limpieza, para ello, se pasó agua desionizada por 15 minutos a través de todo el sistema, para evitar la incompatibilidad entre el solvente utilizado para el análisis y los utilizados para la limpieza. Se empleó HCl 1 M, para la limpieza de los

contaminantes solubles en ácido y NaOH 0,5 M para los contaminantes solubles en base, durante un tiempo aproximado de 30 minutos.

La limpieza de la columna produjo resultados pocos satisfactorios, ya que no condujo a un mejoramiento en la resolución. Esto indicó que la columna no estaba en las condiciones adecuadas de trabajo.

VI.2.2. Columna de Intercambio Aniónico IonPac AS4A-SC (4 x 250) mm

Seguidamente, en base a la disponibilidad se procedió a probar una columna del mismo tipo, pero de 4 mm de diámetro interno y se colocaron las condiciones de operación de columna indicadas en el test anterior, pero a diferencia, reporta un flujo de 2,0 mL/min y volumen de inyección de 50 µL.

Esta columna arrojó mejores resultados, sin embargo, la resolución de los picos de interés sigue siendo baja, como se observa en la figura 18, que para efectos prácticos solo se muestran las cinco primeras bandas.

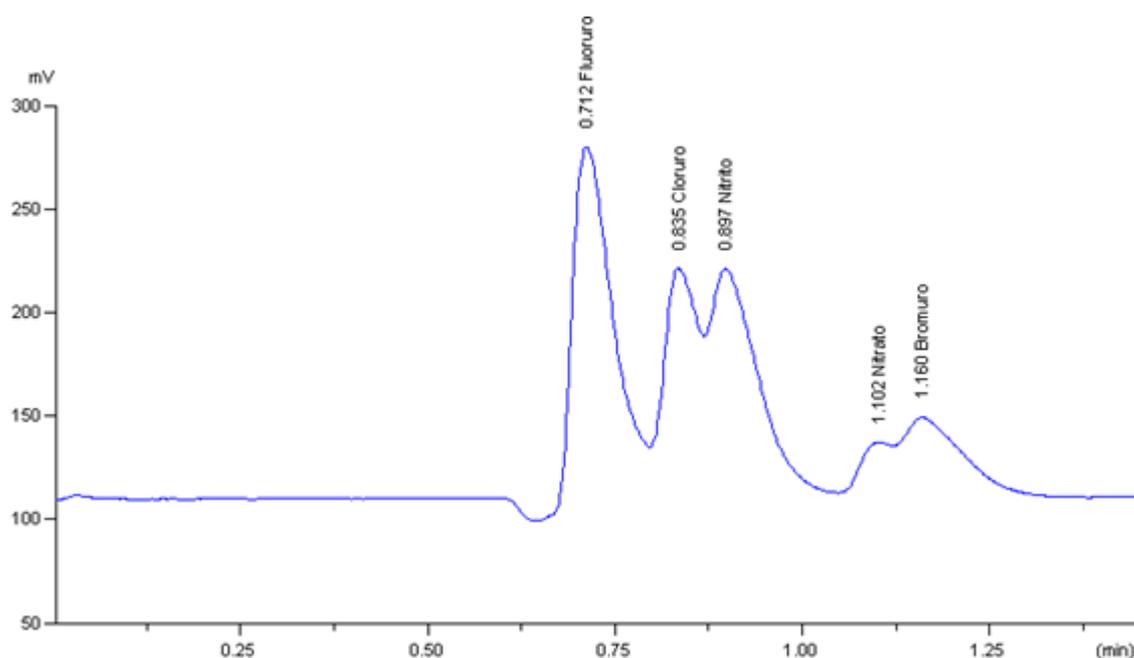


Figura 18. Cromatograma de muestra de varios aniones con columna AS4A-SC (4 mm) a flujo de 2,0 mL/min

En esta ocasión, se pudieron reconocer las bandas de los aniones de interés, ya que el solapamiento de las mismas no fue completo. El cloruro sigue solapado con el nitrito, mientras que la del nitrato con la del bromuro.

Esto indicó que las columnas que emplean el eluente carbonato-bicarbonato no se encontraban en condiciones adecuadas para el análisis.

VI.2.3. Columna de Intercambio Aniónico IonPac AS11 (4 x 250) mm

Esta columna está específicamente diseñada para resolver una gran cantidad de iones inorgánicos y orgánicos utilizando NaOH como fase móvil y generalmente con gradientes, además de ser ideal para aniones altamente cargados. Es estable para pH entre 0 y 14, siendo compatible con eluentes orgánicos.

Para comprobar su estado, se tomó como referencia el test de columna. El eluente utilizado es 12 mM de NaOH, a un flujo de 1,0 mL/min, con un volumen de inyección de 10 μ L. Los aniones a analizar en orden de elución fueron: 1. F^- , 2. Cl^- , 3. NO_2^- , 4. NO_3^- , 5. Br^- , 6. SO_4^{2-} . El cromatograma de este test se presenta en la figura 19.

Para evaluar la resolución entre los aniones de interés, decidimos descartar el bromuro, ya que es de esperar que no se encuentre en las muestras de chimó, y el sulfato y orto-fosfato por sus largos tiempos de retención. En base a esto, las pruebas se enfocaron en evaluar la resolución entre fluoruro, cloruro, nitrito y nitrato.

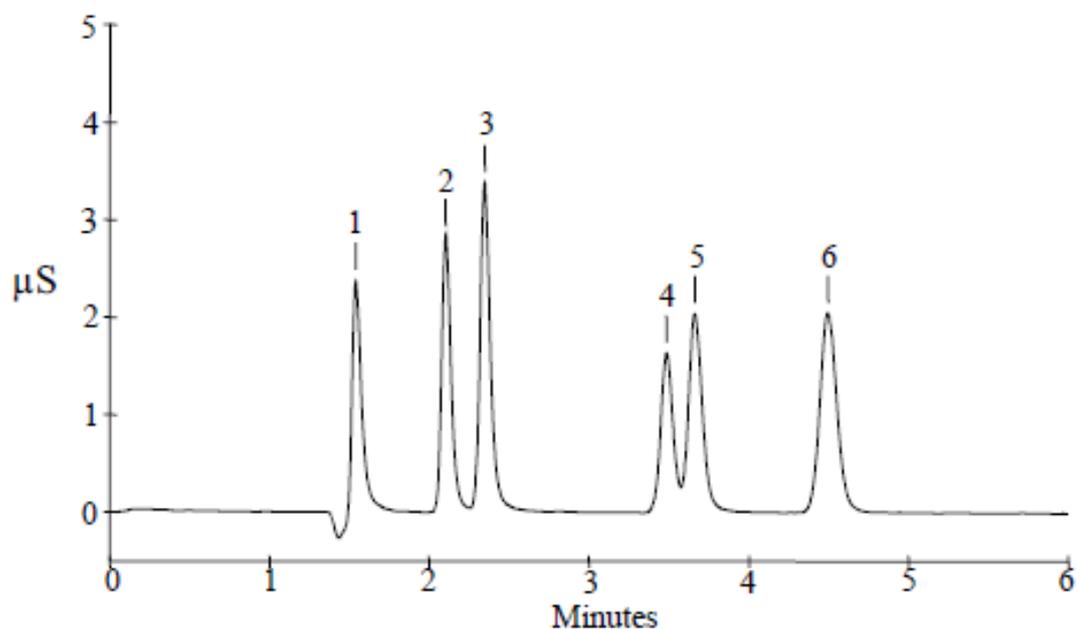


Figura 19. Cromatograma de test de Columna AS11

Se colocaron las condiciones de eluente y flujo previamente mencionadas, sin embargo, esto no llevó a resultados satisfactorios, así que se ajustó la composición y flujo de fase móvil, hasta obtener la mejor resolución. Las condiciones cromatográficas se muestran en la tabla 10 y el respectivo cromatograma en la figura 20.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas establecidas

Flujo de eluente	1,7 mL/min
Composición de NaOH	5 mM
Volumen de Inyección	10,0 µL

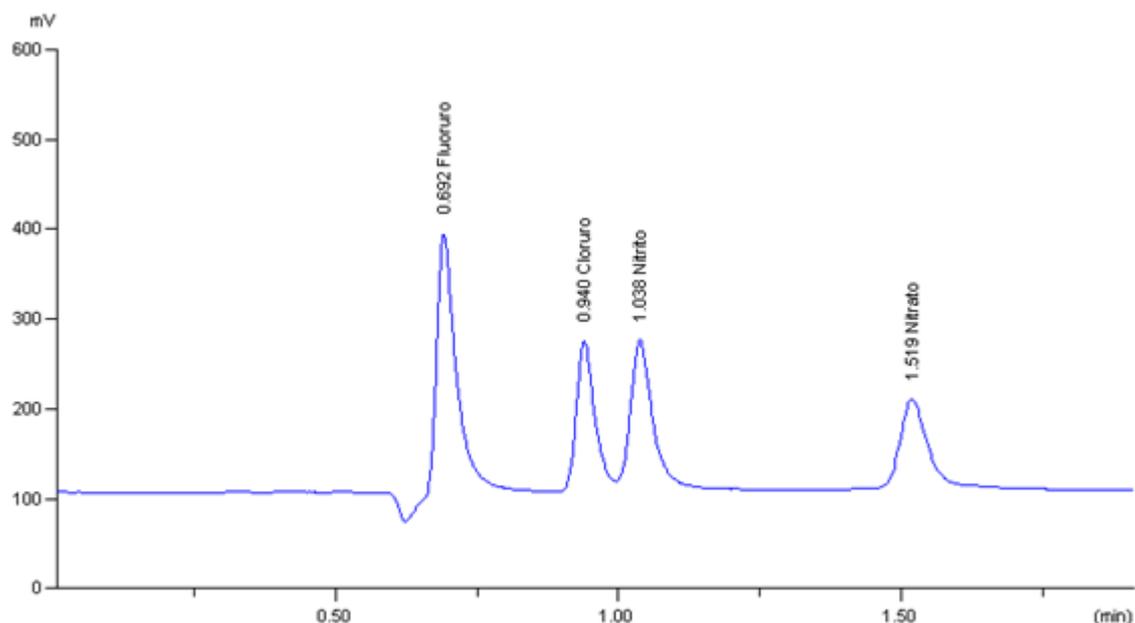


Figura 20. Cromatograma con condiciones cromatográficas preliminares.

A pesar que las condiciones de la columna, en cuanto a los tiempos de retención no son iguales a los reportados en el test, la resolución del nitrato fue bastante satisfactoria. Sin embargo, como se observó que las bandas del cloruro y nitrito estaban próximas, se determinó la resolución entre ellos, obteniéndose un valor de 2,7, lo que indica que se produjo una separación completa de las bandas. De esta manera, se logró la separación exitosa de los aniones de interés (nitrito y nitrato), y estas condiciones cromatográficas fueron establecidas como las preliminares.

Una vez obtenidas las condiciones cromatográficas preliminares, éstas fueron evaluadas en una muestra real, con la finalidad de determinar si pudiera existir una interferencia de algún componente de la muestra con las bandas de los analitos de interés.

VI.3. Condiciones Cromatográficas definitivas

Para realizar la extracción preliminar, se procedió a elaborar una muestra modelo, que posteriormente se utilizó para ensayar diversas metodologías de extracción, de manera de optimizar la determinación de nitrato y nitrito. Para su elaboración, se utilizó la marca de mayor consumo nacional “El Tigrito”. Inicialmente se elaboró de la siguiente manera:

1. Se procedió a homogenizar una porción conformada por 10 latas de 18 g cada una (no hubo garantías de que se tratasen de un mismo lote).
2. Se sometieron a un baño de vapor (calentamiento indirecto por convección térmica) y de esta manera hacerlas más blandas, maleables y fluidas con el objetivo de mezclarlas y homogeneizarlas.
3. Al momento del análisis, esta muestra modelo era calentada en baño de vapor, para disponer de la cantidad requerida.

Sin embargo, con el tiempo de uso y los múltiples calentamientos, la muestra fue cambiando su apariencia física. Se iba haciendo más viscosa, una especie de vitrificación. Esto posiblemente se debió a la presencia de una cantidad significativa de azúcares, ya que la base del chimó lleva un alto contenido de melaza. Estos cambios en la composición del chimó pudieran afectar los futuros resultados.

Para solucionar este problema, se mantuvieron los pasos 1 y 2 mencionados anteriormente y se aprovechó el calentamiento de la etapa 2, para fraccionar la muestra en cantidades aproximadas para el análisis. Estas porciones fueron conservadas en refrigeración, hasta el momento de utilizarlas.

Para el estudio de las condiciones cromatográficas definitivas se realizó una extracción preliminar, pesando una cantidad determinada de la muestra modelo y realizando una extracción asistida por ultrasonido con 10 mL de agua desionizada.

A continuación el extracto es filtrado e inyectado en las condiciones cromatográficas preestablecidas. Esta muestra satura la señal, por lo que produce bandas muy anchas. La alta cantidad de cloruro que produjo un solapamiento en la zona correspondiente al tiempo de retención del nitrito. Mientras que la banda del nitrato se observó completamente resuelta. Este hecho se ve reflejado en la figura 21, donde se comparó el cromatograma obtenido, con el cromatograma de los patrones puros (figura 20).

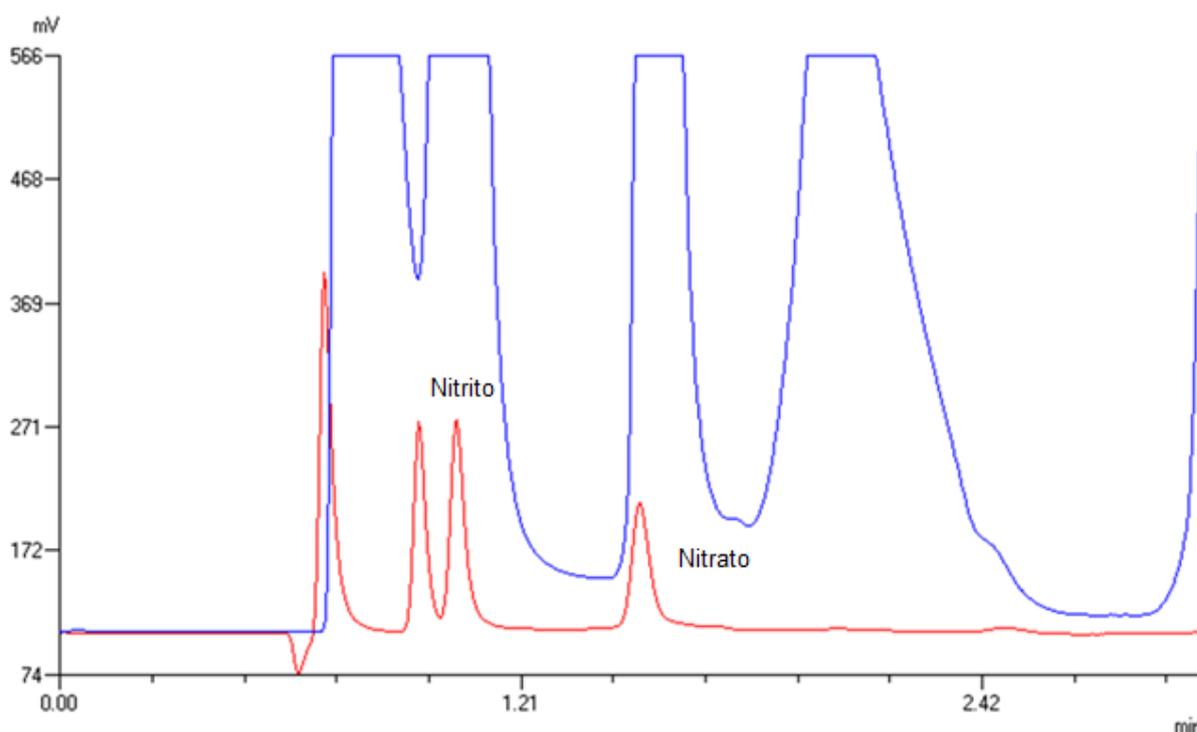


Figura 21. Comparación de los cromatogramas: **Cromatograma de extracción preliminar (azul), Cromatograma de mezcla de patrones, F⁻, Cl⁻, NO₂⁻ y NO₃⁻, en orden de elución (rojo).**

Para resolver este problema, se procedió a realizar diluciones del extracto de la muestra, observándose que a concentraciones de cloruro aceptables (a manera que su banda no sature el detector), la señal del nitrito no apareció como se observa en la figura 22. Este hecho se puede deber a dos factores: a que el nitrito desaparecía por efecto de la dilución o simplemente no se encontraba presente.

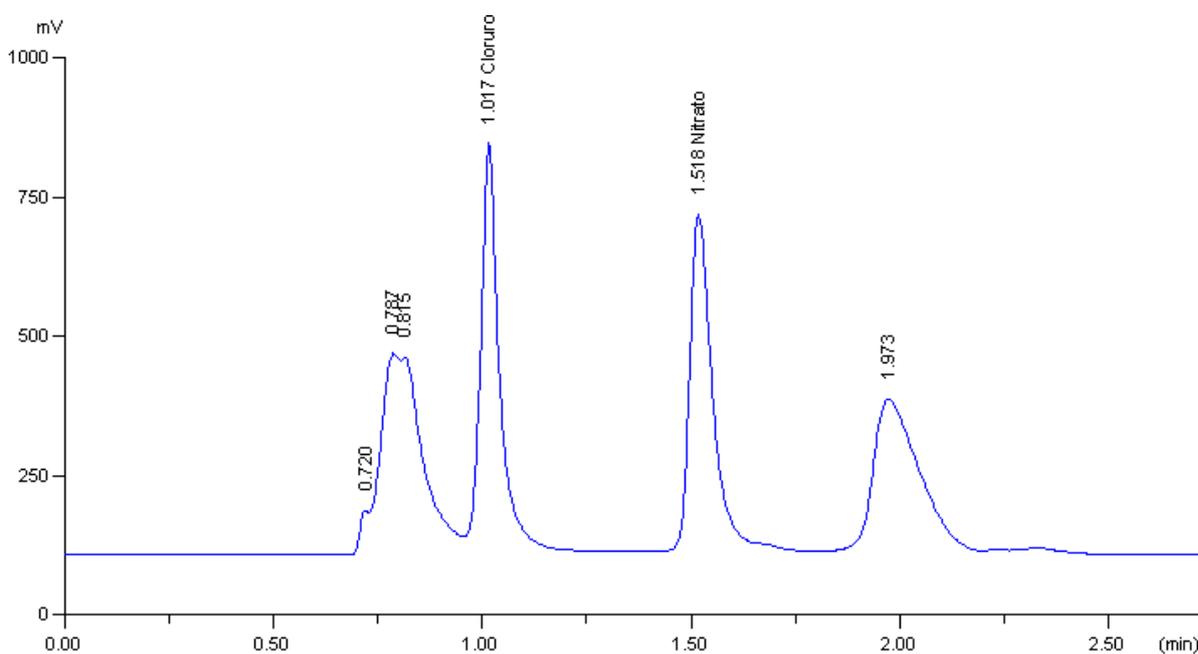


Figura 22. Cromatograma de extracto preliminar diluido

Ya que se desconoce la presencia nitrito en la muestra, se procedió a realizar los siguientes tratamientos: Eliminación de la interferencia de la banda del cloruro o transformar el nitrito a nitrato, de manera de cuantificar el nitrito por diferencia, si esta realmente presente.

Eliminación de la interferencia de la banda del cloruro

Para eliminar la interferencia producida por la alta cantidad del ión cloruro, se utilizó acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), de manera que el cloruro precipite como cloruro de plomo (PbCl_2).

Para ello se tomó una alícuota del extracto acuoso después de centrifugar y se le agregó una disolución de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, haciendo precipitar el PbCl_2 , se centrifugó nuevamente y se analizó el extracto acuoso. Al observar el cromatograma, se encontró una banda aún más grande, que solapaba la mayoría de los picos que aparecían, como se observa en la figura 23. Esta banda tan grande sin dudas se trata del ión acetato (CH_3COO^-). Por lo tanto, este método quedó descartado.

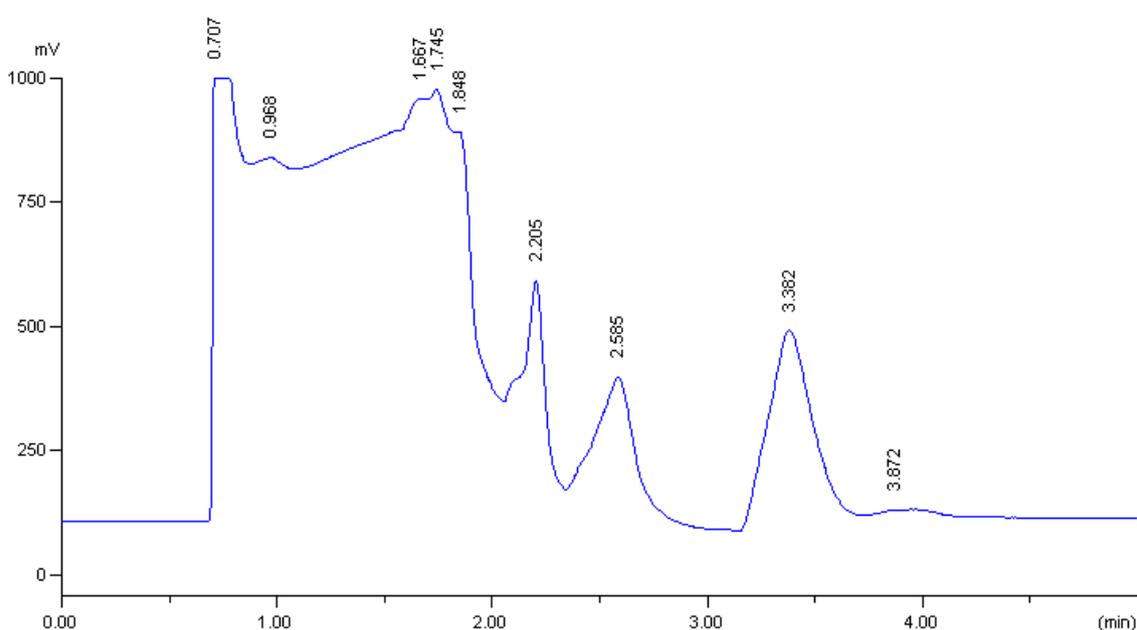


Figura 23. Cromatograma de ensayo con $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

Conversión del nitrito a nitrato

Para evaluar la presencia del nitrito, se procedió a emplear diversos agentes oxidantes a manera de convertirlo a nitrato y determinar su contenido por diferencia.

Para los ensayos en una primera etapa los agentes oxidantes se realizaron sobre patrones puros de nitrito y nitrato. De resultar satisfactorios serían aplicados sobre los extractos reales.

El primer oxidante empleado fue el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es un oxidante muy fuerte. El peróxido de hidrógeno produjo una distorsión importante en la línea base del cromatograma que afectó las bandas de interés. Por lo tanto, se descartó por su alto poder oxidante que pudiese afectar los eluentes y la matriz de la muestra.

Seguidamente, se utilizó permanganato de potasio ($KMnO_4$), que es un oxidante más débil. El $KMnO_4$ produjo la desaparición de la banda del nitrito en los patrones. Al utilizar una disolución moderada en la muestra modelo, el color morado del permanganato desapareció rápidamente, precipitando una gran cantidad de compuestos, entre ellos el MnO_2 . La muestra de chimó posee muchos componentes que pueden ser oxidados, así que sería necesario de una gran cantidad de este reactivo. Por otra parte, sería muy difícil de estimar la cantidad a emplear debido la heterogeneidad de las muestras de chimo.

Por lo resultados anteriores, estas pruebas fueron descartadas. No obstante, en muchas de las investigaciones consultadas, las concentraciones reportadas de nitrito en los productos de tabaco sin humo tienden a ser muy bajas o no detectadas por la instrumentación utilizada, debido posiblemente a que el nitrito es oxidado rápidamente en presencia de oxígeno y/o por procesos químicos o biológicos a nitrato, que termodinámicamente es la forma de nitrógeno más estable. Adicionalmente, en otras publicaciones se enfocan principalmente en solo determinar el nitrato y una referencia importante es la normativa canadiense (Health Canada), para el análisis de tabaco entero ^[34], que solo reporta el método para el nitrato, es decir no le dan importancia al nitrito.

Como se mencionó en la revisión bibliográfica ^[29], la importancia del nitrato dentro del organismo es que puede ser reducido a nitrito por acción microbológica, en medio ácido, junto a las aminas secundarias, siendo el principal precursor en la formación de nitrosaminas (compuestos potencialmente cancerígenos). Entonces, ya que las concentraciones nativas de nitrito en estos productos suelen ser muy bajas, resulta más trascendental el análisis del nitrato, que al encontrarse en

concentraciones mayores, pudiera ser una fuente importante en la producción de nitrito.

Por esta razón, esta investigación se enfocó exclusivamente en el análisis cuantitativo del nitrato en las diferentes marcas de chimó.

Ya que el nitrato analizado en la extracción preliminar no sufrió interferencias en su banda, las condiciones cromatográficas previamente establecidas quedaron como las definitivas. En la tabla 11 se muestran las condiciones cromatográficas definitivas y un cromatograma típico del extracto diluido se muestra en la figura 24.

Tabla 11. Condiciones cromatográficas definitivas

Columna utilizada	Columna de intercambio aniónico IonPac AS11 (4 x 250) mm
Flujo de eluente	1,7 mL/min
Composición de NaOH	5 mM
Supresor Químico	Micromembrana aniónica (Modelo AMMS-II). Dionex
Flujo de agente supresor	3 mL/min
Composición de H₂SO₄	50 mN
Volumen de Inyección	10,0 µL

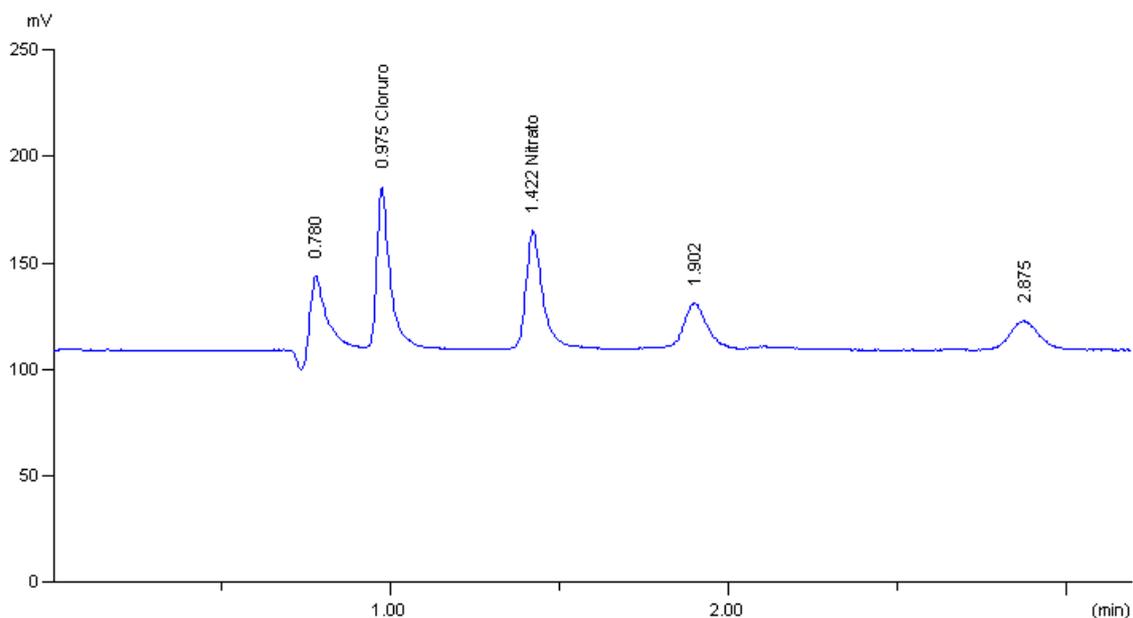


Figura 24. Cromatograma típico de la muestra modelo.

Bajo estas condiciones, el tiempo total de corrida fue de 6 minutos aproximadamente, para asegurar la salida de todos los componentes de la muestra. El nitrato eluyó a un t_R de 1,3 minutos aproximadamente.

Para evaluar el factor de retención k , que describe la velocidad de migración del analito en la columna, se empleó la siguiente expresión:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Donde t_R es el tiempo de retención y t_M es el tiempo muerto.

Ya que no se disponía de un compuesto no retenido por la fase estacionaria para determinar t_M , se decidió emplear el tiempo de retención producido por la dilución del eluyente por efecto del agua como solvente en la muestra (pico negativo de la figura 23).

Esta banda negativa se encuentra a los 0,738 minutos, mientras que el tiempo de retención del analito es de 1,375 minutos. Se obtuvo un k de 0,9. Es de esperar que los valores óptimos de k sean entre 1 y 10, por lo que el valor está por debajo del adecuado. Sin embargo, estos valores bajos de k son característicos en este tipo de columna, por la alta selectividad del detector y de la columna. Se estimó que el valor de k en el cromatograma del test de columna, mostrado en la figura 19, es aproximadamente de 1,3, que no es muy distinto al obtenido.

VI.4. Elaboración de la Curva de Calibración

Se evaluó el desempeño cromatográfico, inyectando réplicas de un mismo patrón de concentración moderada (aproximadamente 6 mg/L) y analizando su reproducibilidad a través del tiempo de retención y del área de la banda del nitrato. Los resultados se muestran en la tabla 12 y sus cromatogramas en la figura 25.

Tabla 12. Reproducibilidad de la Inyección

Replica	t_R (min)	Área
1	1,360	16541
2	1,377	16741
3	1,377	16889
4	1,375	16820
5	1,377	16786
6	1,375	16899
7	1,377	16658
8	1,377	16197
9	1,375	16127
10	1,375	16185
11	1,375	16214
Promedio	1,375	16551
S	0,005	310
CV	0,4 %	2 %

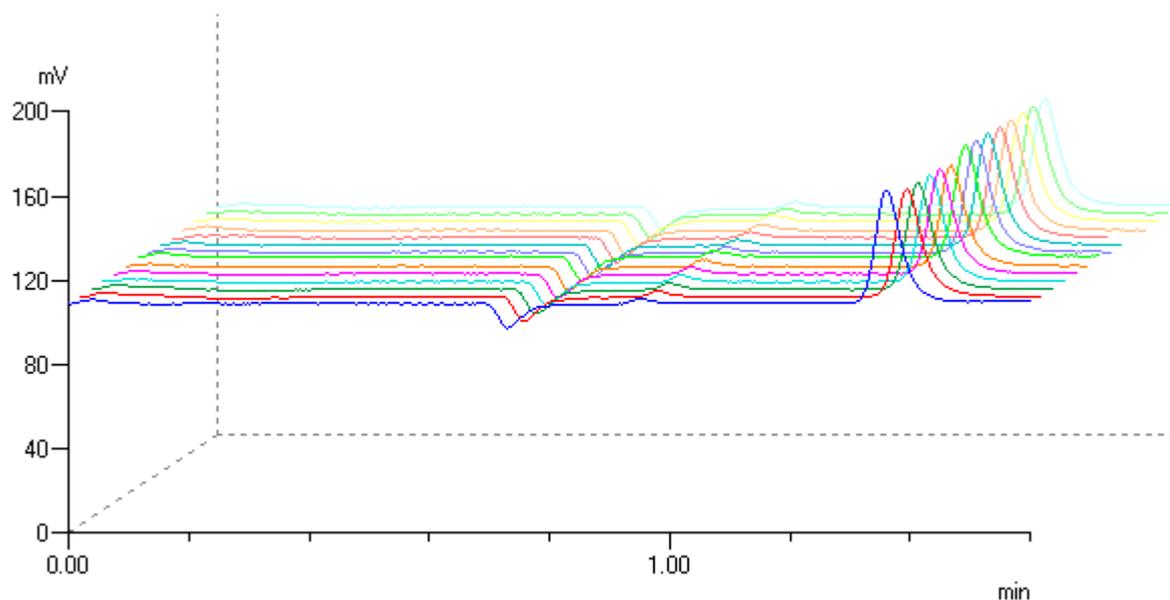


Figura 25. Reproducibilidad de la inyección

Como se pudo observar, la reproducibilidad del tiempo de retención es muy buena, con un excelente coeficiente de variación del 0,4 %, mientras que para el área del pico, se obtuvo una buena precisión, con un coeficiente de variación del 2 %, dentro de los valores aceptados para cromatografía líquida.

Como se utilizó la técnica de cromatografía iónica, que es un tipo de cromatografía líquida, se empleó un volumen fijo de inyección de muestra, el cual mostró una reproducibilidad bastante aceptable. Por lo que se aplicó el método de curva de calibración externa para la determinación cuantitativa del nitrato.

Para la elaboración de la curva de calibración del nitrato, se partió con un patrón puro de nitrato de sodio (NaNO_3). Así que se elaboró un rango de concentraciones sugerido por el manual de la columna de 5 a 100 mg/L.

Utilizando la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal, se procedió a realizar el cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) de la técnica cromatográfica.

Para el cálculo del LOD y el LOQ empleamos las siguientes respectivamente:

$$y_{LOD} = PC + 3 s_{Y/X} \qquad y_{LOQ} = PC + 10 s_{Y/X}$$

Donde y_{LOD} es la señal del LOD, y_{LOQ} corresponde a la señal del LOQ, PC es el punto de corte de la ecuación de la recta desarrollada por mínimos cuadrados y $s_{y/x}$ es la desviación estándar de dicha regresión o error típico.

Al sustituir el valor de las señales en la ecuación de la curva de calibración, se obtuvo que el LOD de la técnica cromatográfica fue de 0,3 mg/L y el LOQ de 2,0 mg/L.

Seguidamente se procedió a realizar la nueva curva de calibración desde 2 mg/L hasta 10 mg/L (El valor del 10 mg/L para efectos prácticos fue escogido arbitrariamente, no corresponde al límite de linealidad).

En la tabla 13 se muestran los valores de concentración y las áreas obtenidas y el ajuste por regresión lineal por mínimos cuadrados en la figura 26, con su respectivo análisis de residuales en la figura 27.

Tabla 13. Datos de Curva de Calibración de Nitrato

Concentración (mg/L)	Área de Pico
0	0
2,363	5538
2,363	5693
2,363	5922
4,84	11788
4,84	12361
4,84	11784
6,75	17335
6,75	17547
6,75	17490
8,8	22509
8,8	22547
8,8	23135
11,16	28731
11,16	28844
11,16	29203

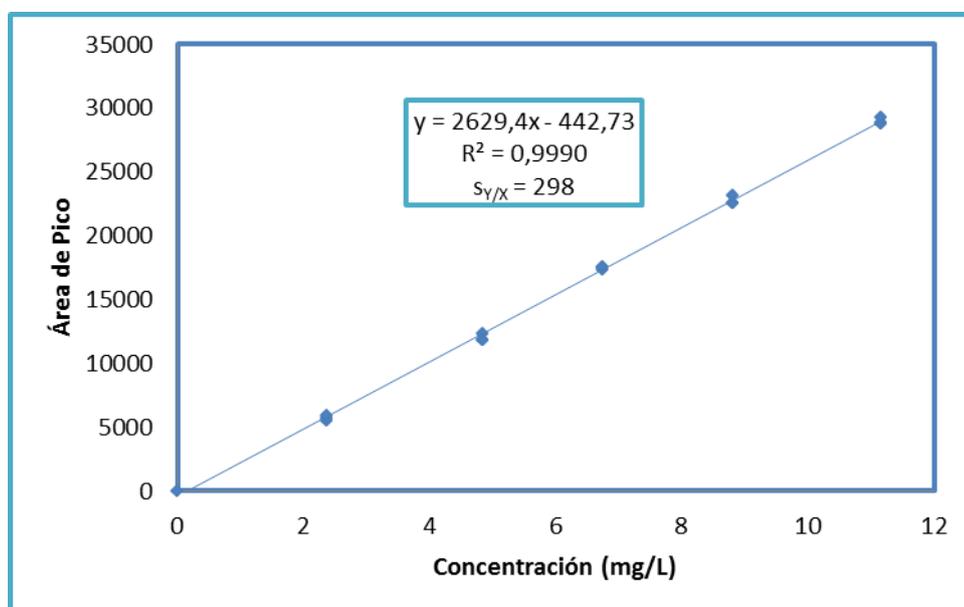


Figura 26. Curva de Calibración de Nitrato

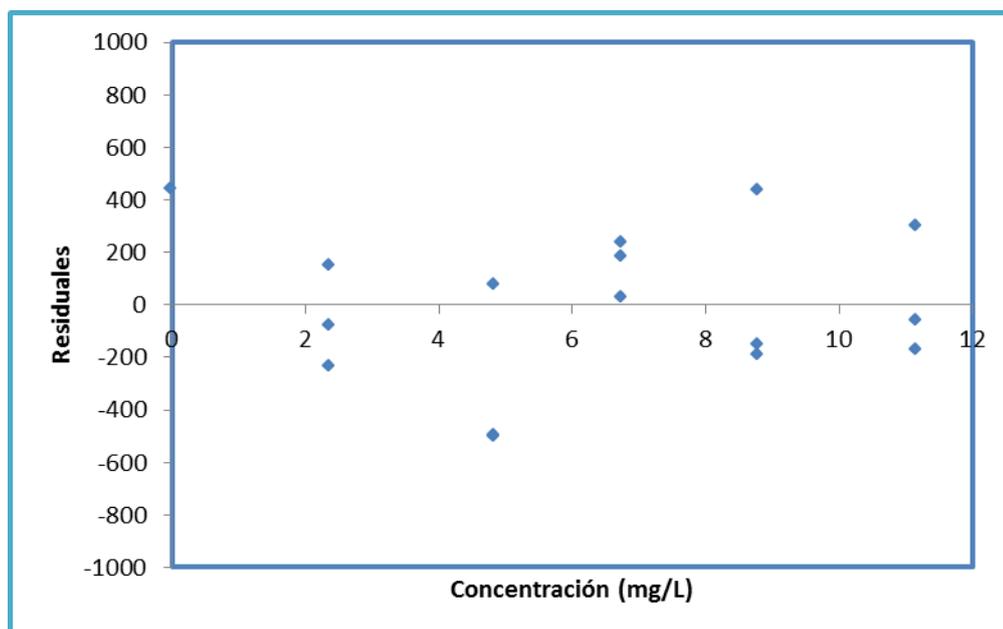


Figura 27. Análisis de Residuales

La recta presentó un coeficiente de regresión lineal bastante aceptable de 0,9990 y los residuales mostraron una distribución satisfactoria, variando aproximadamente entre 500 y - 500.

Una vez evaluados todos los parámetros instrumentales, nos referiremos acerca del método de tratamiento de la muestra.

VI.5. Método de tratamiento de muestra

Para el tratamiento de la muestra de chimó, se tomó como referencia la metodología, aplicada por I. Stepanov en 2005 y 2007 ^[37, 38, 39]. Un esquema de la misma se muestra en la figura 28.

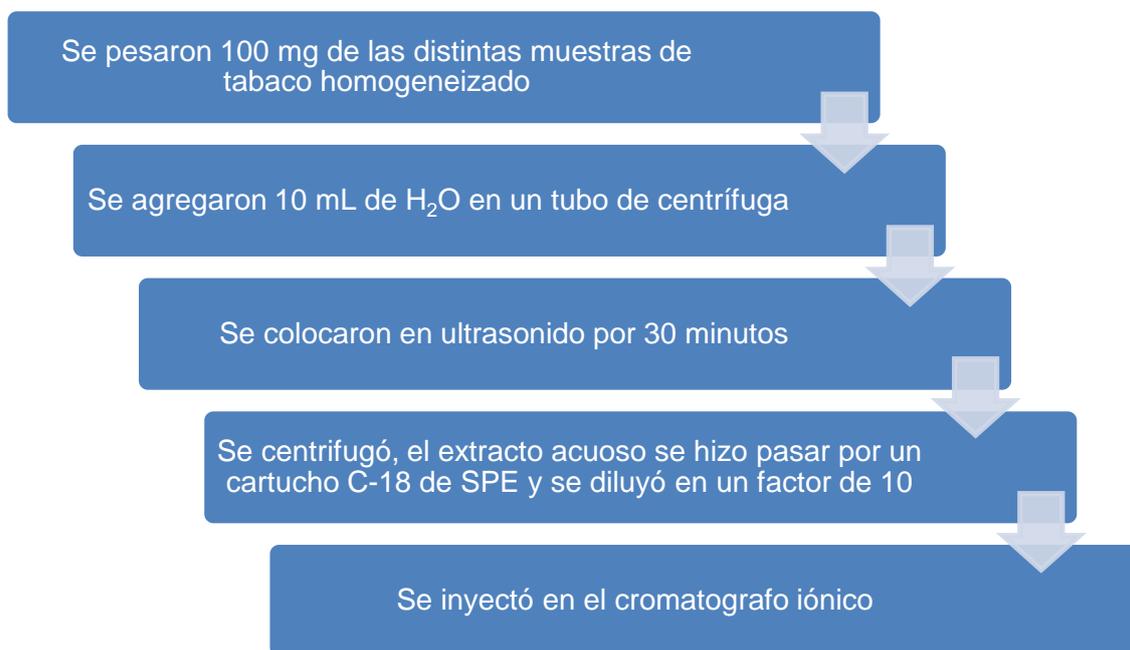


Figura 28. Esquema de metodología de I. Stepanov

Se estudiaron las diferentes fases de dicha metodología y se dividió en dos etapas:

1. Etapa de disgregado de la muestra y extracción del analito.
2. Etapa de limpieza por extracción en fase sólida (SPE).

VI.5.1. Etapa de disgregado de la muestra y extracción del analito

En la etapa correspondiente a la extracción, se encontraron diversas dificultades, motivado a que el chimó en la mayoría de los casos es una sustancia muy densa, pastosa y viscosa, por lo cual una porción de muestra forma una especie de bola compacta de difícil disgregación y extracción, inclusive con ultrasonido.

Para resolver esta problemática, se utilizó como referencia el método para el análisis de derivados del tabaco de la Organización de Salud de Canadá (Health Canada),

donde las muestras de tabaco eran liofilizadas. Esto busca mejorar la disgregación y extracción de la muestra.

Los ensayos realizados revelaron que se requirió de 48 horas para liofilizar completamente las muestras. Una vez liofilizadas, éstas pudieron ser pulverizadas, pero se debía trabajar rápidamente, ya que reabsorbían agua. Este hecho, junto a la gran cantidad de tiempo empleado en la liofilización hizo poco práctico el empleo de este tratamiento.

Sin embargo, a partir del proceso de liofilización surgió una mejora, ya que cuando se pulverizaba la muestra de chimó, aumentaba la superficie de contacto entre el sólido y el solvente, facilitando la disgregación de la misma. Por lo que surgió la idea de laminar las muestras de chimó, para aumentar el área superficial.

Para ello, se procedió a tomar una pequeña porción del chimó y se colocó entre dos placas metálicas con superficies altamente planas cubiertas de unas hojas de poliestireno de alta densidad y luego se sometió a compresión en una prensa manual, como se observa en la figura 29.

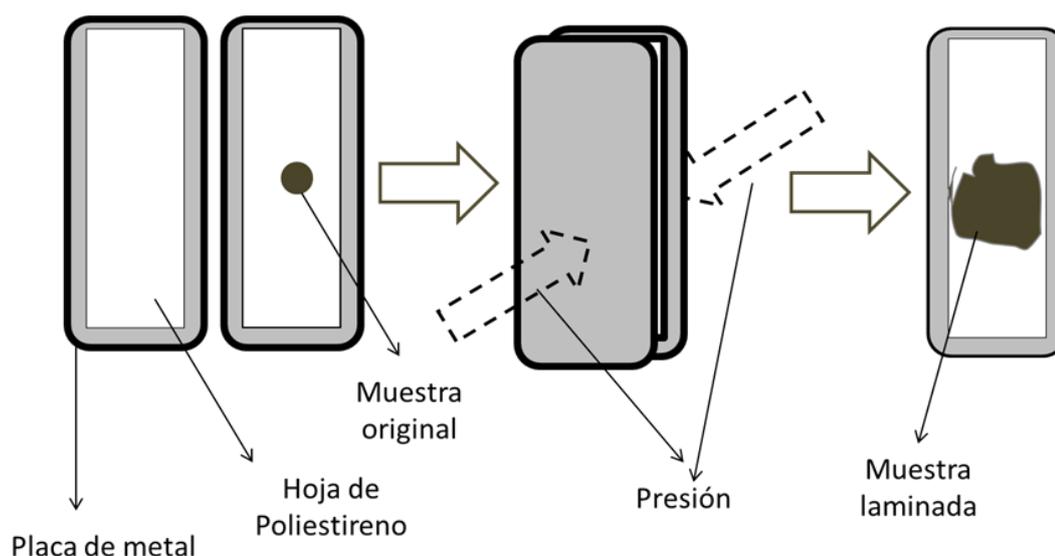


Figura 29. Proceso de laminado del chimó.

Las muestras laminadas de chimó quedan adheridas a las hojas de poliestireno y se mantienen refrigeradas hasta el momento de su análisis.

Para continuar con el ensayo, las muestras fueron desprendidas de las hojas de poliestireno con una espátula. Al disolverlas en agua, se mostró una mejoría en la disgregación y velocidad de disolución de ésta. Sin embargo, siempre quedaba un residuo insoluble, que posiblemente se tratara de partículas muy pequeñas de alquitrán, carbón y silicatos insolubles.

VI.5.2. Etapa de extracción en fase sólida (SPE)

Varias metodologías ^[37, 38, 39] y entre ellas la usada como referencia utilizan una extracción en fase sólida (SPE) con un cartucho de C-18. Esta extracción es utilizada para eliminar compuestos que podrían coeluir con el analito de interés, además de eliminar los componentes hidrofóbicos de las muestras, que podrían ocasionar daño en la columna.

A manera de comprobar esto, se prepararon dos extractos de la muestra modelo, y a una de ella se le realizó una SPE con un cartucho de C-18 y a la otra no. A partir de éstas, se obtuvieron los cromatogramas indicados en la figura 30.

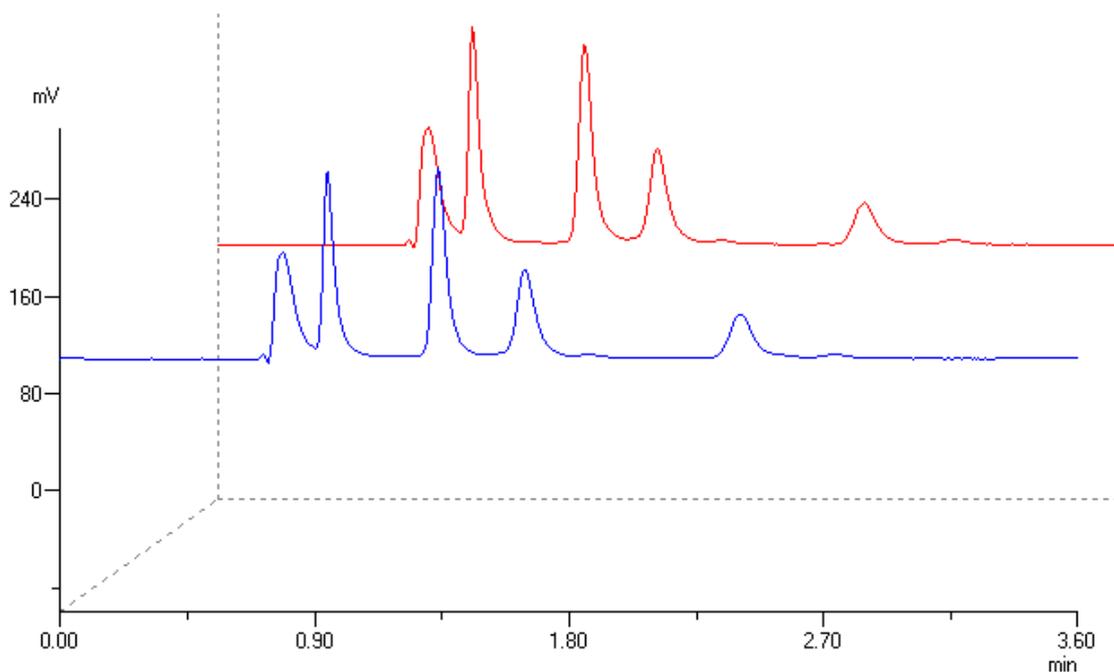


Figura 30. Comparación de cromatogramas. **Cromatograma de muestra modelo sin SPE con C-18;** **Cromatograma de muestra modelo con SPE con C-18**

Al observar los cromatogramas, se determinó que el empleo de la SPE no influye en las bandas cromatográficas, descartando la existencia de algún compuesto que pudiese coeluir con la banda de interés. Adicionalmente se descartó la presencia de compuestos hidrofóbicos que pudiesen dañar la columna, debido a que su composición debe ser mínima, ya que el chimó es un extracto netamente acuoso, altamente soluble en agua y por otra parte las muestras analizadas requieren una elevada dilución, porque poseen grandes cantidades de nitrato. Con este ensayo, se descartó la utilización de la SPE con un cartucho de C-18 para este tipo de muestras, reduciendo el tiempo de análisis y las posibles pérdidas de analito.

A continuación, se procedió a optimizar el tiempo de extracción asistida con ultrasonido.

VI.5.3. Optimización del tiempo de extracción asistida con ultrasonido

Se partió del tiempo en ultrasonido utilizado por I. Stepanov y colaboradores en 2005 y 2007 [37, 38, 39], que fueron de 30 minutos. Como el chimó es hecho a partir del extracto acuoso de la hoja de tabaco curada, es de esperarse que presente una mayor solubilidad en agua que los productos analizados en esas investigaciones, así que se consideraron los tiempos menores a 30 minutos.

Se evaluaron tres tiempos en ultrasonido: 30, 15 y 5 minutos. Todas las mediciones se hicieron con tres réplicas de muestra y mínimo tres inyecciones de cada una. Se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 14:

Tabla 14. Resultados de optimización de tiempo de ultrasonido

Réplica	Tiempo en ultrasonido (min)	Concentración de NO ₃ ⁻ (%)	Promedio (%)	s (%)
1	5	3,17	3,13	0,04
2		3,10		
3		3,13		
1	15	3,05	3,07	0,03
2		3,05		
3		3,10		
1	30	3,07	3,06	0,01
2		3,06		
3		3,06		

Al observar los resultados se encontró que la efectividad de la extracción del analito fue constante en los diferentes ensayos, por lo tanto, se consideró 5 minutos de extracción en ultrasonido como un tiempo óptimo.

Finalmente, la metodología experimental para el análisis de nitrato en chimó quedó establecida como se indica en la figura 29.

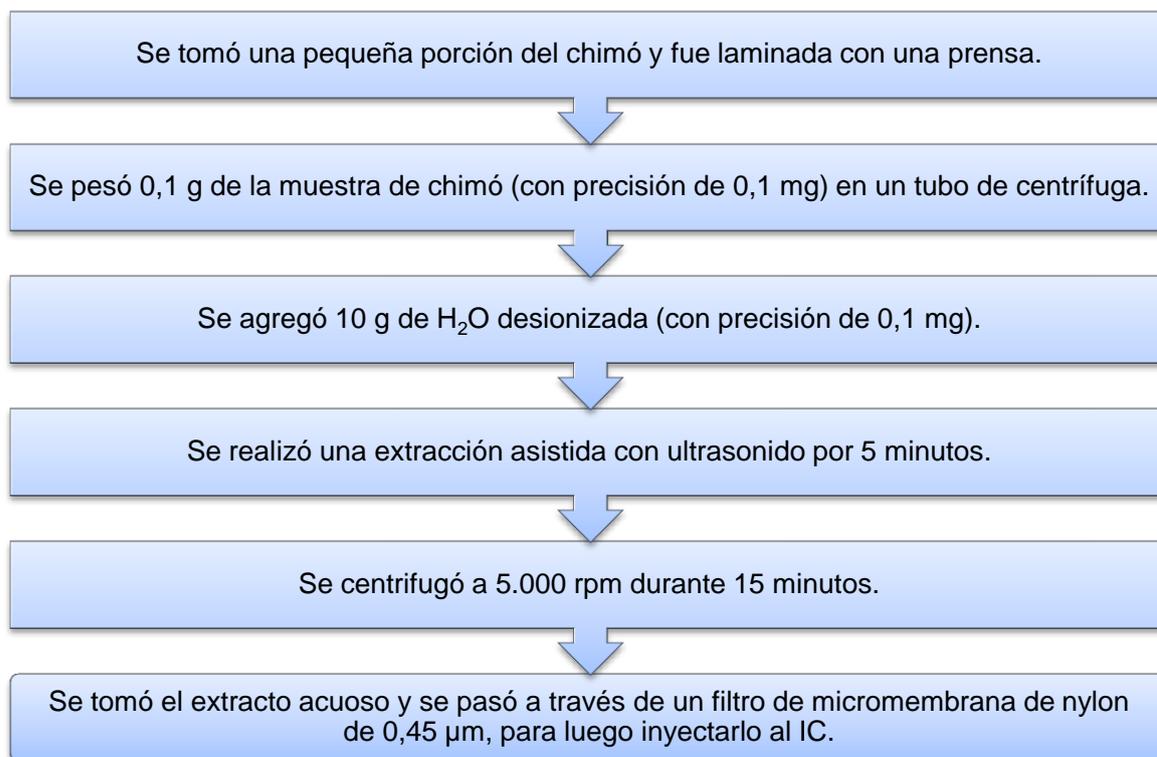


Figura 29. Metodología experimental establecida para la determinación de nitrato en chimó.

El procedimiento completo para el análisis de una muestra de chimó requirió aproximadamente 3 horas por batch, permitiendo el análisis de una elevada cantidad de muestras de manera simultánea.

Una vez optimizada la metodología experimental, fue necesaria la determinación de distintos parámetros de calidad de la metodología completa (tratamiento de muestra-medida).

VI.5.4 Parámetros de calidad de la metodología completa de extracción-medida cromatográfica

Reproducibilidad

Para el estudio de la reproducibilidad del método, se realizaron seis réplicas de la muestra modelo y cada una de ellas se inyectó por triplicado. Los resultados obtenidos son reportados en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados de la concentración de nitrato en la muestra modelo

Réplica	Concentración de NO ₃ ⁻ (%)	Promedio (%)	s (%)	CV	LC 95% (%)
1	3,08				
2	3,17				
3	3,06	3,12	0,05	2 %	0,05
4	3,17				
5	3,10				
6	3,13				

Se obtuvo una concentración promedio de nitrato de 3,12 % y la reproducibilidad de la metodología completa es del orden del 2% como coeficiente de variación, que es el mismo valor que la reproducibilidad de la técnica cromatográfica por si sola. Esto indicó que el factor más influyente en la precisión de la metodología es la medida cromatográfica. Este resultado es de esperarse, ya que el tratamiento de muestra es relativamente sencillo.

Límite de detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

Otro aspecto a considerar fue el LOQ y LOD de la metodología de extracción-análisis cromatográfico, partiendo de las cantidades empleadas en el método de

tratamiento de muestra y de los valores estimados anteriormente en la curva de calibración.

Los valores del LOD y el LOQ de la metodología completa, resultaron 0,003 y 0,02 % respectivamente. A pesar de que estos valores parecieran elevados, son satisfactorios para los valores de nitratos reportados por la literatura para este tipo de compuestos [35,36,37,38,39]. Sin embargo, si se desean mejorar estos parámetros, se puede disponer de una mayor cantidad de muestra.

Otro parámetro importante que se determinó es el porcentaje de recuperación, a manera de corroborar la extracción completa del analito y considerarlo como criterio de exactitud de la metodología.

Porcentaje de recuperación

Ya que no se dispone de un estándar certificado para poder medir la exactitud del método, se procedió a determinar el porcentaje de recuperación. El ensayo contempla la contaminación de una muestra que previamente haya sido analizada, con un estándar de concentración conocida. Se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Recuperación} = \frac{m_{\text{total}} - m_{\text{nativa}}}{m_{\text{añadida}}} \times 100$$

Donde m_{nativa} es la cantidad inicial de nitrato en la muestra modelo (determinada anteriormente), $m_{\text{añadida}}$ es la cantidad de nitrato añadida a la muestra modelo y m_{total} es la cantidad total de nitrato medida.

Este mismo procedimiento se realizó con la muestra con mayor y menor contenido de nitrato. Para conocer esto, se hizo una estimación de los niveles de nitrato de las diferentes marcas a analizar. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16:

Tabla 16. Contaminación de las muestras y determinación del porcentaje de recuperación.

Marca	Peso de muestra (mg)	Nitrato nativo (mg)	Nitrato añadido (mg)	Nitrato total (mg)	Porcentaje de Recuperación (%)
La Chinata	133,2	1,51	1,02	2,60	107
El Tigrito (M. Modelo)	100,7	3,13	1,23	4,41	105
Matheitos	101,8	3,23	1,08	4,35	104

Los resultados indicaron que la exactitud del método, medido a través del porcentaje de recuperación se encuentra entre (104-107) %, que es un valor bastante bueno, ya que se está analizando casi en su totalidad al nitrato que se encuentra en el chimó.

Una vez optimizado y comprobado el método para la determinación de nitrato en chimó, se procedió a analizar otras marcas nacionales.

VI.6. Determinación de la concentración de nitrato en chimó

Para la determinación de las diferentes marcas se aplicó la metodología previamente desarrollada, sin embargo, no todas pudieron ser laminadas, debido a su textura y viscosidad, pero igualmente mostraron una buena disgregación.

Para cada marca se realizaron réplicas del procedimiento, tanto de tratamiento de muestra como medida y en la tabla 17, se muestran los resultados obtenidos en orden creciente.

Tabla 17. Concentraciones de nitrato en las diferentes marcas de chimó analizadas

Marca	Réplica	C de NO ₃ ⁻ (%)	Promedio (%)	S (%)	CV
La Chinata	1	1,10	1,14	0,03	3 %
	2	1,17			
	3	1,14			
Taparo	1	1,43	1,40	0,04	3 %
	2	1,40			
	3	1,35			
El Águila	1	1,51	1,50	0,04	3 %
	2	1,53			
	3	1,45			
Matheus	1	1,69	1,67	0,02	1 %
	2	1,65			
	3	1,66			
San Benito^a	1	2,15	2,19	0,07	3 %
	2	2,27			
	3	2,14			
San Benito^b	1	2,59	2,52	0,07	3 %
	2	2,46			
	3	2,58			
	4	2,46			
El Tigrito Ice	1	2,82	2,92	0,09	3 %
	2	2,98			
	3	2,96			
El Tigrito^c	1	2,9	3,0	0,1	3 %
	2	3,1			
	3	2,9			
San Francisco	1	2,99	3,01	0,06	2 %
	2	3,00			
	3	2,95			
	4	3,10			
El Tigrito^d	1	3,08	3,12	0,05	2 %
	2	3,17			
	3	3,06			
	4	3,17			
	5	3,10			
	6	3,13			
Matheitos	1	3,08	3,18	0,09	3 %
	2	3,20			
	3	3,25			
Chain	1	3,7	3,5	0,2	5 %
	2	3,5			
	3	3,4			

a- Presentación en caja.

b- Presentación en bolsa.

c- Otro lote del chimó El Tigrito.

d- Muestra Modelo.

La concentración de nitrato en las diferentes marcas nacionales varió en un intervalo de 1,0 a 3,5 % aproximadamente. La reproducibilidad en los análisis fue muy buena, variando desde un 1 a 3 % de coeficiente de variación, a excepción de la marca Chain. Este chimó mostró un valor ligeramente superior, esto se podría atribuir a la difícil homogenización de la muestra.

VII. DISCUSIONES

Comparación de los niveles de nitrato con otras publicaciones:

En tabla 18 se muestra un resumen de las muestras de chimó analizadas.

Tabla 18. Niveles de nitrato en las diferentes marcas de chimó.

Marca	Concentración de Nitrato (%)	CV
La Chinata	1,14	3 %
Taparo	1,40	3 %
El Águila	1,50	3 %
Matheus	1,67	1 %
San Benito (En caja) ^a	2,19	3 %
San Benito (En bolsa) ^b	2,52	3 %
Tigrito Ice	2,92	3 %
Tigrito ^c	3,00	3 %
San Francisco	3,01	2 %
Tigrito ^d	3,11	2 %
Matheitos	3,18	3 %
Chain	3,50	5 %

a- Presentación en caja.

b- Presentación en bolsa.

c- Otro lote del chimó El Tigrito.

d- Muestra Modelo.

El valor promedio de las muestras de chimó fue de 2,4 % y la muestra de menor concentración de nitrato fue La Chinata con 1,14 %, mientras que el valor máximo fue la Chain con 3,5 %.

- ✓ K. D. Brunnemann y colaboradores, en EEUU, Año 2002 ^[36], determinaron la composición de nitrato de dos marcas de tabaco de mascar de EEUU. Las dos marcas de tabaco de mascar fueron compradas en cinco localizaciones distintas de EEUU. Sus resultados se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Resultados de las concentraciones de nitrato de las muestras analizadas por Brunnemann y colaboradores.

Marca	Concentración de NO₃⁻ (%)
A	(0,88-0,93)
B	(2,01-2,27)

Al comparar los resultados de las diferentes marcas de chimó con los obtenidos por Brunnemann y colaboradores, se encontró que los niveles de la marca A estuvieron ligeramente por debajo de nuestros resultados, mientras que los de la marca B fueron cercanos a nuestro valor promedio de nitrato.

- ✓ I. Stepanov y colaboradores, en Moldova, Año 2005 ^[38], determinaron los niveles de nitrato en nuevas marcas de tabaco sin humo en EEUU (productos en los que trataron de disminuir los componentes dañinos), para compararlas con los tabacos de mascar tradicionales. Sus resultados se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Niveles de nitrato en productos analizados por I.Stepanov y colaboradores

	Promedio de Concentración de NO₃⁻ (%)	Intervalo de Concentración de NO₃⁻ (%)
Productos nuevos	0,868	(0,366-1,677)
Productos tradicionales	3,019	(2,045-3,524)

Comparando los niveles de nitrato con los obtenidos en nuestra investigación, se encontró que los niveles de los productos nuevos fueron ligeramente bajos en comparación a nuestros valores. Sin embargo, el intervalo de nuestros valores fue muy parecido a los productos tradicionales analizados por Stepanov.

VIII. CONCLUSIONES

En base a las condiciones cromatográficas, se encontró que:

- ✓ A pesar de que la columna no estaba en óptimas condiciones, se logró buena resolución en las bandas de los analitos de interés. Se utilizó una columna de intercambio aniónico AS11, con un flujo de 1,7 mL/min de NaOH (5 mM). Bajo estas condiciones, el tiempo total de corrida fue de 6 minutos aproximadamente, para asegurar la salida de todos los componentes de la muestra.
- ✓ Se tuvo buena reproducibilidad del área de pico, basado en un coeficiente de variación de 2 %.
- ✓ Presentó excelente reproducibilidad del tiempo de retención, con un coeficiente de variación de 0,4 %.
- ✓ La curva de calibración del nitrato presentó un coeficiente de regresión lineal bastante aceptable de 0,9990, mientras que los residuales variaron de manera satisfactoria.
- ✓ Se encontró que el LOD de la técnica fue 0,3 mg/L, mientras que el LOQ fue 2,0 mg/L.
- ✓ La alta concentración de cloruro con respecto a la baja o nula concentración de nitrito impidió el análisis cualitativo y cuantitativo de este anión.

Por otra parte, en muchas de las investigaciones consultadas, las concentraciones nativas de nitrito en estos productos suelen ser muy bajas o no detectadas por la instrumentación, por lo tanto, resulta más trascendental

el análisis del nitrato, que al encontrarse en concentraciones mayores, pudiera ser una fuente importante en la producción de nitrito.

En base al tratamiento de la muestra, se concluyó que:

- ✓ A través de un único calentamiento para homogeneizar y disponer de una cantidad aproximada de muestra, se evitaron cambios en la composición del chimó, que podían ocurrir con los constantes calentamientos. El laminado de la muestra mejoró su disgregación y una mayor extracción. Mientras que las muestras muy fluidas no requieren de laminado.
- ✓ El uso de la extracción en fase sólida con un cartucho de C-18 no produjo efectos importantes en el tratamiento de la muestra. Por lo tanto, esta etapa se descartó, reduciendo el tiempo de análisis y la posible pérdida de analito.
- ✓ Se redujo el tiempo de extracción asistida con ultrasonido a 5 minutos. Disminuyendo 25 minutos con respecto al método propuesto. Presentó poca complejidad en el tratamiento de la muestra y produjo poco gasto de reactivos.

En cuanto a la metodología completa (tratamiento de muestra-medida), se concluyó que:

- ✓ Se encontró buena reproducibilidad y exactitud, basados en el coeficiente de variación de 2 % y porcentaje de recuperación entre (104-107) % respectivamente.
- ✓ Permitió el manejo de un elevado número de muestras de manera simultánea. Resultando en un tiempo de análisis de 3 horas por batch.

- ✓ Los niveles de nitrato de las muestras analizadas variaron desde 1 a 3,5 %.

En base a los resultados obtenidos, se concluyó que:

- ✓ Los niveles de nitrato en las diferentes marcas de chimó fueron muy parecidos a los de tabaco sin humo, analizados en las otras investigaciones, especialmente a los productos tradicionales analizados por Stepanov. La marca de mayor cantidad de nitrato analizada en esta investigación, que fue la Chain, tuvo una concentración aproximadamente 50 % mayor que la más alta analizada por Brunnemann y colaboradores, pero parecida a la de mayor concentración analizada por Stepanov.
- ✓ Los valores de nitrato permitidos, están reportados sobre el peso corporal (3,7 mg/kg de peso corporal por día) y resulta muy difícil establecer la cantidad de nitrato absorbida por el cuerpo al consumir una unidad de chimó. Ya que esto puede variar dependiendo de la cantidad de unidades consumidas, la frecuencia de uso, el tiempo de permanencia en la boca, la intensidad al mascar y la cantidad que se expectora.
- ✓ Con respecto a las nitrosaminas, que son compuestos potencialmente cancerígenos, que se forman a partir del nitrito y los alcaloides, el mayor contribuidor del nitrito, formado endógenamente en el cuerpo proviene del nitrato reducido, bien sea por acción bacteriana en la saliva o dentro del estómago ^[40]. Por lo tanto, un valor de nitrato del 2 % es muy probable que influya en la formación de nitrosaminas

IX. RECOMENDACIONES

- ✓ En caso de que se requieran analizar menores niveles de concentración de nitrato, se podría emplear una columna con menor diámetro interno, para mayor sensibilidad, menor LOQ y LOD y menos gasto de reactivos.
- ✓ Utilizar una columna aniónica que esté en óptimas condiciones operativas, que presente una mayor selectividad entre cloruro y nitrito. Como por ejemplo la AS9-HC, que hace eluir los dos aniones con dos minutos entre ellos, a diferencia de las otras columnas, que siempre los eluye muy próximos.
- ✓ Acoplar un detector de UV en serie con el de conductancia. De manera que se pueda medir la absorbancia del nitrito a una longitud de onda de 215 nm, donde este ión es medido con una mayor sensibilidad y su banda no sufre interferencias.
- ✓ Correlacionar los niveles de nitrato obtenidos en los productos de chimó con los de nicotina, ya determinados en el Centro de Química Analítica y con la nicotina libre y nitrosaminas.

X. APÉNDICE

X.1. Términos desconocidos

- **Catechu:** Es un pequeño árbol de la familia de las fabáceas. Es original de Indonesia, Malasia, Birmania y la costa Malabar.

- **Cianosis:** Es la coloración azulada de la piel, mucosas y lechos ungueales, usualmente debida a la existencia de por lo menos, 5 % de hemoglobina reducida en la sangre circulante o de pigmentos hemoglobínicos anómalos (metahemoglobina o sulfohemoglobina) en los glóbulos rojos.

- **Cumarina:** Es un extracto vegetal de sabor y apariencia similar a la vainilla, aunque su utilización como aditivo alimentario no está permitida, ya que su ingesta es perjudicial para la salud. Sin embargo, se encuentra presente de manera natural en algunos ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes.

- **Eritoplasias:** Es una mancha o placa de color blanco, que asienta sobre la mucosa bucal, que no puede ser raspada o desprendida ni ser atribuida clínica o patológicamente a ninguna otra enfermedad. La trascendencia de esta lesión estriba en su relativamente alta incidencia y en un 5% de los casos, evoluciona a un carcinoma.

- **Fitoesteroles:** Son sustancias de origen vegetal con una estructura química similar a la del colesterol. Están presentes en frutos, semillas, hojas y tallos de casi todos los vegetales conocidos. Se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas.

- **Halitosis:** Es una afección de la que se da cuenta muy a menudo. Sea en forma de mal aliento ocasional que siente casi todo adulto sano al levantarse en la mañana, o sea en forma de problemas más serios o graves, desde trastornos metabólicos hasta tumores pulmonares.
- **Henequén:** Es una planta originaria de las áreas secas de la península de Yucatán, México. Es cultivada para la producción de fibra.
- **Leucoplasias:** Es una lesión bien definida de la mucosa bucal, de color rojo intenso, aterciopelada o granulosa, que por lo general presenta contornos irregulares.
- **Metaheglobinemia:** Es la aparición súbita en la boca y otras mucosas, la cara y las extremidades de un color grisáceo. Aparece entre los 30 y 60 minutos después de la ingestión de sustancias ricas en nitratos, ya que transforman la hemoglobina en hemoglobina, lo que disminuye el transporte de oxígeno a los tejidos. Existe tratamiento específico y cuando se presenta esta patología es necesario acudir a urgencias.
- **Nuez de Areca:** Es un fruto maduro del árbol Areca. Posee un sabor amargo y se utiliza habitualmente para masticar, especialmente en combinación con las hojas de Betel, el tabaco, etc.
- **Sialorrea:** Es la excreción excesiva de saliva por la boca como resultado de un aumento de su producción. Se debe a afecciones de la mucosa oral y de la lengua.

X.2. Conceptos Analíticos

X.2.1. Liofilización

La liofilización es la desecación producida al sublimar un sólido en un recipiente evacuado a una presión absoluta de 1 mbar. En este proceso se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Al suministrar calor el hielo sublima y se evita el paso por la fase líquida, como se observa en la figura 30. Es un proceso lento y costoso, pero en ciertos casos es el único medio disponible para obtener un producto satisfactorio.

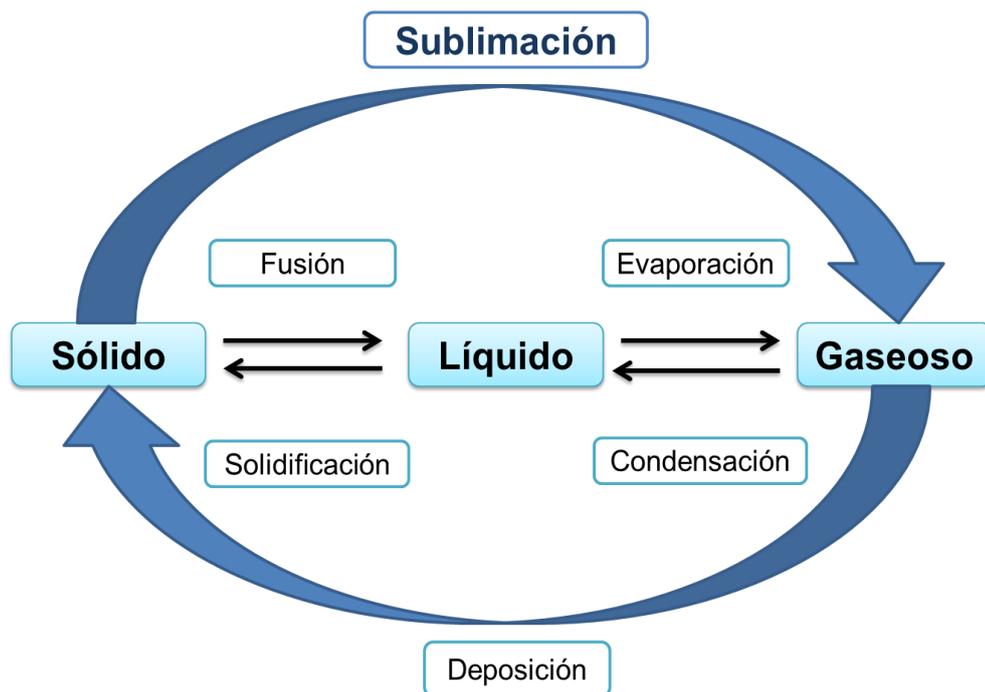


Figura 30. Cambios de estados físicos de la materia.

Las ventajas del uso de esta técnica son:

- A veces es posible sacar ventajas de los cambios en las volatilidades con la temperatura en la liofilización de un material, al evitar la pérdida de otro componente, el cual se evaporaría junto con el agua si se operara a una temperatura mayor que la de liofilización.
- Es posible evitar a bajas temperaturas los cambios indeseables en el material a secar, por cambios químicos.
- Se suprimen los efectos de la tensión superficial durante la liofilización, de manera que el producto tiende a mantener una estructura con los poros abiertos que facilita una rápida reabsorción del agua cuando se desee ^[41].

X.2.2. Extracción

Se empleó una extracción de nitrito y nitrato, mediante una disolución de la muestra en agua, asistida con ultrasonido y se utilizó en ocasiones la extracción en fase sólida (SPE).

Una extracción se basa en el reparto de un soluto entre dos fases no miscibles y es un fenómeno de equilibrio que se rige por la ley de distribución. Si se permite que la especie de soluto A se distribuya por sí misma entre el agua y una fase orgánica, resulta el siguiente equilibrio:



Existen diferentes tipos de extracciones entre las cuales se encuentran las extracciones líquido-líquido y líquido-sólido. ^[42]

X.2.2.1. Extracción líquido-líquido

El soluto se distribuye entre dos fases no miscibles, en la mayoría de los casos, una de las cuales es una fase acuosa y la otra es un disolvente orgánico. Como las fases no son miscibles, se forman dos capas, con la más densa en la parte inferior. El soluto se encuentra inicialmente en una de las fases, pero tras la extracción aparece en las dos fases, pero en mayor proporción en la que presente mayor solubilidad.

La eficacia de una extracción líquido-líquido depende de la constante de equilibrio para el reparto del soluto entre las dos fases así como las reacciones secundarias en las que interviene el soluto. ^[43]

X.2.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)

Se usan membranas o pequeñas jeringas o cartuchos desechables. Para formar la fase de extracción sólida, se recubre o se liga químicamente un compuesto orgánico hidrofóbico a sílice en polvo. Los compuestos pueden ser no polares, medianamente polares o polares. Los grupos funcionales ligados al empaquetamiento atraen a los compuestos hidrofóbicos de la muestra, debido a interacciones del tipo van der Waals y son extraídos de la disolución acuosa.

En la figura 31 se muestra un sistema típico de cartucho para extracciones en fase sólida. La muestra se coloca en el cartucho y se aplica presión mediante la jeringa o con una línea de aire o nitrógeno, también se puede usar vacío para hacer pasar la muestra a través del extractante. Las moléculas orgánicas son extraídas de la muestra y se concentran entonces en la fase sólida, y luego estas serán eluidas mediante un disolvente como el metanol. En algunos procedimientos de extracción en fase sólida, las impurezas son extraídas en la fase sólida, mientras que los compuestos de interés pasan sin ser retenidos. ^[42]

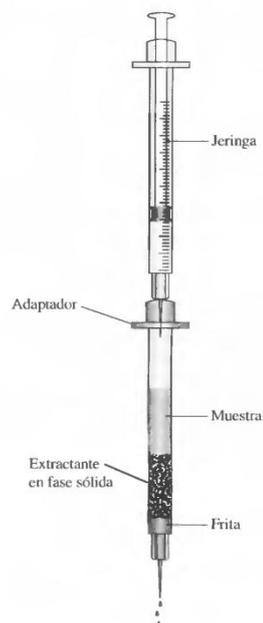


Figura 31. Sistema de extracción en fase sólida.

X.2.2.3. Extracción asistida con ultrasonido

Cuando un sólido se disuelve, el analito se puede separar de la superficie solo por difusión si no hay agitación. Como la difusión es un proceso relativamente lento, la disolución se acelera si se agita la solución.

Los ultrasonidos son vibraciones sonoras por encima del nivel auditivo humano. Las vibraciones agitan la solución, produciendo burbujas microscópicas que se dilatan y contraen. Estas burbujas pueden aumentar hasta el tamaño crítico por encima del cual explotan, produciendo un breve intervalo de altas temperaturas y presiones. Además de agitar la solución, las burbujas pueden quebrar una superficie sólida. ^[44]

X.2.3. Instrumentación

X.2.3.1. Cromatógrafo iónico

La Cromatografía Iónica (IC) es una técnica instrumental que permite separar y detectar aniones (átomos o moléculas con carga negativa) y cationes (especies con carga positiva), basándose en el uso de resinas de intercambio iónico. Se lleva a cabo con grupos funcionales enlazados a una matriz polimérica, donde los grupos funcionales son iónicos y están asociados con contraiones de carga opuesta. ^[45,46]

Los procesos donde existe intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio, entre los iones de una disolución y los iones del mismo signo, que están en la superficie de un sólido de elevada masa molecular e insoluble. Las resinas empleadas en cromatografía de intercambio iónico poseen grupos funcionales con cargas fijas. Los respectivos contraiones se ubican cerca de estos grupos, formando una entidad electrónicamente neutra.

Para cromatografía de intercambio aniónico, por lo general son utilizadas resinas de grupo amino terciario ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{OH}^-$), mientras que para el intercambio de cationes, se utilizan grupos de ácido sulfónico ($-\text{SO}_3^- \text{H}^+$). Cuando el contra ión es reemplazado por un ión del soluto, este se retiene temporalmente por la carga fija. Los diferentes iones quedan retenidos en la columna durante tiempos distintos, debido a las distintas afinidades de los iones hacia la fase estacionaria y de esta manera, se logran separar. ^[45,47]

Cuando se tiene como eluente aniones hidroxilo, la resina siempre está unida a este anión. Si una muestra con aniones A^- y B^- es inyectada, cuando llega a la columna, esos aniones sustituyen los aniones hidroxilo, como se observa en la figura 32.

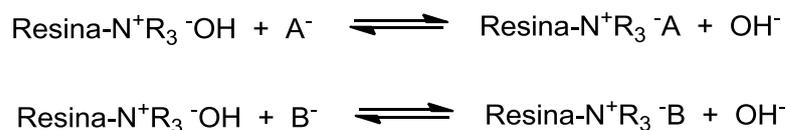


Figura 32. Equilibrios involucrados en la columna de intercambio aniónico, con un eluente de NaOH

La separación de los aniones se debe a sus diferentes afinidades iónicas hacia la fase estacionaria. Sin embargo, en algunos iones específicos también se observan interacciones no iónicas con la fase estacionaria. ^[47]

X.2.3.2. Sistema General del Cromatógrafo Iónico

Los componentes básicos del cromatógrafo iónico se asemejan mucho a los sistemas de HPLC tradicionales. Este sistema se encuentra esquematizado en la figura 33.

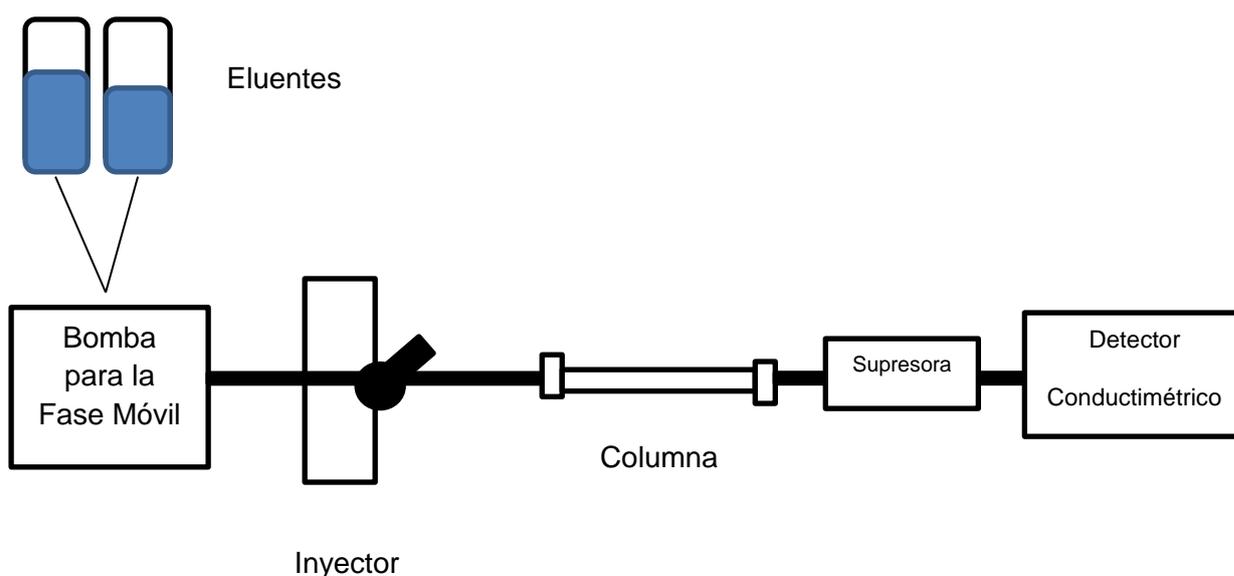


Figura 33. Componentes básicos de un cromatógrafo iónico.

Los eluentes son filtrados al vacío, a través de un filtro de tamaño de poro muy pequeño, para eliminar el polvo y partículas sólidas en suspensión. De esta manera, se evita que estas partículas dañen la bomba, sistemas de inyección o que obstruyan la columna. Los recipientes con los eluentes a menudo se equipan con un sistema para eliminar gases disueltos, generalmente nitrógeno y oxígeno, que interfieren, formando burbujas en la columna y en el detector, provocando ensanchamientos de banda e interferencias.

Una bomba envía la fase móvil hacia el sistema cromatográfico. En general, son empleadas bombas de un solo pistón o de dos pistones. La muestra es inyectada por un sistema de inyección, donde es cargada a presión atmosférica. Al abrir la válvula de inyección, la muestra es transportada hacia la columna por la fase móvil.

La parte más importante de todo el sistema es la columna de separación, donde la elección de la fase estacionaria y condiciones cromatográficas determinan la calidad del análisis. Los analitos son detectados y cuantificados por el sistema de detección.

El rendimiento de cualquier detector se establece basándose en su sensibilidad, linealidad, resolución y ruido. El detector más empleado en cromatografía iónica es el de conductividad, que es usado con o sin un sistema supresor. La función principal del supresor es que químicamente reduce la alta conductividad de fondo de los electrolitos en el eluente y convierte a los iones de la muestra en una forma más conductiva. Las señales cromatográficas son adquiridas en un receptor y los resultados cuantitativos son obtenidos evaluando el área o la altura del pico. ^[45,47]

X.2.3.3. Fase Estacionaria en Cromatografía Iónica

A diferencia de los empacados en base a sílice usados tradicionalmente en HPLC, para IC se usa predominantemente polímeros orgánicos, ya que éstos presentan una elevada estabilidad en condiciones de pH extremas, aunque presente una

menor eficiencia cromatográfica. La capacidad de intercambio iónico de una resina está definida como el número de sitios con intercambio iónico por peso equivalente del empacado de la columna. ^[47]

X.2.3.4. Fase Móvil en Cromatografía Iónica

Los tipos de eluentes utilizados en cromatografía iónica dependen principalmente del sistema de detección empleado. En muchos casos, la detección de iones inorgánicos y orgánicos se realiza por medición de la conductividad. Además de esto, las afinidades de los iones del eluente y los iones del soluto deben ser comparables. La mezcla de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, tiene una amplia aplicación, ya que su poder de elución y selectividad es determinado por el amplio rango de trabajo por la relación de concentraciones entre los dos compuestos. Una gran variedad de aniones orgánicos e inorgánicos pueden ser separados con esta combinación. Como producto de la reacción de supresión, el componente del eluente se disocia muy poco, lo que produce una conductividad de fondo muy baja. ^[47]

X.2.3.5. Métodos de Detección en Cromatografía Iónica

Los detectores en cromatografía de líquidos se basan en la medida de una propiedad de la disolución, ya que responden a una propiedad del eluente que es modificada por la presencia de los analitos, como el índice de refracción, constante dieléctrica o la densidad. Los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades de éste que no son inherentes a la fase móvil, como la absorbancia en el UV, fluorescencia, corriente eléctrica. ^[45]

La detección conductimétrica es la más utilizada en la cromatografía iónica. La conductancia eléctrica crece con el aumento de la concentración del ion, del número de cargas del ion y con la movilidad del ion. La señal del detector no solo depende de la concentración, sino también depende del grado de disociación de los iones del

eluyente y del soluto. Estos dos últimos parámetros mencionados, son determinados por el valor de pH de la fase móvil. ^[47]

X.2.3.6. Sistema Supresor en Cromatografía Iónica

Es utilizado para producir una detección más sensible de los iones a través de su conductancia. El sistema supresor esta relleno con una segunda resina de intercambio iónico, que convierte eficazmente los iones del disolvente en especies poco ionizadas, sin alterar los iones del analito. Cuando el eluyente es NaOH, se forma agua, y de manera similar, los aniones del analito se convierten en sus correspondientes ácidos, como se observa en la figura 34.



Figura 34. Reacción de supresora con eluyente (NaOH) y con dos iones de analito (Cl⁻ y Br⁻)

Como resultado de la reacción de supresión, ácidos minerales, que son fuertes conductores, en presencia del agua, entran en la celda de conductividad y entonces son fácilmente detectados. Existen distintos tipos de sistemas supresores, como lo son las columnas supresoras, supresoras de fibra hueca y de micromembrana. ^[47]

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] World Health Organization, **Who report on the global tobacco epidemic**, Brasil, Año 2008.

[2] Saner L. Gilman, Zhou Xun, **Smoke**, Reaktion Books, Año 2004.

[3] Brunneemann, K.D.; Hoffmann, D. **Chemical Composition of Smokeless Tobacco**, Smoking and Tobacco Control. Monograph N°.2 98-108. Año 1992.

[4] Goodman, J., **Tobacco in History**, Routledge, Londres, Año 2005.

[5] García Rivas, H., **Plantas Curativas Mexicanas**, Editorial Panorama, México, Año 2005.

[6] León, J., **Botánica de los Cultivos Tropicales**, Editorial Agroamericana del IICA, Tercera Edición, Costa Rica, Año 2000.

[7] **Etimología: el origen de las palabras**, Elcastellano.org. Disponible en: <http://www.elcastellano.org/palabra.php?id=1228>

[8] Martínez Llamas, A., Patología del consumo de tabaco. **El tabaco como planta fumable**. Consideraciones históricas. Editorial Glosa. Barcelona. Año 1989.

[9] Martínez Llamas, A, Manual de patología tabáquica. **El tabaco y su historia**. Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Salud Pública. Madrid, Año 1982.

[10] Brosse, Jacques. **La Magie des Plantes**. Tabac. Espaces libres. Paris, Año 1990.

[11] García, R., **El arte de fumar**. Tabacología Universal. París. Librería Española de Garnier hermanos, Año 1881.

[12] Cordry, H, **Tobacco**, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, EEUU, Año 2001.

[13] Bigott, **Historia del Tabaco**, disponible en:
http://www.bigott.com.ve/group/sites/BAT_82ZFCG.nsf/vwPagesWebLive/DO82ZHS7?opendocument&SKN=1

[14] Sosa, J., **Algunos Términos del Español Colonial Venezolano en causas sobre comercio ilegal de Urao y Chimó en Mérida, Siglos XVIII y XIX**, Mérida, diciembre de 2005.

[15] Urbina, J., **Contrabando y comiso de urao en la provincia de Mérida, durante la vigencia del estanco del tabaco (1781-1833)**. Primera Edición. Venezuela. Año 2009.

[16] Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, **Editorial Tabaco y género**, Caracas, Venezuela, Año 2010. Disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772010000200001&lng=es&nrm=iso

[17] Agencia EFE, **Nueva resolución prohíbe fumar en lugares públicos y de trabajo**, 25 de febrero de 2011, Disponible en:
<http://www.noticias24.com/actualidad/noticia/212660/nueva-ley-prohibe-fumar-en-lugares-publicos-y-de-trabajo/>

[18] Globovisión, **En vigencia resolución que prohíbe fumar en espacios públicos y privados**, 30 de mayo de 2011, Disponible en: <http://www.globovision.com/news.php?nid=190223>

[19] World health Organization international agency for research on cancer. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Volumen 89. Lyon, Francia, Año 2007.

[20] DIANE Publishing Company, **Smokeless Tobacco or Health, an International Expectative**, Año 1993.

[21] Rudu, B., Jansson, C., **Smokeless Tobacco and Oral Cancer: A review of the risks and determinants**, Birmingham, Año 2004.

[22] Fundación Mayo para la Educación e Investigación Médica (MFMER). **Tabaco de Mascar: ¿Sin Humo Significa Sin Peligro?**. Año 2004. Disponible en: <http://www.colgate.com/app/ColgateTotal/US/ES/MBHC/Smoking/SpitTobacco.cvsp>

[23] Rosales, A. Sosa, L., **Cambios clínicos periodontales ocasionados por el chimó en animales de experimentación**. Mérida, Venezuela. Año 2008.

[24] Seelkopf, C. Rojas, A., **Estudio Sobre El Chimó**. Mérida, Venezuela. Año 1960.

[25] Edny González, P., **Adolescentes consumen chimó**. El Carabobeño. Carabobo, 11/05/2009. Disponible en: http://boletin.uc.edu.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=24923:adolescentes-consumen-chimo&catid=7:investigaciones&Itemid=10

[26] González, M. Pavón, O. **Efectos del consumo de chimó, en las estructuras bucales.** Año 2005.

[27] Jarpa, P., **Medición del pH de 12 preparaciones distintas de pasta de tabaco de mascar, relacionándolas con la adición a la nicotina.** Revista de la facultad de farmacia vol. 45 (2). Mérida, Venezuela. Año 2003.

[28] Flores, A. **El chimó (Jalea de tabaco).** Disponible en: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1380>

[29] Grasso, P., Mann, H., **Smokeless tobacco and oral Cancer: An Assessment of Evidence Derived from Laboratory Animals,** Food and Chemical Toxicology, vol 36. UK, Año 1998.

[30] Antón, A., Lizaso, J., **Nitritos, Nitratos y Nitrosaminas.** Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid, España. Año 2001.

[31] Departamento de Sanidad del País Vasco. **Vigilancia de la contaminación química de los alimentos en la comunidad autónoma del país vasco (1990-1995).** Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. Primera Edición. Año 1996.

[32] Stellman, J., **Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo.** Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Cuarta Edición. Madrid, España. Año 2001

[33] Burton, H., Dye, N., Bush, L., **Distribution of Tobacco Constituents in Tobacco Leaf Tissue. Tobacco-Specific Nitrosamines, Nitrate, Nitrite, and Alkaloids.** Lexington, Kentucky, EEUU, Año 1992.

[34] Health Canada – Official Method, **Determination of nitrate from whole tobacco**, Canada, Año 1999.

[35] Perez-Olmos, R., Ríos, A., Fernández, J.R., Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C., **Construction and evaluation of ion selective electrodes for nitrate with a summing operational amplifier. Application to tobacco analysis**, Bilbao, España, Año 2000.

[36] Brunnemann, K.D., Qi, J., Hoffmann, D., **Chemical profile of two types of oral snuff tobacco**, Nueva York, en EEUU, Año 2002.

[37] Stepanov, I., Hecht, S., **Tobacco-specific nitrosamines in smokeless tobacco products marketed in India**, Minneapolis, EEUU y Mumbai, India, Año 2005.

[38] Stepanov, I., Hecht, S., Mirvish, S., Gonta, M., **Comparative Analysis of Tobacco-Specific Nitrosamines and Total N-Nitroso Compounds in Moldovan Cigarette Tobacco**, Moldova, Año 2005.

[39] Stepanov, I., Jensen, J., Hatsukami, D., Hecht, S.S., **New and traditional smokeless tobacco: Comparison of toxicant and carcinogen levels**, EEUU, Año 2007.

[40] Cecotti, Sforza, **El diagnóstico en clínica estomatológica**. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, Año 2007.

[41] Nonhebel, G., Moss, A.A.H., **El Secado de sólidos en la industria química**, Editorial Reverté, Barcelona, España, Año 1979.

[42] Skoog, D., West, D., **Fundamentos de Química Analítica**, Editorial Thomson, Octava Edición, México, Año 2005.

[43] Harvey, D., **Química Analítica Moderna**, Mc Graw Hill, España 2002.

[44] Rubinson, K., Rubinson, J., **Análisis Instrumental**, Editorial Prentice Hall, Primera Edición. Madrid, España. Año 2001.

[45] Skoog, D., Holler, F., **Principios de Análisis Instrumental**, Editorial Mc Graw Hill, Quinta Edición, Año 2001.

[46] Just Chromatography, **Ion Chromatography**. Disponible en: <http://www.justchromatography.com/chromatography/ic>. Consultado en marzo de 2012.

[47] Weiss, J., **Ion Chromatography**, VCH Verlagsgesellschaft mbH y VCH Publishers, Inc., 2da Edición, Alemania, Año 1995.