

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



***DETERMINACIÓN DE NICOTINA LIBRE, pH y HUMEDAD EN PRODUCTOS DE
TABACO SIN HUMO VENEZOLANO (CHIMÓ)***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado
ante la ilustre Universidad Central de Venezuela
por la Br. Niwdy Norex Blanco Hernández para
optar por el título de Licenciado en Química,
opción Tecnología.

Dr. Luis Gómez

Caracas, Febrero 2012

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1.- Tabaco	2
2.2.- Tipos de derivados del tabaco	3
2.2.1.- Cigarros o puros	4
2.2.2.- Cigarrillos	5
2.2.2.1.- Cigarrillos de liar manualmente ó de tipo “Rool Your Own”	7
2.2.2.- Bidis y kreteks	8
2.2.3.- Pipas	9
2.2.4.- Tabaco sin humo	11
2.2.4.1.- El chimó	12
3.- Nicotina	15
3.2.- Farmacología de la nicotina	19
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. ANTECEDENTES	27
V. OBJETIVOS	40
5.1.- General	40
5.2.- Específicos	40
VI. PARTE EXPERIMENTAL	41
6.1.- Instrumentación	41
6.2.- Materiales, reactivos	41
6.3.- Muestras de Chimó	42
6.4.- Metodología Experimental	43
6.4.1.- Purificación del patrón de nicotina	43
6.4.2.- Muestra de referencia o “modelo” de chimó	44
6.4.3.- Acondicionamiento de las muestras	45
6.4.4.- Método para la determinación de porcentaje de humedad	47
6.4.5.- Método para la determinación de pH	50
6.4.6.- Método para la determinación de nicotina total	52
6.4.7.- Determinación de la nicotina libre	60
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	72
7.1.- Determinación del porcentaje de humedad	72

7.2.- Valores de pH medidos para distintas marcas de chimó	74
7.3.- Determinación de la concentración de nicotina total obtenida por cromatografía de gases	75
7.4.- Determinación de la cantidad de nicotina libre obtenida por la ecuación de Henderson- Hasselbalch	77
VIII. CONCLUSIONES	80
IX. RECOMENDACIONES	83
X. APÉNDICE	84
10.1.- Definición de pH	84
10.2.- Electrodo para medir pH	85
10.2.1.- Funcionamiento del electrodo de vidrio	87
10.3.- Liofilización	87
10.4.- Cromatografía de Gases	89
10.4.1.- Parámetros que afectan las separaciones cromatográficas	90
10.5.- Teoría de Ecuación de Henderson – Hasselbalch	92
10.5.1.- Propiedades de la ecuación de Henderson- Hasselbalch	94
10.6.- Prueba: Diferencia Honestamente Significativa de Tukey (DHS)	94
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“DETERMINACIÓN DE NICOTINA LIBRE, pH Y HUMEDAD EN PRODUCTOS DE TABACO SIN HUMO VENEZOLANO (CHIMÓ)”** presentado por el Br. Niwdy Norex Blanco Hernández, 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)

Dra. Ivette Piña
(Jurado)

Dra. Rosa Amaro
(Jurado)

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el hábito del consumo del tabaco sin humo se ha incrementando en los últimos años, una de las causas pudiera ser las restricciones aplicadas al consumo de cigarrillos en sitios públicos. Sin embargo, su práctica está asociada a muchas enfermedades bucales y pre-cancerígenas.

El tabaco sin humo más consumido en Venezuela es conocido como el chimó, el cual se suponía que era un hábito de las zonas rurales del país, pero en la última década, su consumo se ha extendido al resto de la población. De tal manera, que puede representar un potencial problema a nivel nacional, debido a que es adictivo y está estrechamente vinculado con lesiones bucales.

Uno de los componentes “activos” del chimó es la nicotina, la cual causa adicción y dependencia tanto física como psicológica. Se presume que la velocidad con que se absorbe en el organismo depende de varios factores: especie química en que se encuentre (nicotina libre o protonada), nivel de *pH*, humedad, etc.

En función a la necesidad de conocer que tan nocivo puede ser el chimó, se llevó a cabo, la caracterización química del mismo, desarrollando metodologías para la determinación de humedad, *pH* y nicotina libre. Se determinaron estos tres parámetros en diferentes marcas de chimo nacional.

El porcentaje de humedad en las muestras abarcó un rango desde 6 hasta 10 %, mientras que el rango de valores de la nicotina total abarca desde 3 a 25 mg/g. Se encontró que la mayoría de las marcas analizadas presentan niveles de *pH* básicos a excepción de algunas pocas, lo cual favorece la presencia de la nicotina libre.

El estudio de la fuerza iónica en la matriz de chimo, indicó que la ecuación Henderson- Hasselbalch, no puede ser utilizada para la determinación “exacta” de la nicotina libre.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- Tabaco

El tabaco es una planta que pertenece a la familia de las *Solanáceas*, las cuales se encuentran esparcidas por todo el mundo en unas 2500 especies, pero principalmente en América tropical. Las *Solanáceas* son fundamentalmente hierbas, arbustos y árboles, cuyas especies tienen un gran valor comercial por sus propiedades alimentarias, farmacéuticas y ornamentales. Dentro de las *Solanáceas*, el tabaco pertenece al género *Nicotiana*, siendo las especies *Nicotiana tabacum* y la *Nicotiana Rustica* las más explotadas. A su vez, estas dos especies poseen cuatro variedades, las cuáles son las de mayor importancia comercial por poseer superior cantidad de nicotina: *Brasilensis*, *Havanensis*, *Virginica* y *Púrpurea*.^[1]

La *Nicotiana tabacum* es una planta robusta, de 50 a 120 cm de altura, de tallo erecto, de sección circular, pilosa y rugosa al tacto. Se ramifica cerca de su extremo superior, produciendo hojas densas y grandes, de 30 a 60 cm de largo por 10 a 20 cm de ancho. Es una planta de fácil adaptación; por lo que pudo ser introducida por los colonizadores en toda Europa y en el resto del mundo ^[1]. En la figura 1 se muestra dos fotografías de las hojas características de la *Nicotiana Tabacum*.



Figura 1.- Planta *Nicotiana tabacum*

El cultivo extensivo de esta planta es de gran importancia comercial, debido a que es utilizada como materia prima en la elaboración de distintas clases de productos de consumo masivo, los cuales pueden variar en su forma, preparación y presentación. La gran variedad en los productos del tabaco viene dada por la necesidad de satisfacer las opciones de los distintos consumidores alrededor del mundo. A continuación se hará una breve descripción de algunos de los derivados del tabaco de mayor consumo mundial.

2.2.- Tipos de derivados del tabaco

A lo largo de los años la industria tabacalera se ha encargado de desarrollar una gran variedad de derivados del tabaco, con la finalidad de captar una mayor variedad de consumidores, ofreciendo productos que satisfagan la demanda de cada uno de ellos. Estos productos tienen muchas formas de uso, denominaciones, aspectos, formas de producción y reclamos asociados, pero, aunque el producto difiera en muchos aspectos, todos coinciden en contener el elemento que contribuye al éxito de esta industria “la nicotina”.

La nicotina la cual es la principal causa de la adicción al tabaco se concentra principalmente en las hojas y el nombre se deriva del diplomático francés Jean Nicot, el cual promovió su cultivo, creyendo que era una planta medicinal ^[2].

Los principales productos del tabaco se pueden clasificar en función de su preparación y consumo:

- Tabaco para fumar (bidi, puros o cigarros, cigarrillos, pipas, pipas de agua, etc).
- Tabaco sin humo para mascar o mantener en la boca (rape húmedo, chimó, etc).
- Tabaco sin humo para inhalar (rapé, snus, nuez de betel, etc).
- Tabaco para beber o sorber (infusiones, jarabes, etc).

Los derivados del tabaco de mayor consumo mundial son los de fumar, entre ellos el más popular es el cigarrillo. Otros menos populares, pero de constante aumento en su demanda, son los conocidos como “tabaco sin humo”. Entre los cuales se encuentran el rape, el snus, el chimó, entre otros. Muchos de ellos, forman parte del arraigo cultural de una región y han sido utilizados por sus ancestros. A continuación se hará referencia a los de mayor interés.

2.2.1.- Cigarros o puros

Los puros son elaborados con hojas enteras del tabaco, que han sido secadas y fermentadas en ciertas condiciones características de cada región y fabricante. Son liados sin papel, es decir, en forma de rollos envueltos en la misma hoja del tabaco. Pueden ser liados a máquina o manualmente. Su tamaño es variado: calibre fino de 10,32 a 15,48 mm, calibre mediano de 15,87 a 17,46 mm y calibre grueso de 18,26 a 20,64 mm.^[3] En la figura 2 se muestra la elaboración de un puro.



Figura 2.- Elaboración de puros

El primer paso en la preparación del puro consiste en la recolección de las hojas, la cual se hace por cortes, es decir, por pisos foliares. Un segundo paso es el curado, que puede ser al aire libre o usando hornos calefactores, en esta etapa la hoja pierde hasta un 85 % de su contenido de agua.^[4]

El próximo paso es la fermentación, donde la humedad aun presente en las hojas desencadena la primera fermentación, que puede durar hasta 30 días. En este proceso se reduce la presencia de resinas en las hojas. Por otra parte, las hojas son humedecidas con betún (macerado de las hojas en agua), mediante este proceso la presión causada por el peso de las hojas dispara la segunda fermentación que dura 60 días, y es aquí donde el tabaco sufre una transformación química que refina su aroma y sabor. ^[4]

Después de la fermentación se seleccionan las hojas según sus propiedades, algunas para envoltura y otras para el relleno (tripa, capote o capa). Se añejan durante uno o dos años y finalmente el puro está listo para ser ensamblado. ^[4]

Aunque, el término puros y cigarrillos comúnmente se usan indistintamente, estrictamente se llama cigarrillo al que se elabora a base de picadura de tabaco y no al de la hoja entera.

2.2.2.- Cigarrillos

Los cigarrillos se encuentran entre los productos más mortíferos y adictivos que la humanidad haya producido. Evolucionó desde una variante del cigarro del siglo XVI, que servía para fumar trozos de hoja de tabaco enrollándolos en un pequeño tubo de papel. ^[3]

Una vez que el tabaco es cosechado, recolectado y pasa por el riguroso proceso de curado. Las hojas de tabaco son enviadas a las fabricas procesadoras, donde se acondiciona la materia prima mediante un incremento de humedad y temperatura, con el fin de hacerlo óptimo para el resto del proceso. Cumplido el tiempo de reposo en los silos donde la hoja adquiere su sabor característico, se divide la hoja de tabaco separando la vena de la lámina. Luego ambas son transportadas a unas

máquinas especiales para realizar el picado. En esta parte del proceso es donde el cigarrillo se comienza a diferenciar del puro.^[5]

Después de picar cada componente, la lámina y la vena son introducidas en distintas secadoras para reducir el nivel de humedad. Al finalizar estos procesos, la lámina y la vena, que han sido acondicionadas por separado se juntan y conforman la hebra utilizada para la elaboración de cigarrillos. Esta mezcla se realiza siguiendo los requerimientos de cada marca.^[5]

La mezcla ya picada que recibe el nombre de hebra, se envuelve en un papel especial formando una varilla continua de cigarrillo y es cortado al tamaño deseado. Se ensambla el filtro, el cual es elaborado de acuerdo al fabricante, pero normalmente es de fibra de acetato de celulosa y papel.^[5]

Una vez que se ha armado el cigarrillo, éste pasa a la máquina empacadora, que los agrupa en conjuntos (generalmente de 20 cigarrillos) para envolverlos en papel aluminio y posteriormente en el papel impreso que identifica cada marca e incluye las disposiciones legales requeridas.^[5]

Actualmente las industrias tabacaleras desarrollan nuevas estrategias para describir los “nuevos” productos como más seguros, se pueden citar el uso de extra-filtros, filtros mentolados o el desarrollo de cigarrillos que se hacen conocer como: “light” “suaves”, “naturales” y “sin aditivos”. Cuando se habla de este tipo de cigarrillos el propósito es hacer ver a los consumidores que existe un menor riesgo en su consumo, justificado por su menor nocividad. Propaganda engañosa, ya que aun cuando éstos son teóricamente más “puros”, todos contienen el ingrediente más nocivo, la nicotina, además de otros subproductos que se generan cuando se quema.^[3] En la figura 3, se muestran varios productos de cigarrillos que dicen no poseer aditivos.

A pesar de décadas de publicidad fomentada por la industria tabacalera donde anuncian innovaciones en la producción, relativas a un producto más sano, existen pocas pruebas científicas que indiquen que los cigarrillos modernos tengan menores riesgos en la salud que los fabricados a mediados del siglo XX. ^[3]



Figura 3.- Cigarrillos Light y naturales

2.2.2.1.- Cigarrillos de liar manualmente ó de tipo “Rool Your Own”

Los costos de los cigarrillos industrializados son más altos, debido a las restricciones aplicadas a su consumo o por los elevados impuestos, por tanto, muchas personas elaboran ellos mismos los cigarrillos para su consumo, conocidos en idioma inglés como Rool Your Own”. ^[3] En la figura 4 se muestra un cigarrillo para liar.



Figura 4.- Cigarrillos de liar manualmente

En algunos países, los cigarrillos liados personalmente representan un segmento considerablemente creciente del mercado de tabaco. Por la forma de preparación de estos, se podría pensar que son más saludables que los industrializados, pero no existen datos que indiquen que el consumo de estos tabacos sea menos dañino. No

obstante, datos publicados recientemente y recogidos por el ministerio de sanidad neozelandés, sugieren que pueden conducir a niveles más altos de exposición a alquitrán. ^[3]

2.2.2.- Bidis y kreteks

Tradicionalmente, tanto en Sudeste Asiático como en el Medio Oriente, los cigarrillos se consumen de una forma distinta a los convencionales, utilizan el tabaco como un ingrediente importante, pero no como el principal, y al igual que los llamados tabacos orgánicos son vendidos en herbolarios alrededor del mundo. Estas formas incluyen los bidis y los kreteks.

Los bidis contienen hierbas y especias, son pequeños y a menudo hechos a mano y envueltos en una hoja de kendú o de temburni (plantas nativas de Asia). A pesar de su pequeño tamaño, presuntamente los niveles de toxinas son más altos que los que se encuentran en los cigarros, ya que para fumar los bidis, es necesario succionar más fuerte para mantenerlos encendidos. ^[3,6]

Los Kreteks contienen una mezcla que consiste en tabaco, clavos y otros aditivos. También pueden contener una amplia gama de sabores exóticos y de eugenol, que tiene un efecto anestésico y permite que la inhalación sea más profunda. ^[6] Estas variantes de los cigarrillos se pueden observar en la figura 5 donde se muestran los bidis y los kreteks respectivamente.



Figura 5.- Bidis y Kreteks

Tanto los Bidis como los Kreteks a pesar de tener olores exóticos y una distinta forma de elaboración se ha encontrado que poseen los siguientes riesgos: ^[3]

- Estudios recientes indican que la nicotina y otras sustancias que los bidis liberan, alcanzan al menos los mismos niveles que en los cigarrillos convencionales más industrializados.
- Tienden a ser fumados más intensamente y con más frecuencia, lo cual se traduce en una absorción más elevada de nicotina y en un efecto cardiovascular superior al de los cigarrillos.
- La inhalación de alquitrán es de 2 a 3 veces superior.
- Riesgo tres veces mayor de cáncer bucal y pulmón en comparación con personas que nunca hayan fumado.
- El consumo de kreteks ha sido asociado a un mayor riesgo de lesión pulmonar aguda, especialmente entre personas susceptibles que padecen de asma o infecciones respiratorias.

2.2.3.- Pipas

Esta forma de consumo del tabaco no ha sido objeto de estudio, tal como, lo ha sido el cigarro o los cigarrillos, pero es de esperar que los efectos de estos se cumplan también para las pipas. Los tabacos para fumar en pipa reciben un tratamiento que les permite alcanzar matices de sabor no disponibles en otros tipos. Muchas de las mezclas (*blends*) usan como ingredientes de base, tabacos Burley o Virginia en

diversos grados de curación, a los que se agrega tabacos más picantes o con una intensidad y singularidad de sabor mayor. ^[3] En la figura 6 se muestra una pipa tradicional.

El humo inhalado a través de las pipas tiende a ser más alcalino, por ende, hay una mayor absorción de nicotina en estos productos. ^[3] Debido a las grandes cantidades de tabaco que suele colocarse en su interior, tanto los fumadores como los no fumadores están expuestos a mayor cantidad de humo. Por tanto, dichos consumidores corren un riesgo considerablemente mayor de enfermedades que incluyen bronconeumopatía crónica, cáncer cerebral y de cuello, cáncer de laringe, de esófago y pulmón. ^[3,7]



Figura 6.- Pipa tradicional

Una variante de las pipas tradicionales son las pipas de agua, las cuales tienen gran aceptación en todo el Sudeste Asiático y el Medio Oriente, habiendo sido utilizadas durante muchos siglos con la falsa creencia de que eran una forma segura de fumar tabaco. ^[3] Se les conoce con los nombres regionales de *hookah*, *bhang* y *narghile*, pero ahora en el occidente están comenzando a ser utilizadas. En la figura 7 se pueden observar algunas de las pipas de aguas existentes de diseños modernos.

Las cantidades de monóxido de carbono inhalado son muy elevadas, el consumo de una pipa de agua pueden durar fácilmente entre 20 y 60 minutos con volúmenes de 10 litros o más inhalados, en comparación con un cigarrillo que suele fumarse

durante unos cinco minutos aproximadamente, con una inhalación de 300-500 mililitros de humo.



Figura 7.- Pipas de agua

Es factible que algunas sustancias hidrosolubles sean parcialmente absorbidas por el agua, reduciéndose así su concentración, pero se desconoce si la toxicidad se reduce suficientemente como para disminuir los efectos adversos para la salud. ^[3]

2.2.4.- Tabaco sin humo

Como su nombre lo indica, se llama tabaco sin humo a aquel que para consumirlo no requiere del quemado o combustión del mismo y en la actualidad su empleo posee una creciente popularidad, debido a las restricciones aplicadas a los cigarrillos y cigarrillos, así como los elevados impuestos y las campañas publicitarias donde exhiben los riesgos de estos productos y en especial el peligro que representa a los “fumadores pasivos”.^[7] Mediante esta modalidad, el producto puede ser ingerido vía nasal u oral, siendo esta última la forma más habitual de consumirlo.

Existen cinco formas principales de tabaco de uso oral sin combustión, las cuales se nombran a continuación:

- El tabaco de mascar, viene en hojas sueltas, rollos o trenzados que deben masearse para liberar la nicotina. Se coloca entre la mejilla y el labio inferior, típicamente hacia la parte posterior de la boca.

- El rapé, se corta en partículas pequeñas, siendo hidratado y utilizado manteniéndolo entre la encía y la mejilla o Inhalado.
- El snuff, es finamente cortado o en polvo. Se puede encontrar húmedo o seco, en la mayor parte de América se encuentra húmedo. Está disponible suelto, en pastillas solubles, tiras o en pequeñas bolsas similares a las bolsitas de té. Se coloca entre la mejilla y las encías o detrás del labio superior o inferior. Otro nombre para el tabaco de mascar es el snus (se pronuncia "snoose"). También algunas personas lo inhalan por la nariz.
- El gutkha es otro producto de tabaco de uso oral sin combustión, que se consumen en india y en el Sudeste Asiático.
- El chimó, también tabaco de mascar, constituido por una pasta negra de uso oral, producido y consumido en Venezuela.

El objetivo de este estudio está dedicado al tabaco sin humo de consumo nacional, conocido como el Chimó. Por lo tanto, se hará énfasis en este tipo de producto.

2.2.4.1.- El chimó

El chimó es un preparado en forma de pasta, de consistencia muy viscosa, obtenida por la cocción de las hojas del tabaco con ciertos aditivos. Esta pasta se remonta a la época prehispánica, siendo elaborada por los aborígenes venezolanos de la zona de Jamohé (conocido en la actualidad como Lagunilla), perteneciente a la región de los Andes, estado Mérida. ^[8]

Su preparación depende mucho de la región y el productor, pero esencialmente está constituido de cuatro procesos básicos: preparación de la hoja, elaboración de base, colocación del aliño (“*aliñado*”) y el envasado. ^[8,9] En la figura 8 se ilustra gráficamente un resumen de los procesos básicos para la preparación del chimó.



Figura 8.- Proceso de preparación del Chimó

En algunas regiones productoras de chimó, como por ejemplo en Lagunillas, estado Mérida, las hojas del tabaco se secan hasta lograr un color marrón, cortándolas en tiras pequeñas que posteriormente se hierven en agua en una paila de gran tamaño. A medida que se cocinan las hojas del tabaco, el extracto acuoso se concentra, para posteriormente trasladarlo a una paila de tamaño mediano, cuya función es la eliminación del resto sólido (sobrante de hojas, almidón, fibras, etc).^[8,9]

Al extracto acuoso se le incorpora melaza y se continúa cocinando, hasta que la masa alcanza la consistencia deseada y el típico color negruzco. Esta etapa corresponde a la base del chimó.^[8]

Seguidamente, la pasta es colocada en un recipiente de madera, donde se aliña con sal de Urao (sequicarbonato de sodio), ceniza y se añade nitrato de potasio. La mezcla final se envuelve en hojas secas de plátano o se coloca en embases de metal o plástico.^[8]

Hay que hacer notar, que los conocidos “aliños”, son característicos de cada región y fabricante, sin embargo, la formulación de la mayoría de estos aditivos, es un secreto comercial, muchas veces conocidos por muy pocas personas, y que son herméticamente guardados. El aliñado puede contener bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, nitratos, nitritos, saborizantes, harina de trigo, clavos de especie, pimienta, menta, harina de maíz, etc. ^[8] También se emplean sabores artificiales que pueden incluir β -citronelol, 1,8-cineol, mentol, benzoato de bencilo, eugenol y cumarina, entre otros. El ácido ascórbico es añadido como un agente antimicrobiano, mientras que la adición de propionato de sodio actúa como conservante. ^[7]

Como se mencionó en párrafos anteriores, entre los componentes básicos del chimo está el extracto acuoso de la hoja del tabaco, y los componentes “activos” del chimo provienen en mayor parte de dicho extracto, por lo tanto, es de interés conocer los componentes de la hoja del tabaco.

La hoja del tabaco procesada antes de la fermentación consiste en hidratos de carbono (50%) y proteínas. La fermentación del tabaco curado hace que el contenido de hidratos de carbono y los polifenoles disminuyan. Otros componentes importantes son los alcaloides (0,5- 5,0%), los terpenos (0,1- 3,0%), los polifenoles (0,5- 4,5%), los fitoesteroles (desde 0,1- 2,5 %), los ácidos carboxílicos (0,1- 0,7%), los alcanos (0,1- 0,4%), hidrocarburos aromáticos, aldehídos, cetonas, aminas, nitrilos, hidrocarburos, N- y O-heterocíclicos, pesticidas, nitratos alcalinos (0,01- 5%) y por lo menos 30 compuestos inorgánicos, entre ellos los metálicos. ^[7,10]

El tabaco puede contener más de 19 sustancias carcinógenas conocidas, además de químicos de distinta naturaleza que pueden conllevar a efectos en la salud a corto, mediano y largo plazo, los cuales permiten sugerir el consumo del chimó como un problema de salud pública. ^[11] De todos estos compuestos, los que se les atribuye mayor interés por ser los componente “activos” en cualquier variante del tabaco, son los alcaloides, en especial la nicotina. Muy señalada por su efecto

adictivo y que da a la industria de tabaco en cualquier rincón del planeta su gran éxito y proliferación.

3.- Nicotina

La nicotina aparte de encontrarse en la planta de tabaco, también es posible hallarla, aunque, en cantidades mínimas, en el tomate, la papa, la pimienta verde, etc. En pequeñas concentraciones constituye un estimulante y ha sido usada por sus propiedades terapéuticas. Combinada con otros compuestos es empleada por la medicina antroposófica y homeopática, para tratar enfermedad como espasmos, calambres y asma. ^[12] Sin embargo, se ha convertido en un compuesto de gran interés, debido a que esta sustancia es la creadora de la dependencia en el individuo consumidor. ^[13,14]

En el tabaco comercial, los alcaloides están en el orden del 0,5 al 5 % y de ellos, la nicotina es el alcaloide que se encuentra en mayor proporción, la cual representa el 95 % de los alcaloides totales. La nornicotina y la anatabina son los segundos alcaloides en proporción, los cuales se encuentran en cantidades aproximadamente iguales, cada uno representa alrededor del 2 al 3 %. Finalmente está la anabasina, presente generalmente en concentraciones de aproximadamente 0,3 % de los alcaloides totales. ^[15] En la figura 9, se muestran las estructuras químicas de algunos alcaloides relacionados con el tabaco.

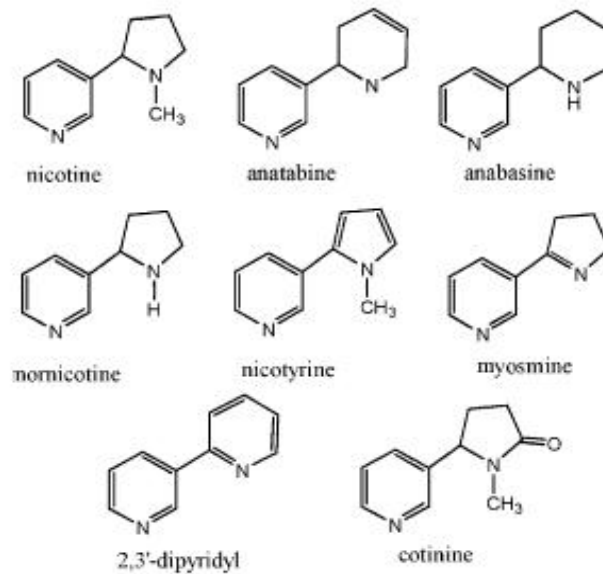


Figura 9.- Estructuras químicas de la nicotina y otros alcaloides relacionados con el tabaco y el humo de cigarrillo

En algunas especies de plantas de tabaco los porcentajes de nicotina suelen variar, encontrándose el mayor porcentaje en la *nicotiana tabacum*, mientras que en otras como la *nicotiana glauca* el alcaloide más abundante o principal es la anabasina. También pueden encontrarse en el humo del tabaco en pequeñas cantidades. ^[16]

Desde el punto de vista químico, la nicotina es un compuesto orgánico de origen natural que contiene nitrógenos heterocíclicos procedentes del metabolismo de aminoácidos, razón por la cual es clasificada como un alcaloide. ^[14] Es una sustancia líquida, aceitosa, incolora, que se vuelve ligeramente marrón al quemarse, dando el olor característico a tabaco. Es higroscópica y por ser una molécula polar es soluble en agua. Posee un punto de fusión - 79 °C, y un punto de ebullición de 247 °C, presentando descomposición a esta temperatura. Peso molecular de 162,23 g/mol y una densidad 1,01 g/mL, la nicotina ionizada forma sales con los ácidos, que son generalmente sólidos solubles en agua.

La nicotina es una amina terciaria que existe en sus dos formas isoméricas, en el tabaco se encuentra solamente la levorotatoria o (S)-nicotina, que es la forma más

activa desde el punto de vista farmacológico. En su esqueleto posee un centro quiral y dos átomos de nitrógenos. Está formada por dos heterociclo, uno de estos forma parte de un anillo sustituido de pirrolidina y el otro de un anillo de piridina. La parte pirrolidínica con un pK_a 8,02 y la piridínica con un pK_a 3,12. ^[17] En la figura 10 se muestra el equilibrio ácido-base de la nicotina.

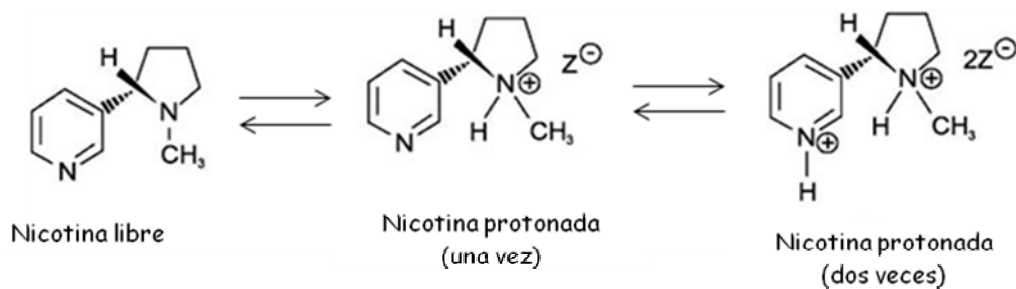


Figura 10.- Equilibrio ácido-base de la nicotina.

Hay que denotar que a un pH elevado la molécula se encuentra en su forma no ionizada, conocida como nicotina no protonada o libre. En la medida que disminuye el pH en primer lugar se protona la parte pirrolidínica de la molécula y conforme continua disminuyendo se protona también la parte piridínica. A pH intermedios, entre 5 y 8 se establece un equilibrio entre las especies esquematizadas en la figura 11, cuyo pK_a está en el orden 8,02.

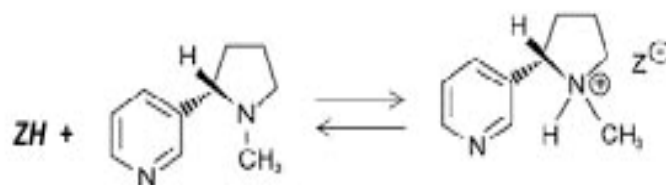


Figura 11.- Equilibrio ácido-base de la nicotina libre y la nicotina protonada una vez. ($pK_a = 8,02$)

Autores como Connolly, alegan que el aumento del pH , en los productos de tabaco los hace más fuertes y más adictivos y lo atribuyen a que la nicotina libre es más fácilmente absorbida por el organismo. ^[20]

En el caso particular del chimó, se ha reportado una variabilidad de pH que puede oscilar entre 5,1 y 6,3 para el producto sin aliñar y de 8,68 a 9,82 en su presentación final para el consumo. ^[21] Entre la gran variedad de componentes que aumentan los valores de pH , se encuentran el bicarbonato de sodio, carbonato de amonio, amoniaco, cenizas, etc. Estos se aplican para elevar los valores de pH lo que conlleva a un aumento en las cantidades de nicotina no protonada. ^[22] Debido a todos estos argumentos, radica la importancia en la determinación de la nicotina libre en el chimó.

Para la determinación de la nicotina libre en un derivado del tabaco se emplea la conocida ecuación de Henderson – Hasselbalch, a partir de los datos de pH , el pKa , y la concentración total de nicotina. ^[18]

Existe una serie de suposiciones que limitan el uso de la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Esta ecuación está diseñada para una disolución acuosa pura y diluida de una base simple con su ácido conjugado, mientras que los extractos de los derivados de tabaco, poseen sólidos en suspensión, altas concentraciones de sales, aniones poliméricos, sales de amonio, aminoácidos libres, ácidos carboxílicos, entre otros. ^[19]

Autores como Lauterbach J y colaboradores, ^[18] se refieren a una ecuación desarrollada por el equipo de Nguyen, donde se toman en cuenta algunos de estos efectos. Sin embargo, la corrección que hizo esta ecuación proporcionó una estimación de un aumento de 0,2 unidades en los valores de pH . La determinación del pH en una muestra de este tipo (producto de tabaco sin humo), depende del método y aún la ecuación corregida sigue siendo una aproximación, por lo tanto, lo

importante al comparar diferentes muestras es que hayan sido medidas bajo el mismo método y condiciones.

A un *pH* ligeramente ácido aproximadamente 6 o menor, la mayoría de la nicotina está ligada químicamente a las sustancias ácidas contenidas en la matriz del producto, lo que la hace poco volátil y es absorbida lentamente por el fumador con mayor porcentaje en los pulmones. Al incrementar el *pH* en los derivados del tabaco, la nicotina que se encontraba ligada a especies ácidas, penetra ahora con mayor rapidez y eficacia en la corriente sanguínea, y además atravesando fácilmente la mucosa de la boca y la pared de los pulmones. ^[23,24]

La incorporación de productos como carbonato y/o bicarbonato de sodio el tabaco húmedo juegan un papel importante en la regulación del *pH* de la fase acuosa y pueden causar la desprotonación de la nicotina. Sin embargo autores como Lauterbach J. y colaboradores, 2011^[18] alegan que los ácidos presentes en el producto reaccionan con algunos de los bicarbonatos para dar dióxido de carbono y agua, y que además la presencia de proteínas y otros polímeros, así como varios ácidos débiles pueden actuar como amortiguadores.

3.2.- Farmacología de la nicotina

Los niveles de ingesta de nicotina varían a través de las diferentes tendencias en el consumo del tabaco, al fumarlo, inhalarlo o mascararlo. En cualquiera de los casos, el primer lugar donde tiene contacto el producto es a la boca, luego a los pulmones (en el caso del cigarrillo), donde se realiza la absorción con gran rapidez. La nicotina pasa al torrente sanguíneo, llegando al corazón y es impulsada en aproximadamente veinte segundos al cerebro donde reside la "adicción". ^[25]

La absorción en los pulmones es de un 79 a un 90 %, pero en menor medida a través de la mucosa bucal, plexos sublinguales y de la piel (en un 4 a 40 %). Estos valores de absorción son variables y depende de diversos factores, como son la temperatura, el *pH*, el grado de humedad, etc. ^[26]

La vida promedio de este alcaloide es de dos horas, oscilando entre 1 a 4 horas de acuerdo a la variabilidad individual. La mayor parte de ésta es metabolizada en el hígado transformándose en uno de sus metabolitos inactivos, la *cotina* y solamente el 7 % de la nicotina se excreta por vía renal junto con la *cotina*. La nicotina además tiene la propiedad de pasar a la leche materna y atravesar la barrera placentaria durante el periodo de gestación. ^[23]

Al llegar al cerebro donde se encuentran los receptores, es donde ejerce su acción sobre el sistema nervioso central, así como en el sistema nervioso autónomo. Esta relación casi inmediata entre la inhalación del humo y su efecto a nivel cerebral es uno de los factores que contribuye al alto poder adictivo de la nicotina. ^[23]

En el cerebro, comienzan los distintos efectos que llevan a la adicción y a potenciales efectos dañinos para la salud. Ésta permite la liberación de ciertos neurotransmisores en el cerebro, tales como, dopamina y norepinefrina, los cuales pueden generar en el individuo una sensación de placer y alerta. Estos neurotransmisores pueden alterar el funcionamiento de otras células de manera temporal o permanente. ^[27]

Los efectos farmacológicos inducidos por el consumo de nicotina tienen lugar a través de la activación de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Estos están distribuidos en todo sistema nervioso central (SNC) y también en la periferia. En el SNC se generan diversidad de subtipos de nAChRs con propiedades funcionales y farmacológicas diferentes. ^[27]

Los nAChRs producen efectos de tipo excitador sobre la transmisión sináptica. Estos receptores se encuentran principalmente ubicados en terminales de fibras presinápticas, y al activarse facilitan la liberación de los neurotransmisores. La nicotina al estimular los nAChRs centrales, es capaz de afectar una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, entre los que cabe destacar la transmisión del dolor, el control del movimiento, los procesos de aprendizaje y memoria, las respuestas emocionales y la inducción de fenómenos de adicción.^[27]

Los neurotransmisores son los encargados de transmitir el mensaje de una neurona a otra, lo cual ocurre en la sinapsis. Siendo entonces la dopamina al ser liberada en las regiones del cerebro la que controla las sensaciones de placer y bienestar, generando la adicción.^[28] La adicción a las drogas es, una alteración cerebral que está mediada por componentes neurobiológicos.^[29]

Algunos estudios han demostrado que a nivel neuronal la nicotina, reduce la cantidad de neuronas en los consumidores, y la abstinencia a la nicotina se acompaña de deterioro cognitivo.^[30]

La abstinencia sigue la vía noradrenérgica, mediada por la norepinefrina que se concentra en las neuronas del locus ceruleus. Cuando un fumador trata de no fumar, los niveles de nicotina caen y la frecuencia de los disparos de las neuronas noradrenérgicas en el locus ceruleus, llega a ser alta y tienen lugar los síntomas de abstinencia a la nicotina.^[25]

Estos síntomas generalmente empiezan al cabo de 2 a 3 horas después del último consumo de tabaco y alcanzan su pico máximo aproximadamente de 2 a 3 días después. Pueden ser serios, dependiendo de por cuánto tiempo haya fumado un individuo y cuántos cigarrillos fumaba al día. Los síntomas comunes abarcan: Un deseo vehemente de nicotina, ansiedad, tensión, inquietud, frustración o impaciencia, dificultad para concentrarse, somnolencia y problemas para dormir, al igual que malos sueños y pesadillas, dolores de cabeza, incremento del apetito y aumento de peso, irritabilidad o depresión.^[25]

La nicotina, además produce distintos efectos sobre el organismo de los consumidores, que llegan a afectar la salud de estas personas. En la tabla 1 se mencionan algunos de los problemas que causa el consumo de la nicotina.

Tabla 1.- Principales alteraciones debidas a la acción de la nicotina. ^[30]

Efectos neuroendocrinos	Aumento de la liberación de hormonas adrenocorticotropa, cortisol, vasopresina, aldosterona, hormona del crecimiento y prolactina.
Aparato circulatorio	Incremento de la presión sanguínea, y vasoconstricción a nivel de pequeños vasos periféricos, lo que implica menor aporte sanguíneo a la parte irrigada.
Sistema gastrointestinal	Reducción o supresión de las contracciones de la pared gástrica, y aumento de las secreciones ácidas del estómago, lo que puede originar la aparición de gastritis y úlceras, o dificultar su tratamiento. Suprime la liberación de insulina del páncreas
Sistema respiratorio	El aumento de la frecuencia respiratoria hace que se reduzca la función inmunitaria del pulmón, lo que favorece la aparición de infecciones y el desarrollo de neoplasias.
Coagulación	Aumento en el recuento celular y en el tamaño, y disminución en la capacidad de deformación. El mayor número de plaquetas, junto con la disminución en la síntesis de prostaglandinas I_2 favorece la adhesividad, lo que puede dar lugar a trombos plaquetarios intravasculares.
Metabolismo	Aumento del metabolismo basal.
Interacciones metabólicas	Se Producen interacciones con muchas sustancias, incluidos fármacos, que utilizan la misma vía de metabolización que la nicotina (P-450), compitiendo, o bien acelerando su metabolismo (es el caso de la teofilina).

El cáncer es una de las enfermedades más serias proveniente del consumo de la nicotina ya que a partir de ésta se forman tres tipos de nitrosaminas. Estas se pueden producir en el cigarrillo por efecto del calcinado del tabaco.

En los productos de tabaco sin humo la nicotina puede ser metabolizada como las siguientes nitrosaminas: N'-nitrosornicotina (**NNN**), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (**NNK**) y la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)butanal (**NNA**), donde todas excepto la NNA han sido detectadas en la hoja de tabaco sin procesar.^[29] Su presencia viene dada por la nitración en el proceso de curado. Estas se pueden visualizar en la figura 12.

La NNN y la NNK son fuertemente cancerígenas. Por ende, proporcionan un vínculo entre la nicotina, el factor de habituación en el tabaco y los cánceres relacionados con él. Hoffmann D., y Hecht S. 1985. ^[31] Demostraron que las nitrosaminas NNN y NNK provocan cáncer de esófago, cavidad nasal y pulmón en ratones, ratas y hámster

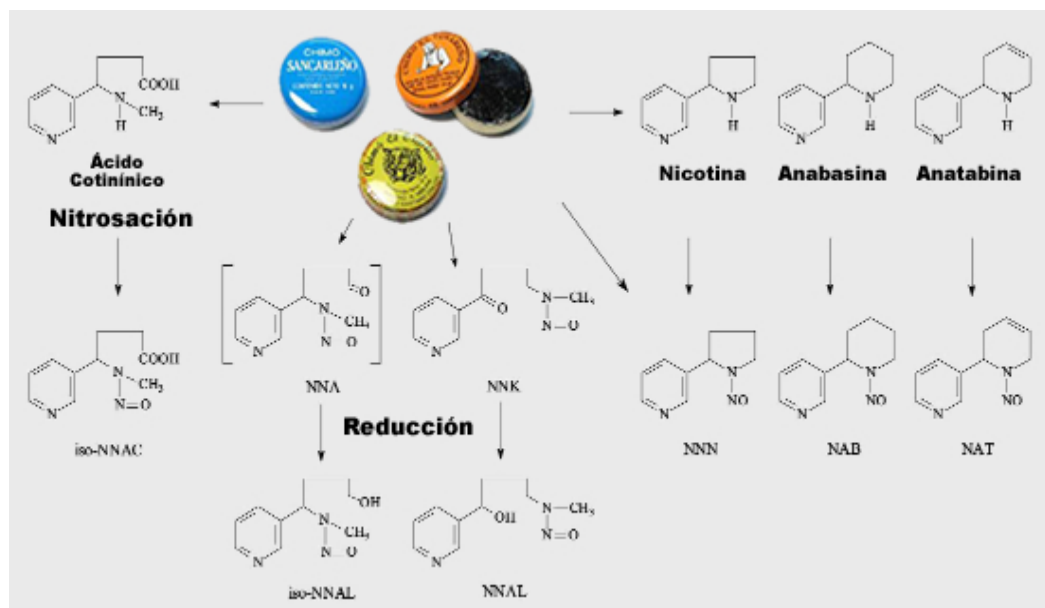


Figura 12.- Productos cancerígenos provenientes del tabaco

El chimó por ser un derivado del tabaco contiene nicotina, y en toda Venezuela tanto en las zonas rurales como en las urbanas se ha incrementado el consumo de este producto, principalmente los adolescentes (estudiantes de bachillerato) están comenzando a consumir el chimó sin conocer los riesgos que conlleva y sin que exista alguna restricción en su consumo. ^[32]

El Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), señala que el chimó es capaz de causar no sólo lesiones odontológicas, sino también unos seis tipos de cáncer y una serie de efectos nocivos para la salud a corto, mediano y largo plazo. Se nombran algunos de ellos en la tabla 2.

Tabla 2.- Efectos del Chimó en el organismo a corto, mediano y largo plazo. ^[7,33]

Efectos Adversos y Complicaciones		
<i>A Corto plazo</i>	<i>A mediano plazo</i>	<i>A largo Plazo</i>
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sensación de embriaguez. ➤ Acidez estomacal. ➤ Elevación de la presión arterial. ➤ Desarrollo de problemas cardiovasculares. ➤ Pérdida del apetito y salivación abundante. ➤ Adicción. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Recesión gingival ➤ Leucoplasias o ceratosis ➤ Manchas en los dientes 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cáncer bucal ➤ Cáncer de tráquea ➤ Cáncer de esófago ➤ Cáncer de colon ➤ Caída de los dientes

En el 2005 Victorio Berríos, coordinador de tratamiento de la Oficina Nacional Antidrogas (ONA) recordó en el Parlamento venezolano, la Ley Orgánica Contra el Tráfico Ilícito y Consumo de Sustancias Estupefacientes y Psicotrópicas (LOCTICSEP), en la que se desarrollaba el tema: alcohol, tabaco y sus mezclas, así como otras drogas e instó a vigilar "a nuestros niños, adolescentes y personas que estén bajo nuestra responsabilidad, para prevenir el consumo de cualquier sustancia nociva como las drogas lícitas e ilícitas, así como de sustancias o mezclas como el chimó".^[34]

Se puede resaltar que el Ministerio del Poder Popular para la Salud, elaboró una resolución para comenzar a normar este producto, la primera medida estaría enfocada en regulación de los empaques de chimó y de cualquier producto de tabaco no fumado. El proyecto de resolución indica que el objetivo es regular los envases y el embalaje de chimó, y otros productos derivados del tabaco sin humo. El MPPS propone que los recipientes sean de plástico color blanco, con letras negras y con advertencias de los riesgos (como las que tienen las cajetillas de cigarrillos) ocupando toda la superficie superior del envase.^[35]

Algunos de los mensajes a incluir son: "este producto es nocivo para la salud", "el chimó y cualquier producto de tabaco no fumado causa mal aliento, daño a las encías y cáncer de boca", y "consumir chimó durante el embarazo daña la salud de

tu bebé". Además, prohibiría la inclusión de palabras que puedan incitar a su consumo como: "ultra bajo, suave, light, liviano, duro". [35]

Debido a todos los aspectos y argumentos mencionado en los párrafos anteriores, relacionados con los efectos y los daños que pueden ocasionar los distintos productos de tabaco sin humo, se ve justificado cualquier análisis en la caracterización química del chimo.

III. JUSTIFICACIÓN

Considerando lo planteado durante la revisión bibliográfica, relativo a que:

- El consumo del tabaco sin humo mas empleado en Venezuela es el chimo y que su auge se ha incrementado en los últimos años, en especial en la población joven del país.
- En los derivados del tabaco, la nicotina es la principal causante de la dependencia tanto física como psicológica y su repetida práctica está asociada a muchas enfermedades bucales y pre-cancerígenas.
- La absorción de nicotina en el organismo es probablemente mayor cuando se encuentra en su forma libre, y que dicha forma depende de la humedad y el pH del derivado del tabaco empleado.
- El chimo pudiese contener niveles elevados de pH lo que probablemente haga que la nicotina se encuentre en su forma libre y a la vez pueda ser absorbida con mayor rapidez.

Se justifica el desarrollo de métodos para la determinación de nicotina libre, pH y humedad, que pudieran servir para caracterización química de los diferentes tipos de chimó de producción nacional, en vías de establecer normas para en una futura regulación de este producto.

La justificación anterior se argumenta aún más, cuando la aplicación de las normas de análisis pre-establecidas para los derivados de tabaco, no han sido empleadas en una matriz tan compleja y variable como el chimo.

IV. ANTECEDENTES

En esta sección se realizará una revisión de los antecedentes relativos a los análisis químicos de nicotina total, nicotina libre, pH, humedad en derivados de tabaco, especialmente a los de tabaco sin humo.

Brevemente se muestran las normas internacionales establecidas para la determinación de pH y humedad, y los trabajos restantes están enfocados fundamentalmente en la determinación de nicotina libre.

4.1.- Health Canada. Método oficial. Prueba T-310 (Determinación de pH en Tabaco). Diciembre 31, 1999^[36]

Mediante este método se determina el pH de una suspensión acuosa de tabaco al 10 % p/v. Se emplea un medidor de pH con un auto-compensador de temperatura. Un electrodo de vidrio combinado (Ag/AgCl con Referencia interna y junta de cerámica), previamente calibrado con disoluciones buffer.

Se pesa 2 g de tabaco (+/- 0.05 g) homogeneizado de una muestra recién abierta (paquete o lata de tabaco), se transfiere en una fiola con tapa de 50 mL y se extrae en 20 mL de agua desionizada y desgasificada, con agitación mecánica durante 30 min. La muestra es colocada en la oscuridad y se deja reposar por una hora.

El sobrenadante es decantado y transferido en un beaker de 10 mL de poliestireno, donde el pH es medido.

Si se dispone de suficiente muestra, puede utilizarse mayor cantidad inicial del tabaco pero manteniendo la misma relación tabaco-agua, así se obtendrá mayor cantidad de sobrenadante y facilitará la medición del pH. Las medidas de las replicas no deben variar entre 0,1 unidades de pH.

El método aclara el hecho de mantenerlo en la oscuridad por una hora. En esta última situación, asumimos que pueden ocurrir reacciones de descomposición catalizadas por la luz.

4.2.- Centro de Control y Prevención de Enfermedades de USA (US-CDC). Método para la determinación de pH (Atlanta, Georgia, USA). Enero 07, 2009. [37]

Se pesan exactamente 2,00 g de muestra, en un recipiente de polipropileno de 50 mL y se añade 20 mL de agua desionizada. Se coloca la barra de agitación magnética recubierta de teflón en un recipiente y agita la mezcla continuamente.

El medidor de pH y el electrodo es calibrado con dos buffers estándar de pH, según el rango de medida esperado (4.01 y 7.00 ó 7,00 y 10,00).

Para un producto del tabaco que se le mide el pH por vez primera, se le determina a los 5, 15, y 30 minutos. Si no hay variación sistemática del pH con el tiempo, todas las determinaciones de pH posteriores se realizan a los 5 minutos. Si existe una variación en los valores del pH, se continúa midiendo el pH del producto de tabaco hasta que el valor sea estable y no varíe más del 10 %.

4.3.- Health Canada. Determinación de humedad. Método oficial. Prueba T-301 (Determinación de alcaloides en Tabaco). Diciembre 31, 1999. [38]

Pesar 2 g (precisión de 0,1 mg) de tabaco en un vial limpio y seco de una capacidad de 20 mL para su liofilización. Previamente se coloca el recipiente con la muestra a enfriar en un refrigerador a - 30 °C durante 1 hora.

Colocar la muestra en el liofilizador para extraer la humedad, durante un periodo mínimo de 48 horas. Posteriormente, se remueve el vial y se tapa para que la muestra no absorba la humedad del medio ambiente. Se coloca en el desecador hasta llevar a temperatura ambiente.

Finalmente obtener el peso total del vial con la muestra y calcular el porcentaje de humedad. El análisis debe realizarse por triplicado.

4.4.- Método para la determinación de humedad por método gravimétrico. AOAC. 966.02. ^[39]

Se pesa 5 g (precisión de 0,1 mg) una porción de ensayo en un recipiente de pesar para humedad (vidrio de reloj) y se coloca descubierto en el horno. Secar por tres horas a una temperatura de 99,5 °C. Retirar del horno, cubrir, y dejar llevar en el desecador a temperatura ambiente por 30 min. Volver a pesar y calcular el porcentaje de humedad.

Este método de secado puede ser conveniente para ciertos derivados del tabaco, pero, para muestras que tienden a descomponerse con la temperatura no es recomendable.

A continuación describiremos algunos de los trabajos más resaltantes en la determinación de nicotina libre en productos de tabaco sin humo.

4.5.- Richter P., y Spierto F. 2003. ^[22]

Determinaron la cantidad de nicotina total, humedad, pH y el contenido de nicotina no protonada de las marcas de tabaco sin humo más vendidas en Estados Unidos en el año 2000. Se analizaron 18 marcas: 8 muestras de tabaco de mascar húmedo y 10 muestras de tabaco de mascar en hojas sueltas.

Las muestras fueron almacenadas en sus empaques originales a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por otro lado, la cantidad de nicotina total fue medida por cromatografía de gases y la nicotina libre se calculó mediante la ecuación de Henderson Hasselbach, el porcentaje de humedad se determinó mediante la diferencia de peso de una cantidad de tabaco sin humo antes y después de secarse por 3 horas en un horno a $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el pH del producto fue medido con un pH-metro en agua desionizada.

Los resultados obtenidos (Tabla 3), indicaron que todas las marcas de tabaco de mascar húmedo contienen mayor cantidad de nicotina, mayor porcentaje de humedad, valores de pH más elevados y por ende mayor cantidad de nicotina libre que el tabaco de mascar en hojas sueltas. Con la excepción de una las marcas analizadas, la cual presentó un porcentaje bajo de nicotina no protonada como consecuencia de un pH bajo ($\text{pH} \approx 5,35$) y una baja cantidad de nicotina total.

Adicionalmente, plantearon que los productos con un pH alto tienen un alto porcentaje de nicotina libre, siendo esta forma de nicotina la que más fácilmente atraviesa las membranas biológicas y que en el caso del tabaco de mascar húmedo son justamente estos los que mayoritariamente se venden en el mercado.

Por último, concluyen que a pesar de que todos los productos de tabaco sin humo son producidos a partir de la hoja de tabaco, factores como el cultivo o alteraciones de la mezcla generan variación de la concentración de nicotina entre diferentes lotes.

Tabla 3.- Contenido de nicotina, humedad y pH en 18 productos de tabaco sin humo.

Marca	Nicotina Libre $\pm s$ (mg/g)	Nicotina total (mg/g)	Total de humedad $\pm s$ (%)	pH $\pm s$
<i>Hawken Wintergreen</i>	4,28 \pm 0,10	4,28 \pm 0,10	26,0 \pm 0,6	5,35 \pm 0,04
<i>Skoal Bandits Mint</i>	8,49 \pm 0,23	8,49 \pm 0,23	47,3 \pm 0,2	7,13 \pm 0,03
<i>Timber Wolf Long Cut Straight</i>	13,54 \pm 0,22	13,54 \pm 0,22	50,8 \pm 0,1	7,14 \pm 0,01
<i>Silver Creek Long Cut Wintergreen</i>	6,39 \pm 0,04	6,39 \pm 0,04	53,5 \pm 0,1	7,64 \pm 0,03
<i>Copenhagen Long Cut</i>	10,35 \pm 0,20	10,35 \pm 0,20	53,5 \pm 0,0	7,41 \pm 0,04
<i>Copenhagen Snuff</i>	12,71 \pm 0,15	12,71 \pm 0,15	53,0 \pm 0,1	7,52 \pm 0,03
<i>Skoal Long Cut Straight</i>	12,94 \pm 0,34	12,94 \pm 0,34	54,6 \pm 0,1	7,62 \pm 0,02
<i>Kodiak Wintergreen</i>	9,00 \pm 0,02	9,00 \pm 0,02	53,4 \pm 0,1	8,28 \pm 0,03
Chattanooga Chew Premier Flavor	8,26 \pm 0,09	8,26 \pm 0,09	25,0 \pm 0,1	5,33 \pm 0,05
Beech-nut Wintergreen	4,06 \pm 0,09	4,06 \pm 0,09	22,4 \pm 0,1	5,70 \pm 0,01
H. B. Scott's Private Blend	4,11 \pm 0,06	4,11 \pm 0,06	23,4 \pm 0,1	5,71 \pm 0,01
Beech-nu	6,79 \pm 0,12	6,79 \pm 0,12	22,0 \pm 0,2	5,61 \pm 0,04
Taylor's Pride	4,69 \pm 0,05	4,69 \pm 0,05	21,2 \pm 0,1	5,77 \pm 0,05
Red Man	7,44 \pm 0,09	7,44 \pm 0,09	24,0 \pm 0,1	5,83 \pm 0,03
Red Man Golden Blend	6,23 \pm 0,03	6,23 \pm 0,03	24,0 \pm 0,1	6,03 \pm 0,04
Red Man Select	3,73 \pm 0,06	3,73 \pm 0,06	25,1 \pm 0,0	6,26 \pm 0,02
Granger Select	4,90 \pm 0,02	4,90 \pm 0,02	21,3 \pm 0,1	6,34 \pm 0,02
Levi Garret	4,45 \pm 0,09	4,45 \pm 0,09	23,0 \pm 0,3	6,41 \pm 0,02

4.6.- Richter P y col. 2008. ^[40]

Realizaron un estudio para determinar la cantidad total de nicotina, el pH, la humedad, el contenido de N-nitrosaminas y de nicotina no protonada en 40 marcas de tabaco de mascar húmedo fabricados por 5 empresas diferentes de mayor venta. Adicionalmente examinaron la relación entre las características de los productos, como el empaquetamiento, corte, sabor y precio, con los niveles de nicotina no protonada y de N-nitrosaminas. Las muestras fueron almacenadas en su

presentación original a - 70 °C hasta su uso y posteriormente los 5 paquetes de cada marca se combinaron y las muestras homogéneas fueron utilizadas para los análisis.

Usaron las mismas técnica de análisis para la humedad, pH, nicotina libre y nicotina total aplicadas por Richter P., y Spierto F. 2003.^[22] Pero como sistema de detección se usó un detector de masa, en lugar de la detección por ionización a la llama.

Los resultados, mostraron que existe una correlación significativa entre el pH, la humedad y la cantidad de nicotina no protonada, siendo entonces el pH un buen indicador del contenido de este tipo de nicotina en los productos de tabaco sin humo. Adicionalmente, en base a la información que poseían de los productos más vendidos, concluyeron que justamente son aquellos que contienen mayor cantidad de nicotina no protonada.

Se indicó que el tipo de empaquetado tiene cierta relación con la humedad, el pH y la cantidad de nicotina no protonada, pero no existe relación con el contenido de N-nitrosaminas. De igual forma no se consiguió una correlación significativa entre la humedad y las N-nitrosaminas. Por último, concluyen que entre las marcas de mayor venta, el contenido de nicotina no protonada y de las N-nitrosaminas cancerígenas varía ampliamente.

4.7.- Lauterbach J., y col. 2011.^[18]

Determinaron el contenido de nicotina total, pH y humedad en 32 muestras abarcando 8 tipos de productos de tabaco sin humo. El propósito principal era la obtención de la cantidad de nicotina libre calculada mediante la ecuación de Henderson Hasselbalch y estudiar los diferentes parámetros que afectan su determinación. El método para la determinación de nicotina total fue Labstat TWT-320, para el pH se utilizó el método oficial Health Canada T-310 y la humedad mediante el método gravimétrico AOAC 966.02. Estas determinaciones se utilizaron para el cálculo de la nicotina libre que se asume que es la de mayor absorción y por ende más perjudicial para la salud.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en esta investigación, se observa una clara tendencia que para un mismo tipo de producto los valores de pH, nicotina total, humedad y nicotina libre son similares, esto es de esperarse ya que cada tipo de producto tiene características semejantes de manufactura.

Sin embargo, la determinación de pH se ve influenciada por efectos de la matriz, pero dentro de un mismo tipo de producto las matrices son similares y pueden ser comparados, por ejemplo la muestra Rooster Wintergreen, dentro del grupo de snuff de corte largo, presenta la menor cantidad de nicotina total pero es una de las marcas que contiene un mayor valor de pH y por ende mayor cantidad de nicotina libre y en efecto esta es una de las marcas más vendidas en el comercio canadiense.

Tabla 4.- Valores promedio de pH, nicotina total, nicotina libre y humedad para los productos de tabaco sin humo.

Product name	Product type	Total nicotine (mg/g)	pH Result	Free-base nicotine (mg/g)	FBN/TN ratio	Dry matter (%)	Moisture (%)
Skoal Long Cut Berry	Long-cut moist snuff	12,9	7,38	2,4	0,19	46,8	53,2
Skoal Long Cut Citrus	Long-cut moist snuff	12,3	7,26	1,84	0,15	46,9	53,1
Skoal Long Cut Mint	Long-cut moist snuff	13,4	7,47	2,92	0,22	46,6	53,4
Skoal Long Cut Spearmint	Long-cut moist snuff	12,3	7,48	2,74	0,22	46,8	53,2
Skoal Long Cut Vanilla	Long-cut moist snuff	11,7	7,24	1,67	0,14	46,7	53,3
Copenhagen Long Cut	Long-cut moist snuff	12,4	7,68	3,91	0,31	46,1	53,9
Skoal Long Cut Apple	Long-cut moist snuff	12	7,26	1,77	15	46,8	53,2
Skoal Long Cut Cherry	Long-cut moist snuff	13,1	7,37	2,38	0,18	47,4	52,6
Skoal Long Cut Classic	Long-cut moist snuff	12,7	7,54	3,16	0,25	46,8	53,2
Skoal Long Cut Peaches	Long-cut moist snuff	12,1	6,97	0,99	0,08	46,8	53,2
Skoal Long Cut Straight	Long-cut moist snuff	13	7,6	3,56	0,27	46,6	53,4
Skoal Long Cut Wintergreen	Long-cut moist snuff	12,7	7,44	2,67	0,21	46,9	53,1
Rooster Wintergreen	Long-cut moist snuff	11,6	7,61	3,23	0,28	46,2	53,8
Copenhagen Fine Cut	Long-cut moist snuff	12,4	7,55	3,15	0,25	46,3	53,7

Tabla 4.- (Continuación). Valores promedio de pH, nicotina total, nicotina libre y humedad para los productos de tabaco sin humo.

Product name	Product type	Total nicotine (mg/g)	pH Result	Free-base nicotine (mg/g)	FBN/TN ratio	Dry matter (%)	Moisture (%)
Skoal Fine Cut Wintergreen	Long-cut moist snuff	13,3	7,52	3,16	0,24	46,9	53,1
Copenhagen Pouches	Pouched moist snuff	10,9	8,19	6,49	0,59	47,5	52,5
Skoal Bandit Mint	Pouched moist snuff	12,7	7,55	3,2	0,25	52,1	47,9
Skoal Bandit Wintergreen	Pouched moist snuff	12,6	7,6	3,48	0,28	48,5	51,5
Skoal Berry Pouches	Pouched moist snuff	12,3	7,62	3,51	0,28	47,8	52,2
du Maurier Original	Pouched snus	14,9	7,39	2,85	0,19	73,9	26,1
du Maurier Freshmint	Pouched snus	13,7	7,39	2,58	0,19	70,8	29,2
McChrystal's Raspberry	Low-moisture snuff	5,51	9,4	5,29	0,96	85,7	14,3
McChrystal's Violet	Low-moisture snuff	6,17	9,45	5,95	0,96	84,1	15,9
McChrystal's Mild Lemon	Low-moisture snuff	5,45	9,43	5,25	0,96	82,7	17,3
McChrystal's Menthol	Low-moisture snuff	6,2	9,56	6,03	0,97	80,9	19,1
McChrystal's Original	Low-moisture snuff	6,91	9,68	6,77	0,98	83,3	16,7
McChrystal's Apricot	Low-moisture snuff	7,93	9,46	7,65	0,96	88,2	11,8
Apple Plug	Plug-style chewing tobacco	12,6	4,9	0,01	0	82,9	17,1
Red Man	Loose-leaf chewing tobacco	7,65	5,85	0,05	0,01	78,4	21,6
Manikchand	Gutkha from India	NQ	8,25	NQ	NM	94,3	5,67
Tulsi	Mixture of basil and tobacco	4,32	8,24	2,69	0,62	92,7	7,26

Algunos de los productos utilizados fueron también caracterizados por Richter P. y col 2008, donde los valores de pH obtenidos fueron alrededor de 8 % mayor que los valores obtenidos por Lauterbach y col. Este incremento del 8 % en los valores de pH resultó en un incremento del 25 % de las cantidades relativas de nicotina libre. Atribuyeron que las diferencias probablemente sean debidas a que se utilizaron métodos diferentes. Lauterbach J. y col, emplearon el método T-310 que se basa en la determinación de pH de una suspensión de tabaco decantada mientras que Richter P. y col 2008 emplearon el método USCDC que se basa en una suspensión de tabaco agitada.

4.8.- Stanfill S., y col. 2011. ^[41]

Analizaron un total de 65 marcas de tabaco sin humo obtenidos alrededor del mundo, entre los cuales 5 de ellos eran proveniente de Venezuela (chimó). Midieron el pH y la cantidad de nicotina total y nicotina libre. Las muestras obtenidas se almacenaron a - 30 °C. Las mediciones de pH se realizaron mediante la adición de 2 g de producto de tabaco oral en 10 mL de agua desionizada. Muchos de los productos analizados en este estudio fueron polvos secos. En casos en que el producto absorbe toda el agua, formándose una pasta viscosa, se le añaden 10 mL adicionales de agua desionizada antes de la medición del pH. El contenido de nicotina libre o nicotina no-ionizada se determinó mediante la ecuación de Henderson Hasselbalch.

Llegaron a la conclusión, que las diferencias en los resultados entre cada tipo de tabaco, se debe a los diversos métodos de curado, preparación y la naturaleza de otras sustancias añadidas a estos productos antes de su uso.

Para los productos de tabaco sin humo venezolanos se concluyó que el nivel de pH determina la cantidad de nicotina libre. En la tabla 5 se muestra que para el producto *Fábrica de chimó* a pesar de tener una cantidad menor de nicotina total que el Producto *Vencedor Chimó*, el valor de nicotina libre es mayor debido a que presenta el valor de pH más elevado (9,40).

Tabla 5.- Niveles de pH, nicotina total y nicotina no protonada en 5 marcas venezolanas.

Muestra	pH \pm s	Nicotina \pm s (mg/g)	Nicotina no protonada (%)	Nicotina no protonada (mg/g)
Chimó Vencedor	6,98 \pm 0,09	16,13 \pm 0,19	8,18	1,32
Chimó El Tigrito	8,56 \pm 0,03	10,39 \pm 0,33	77,2	8,02
Chimó La Chinata	9,04 \pm 0,01	30,13 \pm 2,24	91,1	27,4
Chimó El Tabacote	9,12 \pm 0,08	27,51 \pm 1,19	92,5	25,4
Fábrica de Chimó	9,40 \pm 0,03	5,29 \pm 0,14	95,9	4,99

4.9.- Carrillo A. y colaboradores 2011. ^[42]

Desarrolló un método de extracción y análisis de nicotina en tabaco sin humo (chimó). Para la determinación de nicotina se empleó el método espectrofotométrico (espectroscopia molecular UV), utilizando el ensayo de arrastre con vapor para recolectarla. Se seleccionó una longitud de onda de trabajo de 260 nm, con un patrón de nicotina pura 50 mg/L disuelta en HCl al 7,4 %. Se realizó la curva de calibración para un rango dinámico lineal de 1,8 a 30 mg/L.

Para la determinación de nicotina de varias marcas nacionales de chimó y una muestra proveniente de Brasil conocida como Miel de Tabaco, llamada de esta manera por tener muy baja viscosidad (bastante fluida con respecto al chimó nacional). Cada marca fue destilada por triplicado y en la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6.- Resultados de la concentración de nicotina en la muestra de referencia

Réplicas	Peso muestra (g)	Nicotina (mg/g)
1	0,3047	13,5
2	0,3300	12,6
3	0,3044	12,7
4	0,3080	12,4
5	0,3246	13,0
6	0,3036	13,0
	Media	12,9
	s	0,4
	CV	3
	LC 95 %	0,4

El tiempo de destilación requerido para garantizar la recuperación total de la nicotina (97 %), pudo variar dependiendo de la concentración en las diferentes marcas de chimó. Para marcas que contienen una concentración menor a 13 mg/g aproximadamente de nicotina, requieren de un tiempo de destilación menor y las marcas que contienen una concentración superior a este valor requieren un tiempo de destilación mayor. Pero se decidió emplear el mismo tiempo para todas las marcas para establecer un tipo de norma única. Este tiempo correspondió a 5 horas de destilación y 30 min de medida espectrofotométrica, para un tiempo total de 5 ½ horas por muestra aproximadamente.

Una vez establecido el método de referencia para la determinación de nicotina, se procedió a desarrollar el análisis por Cromatografía de Gases, debido a su menor “complejidad”, menor gasto de consumibles, tiempo de análisis y la mayor posibilidad para estudios sistemáticos y rutinarios. Para ello se empleó un cromatógrafo de gases con detector de ionización a la llama.

Tabla 7.- Concentración de nicotina en varias marcas de chimó. ^a muestra de lote diferente al de referencia, ^b presentación en bolsa y ^c presentación en caja.

Marca	Nicotina (mg/g)	s	CV
Las Delicias	5,1	0,1	2
Chain	6,2	0,2	3
El Águila	10,5	0,3	2
El Tigrito ^a	13,6	0,6	4
Matheitos	14,0	0,5	4
Matheus	15,7	0,4	2
San Francisco	16,6	0,4	3
San Benito ^b	17,8	0,6	4
San Benito ^c	23,8	0,5	2
Miel de tabaco	6,2	0,2	4

Este posee un divisor de flujo en la cámara de inyección (split-splites) y una columna capilar comúnmente empleada para propósitos de polaridad intermedia, de 30 metros de longitud, diámetro interno de 0,32 milímetros y 0,25 μm de espesor pelicular. Se utilizó inyección manual con una jeringa de 10 μL y el gas. Las condiciones cromatográficas preliminares se muestran en la Tabla 8. Para la curva de calibración se uso el hexadecano como estándar interno y se procedió a inyectar un extracto de nicotina y el estándar interno.

Tabla 8.- Condiciones cromatográficas preliminares

T Columna	T Inyector	T Detector	Flujo de entrada (inyector)	Relación Split	Flujo del gas de arrastre (columna)	Vol aprx de inyección
(100-250) $^{\circ}\text{C}$ 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	250 $^{\circ}\text{C}$	250 $^{\circ}\text{C}$	75 mL/min	50:1	1,5 mL/min	1 μL

Se estableció un rango dinámico lineal desde 19 a 130 mg/L.

Se concluyó que los dos métodos utilizados eran significativamente diferentes, los valores obtenidos por el método clásico de referencia, en todas las muestras resultaron superiores a los valores obtenidos por el método cromatográfico. Se escogió el método cromatográfico debido a las ventajas que presentaba, tales como su aplicabilidad como herramienta de separación de los alcaloides presentes, determinación cuantitativa de la nicotina como alcaloide mayoritario (selectividad), capacidad para cuantificar los alcaloides presentes de forma individual, su menor complejidad en cuanto al tratamiento de la muestra, menor gasto de consumible y por el manejo de un alto volumen de muestras.

En el momento de realizar esta revisión bibliográfica, el método anteriormente descrito se encuentra en un proceso de mejoramiento y optimización.

V. OBJETIVOS

5.1 General

El objetivo principal de este estudio, fue caracterizar químicamente el tabaco sin humo de consumo nacional (chimó), específicamente en la determinación de la cantidad de nicotina libre, pH y humedad.

5.2 Específicos

- Elaborar una muestra modelo, que funcione como punto de comparación entre los diferentes resultados de las metodologías a desarrollar.
- Desarrollar un método para la determinación del contenido de humedad en chimó.
- Desarrollar un método para la determinación del pH en el chimó.
- Determinar la nicotina total a través de una técnica previamente establecida (extracción de muestra- cromatografía de gases).
- Estudiar del comportamiento de la ecuación de Henderson – Hasselbalch, con una matriz como la del chimó, y ajustarla para la determinación más exacta de nicotina libre en chimo.
- Determinar los parámetros de interés en muestras de chimó de fabricación nacional.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

6.1.- Instrumentación

- Cromatógrafo con detector de ionización a la llama. *Thermo Finnigan*, modelo Trace GC.
- Columna capilar DB-5 de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor pelicular. Rango de temperatura - 60 a 350 °C. Fase estacionaria: Enlazada con un entrecruzamiento de fenil al 5 % y polimetilsiloxane al 95 %. *Agilent Technologies (J&W Scientific)*,
- Medidor de *pH*. *Thermo*, modelo *Orion 4 Star*,
- Liofilizador. Capacidad para liofilizar 12 muestras simultáneamente, operando a una temperatura de - 50 °C y a una presión de 0,046 mbar. *Labconco*, modelo *Freezone*.
- Ultracentrifuja. *Thermo Electron Corporation*, modelo *ICE Central CL2*.
- Ultrasonido. *Cole – Parmer*, modelo *8890*.
- Freezer. Rango de temperatura de 0 - 30 °C. *Thermo Electron*, modelo *Forma*.
- Reactor Radiometer. EA 876-20.
- Baño termostatado. *Colora WK5*.

6.2.- Materiales, reactivos

- Gases N_2 , H_2 y Aire de alta pureza. *AGA*, *Gases Industriales de Vzla*.
- Heptadecano ($\text{C}_{17}\text{H}_{36}$). Calidad CG. *Poly Science Corp*.
- Heptano (C_7H_{16}). Grado CG, 99,9 %. *Burdick & Jackson*.
- Cloroformo (CHCl_3). Contiene 1 % de Etanol. Grado CG, 99,98 %. *Merck*.
- Metanol (CH_3OH). Grado CG, 99,9 %. *Merck*.
- Hidróxido de potasio (KOH). 99 %. *Merck*.
- Cloruro de sodio (NaCl). 99,8 %. *Fisher Scientific*.
- Agua grado 18 M Ω . Desionizador: *Barnstead / Thermolyne*.

- Patrón de Nicotina (C₁₀H₁₄N₂) al 99 %. *Sigma - Aldrich*.
- Saliva artificial. *Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela*.
- Disoluciones buffer de pH 4,7, 7,0 y 10,0. *Merck*.

6.3.- Muestras de Chimó

La mayoría de las muestras fueron adquiridas del mercado nacional y algunas de ellas facilitadas por el Laboratorio de Análisis de Derivados de Tabaco de la Unidad de Fármaco y Toxicología del Instituto "Rafael Rangel" de la Universidad Central de Venezuela:

- **Matheus.** *Marcelino Matheus D. La Fría, Edo. Trujillo*
- **San Benito (Caja y bolsita).** *Suarez Q. La Fría, Edo. Trujillo.*
- **Chain.** *Sabor criollo. La Fría, Edo. Trujillo-Valera.*
- **Matheitos.** *Luis Matheus, Valera, Edo. Trujillo.*
- **El Tigrito II.** *Avelino Molina, Vía Quibor, Edo. Lara.*
- **El Tigrito Ice.** *Avelino A. Molina, Barquisimeto, Edo. Lara.*
- **El Águila.** *Mendoza. La Fría, Edo. Trujillo*
- **Taparo.** *Hnos. Gutiérrez Prado. Comercializado por Dist. El Cacique CA.*
- **La Chinata.** *La Chinata C.A, Edo. Barinas.*

6.4.- Metodología Experimental

6.4.1.- Purificación del patrón de nicotina

Para la determinación de la nicotina total y nicotina libre se empleó un estándar de nicotina de alta pureza. Sin embargo, este compuesto tiende a descomponerse en el tiempo y adicionalmente el proceso es catalizado por la exposición a la radiación visible. Lo anterior es evidenciado por un cambio en su coloración (de incoloro a un tono amarillento), por tanto, se recomienda ser usada recién destilada. El proceso de purificación se llevó a cabo mediante una destilación y la literatura recomienda realizarlo a presión reducida, ^[13,48] tal y como, se muestra en el montaje esquematizado de la figura 13.

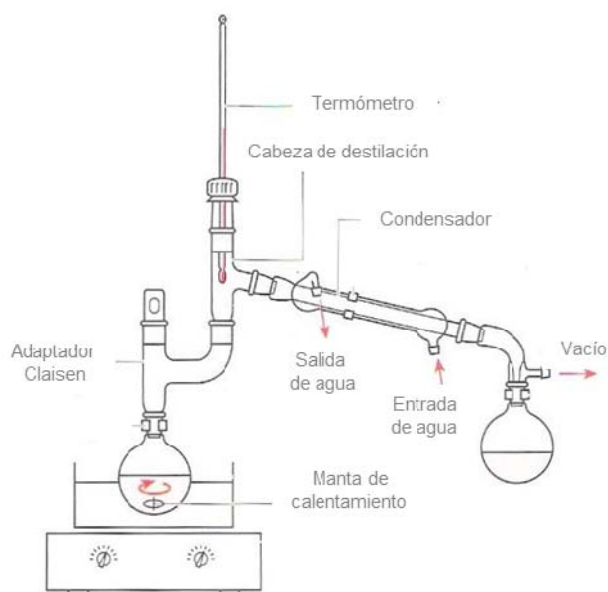


Figura 13.- Montaje de destilación a presión reducida.

Posteriormente, para su preservación el estándar fue almacenado en un recipiente de vidrio ámbar y mantenido a una temperatura de $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. En el momento de utilizarlo se dejó reposar hasta llegar a la temperatura ambiente.

6.4.2.- Muestra de referencia o “modelo” de chimó

Ya que debíamos ensayar diversas metodologías y compararlas entre sí, la primera etapa consistió en tratar de disponer de un estándar que nos pudiera servir como referencia de comparación entre resultados. Aunque los proveedores de reactivos comercializan estándares certificados de nicotina en tabaco, ninguno de ellos está disponible en una matriz tan compleja y con las características físico-químicas del chimó. En vista de ello se procedió a elaborar una muestra de referencia que, aunque no se conocía la concentración exacta de nicotina u otros parámetros de interés, nos pudiera servir como sistema de comparación entre las diferentes técnicas ensayadas.

Para la preparación de la muestra de referencia, se empleó la marca de mayor consumo y comercialización en el país: “*El Tigrito*”. Con el objetivo de disponer de suficiente cantidad se adquirió una porción conformada por 10 envases (latas metálicas) de 18 g cada una. Como no se garantizaba que las diferentes “latas” de chimó provenían del mismo lote, se procedió a combinarlas y homogeneizarlas. Esto último es de especial importancia, ya que, si bien es cierto que el chimó el Tigrito es elaborado a nivel semi-industrial todavía posee muchos procedimientos artesanales y ningún control de calidad.

Las “latas” fueron sometidas a un baño de vapor (calentamiento indirecto por convección térmica) para hacer el chimó más fluido, y de esta forma poder mezclarlos y homogeneizarlos. La muestra compacta de 180 g aproximadamente fue conservada en refrigeración hasta el momento de los análisis.

En lugar de denominarla muestra de referencia se decidió llamarla “*muestra modelo*” para evitar confusión con el término referencia, el cual es empleado en diversos conceptos y connotaciones. Hay que hacer notar, que los subsiguientes análisis fueron realizados previamente sobre la muestra modelo y una vez optimizados se efectuaron sobre las diferentes marcas de chimó.

6.4.3.- Acondicionamiento de las muestras

Aunque entre los objetivos del presente trabajo no se incluía el desarrollo u optimización de una técnica cromatográfica para la determinación de nicotina total en chimó, se participó extensamente en el desarrollo de la misma y especialmente en las medidas de nicotina total de las diferentes marcas de chimó. De la experiencia adquirida llevando a cabo estos análisis se tomaron ciertas precauciones, que sirvieron para el acondicionamiento y preservación de las muestras.

Se pudo observar que durante el desarrollo de los análisis para manipular la muestra modelo, había que someterla a calentamiento en baño de vapor con el objetivo de disponer de la cantidad requerida. Se notó que al emplear repetidamente este procedimiento, la muestra cambiaba su apariencia física. Se iba haciendo más viscosa y se observó una especie de vitrificación. Esto posiblemente se debe a la presencia de una cantidad significativa de azúcares, no hay que perder de vista que la base del chimó posee un alto contenido de melaza. Estos cambios en la composición original del chimó pudieran afectar los resultados sucesivos.

Con el fin de remediar la situación anterior, se decidió implementar una idea que surgió en la etapa de liofilización, cuyo objetivo era aumentar el área superficial (etapa que desarrollaremos más adelante). Para ello, una porción de la muestra modelo fue colocada entre dos rectángulos metálicos de superficies planas que previamente fueron cubiertas con laminas u hojas de polietileno, tal y como se muestra en la figura 14. Se colocó una porción de la muestra entre ambas superficies y se sometió a compresión en una prensa manual.

Las muestras laminadas de chimó quedan adheridas a las dos hojas de poliestireno y se mantienen refrigeradas hasta el momento de su análisis. Una fotografía de las muestras modelos laminadas se puede observar en la figura 15.

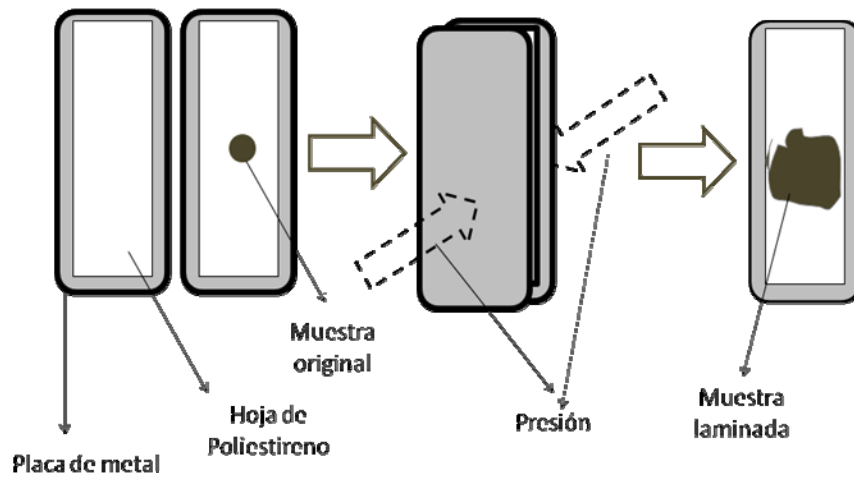


Figura 14.- Diagrama del proceso de laminado para una muestra de chimo.



Figura 15.- Fotografía de un grupo de muestras laminadas.

Para proseguir con los sucesivos ensayos, las muestras eran desprendidas de las láminas de poliestireno con una lanceta u hojilla.

A manera preventiva, para evitar la descomposición de las diferentes muestras de chimó, una vez adquiridas de los proveedores locales fueron cortadas en las fracciones aproximadas requeridas para los análisis y seguidamente laminadas. Se mantuvieron refrigeradas entre las dos láminas de poliestireno hasta el momento de

su análisis. Hay que resaltar que algunas muestras, especialmente aquellas poco viscosas y muy fluidas no requieren de este procedimiento de acondicionamiento.

6.4.4.- Método para la determinación de porcentaje de humedad

En un principio para la determinación de este parámetro y con fines prácticos, se empleó el método más rápido y directo descrito por la AOAC. 966.02, ^[39] calentamiento entre 60 y 70 °C. Sin embargo se consideró poco conveniente, ya que, debido a la naturaleza de la muestra (pasta muy viscosa) se debía aumentar mucho la temperatura para favorecer el secado total de la misma. Pero en estas condiciones de mayor temperatura tendía a descomponerse.

Seguidamente, se optó por la metodología usada por *Health Canada - Método oficial. Prueba T-301*, ^[38] basado en la liofilización (sublimación del agua a baja temperatura y vacío).

Cabe mencionar, que los primeros ensayos se realizaron sobre la muestra modelo sin laminarla. Se observó que para poder liofilizarla se requería de tiempos muy superiores a las 48 h. Esto fue nuevamente atribuible a la naturaleza altamente viscosa de la muestra, que impedía la salida de la humedad en la parte más interna de la pasta.

De forma sucesiva, se procedió hacer el ensayo sobre la muestra modelo laminada, que poseía una mayor área superficial. Los ensayos preliminares arrojaron una mayor eficiencia en el secado y en un tiempo razonable. Se obtuvo una muestra seca, inclusive muy fácil de pulverizar y sin rastros pastosos. Luego se llevó a cabo la optimización de la cantidad de muestra a emplear y el tiempo de liofilización.

El peso máximo óptimo correspondió a 1,0 g de muestra (aprox.), básicamente determinado por la disponibilidad de los envases en función de la mayor área superficial de la muestra laminada. Para los ensayos de los tiempos óptimos de liofilización, la muestra modelo fue previamente refrigerada en nitrógeno líquido por

un periodo de 5 a 10 min y seguidamente liofilizada a una temperatura de - 50 °C y una presión de vacío de 0,046 mbar. En las siguientes figuras se puede observar, la forma de refrigeración utilizada en esta metodología y la incorporación de la muestra en el liofilizador.



Figura 16.- Vial enfriado con nitrógeno líquido.



Figura 17.- Vial insertado en el liofilizador.

A pesar que en la mayoría de las muestras de carácter orgánico, la literatura recomienda un tiempo de liofilización de 48 h. Decidimos ensayar con tres tiempos correspondientes a 12, 24 y 48 h respectivamente. Para la determinación del porcentaje de humedad se empleó la expresión 1 y en la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{masa húmeda} - \text{masa seca}}{\text{masa húmeda}} 100 \quad [1]$$

Tabla 9. Tiempos de liofilización de la muestra modelo para determinar el % de humedad en tres intervalos de tiempo.

Tiempo (h)	12	24	48
% Humedad	5,6699	6,9358	8,2319
	6,2865	7,4563	7,7301
	6,5033	7,0586	7,8466
	6,0404	7,6624	8,1855
Promedio	6,1	7,3	8,0
s	0,4	0,3	0,3

Para probar si existen diferencias significativas en las determinaciones de humedad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA).^[49] En la tabla 10 se muestra el resumen del análisis ANOVA.

Tabla 10. Análisis de varianzas para porcentajes de humedad.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7,14	2	3,57	35,22	5,5E-05	4,26
Dentro de los grupos	0,91	9	0,10			
Total	8,06	11				

Debido a que el estadístico F experimental (35,22) es mayor que el valor crítico para F (4,26), se concluye que existen diferencias significativas en el % de humedad debida a los diferentes tiempos de liofilización. Sin embargo, el análisis ANOVA no indica entre cual o cuales de los grupos de datos existe la diferencia, por lo que fue necesario llevar a cabo una prueba adicional, conocida como la prueba de Diferencia Honestamente Significativa de Tukey (DHS).^[49]

DHS entre tiempos de 12 y 24 horas

$$\text{Estadístico: } Q = \frac{Y_{24h} - Y_{12h}}{\sqrt{\frac{CME}{n^*}}} = 7,59$$

$$\text{Valor crítico: } T_{\alpha} = Q_{\alpha}(p, f) \times \sqrt{\frac{CME}{n^*}}$$

P: es el número de tratamiento

F: es grados de libertad del CME

$$T_{\alpha} = Q_{0,05}(3,9) \times \sqrt{\frac{CME}{n^*}} = 0,62$$

(Ver apéndice 11.6 para detalles de la prueba).

Debido a que el estadístico Q (7,59) es mayor que el valor crítico T_α (0,62), se concluye que si existe diferencia significativa en la humedad debido a los tiempos de 12 y 24 h.

DHS entre tiempos de 24 y 48 horas

$$\text{Estadístico: } Q = \frac{Y_{48h} - Y_{24h}}{\sqrt{\frac{CME}{n}}} = 4,43$$

$$\text{Valor crítico: } T_\alpha = 3,95 \times \sqrt{\frac{0,10}{4}} = 0,62$$

Debido a que el estadístico Q (4,43) es mayor que el valor crítico T_α (0,62), se concluye que si existe diferencia significativa en el % de humedad debido a los tiempos de 24 y 48 h.

Entonces, se decidió utilizar como condición óptima el tiempo de liofilización de 48 h.

Una vez establecido el tiempo óptimo para la liofilización se procedió a realizar la determinación de la humedad en las diferentes marcas.

6.4.5.- Método para la determinación de pH

Para el desarrollo de este método se disponía de dos ensayos de referencia; la metodología empleada por: *Health Canada – Método oficial. Prueba T-310 (Determinación de pH en Tabaco)*.^[36] y la desarrollada por el *Centro de Control y Prevención de Enfermedades de USA (US-CDC). Protocolo Revisado para el Análisis de Nicotina, pH en Productos de Tabaco sin Humo*.^[37] Ambas referencias contienen procedimientos muy similares, por lo tanto, decidimos tomar en cuenta los aspectos relevantes de cada una de ellas, en especial aquellos que se adaptan mejor a la matriz del chimó. En detalle, el método desarrollado por *Health Canada*,

toma en cuenta el tiempo de agitación de la muestra, mientras que la metodología desarrollada por *US-CDC* lo obvia. En contraparte, la *US-CDC* sugiere que si el producto es analizado por primera vez se debe hacer un estudio de la variación de *pH* en el tiempo, mientras que *Health Canada* no lo aplica.

En primer lugar se procedió a realizar la calibración del *pH*-metro, usando para ello tres disoluciones buffer de *pH* 4,01; 7,00 y 10,01. Estas disoluciones fueron medidas a 25 °C.

La concentración de la disolución de la muestra de tabaco para la determinación de *pH*, es incierta, pero ambas referencias parten de una disolución al 10 % (p/vol). En función de ello se preparó una disolución de la muestra modelo de chimó, tomando 1 g de la muestra laminada en 10 mL de agua 18 mΩ.

Los ensayos de disolución y homogenización de la muestra al 10 % se realizaron en un baño de ultrasonido a temperatura ambiente. Se observó que a un tiempo de 4 min (aprox) la muestra estaba completamente disgregada y homogenizada. Hay que hacer notar, que la muestra modelo laminada se disgrega muy rápidamente en baño ultrasónico, hecho que no acontece en la muestra sin laminar. Se estableció un tiempo final de disgregación y homogenización de la disolución al 10 % de chimó de 5 min.

Seguidamente se realizó un ensayo para probar si existe variación del *pH* en el tiempo. Por lo tanto se realizaron las medidas a los 5, 15 y 30 minutos respectivamente. En la tabla 11 se muestran los resultados.

Tabla 11. Medición del *pH* de la muestra de referencia a tres intervalos de tiempo.

Tiempo (min)	5	15	30
<i>pH</i>	8,01	7,96	7,90
	7,97	7,96	7,91
	8,03	7,97	7,97
Promedio	8,00	7,96	7,93
S	0,03	0,01	0,04

La norma *US-CDC* establece que, si no existen diferencias mayores al 10 % en las medidas de *pH* se puede considerar que son parecidas. Por lo tanto, se decidió emplear el menor tiempo correspondiente a 5 min.

Con el método establecido se procedió a determinar el *pH* a todas las muestras de chimó.

6.4.6.- Método para la determinación de nicotina total

Es importante destacar que el método inicial para la determinación de nicotina total en chimó fue desarrollado en el Centro de Química Analítica (UCV) por Carrillo A. ^[42] Posteriormente, en el mismo centro y en un estudio realizado por Hernández J. ^[50], se trabajó en la optimización de ciertas condiciones operacionales del mismo. Sobre este último ensayo, hubo una extensa colaboración, especialmente en la determinación de la nicotina total de las diferentes marcas de chimó.

El método para la determinación de nicotina en chimó fue desarrollado en dos etapas: una correspondiente a las condiciones operativas del equipo de medida (cromatógrafo de gases) y otra relativa a la etapa del tratamiento de la muestra (extracción de la nicotina del chimó). A continuación se hará una descripción del método cromatográfico con estándares puros de cromatografía, seguidamente se describe el método de tratamiento empleando para la muestra modelo de chimó, y por último las condiciones operativas finales por la combinación de ambos procedimientos.

Condiciones operativas por cromatografía de gases

Se dispuso de un cromatógrafo con un detector de ionización a la llama, el cual dispone de un divisor de flujo en la cámara de inyección. Se empleó una columna capilar de polaridad baja, comúnmente empleada para propósitos generales, DB-5 de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor pelicular. El gas de arrastre fue nitrógeno de alta pureza. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C respectivamente. Se utilizó inyección manual de aproximadamente 1 μL de volumen de muestra, con una relación de división de flujo en el inyector de 10:5 y un flujo a la entrada de la columna de 2,5 mL/min.

Para el ajuste de las condiciones cromatográficas se empleó un patrón de nicotina recién destilado y se desarrolló un gradiente de temperatura de 100 a 250 °C a una rampa de 10 °C/min.

En la en la figura 18 se muestra un cromatograma de una corrida del patrón puro de nicotina y del estándar interno (heptadecano), ambos disueltos en cloroformo, llevado a cabo bajo las condiciones cromatográficas anteriormente descritas. El tiempo de análisis fue de 15 minutos más dos minutos de equilibrio, para un tiempo total por muestra de 17 minutos.

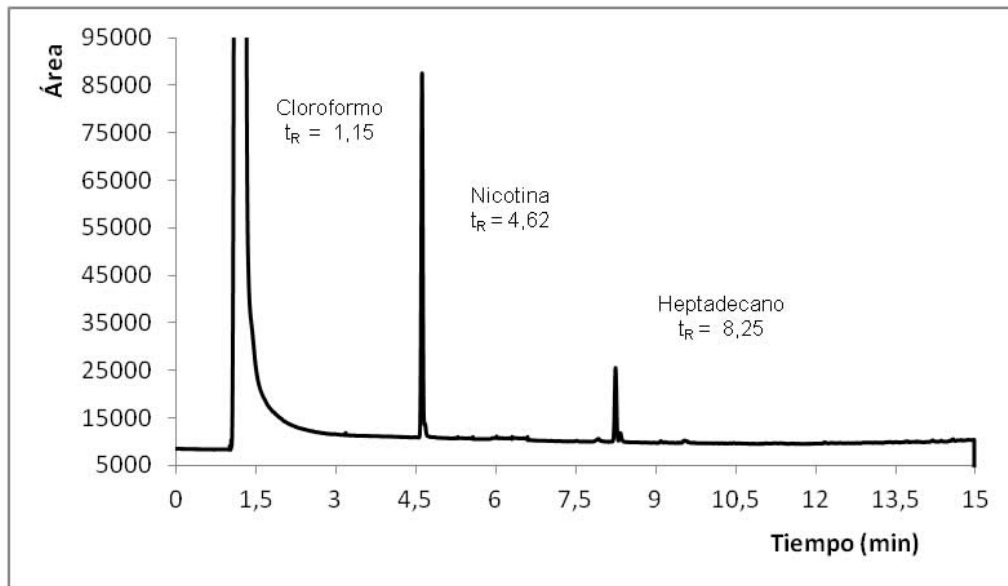


Figura 18.- Cromatograma de patrón de nicotina y el estándar interno.

La banda cromatográfica más significativa corresponde al solvente cloroformo con un t_R de 1,15 min, luego la nicotina la cual eluye con un t_R de 4,62 min y finalmente el estándar interno el cual poseen un t_R de 8,25 min.

De diversos ensayos realizados sobre extractos preliminares, se determinó un valor para el tiempo muerto (t_M) de 0,74 min, resultando un factor de retención (k) para la nicotina de 5,24.

La curva de calibración se realizó usando el método del estándar interno, para ello se prepararon una serie de patrones de nicotina entre 5 y 120 mg/Kg conteniendo cada uno 10 mg/Kg de heptadecano como estándar interno. Por cuestiones prácticas las diferentes concentraciones fueron preparadas por pesadas, es por ello que las disoluciones normalmente fueron reportadas en mg/Kg.

El estudio de la reproducibilidad cromatográfica medida bajo la relación de áreas, arrojó un CV del orden del 1,5 %, el cual se considera bastante satisfactorio.

Seguidamente se realizó la curva de calibración mediante un ajuste de regresión lineal por mínimos cuadrados. La curva ajustada se muestra en la figura 19 y el análisis de residuales en la figura 20.

Del ajuste de regresión lineal por mínimos cuadrados, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,9999, por otra parte, el análisis de residuales osciló entre - 0,04 y 0,04 aproximadamente, lo que indica que el método de mínimos cuadrados se ajusta bastante bien.

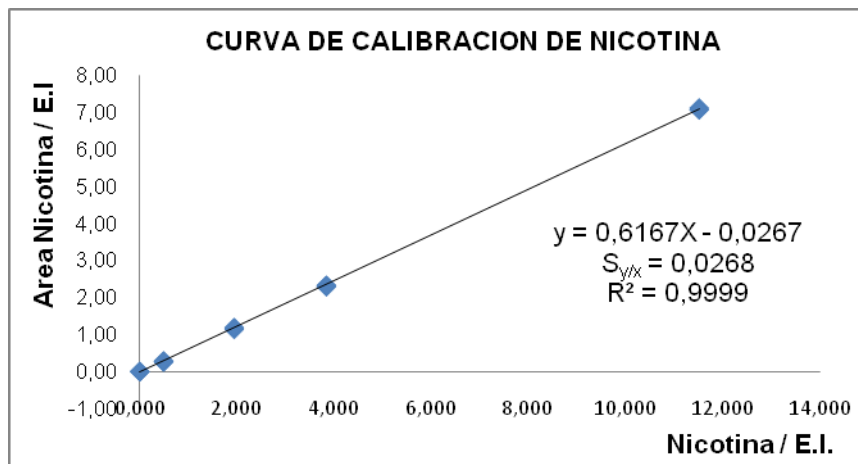


Figura.19.- Curva ajustada por regresión lineal por mínimos cuadrados

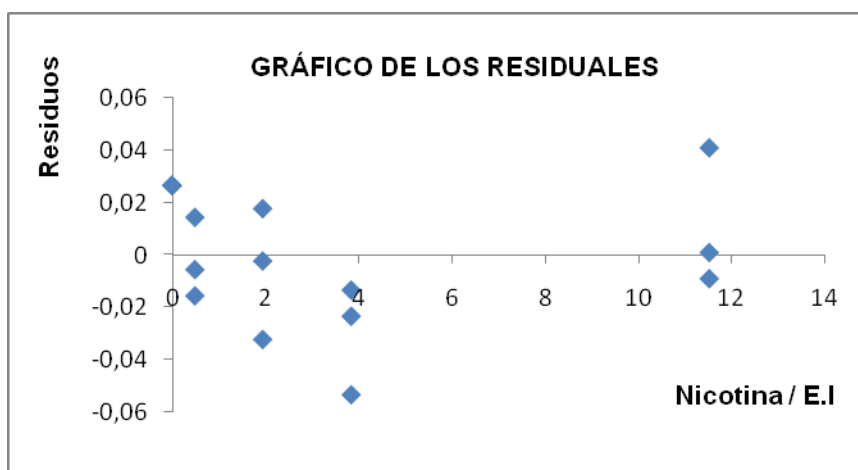


Figura 20.- Análisis de residuales

La ecuación de la recta fue $y = 0,6167x - 0,0267$, lo que indica que la sensibilidad de la técnica medida a través de la pendiente fue 0,6167. El error típico ($S_{y/x}$) fue 0,0268, el Límite de Detección (LOD, Limit of Detection) de la técnica de medida estuvo en el orden de 1 mg/kg y el Límite de Cuantificación (LOQ, Limit of Quantification) de 5 mg/Kg.

Método de tratamiento de muestra

En un tubo de ensayo para centrifuga se coloca 0,3 g de la muestra laminada (0,1 mg de precisión) y se adicionan 10 g (0,1 mg de precisión) de una disolución acuosa de hidróxido de potasio al 5 % (p/v), y es asistida con ultrasonido por un periodo de 15 min. Luego de esto, se obtiene una especie de emulsión compuesta por una disolución acuosa con una alta proporción de los componentes solubles del chimó (entre ellos la nicotina) y una cantidad de sólidos en suspensión.

La suspensión es centrifugada a 5000 rpm durante 15 min, de esta manera los sólidos se depositan en el fondo del tubo.

Con extremo cuidado, a manera de no perturbar el sistema se toma una alícuota de 5 g del sobrenadante (0,1 mg de precisión). Se coloca en otro tubo de ensayo y se le adiciona 14 g de cloroformo (0,1 mg de precisión). Se somete a ultrasonido por 15 min y se deja reposar por 2 h. La nicotina es extraída a la capa orgánica.

Una vez que se observa la separación de ambas capas y con las condiciones cromatográficas descritas en la sección anterior, se inyecta 1 μ L (aprox.) de la capa orgánica en el cromatógrafo.

Un cromatograma del extracto de nicotina de la muestra modelo, proveniente del procedimiento de tratamiento de muestra se detalla en la figura 21.

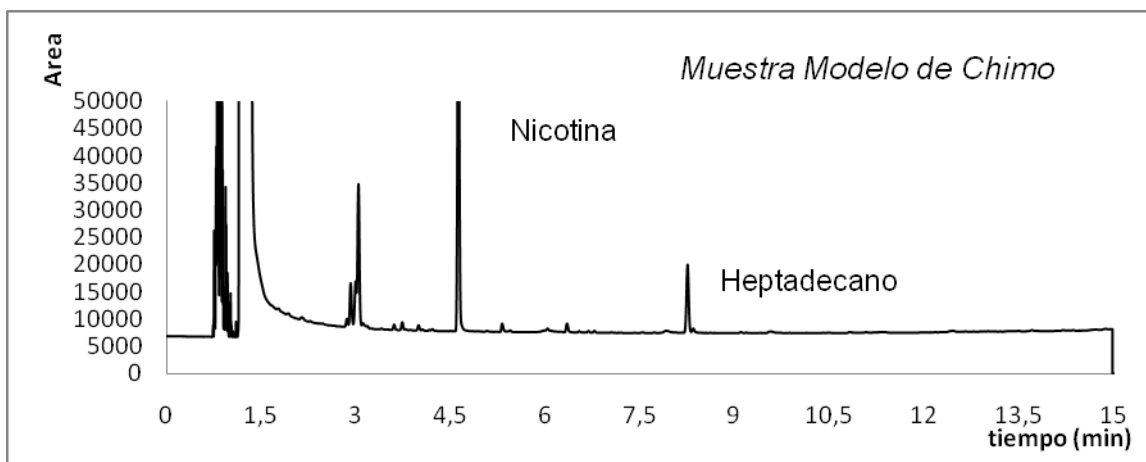


Figura 21.- Cromatograma de un extracto de muestra con el ensayo cromatográfico.

Las pequeñas bandas observadas entre la nicotina y el estándar interno se deben posiblemente a los alcaloides minoritarios que han sido reportados en esta zona.

Por otra parte, una serie de bandas que aparecen alrededor del t_R del cloroformo son de compuestos desconocidos.

El tiempo total del tratamiento de muestra, sin tomar en cuenta el análisis cromatográfico fue de 2 1/2 horas.

Evaluación del Método de Tratamiento de Muestra – Determinación Cromatográfica

Reproducibilidad

Para el estudio de la reproducibilidad de la metodología completa (tratamiento de muestra - determinación cromatográfica) se emplearon tres réplicas de la muestra modelo. Se sometieron al procedimiento de extracción y seguidamente inyectadas al cromatógrafo. Se encontró un valor promedio de 8,6 mg/g con un coeficiente de variación del 4 %.

No hay que perder de vista que la reproducibilidad del método cromatográfico por si solo fue del 1,5 %, pero al incluir la metodología de tratamiento de muestra aumentó a 4 %. Es razonable y se considera bastante satisfactorio.

Determinación del porcentaje de recuperación

Ya que no se dispone de un estándar certificado para poder medir la exactitud del método, se procedió a determinar el porcentaje de recuperación. El ensayo contempló la contaminación de la muestra modelo con un estándar de concentración conocida.

Para ello un peso determinado de la muestra modelo, se le añadió una alícuota de una concentración conocida de nicotina. Se homogenizó y se dejó reposar por una hora, para luego someterla al procedimiento de extracción y medida. Se empleó la siguiente expresión:

$$\% R = \frac{M_{total} - M_{nativa}}{M_{spike}} 100 \quad [7]$$

Donde %R es el porcentaje de recuperación, el cual corresponde a una medida de exactitud, M_{total} es la cantidad total de nicotina medida, M_{nativa} es la cantidad inicial de nicotina en la muestra modelo y M_{spike} es la cantidad de nicotina añadida a la muestra modelo.

Los resultados arrojaron que la exactitud del método medido a través del porcentaje de recuperación fue del orden del 85 %.

Estimación del LOD y LOQ

Partiendo del hecho que el límite de detección de la técnica de medida fue de 1 mg/kg y que el método de tratamiento de muestra establece que dicho valor debe ser obtenido en los 14 g del extracto final. Por consiguiente, debe haber 0,014 mg de nicotina en dicha cantidad de extracto.

Por otra parte, esos 0,014 mg fueron extraídos de los 5 g de la disolución de hidróxido de potasio que estuvo en contacto con el cloroformo. Pero, como se emplearon 10 g de la disolución de hidróxido de potasio, implica que la cantidad total extraída de nicotina fueron 0,028 mg.

Los 0,028 mg deben provenir de 0,30 g de muestra. Por lo tanto el LOD obtenido es del orden de los 0,1 mg/g. Si a ello consideramos que solo podemos recuperar el 85 % de 0,1 mg/g, el LOD quedó en el orden aproximado de los 0,11 mg/g.

De la misma manera, partiendo del hecho que el LOQ de la técnica de análisis es de 5 mg/kg, el mismo cálculo anterior realizado sobre la metodología tratamiento de muestra-medida, correspondió a un valor del LOQ de 0,55 mg/g.

Los valores del LOD y el LOQ obtenidos se consideran satisfactorios, ya que ensayos preliminares sobre chimó arrojan valores promedios de nicotina al menos 10 superiores.

El tiempo total del ensayo completo (tratamiento de muestra-medida cromatográfica) es de aproximadamente 3 1/2 a 4 h. Sin embargo, es factible el análisis en "batch", lo cual permite analizar muchas muestras en ese mismo tiempo.

Seguidamente se procedió a la determinación de nicotina total en las otras marcas nacionales.

6.4.7.- Determinación de la nicotina libre

El análisis de la sección anterior se refiere a la determinación de la nicotina total, no corresponde a un análisis de especiación química de la misma. Esto cobra relevancia, ya que hay autores ^[22,40] que califican a la nicotina libre como la mayor causante de la adicción al tabaco, debido a su mayor “capacidad de absorción” por parte del organismo. No obstante, este punto de vista tiene sus detractores ^[18]. Sin embargo, mientras la controversia de este asunto es dilucidado, no deja de ser importante la determinación de la nicotina libre.

No hay que perder de vista que la nicotina está formada por dos heterociclos, uno de estos forma parte de un anillo sustituido de piridina y el otro de un anillo de pirrolidina. La parte pirrolidínica posee un pka 8,02 y la piridínica un pka 3,12. En la figura 10 de la sección de introducción, se muestra el equilibrio ácido-base de ambas especies de la nicotina.

A un pH elevado la molécula se encuentra en su forma no ionizada, conocida como nicotina no protonada o libre (N_{libre}). En la medida que disminuye el pH se protona en primer lugar la parte pirrolidínica de la molécula y conforme continua disminuyendo el pH se protona también la parte piridínica.

A pH intermedios, entre 5 y 8 se establece un equilibrio entre las especies esquematizadas en la figura siguiente, cuyo pKa está en el orden 8,02. ^[17]

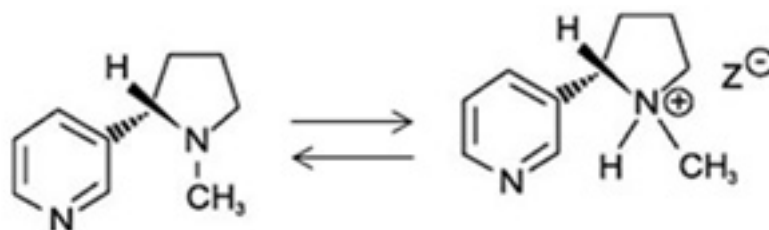
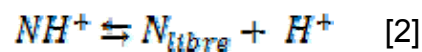


Figura 22.- Equilibrio ácido-base de la nicotina libre y la nicotina protonada una vez. ($pka = 8,02$)

Para la determinación de la nicotina libre, es necesario el uso de la ecuación de Henderson- Hasselbalch (HHE por sus siglas en ingles), la cual está conformada en

base a dos variables importantes, el pK_a y el pH . Para entender mejor lo anterior, vamos a desarrollar las expresiones empleadas en la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

El equilibrio químico entre la nicotina protonada (NH^+) y la nicotina libre (N_{libre}) se establece con la siguiente expresión:



Donde la constante de equilibrio de la especie NH^+ viene dada por:

$$K_a = \frac{[N_{libre}][H^+]}{[NH^+]} = 9,54 \times 10^{-9}$$

$$[H^+] = \frac{K_a [NH^+]}{[N_{libre}]}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[N_{libre}]}{[NH^+]}$$

$$\frac{[N_{libre}]}{[NH^+]} = 10^{(pH - pK_a)} \quad [3]$$

Por otra parte: $[N_{total}] = [N_{libre}] + [NH^+]$ [4]

Sustituyendo 4 en 3:

$$\frac{[N_{libre}]}{[N_{total}] - [N_{libre}]} = 10^{(pH - pK_a)}$$

$$[N_{libre}] = 10^{(pH - pK_a)} [N_{total}] - 10^{(pH - pK_a)} [N_{libre}]$$

$$[N_{libre}] = \frac{10^{(pH - pK_a)} [N_{total}]}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} \quad [5]$$

El porcentaje de nicotina libre se expresa como:

$$\%N_{\text{libre}} = \frac{N_{\text{libre}}}{N_{\text{total}}} \times 100 \quad [6]$$

Combinando la expresión 3 con la 6 se obtiene:

$$\% [N_{\text{libre}}] = \frac{10^{(pH-pKa)} 100}{1+10^{(pH-pKa)}} \quad [7]$$

La expresión 7 es empleada comúnmente para la determinación del % de nicotina libre, en función del pH y el pKa .

Sin embargo, la ecuación Henderson- Hasselbalch, puede verse influenciada por efectos de la fuerza iónica, causado por una gran cantidad de iones desconocidos que son incorporados en los medios donde son medidos (efecto de la matriz). Para establecer de qué forma afecta la fuerza iónica en dicha ecuación, se debe proceder a realizar un estudio de las variables que la modifican.

Por lo tanto, en nuestro caso en particular, es de gran relevancia destacar que para determinar la cantidad de nicotina libre presente en el chimó, fue necesario hacer un estudio del efecto matriz que produce este derivado del tabaco sobre la ecuación de Henderson- Hasselbalch. Se decidió estudiar este efecto en colaboración con el Centro de Equilibrios en Solución adscrito a la Escuela de Química de la UCV.

Influencia de la fuerza iónica en la ecuación de Henderson- Hasselbalch

De las variables que se consideran en la ecuación de Henderson- Hasselbalch, el pKa es el que presenta mayores complicaciones, pues como es bien sabido, ^[55, 56] el pKa de cualquier especie es dependiente de la fuerza iónica del medio, y si consideramos que durante la preparación del chimó son incorporadas una cantidad abundante de sales, así como de otros componentes podemos presumir que utilizar

en dicha ecuación, el valor de pK_a reportado en la bibliografía acarrearía un gran error.

El concepto de fuerza iónica fue introducido la primera vez por Gilbert N. Lewis y Merle Randall, ^[52,53,54] definiendo la fuerza iónica (μ) de una disolución, como la semisuma de los productos de la concentración (c) de cada uno de los iones, por el cuadrado de su carga (z), expresión 8. Este concepto se usa para tener en cuenta la contribución de la fuerza electrostática, de la cantidad de los iones de todo tipo presentes en una disolución.

$$I = \frac{1}{2} \sum_n c_i z_i^2 \quad [8]$$

La teoría de Debye-Hückel, ^[53] relacionan teóricamente los coeficientes de actividad con la fuerza iónica según se indica en la ecuación 9, y desde entonces muchos trabajos han intentado mantener constante los coeficientes de actividad mediante el uso de soluciones con valores altos y constantes de fuerza iónica. Esto permite que sea posible utilizar concentraciones en lugar de actividades en las expresiones termodinámicas (ver expresiones 11 y 12), como la ley de masas y la ecuación de Nernst. Siempre y cuando se mantengan las concentraciones de las especies reaccionantes mucho más bajas que la concentración del medio iónico inerte.

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{-0,5091 \sqrt{\mu} |Z_+ * Z_-|}{1 + \sqrt{\mu}} \quad [9]$$

La actividad de una especie i se define mediante la expresión del potencial químico (ver expresión 11), siendo μ_i el potencial químico, c , es la concentración en equilibrio de i , γ_i su coeficiente de actividad y μ_i^0 es una constante que define la escala de actividades. ^[53]

$$a_i = e^{\frac{\mu_i^0}{RT}} \cdot e^{\frac{\mu_i}{RT}} = \gamma_i c \quad [10]$$

En la figura 23, se muestra de forma comparativa, como varia el coeficiente de actividad en función del logaritmo de la fuerza iónica, para iones de cargas ± 1 , ± 2 , ± 3 con igual tamaño (600 pm).

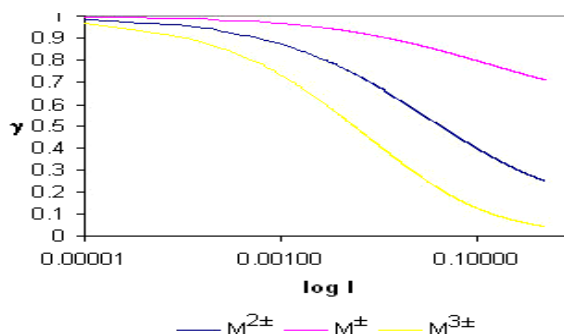
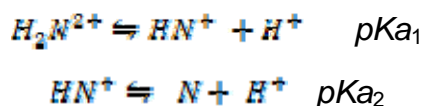


Figura 23.- Variación del coeficiente de actividad en función del logaritmo de la fuerza iónica para iones con cargas ± 1 , ± 2 y ± 3 con igual tamaño de 600 pm

Mientras mayor es la carga del ion, mayor es el efecto de la fuerza iónica sobre el coeficiente de actividad.

Luego de aclarar que los coeficientes de actividad permanecen constantes cuando se utiliza el método del medio iónico (siempre concentraciones de los reactivos y productos se mantengan por debajo del 20% de la concentración del medio iónico). Se usan las reacciones de protonación de la nicotina y los balances de masa de la misma, para determinar los valores de la constante de formación, con sólo medir la concentración en equilibrio de H^+ :



Una de las herramientas primordiales en la determinación de constantes de formación es el uso de funciones de formación, que además permiten dar una mejor interpretación a los resultados experimentales. La primera función que definiremos

es θ_C , la cual es el número medio de moles de protones asociados por mol de ligando mostrada en la ecuación 11, mientras que la función que define el número de protones disociados por mol de nicotina la llamaremos Z_C la cual se muestra en la expresión 12:

$$\theta_C = \frac{H-h+a}{c} \quad [11]$$

$$Z_C = \frac{h-H-a}{c} \quad [12]$$

Donde H es la acidez, h la concentración de protones en equilibrio, C la concentración total de nicotina y a la actividad.

A fin de interpretar las curvas $\theta_C(pH)$ ó $Z_C(pH)$, tomaremos un ejemplo sencillo, mostrado en la figura 24. Consideremos el caso de un ligando del tipo H_2C , el cual posee dos reacciones de desprotonación caracterizadas por sus correspondientes valores de pK_{a1} y pK_{a2} , tal como lo exhibe la nicotina.

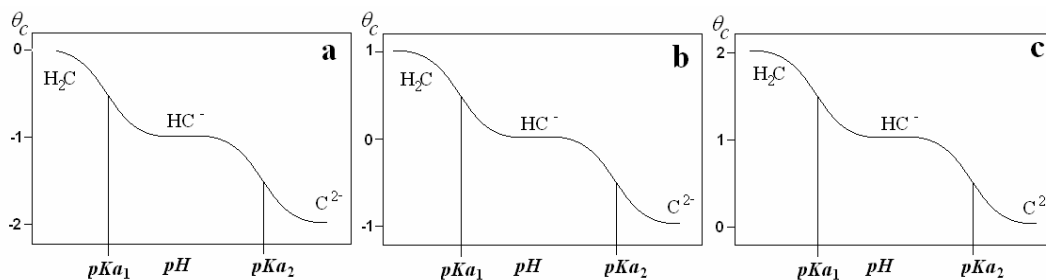


Figura 24.- Diagrama $\theta_C(pH)$ para un ligando del tipo H_2C . Caso: a) datos de $\theta_C(pH)$, nivel H_2C , b) datos de $\theta_C(pH)$, nivel HC^- y c) datos $\theta_C(pH)$, nivel C^{2-} .

Estos diagramas describen el comportamiento del ligando en diferentes niveles cero de protones, el caso (a) considera la pérdida sucesiva de dos protones en el nivel H_2C , θ_C tiende a -2, en el caso (b) en el nivel HC^- , θ_C tiende a -1, y finalmente en el caso (c) en el nivel C^{2-} donde θ_C tiende a 0.

Los diagramas anteriores muestran la correspondencia del número de protones asociados o disociados a lo largo de toda la región de pH . Los puntos de inflexión que presentan las curvas, cuando $\theta_C = (\theta_C + 1/2)$, representan los valores de pK_a , de cada paso.

En vista a lo anteriormente planteado, respecto a la importancia de la evaluación de θ_C , se llevó a cabo un estudio de la constante de acidez de la nicotina pura en un medio estándar y nicotina pura en el medio de chimo (muestra modelo).

Evaluación de las constantes de acidez de la nicotina

Para la determinación de la constante de acidez de la nicotina en cualquier medio debe previamente calibrarse el electrodo a través de la ecuación de Nerst:

$$E = E_0 - 59,154 \log h + j/h \quad [13]$$

Donde E es el potencial medido empleando medidas de fuerzas electromotrices (emf), E_0 y j , el potencial en condiciones estándar y el potencial de la unión líquida respectivamente, ambas son constantes las cuales no pueden ser determinadas de forma independiente.

Para ello, se realizó una titulación ácido fuerte (HCl) base fuerte (NaOH) en una corriente de gas inerte (nitrógeno). Se midió el potencial (mV) a 25 °C, con el objeto de determinar los parámetros E_0 y J de la ecuación 13. Un esquema del montaje realizado se muestra en la figura 25.

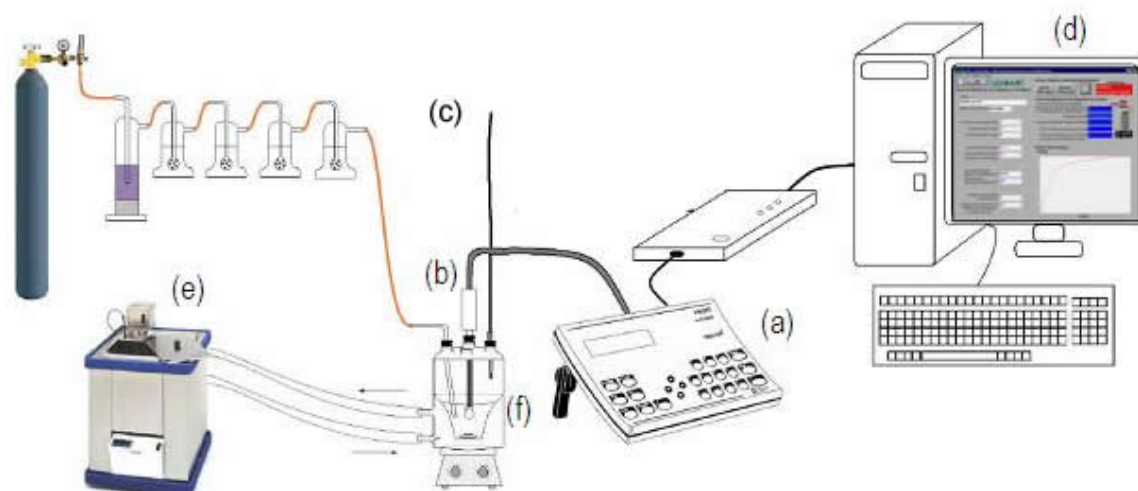


Figura 25.- Esquema del equipo de medida de potencial. (a) *pH*-metro, (b) electrodo de vidrio, (c) bureta, (d) sistema de adquisición de datos, (e) baño termostático, (f) reactor.

Los valores de E_o y j , son posteriormente corregidos empleando el programa computacional, mediante un ajuste por mínimos cuadrados e interacción matemática (LETAGROP).^[57]

Luego en una segunda etapa, se adicionó un volumen dado de una disolución de concentración de aproximadamente 40 mM de nicotina, usando como medio iónico cloruro de sodio (0,1 M). Se incorporó además una cierta cantidad del ácido y se procedió a titular con la base.

Con este procedimiento se obtuvo el diagrama $\theta_M(pH)$ (donde θ_N es el número medio de moles de protones asociados por mol de nicotina) para un ligando del tipo N, midiendo los potenciales en cada adición de la base.

Una vez obtenidos los datos del estudio del sistema H_2N fueron, analizados mediante el programa computacional LETAGROP, minimizando la función θ_N . El resultado de esto es la curva de $\theta_M(pH)$ mostrado en la figura 26, y el correspondiente diagrama de distribución de especies obtenidas para la nicotina en la figura 27.

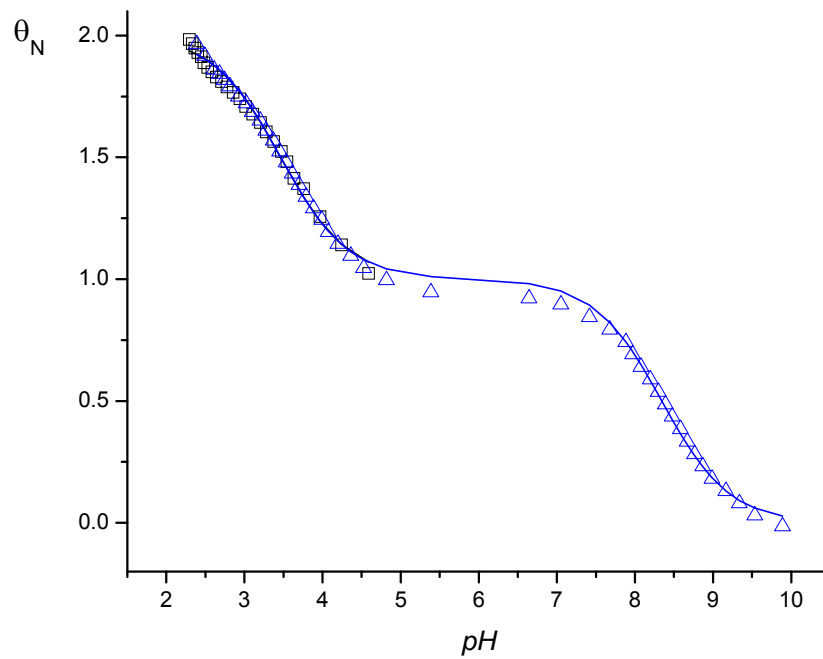


Figura 26.- Curva $\theta_N(pH)$ para la nicotina, obtenida utilizando NaCl 1,0 M como medio iónico a 25 °C, mediante $emf(H)$.

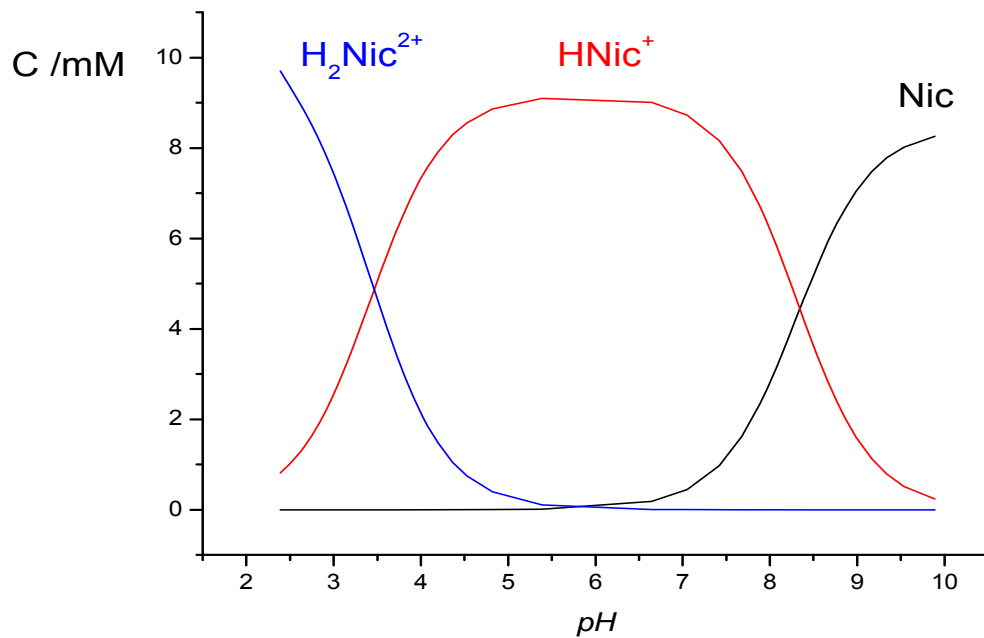


Figura 27.- Diagrama de distribución de especies para la nicotina, obtenida utilizando NaCl 1,0 M como medio iónico a 25 °C, mediante $emf(H)$.

En las curvas $\theta_N(pH)$ se muestran un buen ajuste entre el modelo propuesto (línea continua) y los datos experimentales (puntos), el modelo propuesto se resume en la tabla 12.

Tabla 12. Valores de constantes de acidez obtenidas para la nicotina en NaCl 1,0 M a 25°C

Reacción	$\log \beta_{pq}$	<i>pKa</i> modelo teórico		<i>pKa</i> experimentales
		<i>pKa</i> ₁		
$N + H^+ \rightleftharpoons HN^+$	$8,5 \pm 0,1$	<i>pKa</i> ₁	$4,5 \pm 0,2$	$3,36 \pm 0,08$
$N + 2H^+ \rightleftharpoons H_2N^{2+}$	$13,0 \pm 0,1$	<i>pKa</i> ₂	$8,5 \pm 0,1$	$8,33 \pm 0,04$
<i>Dispersión</i>			0,12	

Donde los puntos en el grafico de la figura 26, representan los valores de θ_N encontrados experimentalmente y la línea continua sobre los puntos representa el valor de teórico de θ_N^* , la cual es una función que depende de h y de las constantes de acidez de la nicotina (*pKa*₁ y *pKa*₂). Al estar θ_N^* sobre los puntos (sobre θ_N) indica que las constantes usadas para la expresión teórica, coinciden con las constantes reales del sistema experimental. Donde los valores de *pKa*₁ y *pKa*₂ obtenidos experimentales para la nicotina son $3,36 \pm 0,08$ y $8,33 \pm 0,04$ respectivamente.

Mientras que el grafico de la abundancia de la nicotina (figura 27). Se observa la distribución de las especies de nicotina tanto protonada como desprotonada, donde los puntos de intersección de las curvas corresponden a los *pKa*₁ y *pKa*₂ obtenidos experimentalmente.

También en la figura 28 se puede observar el correspondiente diagrama de distribución de especies obtenidas para la nicotina expresada en función de la concentración de nicotina $C_{(mg/g)}(pH)$.

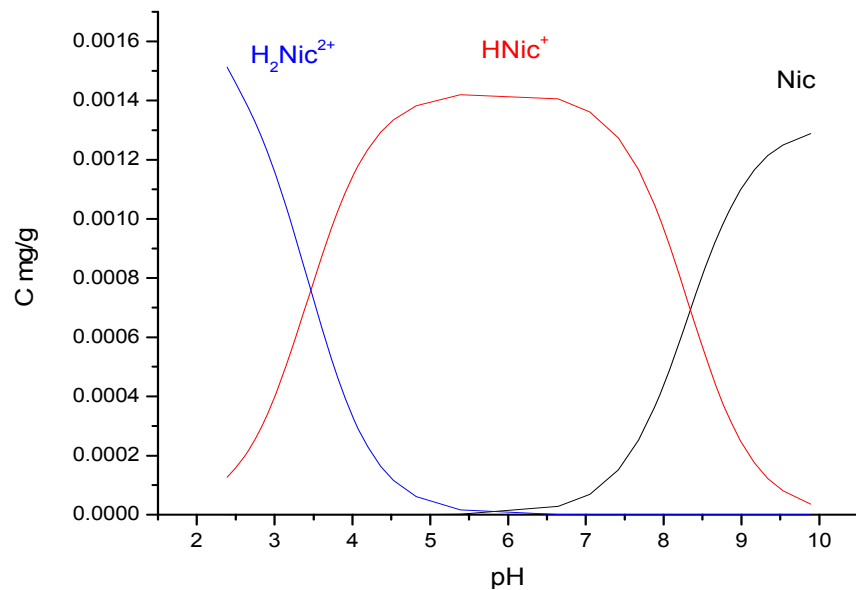


Figura 28.- Diagrama de distribución de especies para la nicotina, obtenida utilizando NaCl $3,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ como medio iónico a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, mediante $emf(H)$.

Seguidamente se le incorporó a al sistema Nicotina en NaCl (0,1 M) cantidades variables de la matriz a estudiar, el chimó y se procedió a repetir el procedimiento anteriormente descrito.

El grafico 29 se evidencian desplazamientos en la curva $\theta_N(pH)$ producida por el efecto matriz resultante de la adición de distintas cantidades de la muestra de modelo a la nicotina pura en NaCl (0,1 M).

El resultado obtenido es un gran desplazamiento de la curva θ_N a medida que se incorporan mayores cantidades de la matriz de chimó en el medio. Hecho que demuestra que existen otras especies básicas presentes, las cuales son capaces de protonarse.

Todo, lo anterior sugiere que, utilizar la ecuación de Henderson- Hasselbalch en sistemas tan complejos como este, sin considerar el efecto del medio sobre el pKa trae consigo mucho error.

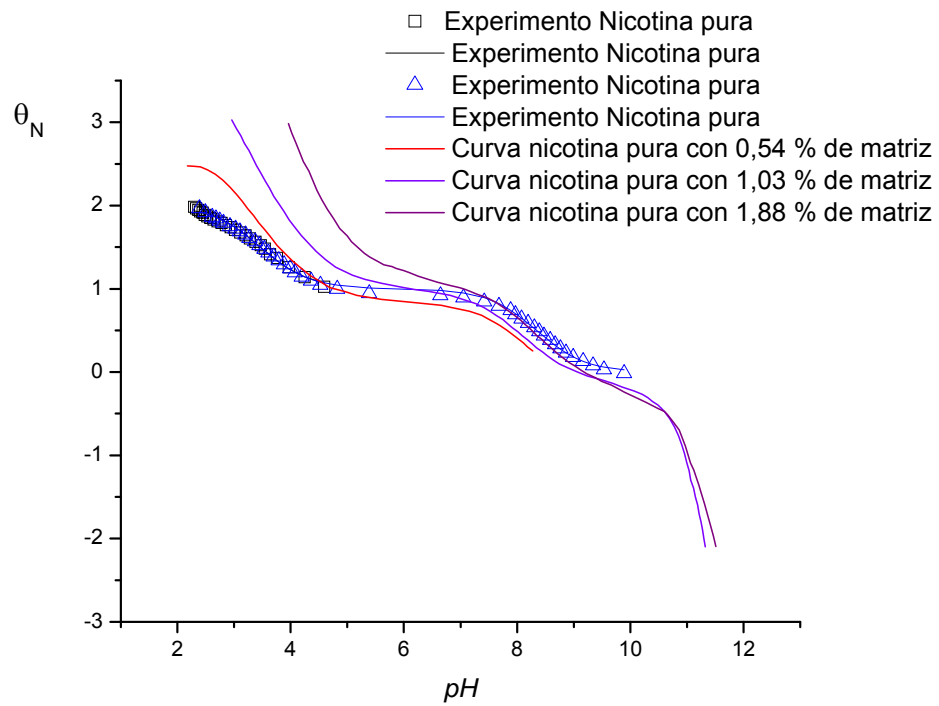


Figura 29.- Curva $\theta_N(pH)$ para la nicotina, obtenida utilizando NaCl 1,0 M como medio iónico a 25 °C, mediante $emf(H)$ y cantidades de matriz de chimó de 0,54%; 1,03%; 1,88%.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1.- Determinación del porcentaje de humedad

La mayoría de las marcas de chimó, tuvieron que ser laminarlas para poderlas liofilizar, de lo contrario los tiempos de análisis eran exageradamente largo. Esto se atribuye a la gran viscosidad de las mismas, que impedía que el contenido de humedad en la parte interna de la “bola” de muestra, fuese extraída con facilidad. Al laminar las muestras se aumentaba considerablemente el área superficial favoreciendo el secado.

La metodología experimental para el análisis de porcentaje de humedad en muestras de chimó quedó establecida de la siguiente manera:

- La muestra debe ser previamente laminada por compresión con una prensa manual y mantenida refrigerada entre dos láminas de poliestireno hasta el momento de ser analizada.
- En un vial de liofilización seco, se pesa 1 gramo de muestra (0,1 mg de precisión)
- Previo a la liofilización, la muestra es enfriada en nitrógeno líquido por 5 minutos.
- Se liofiliza por 48 horas a una temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una presión de 0.046 mbar.
- Se lleva a temperatura ambiente en un desecador y se pesa la muestra (0,1 mg de precisión).
- Se determina el % de humedad por diferencia de pesos.

El porcentaje de humedad obtenido para cada muestra de chimó se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Porcentaje de humedad de distintas marcas de chimó

Marca	% de humedad	S	CV
San Benito bolsita	9,9	0,4	4
San Benito caja	10,0	0,3	3
Chain	8,3	0,4	4
Tigrito Ice	7,6	0,5	7
Matheus	8,1	0,4	5
Matheitos	6,1	0,1	2
El Aguila	10,2	0,4	4
Taparo	8,0	0,2	3
La Chinata	9,4	0,4	4
Trigrito II	8,5	0,1	1
Tigrito modelo.	7,9	0,2	3

Los valores de humedad de las diferentes marcas analizadas están en un rango de 6 a 10 %. La diferencia de humedad entre cada uno de estos productos se debe probablemente a las diferencias en la preparación de cada fabricante. Además, se pudo observar (aunque no es el objetivo de este estudio), que para una misma marca la humedad puede variar en distintos lotes. Esto se atribuye a que el proceso de producción de este derivado del tabaco es bastante artesanal y es muy variable la cantidad de agua que se pierde por efecto de la evaporación en el proceso de cocción.

Tal como se muestra en la tabla 13, las marcas con mayor porcentaje de humedad fue El Águila y San Benito, esto concuerda con su apariencia física, ya que estos chimó tenían un aspecto bastante fluido con respecto a los demás y debido a ello su manejo era bastante engorroso. Estos chimós tenían que laminarse en el momento del análisis e inmediatamente congelarlo con nitrógeno líquido.

7.2.- Valores de *pH* medidos para distintas marcas de chimó

Se realizaron los análisis de determinación de *pH* a tiempos de % min. La metodología para esta determinación se aplicó para obtener los valores de *pH* en cada marca de chimó consumida en el país las cuales se muestran en la tabla 14, y dicha metodología quedo establecida tal como muestra a continuación. .

- Se preparó una solución al 10% p/v, pesando en un recipiente de poliestireno una cantidad de 1g aprx. de la muestra y adicionando 10 mL de agua desionizada.
- Se homogeneizó la solución durante un tiempo de 5 minutos en ultrasonido.
- Se midió en *pH* a los 5 minutos de reposo de la muestra.

Tabla 14. Valores de *pH* para distintas marcas de chimó.

Muestra	<i>pH</i> ($\pm 0,07$)
	5 min
San Benito Bolsita	7,33
San Benito Caja	6,38
Chain	9,84
El Tigrito Ice	7,87
Matheus	9,26
Matheitos	9,27
El Aguila	9,67
Taparo	8,60
Chinata	9,44
Tigrito II	7,76
Tigrito Modelo	8,00

La obtención del *pH* para cada marca es de vital importancia en la determinación de la nicotina libre, ya que ésta depende estrechamente del valor de esta variable. Era de esperarse que los *pH* de los extractos acuosos de varias de las marcas tendieran a ser básicos, tal como se muestra en la tabla 14. La mayoría de las marcas poseen un *pH* básico, a excepción de San Benito caja, el cual presenta un *pH* ácido mientras

que San Benito bolsita, Tigrito ice y Tigrito II, presentan un pH que tiende a la neutralidad.

Es muy posible que las causas por las cuales las distintas marcas exhiben pH básicos, se deba a la incorporación de distintos tipos de sales básica, tales como: carbonatos, cal, sal de Urao, cenizas, etc. Así como otros aditivos que puedan incrementar los niveles de pH . Es evidente que San Benito caja pudiera contener pocos, o no contener aditivos que pudieran incrementar su valor de pH .

Algunos autores, ^[20] hacen referencia acerca de la manipulación de pH , es decir, la incorporación de aditivos químicos en la manufactura de los productos de tabaco, con el fin de aumentar el consumo de los mismos, ya que alegan que al incrementar el pH dichos productos son más fuertes y aumenta la cantidad de nicotina libre, lo cual los hace mas adictivos, pero es imposible comprobar dichas afirmaciones. Aun no existen estudios con lo que respecta al chimó, que relacionen la dependencia a dichos productos con el pH .

7.3.- Determinación de la concentración de nicotina total obtenida por cromatografía de gases

Fueron analizadas 11 marcas fabricadas y distribuidas en el territorio nacional. Se realizaron tres réplicas para cada una de las muestras bajo el procedimiento ya establecido ^[50] y cada una de estas se inyectó por triplicado. Las cantidades de nicotina total reportados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Concentración de Nicotina obtenido en algunas de las marcas de chimó

Marca	Concentración Promedio de nicotina total (mg/g)	S	CV
San Benito Bolsita	16,8	0,8	5
Benito caja	23,4	0,8	3
Chain	3,4	0,1	3
Tigrito Ice	7,9	0,2	3
Matheus	15,5	0,5	3
Matheitos	11,8	0,4	3
El Águila	9,6	0,3	3
Taparo	8,7	0,3	4
La Chinata	25,7	0,8	3
Tigrito 2	9,4	0,3	3
Tigrito ref.	8.6	0.4	4

Se encontró que la concentración de nicotina en las diferentes marcas presentó una variación en un rango de 3 a 26 mg/g aproximadamente, sin embargo no se encontraron especificaciones de la cantidad máxima de nicotina permitida para estos derivados de tabaco.

En contraste, tanto en los Estados Unidos como en Europa los valores establecidos como permitidos son de un máximo de 1 mg de nicotina por cigarrillo. El cigarrillo de mayor consumo nacional (Belmont) tiene un peso promedio de aproximadamente 0,84 g, de los cuales 0,62 g corresponden al tabaco puro (picadura), y el resto corresponde al papel y el filtro.

Lo que quiere decir, que si dicho cigarrillo posee la cantidad de nicotina máxima permitida implica que un cigarrillo debe tener 1 mg de nicotina en los 0,62 g del tabaco. En conclusión el máximo permitido de nicotina para dicho cigarrillo sería de 1,6 mg/g aproximadamente.

Partiendo del hecho que la bolita de chimó ingerida normalmente tiene un peso de 0,5 g, haciendo el análisis anterior tendríamos que el máximo permitido en el chimó

debería ser de 2 mg/g. Asumiendo que se consume 0,5 g cualquiera de las marcas analizadas, todas estas están por encima del valor permitido.

Como dato adicional, según la United State Department of Health and Human Service, un cigarrillo posee generalmente de 8 a 20 mg de nicotina y en promedio el fumador absorbe de 1 a 2 mg de nicotina para el tabaco fumado.

7.4.- Determinación de la cantidad de nicotina libre obtenida por la ecuación de Henderson- Hasselbalch

Se partió de la ecuación de HHE para obtener la nicotina libre, contenida en cada una de las marcas que se analizaron previamente por cromatografía de gases.

Mediante el empleo de las ecuaciones obtenidas en la sección 6.4.7 y junto con los valores de pH , usando el valor experimental del segundo pK_a obtenidos para cada marca, se calculó en primer lugar el porcentaje de nicotina libre. Con este porcentaje y la nicotina total determinada por GC, se calculó la cantidad de nicotina libre expresada en mg/g para cada muestra de chimó. Estos valores se encuentran reportados en la tabla 16.

La marca con mayor porcentaje de nicotina libre es Chain, sin embargo la nicotina total contenida en este producto es de 3,4 mg/g. Aunque casi todo el contenido de nicotina esté en forma libre, como éste no posee gran cantidad de nicotina total, la concentración de nicotina libre que este presenta es una de las más bajas. A diferencia de La chinata que aunque no presenta el mayor porcentaje de nicotina libre su contenido de nicotina total es de 25,7 mg/g, lo cual lo convierte en el producto con mayor cantidad de nicotina libre analizado.

Tabla 16. Concentración de Nicotina libre obtenido en algunas de las marcas de chimó

Marcas	% Nicotina libre	Nicotina total (mg/g)	Nicotina libre (mg/g)	S
San Benito Bolsita	9,02	16,8	1,5	0,8
San Benito Caja	1,12	23,4	0,3	0,8
Chain	97,0	3,4	3,3	0,1
El Tigrito Ice	25,7	7,9	2,0	0,2
Matheus	89,5	15,5	13,9	0,5
Matheitos	89,6	11,8	10,6	0,4
El águila	95,6	9,6	9,2	0,3
Taparo	65,2	8,7	5,7	0,3
La Chinata	92,8	25,7	23,9	0,8
Tigrito II	21,4	9,4	2,0	0,3
Tigrito Modelo	32,03	8,6	2,8	0,4

San Benito caja, a pesar de ser la segunda marca con mayor cantidad de nicotina total presenta la menor cantidad de nicotina libre, ya que el porcentaje de ésta es bajo como consecuencia de un *pH* ácido (6,38).

Al igual que el *pH*, no se han realizado estudios que demuestren o descarten los efectos de la nicotina libre causados en la fisiología humana.

En cuanto a la utilización de la HHE en la determinación de la nicotina libre, es necesario hacer un análisis profundo del empleo de esta ecuación. Si bien es cierto que todos los autores referidos la emplean para la determinación de este parámetro, es desacertado hacerlo sin tomar en cuenta la matriz en el cual se está experimentando.

Aunque en la disolución estudiada (matriz de chimó), existan más de un sistema ácido-base distinto debido a las diferentes sales añadidas en su elaboración, las

expresiones correspondientes a la HHE deben dar todas el mismo pH , porque sólo puede haber una concentración de H^+ . Sin embargo hemos evidenciado que el efecto de la fuerza iónica, aportada por cada una de estas sales, produce como consecuencia un efecto en los coeficientes de actividad, que a su vez se traduce en un cambio en el pKa .

En la figura 29 se observa que conforme se va incorporando matriz al sistema, la curva experimental tiende a valores más grandes, lo cual es indicador de que existen otras especies capaces de protonarse en este medio.

El pKa en este sistema tiende a ser más pequeño a mayor cantidad de la matriz, y por ende, aumenta la cantidad de nicotina libre a un mismo valor de pH , es decir, que usar la HHE para determinar la cantidad de nicotina libre en el chimó con el pKa reportado en el handbook, trae consigo mucho error, como se dijo anteriormente. Entonces con el pKa obtenido experimentalmente sólo se puede reportar la cantidad mínima de nicotina libre presente en el chimó usando dicha ecuación.

VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Se desarrollo una metodología para la caracterización química de chimó, obteniendo parámetros de, *pH*, humedad y nicotina libre.
- ✓ La metodología desarrollada permitió la caracterización de 12 marcas de chimó de mayor consumo a nivel nacional.
- ✓ Se determinó la nicotina total con una metodología ya desarrollado en el Centro de Química Analítica de la UCV

En base a la metodología para liofilización, se encontró que:

- ✓ Realizar la extracción de la humedad a través de la liofilización para el chimó es totalmente acertada, ya que, extraer el agua por calentamiento conlleva a la desnaturalización del producto.
- ✓ El aumento del área superficial en las muestras facilita la extracción de la humedad de las muestras y disminuye los tiempos de liofilización de las mismas.
- ✓ Entre los tiempos estudiados para la liofilización, el tiempo de 48 horas fue el que garantizó una mayor extracción del agua en las muestras.
- ✓ El enfriamiento de las muestra con nitrógeno liquido proporciona una forma rápida y eficiente de congelación de las muestras.
- ✓ Las muestras más fluida presentaron como era de esperarse la mayor cantidad de humedad, tales son los casos de El Águila, San Benito caja y San

Benito bolsita, lo cual se traduce en un manejo más dificultoso para dichas muestras.

En base a la determinación de pH, se encontró que:

- ✓ Según el estudio de medición de pH para chimó en intervalos de tiempo que abarcaban los 5, 15 y 30 minutos, se evidenció que no existen variaciones de este parámetro a través del tiempo. Por este hecho se procedió a medirlo en el menor tiempo.
- ✓ La disgregación de la muestra para la preparación de los extractos acuosos para la medición de pH fueron muy eficientes debido a la alta área superficial que presentaba la muestra, presentando tiempo de 5 minutos en ultrasonido.
- ✓ La mayoría de las muestras presentaron valores de *pH* básicos excepto para las marcas San Benito caja, San Benito bolsita y El Tigrito II los cuales presentaron los valores de pH más bajos respectivamente 7,33; 6,38; 7,76.

Referente a la nicotina libre, se obtuvo que:

- ✓ Antes de emplear de la HHE es necesario un estudio del efecto matriz que puede causar la fuerza iónica en los valores de *pKa*.
- ✓ Se encontró que existe una tendencia de disminuir los valores de *pKa* al incorporar mayor cantidad de matriz en el estudio del sistema ^+H-N .
- ✓ Utilizar los *pKa* reportados en la bibliografía para la determinación de la nicotina libre con la HHE conlleva a incertidumbre.

- ✓ La utilización de dicha ecuación para la obtención de nicotina total para el chimó solo da una idea de la mínima cantidad de nicotina libre, presente en estos productos.

IX. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda hacer el estudio del efecto matriz, al resto de las marcas de chimó, haciendo un especial énfasis en el estudio de la marca con menor valor de pH, San Benito caja.

- ✓ Se recomienda hacer un análisis de especiación para la nicotina en la matriz de chimó.

X. APÉNDICE

10.1.- Definición de *pH*

Las reacciones más importantes son probablemente las que tienen lugar en disolución acuosa. Todas las reacciones biológicas, y gran número de las efectuadas en el laboratorio, se realizan en el seno del agua. Una sustancia en dilución acuosa se disocia en iones y se establece un equilibrio entre la especie no disociada y sus partes componentes. La expresión de la constante de equilibrio, K_{eq} , para la disociación del agua es: ^[43]

$$K_{eq} = \frac{[H^+][HO^-]}{H_2O}$$

Donde los corchetes representan las concentraciones en Molaridad. En disoluciones razonablemente diluidas, el valor de $[H_2O]$, es prácticamente constante. La cantidad de agua que se consume o se forma durante una reacción química es pequeña, en comparación con la cantidad total de agua presente. Por ello se puede escribir la expresión anterior como: ^[43]

$$K_a = [H^+][HO^-]$$

La constante de equilibrio, K_a , se llama producto iónico del agua y varía con la temperatura. Su valor es $1,0 \times 10^{-14}$, a 25 °C. En el agua pura las concentraciones de H^+ y HO^- valen cada una $1,0 \times 10^{-7}$.

Si se añade un ácido al agua, la concentración de hidrogeniones (H^+) aumenta sobre el valor $1,0 \times 10^{-7}$, pero como el producto iónico permanece igual a $1,0 \times 10^{-14}$, la concentración de aniones hidroxilo (OH^-) desciende por debajo de

$1,0 \times 10^{-7}$. De forma similar ocurre si se añade base al agua, la concentración de cationes H^+ disminuye. ^[43]

El manejo de las potencias suele resultar laborioso, es por ello que se ha introducido una notación logarítmica, llamada escala de *pH*. El signo de *pH* significa “potencia negativa de la concentración de iones hidrógeno”. El *pH* es el logaritmo negativo de la actividad de hidrogeniones, pero en la práctica se toma generalmente la concentración de hidrogeniones, ya que la concentración y la actividad son prácticamente las mismas, excepto en soluciones fuertemente ácidas. ^[43]

En el agua pura el *pH* es 7. Se considera que una solución acuosa es neutra cuando está muy cercana a ese valor, Mientras que las soluciones acidas están por debajo de ese valor y las básicas por encima del mismo. ^[43]

10.2.- Electrodo para medir *pH*

El electrodo de vidrio constituye la pieza fundamental en la medición electrométrica del *pH*. Junto con el electrodo de calomel, se encuentran ampliamente difundidos y a la fecha no existe otro sistema para la medición electrométrica que tenga la misma versatilidad y precisión. ^[44]

El principio bajo el cual trabaja el electrodo de vidrio fue descubierto, en forma accidental por McInnes y Dole, cuando observaron que el vidrio que empleaban en sus investigaciones mostraba cierta sensibilidad a las variaciones de *pH*. Una vez hecho su descubrimiento, procedieron a investigar una composición más adecuada de vidrio, que es la base de los electrodos empleados hoy día. ^[44]

La varilla de soporte del electrodo es de vidrio común (o plástico), no conductor mientras que el bulbo es el extremo sensible del electrodo. Se construye con este

vidrio de formulación especial, conocido como "vidrio sensible al pH " (vidrio polarizable). [44]

El vidrio de pH es conductor, porque tiene óxido de litio dentro del cristal, además de óxido de sílice, de calcio y algunos otros. Según se puede observar en la figura 32, la estructura del vidrio es tal que permite el intercambio de iones litio por iones de hidrógeno en solución acuosa, de modo que se forma una capa fina hidratada. Se crea así un potencial (del orden milivolts), a través de la interface creada entre el vidrio y la solución acuosa. El voltaje creado hacia el interior del bulbo es constante porque se mantiene su pH constante (mediante una solución buffer de pH 7) de modo que la diferencia de potencial depende sólo del pH del medio externo. La incorporación de un alambre (usualmente de $Ag/AgCl$) permite conducir este potencial hasta un amplificador. [44]

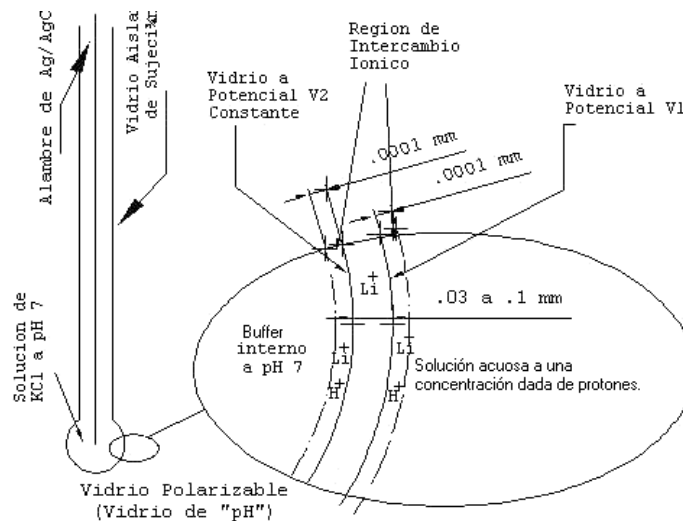


Figura 32.- Electrodo de vidrio. Vista general y detalle de la membrana intercambiadora de iones

10.2.1.- Funcionamiento del electrodo de vidrio

El *pH* se determina midiendo el potencial (en milivoltios) generado por un electrodo, este potencial se compara contra un electrodo de referencia, el cual genera un potencial constante e independiente del *pH*. El electrodo de referencia que se utiliza es el de calomel saturado con cloruro de potasio, el cual sirve como puente salino que permite el paso de los milivolts generados hacia al circuito de medición. ^[44]

El sistema actual de medición de *pH* es, por excelencia, el electrodo de combinación. Su nombre deriva de la práctica inicial en que el electrodo sensible a hidrogeniones estaba separado del electrodo de referencia; la combinación de ambos en una sola estructura llevó a su nombre actual. ^[44]

10.3.- Liofilización

La liofilización es el proceso de deshidratación por congelación y sublimación; el contenido líquido natural de los sistemas biológicos se congela y se elimina en forma de vapor, bajo condiciones cuidadosamente controladas de presión y temperatura, para dejar una estructura que revierta el estado previo por adición de agua; si se aplica a sustancias lábiles como alimentos, permite la conservación a la temperatura ambiente durante largos periodos, adecuadamente protegidos del agua, luz y oxígeno. ^[45]

En líneas generales este método consiste en llevar al agua a condiciones que están por debajo de su punto triple, reduciendo la presión y temperatura para que el agua presente en la muestra pase del estado sólido (agua congelada) al estado gaseoso (vapor de agua) sin pasar por el estado líquido. ^[46] En la figura 33 se muestra el diagrama de fase del agua y como se efectúa el proceso de liofilización.

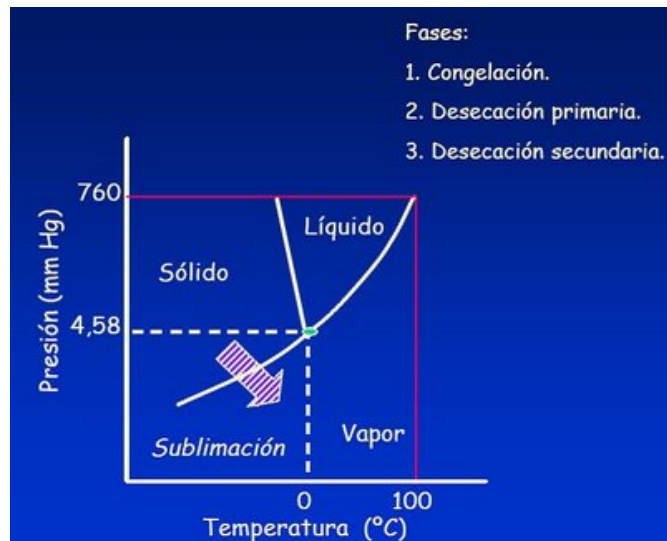


Figura 33.- Diagrama de fase del agua que muestra la liofilización.

El proceso es también llamado criodesecación porque consiste primero en congelar una muestra y luego sublimar directamente el hielo a baja presión. ^[46]

Dicha técnica constituye un efectivo sistema de preservación de elementos biológicos como células, enzimas, vacunas, virus, levaduras, sueros, algas, frutas, vegetales y alimentos en general. Todos estos materiales contienen sustancias volátiles o termosensibles que no se ven afectadas por este proceso, ya que se trabaja a temperaturas y presiones reducidas. ^[45]

Lo más importante del método es que no altera la estructura fisicoquímica del producto y admite su conservación sin cadena de frío, ya que su bajo porcentaje de humedad permite obtener un producto con elevada estabilidad microbológica. Asimismo, el hecho de no requerir refrigeración facilita su distribución y almacenamiento. ^[45]

El desarrollo comercial de este proceso se produjo durante la Segunda Guerra Mundial, donde se utilizó para conservar plasma sanguíneo y en la preparación de

los primeros antibióticos de penicilina. Años después, alrededor de 1960, comenzó a utilizarse la misma tecnología sobre una gran variedad de productos, entre ellos los alimentos. ^[45]

Actualmente se aplica en industrias farmacéuticas, para preservar antibióticos, vacunas (por ejemplo la vacuna del sarampión), plasma, hemoderivados, vitaminas, extractos, leche materna. ^[45]

En la industria química, la técnica se emplea para el preparado de catalizadores, secado de materiales orgánicos, preservación de animales (taxidermia), conservación de documentos y libros antiguos, entre otros. ^[45]

10.4.- Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es una técnica de separación que se basa en la diferente interacción que poseen los analitos sobre una fase estacionaria generalmente líquida, a través de una columna donde fluye la fase móvil (gas) y así cada analito desaloja la columna en un tiempo característico. Esta técnica ha tenido grandes aplicaciones en análisis cualitativos y principalmente cuantitativos de muestras orgánicas complejas, organometálicas, entre otras. ^[47]

En la figura 34 se muestra un esquema típico de un equipo de cromatografía de gases. La muestra es inyectada mediante una jeringa en una cámara de vaporización que convierte la muestra en un gas, la misma es arrastrada a la columna de separación con un flujo de gas continuo que sirve de fase móvil (un gas inerte como nitrógeno, hidrógeno o helio). La columna, el principal componente del equipo ya que en ella ocurre la separación de los analitos, se mantiene termostatazada dentro de un horno que controla la temperatura a la cual se lleva a cabo la separación. Al final de la columna, cada analito pasa a un detector que registra su señal. ^[47]

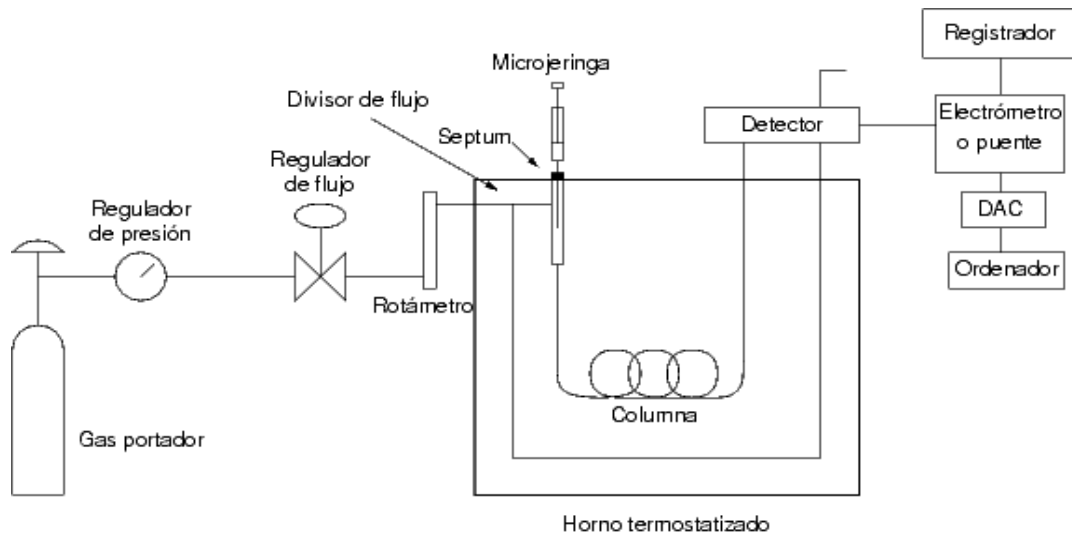


Figura 34.- Esquema de un cromatógrafo de gas

10.4.1.- Parámetros que afectan las separaciones cromatográficas

En general, cuando dos analitos pasan a través de una columna ocurren una serie de fenómenos que permiten que dos analitos, A y B sean separados. Si el compuesto B es más retenido por la columna eluirá más lentamente en la columna y el resultado será un cromatograma como el de la figura 35. ^[47]

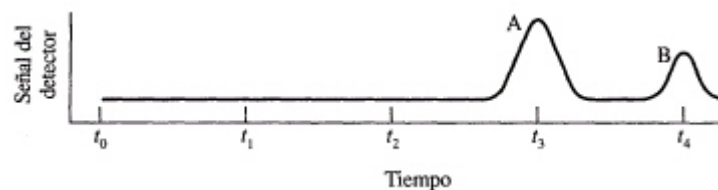


Figura 35.- Señal de salida del detector en las distintas fases de la elución.

Inevitablemente, en este proceso dinámico ocurre una dilución de los analitos a medida que son transportados en la columna, por lo que la banda que llega al detector es más ancha que la original. Así, para lograr una separación eficaz, hay que tener en cuenta tanto los factores cinéticos que afectan el ensanchamiento como aquellos factores termodinámicos. ^[47]

Para comprender los factores termodinámicos hay que tener en cuenta que el analito se distribuye entre una fase móvil y una estacionaria (en este tipo de cromatografía (GC) el analito no interacciona con la fase móvil, ésta es sólo el medio de transporte) que podemos describir por una constante llamada coeficiente de distribución "K" ($K = C_s/C_m$).

Una separación, en principio es efectiva cuando dos analitos tienen constante de distribución diferentes, esta razón se denomina factor de selectividad α ($\alpha = K_a/K_b$). De aquí surgen los dos parámetros principales de los que depende una separación en GC, es decir, para separar dos analitos de interés, la fase estacionaria debe tener una composición química adecuada tal que K_a sea significativamente diferente de K_b , además, las constantes de distribución cambian con la temperatura siendo este el otro parámetro clave. Es preciso mencionar que en la práctica, es mucho más fácil cambiar la temperatura de los experimentos que cambiar la fase estacionaria o cambiar la columna. ^[47]

Los factores cinéticos deben tenerse en cuenta debido al ensanchamiento de banda que se produce debido a la velocidad finita con la que ocurren los distintos procesos de transferencia de masa. La velocidad de la fase móvil afecta en gran medida estos procesos.

En la figura 36 se muestra un gráfico de la eficiencia de la columna, definida como altura de plato teórico H (por su analogía con las columnas de destilación fraccionada y mientras más pequeño es este valor más eficiente es la columna) versus la velocidad lineal de la fase móvil. Se observa que existe un valle donde existe una mayor eficiencia. El comportamiento de la curva puede describirse por la ecuación de Van Demter: ^[47]

$$H = A + B/u + Cu$$

H: Altura de plato

A: Camino múltiple de flujo.

B: Difusión longitudinal.

C: Transferencia de masa entre las fases.

u: Velocidad Lineal de la fase móvil.

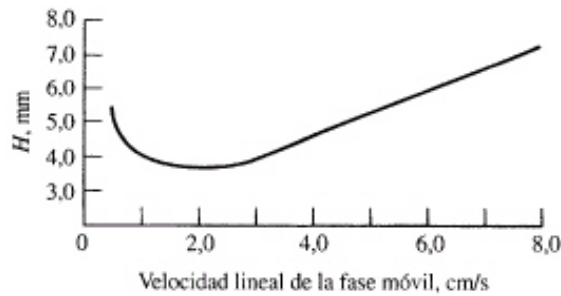


Figura 36.- Efecto del caudal de la fase móvil sobre la altura de plato en GC.

El término A o de camino múltiple depende del tamaño de partícula de relleno y de la calidad del mismo, mientras más pequeño el tamaño de las partículas, más pequeño se hará A y más eficiente la columna. El término B/u depende del coeficiente de difusión del analito en la fase móvil y es inversamente proporcional a H debido a que habrá mayor ensanchamiento a velocidades bajas de la fase móvil. Finalmente, el término Cu o de transferencia de masa, al ser directamente proporcional a H, crea un compromiso al optimizar la eficiencia, este término depende de la calidad del relleno o espesor del recubrimiento líquido, el factor de retención y coeficientes de difusión.^[47]

10.5.- Teoría de Ecuación de Henderson – Hasselbalch

La ecuación fundamental de los tampones es la ecuación de Henderson–Hasselbalch, que simplemente es una forma transformada de la expresión de la constante de equilibrio Ka.^[43]

$$K_a = \frac{[H^+][HO^-]}{H_2O}$$

$$\log_{10}K_a = \log_{10} \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \log_{10}[H^+] + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$-\log_{10}[H^+] = -\log_{10}K_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Resultando de estas expresiones la ecuación de Henderson- Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Esta ecuación da el pH de una disolución, siempre que se conozca la relación de concentraciones del ácido y la base conjugada, así como el pK_a del ácido. Si se prepara la disolución a través de una base débil B y su ácido conjugado BH^+ , es válida una ecuación análoga: ^[43]

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[B]}{[BH^+]}$$

Donde el pK_a es la constante de disociación ácida del ácido débil BH^+ . Es importante resaltar que en ambas ecuaciones la base (A^- o B) aparece en el numerador, y que la constante es la K_a del ácido que se encuentra en el denominador. ^[43]

Cuando se tienen las actividades la forma correcta de la ecuación de Henderson-Hasselbalch es la siguiente: ^[43]

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]_{K_a}}{[HA]_{K_a}}$$

10.5.1.- Propiedades de la ecuación de Henderson- Hasselbalch

De esta ecuación se tiene que si: $[A^-] = [HA]$, $pH = pKa$

$$pH = pKa + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]} = pKa + \log 1 = pKa$$

Independientemente de lo compleja que sea la disolución, siempre el pH será igual al pKa y $[A^-] = [HA]$. Esta relación es cierta porque todos los equilibrios que coexisten en cualquier disolución en equilibrio se deben satisfacer simultáneamente. Si hay diez sistemas ácido-base distintos en la disolución, las diez expresiones correspondientes a la ecuación de Henderson- Haselbalch deben dar todas el mismo pH , porque solo puede haber una concentración de H^+ en una disolución. [43]

Otro rasgo importante en esta ecuación es, que por cada unidad de cambio en el exponente de 10 en la relación $[A^-] / [HA]$, el pH cambia una unidad. A medida que la base (A^-) aumenta, el pH también lo hace. Y a medida que el ácido aumenta (HA), el pH disminuye. Para cualquier par ácido-base conjugado se puede decir, por ejemplo, que si $pH = pKa - 1$, debe haber diez veces más de HA que de A^- . Por ende, habrá 10/11 en la forma de HA y 1/11 en la forma A^- . [43]

10.6.- Prueba: Diferencia Honestamente Significativa de Tukey (DHS)

DHS entre tiempos de 12 y 24 horas

$$\text{Estadístico: } Q = \frac{Y_{24h} - Y_{12h}}{\sqrt{\frac{CME}{n^*}}} = \frac{7,3 - 6,1}{\sqrt{\frac{0,10}{4}}} = 7,59$$

$$\text{Valor crítico: } T_{\alpha} = Q_{\alpha}(p, f) \times \sqrt{\frac{CME}{n^*}} = 0,605 \quad [3]$$

P: es el número de tratamiento

F: es grados de libertad del CME

Con un nivel de confianza del 95 %

$$T_{\alpha} = Q_{0,05}(3,9) \times \sqrt{\frac{CME}{n^*}} = 3,95 \times \sqrt{\frac{0,10}{4}} = 0,62 \quad [4]$$

$Q = 7,59 > T_{\alpha} = 0,62$ Si hay diferencias entre 12 y 24 horas.

DHS entre tiempos de 24 y 48 horas

$$\text{Estadístico: } Q = \frac{Y_{48h} - Y_{24h}}{\sqrt{\frac{CME}{n^*}}} = \frac{8,0 - 7,3}{\sqrt{\frac{0,10}{4}}} = 4,43 \quad [5]$$

$$\text{Valor crítico: } T_{\alpha} = 3,95 \times \sqrt{\frac{0,10}{4}} = 0,62 \quad [6]$$

$Q = 4,43 > T_{\alpha} = 0,62$ Si hay diferencias entre 24 y 48 horas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Font Quer, P. Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado. Tabaco. Editorial Labor S. A. Barcelona. 1980.
- [2] Martínez, A. Patología del consumo de tabaco. El tabaco como planta fumable. Consideraciones históricas. P.p.13-18. Barcelona. 1989. Editorial Glosa.
- [3] Tabaco mortífero en todas sus formas. Organización Mundial de la Salud y Ministerio de Sanidad y Consumo. 31 de mayo Día Mundial sin Tabaco. 2006.
- [4] Elaboración de tabacos. Mayo de 2012. Obtenido de: <http://www.sectur.gob.do>.
- [5] Diseño y manufactura de cigarrillos. Marzo de 2012. Obtenido de: <http://www.bat.com/>
- [6] Productos del tabaco. Marzo de 2012. Obtenido de: <http://www.vivasaludable.org>.
- [7] World health Organization international agency for research on cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 89. Francia, Año 2007.
- [8] El verdadero origen del tabaco de mascar. Febrero de 2012. Obtenido de: <http://www.chimo.com.ve>.
- [9] Seelkopf, C. Rojas, A. Estudio Sobre El Chimó. Mérida, Venezuela. 1960.
- [10] Brunnemann, K. Hoffmann, D. Chemical Composition of Smokeless Tobacco, Smoking and Tobacco Control. Monograph N°.2 98-108. 1992.
- [11] Sánchez C. Sosa G. Leónidas S. Urdaneta P. Chidiak S y Jarpa P. Cambios en el flujo de pH salival de individuos consumidores de chimó. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. 2009.
- [12] Schweiz, D. Vademecum de medicamentos Antroposóficos, El Caduceo. Medicina Antroposófica Suplemento 61. Enero 2010.
- [13] Jibao, C. Baizhan, L. Ping, L. Qingde, S. Fast analysis of nicotine related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by megabore capillary gas chromatography. Journal of Chromatography. Vol.1017. China. Febrero 2003.

- [14] Von Euler, U. Tobacco Alkaloids and Related Compounds. Macmillan. New York. 1965. p. 37.
- [15] Grasso, P. Mann, H. Smokeless tobacco and oral Cancer: An Assessment of Evidence Derived from Laboratory Animals. Food and Chemical toxicology. Vol. 36. UK. 1998
- [16] Hilfrich, J. Schmeltz, I. Hoffmann D. Effects of N-nitrosodiethanolamine and 1,1-diethanolhydrazine in syrian golden hamsters. Cancer Letters. Vol. 4. New York. 1977.
- [17] David R. Lide, ed. CRC Handbook of Chemistry and Physics. Internet Version. 2005.
- [18] Lauterbach, J. Bao, M. Joza, P. Rickert, W. Determination of free-base nicotine in the aqueous extracts of smokeless tobacco products and the relevance of these findings to product design parameters. Regulatory Toxicology and Pharmacology. Vol. 59. USA. 2011.
- [19] Rickert, W. Trivedi, A. Momin, R. Wagstaff, W. Lauterbach, J. Mutagenic, Cytotoxic, and Genotoxic Properties of Tobacco Smoke Produced by Cigarillos available on the Canadian market. Canada. 2009.
- [20] Connolly, G. The marketing of nicotine addiction by one oral snuff manufacturer. Tobacco Control. Vol. 4. 1995.
- [21] Jarpa, P. Medición del pH de 12 preparaciones distintas de pasta de tabaco de mascar, relacionándolas con la adición a la nicotina. Revista de la Facultad de Farmacia. Vol. 45 (2). Facultad de Odontología. Universidad de los Andes. Mérida 2003.
- [22] Ritcher, P. Spierto F. Surveillance of smokeless tobacco nicotine, pH, moisture, and unprotonated nicotine content. Nicotine & Tobacco. Vol. 5. Diciembre. 2003.
- [23] Hukkanen, J. Jacob, P. Benowitz, N. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. Pharmacol Rev. 2005.
- [24] Connolly, G. Stephen, S. 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, unionised nicotine and tobacco-specific N-nitrosamines. Junio de 2011. USA

- [25] Micó, J. Moreno. Roca, A. Rojas, M. Ortega, A. Neurobiología de la adicción a nicotina. Universidad de Cádiz. Prevención del tabaquismo. vol. 2. septiembre 2000.
- [26] Bascarán, T. García, P. Sáiz, P. Bousoño, M. Bobes, J. La nicotina como droga. Monografía Tabaco, Adicciones. Vol. 16. 2004.
- [27] Maldonado, R. La adicción a la nicotina y el sistema cannabinoide como nueva diana terapéutica. Laboratorio e Neurofarmacología. Facultad de Ciencias de la Salud y de la Vida Universidad Pompeu Fabra. Barcelona. 2008.
- [28] Leshner, A. Nicotine Addiction. Research Report Series. National Institute on Drug Abuse. 2001.
- [29] Cooper E, Couturier S, Ballivet M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Nature 1991.
- [30] Solano, R. Jiménez, C. Manual de Tabaquismo. segunda edición. Separ. Masson. Barcelona. Página. 193. 2002.
- [31] Hoffmann D. Stephen S. Hecht Nicotine-derived N-Nitrosamines and Tobacco-related Cancer: Current Status and Future Directions. Naylor Dans Institute for Disease Prevention. American Health Fudation. Valhalla. New York.1985.
- [32] Los chamos mascan chimó sin saber las consecuencias. Obtenido de: <http://fundacionfames.blogspot.com>. Febrero de 2009.
- [33] Rosales, A. Sosa, L. Cambios clínicos periodontales ocasionados por el chimó en animales de experimentación. Mérida 2008.
- [34] Alertan sobre efectos nocivos del consumo de chimó en Venezuela. Obtenido de: <http://www.notitarde.com>. Abril de 2012.
- [35] A consulta pública regulación de empaques de chimó. Obtenido de: <http://www.mpps.gob.ve>. Abril 2012.
- [36] Health Canada. Determination of whole tobacco pH. T-310. Diciembre 1999. Página 1.
- [37] Federal Register. Centro de Control y Prevención de Enfermedades de USA. Revised Protocol for Analysis of Nicotine, Total Moisture, and pH in Smokeless Tobacco Products. Vol. 74. January 7. 2009.

- [38] Health Canada. Determination of Moisture Content. Official Method. Test Method T-301 (Determination of Alkaloids in Whole Tobacco). Diciembre 1999. Página 4.
- [39] Dr. Horwitz, W. Oficial Methods of Analysis of AOAC International. Moisture in Tobacco. Gravimetric Method. Vol. I. Capitulo 3. Página 30.
- [40] Ritcher, P. Knachelle, H. Stanfill, S. Zhang, L. Watson, C. Surveillance of moist snuff: total nicotine, moisture, pH, un-ionized nicotine, and tobacco-specific nitrosamines. Nicotine & Tobacco. Vol 9. 2008.
- [41] Stephen B Stanfill, 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. USA. 2010.
- [42] Carrillo, A. Determinación de nicotina en tabaco sin humo (chimó) mediante la técnica de cromatografía de gases. Trabajo Especial de Grado. UCV. 2011.
- [43] Harris, D. Análisis Químico Cuantitativo. Tercera edición. New York 2003.
- [44] Ciganda, L. Electrodos para medir pH. Ingeniería Biomédica Universidad de la República Oriental del Uruguay. Junio 2004.
- [45] Liofilización de alimentos. Obtenido de: <http://www.invap.com.ar>. Junio 2012.
- [46] Crio-concentración y Liofilización. Universidad Nacional de Colombia. Recursos virtuales. Dirección nacional de Servicios Académicos Virtuales. Obtenido de: <http://www.virtual.unal.edu.co>
- [47] Skoog, D. Análisis Instrumental. Quinta edición. Mc Graw Hill. Madrid 2001.
- [48] Pavia, L.D. Introduction to Organic Laboratory Techniques. 4th. Edition. 2007
- [49] Montgomery. Diseño y Análisis de Experimentos. Segunda edición. Limusa Wiley. Páginas 63 y 96.
- [50] Hernández, J. Desarrollo de un método para la determinación de nicotina en tabaco sin humo (chimó) mediante la técnica de cromatografía de gases. Trabajo Especial de Grado. UCV. 2011
- [51] F. Rossotti, H. Rossotti. The determination of Stability Constants. McGraw-Hill Book Company (1961), p.p 5-22.
- [52] Wayne E. Wentworth, S. Jules Ladner. Fundamentos de Química Física. Editorial Reverté S.A (1975).

- [53] Gilbert N. Lewis, Merle Randall, *J. of The Am. Chem. Soc.* 1921.
- [54] Gilbert N. Lewis, Merle Randall. Thermodynamics. Mac-Graw-Hill Book Co., New York, (1923), p. 367.
- [55] International Union of Pure and Applied Chemistry. Archived from the original on 29 October 2008. Retrieved 2008-11-23.
- [56] Rossotti, F.J.C.; Rossotti, H. The Determination of Stability Constants. McGraw-Hill. Chapter 2: Activity and Concentration Quotients. 1961
- [57] N. Ingrid, L.G. Sillén , *Arkiv Kemi*. 1964.