

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**



***“DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE NICOTINA EN  
TABACO SIN HUMO (CHIMÓ) MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado  
ante la ilustre Universidad Central de  
Venezuela por la Br. Jeniree Flores Moreno,  
para optar al título de Licenciado en Química,  
mención Tecnología.

Tutor: Dr. Luis R. Gómez

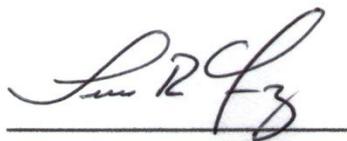
Caracas, Abril de 2016

Yo Dr. Luis R. Gómez, investigador del Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela certifico que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE NICOTINA EN TABACO SIN HUMO (CHIMÓ) MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”**

Presentado por la Br. Jeniree Flores Moreno, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2015 y 2016, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Abril de 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luis R. Gómez', written over a horizontal line.

Dr. Luis R. Gómez  
(Tutor)

## RESUMEN

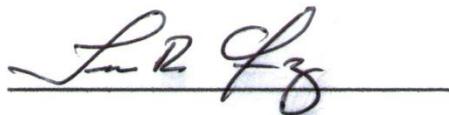
La prohibición a nivel mundial de fumar en muchos sitios públicos sumado a los grandes impuestos a la comercialización de cigarrillos ha motivado el resurgir de otros modos de consumir tabaco, las cuales se han denominado tabacos sin humo. Se considera a este tipo de artículos aquellos productos entera o parcialmente elaborados a partir de hojas del tabaco y que pueden ser mascados, chupados o inhalados, bajo la forma de polvo, pasta, pastillas, etc. Venezuela no escapa de este hecho y en las últimas décadas ha aumentado el consumo de este tipo de producto en el país, siendo el de mayor comercialización el chimó.

El chimó es un producto de consistencia pastosa, calificado como un "snuff", el cual no tiene regulación por parte del Gobierno Nacional, aun habiéndose afirmado que su consumo frecuente genera efectos nocivos para la salud como cáncer en el esófago, hiper-ácidez estomacal, hiper-estimulación del sistema nervioso central, inflamación crónica en los tejidos que sostienen los alvéolos dentarios y pérdida de los dientes. Por lo antes expuesto, el Instituto Nacional de Higiene ha propuesto al Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela el desarrollo de un método para la determinación cuantitativa del agente químico causante de la adicción, la nicotina. Sin embargo, el método cromatográfico hasta ahora desarrollado presenta una etapa lenta y tediosa que la hace poco practica para la determinación en "batch" a nivel semi-industrial.

Según los problemas expuestos anteriormente, se propuso el desarrollo de una metodología por HS-GC para la determinación de nicotina, obteniéndose una disminución sustancial del tiempo total de análisis; sin embargo, problemas asociados a

la reproducibilidad del sistema no permitieron su aplicación definitiva. Por otra parte, para la posible resolución de dichos problemas, se recomienda el empleo de un sistema HS automatizado.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE NICOTINA EN TABACO SIN HUMO (CHIMÓ) MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”** presentado por la Br. Jeniree Flores Moreno, 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. Rafael Golding

(Jurado)



Esp. Marisabel Bor

(Jurado)

---

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a Dios y a la Virgen por haberme guiado en todo momento durante mi formación académica, por haberme dado la mejor familia del mundo; específicamente mis padres, mi hermano y mis abuelas, quienes han sido el pilar más importante en mi formación personal, académica y profesional durante mi vida, los que me inculcaron valores desde pequeña asegurando que serían importante a lo largo de mi vida, los que me mantenían con ánimo durante todo el camino recorrido con una simple palabra de aliento o un gesto cuando sentía que no era posible llegar a la meta, los que madrugaron muchas veces para que no me faltara nada durante mi formación sin pedir nada a cambio.

En segundo lugar agradezco a mi tutor Dr. Luis Gómez, quien a pesar de la distancia me apoyó en los momentos cruciales del desarrollo de mi TEG. De igual forma, agradezco muy especialmente al profesor Gustavo Pérez, quien junto a mi tutor me dieron la oportunidad de formar parte del Centro de Química Analítica, convirtiéndose en mi escuela y casa durante los últimos años de mi carrera. Adicionalmente agradezco a la profesora Rosa Amaro y al profesor Rafael Golding; quienes me prestaron su colaboración y apoyo durante el desarrollo de mi TEG, fueron tan importantes en todo el proceso como mi tutor.

En tercer lugar agradezco a mi gran casa de estudios, la Universidad Central de Venezuela, la cual me dio la oportunidad de formar parte de ella desde el año 2009, abriéndome las puertas a un mundo extremadamente diverso que no conocía hasta entonces.

Por último pero no menos importante, quiero agradecer a todos mis amigos, los que iniciaron este recorrido conmigo, los que conocí en el camino e inclusive a los que conocí cuando ya estaba terminando mi etapa universitaria.

En este sentido agradezco especialmente a Matuzalen, Juan, Betania, Guillén, Salvador, Mariale, Tony, Víctor y Estefanía, con los cuales compartí gran parte de mi paso por la UCV y a su estilo hicieron que este “viaje” fuese fascinante, lleno de alegrías, tristezas, rabias y llantos, de igual forma agradezco Rodrigo, Janetsi y demás combo que hoy hacen su TEG en INTEVP con los cuales logré relacionarme de una forma muy especial a medida que los fui conociendo. Adicionalmente agradezco a mis amigos Paul y Héctor a quienes conocí en la etapa final de mi carrera, siendo los que más me motivaron a través de las bromas a terminar mi TEG. Además, agradezco a mis amigos fuera del campus universitario, Fátima, Roxana, Stephanie y Jefferies quienes aún en la distancia me impulsaron para seguir adelante y mantuvieron su apoyo incondicional.

A todos, ¡gracias!

## ÍNDICE

1. Introducción .....	1
2. Revisión bibliográfica .....	3
2.1 El tabaco .....	3
2.2 Tabaco sin humo .....	7
2.3 El chimó. Tabaco sin humo en Venezuela .....	8
2.3.1 Composición química. ....	11
2.4 Farmacología de la nicotina.....	14
2.5 Técnicas cromatográficas .....	16
2.5.1 Clasificación de los métodos cromatográficos.....	17
2.6 Cromatografía de gases. ....	18
2.6.1 Gas de arrastre.....	19
2.6.2 Sistema de introducción de la muestra: Puerto de inyección. ....	19
2.6.2.1 Inyección con división de flujo (Split). ....	20
2.6.2.2 Inyección sin división de flujo (splitless). ....	20
2.6.2.3. Inyección en columna. ....	20
2.6.3 Columnas cromatográficas.....	21
2.6.3.1 Columnas rellenas o empacadas.....	22
2.6.3.2 Columnas tubulares abiertas o capilares .....	22
2.6.4 Fase estacionaria.....	23
2.6.5 Detectores .....	23
2.6.5.1 Detector FID .....	25

2.6.6 HS-GC (análisis en un espacio confinado ó Análisis en un “espacio de cabeza” acoplada a cromatografía de gases). .....	27
2.6.6.1 Teoría básica para el análisis por HS .....	27
2.6.6.2 Teoría básica para el análisis por el acoplamiento HS-GC.....	30
2.6.6.3 Bases fisicoquímicas para análisis HS-GC .....	31
2.6.6.4 Factores que afectan la sensibilidad del HS.....	34
2.6.6.4.1 Volumen de la muestra .....	34
2.6.6.4.2. La temperatura .....	35
3. Antecedentes.....	36
4. Justificación .....	55
5. Objetivos	56
6. Metodología experimental .....	58
6.1 Equipos y materiales utilizados .....	58
6.1.1 Equipos .....	58
6.1.2 Reactivos y materiales .....	60
6.1.3 Muestra de referencia interna.....	61
6.2 Desarrollo experimental .....	62
6.2.1 Estudio preliminares de la condiciones cromatográficas para la determinación de nicotina.....	62
6.2.2 Verificación de la presencia de la señal del patrón de nicotina en HS-GC...	66
6.2.3 Tratamiento de la muestra. ....	67
6.2.4 Verificación de la presencia de la señal de nicotina utilizando una muestra de chimó.....	70

6.2.5 Búsqueda del estándar interno (EI).....	71
6.2.6 Estudio de las condiciones de trabajo por HS.....	75
6.2.7 Presurización del vial .....	78
6.2.8 Inyección única de réplicas genuinas de un patrón.....	80
6.2.9 Aumento del tiempo de equilibrio .....	83
6.2.10 Cambio del EI .....	84
6.2.11 Modificación de los tiempos de toma de muestra, aplicando la ley de Graham.....	87
7. Conclusiones.....	91
8. Recomendaciones.....	94
9. Apéndice	95
10. Lista de abreviaturas y acronominos.....	98
11. Referencias bibliográficas .....	100

## 1. INTRODUCCIÓN

El tabaquismo desde su descubrimiento hasta la actualidad ha sido un hábito muy practicado por el ser humano. Los motivos por los cuales se consume son diversos, de estos se puede mencionar: satisfacción, necesidad, curiosidad, costumbre, rituales, etc. y sus formas de consumo numerosas como lo son el cigarrillo, cachimba, bidis, puros, snuff, etc.; de estos, el más popular a nivel mundial es el cigarrillo. Sin embargo, en la actualidad a consecuencia del posible daño causado a otras personas (fumadores pasivos), se han establecido diversas leyes a nivel internacional, que prohíben su consumo en algunos sitios públicos. Ello a su vez, ha motivado el auge en el consumo del tabaco sin humo y en particular los “snuff”, los cuales suelen ser presentados en forma de polvo, crema o pasta.

En Venezuela el tabaco sin humo de mayor consumo es conocido como chimó, el cual es un producto de consistencia pastosa y es considerado internacionalmente como un “snuff”. Es elaborado de forma artesanal y semi-industrial en diversas zonas del país, especialmente en los estados andinos y llaneros. En cuanto a la ingesta del chimó, se ha visto incrementada en la sociedad venezolana, especialmente en grupos de bajos recursos económicos debido a los altos costos de los cigarrillos, la fácil distribución, adquisición y consumo del producto, además que sus consumidores alegan percibir una sensación similar que al consumir cigarrillos.

El chimó no tiene regulación por parte del Gobierno Nacional; en consecuencia, los productos no poseen una etiqueta que anuncie los niveles de los componentes dañinos que el mismo posee y sus consecuencias al consumirlo; habiéndose evidenciado

problemas de salud (especialmente cáncer en la boca) por el consumo desmedido y continuo del mismo.

En el Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela, se han desarrollado diversos métodos para determinar la cantidad total de nicotina en el chimó; sin embargo, dichos métodos suelen ser laboriosos y relativamente costosos, especialmente en la etapa de tratamiento de la muestra para la extracción y posterior cuantificación de la nicotina. Por tanto, en este trabajo de investigación se trató de simplificar el tratamiento de muestra para agilizar su análisis de una forma más rápida y expedita que las desarrolladas hasta ahora. Esto es particularmente importante para la determinación en “batch” de nicotina en chimó a nivel semi-industrial. A su vez, el método pudiera ser utilizado en la regulación de los niveles máximos de nicotina que el producto puede contener.

En resumen, se propuso un método para la determinación de nicotina en chimó mediante la técnica de headspace y cromatografía de gases, con la finalidad de reducir o eliminar los inconvenientes presentados por la matriz de la muestra en los análisis previamente desarrollados.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 El tabaco.

El tabaco es una planta perteneciente a la familia de las Solanáceas, la cual se incluye en el reino vegetal, dentro del género de las *Nicotiana* y su especie es el *tabacum*. La *N. tabacum* tiene todas las partes de una planta superior, a saber: raíces, tallo, hojas, flores, fruto y semilla. Es una hierba de cosecha anual con raíz pivotante la cual puede ser compacta o difusa, con una profundidad que oscila entre los 40 y 60 cm de penetración. Su tallo es herbáceo, cilíndrico y forma un tejido leñoso en la parte externa e inferior y suave en la parte superior, se encuentra ramificado en la parte superior una vez que inicia la floración. Sus hojas están adheridas al tallo de forma asimétrica y helicoidal (figura 1), son grandes, abiertas y pueden ser de forma lanceolada u oval, es suculenta y flexible con gran capacidad higroscópica, éstas despiden un olor ligeramente acre y narcótico debido a los alcaloides presentes en su estructura, principalmente la nicotina. Estas hojas tienen entre 50 a 60 cm de largo y de ancho tienen de 25 a 40 cm dependiendo de la clase y variedad, así como de las condiciones ambientales en la zona de cultivo. La superficie foliar de la planta puede alcanzar fácilmente 2,5 m<sup>2</sup>.<sup>[1]</sup>



Fig. 1.- Planta de Tabaco.

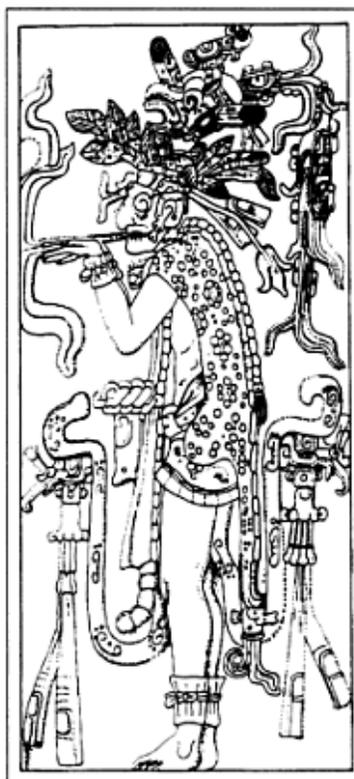
Según el Dr. Martínez Llamas en su Manual de Patología Tabáquica (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1982), no se conoce exactamente los inicios del tabaco como planta específica; sin embargo, se conoce que dicha planta es de procedencia americana, en especial de sus zonas costeras donde esta tiene sus raíces en la historia y en el tiempo; circunscribiéndose a la zona comprendida entre México, Bolivia y Venezuela. El género al cual pertenece comprende más de 50 especies las cuales se clasifican en cuatro grupos principales:

- *Nicotiana tabacum*.
- *Nicotiana rústica*.
- *Nicotiana petunioides*.
- *Nicotiana polidiclia*.<sup>[2]</sup>

El tabaco utilizado comercialmente es obtenido de la especie *N. tabacum* y en cantidad muy reducida, de la especie *N. rústica*. En la actualidad, todos los países americanos producen, exportan e importan tabaco; habiéndose intensificado el cultivo del mismo en Brasil (Bahía), Cuba, México, República Dominicana, entre otros. El uso primitivo, que aún se mantiene en muchas tribus de América del Sur, es mascar las hojas jóvenes, frescas o hervidas. De esta etapa se pasó a la preparación de hojas secas para cigarros o tabaco de pipa y de aquí al uso del polvo como rapé, que fueron desarrolladas por comunidades prehistóricas en diferentes partes de América utilizando las dos especies con mayor contenido de nicotina en las hojas, las especies *N. tabacum* y *N. rústica*<sup>[3]</sup>.

El tabaco era utilizado con fines religiosos y médicos en el continente americano antes de la llegada de Colón. Los pueblos indígenas denominaban a la planta de diversas

maneras según el lugar: *cohiva* o *cojiva* en el Caribe; *kuts* los mayas; *pisietl* y *velt* los aztecas; *saiti* los incas; *vuri* en Colombia y *petum* en Brasil. Entre los mayas la planta de tabaco era utilizada como ritual y para fines medicinales, pues se tienen evidencias de representaciones como la del templo de la Cruz, en Palenque (figura 2), en la que aparece el Dios Jaguar con un cigarro o pipa tubular <sup>[4]</sup>.



**Fig. 2.- Personificación del Dios Jaguar fumando (Palenque, México)**

Posteriormente, en 1492 con la llegada de Colón a tierras americanas se dio a conocer el tabaco en Europa, luego que Rodrigo de Xerez y Luis de Torres fueran enviados para explorar la que hoy es la isla de Cuba y se percataron que los hombres siempre tenían un tizón o tabacos (como era llamado por los indígenas) elaborado con hierbas secas envueltas en una hoja seca; el cual encendían por un lado e inhalaban por el otro,

consiguiendo un efecto de adormecimiento de la carne que los hacía no sentir el cansancio. Fueron ellos, quienes llevaron algunas hojas y semillas a España propagándose este hábito en la comunidad Europea <sup>[4]</sup>.

Años más tarde, la nobleza y la corte de Europa aceptaron el tabaco gracias a la iniciativa del embajador francés en Lisboa, Jean Nicot, quien en 1560 envió a su soberana, Catalina de Médicis, hojas de tabaco molidas conocidas en la actualidad como rapé, pretendiendo que la misma aliviara sus migrañas. En vista de que el remedio fue efectivo para la reina, trajo como consecuencia la difusión del tabaco por todo el mundo además que, se aportó el nombre de Nicot al género de la planta en la clasificación botánica (*Nicotiana*) <sup>[4]</sup>.

En la actualidad, el acto más común de consumo de tabaco es mediante el cigarro a nivel internacional. Este hábito continúa incrementándose e inclusive desarrollándose.

Según cifras manejadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tabaco afecta la salud de más de 6 millones de personas cada año y causa pérdidas económicas valoradas en más de medio billón de dólares. Por lo tanto, se ha catalogado al tabaco como la principal causa de muerte prevenible; decidiéndose en 2008 aplicar el Convenio Marco para el Control del Tabaco de la OMS (CMCT de la OMS) en el cual propusieron vigilar el consumo de tabaco y las políticas de prevención, proteger a la población del humo del tabaco, ofrecer ayuda para dejarlo, advertir de los riesgos a los que se expone el consumidor de tabaco, hacer cumplir las prohibiciones sobre publicidad, promoción y patrocinio del tabaco y aumentar los impuestos de los productos que contengan tabaco. Como resultado del CMCT de la OMS, actualmente alrededor de una tercera parte de la población mundial está cubierta por al menos una

de las medidas aplicadas por la OMS en dicho convenio. Esto demuestra que es posible hacer frente a la epidemia de tabaquismo y salvar vidas, con independencia del tamaño o los ingresos del país <sup>[5]</sup>.

Hoy en día se ofrecen muchos tipos de productos que generan el mismo efecto narcótico que un cigarro convencional pero sin la necesidad de ser fumados. Estos últimos se comercializan ampliamente con la finalidad de atraer grupos específicos como mujeres (pertenecientes a culturas donde no es socialmente aceptable que ellas fumen), jóvenes (utilizándose productos con sabores más agradables y comunes para el consumidor) e inclusive son producidos para atraer fumadores activos los cuales los utilizan como alternativa para consumir el tabaco en espacios libres de humo <sup>[6]</sup>.

## **2.2 Tabaco sin humo.**

A partir del descubrimiento del tabaco, este ha sido preparado de muchas maneras, entre estas se encuentra el tabaco sin humo el cual es tabaco que no es quemado al utilizarse y se coloca en las cavidades nasales u orales justo en las mucosas, lo que permite la absorción de la nicotina en el cuerpo humano <sup>[7]</sup>. En la actualidad se conoce como tabaco para mascar, tabaco oral, pasta de tabaco, tabaco inhalado, etc. Entre los tipos principales de tabaco sin humo se tienen: <sup>[6]</sup> <sup>[8]</sup>

- Tabaco para mascar: Son hojas sueltas de tabaco las cuales han sido prensadas en bloques o en trenzas. Estas se colocan en la boca y pueden ser masticadas o mantenerse fijo en la boca; la saliva puede ser escupida o se puede pasar.

- Rapé: Su presentación es húmeda o seca; está disponible en pastillas solubles, en saquitos semejantes a las hojas de té, también es conocido como snuff. La presentación seca de este puede ser inhalada por la nariz mientras que la presentación húmeda, será de nuestro especial interés ya que es conocido en el país como chimó.

De estas variedades de tabaco sin humo existe escasa información en cuanto a su composición, así como de las consecuencias que tiene su consumo, las cuales alimentan la creencia de ciertas personas considerándolos menos dañinos para la salud<sup>[9]</sup>. Estudios recientes indican que los niveles de carcinógenos en la mercancía van desde niveles relativamente bajos a niveles comparables con los productos de tabaco convencionales<sup>[10]</sup>.

La realidad es que ninguna de las formas de consumir tabaco puede ser considerada inocua, ya que estos provienen de la misma fuente, es decir, de las hojas de tabaco y por consiguiente, causan los mismos daños y, en ocasiones hasta más severos<sup>[11]</sup>.

Será de nuestro especial enfoque el chimó (conocido así en Venezuela) el cual es una pasta a base de tabaco hervido y mezclado con melaza y otros aditivos.

### **2.3 El chimó. Tabaco sin humo en Venezuela.**

El origen del chimó es mucho más antiguo a la llegada de los españoles, en 1492 ya existía este producto expandido por la comunidad indígena de los andes Venezolanos.

Los indígenas preparaban el Mó, el cual se obtiene a partir del cocimiento de la hoja del tabaco, llevándolo a un estado pastoso; luego colocaban sal de urao, la cual fue estudiada por químicos de la Universidad de los Andes y obtuvieron que esta sal se corresponde con el sesquicarbonato de sodio dihidratado ( $C_2H_5Na_3O_8$  /  $Na_2CO_3 \cdot NaHCO_3 \cdot 2H_2O$ ) y otros aliños (los cuales denominaban Chi) para dar el gusto esperado, obteniendo así el CHIMÓ el cual es básicamente un preparado de jalea de tabaco.

El urao era extraído de una laguna de agua salada en los andes Venezolanos, conocida como Laguna de Urao (debido al nombre que recibe la sal que produce esta laguna) y cuyo nombre indígena era Yohama <sup>[12]</sup> (figura 3). Además el urao por ser alcalino, contribuye a que la nicotina entre con mayor facilidad al sistema nervioso, agudizando los efectos de este alcaloide <sup>[12]</sup>.



**Fig. 3.- Laguna de Urao. Edo. Mérida (950 Km de Caracas D.C. Venezuela).**

Posterior al proceso de colonización, se propagó el gusto por el Chimó entre los nuevos pobladores y comenzó entonces una interesante expansión gracias al encantamiento

del tabaco al mundo Europeo, naciendo así una época floreciente y muy rica de comercio del tabaco, urao y chimó<sup>[12]</sup>.

En general, se puede decir que el chimó es un producto venezolano exportado hace siglos al resto del mundo y que se ha ido extendiendo en todo el planeta, tomado últimamente como una amenaza a la salud pues su consumo frecuente puede causar en algunos casos hasta cáncer bucal<sup>[13]</sup>.

Reina Durán, antropóloga del estado Táchira, en los últimos años realizó un estudio acerca del chimó y presenta la preparación de éste de la manera siguiente: El proceso comienza con la cocción del tabaco seco en un caldero denominado “cocedora”, dura allí cuatro horas seguidas y se le saca el agua sobrante de la cocción, en este punto se le agrega el “palito” y “la arenilla” que son materiales arcillosos utilizados para rendir la mezcla. Luego se transfiere la mezcla a la “mermada”, donde se cocina y se permite que se vaya secando la mezcla poco a poco hasta perder su forma líquida. Seguidamente este amasijo llega a la “aliñadora”, que es la paila donde se cocina el tabaco hasta llegar a su punto final, se revuelve constantemente la mezcla para lograr una consistencia pastosa y antes de apagarse se le agrega la ceniza que sería el aliño principal del chimó, pues con ella se consigue el sabor picante de este producto, aunque se le puede aliñar con otras sustancias<sup>[14]</sup>.

En cuanto al consumo del chimó, en una investigación realizada por Rivera H y col.<sup>[15]</sup> se evaluaron 4 comunidades del estado Portuguesa obteniéndose que 15 de los 109 sujetos evaluados (13,2 %), reportaron consumir "chimó", observándose un empleo de chimó asociado al sexo masculino. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en otros países como EEUU y Canadá<sup>[16, 17, 18]</sup>.

Además, se encontró que los principales consumidores son personas de estatus socioeconómico bajo. El promedio de edad de inicio del consumo se ubicó en los 11,6 años, similar a lo reportado por Offenbacher y Weathers <sup>[18]</sup>, quienes obtuvieron un intervalo entre 10 y 17 años, siendo a los 12 el promedio de inicio del hábito de tabaco no fumado (TNF) en el 15 % de los consumidores entrevistados.

En Venezuela, aproximadamente dos de cada diez adolescentes entre sexto y noveno grado consumen productos derivados del tabaco; el que más se usa es el chimó. Se consume tres veces más que el cigarrillo por parte de los adolescentes y se vende fácil por ser económico, de envases pequeños, y venderse sin control en bodegas ubicadas en zonas periféricas a los colegios, haciendo fácil el acceso a este producto por parte de los adolescentes; según lo afirma José Félix Ruiz, médico y Coordinador del Programa Nacional de Prevención y Control del Tabaco de la Fundación Venezolana del Corazón <sup>[19]</sup>.

### 2.3.1 Composición química.

La materia prima en la elaboración de chimó es la planta de tabaco, específicamente la especie *Nicotiana tabacum* la cual ha sido estudiada encontrándose que contiene no menos de 3000 componentes <sup>[20,21]</sup>.

Durante el proceso de elaboración del chimó, la planta sufre cambios en su composición química; durante el curado, el contenido de almidón disminuye drásticamente, los azúcares reductores aumentan un 100 %, las proteínas y la nicotina disminuyen ligeramente. La fermentación para la cura del tabaco hace que el contenido

de carbohidratos y polifenoles de las hojas disminuyan. La masa de la hoja de tabaco procesado antes de la fermentación contiene alrededor de 50 % de carbohidratos y proteínas. Otros componentes incluyen alcaloides (0,5 – 5,0 %) con nicotina como el compuesto predominante (85 – 95 % del total de alcaloides), polifenoles (0,5 – 4,5 %), fitosteroles (0,1 -2,5 %), ácidos carboxílicos (0,1 – 0,7 %), alcanos (0,1 – 0,4 %), hidrocarburos aromáticos, aldehídos, cetonas, aminas, nitrilos, N- y O- hidrocarburos heterocíclicos, pesticidas, alcalinitratos (0,01 – 5,00 %) y, al menos, 30 compuestos metálicos <sup>[20,21]</sup>.

Al menos, 28 agentes tumorígenos han sido separados e identificados en los productos del tabaco de mascar. Estos incluyen algunos hidrocarburos polinucleares aromáticos y carcinogénicos, especialmente benzo[ $\alpha$ ]pireno; los cuales se originan principalmente por aire contaminado o en el proceso de curado del tabaco.

Sin embargo, los carcinógenos más abundantes en el tabaco de mascar son los aldehídos volátiles <sup>[20,21]</sup>; mientras que los carcinógenos más potentes provienen de la nitrosación entre los alcaloides del tabaco (nicotina, nornicotina, anatabina y anabasina principalmente); en especial, de la nicotina y la nornicotina. Estos productos son conocidos como N-nitrosaminas (TSNA; Tobacco-specific nitrosamines) <sup>[15]</sup>, (figura 4) <sup>[17]</sup>. Esta nitrosación se forma en el proceso de curado, fermentación y envejecimiento del tabaco <sup>[21]</sup>.

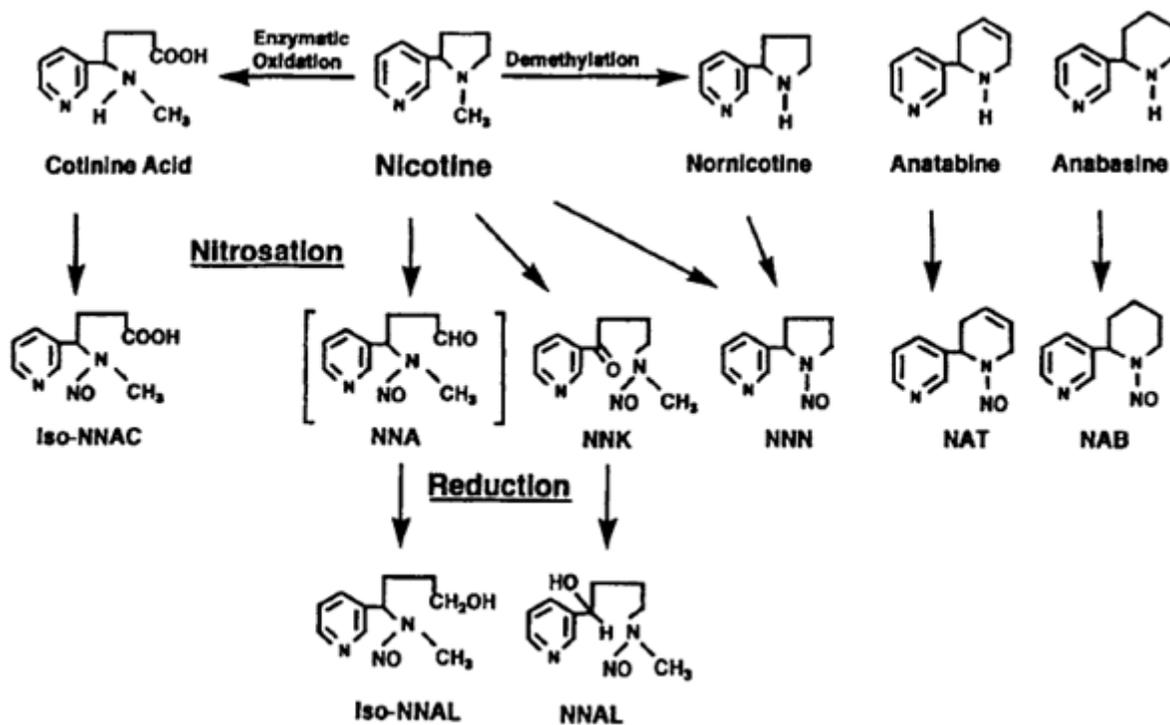


Fig. 4.- Formación de TSNA específicas del tabaco.

Cabe destacar, que la N-nitrosornicotina (NNN) y la 4-(metilnitrosoamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) son los únicos carcinógenos que inducen a tumores orales, mientras que el NNK además provoca adenomas y adenocarcinomas en pulmones de ratas y hámsteres <sup>[22]</sup>. Como se observa en la figura 4, ambos compuestos pueden provenir de la nitrosación de la nicotina; la cual se conoce que crea adicción en el consumidor <sup>[8]</sup>, incrementándose de esta manera el riesgo de adquirir un tumor oral de tipo cancerígeno; por lo que se hace de nuestro interés general el análisis de nicotina.

## 2.4 Farmacología de la nicotina.

La nicotina es una amina terciaria compuesta de un anillo de piridina y un anillo de pirrolidina. En su forma no ionizada, la nicotina atraviesa libremente a través de las membranas, incluyendo la mucosa bucal y la barrera del cerebro y la sangre mientras que la forma ionizada de la nicotina es muy poco absorbida<sup>[23]</sup>.

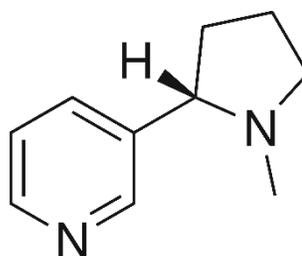


Fig. 5.- Estructura molecular de la nicotina.

Se ha señalado que las compañías de tabaco han manipulado el pH de sus productos para alterar la disponibilidad de la nicotina libre. En un estudio realizado por Jarpa P. se demuestra que en marcas populares de los Estados Unidos, dicha afirmación es cierta, viéndose alterado el pH de los productos para facilitar la adicción de los consumidores jóvenes y proveer mayor cantidad de nicotina a aquellos que ya son adictos<sup>[20]</sup>.

En el caso de las personas que generalmente no inhalan el humo, sino que consumen tabaco sin humo como el chimó, la nicotina se absorbe a través de las membranas mucosas y alcanza los niveles máximos en la sangre y en el cerebro más lentamente. La absorción de nicotina continúa a un ritmo lento durante un máximo de 60 min después de que el tabaco se retira de la boca. Posiblemente, la absorción continuada

es debido a la lenta liberación de nicotina de las membranas mucosas o la absorción de la misma <sup>[24]</sup>.

Inmediatamente después de que la persona ha sido expuesta a la nicotina, recibe un estímulo causado en parte por la acción de la droga sobre las glándulas suprarrenales que resulta en una descarga de adrenalina. El “rush”, es decir, la sensación inicial intensa debido a la adrenalina, estimula al cuerpo y causa un aumento en la presión arterial, la respiración y la frecuencia cardíaca <sup>[8]</sup>.

Una de las sustancias químicas clave en el cerebro implicada en el deseo de consumir la droga es el neurotransmisor dopamina. Las investigaciones han demostrado que la nicotina aumenta los niveles de dopamina en los circuitos de gratificación. Esta reacción es similar a la que se ve con otras drogas de abuso y se cree que es la causa de las sensaciones placenteras que sienten muchos fumadores. Para muchos de los consumidores de tabaco, los cambios a largo plazo en el cerebro inducidos por la exposición crónica a la nicotina resultan en la adicción a la misma <sup>[8]</sup>.

El tabaquismo es un factor de riesgo importante para la enfermedad coronaria y periférica vascular, cáncer, enfermedad pulmonar crónica obstructiva, enfermedad de úlcera péptica y trastornos reproductivos, incluyendo la prematuridad.

En los fumadores con enfermedad coronaria, el tabaco puede tener diferentes efectos. Se puede reducir la contractilidad ventricular izquierda y el gasto cardíaco <sup>[25]</sup>.

La importancia de la nicotina en la causa de cáncer es más especulativa que su papel en la causa de la enfermedad cardiovascular. La nicotina no es en sí carcinógeno, pero se ha demostrado que es co-cancerígeno con benzo[ $\alpha$ ]pireno en la causa de cáncer de piel en ratones; sin embargo, el mecanismo de co-carcinogénesis no está establecido. Además, la nicotina puede formar nitroso compuestos tal como se expuso previamente, los cuales son altamente cancerígenos <sup>[26]</sup> y la principal causa del por qué se asocia la nicotina con el cáncer.

En cuanto a la determinación cuantitativa de la nicotina, existen diversas técnicas para su análisis; sin embargo, las más empleadas son las cromatográficas, ya que permite determinar el analito de interés en presencia de diversos compuestos contaminantes y cuantificar a bajos niveles de concentración con relativa precisión.

## **2.5 Técnicas cromatográficas.**

Las técnicas cromatográficas permiten realizar separaciones analíticas de mezclas complejas o simples, que en ocasiones no podrían analizarse por otros medios; lográndose de esta manera reducir los tiempos de análisis y/o realizar en un mismo análisis la determinación de varios analitos; siempre y cuando no interfiera uno con otro.

Una separación cromatográfica, implica el desplazamiento de una muestra (bien sea en forma líquida o gaseosa) a través de una fase estacionaria (que se encuentra fijada a una superficie sólida), con la cual la muestra es inmisible pero que existen interacciones de tipo fisicoquímicas. La muestra en cromatografía es arrastrada por una fase móvil la cual puede ser líquida o gaseosa y se escogerá de modo tal que la

muestra se distribuya de modo diferente entre la fase móvil y estacionaria además de que no interactúe con los analitos.

En la cromatografía la separación se puede observar en forma de bandas o zonas discretas que posteriormente proporcionan información cualitativa y/o cuantitativa. De este modo, se debe entender que la separación se corresponderá con las interacciones que tenga el analito con la fase estacionaria al ser arrastrado por la fase móvil; evidenciándose retardados aquellos compuestos que son más retenidos en la columna o fase estacionaria; es decir, aquellos que tengan la capacidad de formar interacciones más fuertes con la misma que con la fase móvil.

### 2.5.1 Clasificación de los métodos cromatográficos.

La clasificación del método cromatográfico depende del tipo de equilibrio que permite la transferencia de solutos entre las fases móvil y estacionaria así como de estas individualmente. En general, se tiene la cromatografía de líquidos, de gases y de fluidos supercríticos cuyas fases móviles son respectivamente, líquidos, gases y fluidos supercríticos<sup>[27]</sup>.

En el caso particular de la nicotina su cuantificación puede hacerse tanto por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC; high performance liquid chromatography), como por cromatografía de gases (GC; gas chromatographic), sin embargo, comúnmente se emplea esta última por ser una técnica más económica, que requiere menos consumibles, etc. Por lo tanto haremos énfasis en los conceptos básicos de la GC.

## 2.6 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases comprende dos tipos: la gas-sólido (GSC; gas solid chromatography) y la gas-líquido (GLC; gas liquid chromatography). Sin embargo, la primera no presenta gran aplicabilidad debido que al ser sólida la fase estacionaria, se produce una adsorción física; quedándose retenidos semipermanentemente las moléculas muy polares y por consiguiente poco rango de aplicabilidad. Por otro lado, la cromatografía gas-líquido (la cual normalmente también es abreviada GC), tiene gran aplicabilidad en todos los campos de la ciencia. Esta se basa en la distribución del analito entre una fase móvil y una fase líquida la cual se encuentra inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte [27].

En general, en la GC, la muestra es volatilizada y posteriormente inyectada en el respectivo puerto de inyección del cromatógrafo; produciéndose la elución gracias al flujo de la fase móvil. Un cromatógrafo de gases está conformado por pocos instrumentos (figura 6).

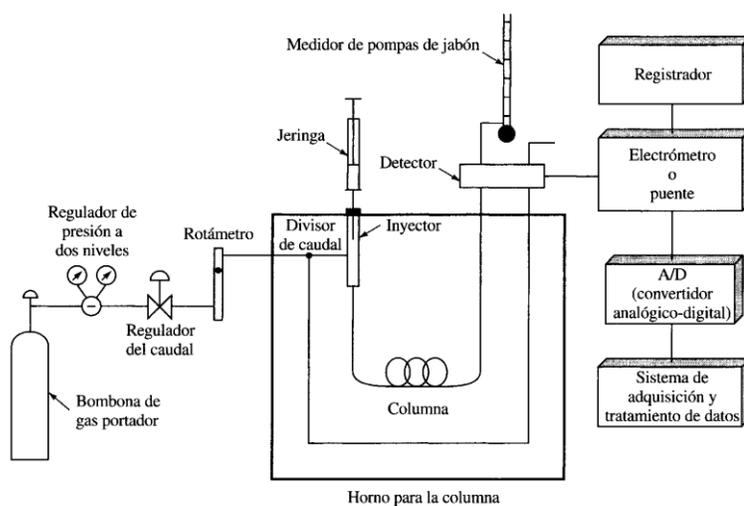


Fig. 6.- Representación esquemática de un cromatógrafo de gases [27].

### 2.6.1 Gas de arrastre.

El gas portador o gas de arrastre tiene como finalidad transportar la muestra empujándola hacia la fase estacionaria donde serán retenidos los analitos momentáneamente para luego alcanzar el detector cromatográfico.

Su pureza es esencial para evitar reacciones secundarias que originan productos no deseables, es decir, debe ser inerte y que no existan interacciones de orden fisicoquímicas; además, los analitos no deben difundir mucho en la misma para evitar que la banda se ensanche. La elección de la fase móvil estará determinada por el tipo de detector que se utilizará <sup>[27]</sup>.

### 2.6.2 Sistema de introducción de la muestra: Puerto de inyección.

El puerto de inyección puede ser considerado una cámara de vaporización instantánea en la cabeza de la columna, comúnmente se encuentra a una temperatura de 50 °C por encima del punto de ebullición del compuesto menos volátil a analizar. Para lograr la mejor eficiencia y resolución del análisis se requiere que la muestra sea introducida como un tapón de vapor a través del septum y en la cantidad adecuada a fin de evitar que se ensanche la banda cromatográfica y que se sature el detector <sup>[27]</sup>.

Las columnas capilares (más usadas en la actualidad) requieren que el volumen de inyección sea muy pequeño por lo cual se puede usar un sistema divisor de muestra que permite pasar a la columna una pequeña fracción de la cantidad inyectada,

desechándose el resto <sup>[27]</sup>. A continuación se describirán los tipos de inyección de la técnica cromatográfica <sup>[28]</sup>.

#### 2.6.2.1 Inyección con división de flujo (Split).

Este tipo de inyección es utilizada cuando el/los analitos de interés son  $> 0,1$  % de la muestra. Se introduce entre 0,2 y 2 % de muestra en la columna. Luego que la muestra atraviesa el septum, entra a la cámara de vaporización y es arrastrada por el gas portador hacia la cámara de mezcla; donde se termina de vaporizar y homogeneizar la muestra. Posteriormente, entra a la columna cromatográfica una cantidad de muestra y el resto es desechado, esta cantidad es controlada por una válvula de presión.

#### 2.6.2.2 Inyección sin división de flujo (splitless).

Este tipo de inyección se utiliza cuando los analitos constituyen  $< 0,01$  % de la muestra, haciendo así factible el análisis de trazas. El puerto de inyección cuando se utiliza este tipo de inyección, no posee cámara de mezcla (figura 7) y la cantidad de muestra que ingresa a la columna es de aproximadamente el 80 % de lo inyectado.

#### 2.6.2.3. Inyección en columna.

Suele utilizarse con columnas de diámetro superior a las capilares, típicamente de 0,53 mm a pesar que éstas no dan una resolución óptima. Se usa en muestras que se descompongan por encima de su punto de ebullición. La muestra se inyecta directamente en la columna, sin pasar por un inyector caliente; los solutos condensan

en la cabeza de la columna y al aumentar la temperatura, estos son eluidos en una banda estrecha.

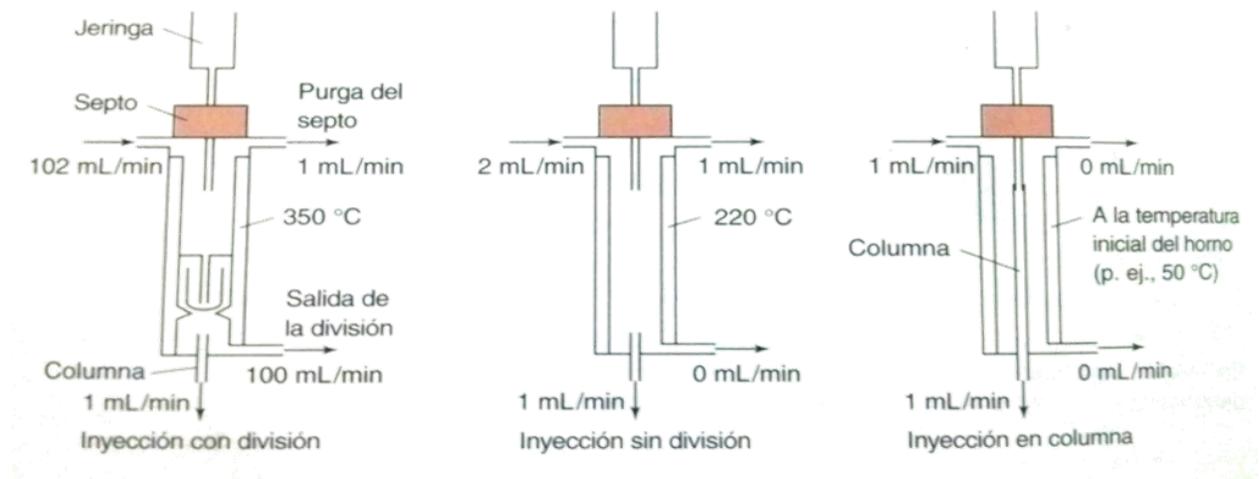


Fig. 7.- Condiciones de inyección en modo de división, sin división y en columna <sup>[28]</sup>.

### 2.6.3 Columnas cromatográficas.

En la columna cromatográfica se lleva a cabo el proceso de separación de los analitos para su posterior identificación y/o cuantificación; están construidas de acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón <sup>[27]</sup>. Se colocan en el interior de un horno termostatzado cuya temperatura es la variable más importante en el proceso de la elución cromatográfica, pudiéndose realizar de forma isotérmica o con rampas de temperatura según sean los requerimientos para lograr la mejor separación en el mejor tiempo posible. En general, existen dos tipos de columnas cromatográficas las cuales se describen a continuación:

### 2.6.3.1 Columnas rellenas o empacadas.

Son fabricadas de vidrio, metal o teflón, poseen una longitud de 2 a 3 m y un diámetro interno de 2 a 4 mm. Están rellenas de un soporte sólido el cual debe ser inerte a elevadas temperaturas, y poder humectarse homogéneamente con la fase estacionaria; en la actualidad se utiliza tierras de diatomeas de procedencia natural.

### 2.6.3.2 Columnas tubulares abiertas o capilares.

Son las más utilizadas en la actualidad, son estrechas, largas y se fabrican de sílice fundida con diámetros interiores entre 0,1 y 0,53 mm con longitudes entre 15 y 100 m <sup>[28]</sup>. Mientras más estrecha es la columna, mejor resolución se obtiene, disminuye el tiempo de retención, pero requieren una presión de trabajo mayor y además tienen una menor capacidad de carga. Estas columnas son de dos tipos básicos; la columna tubular abierta de pared recubierta (WCOT; wall coated open tubular y la columna tubular abierta recubierta con soporte (SCOT, surface coated open tubular).

La WCOT se encuentra recubierta por una película de fase estacionaria líquida cuyo grosor varía de 0,1 a 0,5  $\mu\text{m}$  mientras que SCOT posee la superficie interna revestida de una delgada capa de un material de soporte, tal como tierra de diatomeas; contiene varias veces la fase estacionaria que tiene una columna de pared recubierta y, por tanto, tienen una mayor capacidad de carga. En general, la eficacia de una columna WCOT es mayor a la de una SCOT pero sin embargo esta última tiene una sensibilidad mayor que una columna rellena <sup>[27, 28]</sup>.

#### 2.6.4 Fase estacionaria.

El tiempo de residencia de los analitos en la columna cromatográfica va a depender de la fase estacionaria que la misma posea, siendo un tiempo de residencia razonable aquel que no sea muy largo pero a su vez que no sea muy corto. En efecto, los analitos deben tener cierta compatibilidad (solubilidad) con la fase estacionaria. Mientras más parecido en polaridad sea la muestra a la fase estacionaria en uso, mas retenidos se quedarán los analitos. Cuando la polaridad de la fase estacionaria es similar a la de los componentes de la muestra, el orden de elución queda determinado por el punto de ebullición de los compuestos a eluir.

Algunas de las propiedades deseadas para una fase líquida inmovilizada en una columna cromatográfica gas-líquido son: baja volatilidad (su punto de ebullición debe ser 100 °C superior que la temperatura de trabajo máxima de la columna), estable térmicamente y químicamente inerte <sup>[27]</sup>.

#### 2.6.5 Detectores.

El detector se encuentra ubicado al final de la columna cromatográfica y sirve para detectar la elución de algún componente de la muestra, generando una señal proporcional a la cantidad de sustancia que ingresa. Se poseen detectores de respuesta universal (conductividad térmica y detector de ionización de llama) y de respuesta específica; siendo empleados estos de manera conveniente según el análisis a realizar y cuando se poseen muestras muy complejas.

Los detectores no dan señal cromatográfica cuando entra en ellos el gas portador; estos funcionan de forma diferencial respondiendo a alguna propiedad que pueda variar cuando éste se encuentra mezclado con alguna sustancia eluída de la columna.

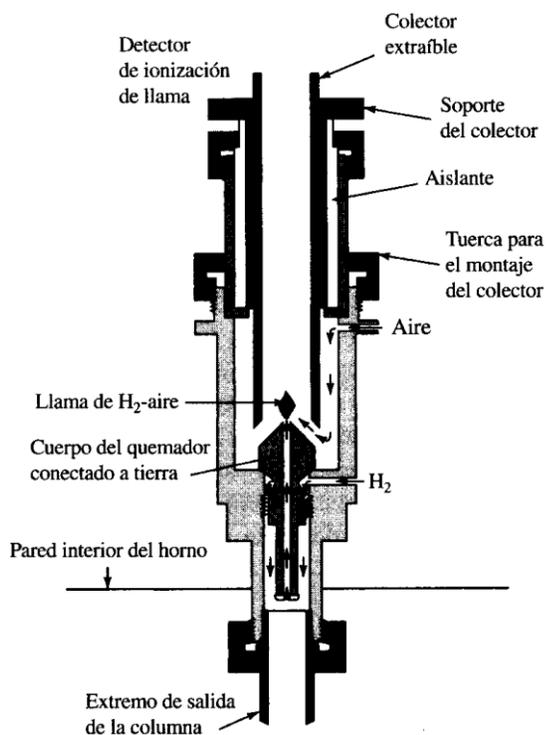
Entre las características que debe tener un detector se encuentran: adecuada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal para los solutos que se extienda a varios órdenes de magnitud, intervalo de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400 °C, alta fiabilidad y manejo sencillo, respuesta similar a todos los solutos, no destructivo de la muestra <sup>[27]</sup>. Sin embargo, no existe detector que cuente con todas estas características, por lo cual, se emplea el que reúna la mayoría de estas y que mejor se adapte al análisis a realizar.

Entre los detectores usados en cromatografía de gases se tienen: detector de ionización a la llama (FID; flame ionization detector), detector de conductividad térmica (TCD; thermal conductivity detector), detectores de quimioluminiscencia del azufre (SCD; sulfur chemiluminescence detector), detector de captura de electrones (ECD; electron capture detector), detector de emisión atómica (AED; atomic emission detector), detector termoiónico (TID; thermionic ionization detector), etc. Siendo el más extensamente utilizado el FID ya que posee una elevada sensibilidad, gran intervalo de respuesta línea, bajo ruido, es resistente y fácil de usar. Su principal desventaja se basa en que este es destructivo de la muestra <sup>[27]</sup>.

### 2.6.5.1 Detector FID.

Su funcionamiento está basado en que al ingresar el eluato al detector, este se mezcla con  $H_2$ /Aire y posteriormente se enciende eléctricamente la llama. La mayoría de los compuestos orgánicos, se pirolizan a la temperatura de la llama producida en el detector; produciendo iones y electrones capaces de conducir la electricidad a través de la llama. Al aplicarse una diferencia de potencial entre el extremo del quemador y el electrodo colector (figura 8) situado por encima de llama, la corriente resultante es medida por un amplificador operacional de alta impedancia. Luego que la señal transitoria sale del detector en forma analógica, es convertida en digital, para ser procesada en un ordenador obteniéndose lo que se conoce como cromatograma el cual es la representación gráfica de la señal en función del tiempo una vez que la muestra es inyectada a un sistema cromatográfico, obteniéndose tiempos de retención, alturas de pico, áreas de los picos, etc. los cuales son datos que servirán para la posterior cuantificación de la muestra.

Este detector, responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, por lo cual se dice que es un detector más sensible a la masa que a la concentración. Además, es insensible a los gases no combustibles como  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $SO_2$  y  $NO_2$ ; siendo utilizado entonces en el análisis de compuestos orgánicos que pudiesen estar contaminados con agua o bien para detectar contaminantes en muestras naturales de agua.



**Fig. 8.- Detector de ionización de llama.**

En el caso del chimó, tiene una matriz muy compleja, lo cual requiere de una extracción del analito de interés (nicotina) muy tediosa y laboriosa. Para simplificar su análisis por cromatografía de gases, se puede aprovechar la volatilidad del analito y emplear el sistema de headspace (HS), como método de extracción de la muestra para su posterior análisis por GC.

### 2.6.6 HS-GC (análisis en un espacio confinado ó Análisis en un “espacio de cabeza” acoplada a cromatografía de gases).

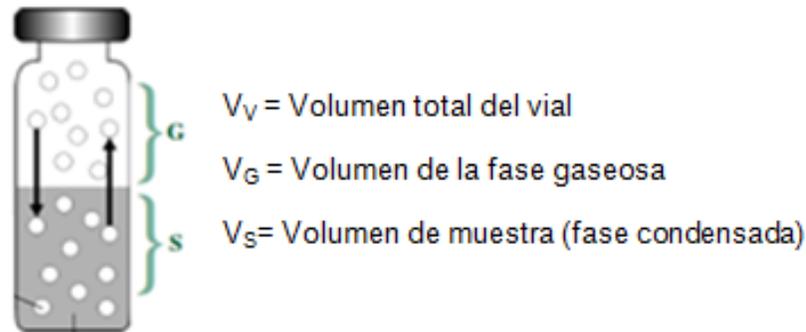
No es una forma de análisis novedosa para la cuantificación de analitos, de hecho, se ha puesto en práctica desde los primeros días en que se comenzó a utilizar la cromatografía de gases. Permite reducir los tiempos de análisis drásticamente debido que en general, la preparación de las muestras suele ser lo que más tiempo consume en un análisis.

La sistema acoplado de HS-GC permite la determinación de analitos volátiles, en muestras cuya matriz no sea volátil; siendo de gran utilidad para cuantificar compuestos en matrices complejas. Se basa en colocar la muestra en un vial, el cual es cerrado inmediatamente y sellado con un septum (este vial debe poseer un espacio vacío en el cual se establecerá el equilibrio liquido-vapor), y la posterior inyección del vapor en el cromatógrafo de gases luego de haberse calentado a una temperatura controlada, estableciéndose una proporcionalidad entre la fase de vapor y la líquida tal como se establece en la Ley de Dalton, Henry y Raoult. De esta manera, se hace posible la cuantificación de los compuestos volátiles del líquido.

#### 2.6.6.1 Teoría básica para el análisis por HS.

Como ya se mencionó, el sistema implica los equilibrios entre la fase líquida o condensada con la fase gaseosa. Si en el medio hay analitos volátiles que son solubles en la fase condensada, estos se distribuirán entre ambas fases de acuerdo con el equilibrio controlado termodinámicamente. En la figura 9 se presenta un vial que

representa gráficamente lo anterior descrito y en el cual nos basaremos para explicar la técnica.



**Fig. 9.- Vial de headspace con muestra líquida.**

El volumen relativo entre las dos fases en el vial está caracterizado por la relación volumétrica de fases  $\beta$ :

$$\beta = V_G / V_S \quad (1)$$

Como:  $V_V = V_G + V_S$ ; la ecuación 1, queda de la siguiente manera:

$$V_G = (V_V * \beta) / (1+\beta) \quad (2)$$

Asumiendo que el volumen de la fase líquida ( $V_S$ ) después de establecerse el equilibrio es igual al volumen de la muestra original ( $V_O$ ), es decir, el analito transferido a la fase gaseosa durante el equilibrio no ofrece un cambio apreciable en el volumen de la muestra original, entonces:

$$V_O = V_S \quad (3)$$

Adicionalmente, la cantidad de analito en la muestra original es  $W_O$ , y su concentración es  $C_O$ , entonces se tiene:

$$C_O = W_O/V_S \quad (4)$$

Después del equilibrio las cantidades respectivas del analito en las dos fases son  $W_S$  y  $W_G$  y sus concentraciones son:

$$C_S = W_S/V_S \quad (5)$$

$$C_G = W_G/V_G \quad (6)$$

Por lo tanto:

$$W_O = W_S + W_G \quad (7)$$

La distribución del analito entre las dos fases en equilibrio es controlada termodinámicamente por una constante de equilibrio ( $K$ ) la cual es análoga al coeficiente de partición o reparto en la cromatografía de gases común.

$$K = C_S/C_G \quad (8)$$

Este coeficiente es un parámetro fundamental que expresa la distribución masiva entre las dos fases presentes en el sistema y depende de la solubilidad del analito con la fase líquida o condensada.

Cuando los analitos tienen mayor solubilidad en la fase líquida los valores de  $K$  serán más altos ya que tendrán una mayor concentración en la fase condensada ( $C_S \gg C_G$ ).

Con las expresiones (4), (5), (6) y tomando en cuenta el balance de masas representado en la expresión (7), resulta:

$$C_G = C_O / (K + 1) \quad (9)$$

En un sistema dado y bajo condiciones tal que  $K$  y  $\beta$  son constantes, se establece que la concentración del analito en la fase vapor es proporcional a la concentración en la muestra original.

$$C_G = \text{constante} * C_O \quad (9.1)$$

#### 2.6.6.2 Teoría básica para el análisis por el acoplamiento HS-GC.

Es sabido que según las reglas básicas de la GC, el área del pico obtenido ( $A$ ) de algún analito, es proporcional a la concentración del analito en la muestra analizada. Es decir, que de la alícuota de la fase de HS analizada cuya concentración es  $C_G$  podemos decir que:

$$A = \text{constante} * C_G \quad (10)$$

Donde, la constante incorpora la influencia de los parámetros analíticos (sensibilidad cromatográfica) y el factor de respuesta del detector.

De igual forma, combinando las ecuaciones 9.1 y 10, se puede escribir que:

$$A = \text{constante} * C_O \quad (10.1)$$

De esta manera, se demuestra que el área cromatográfica medida haciendo uso de la técnica de HS es proporcional a la concentración en el líquido de la muestra original.

### 2.6.6.3 Bases fisicoquímicas para análisis HS-GC <sup>[29]</sup>.

Dentro de un sistema dado (con un analito y el disolvente) el valor del coeficiente de reparto ( $K$ ) puede ser manipulado mediante el cambio de condiciones analíticas. Para investigar los factores que influyen en este, utilizamos tres leyes básicas: estas son la ley de Dalton, la ley de Raoult y la ley de Henry.

De acuerdo con la ley de Dalton la presión total de una mezcla de gases es igual a la suma de las presiones parciales ( $P_i$ ) de los gases presentes en la mezcla:

$$P_T = \sum P_i \quad (11)$$

Se deduce a partir de esta ley que la fracción de presión ejercida por un gas, es igual a la fracción del número total de moles presentes en la mezcla gaseosa:

$$P_i / P_T = n_i / n_T = X_G \quad (12)$$

En donde “ $n$ ” representa el número de moles presentes y  $X_G$  es la fracción molar de un componente en particular de la mezcla.

La ley de Raoult afirma que la presión de vapor de un soluto (presión parcial  $P_i$ ) es directamente proporcional a la fracción molar ( $X_{S(i)}$ ) de este en la disolución y la constante de proporcionalidad es la presión de vapor del analito puro ( $P_i^0$ ):

$$P_i = P_i^{0*} X_{S(i)} \quad (13)$$

La ley de Raoult es válida solo para mezclas ideales y en muchos casos hay desviaciones de la ley; para compensar estas desviaciones otro factor es introducido en la ecuación anterior:

$$P_i = \gamma_i \cdot P_i^{0*} X_{S(i)} \quad (14)$$

Este nuevo parámetro es el coeficiente de actividad ( $\gamma_i$ ) del compuesto  $i$ , puede ser considerado un factor de corrección de la concentración. Este depende de la naturaleza del componente y refleja la interacción intermolecular entre el analito y otros componentes de la muestra. Para altas concentraciones del analito, el  $\gamma_i$  pasa a ser función de la concentración, mientras que en disoluciones diluidas esta constante es independiente de la concentración del analito.

En una solución ideal diluida, existe una linealidad entre la presión de vapor parcial y la concentración molar del analito, esto viene expresado por la ley de Henry:

$$P_i = H * X_i \quad (15)$$

Donde  $H$  es la constante de Henry, en una solución ideal  $\gamma_i = 1$  y  $H = P_i^0$ . La ley de Henry es la base de la cromatografía y del análisis por HS.

En una solución diluida ideal, cada molécula de analito disuelto está rodeado solamente por moléculas de disolvente. Por lo tanto, sólo las fuerzas de interacción intermoleculares entre las moléculas de soluto - disolvente son efectivas, mientras que la probabilidad de interacción adicional soluto - soluto aumenta con la concentración del analito.

Finalmente se tiene que:

$$P_i = P_T \cdot X_{G(i)} = \gamma_i \cdot P_i^0 \cdot X_{S(i)} \quad (16)$$

O,

$$P_T / (\gamma_i \cdot P_i^0) = X_{S(i)} / X_{G(i)} \quad (17)$$

En una solución ideal diluida la concentración puede ser sustituida por la fracción molar, por lo tanto:

$$P_T / (\gamma_i \cdot P_i^0) = X_{S(i)} / X_{G(i)} = C_{S(i)} / C_{G(i)} = K \quad (18)$$

Y en consecuencia, se tiene que:

$$K \propto (1 / (\gamma_i \cdot P_i^0)) \quad (19)$$

En otras palabras el coeficiente de partición es inversamente proporcional a la presión de vapor y al coeficiente de actividad del analito, al aumentar estos valores hace que disminuya el valor del coeficiente de actividad, por otra parte, cuando disminuye este

valor se incrementa la concentración del analito en el HS en el equilibrio, aumentando la sensibilidad de la técnica <sup>[29]</sup>.

#### 2.6.6.4 Factores que afectan la sensibilidad del HS.

##### 2.6.6.4.1 Volumen de la muestra.

La concentración del analito ( $C_G$ ) en el HS es proporcional al área del pico obtenido (A).

$$A = \text{constante} * (C_0 / K + \beta) \quad (20)$$

De acuerdo con las expresiones anteriores la sensibilidad de la técnica de HS depende inversamente de una combinación de K y  $\beta$ . Adicionalmente la relación volumétrica de las fases ( $\beta$ ) a su vez depende del volumen de la muestra ( $V_S$ ).

$$A = \text{constante} * (C_0 / K + \beta) = \text{constante} * (C_0 / (K + (V_G/V_S))) \quad (21)$$

La expresión (21) indica que la sensibilidad final en headspace depende de un efecto combinado entre K y  $\beta$ ; por lo cual para una muestra dada de concentración  $C_0$ , se puede variar la concentración del HS ( $C_G$ ) variando los valores de K y  $\beta$ ; estando este último relacionado con el volumen de muestra. Si K es mucho mayor que  $V_G/V_S$ , el volumen de la muestra no tiene influencia significativa sobre la sensibilidad final.

#### 2.6.6.4.2. La temperatura.

La presión de vapor de un compuesto puro se ve influenciada por la temperatura, y la relación es exponencial, esta puede ser descrita por la siguiente fórmula general:

$$\text{Log } P_i^{\circ} = - (B/T) + C \quad (20)$$

Donde B y C son constantes específicas para cada sustancia y T es la temperatura.

En consecuencia, se hace importante el control termostático de la muestra, debido a la naturaleza exponencial de la relación entre la presión de vapor y la temperatura. Un pequeño cambio de temperatura puede provocar una diferencia considerable en la sensibilidad.

A temperaturas altas el término B/T se hace más pequeño, y como la relación es exponencial, K disminuye haciendo que la concentración del analito en la fase vapor sea mayor<sup>[29]</sup>.

### 3. ANTECEDENTES.

**3.1. Anders H. Laurene y T. Gibson Harrell en el año 1958** <sup>[30]</sup>, realizaron una revisión de los métodos cromatográficos implementados hasta ese entonces para la determinación de nicotina.

El primero de los métodos evaluados fue desarrollado por C.O. Jesen y D.E. Haley en el año 1935. Estuvo basado en un análisis gravimétrico en el cual se hacía precipitar la nicotina presente en tabaco y en humo de tabaco utilizando ácido silico-tungstenico, en un medio de ácido clorhídrico (HCl). Este método estuvo sujeto a errores de co-precipitación de otros constituyentes en el humo y a la pérdida de solubilidad del complejo formado; además que este método era tedioso y requería emplear un gran tiempo de análisis. Sin embargo, posterior a unas modificaciones realizadas en el método planteado, fue el más aceptado en los años 50 y en consecuencia incluido en la Norma Oficial 920.35 de los métodos oficiales de análisis de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC; Association of Official Analytical Chemists) International del año 2000.

En el año 1948 Wolff W. Hawkins M. y Giles W emplearon métodos espectrofotométricos UV-Vis buscando minimizar el tiempo de análisis de los métodos gravimétricos y una mayor especificidad. Estos se basaban en la extracción de la nicotina con etanol-ácido clorhídrico y la posterior determinación cuantitativa del alcaloide en tabaco mediante el uso de un espectrofotómetro; pero se presentaron los problemas típicos de absorción de fondo por parte de los diferentes componentes de la matriz del tabaco.

En el año 1950 Willits C. Swain M. Connelly J. A. y Brice B. A. utilizaron un método espectrofométrico para la determinación de nicotina. Usaron la banda de absorción UV y consistía en analizar el extracto ácido de una muestra de tabaco disuelta en kerosén o gasolina. Este procedimiento al ser comparado con el método de silico-tungstenenico aceptado por la AOAC, obtuvo resultados muy similares; además que continuaba siendo un problema la absorción de fondo por parte de los diferentes componentes de la matriz de la muestra.

A partir de los resultados obtenidos previamente, Griffith R. en el año 1957, Harvey W. R., Stahr H. M., Smith W. C. en 1969 y Davis R.F. en 1976, desarrollaron métodos de destilación de la nicotina por arrastre con vapor para su posterior análisis por vía espectrofotométrica; con esta destilación pretendían eliminar de la matriz de la muestra sustancias no deseadas valiéndose de la manipulación del pH. Sin embargo, continuaron observando contaminación proveniente de alcaloides minoritarios presentes en la muestra; requiriéndose así pasos adicionales. Fue entonces, cuando se comenzaron a desarrollar métodos cromatográficos para la determinación de la nicotina en tabaco.

**3.2. Wu Weijia, David L. Ashley y Clifford H. Watson en el año 2002** <sup>[31]</sup>, realizaron el primer análisis de nicotina, nornicotina, anabasina, y anatabina utilizando el sistema de HS por microextracción en fase sólida (SPME; solid-phase microextraction) combinada con cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS; Gas chromatography–mass spectrometry).

Se analizó el tabaco de relleno de 28 marcas de cigarrillos correspondientes a 14 países (Bangladesh, Brasil, China, Egipto, Alemania, India, Indonesia, Japón, Kenia,

México, Nigeria, Pakistán, Rusia y Estados Unidos) las cuales fueron seleccionadas por la OMS. De cada país se adquirieron dos marcas y tres paquetes de cada una; la de mayor venta a nivel nacional y marlboro (marca conocida internacionalmente. Las muestras se almacenaron en sus envases originales a -70 °C hasta su análisis.

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent 6890, equipado con un automuestreador y un detector de masa selectivo marca Agilent 5973N, una columna J&W de fase estacionaria DB-1701 (30 m x 0,25 mm DI x 0,25 µm), un mezclador para la preparación de las muestras a inyectar y una fibra para SPME de dimetilsiloxano de 100 µm. La extracción con la fibra se realizó por 2 min a 40 °C y la desorción en el cromatógrafo se realizó durante 4 min a 260 °C. El gas de arrastre utilizado fue helio a un flujo constante de 1 mL/min. El puerto de inyección se operó en condiciones splitless por los primeros 45 s y posteriormente en condición split. La temperatura del horno inició a 100 °C por 0,5 min, con una rampa de temperatura de 40 °C/min hasta 280 °C la cual se mantuvo por 1 min.

La preparación de las muestras se realizó combinando el relleno de los cigarrillos (de igual marca) en una muestra homogénea. Se dejó a 22 °C y 60 % de humedad por 24 h y posteriormente se tomaron 30 mg de muestra y se transfirieron a un vial para SPME de 10 mL con 5 µL de pirrolidina, 4 mL de fosfato de sodio tribásico 0,01 N y la mezcla de estándar interno usada de 100 µg de metil-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-nicotina y 20 µg de 3', 4', 5'-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-DL-nornicotina; seguidamente estos viales se agitaron en el mezclador por una noche.

La técnica de HS fue utilizada con la intención de minimizar los problemas con la matriz de la muestra ya que esta contiene numerosos compuestos. En cuanto a los resultados experimentales (figura 9), se encontró que la marca con niveles más altos de nicotina

era Marlboro en la mayoría de los países a excepción de Bangladesh y China. Entre los factores que pudiesen explicar esta marcada variación, se destacan la elaboración del mismo, las condiciones de crecimiento de la planta y la posición de las hojas respecto al tallo.

En términos de cuantificación de los analitos, se tiene que inicialmente para la elaboración de las curvas de calibración se utilizaba tabaco que solo contenía niveles trazas de nicotina, imitando la matriz del tabaco. Estos produjeron curvas de calibración con excelente linealidad, abarcando varios órdenes de magnitud.

Sin embargo, cuando se analizaron muestras de cigarrillos de diferentes países, las diferencias en los factores de respuesta relativos sugieren que la magnitud de los efectos de la matriz no fue consistente entre las diferentes marcas de cigarrillos internacionales. Esto sugirió que era necesaria una investigación más a fondo de los efectos de la matriz de relleno de tabaco. En consecuencia, se decidió utilizar el método de adición de estándar para así compensar los efectos de la matriz de la muestra.

Los límites de detección para nicotina, nornicotina, anabasina y anatabina fueron:

<b>LODs</b>			
Nicotina ( $\mu\text{g}$ )	Nornicotina ( $\mu\text{g}$ )	Anabasina ( $\mu\text{g}$ )	Anatabina ( $\mu\text{g}$ )
1,80	0,134	0,475	0,209

**Tabla N° 1.- Límites de detección medidos para nicotina, nornicotina, anabasina y anatabina.**

Para la determinación de la reproducibilidad, exactitud y linealidad se utilizó una muestra de referencia de 1 g. Obteniéndose:

<b>Analito</b>	<b>Promedio total del alcaloide (mg ± RSD)</b>	<b>% Recuperación</b>
Nicotina (n=14)	18,7 ± 10,3	6,7 %
Nornicotina (n=13)	0,841 ± 11,7	9,9 %
Anabasina (n=12)	0,101 ± 18,6	17,6 %
Anatabina (n=14)	0,554 ± 12,9	20,6 %

**Tabla N° 2.- Promedio total de alcaloides y % de recuperación de los mismos según metodología aplicada.**

En cuanto al método empleado, se concluyó que este ofrece ventajas sobre los métodos aplicados anteriormente por otros autores ya que éste permite determinar de manera inequívoca los analitos, fue fácil la preparación de las muestras, se obtuvo alto rendimiento y aceptable reproducibilidad (tabla N° 2). De esta manera, Wu Weija y col. consideraron que la metodología implementada puede ser fácilmente adaptada para el análisis de otros analitos en el tabaco, el humo del tabaco y una variedad de productos agrícolas.

country	brand name	nicotine	normicotine	anabasine	anatabine
Bangladesh	JP Gold Leaf	16.4 ± 0.7	1.03 ± 0.29	0.101 ± 0.017	0.56 ± 0.15
Bangladesh	Marlboro	14.1 ± 1.6	0.71 ± 0.07	0.069 ± 0.027	0.42 ± 0.11
Brazil	Derby	16.1 ± 2.8	1.06 ± 0.16	0.125 ± 0.053	0.59 ± 0.04
Brazil	Marlboro	18.0 ± 1.0	0.77 ± 0.08	0.082 ± 0.011	0.97 ± 0.41
China	Hongtashan	22.1 ± 0.6	1.02 ± 0.22	0.143 ± 0.013	1.12 ± 0.07
China	Marlboro	16.4 ± 0.9	0.85 ± 0.07	0.100 ± 0.026	0.51 ± 0.07
Egypt	Cleopatra	16.5 ± 2.4	1.12 ± 0.74	0.089 ± 0.034	0.67 ± 0.20
Egypt	Marlboro	21.0 ± 0.5	0.76 ± 0.24	0.094 ± 0.019	0.59 ± 0.03
Germany	West	16.5 ± 1.7	0.67 ± 0.12	0.060 ± 0.008	0.61 ± 0.22
Germany	Marlboro	15.3 ± 1.3	1.16 ± 0.72	0.076 ± 0.012	0.54 ± 0.11
India	Gold Flake	13.6 ± 0.6	0.51 ± 0.03	0.089 ± 0.029	0.31 ± 0.07
India	Marlboro	18.9 ± 3.4	0.61 ± 0.09	0.096 ± 0.022	0.92 ± 0.37
Indonesia	Ardath	16.0 ± 0.5	0.39 ± 0.02	0.073 ± 0.011	0.69 ± 0.10
Indonesia	Marlboro	17.0 ± 1.1	0.95 ± 0.12	0.092 ± 0.023	0.54 ± 0.06
Japan	Mild Seven	16.7 ± 1.4	1.30 ± 0.38	0.094 ± 0.021	0.86 ± 0.39
Japan	Marlboro	17.7 ± 1.9	1.10 ± 0.50	0.085 ± 0.008	0.68 ± 0.20
Kenya	Sportsman	12.5 ± 0.8	0.50 ± 0.10	0.051 ± 0.003	0.49 ± 0.11
Kenya	Marlboro	15.6 ± 1.1	0.82 ± 0.28	0.084 ± 0.011	0.44 ± 0.08
Mexico	Boots	16.3 ± 0.9	1.27 ± 0.14	0.071 ± 0.012	0.55 ± 0.20
Mexico	Marlboro	21.2 ± 0.8	1.50 ± 0.48	0.106 ± 0.003	0.56 ± 0.15
Nigeria	High Society	8.1 ± 0.4	0.36 ± 0.14	0.044 ± 0.013	0.13 ± 0.02
Nigeria	Marlboro	17.6 ± 1.9	0.77 ± 0.28	0.077 ± 0.013	0.69 ± 0.16
Pakistan	Embassy	18.1 ± 0.6	0.63 ± 0.03	0.163 ± 0.062	0.31 ± 0.10
Pakistan	Marlboro	18.2 ± 0.8	0.84 ± 0.30	0.089 ± 0.009	0.58 ± 0.10
Russia	Prima	15.3 ± 2.8	0.73 ± 0.06	0.060 ± 0.006	0.43 ± 0.04
Russia	Marlboro	16.2 ± 1.6	0.85 ± 0.19	0.071 ± 0.019	0.76 ± 0.29
United States	Doral	13.6 ± 0.6	0.66 ± 0.12	0.074 ± 0.009	0.50 ± 0.10
United States	Marlboro	18.1 ± 1.5	0.75 ± 0.01	0.071 ± 0.011	0.55 ± 0.12

Fig. 9.- Niveles de alcaloides (mg/g) en varias marcas de cigarrillos de diferentes países.

**3.3. K.D. Brunemann, J. Qi y D. Hoffmann en el año 2002** <sup>[32]</sup>, analizaron dos marcas diferentes de tabaco sin humo distribuido en cinco estados de U.S.A. con la finalidad de determinar la humedad de los mismos, pH, alcaloides minoritarios, nitritos, nitratos y nitrosaminas.

Las muestras analizadas consistieron básicamente en dos tipos diferentes; la marca A que presentó un pH de 5,84 y la marca B que presentó un pH de 7,99. De cada una de estas marcas se adquirieron 50 latas en mercados minoritarios; las cuales posteriormente fueron homogeneizadas para tener una muestra representativa de las mismas y almacenadas a baja temperatura para evitar la formación de TSNA.

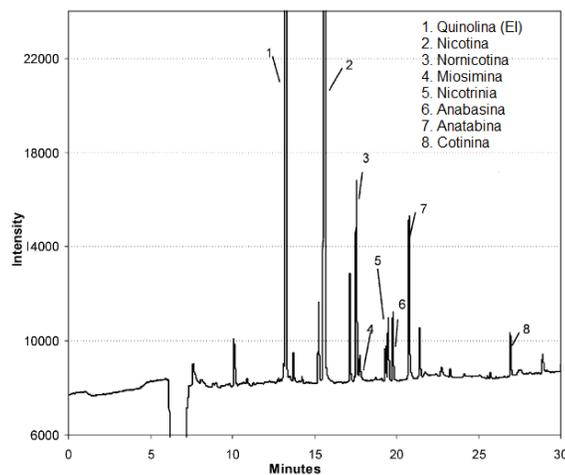
Para el análisis de la nicotina y los alcaloides minoritarios del tabaco se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 Series II el cual contaba con un detector NPD. La columna utilizada para la separación fue una columna capilar de sílice fundida cuya fase estacionaria fue HP-5 (5%-fenil-metilpolisiloxano) cuyas características son 60m x 0,32 mm DI x 0,25  $\mu$ m. Dicha columna fue sometida a un control de temperatura que inicio a 50 °C por 2 min e incrementó 30 °C/min hasta alcanzar 150 °C por 3 min y posteriormente incrementaba 2 °C/min hasta 180 °C por 0,5 min y finalmente incrementaba 10 °C/min hasta alcanzar 220 °C manteniéndose por 5 min. El puerto de inyección se encontraba a 220 °C mientras que la temperatura del detector NPD fue de 230 °C. El gas de arrastre utilizado fue helio a un flujo de 0,875 mL/min. Para la preparación de la muestra se tomaron 200 mg del tabaco húmedo y se añadieron a 4 mL de metanol que contenía hidróxido de potasio al 1%. Como estándar interno se utilizó quinolina (50 mg/mL) y se colocó la muestra en ultrasonido por 1 h, posteriormente se filtró a través de un filtro de membrana de PTFE de 0,45  $\mu$ m; tomándose 100  $\mu$ L de este extracto y diluyéndose 10 veces con metanol el cual contenía el estándar interno (50  $\mu$ g/mL) de quinolina. Por otro lado, la determinación del pH fue realizada disolviendo 2 g de tabaco en 20 mL de agua desionizada, agitando por 15 min e introduciendo un electrodo en la solución sobrenadante.

En cuanto a los resultados se refiere, se encontró que el pH del tabaco determina la cantidad de nicotina libre o no protonada, siendo ésta la nicotina más rápidamente absorbida por las membranas mucosas de la cavidad oral y posteriormente transportada al sistema nervioso central causando la estimulación normal del tabaco en el cuerpo humano. Adicionalmente, el pH del producto influye en la formación de TSNA. En el estudio, se encontró que la marca A cuyo pH fue de 5,84 contenía 0,42 % de nicotina mientras que la marca B cuyo pH fue de 7,99 contenía 2,73 %. Es decir, que a pH 5,84, solo el 1 % de nicotina está presente como la base libre mientras que a pH 7,99 se encuentra libre el 59 % de la misma. Los resultados obtenidos se muestran en

la figura 11. El respectivo cromatograma para la determinación de los alcaloides en los tabacos de marca B se muestra en la figura 12.

Analyte	Snuff type A	Snuff type B
Moisture (%)	24.0	52.7
pH	5.84	7.99
Nicotine (%)	0.42	2.73
Nornicotine (%)	0.012	0.037
Myosmine (%)	0.001	0.003
$\beta$ -Nicotyrine (%)	0.003	0.007
Anabasine (%)	0.002	0.009
Anatabine (%)	0.008	0.028
Cotinine (%)	0.008	0.011
Total alkaloids (%)	0.45	2.83
Nitrate (%)	0.94	2.17
Nitrite ( $\mu\text{g/g}$ )	7	1176
NNN ( $\mu\text{g/g}$ )	3.1	15.4
NAT ( $\mu\text{g/g}$ )	0.8	18.5
NAB ( $\mu\text{g/g}$ )	0.2	1.2
NNK ( $\mu\text{g/g}$ )	0.5	2.5
Total TSNA ( $\mu\text{g/g}$ )	4.6	37.6

**Fig. 11.- Resultados obtenidos en la investigación realizada por K.D. Brunnemann, J. Qi y D. Hoffmann sobre los tabacos marca A y marca B.**



**Fig. 12.- Cromatograma obtenido para la separación de los alcaloides del tabaco marca B vía GC-NPD.**

**3.4. Sheng L.Q., Ding L., Tong H.W., Yong G.P., Zhou X.Z., Liu S.M. en el año 2005** <sup>[33]</sup>, desarrollaron un método utilizando cromatografía de gases con un detector FID para la determinación en tabaco y en el humo del tabaco de nicotina y cuatro de los alcaloides relacionados (nornicotina, anabasina, anatabina y 2,3-dipiridilo).

Para el análisis cuantitativo se utilizó un cromatógrafo de gases HP-6890 (Plus +) equipado con un autosampler HP-7683. Los componentes fueron separados usando una columna capilar HP-1MS (30 m x 0,25 mm DI x 0,25 µm). Se empleó inyección splitless cuando se analizó el tabaco y modo split cuando se analizó el humo del tabaco; habiéndose fijado una relación de split 1:10; mientras que el volumen de inyección fue de 1 µL y la temperatura del puerto de inyección se fijó en 230 °C. El gas de arrastre utilizado fue nitrógeno a flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del detector FID se fijó en 300 °C. En cuanto a las condiciones del horno, se utilizó un control de temperatura el cual inició a 60 °C por 1 min, luego incremento 15 °C/min hasta 180 °C (se mantuvo por 1 min) y seguidamente se incrementó a 40 °C/min hasta 280 °C (donde se mantuvo por 2 min). La cuantificación de los componentes fue realizada por el método de estándar interno, habiéndose empleado quinaldina.

Para la extracción de los alcaloides del tabaco, este se secó por 4 h a 40 °C en un horno, se pesaron 500 mg del polvo obtenido y se le añadió 1 mL de una solución acuosa de amoníaco (1:4 v/v), 1 mL de quinaldina (1 mg/mL) como estándar interno y 20 mL del solvente de extracción el cual fue una mezcla 1:3 (v/v) del CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se llevó a un baño de ultrasonido por 15 min, se filtró y finalmente se tomó una porción que fue transferida a un vial para su posterior análisis. Para la extracción del humo de los cigarrillos se mantuvieron los mismos al menos durante 48 h en una cámara de humedad relativa del 60 ± 2 % y 22 ± 1 °C; los cigarrillos fueron fumados con una máquina de 20 puertos (Bargwaldt Technik RM 20 / cs, Alemania), con una duración de

soplos de 2 s con una frecuencia de 1 soplo/min, obteniéndose un volumen de soplo de 35 mL. El humo de 20 cigarrillos fue condensado en un filtro Cambridge, el cual fue posteriormente sometido a ultrasonido durante 15 min en una solución de HCl 1M a la cual se le habían añadido 0,2 mL de la solución de quinaldina. Se realizaron extracciones con dos alícuotas de 25 mL de diclorometano y se separaron ambas capas, la capa acuosa se llevó a pH=13 mediante el agregado de una solución acuosa de NaOH, seguidamente se realizaron tres extracciones con 25 mL de diclorometano y el extracto se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Finalmente, se concentró a 1 mL dicho extracto utilizando un rotavaporador EB 2000 (Beijing Analytical Instrument, China) conectado a una bomba de vacío.

Los resultados obtenidos mediante éste método analítico empleado fueron comparados con los resultados obtenidos en un procedimiento automatizado por Davis en 1976 (Tob Sci 20:146–148). Tal como se puede observar en la figura 13, se obtuvo buena relación entre los mismos:

Sample <sup>a</sup>	Total alkaloid content (%)	
	This method	Automated procedure
Tobacco	1.51	1.43
Cigarette smoke	1.23 <sup>b</sup>	1.19 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>From Xian Fan Cigarette Factory (Hubei Province, P.R. China)

<sup>b</sup>mg/cigarette

**Fig. 13.- Comparación de la data obtenida por el método planteado con el procedimiento automatizado utilizado por Davis en 1976.**

La repetibilidad de todo el procedimiento se determinó mediante la extracción de los alcaloides de tabaco cinco veces; habiéndose cuantificado por el método de estándar

interno la nicotina, nornicotina y anatabina ya que solo de estos se poseía estándares puros para la realización de la curva de calibración. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla N° 3.

Analito	Contenido total del alcaloide ( % $\pm$ SD)	Coefficiente de correlación
Nicotina	90,21 $\pm$ 1,5	0,9999
Nornicotina	4,76 $\pm$ 3,4	0,9994
Anabasina	0,49 $\pm$ 2,7	0,9995
LOD = 0,01 $\mu$ g		
% Recuperación (nicotina en tabaco)		95,7 %

**Tabla N° 3: Cuantificación de alcaloides presentes en el tabaco Burley con sus respectivos coeficientes de correlación.**

**3.5. Stephen B. Stanfill, Lily T. Jia, David L. Ashley y Clifford H. Watson en el año 2009** <sup>[34]</sup>, realizaron una investigación en la cual compararon dos métodos para la cuantificación de nicotina en tabaco sin humo; el primero de estos consistía en cromatografía de gases y utilizaba un detector FID mientras que en el segundo desarrollaron un método utilizando GC-MS. Se analizaron 7 muestras convencionales de tabaco sin humo por ambos métodos, encontrándose excelente correspondencia entre estos.

Se adquirieron 5 paquetes de cada producto de tabaco sin humo húmedo y fueron homogeneizadas previamente; estos fueron adquiridos en distintos puntos de venta o mediante páginas web y fueron almacenadas a -70 °C hasta que se fuesen a utilizar. Antes de analizar las muestras fueron equilibradas en una cámara de humedad a 23 °C

y 95 % de humedad durante la noche y llevadas a temperatura ambiente cuando se fueron a analizar. Con la finalidad de facilitar la comparación de los métodos, se utilizó quinolina como estándar interno en ambos casos; para esto se preparó un solvente de extracción añadiendo 500 mg de quinolina en un frasco de 4 L de metil-tertbutil-éter. Se añadieron 50 mL del solvente de extracción y 5 mL de NaOH 2 N a 1 g de muestra la cual se dejó agitar por 2 h a 160 rpm, pasado el tiempo se separaron ambas capas y se tomó una alícuota de 2 mL de la fase orgánica que fue transferida a los viales correspondientes del autosampler GC-FID y GC-MS, habiéndose inyectado 1 $\mu$ L del extracto.

Para la determinación de nicotina en el sistema GC-FID se utilizó un cromatógrafo Agilent 6890 GC, una columna Ultra2 (25 m x 0,32 mm x 0,52  $\mu$ m). El puerto de inyección se mantuvo a 230 °C en modo split con una relación 50:1; mientras que el gas de arrastre usado fue helio a un flujo constante de 1,7 mL/min. El horno del sistema cromatográfico se encontraba inicialmente a 110 °C, se incrementó 10 °C/min hasta 185 °C, luego 6 °C/min hasta 240 °C, temperatura en la cual se mantuvo por 10 min; teniendo un tiempo total de 26,7 min. Las condiciones para el sistema GC-MS solo variaron en la temperatura como se estableció el horno, estando este inicialmente a 175 °C por 1 min, luego se aumentó a 5 °C/min hasta 180 °C, luego a 35 °C min hasta 240 °C; teniendo un tiempo total 3,7 min.

Para determinar la precisión y el porcentaje de recuperación según el método, se utilizó 1 g de muestras libres de nicotina y se contaminaron con una solución que contenía nicotina en los rangos de 4,02; 9,07 y 14,01 mg/g tabaco como se muestra en la figura 14.

Table I. Method Precision and Accuracy Determined by Spiking a Set of Five 1-g Nicotine-Free Tobacco Samples with a Solution Containing Nicotine at 4.02, 9.07, or 14.01 mg/g Tobacco*							
GC-MS Method (n = 5) <sup>†</sup>				GC-FID Method (n = 5) <sup>‡</sup>			
Nicotine Spike (mg)	Nicotine Mean ± Standard Error (mg/g)	Method Precision (CV,%)	Method Accuracy (%)	Nicotine Spike (mg)	Nicotine Mean ± Standard Error (mg/g)	Method Precision (CV,%)	Method Accuracy (%)
4.02	4.04 ± 0.02	1.17%	100.6%	4.02	4.08 ± 0.03	1.77%	101.6%
9.07	9.21 ± 0.03	0.75%	101.6%	9.07	9.17 ± 0.06	1.51%	101.2%
14.01	14.17 ± 0.05	0.73%	101.2%	14.01	13.92 ± 0.04	0.69%	99.4%

\*Following spiking, samples were extracted with methyl tertiary butyl ether, and the resulting extract was analyzed.  
<sup>†</sup> Analysis method presented in this manuscript.  
<sup>‡</sup> Analysis method published in Federal Register. 1999. pp.14085 – 14096. FR Doc. 99-7022.

**Fig. 14.- Precisión y porcentaje de recuperación del método planteado.**

La data para estos métodos (GC-MS y GC-FID) presentaron excelente precisión (CV < 2 %) siendo similar entre ambos métodos los coeficientes de varianza. Adicionalmente el porcentaje de recuperación promedio para la detección GC-MS y GC-FID se ubicó en 101,1 % y 100,7 % respectivamente; correspondiéndose entre ellos.

En cuanto a la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad del método, cada una de las soluciones preparadas fue inyectada en el cromatógrafo 10 veces durante tres días, es decir, 30 veces obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla N° 4.

<b>Pico de nicotina (mg)</b>	<b>Primeras 10 inyecciones C.V. (%)</b>	<b>Promedio de los C.V. para el total de 30 inyecciones</b>
4,02	0,38 %	0,38 %
9,07	0,63 %	0,32 %
14,01	0,24 %	0,33 %

**Tabla N° 4.- Determinación de la repetibilidad y reproducibilidad del método.**

**3.6. Gómez Luis, Hernández Jackdín y colaboradores en el año 2012** <sup>[37]</sup>, desarrollaron un método para la determinación de nicotina en tabaco sin humo (chimó) en distintas marcas de producción nacional (Matheus, San Benito, Chain, San Francisco, Matheitos, Tigrito II, Tigrito Ice y El Águila) 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 y en dos marcas adicionales (Taparo, La Chinata) las cuales fueron adquiridas en una distribuidora en San Felipe, Edo. Yaracuy. La técnica utilizada para la cuantificación de nicotina fue GC.

Se pesaron 0,3 g de muestra previamente laminada, se adicionaron 10 g de disolución acuosa de KOH al 5 % (p/v), se llevó a ultrasonido por 15 min, se colocó en la centrifuga por 15 min, se toma una alícuota de 5 g y se adicionaron 14 g de cloroformo, se colocó nuevamente en ultrasonido por 15 min, se dejó reposar por 2 h, se separaron las capas y se inyectó en el cromatógrafo 1 µL de la fase orgánica.

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases modelo Trace GC Thermo Finnigan equipado con un detector FID. La columna utilizada fue una columna capilar DB-5 Agilent Technologies (J&W Scientific) (30 m x 0,32 mm DI x 0,25 µm). La

temperatura del horno inició en 100 °C y fue incrementada a razón de 10 °C/min hasta alcanzar los 250 °C donde se mantuvo la temperatura por 2 min. El puerto de inyección se estableció a 250 °C, operando en modo split cuya relación fijada fue 10:5. Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre a un flujo de 2 mL/min.

En cuanto a los resultados obtenidos, se encontraron que los valores de nicotina oscilaron entre 3 y 25 (mg/g) aproximadamente (tabla Nº 4) correspondiéndose estos a los resultados obtenidos en otras investigaciones donde el rango de concentración de nicotina en cigarrillos internacionales se mantiene entre 8,1 y 22,1 (mg/g); en los cuales además se hizo notar que la concentración de nicotina varía dependiendo del tipo de producto de tabaco y factores como el cultivo, el proceso de curado, la humedad, pH, contenido y tipo de aditivos o aliños, etc.

<b>Marca</b>	<b>Concentración (mg/g)</b>	<b>S</b>	<b>CV</b>
<b>Chain</b>	3,4	0,1	3,0
<b>Tigrito Ice</b>	7,9	0,2	3,0
<b>Tigrito 1</b>	8,6	0,4	4,0
<b>Taparo</b>	8,7	0,3	3,8
<b>El Águila</b>	9,6	0,3	3,0
<b>Tigrito 2</b>	9,4	0,3	3,2
<b>Matheitos</b>	11,8	0,4	3,4
<b>San Francisco</b>	14,4	0,5	3,5
<b>Matheus</b>	15,5	0,5	3,2
<b>San Benito bolsita</b>	16,8	0,8	4,6
<b>San Benito caja</b>	23,4	0,8	3,4
<b>La Chinata</b>	25,7	0,8	3,1

**Tabla Nº 4: Concentración de nicotina en distintas marcas de chimó de consumo nacional.**

En cuanto a la técnica implementada se obtuvo buena reproducibilidad, sin embargo se puede notar que al considerar solamente el método cromatográfico (utilizando patrones puros) el CV= 1,5 % (tabla N° 5) mientras que al incluir el tratamiento de la muestra, el CV se incrementa al 4 % (tabla N° 6) debido a los múltiples pasos realizados en el tratamiento de la muestra.

Numero de replica	Relación de área
1	2,28
2	2,33
3	2,26
4	2,29
5	2,33
6	2,32
7	2,29
8	2,33
9	2,37
Promedio	2,31
s	0,03
CV	1,5

Tabla N° 5.- Reproducibilidad considerando solamente el método cromatografico.

Replicas	Peso de muestra (g)	Nicotina (mg/g)
1	0,3017	9,0
2	0,3093	8,2
3	0,3062	8,6
4	0,3057	8,2
	Promedio	8,6
	s	0,4
	CV	4

Tabla N° 6.- Reproducibilidad considerando el método cromatografico y el tratamiento de la muestra.

Con la finalidad de establecer la eficiencia del proceso de extracción según las pérdidas que pudiesen existir en cada paso realizado, se determinó el porcentaje de recuperación (tabla N° 7) teniéndose que este fue de 85 % el cual a pesar de no ser un valor extremadamente bajo, pudiese mejorarse.

LOD (mg/g)	LOQ (mg/g)	Porcentaje de recuperación
0,11	0,55	85 %

**Tabla N° 7.- LOD, LOQ y porcentaje de recuperación del método desarrollado.**

**3.7. Corredor A., Chidiak S., Jarpa P., Urdaneta L., Sánchez N., Aparicio R. y Usubillaga A. en el año 2013** <sup>[36]</sup>, realizaron una investigación en la cual determinaron el nivel de nicotina presente en seis variedades comerciales de chimó disponibles en el mercado venezolano; una de producción artesanal autóctona del estado Mérida y cinco de producción semi-industrializada: Andinito, Chinata, Llanero de Socopó, Recio Apureño y Tigrito, provenientes de diferentes estados del país.

El tratamiento de la muestra consistió en pesar 500 mg de cada una en un vaso de precipitado, tratarlas con 10 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 5 %, colocarlas en un ultrasonido marca Cole – Parmer, hasta la completa disgregación de la muestra, añadir 5 mg de octadecano disueltos en 200 µL de hexano y finalmente se agregan 30 mL de éter dietílico y se coloca por 15 min en ultrasonido. Posteriormente, se trasvasó a un embudo de decantación para separar la fase acuosa de la fase etérea que contenía la nicotina. La fase etérea se concentró a sequedad en un rotavaporador

(marca Ika Rv10 digital) a una temperatura de 35 °C. El producto concentrado obtenido de la extracción, se disolvió en 1,0 mL de éter isopropílico y se transfirió a un vial de muestra para su análisis en el GC-MS.

Para la cuantificación, se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5973, provisto de un detector de masas tipo cuadrupolo y una columna capilar HP-5M (30 m x 0,25 mm DI x 0,25  $\mu$ m). La temperatura del horno inicial fue de 120 °C, luego se aplicó un calentamiento a razón de 10 °C/min hasta una temperatura final de 220 °C. La temperatura de la interfase-cromatógrafo-espectrómetro se mantuvo a 280 °C. En el detector de masas se usaron las siguientes condiciones: temperatura de la cámara de ionización 230 °C y temperatura del cuadrupolo 150 °C. Como gas portador se usó helio ajustado a una velocidad de 34 cm/s. El análisis se realizó a 70 eV; con un rango de masas de 40-500 am $\cdot$ u y a una velocidad de 3,9 espectros/s. Se inyectó 1,0  $\mu$ L de cada solución de nicotina/octadecano utilizando una relación de split de 1:20. La nicotina fue identificada mediante comparación computarizada de su espectro de masas con los datos de la librería Wiley MS (6<sup>ta</sup> edición).

En cuanto a resultados se refiere, se encontró que con el método planteado, la nicotina tuvo un tiempo de retención de 4,49 min y el estándar interno (octadecano) de 8,95 min; requiriéndose un tiempo de análisis de 10 min posterior al tratamiento de la muestra. Adicionalmente se encontró que el chimó artesanal contiene entre 500 y 1000 veces menos nicotina que los otros tipos de chimó, encontrándose estos entre 3,64 mg/g y 10,8 mg/g. De las marcas analizadas, se encontró que el de más alto contenido de nicotina por gramo fue La Chinata (10,8 mg/g) seguido de Recio Apureño (8,5 mg/g) como se muestra en la figura 15.

Producto	Nicotina (mg/g)
Artesanal	0,009
Andinito®	3,64
Chinata®	10,80
Llanero de Socopó®	4,04
Tigrito®	3,84
Recio Apureño®	8,50

Fig. 15.- Contenido aproximado de nicotina por gramo de chimó.

#### **4. JUSTIFICACIÓN.**

En vista que los métodos analíticos para la determinación de nicotina en tabaco sin humo (chimó) han resultado ser procedimientos laboriosos que implican un tratamiento de muestra tedioso y en consecuencia una relativa pérdida en la cantidad total de analitos, se busca desarrollar una nueva metodología que logre cuantificar de manera rápida y efectiva la cantidad de nicotina en el chimó, para realizar análisis en “batch”.

## 5. OBJETIVOS.

### 5.1 Objetivo General.

Desarrollar un método para la determinación de nicotina en tabaco sin humo (chimó) mediante la técnica de cromatografía de gases - headspace.

### 5.2 Objetivos Específicos.

- Ajustar las mejores condiciones cromatográficas de identificación y cuantificación de la nicotina por cromatografía de gases empleando estándares puros.
- Realizar un material de referencia interno homogeneizando una cantidad de chimó comercial de distintos lotes ya que no se posee un estándar certificado del mismo.
- Encontrar un solvente volátil que disgregue la muestra permitiendo la extracción de la nicotina para ser determinada mediante la técnica de headspace.
- Ajustar las condiciones cromatográficas de acuerdo a la complejidad de la matriz del material de referencia interno para la determinación de nicotina en el chimó.
- Evaluar los parámetros respectivos para la metodología de HS.
- Evaluar las figuras de mérito de la técnica medida (reproducibilidad, rango dinámico lineal, linealidad, etc.)

- Determinar la concentración de nicotina en diferentes marcas comerciales de producción y distribución nacional de chimó.

## 6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

### 6.1 Equipos y materiales utilizados.

#### 6.1.1 Equipos.

- Cromatógrafo de gases marca Thermo Finnigan, modelo TRACE GC (Figura 16), Chromopack CP-9001, equipado con un inyector split-splitless y un detector FID. Para la adquisición y procesamiento de la data, se utilizó el software Chromcard.



**Fig. 16.- Cromatógrafo de gases Thermo Finnigan, modelo TRACE GC.**

- Columna capilar HP- 5MS, Agilent Technologies (J&W Scientific), de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor pelicular. Con un rango de temperatura de -60 a 325/350 °C. Fase estacionaria: Bonded and cross-linked 5 % fenil, 95 % metilpolisiloxano.
- Columna capilar DB- 5MS, Agilent Technologies (J&W Scientific), de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor pelicular. Con un rango de temperatura de -60 a 325/350 °C. Fase estacionaria: Bonded and cross-linked polímero fenilarileno.
- Ultrasonido, modelo 8890. Cole-Parmer (figura 17).



**Fig. 17.- Ultrasonido Cole Parmer, modelo 8890.**

- Baño termostático marca Julabo modelo VC-5 ( $\pm 0,5$  °C) adaptado para headspace (figura 18).



Fig. 18.- Baño termostático marca Julabo modelo VC-5 ( $\pm 0,5$  °C) adaptado para HS.

#### 6.1.2 Reactivos y materiales.

- Gases de  $N_2$ ,  $H_2$  y aire de alta pureza. AGA gases industriales de Venezuela.
- Nicotina ( $C_{10}H_{14}N_2$ ), 99 % de pureza, para síntesis, Sigma-Aldrich.
- Metanol ( $CH_3OH$ ), 99,8 % de pureza, Sigma-Aldrich.
- Acetato de isoamilo ( $C_7H_{14}O_2$ ), 99,5 % de pureza, Carlo Erba
- Nitrobencono ( $C_6H_5NO_2$ ), 99 % de pureza, para síntesis, Merck.
- Etanol ( $CH_3CH_2OH$ ), 99 % de pureza, Merck.
- Hidróxido de potasio (KOH), 85 % de pureza, Merck.

- Viales transparentes marca Agilent con un volumen de 12 y 20 mL respectivamente (figura 19).



**Fig. 19.- Viales transparentes marca Agilent con un volumen de 12 y 20 mL.**

- Balones aforados marca Pyrex de 10, 25 y 50 mL, clase A.
- Balanza analítica marca Mettler Toledo modelo AB204 con una resolución digital de 0,1 mg.

### 6.1.3 Muestra de referencia interna.

- Chimó marca El Tigrito, presentación en forma de lata.

Se empleó la marca de mayor consumo y comercialización nacional “El Tigrito”. Con el objetivo de disponer de suficiente cantidad, se procedió a homogeneizar una porción conformada por 10 latas de 18 g cada una (no hubo garantías de que se trataran de un mismo lote). Para su elaboración, las diferentes muestras se sometieron a un baño de vapor (calentamiento indirecto por convección térmica), haciéndolas más blandas y maleables con el objetivo de mezclarlas y homogeneizarlas. Se fraccionó en pequeñas cantidades y fueron conservadas en refrigeración, hasta el momento de los análisis.

## **6.2 Desarrollo experimental.**

No hay que perder de vista que el objetivo fundamental del presente trabajo de investigación, fue estudiar la factibilidad de desarrollar un método por HS-GC para la determinación de nicotina en chimó. La principal intención era que el método a desarrollarse fuese menos tedioso y laborioso, además de valerse de un tiempo de análisis mucho menor al desarrollado previamente en nuestros laboratorios; en especial cuando se requiere examinar volúmenes grandes de muestra, es decir para análisis en “batch”. Para ello, nos basamos en las condiciones operativas previamente desarrolladas, el cual fue llamado “método de referencia” <sup>[37]</sup>.

### **6.2.1 Estudio preliminares de la condiciones cromatográficas para la determinación de nicotina.**

El método de referencia reporta el empleo de un cromatógrafo de gases equipado con un detector FID y un sistema de introducción de la muestra split/splitless. Utilizaron una columna capilar de polaridad baja, comúnmente empleada para propósitos generales

(DB-5 de Agilent Technologies, 30 m de longitud, 0,32  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor pelicular). Las condiciones cromatográficas del método de referencia se muestra en la tabla N° 8.

T columna (°C)	T inyector (°C)	T detector (°C)	Relación de split	Flujo del gas portador (mL/min)	Vol. de inyección aproximado
100 - 250 °C 10 °C/min	250	250	10:5	2,0	1 $\mu\text{L}$

Tabla N° 8.- Condiciones cromatográficas del método de referencia.

Un cromatograma reportado bajo estas condiciones se muestra en la figura 20.

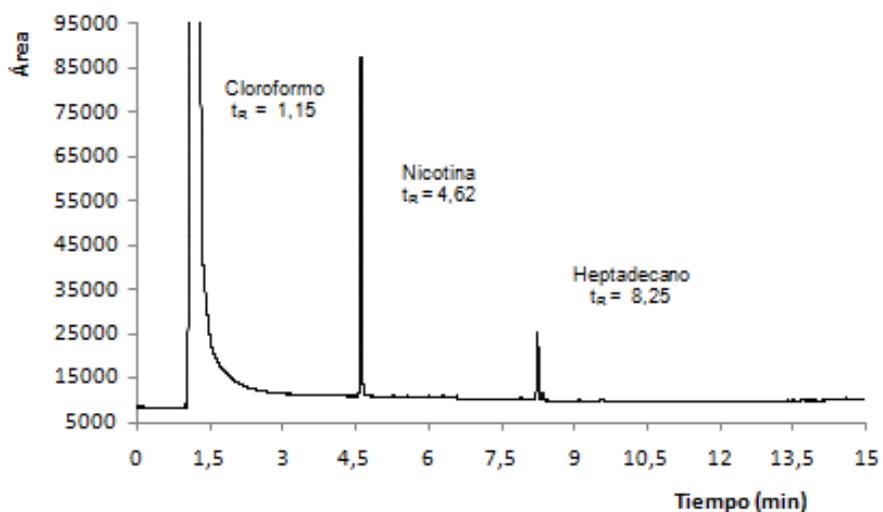


Fig. 20.- Cromatograma obtenido en el método de referencia.

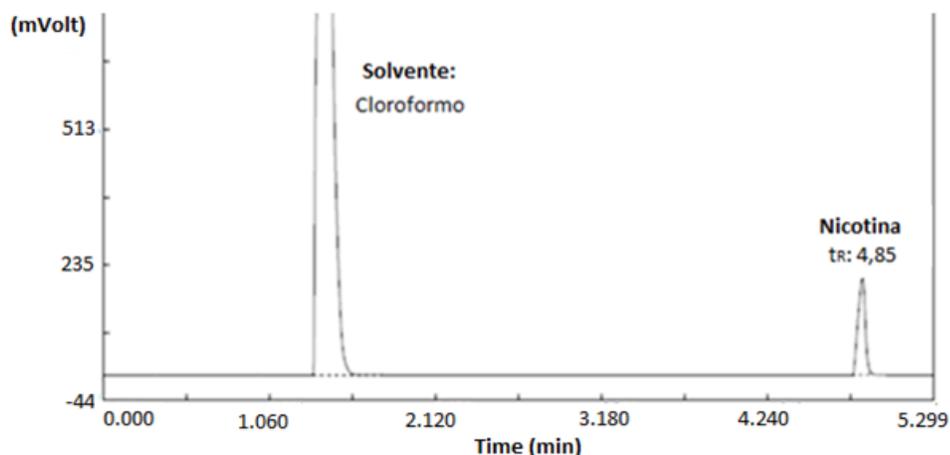
Del cromatograma se puede observar que la banda más ancha corresponde al solvente (cloroformo) con un  $t_R$  de 1,15 min, luego la banda de nicotina con un  $t_R$  de 4,62 min y por último el estándar interno con un  $t_R$  de 8,25 min; obteniendo un tiempo total de análisis cromatográfico de 15 min y 2 min de equilibrio respectivo para realizar la siguiente inyección. Para un tiempo total aproximado de 20 min por muestra, solo en la etapa cromatográfica.

Al tratar de simular las condiciones operativas en el cromatógrafo de gases, no se logró ubicar la columna empleada en el método de referencia, por lo tanto, se decidió realizar una serie de cambios. En este sentido, se utilizó una columna capilar HP 5MS, Agilent Technologies (J&W Scientific), de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m; con fase estacionaria: bonded and cross-linked 5 % fenil, 95 % metilpolisiloxano. Aun así, después de una serie de ensayos las condiciones cromatográficas preliminares resultaron muy similares a las establecidas en el método de referencia, realizando un cambio en la programación de temperatura y estableciendo el tipo de inyección en modo splitless. En la tabla N° 9 se muestran las condiciones preliminares.

T columna (°C)	T inyector (°C)	T detector (°C)	Flujo del gas portador (mL/min)	Vol. de inyección aproximado
220 °C (1,30 min) y aumentando 10 °C/min hasta 250 °C (1 min)	250	250	2,0	1 $\mu$ L

**Tabla N° 9.- Condiciones cromatográficas preliminares.**

Se procedió a realizar la inyección de 0,1  $\mu\text{L}$  de una disolución de nicotina pura en cloroformo, obteniéndose el cromatograma que se muestra en la figura 21.



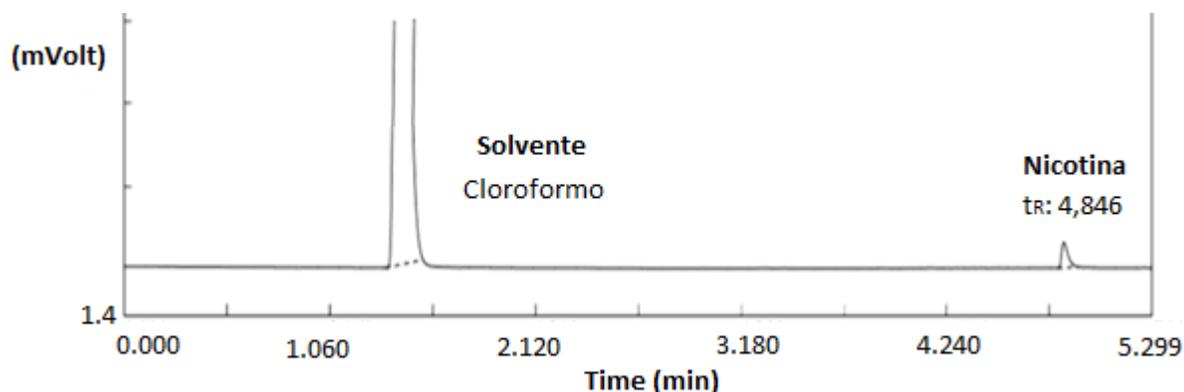
**Fig. 21.- Cromatograma obtenido al inyectar 0,1  $\mu\text{L}$  del estándar de nicotina diluido en cloroformo con las condiciones cromatográficas establecidas en la tabla N° 9.**

Se observó una banda ancha con un tiempo de retención cercano a 1,2 min correspondiente al solvente (cloroformo) y un tiempo de retención para la nicotina de 4,8 min. Lo que indica que la separación es muy similar a la del método de referencia y por lo tanto las condiciones cromatográficas establecidas son factibles para la determinación de nicotina.

Habiendo comprobado la retención de la nicotina en disolución (líquida) con las nuevas condiciones establecidas en el cromatógrafo de gases, se procedió a realizar un ensayo preparatorio a ver si era posible medir la nicotina bajo las condiciones de vapor en el HS-GC.

### 6.2.2 Verificación de la presencia de la señal del patrón de nicotina en HS-GC.

En vista de que no se cuenta con un antecedente para la determinación de nicotina utilizando HS-GC, se desconoce cuál es la temperatura de calentamiento del vial; por lo cual, se fijó una temperatura arbitraria, tomada de los promedios de los análisis más comunes por HS. En función de esto, se calentó el vial con la disolución de nicotina pura en cloroformo (vial de proporciones arbitrarias) en un baño termostático a 40 °C por un tiempo de 15 min, para permitir que el analito de interés pasara a la fase de vapor. Posteriormente se procedió a inyectar 1 mL de la fase de vapor en el cromatógrafo, manteniendo las condiciones cromatográficas antes presentadas; el cromatograma obtenido se muestra en la figura 22.



**Fig. 22.- Cromatograma obtenido al inyectar 1 mL de la fase de vapor de disolución de nicotina pura en metanol.**

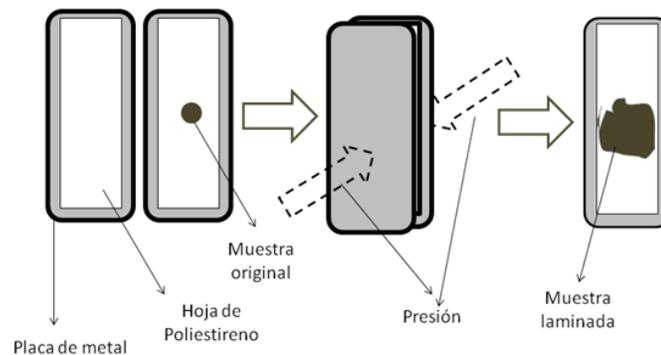
Al comparar el cromatograma de la figura 22 con el de la figura 21, se observa que los tiempos de retención de la nicotina coinciden entre sí; siendo de 4,8 min en ambos

casos. De esta forma se comprueba que es factible el análisis mediante la técnica acoplada de HS-GC.

Sin embargo, aún se debía verificar que el análisis mediante la técnica acoplada de HS-GC fuese aplicable al utilizar una muestra de chimó; para ello, fue necesario estudiar el sistema de tratamiento de muestra en el método de referencia. Para todos los ensayos que se describen a continuación empleamos la muestra de referencia interna.

### 6.2.3 Tratamiento de la muestra.

En esta etapa se mantuvo el proceso de laminación de la muestra expuesto en el método de referencia, el cual logra favorecer la extracción de la nicotina con una mayor disgregación del chimó a medida que se aumenta su área superficial, lo que genera una reducción en el tiempo de análisis. En consecuencia, se procedió a laminar una cantidad de muestra entre dos películas de poliestireno, que se ubican entre dos placas metálicas tal como se muestra en la figura 23, y se ejerce suficiente presión con una prensa manual, hasta obtenerse una lámina muy fina de muestra.



**Fig. 23.- Diagrama del proceso de laminación de la muestra**

Seguidamente, se realizó una prueba de disgregación de la muestra manteniendo el proceso de laminación antes expuesto. Se pesaron ( $0,2000 \pm 0,0001$ ) g de muestra laminada, se introdujo en un vial, se añadió cloroformo (solvente utilizado en el método de referencia y en los ensayos preliminares) hasta la mitad de la capacidad volumétrica de un vial (11 mL aprox.) y se selló. En un tiempo prudencial no se observaron cambios aparentes en la muestra, por lo cual se sometió el vial a ultrasonido. Pasadas 2 h aproximadamente, se observó que la muestra de chimó no presentó disgregación y consecuentemente poca solubilidad.

Al evaluar el método de referencia, el cloroformo es utilizado en un proceso de extracción líquido-líquido con una disolución acuosa de KOH al 5 % (p/v). Considerándose un punto crítico, ya que se forma una emulsión tan fuerte que se hace necesario dejarla reposar un tiempo prudencial para lograr separar ambas fases, para luego analizar la fase orgánica (cloroformo). Cabe acotar, que la solución acuosa de KOH al 5 % (p/v) ayuda a disgregar fácilmente la muestra además de garantizar que la nicotina se encuentre desprotonada; la cual es su forma estructural más volátil.

A pesar de que en el método de referencia se realiza la disgregación de la muestra en una solución acuosa de KOH al 5 % (p/v), se decidió no utilizar agua como solvente de extracción de la nicotina ya que para fines de un análisis por HS, se requiere un solvente volátil que favorezca la migración del analito a la fase de vapor. En el caso de sistemas con alto contenido acuoso, una mayor temperatura tiene una fuerte influencia en la constante de distribución y puede usarse como ventaja, pero tiene ciertos límites; considerando que la presión de vapor del agua aumenta exponencialmente con la temperatura, si se usa un valor muy alto del mismo en el vial, se puede producir su explosión, así como algunas muestras pudiesen sufrir descomposición térmica, además que se puede presentar la condensación del solvente en el vial.

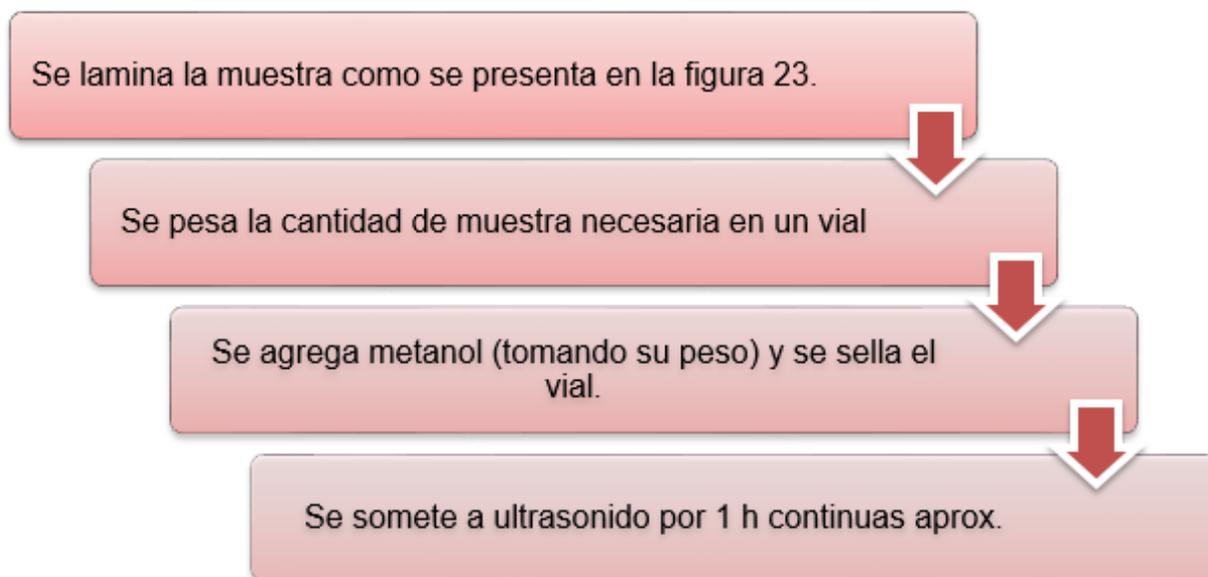
Tomando las consideraciones anteriores, se realizaron pruebas de disgregación de la muestra en distintos solventes orgánicos, aumentando la polaridad a partir del cloroformo y manteniéndose el medio básico con KOH al 5 % (p/v). En la figura N° 24, se presenta el orden en que se realizaron los ensayos.



**Fig. 24.- Orden de prueba de los solventes de disgregación de la muestra**

En cloroformo, tolueno, alcohol isopropílico y propanol no evidenciaron disgregación, por lo tanto no fueron considerados como elementos disgregantes para una extracción efectiva; mientras que en etanol se percibió disgregación de la muestra, sin embargo, sigue siendo necesario utilizar el ultrasonido para reducir el tiempo del mismo; en este sentido, se empleó un solvente mas polar, como el metanol. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios desde el momento en que la muestra tiene contacto con el solvente, evidenciándose la coloración de la fase líquida. En cuanto al tiempo de disgregación, se pudo notar que fue en metanol con el que se requiere menor tiempo de disgregación; estableciéndose entonces como solvente de disgregación-extracción.

En resumen, el tratamiento de la muestra quedó establecido como se muestra en la figura 25.



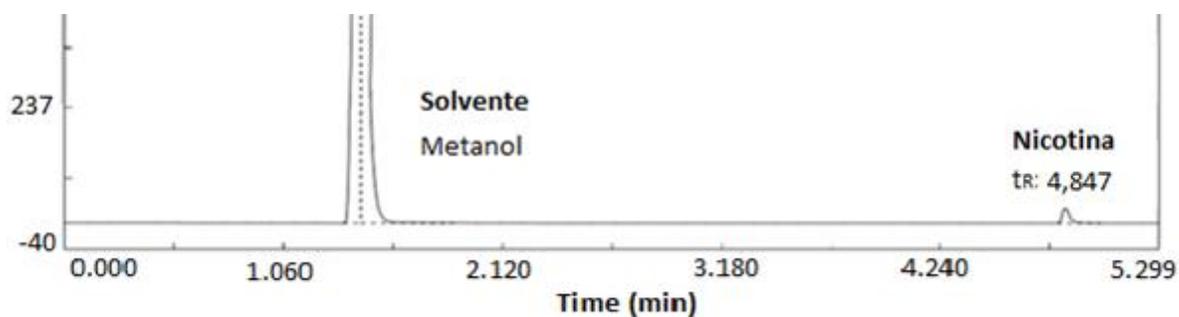
**Fig. 25.- Etapas del tratamiento de la muestra.**

Habiendo optimizado la etapa de tratamiento de muestra, era de crucial importancia verificar la presencia de la señal de nicotina GC- HS al utilizar chimó.

#### 6.2.4 Verificación de la presencia de la señal de nicotina utilizando una muestra de chimó.

Siguiendo las etapas presentadas en la figura 25, se preparó un vial de 21 mL, se pesó 1,0 g de la muestra de referencia interna aproximadamente, se agregaron 11 mL del

solvente y se selló. Se fijaron las condiciones previamente establecidas (apartado 6.2.2); obteniéndose el cromatograma presentado en la figura 26.



**Fig. 26.- Cromatograma obtenido al inyectar 1 mL de la fase de vapor de una muestra real de chimó diluido en metanol.**

Al comparar el cromatograma obtenido en la figura 26 con el de la figura 22; observamos que los tiempos de retención de la señal de nicotina coincidieron, presentando un tiempo de retención de 4,8 min en ambos casos. De esta forma, se consideró factible el análisis de nicotina en chimó utilizando la técnica de HS-GC. Por consiguiente, proseguimos en la búsqueda de un estándar interno con la intención de disminuir los problemas de reproducibilidad en el método acoplado HS-GC.

#### 6.2.5 Búsqueda del estándar interno (EI).

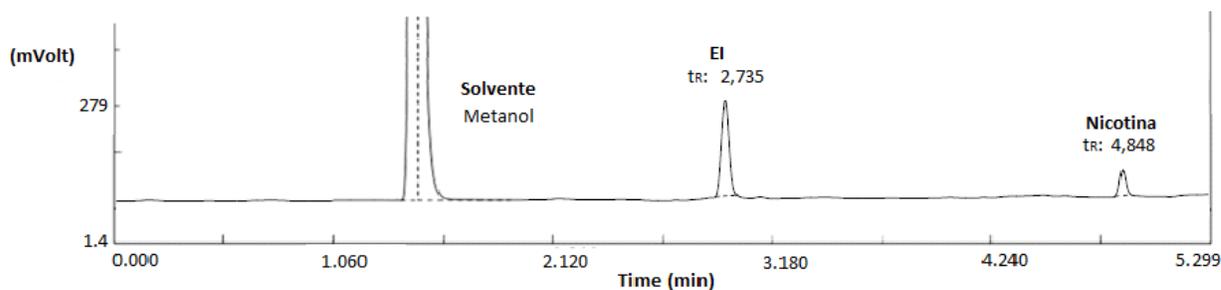
El empleo de un EI permite que la medición de la muestra se independice de muchos factores, tanto del tratamiento de muestra como del volumen de inyección; siendo

especialmente importante en la investigación realizada por no contarse con un método de introducción de la muestra automatizado.

Para la búsqueda del EI, se consideraron los siguientes requerimientos establecidos para un EI ideal:

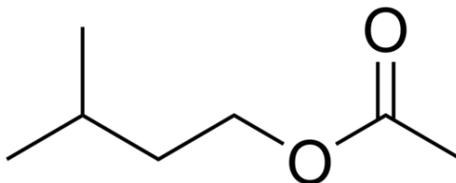
- Ser miscible con los demás compuestos (analitos, solvente).
- Debe ser resuelto de los otros picos.
- Debe eluir cercano al pico de interés.
- Debe ser de las mismas características estructurales del analito de interés.
- Ser un reactivo de alta pureza.

Con la intención de cumplir con estos requerimientos, se realizaron pruebas con distintos reactivos disponibles en el laboratorio; iniciando la búsqueda con compuestos nitrogenados (aminas, amidas), encontrando que estos en su mayoría presentaron tiempos de retención muy cercanos al solvente; llegando a coeluir con el metanol, por lo cual fueron descartados. Posteriormente, se realizaron pruebas con alcoholes y acetatos, encontrándose que el acetato de isoamilo cumple con la retención necesaria para ser considerado el EI. En la figura 27 se muestra el cromatograma obtenido del solvente, la nicotina y el EI, con un tiempo de retención para este último de 2,735 min. Adicionalmente se observa una completa resolución de las diferentes bandas y eluye relativamente cercano al pico de interés.



**Fig. 27.- Cromatograma obtenido al inyectar disolución metanólica preparada con patrones puros de nicotina y EI.**

En la figura 28 se muestra la estructura molecular del acetato de isoamilo, el cual posee un punto de ebullición de 147 °C y es miscible con el analito y el solvente.



**Fig. 28: Estructura del EI (acetato de isoamilo)**

Una vez establecido el sistema de medición cromatográfico y la factibilidad del análisis de nicotina por HS-GC, se procedió a optimizar las condiciones del sistema. En esta etapa, por motivos ajenos al desarrollo del método, se debió realizar el cambio de la columna cromatográfica por una equivalente pero con el doble de la longitud anterior (Agilent DB-5MS de fase estacionaria polímero de fenil arileno de 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

En vista que la columna cromatográfica es equivalente pero con el doble de longitud, se presumió que los tiempos de retención se duplicarían, tal como efectivamente sucedió. Con la intención de reducir los tiempos de análisis, se realizaron una serie de experiencias cambiando las condiciones cromatográficas hasta obtenerse finalmente las mostradas en la tabla N°10.

T columna (°C)	T inyector (°C)	T detector (°C)	Tipo de inyección	Flujo del gas portador (mL/min)	Vol. de inyección aproximado (mL)
90 °C (3,50 min) y aumentando 80 °C/min hasta 250 °C (2min)	250	250	Splitless	2,0	1

Tabla N° 10.- Condiciones cromatográficas al utilizar columna DB-5MS.

El cromatograma obtenido bajo estas condiciones se muestra en la figura 29.

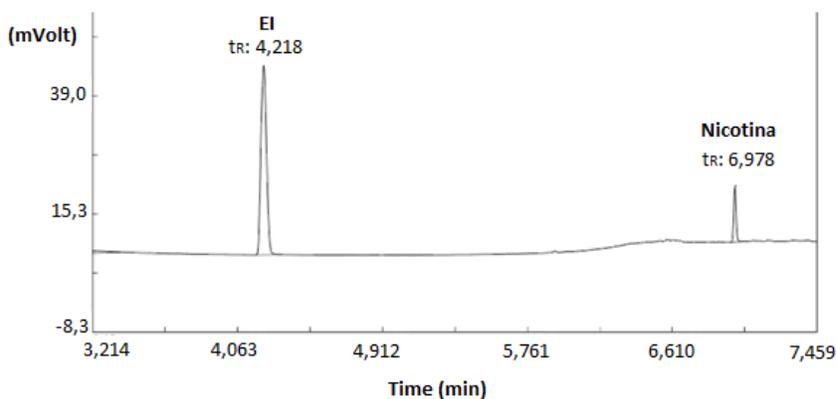


Fig. 29.- Cromatograma ampliado al inyectar mezcla de nicotina, acetato de isoamilo y metanol utilizando la técnica de HS.

El cromatograma está cortado a partir del minuto 3,214 para efectos de visualización. El metanol presentó un  $t_R$  de 2,162 min, el EI un  $t_R$  de 4,2 min y la nicotina un  $t_R$  de 6,9 min.

De esta forma se verificó que las nuevas condiciones cromatográficas establecidas sirven para llevar a cabo la cuantificación de nicotina utilizando como EI el acetato de isoamilo y como solvente el metanol. Se procedió a realizar el estudio de las condiciones óptimas de trabajo por HS; sabiendo que en esta técnica las variables que se pueden modificar a fin de obtener mayor sensibilidad son la temperatura, el tiempo de equilibrio y la relación volumétrica de las fases.

#### 6.2.6 Estudio de las condiciones de trabajo por HS.

Con el propósito de estudiar las variables a modificar para conseguir las condiciones de trabajo por HS-GC, es necesario recordar la expresión que relacionan la señal cromatográfica en la fase de vapor con los parámetros de HS:

$$A = S \left( \frac{C_o}{K + \beta} \right)$$

Donde A es la señal en la fase de vapor, que la podemos llamar sensibilidad del HS; S es la sensibilidad del sistema cromatográfico (básicamente, la pendiente de la curva de calibración);  $C_o$  es la concentración del analito en el líquido; K es el coeficiente de partición y  $\beta$  la relación volumétrica de las fases ( $\beta = V_G / V_S$ ). A condiciones fijas de

concentración del patrón ( $C_0$ ), las variables a estudiar para obtener una mayor  $A$ , son  $K$  y  $\beta$ , ya que  $S$  viene determinado por las condiciones cromatográficas.

Para obtener una mayor sensibilidad,  $K$  y  $\beta$  deben ser lo más pequeño posible; Si  $K$  es mucho mayor de  $\beta$ , es posible descartar su estudio, ya que  $K + \beta \cong K$ . Sin embargo, al desconocer el valor de  $K$ , se hace necesario el estudio de distintas relaciones volumétricas, además de diferentes temperaturas ( $K$ ) y tiempos de equilibrio.

Para los ensayos sucesivos, se partieron de disoluciones madres de nicotina al 11,68 % (p/p) y de EI al 0,09 % (p/p) disueltas en metanol, las cuales fueron utilizadas en todos los ensayos sucesivos. Es importante recalcar que todos los patrones fueron preparados por pesada.

Partiendo de un vial de 20 mL, se consideraron los ensayos para un  $\beta = 1,10$  (cuando el líquido ocupa aprox. el 50 % de la capacidad del vial) y de  $\beta = 3,04$  (cuando el líquido ocupa aprox. el 25 % de la capacidad del vial). Para los  $\beta = 1,10$  se prepararon distintos viales tomando 5 mL de la disolución patrón de nicotina y 5 mL de la disolución patrón de EI y para los de  $\beta = 3,04$  se prepararon viales tomando 2,6 mL del patrón de nicotina y 2,6 mL de la disolución patrón de EI. Conteniendo los viales una concentración porcentual de aprox. 5,83 % (p/p) en nicotina y 0,04 % (p/p) en EI.

Las temperaturas ensayadas fueron de 30, 40 y 50 °C respectivamente, colocándose el vial en un baño termostático, momento en que se empezó a contabilizar el tiempo de equilibrio los cuales fueron de 12, 16 y 20 min respectivamente. El volumen de inyección fue 1 mL, realizándose al menos 5 réplicas por inyección. Para un número

total de 18 experiencias. En la tabla N° 11 se presentan los resultados en resumen y en el apéndice 1, 2 y 3 los detalles.

T: 30°C						
	$\beta = 1,10$			$\beta = 3,04$		
Tiempo de equilibrio	x	s	CV (%)	x	s	CV (%)
12 min	0,339	0,205	60,41	0,521	0,320	61,38
16 min	0,298	0,125	41,83	0,296	0,149	50,44
20 min	0,843	0,445	52,72	0,792	0,599	75,69
T: 40°C						
	$\beta = 1,10$			$\beta = 3,04$		
Tiempo de equilibrio	x	s	CV (%)	x	s	CV (%)
12 min	0,311	0,210	67,66	0,350	0,174	49,79
16 min	0,707	0,681	96,32	0,517	0,356	68,81
20 min	0,335	0,191	56,97	0,320	0,155	48,57
T: 50°C						
	$\beta = 1,10$			$\beta = 3,04$		
Tiempo de equilibrio	x	s	CV (%)	x	s	CV (%)
12 min	0,042	0,014	34,72	0,277	0,156	56,41
16 min	0,563	0,356	63,23	0,388	0,240	61,86
20 min	0,322	0,154	47,82	1,245	0,533	42,82

**Tabla N° 11.- Problemas en la repetibilidad al realizar réplicas de las inyecciones de los patrones haciendo uso de la técnica de HS-GC; donde  $\beta$ : relación volumétrica de las fases, x: promedio de relación de áreas, s: desviación estándar y CV: coeficiente de varianza (%)**

Al observar los valores de CV, se presenta una falta de repetibilidad en todos los casos; por ejemplo, para una misma  $\beta$  y temperatura, los diferentes tiempos de equilibrio presentan gran variabilidad, más del 50% en promedio. En efecto, se decide replicar el análisis, considerando un  $\beta$  diferente; los resultados obtenidos arrojaron que no fue significativo este cambio. Por ende, se realizó el estudio a otras temperaturas,

obteniéndose CV similares a los de la experiencia anterior, manteniéndose la falta de repetibilidad. En efecto, es imposible discernir cuál es la mejor condición de HS.

En consecuencia, se investigaron los factores que pudiesen verse involucrados, considerando inicialmente que el volumen de inyección en la fase de vapor no era constante, posibles cambios en la composición del líquido y consecuentemente del vapor entre las inyecciones, poco tiempo de equilibrio, interferencias por parte del EI y diferentes velocidades de efusión de los compuestos en la aguja de la inyectora.

#### 6.2.7 Presurización del vial.

Buscando resolver las variaciones en los volúmenes de inyección, se ideó imitar el sistema utilizado por un inyector automático, presurizando el vial con un gas inerte ( $N_2$ ), lo que permite que la inyectora se llene debido a la presión positiva que se tiene en el vial.

El  $N_2$  utilizado se obtuvo de la línea del gas portador del GC. Finalmente con una serie de dispositivos mostrados en la figura 30 fue presurizado a 1,0 atm. La ventaja principal que se obtuvo fue que se genera una presión positiva tal que, al tomar la muestra, no se debía subir el embolo de forma manual, garantizando de cierta forma que el volumen de inyección será el mismo.

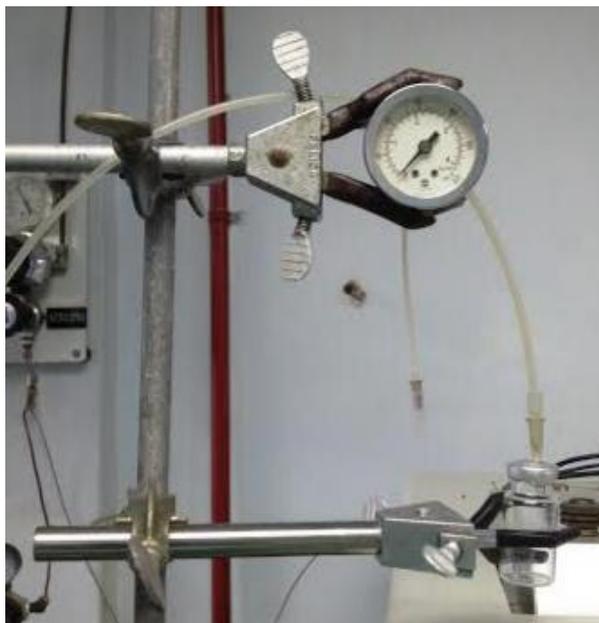


Fig. 30.- Sistema de presurización utilizando gas inerte ( $N_2$ ).

Experimentalmente, se consideró una condición arbitraria de HS ya que aún no se conocen las condiciones ideales para el sistema HS-GC; la condiciones se muestran en la tabla N° 12. En cuanto a la preparación del vial a ensayar, se preparó a partir de las disoluciones patrón de nicotina y EI respectivamente, quedando una concentración de nicotina del 5,83% (p/p) y de EI del 0,04 % (p/p). Se realizaron cuatro inyecciones manteniendo en todos los casos la presurización del vial obteniendo los resultados que se muestran en la tabla N° 13.

Presión (atm)	Temperatura (°C)	tiempo de equilibrio (min)	Volumen de inyección (mL)	$\beta$
1	50	12	1 mL	1,10

Tabla N° 12.- Condiciones durante la presurización el vial.

Inyección N°	Área EI	Área Nicotina	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{EI}}$
1	3954190	136043	0,034
2	5546041	256505	0,046
3	7066186	322157	0,046
4	6782058	146472	0,022
s			0,012
promedio			0,037
<b>CV (%)</b>			<b>31,37</b>

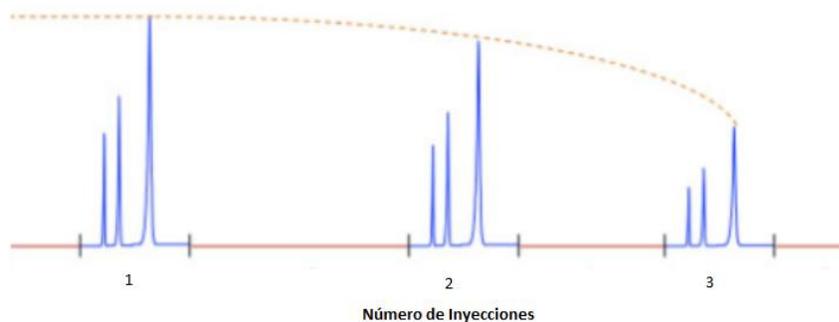
**Tabla N° 13.- Datos obtenidos al inyectar 1 mL de la fase de vapor de un vial presurizado a 1 atm con N<sub>2</sub>, sometido a 50 °C en el baño termostático, considerando un tiempo de equilibrio de 12 min y una  $\beta = 1,10$ .**

Al comparar el CV que se muestra en la tabla N° 13 obtenido al presurizar el vial, con el presentado en la tabla N° 11 bajo iguales condiciones (34,72 %), se nota que no se obtuvo un cambio significativo; indicando que el problema no se debe a la inyección de distintos volúmenes de la fase de vapor. De haber sido este el problema, a pesar que las áreas absolutas fuesen muy diferentes, la relación  $A_{\text{nicotina}} / A_{\text{EI}}$  debió mantenerse constante ya que al analito debe ocurrirle en igual medida lo que le suceda al EI. A pesar de no haber obtenido resultados satisfactorios por esta vía, se mantuvo la presurización del vial para los siguientes ensayos por HS-GC ya que se facilita la toma de la fase de vapor.

#### 6.2.8 Inyección única de réplicas genuinas de un patrón.

Es de esperar que a unas condiciones determinadas de HS-GC, al inyectar consecutivamente un mismo patrón (obviamente esperando las condiciones de equilibrio), la composición en la fase líquida se vea alterada y por consiguiente la

composición de la fase de vapor, cambiando continuamente el valor de las áreas absolutas tal como se muestra en la figura 31.



**Fig. 31.- Imagen referencial donde se refleja la posible disminución del área en tres inyecciones sucesivas del HS, después de alcanzado el equilibrio.**

De ser el caso, no puede utilizarse el mismo patrón para medir la repetibilidad de la medida por HS-GC, teniendo que preparar el patrón nuevamente para evaluar una misma condición. Por lo tanto, se realizaron inyecciones únicas de réplicas genuinas de un patrón, buscando mejorar la falta de repetibilidad presentada en la tabla N° 11,

Se prepararon patrones de igual concentración (réplicas genuinas) como se muestra en la tabla N° 14 y se sometieron a la misma temperatura, tiempo de equilibrio y presión, por lo que se esperaba que las áreas relativas obtenidas por el método HS-GC, fueran muy similares.

Vial N°	Masa nicotina (g) (± 0, 1 mg)	Masa EI (g) (± 0, 1 mg)	Concentración de nicotina (% p/p)	Concentración de EI (% p/p)
1	5,0928	5,1023	5,83	0,04
2	5,0728	5,0892	5,83	0,04
3	5,0913	5,0998	5,83	0,04
4	5,0989	5,0837	5,84	0,04

Tabla N° 14.- Concentraciones de las réplicas genuinas preparadas.

Seguidamente se inyectó 1 mL de la fase de vapor, con las condiciones de HS-GC establecidas en el ensayo anterior (tabla N° 12). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 15.

Vial N°	Área EI	Área Nicotina	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{EI}}$
1	7970246	43736	0,005
2	6146821	17068	0,003
3	6652524	33762	0,005
4	7386536	45325	0,006
<b>S</b>			0,001
<b>Promedio</b>			0,005
<b>CV</b>			30,02

Tabla N° 15.- Áreas relativas obtenidas al inyectar una vez réplicas genuinas de disoluciones patrones de nicotina al 5,83 % (p/p) y de EI al 0,04 % (p/p).

A pesar de haber realizado una inyección única de la fase gaseosa de cada vial, cuyas concentraciones de nicotina y EI se mantuvieron constantes entre ellos (réplicas genuinas), los CV obtenidos eran muy grandes. En consecuencia, se descarta la premisa planteada, donde se atribuía la falta de repetibilidad a cambios en las composiciones del líquido y consecuentemente del vapor en el HS. Sin embargo, es importante destacar que este ensayo realizado fue el que presentó mejor CV de los evaluados hasta entonces.

#### 6.2.9 Aumento del tiempo de equilibrio.

Al utilizar la técnica de HS-GC, debe considerarse importante la variable “tiempo”, cuya modificación se encuentra condicionada por el equilibrio líquido-vapor que se establece en el vial; siendo la difusión molecular y la transferencia de masa a través del límite de la fase, los factores que determinan la variable.

En efecto, en el trabajo de investigación realizado, se efectuaron pruebas a tres tiempos diferentes (12, 16 y 20 min). Además, al considerar el punto de ebullición de la nicotina, se decidió establecer un tiempo de equilibrio mayor (32 min), a fin de verificar si con los tiempos estudiados, no era suficiente para alcanzarse el equilibrio, generando problemas de repetibilidad.

Para la experiencia realizada, se utilizaron las condiciones mostradas en la tabla N° 12, se prepararon tres viales de iguales concentraciones (5,38 % en nicotina y 0,04 % en EI) y se inyectó 1 mL de la fase de vapor 4 veces. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 16.

Inyección N°	Área nicotina	Área EI	A nicotina/A EI	s	x	CV (%)
1	8833	199477	0,044	1,778	2,060	86,31
	306810	205860	1,490			
	489169	114051	4,289			
	336130	139104	2,416			
2	1614873	509537	3,169	2,014	2,505	80,41
	261177	51749	5,047			
	117945	102743	1,148			
	53122	81177	0,654			
3	1309878	257448	5,088	2,400	1,490	161,05
	42522	202312	0,210			
	41398	161610	0,256			
	15468	38057	0,406			

**Tabla N° 16.- Resultados de las réplicas genuinas de un patrón y de las réplicas de las inyecciones de cada patrón considerando un tiempo de equilibrio de 32 min.**

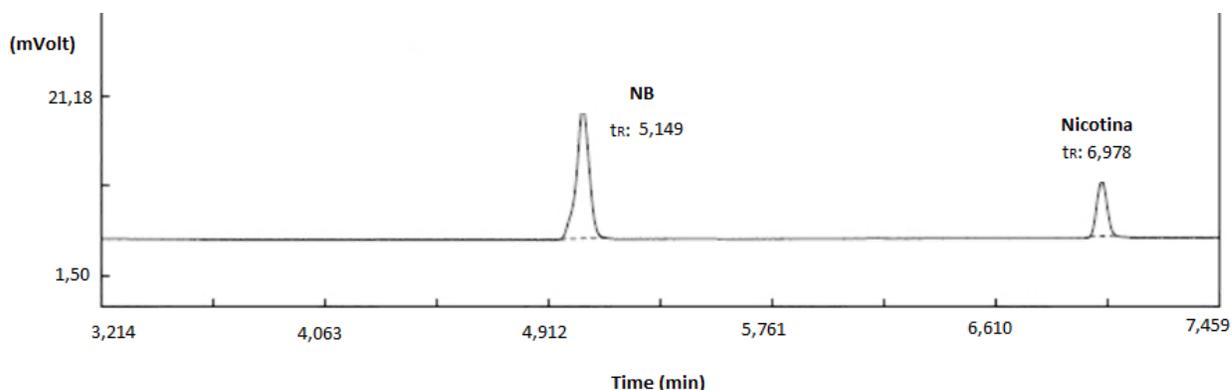
Como se observa en la tabla N° 16, considerando 32 min de equilibrio, se obtuvo CV del 86,31 %, 80,41 % y 161,05 %; lo cual indica que con 32 min, aun no se ha establecido el equilibrio o existe algún otro factor que lo pudiese estar afectando. En consecuencia, no se puede discernir cual es el tiempo de equilibrio óptimo para llevar a cabo el análisis de nicotina utilizando la técnica de HS-GC.

#### 6.2.10 Cambio del EI.

Otro factor que pudiese interferir en el equilibrio líquido-vapor es que exista reacción entre el EI y el analito, que se esté hidrolizando el EI por efecto del medio básico

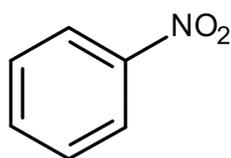
(cambiando su composición en la fase líquida y en consecuencia en la de vapor entre inyecciones) o que el proceso de migración a la fase de vapor se da en orden creciente de puntos de ebullición; viéndose favorecido el metanol, posteriormente el EI y por último la nicotina en la fase de vapor. Para verificar estos factores, se comenzó cambiando el EI.

Buscando cumplir con todos los requisitos establecidos para un EI ideal, se volvieron a realizar pruebas con distintos reactivos, logrando encontrar que el nitrobencono (NB) cumple con la retención necesaria para considerarse el EI, tal como se muestra en la figura N° 32, presentando un  $t_R$ : 5,149 min, además de observarse una resolución completa de las diferentes bandas cromatográficas.



**Fig. 32.- Cromatograma obtenido al inyectar disolución metanólica preparada con patrones puros de nicotina y NB.**

En la figura 33 se muestra la estructura molecular del NB, el cual posee un punto de ebullición de (208-211) °C, es miscible con el analito y el solvente además de ser inerte.



**Fig. 33.- Estructura del nitrobenzeno**

Para los ensayos, se preparó una disolución patrón de NB en medio básico con una concentración de 12,81 % (p/p), la cual fue empleada en los análisis posteriores.

Compuesto	Masa NB (g) (± 0,1 mg)	Masa enrase (g) (± 0,1 mg)	Concentración (% p/p)
NB	2,5619	19,9947	12,81

**Tabla N° 18.- Preparación de la solución madre de NB.**

La preparación de los viales se realizó tomando alícuotas de 5 mL de cada solución madre, quedando los patrones con una concentración de nicotina del 5,38 % (p/p) y de 6,4 % (p/p) en NB. Se establecieron las condiciones de HS-GC presentadas en la tabla N° 12, y se realizaron réplicas de las inyecciones de la muestra, obteniendo los resultados mostrados en la tabla N° 19.

Inyección N°	Área NB	Área nicotina	A nicotina/A NB
1	1000302	148196	0,148
2	257005	51434	0,200
3	157632	34745	0,220
4	168593	22634	0,134
5	878621	341970	0,389
6	74116	19171	0,259
7	508994	49856	0,098
8	307249	27499	0,090
<b>S</b>			0,099
<b>promedio</b>			0,192
<b>CV (%)</b>			51,57

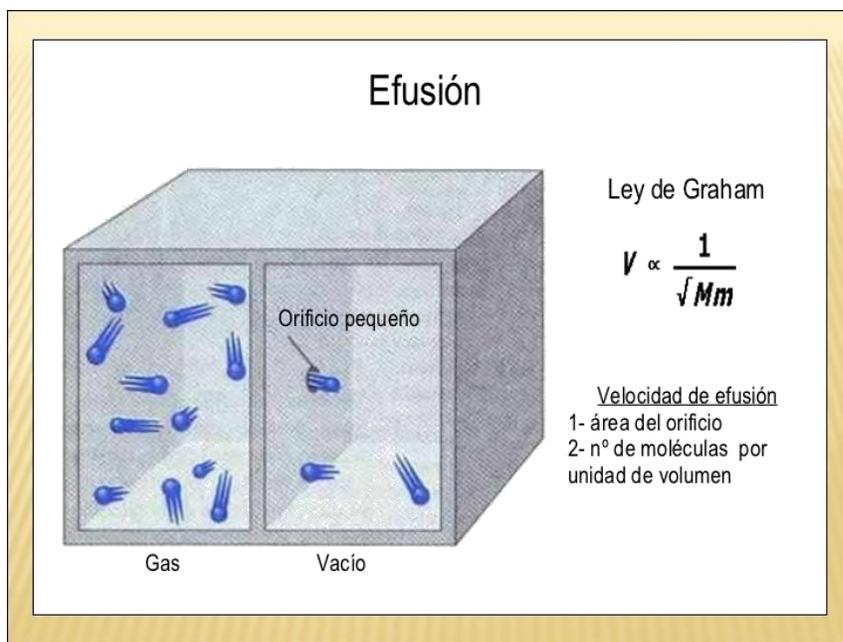
**Tabla N° 19.- Replica de las inyecciones de un patrón utilizando como EI el nitrobenzeno.**

Como se observa en la tabla N° 19, se continuo obteniendo CV muy elevados y de hecho similares a los obtenidos empleando acetato de isoamilo como EI. En consecuencia, se logra concluir que el problema no radicaba en interferencias causadas por parte del EI con la nicotina ni con el solvente.

#### 6.2.11 Modificación de los tiempos de toma de muestra, aplicando la ley de Graham.

Surgió otra posibilidad de tipo fisicoquímico que se deduce a partir de la ley de Graham; la cual establece que *“La velocidad de difusión y efusión de los gases son inversamente proporcionales a las raíces cuadradas de sus respectivas masas molares”*. Es decir, que mientras más grandes sea la estructura molecular, más lenta será la velocidad de

efusión, la cual se define como el flujo de partículas de gas a través de orificios estrechos o poros tal como se muestra en la figura N° 34.



**Fig. N° 34.- Ejemplo de la definición de efusión.**

Aplicando el enunciado de la Ley de Graham al trabajo de investigación realizado, se puede intuir que al tomarse la muestra para la inyección, el vapor es aspirado por un orificio muy pequeño. Considerando que el vial contiene  $N_2$ , metanol, acetato de isoamilo o NB y nicotina; será en este orden que los analitos efundan por la jeringa respectivamente; pudiendo causar problemas de repetibilidad si no se considera un tiempo amplio de toma de muestra, tal que se garantice que el tiempo sea suficiente para que efundan la misma cantidad de moléculas entre inyecciones. En consecuencia, se realizaron tres experimentos considerando tres tiempos prudenciales de toma de muestra.

Para llevar a cabo este ensayo, se prepararon tres viales de concentración conocida tomando una alícuota de 5 mL de la disolución patrón de nicotina y 5 mL de la disolución de NB presentada en la tabla N° 18. De esta forma, ambos compuestos contienen una concentración aproximada de nicotina del 5,83 % (p/p) y de aproximadamente 6 % (p/p) en NB. Se fijaron las condiciones de HS-GC establecidas en la tabla N° 12, ensayándose tres tiempos de toma de muestra a 1, 2 y 3 min respectivamente, los resultados se muestran en la tabla N° 20.

<b>tiempo de toma de muestra: 1 min</b>			
<b>Inyección N°</b>	<b>Área nicotina</b>	<b>Área NB</b>	<b>A<sub>nicotina</sub> / A<sub>NB</sub></b>
1	1871244	1663594	1,125
2	64665	398672	0,162
3	781709	579248	1,350
4	75338	228089	0,330
5	294271	230622	1,276
<b>s</b>			0,559
<b>promedio</b>			0,849
<b>CV (%)</b>			65,87
<b>tiempo de toma de muestra: 2 min</b>			
<b>Inyección N°</b>	<b>Área nicotina</b>	<b>Área NB</b>	<b>A<sub>nicotina</sub> / A<sub>NB</sub></b>
1	2790913	5046242	0,553
2	192672	1018362	0,189
3	1485290	1851196	0,802
4	190974	566312	0,337
5	128098	322187	0,398
<b>s</b>			0,234
<b>promedio</b>			0,456
<b>CV (%)</b>			51,22

Tabla N° 20.- Modificación en los tiempos de toma de muestra.

Se debe destacar que no fue posible realizar el ensayo considerando un tiempo de toma del vapor de 3 min, ya que se observaron problemas de condensación en la inyectora. Por tanto, se decidió comparar los CV obtenidos a 1 min y 2 min, observándose en la tabla N<sup>o</sup> 20 que se continúa obteniendo CV demasiado elevados para considerarse en el uso de un método cuantitativo ya que al realizar los cálculos con las muestras, la variabilidad será muy grande.

En conclusión, no se logró alcanzar condiciones en el sistema HS-GC que generaran buenos CV o al menos de un orden aceptable para realizar una curva de calibración que permitiera la cuantificación de nicotina utilizando el método que se planteó desarrollar.

## 7. CONCLUSIONES.

- Se desarrolló una metodología analítica por Cromatografía de Gases con sistema acoplado de HS, que demostró la factibilidad de analizar nicotina en el producto en estudio, ya que se logró observar una señal apreciable de dicho analito en una muestra de referencia de chimo, es decir, posee la sensibilidad mínima necesaria.
- Las condiciones cromatográficas de trabajo fueron las siguientes: columna capilar Agilent DB-5MS (polímero de fenilarileno) de 60 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor pelicular, la cual se sometió a una programación de temperatura iniciando en 90 °C por 3,50 min y aumentaba a 80 °C/min hasta 250 °C, donde se mantuvo por 2 min. Se utilizó nitrógeno como fase móvil con un flujo de 2,0 mL/min, y el inyector se colocó en modo splitless, el detector FID se mantuvo a 250 °C y con un flujo de 30 mL/min para el make-up gas ( $\text{N}_2$ ). Se escogió acetato de isoamilo y/o nitrobenceno como estándar interno por haber presentado la retención necesaria, buena resolución de las diferentes bandas y miscibilidad con el solvente y analito, lo cual es ideal tanto para el sistema cromatográfico como para el HS.
- Los tiempos de retención fueron 2,16 min para el metanol, 4,22 min para el acetato de isoamilo, 5,15 min para el nitrobenceno y 6,98 min para la nicotina; encontrándose completamente resueltos los picos cromatográficos. El tiempo total de análisis cromatográfico fue de 10 min aproximadamente, la mitad del tiempo de análisis del método de referencia.

- El tratamiento de muestra consistió en la laminación de la pasta compacta de chimó para aumentar el área superficial de extracción (disgregación) e inmediata disolución con metanol en ultrasonido, disminuyendo considerablemente los reactivos y el tiempo empleado en esta etapa con respecto a método ya desarrollado.
- El tiempo total de análisis (tratamiento de muestra y medida) fue considerablemente menor al método de referencia, ya que como se puede observar de las condiciones cromatográficas anteriormente descritas, fue necesario utilizar una programación de temperatura, además, al utilizarse la técnica de HS, los posibles contaminantes de la muestra estarían en menor proporción, es decir, menor interferencia cromatográfica. Adicionalmente el tiempo empleado en el método de tratamiento de muestra es considerablemente menor.
- A pesar de que se pudo observar la señal de nicotina en chimo en el sistema acoplado HS-GC, no fue posible optimizar el procedimiento de HS, ya que la falta de repetibilidad y reproducibilidad hace imposible la comparación de las diferentes variables que lo rigen.
- Se estudiaron las potenciales causas de la falta de reproducibilidad, como la posibilidad de que el volumen de inyección en la fase de vapor no era constante, cambios en las composiciones del líquido y consecuentemente del vapor por las inyecciones múltiples de un mismo patrón (realización de réplicas genuinas), poco tiempo de equilibrio, interferencias por parte del EI y diferentes velocidades de

efusión de los compuestos. Con el control de variables antes mencionadas no se logró aclarar la falta de reproducibilidad.

- Finalmente no habiendo encontrado las causas de la falta de reproducibilidad, nos llevó a considerar que el HS manual empleado por nosotros, pueden ocurrir cambios bruscos de temperatura en vial y en la inyectora cuando son transitados al sistema cromatográfico, contribuyendo a la condensación selectiva y casual entre nicotina y el EI.

## 8. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda utilizar un sistema automático de HS del tipo dinámico, que pudiera evitar los problemas asociados a un HS manual, que conlleva a la condensación selectiva y circunstancial de los analitos de interés, pudiendo trabajar con áreas absolutas y conseguir mejorar la reproducibilidad en la técnica HS-GC.
- El método desarrollado puede ser empleado como indicador de estabilidad de la nicotina al someterse a algún tipo de estrés, determinando la presencia de nitrosaminas (específicamente la NNN y NNK, las cuales se consideran los únicos carcinógenos que inducen a tumores orales). Sin embargo, se debe destacar que debe ser empleado un sistema más sensible a este tipo de compuestos tal como un GC-MS o algún cromatógrafo acoplado con un detector específico para compuestos de nitrógeno; siendo este un análisis de tipo cualitativo.

## 9. APÉNDICE.

$\beta = 1,10$								
T=30 °C								
12 min			16 min			20 min		
A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>
976161	1546927	0,631	315641	1295916	0,244	2674501	1845710	1,449
65478	964981	0,068	76028	194820	0,390	521895	1101676	0,474
284750	589271	0,483	162960	900471	0,181	200729	341948	0,587
243961	736138	0,331	256921	769382	0,334	467354	421756	1,108
231869	652019	0,356	300850	626935	0,480	289471	900681	0,321
73491	442991	0,166	121901	751127	0,162	534091	476910	1,120
s		0,205	S		0,125	s		0,445
promedio		0,339	Promedio		0,298	promedio		0,843
CV (%)		60,409	CV (%)		41,833	CV (%)		52,724

$\beta = 3,04$								
T=30 °C								
12 min			16 min			20 min		
A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>
127329	501870	0,254	233749	1294765	0,181	178933	365541	0,490
260739	980360	0,266	130473	870371	0,150	267834	788950	0,339
318572	870263	0,366	199582	787351	0,253	2911670	1634571	1,781
311790	409792	0,761	264822	525001	0,504	534996	1286041	0,416
233691	243955	0,958	77592	197360	0,393	420931	451965	0,931
s		0,320	s		0,149	s		0,599
promedio		0,521	Promedio		0,296	promedio		0,792
CV (%)		61,381	CV (%)		50,444	CV (%)		75,692

Apéndice 1.- Estudio de las condiciones de trabajo por HS a 30 °C y  $\beta = 1,10$  y  $\beta = 3,04$ .

$\beta = 1,10$								
T=40 °C								
12 min			16 min			20 min		
A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>
1051847	1883730	0,558	112435	369832	0,304	267848	1432648	0,187
77602	1596797	0,049	266871	907176	0,294	59361	175836	0,338
307149	548118	0,560	206561	603488	0,342	286591	537321	0,533
134597	673641	0,200	364308	354849	1,027	201635	870296	0,232
183224	585558	0,313	44411	999381	0,044	320144	539571	0,593
86009	468293	0,184	1988900	904130	2,200	120977	954867	0,127
-	-	-	182106	832021	0,219	-	-	-
-	-	-	179859	306319	0,587	-	-	-
-	-	-	545644	1018516	0,536	-	-	-
-	-	-	2683261	1767670	1,518	-	-	-
s	0,210	S	0,681	s	0,191			
promedio	0,311	promedio	0,707	promedio	0,335			
<b>CV (%)</b>	<b>67,656</b>	<b>CV (%)</b>	<b>96,322</b>	<b>CV (%)</b>	<b>56,973</b>			

$\beta = 3,04$								
T=40 °C								
12 min			16 min			20 min		
A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub>	A <sub>EI</sub>	A <sub>nicotina</sub> /A <sub>EI</sub>
100548	254875	0,394	958231	1390198	0,689	245198	1218706	0,201
46829	121977	0,384	253879	659221	0,385	76014	255991	0,297
345878	533711	0,648	201930	626118	0,323	205878	500891	0,411
120918	657330	0,184	239618	551901	0,434	309447	578294	0,535
177365	554910	0,320	55001	427880	0,129	56910	367829	0,155
74883	435209	0,172	79901	70018	1,141	-	-	-
s	0,174	s	0,356	s	0,155			
promedio	0,350	promedio	0,517	promedio	0,320			
<b>CV (%)</b>	<b>49,786</b>	<b>CV (%)</b>	<b>68,807</b>	<b>CV (%)</b>	<b>48,574</b>			

Apéndice 2.- Estudio de las condiciones de trabajo por HS a 40 °C y  $\beta = 1,10$  y  $\beta = 3,04$ .

$\beta = 1,10$								
$T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$								
12 min			16 min			20 min		
$A_{\text{nicotina}}$	$A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}$	$A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}$	$A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{EI}}$
136043	3954190	0,034	120658	478902	0,252	267848	1432648	0,187
256505	5546041	0,046	267839	1038221	0,258	59361	175836	0,338
322157	7066186	0,046	300879	721454	0,417	286591	537321	0,533
146472	6782058	0,022	300979	301944	0,997	201635	870296	0,232
65821	1093767	0,060	228657	256721	0,891	-	-	-
s		0,014	s		0,356	s		0,154
promedio		0,042	promedio		0,563	promedio		0,322
<b>CV (%)</b>		<b>34,719</b>	<b>CV (%)</b>		<b>63,227</b>	<b>CV (%)</b>		<b>47,822</b>

$\beta = 3,04$								
$T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$								
12 min			16 min			20 min		
$A_{\text{nicotina}}$	$A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}$	$A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}$	$A_{\text{EI}}$	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{EI}}$
325650	1114860	0,292	1328561	2210835	0,601	758812	928001	0,818
145978	905771	0,161	70871	352961	0,201	566812	436192	1,299
43871	200477	0,219	120844	769951	0,157	659110	349013	1,888
121850	703881	0,173	200721	678421	0,296	487991	800621	0,610
333701	615910	0,542	341870	499388	0,685	871125	540771	1,611
s		0,156	S		0,240	s		0,533
promedio		0,277	Promedio		0,388	promedio		1,245
<b>CV (%)</b>		<b>56,408</b>	<b>CV (%)</b>		<b>61,860</b>	<b>CV (%)</b>		<b>42,823</b>

Apéndice 3.- Estudio de las condiciones de trabajo por HS a 50 °C y  $\beta = 1,10$  y  $\beta = 3,04$ .

## 10. LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRONIMOS.

**A:** Área

**AOAC:** Association of Analytical communities.

**atm:** Atmósfera

**Autosampler:** Automuestreador

**Batch:** En lote

**cm:** Centímetros

**CMCT:** Convenio Marco para el Control de Tabaco

**col:** Colaboradores

**CV:** Coeficiente de variación

**D.C.:** Distrito Capital

**DI:** Diámetro interno

**EEUU:** Estados Unidos de América

**EI:** Estándar interno

**eV:** Electronvoltio

**FID:** Detector de ionización a la llama

**g:** gramo(s)

**GC:** Cromatografía de gases.

**GC-FID:** Cromatografía de gases empleando un detector de ionización a la llama

**GLC:** Cromatografía de gas- liquido.

**GC-MS:** Cromatografía de gases empleando un detector de masas.

**h:** hora (s)

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficiencia

**HS:** Headspace; análisis en un espacio confinado ó Análisis en un “espacio de cabeza”

**HS-GC:** Análisis en un espacio confinado ó Análisis en un “espacio de cabeza” acoplada a cromatografía de gases

**k:** Constante de partición

**LODs:** Límites de detección

**m<sup>2</sup>:** Metro (s) cuadrado (s)

**make-up gas:** Gas auxiliar; impulsa los analitos a la salida de la columna hacia el detector para evitar el ensanchamiento de la banda cromatográfica

**min:** Minuto (s)

**mg:** Miligramo (s)

**mL:** Mililitro (s)

**mm:** Milímetro (s)

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PTFE:** Politetrafluoroetileno

**split:** Con división de flujo, solo una pequeña parte del vapor entra en la columna cromatográfica.

**splitless:** Sin división de flujo, casi todo el vapor es transferido del inyector a la columna cromatográfica.

**SPME:** Micro extracción en fase solida.

**TNF:** Tabaco no fumado

**t<sub>R</sub>:** Tiempo de retención

**TSNA:** Nitrosaminas específicas del tabaco

**UV-Vis:** UV-Visible

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Chaverri R. **El Cultivo del Tabaco**. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. 1995.
2. Martínez Llamas A. **Manual de patología tabáquica**. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Salud Pública. 1982.
3. León, J. **Botánica de los cultivos tropicales**. Editorial Agroamericana del IICA. San José, Costa Rica. 2000, c 1968.
4. Pardell H. Saltó E. Salleras LL. **Manual de diagnóstico y tratamiento del tabaquismo**. Editorial médica panamericana, S.A. Madrid, España. 1996.
5. Mackay, J. y M. Ericksen. **The tobacco atlas**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. 2002.
6. Moreno A. Coutiño B. **Nicotiana tabacum L., usos y percepciones**. Asociación etnobiológica Mexicana. Revista etnobiológica. Vol. 10. Número 2. México. 2012.
7. PhD, Henningfield J. MS, Rose C. PhD, Giovino G. **Brave New World of Tobacco Disease Prevention Promoting Dual Tobacco-Product Use?**. American Journal of Preventive Medicine. 2002
8. M.D., Volkow N. **Adicción al tabaco**. (NIH Publicación N°. 11-4342(S)). Nueva York, NY: Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas.

9. Organización Mundial de la Salud. **Informe OMS Sobre La Epidemia Mundial De Tabaquismo, 2013: Hacer cumplir las prohibiciones sobre publicidad, promoción y patrocinio del tabaco.**2013. [http://www.who.int/tobacco/global\\_report/2013/summary/es/](http://www.who.int/tobacco/global_report/2013/summary/es/) [Consulta: 01 de junio de 2015]
10. Warnakulasuriya S. **Smokeless tobacco and oral cancer.** Department of Oral Medicine and Pathology, WHO Collaborating Centre for Oral Cancer and Precancer, Guy's, King's and St Thomas' Dental Institute, Denmark Hill Campus, London SE5 9RW, UK. *Oral Diseases* (2004); 10 (1) 1–4.
11. National Cancer Institute. **Smokeless Tobacco or Health.** Monograph 2. NIH Pub. N° 93-3461. Washington, DC: U.S. (1992). Department of Health and Human Services.
12. Chimó El Toro. **El auténtico origen del CHIMÓ.** Disponible en: <http://www.chimo.com.ve/HISTORIA.html>. [Consulta: 04 de junio de 2015]
13. Oletta J. Carvajal A. **Consumo de productos de tabaco no fumado, (TNF).** Red de Sociedades Científicas Médicas Venezolanas. Comisión de Epidemiología. Nota técnica N° 42. (11 de junio de 2002).
14. **Mascando tradición.** Disponible en: [http://servidor-opsu.tach.ula.ve/alum/pd\\_5/masc\\_t/cuentos2.html](http://servidor-opsu.tach.ula.ve/alum/pd_5/masc_t/cuentos2.html). [Consulta: 03 de junio de 2015]
15. Rivera H. y col. **USO DEL TABACO NO FUMADO (TNF), CHIMÓ EN NIÑOS Y ADOLESCENTES EN EL ESTADO PORTUGUESA.** (2010). *Acta Odontológica Venezolana - VOLUMEN 48 N° 3*

16. Abernathy T. Bertrand L. **The prevalence of smokeless tobacco and cigarette use among sixth, seventh and eighth grade students: a longitudinal investigation.** Canadian Journal of Public Health. Canada. Revue Canadienne de Sante Publique (1992), 83 (1): 15-8.
17. Greer R, Poulson T. **Oral tissue alterations associated with the use of smokeless tobacco by teenagers.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Volume 56, Issue 3, September 1983; 275-284.
18. Offenbacher S. Weathers D. **Effects of smokeless tobacco on the periodontal, mucosal and caries status of adolescent males.** Journal of Oral Pathology. 1985; 14: 169-181
19. Contreras C. (2012, 06 de junio). **Adolescentes consumen más chimó que cigarrillos.** *El Universal*.
20. Jarpa P. **Medición del pH de 12 preparaciones distintas de pasta de tabaco de mascar, relacionadas con la adicción a la nicotina.** Revista de la Facultad de Farmacia. (2003). vol. 45 (2):7-11.
21. Brunnemann K. Hoffmann D. **Chemical Composition of Smokeless Tobacco, Smoking and Tobacco Control.** (1992). Monograph N°.2 98-108.
22. Brunnemann K. Hoffmann D. Prokopczyk B, Djordjevic M. **Tobacco-specific N-nitrosamines and areca derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans.** (1994). Journal of Toxicology Environ Health 41:1-52.

23. Chen Y. Squier, C.A. **Effect of Nicotine on 7, 12 – dimethylbenz[a]anthracene carcinogenesis in Hamster cheek pouch.** (1990).Journal of the National Cancer Institute 82: 861 – 864.
24. Benowitz N. Porchet H. Sheiner L. Jacob III P. **Nicotine absorption and cardiovascular effects with smokeless tobacco use: Comparison with cigarettes and nicotine gum.** San Francisco, California. Clinical Pharmacology and therapeutics. 1988 Julio; 44(1):23-8.
25. Aronow W. Cassidy J. Vangrow J. March H. Kern, J. **Effect of cigarette smoking and breathing carbon monoxide on cardiovascular hemodynamics in anginal patients.** (1974). Circulation. Vol. 50: 340-47.
26. Neal L. Benowitz M. **CLINICAL PHARMACOLOGY OF NICOTINE.** Ann. Rev. Med. 1986. 37: 21-32
27. Skoog D. Holler J. Nieman T. **Principios de Análisis Instrumental.** Editorial Mc Graw Hill. 5º Edición. España. 2010.
28. Harris D. **Análisis químico cuantitativo.** Editorial Reverté. 3º Edición (6º edición original). Barcelona – España. 2007.
29. Kolb Bruno. Ettre Leslie. **Static Headspace-Gas Chromatography: theory and practice.** Editorial Wiley-VCH. 1997
30. Anders H. y T. Gibson Harrel. **Improved Spectrophotometric Method for determination of Nicotine in Tobacco Smoke.** Sociedad Americana de Química. Vol. 30. Nº 11. Noviembre 1958.

31. Weeks W. W., Davis D. L. y Bush L.P. **Gas Chromatography separation of tobacco alkaloids.** *Journal of Chromatography.* Vol. 43. Páginas 506-509. U.S.A. 1969
32. Wu Weijia, David L. Ashley y Clifford H. Watson. **Determination of Nicotine and Other Minor Alkaloids in International Cigarettes by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry.** *Analytical Chemistry,* Vol. 74. N° 19. Octubre, 2002
33. K.D. Brunnemann, J. Qi y D. Hoffmann. **Chemical profile of two types of oral snuff tobacco.** *Food and Chemical Toxicology.* Vol. 40. Páginas 1699–1703. U.S.A. 2002.
34. Sheng L.Q., Ding L., Tong H.W., Yong G.P., Zhou X.Z., Liu S.M. **Determination of Nicotine-Related Alkaloids in Tobacco and Cigarette Smoke by GC-FID.** *Chromatographic.* Vol. 62. (No. 1/2). Julio (2005).
35. Stephen S. Lily J. David A. Clifford W. **Rapid and Chemically Selective Nicotine Quantification in Smokeless Tobacco Products using GC–MS.** *Journal of Chromatographic Science.* Vol. 47. Noviembre (2009).
36. Stephen S. Connolly G. Zhang L. Jia L. Henningfield J. Richter P. Lawler T. Ayo-Yusuf O. Ashley D. Watson C. **Global surveillance of oral tobacco products: total nicotine, unionized nicotine and tobacco-specific N-nitrosamines.** *Tobacco Control.* Vol. 20. Ed. 2. (2011).
37. Gómez L. y Hernández J. **Desarrollo de un método para la determinación de nicotina en tabaco sin humo (chimó) mediante la técnica de cromatografía de gases.** Caracas, Venezuela. 2012.

38. Corredor A., Chidiak S., Jarpa P., Urdaneta L., Sánchez N., Aparicio R. y Usubillaga A. **Determinación del nivel de nicotina en el chimó venezolano.** Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes. Vol. 55. Fasc. 2. Págs. 6-10. Mérida, Venezuela. (2013).