

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



***DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE NICOTINA EN  
TABACO SIN HUMO (CHIMÓ) MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE  
GASES***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado  
ante La Ilustre Universidad Central de  
Venezuela, por la Br. Jackdin Hernández  
González para optar por el título de Licenciada  
en Química, opción Tecnología.

Tutores:

Dr. Luis Gómez

Lic. Beatriz Mosquera

Caracas, Septiembre 2012.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: “**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE NICOTINA EN TABACO SIN HUMO (CHIMÓ) MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES**” presentado por la Br. Jackdin Carolina Hernández González, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.

---

Dr. Luis Gómez

(Tutor)

---

Lic. Beatriz Mosquera

(Tutora)

---

Lic. Gustavo Pérez

(Jurado)

---

Dra. María Rodríguez

(Jurado)

## RESUMEN

El tabaquismo se ha convertido en un hábito social muy extendido, tanto es así, que desde el punto de vista comercial, de los finales del siglo XIX hasta la actualidad, el tabaco ha ocupado una considerable posición en el mercado internacional. En cuanto a la forma de consumirlo, puede ser tanto fumado (pipas, puros, cigarros, etc) como mascado e inhalado (tabaco en rama, rape, chimó, etc), esta última forma de consumo es denominada “tabacos sin humo”, la cual ha resurgido en los últimos años con mucho impulso, en especial, entre la población joven del país. No obstante, hasta los momentos por parte del estado, no se disponen de normas regulatorias que pudiera controlar o dar información de los componentes químicos del chimó, es por esto que el Centro de Química analítica en conjunto con el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” han puesto en marcha una investigación para la lograr la caracterización de los componentes del chimó.

El objetivo fundamental de este trabajo fue optimizar un método de extracción y análisis del alcaloide mayoritario (nicotina) presente en los tabacos sin humo de mayor consumo nacional (chimó). Se partió de un método que previamente había sido desarrollado, en vía de reducir el tiempo de análisis y obtener resultados satisfactorios con un grado de confianza aceptable.

Se realizaron cambios en diferentes parámetros cromatográficos los cuales permitieron medir valores menores de nicotina, así como la disminución del tiempo de ensayo por muestra.

En cuanto a la metodología de tratamiento de muestra, se realizaron cambios importantes que nos ayudaron a solventar problemas en los pasos determinantes. Uno de ellos fue el tiempo de disgregación de la muestra el cual disminuyó en 45 minutos, debido a un paso previo de laminado mediante una prensa manual.

Otra etapa de importancia fue la extracción en el solvente orgánico el cual generaba emulsiones estables debido a los sólidos en suspensión. Este problema fue resuelto exponiendo el extracto acuoso a un proceso de centrifugado, para posteriormente tomar una alícuota del sobrenadante para realizar la extracción con el solvente orgánico. Disminuyendo considerablemente el tiempo total de análisis.

Los resultados obtenidos en el análisis de nicotina de algunas de las diferentes marcas de chimo de producción nacional arrojaron valores de nicotina se encuentra en un rango de concentración de 3 a 26 mg/g respectivamente. Comparado con el método de referencia se encuentra en el mismo rango, por lo que, los cambios realizados no afectaron directamente a los resultados obtenidos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Luego de un largo tiempo trabajando y luchando por conseguir esta primera meta, de muchas más que vendrán en un futuro, llega el momento en que nos sentamos a pensar en todo lo que ha significado para nosotros este viaje , pero sobretodo en todas aquellas personas que te acompañaron en el camino del mismo. Es por esto que comenzamos a dar gracias por todo el apoyo que significaron para la exitosa culminación de una etapa.

Primero que nada debo dar gracias a Dios, sin él, sin su luz guiándonos día a día nada de esto sería posible, como su palabra lo divulga: Salmo 30,5: “Aunque al anochecer nos visite el llanto, en la mañana vendrá la alegría.”

A mis padres quienes siempre han estado a mi lado, apoyándome en todas mis decisiones, aconsejándome y dándome fuerzas cuando decaía. A mi hermano Jeckdry quien es más que mi hermano un amigo con quien muchas veces drenaba el estrés de un examen o practicaba una exposición, te quiero.

A mi tia, Norys García, quien siempre ha estado ahí, dándome ánimos, pendiente de cómo iban las cosas paso a paso en este camino al igual que mi prima, Norbis Guerra, que desde lejos siempre mandaba buenas vibras para que todo saliera excelente... gracias!.

A mis profesores quienes durante toda la carrera impartieron conocimientos y experiencias en mi vida, en especial a mi tutor Dr. Luis R Gómez quien me orientó para la realización de este trabajo, aunque eso traerá consigo regaños, molestias, chistes y alegría.

A todas esas personas especiales en mi vida que de una u otra manera pusieron un granito de arena para hacerme la persona que soy hoy en día. Rubén y su familia no hay más palabras que decir que no sea GRACIAS, y aun así me faltan maneras de expresar todo lo que les debo, son mis angelitos. A mis brujas Evelin y Daniela compañeras de toda la vida y que aún están a mi lado, las adoro y agradezco su constante apoyo. A Gabriela Márquez, excelente compañera de clases con la que me enfrente a muchos retos, y compartí muchos trasnochos y que hoy es una buena amiga y colega.

A esa personita especial en mi vida, quien durante todo el proceso luchó con todos los cambios de humor que esto conllevó, y quien me escuchó, corrigió y corrió conmigo todos los días, Jesús Materano, gracias, espero poder darte el mismo apoyo cuando sea tu turno, TAMDLQP.

Por último pero no menos importante a todos mis compañeros del CQA quienes siempre estuvieron ahí, me calmaron y ayudaron cuando los necesite, vamos juntos a la meta final, en especial al team chimó, somos grandes muchachos.

A todas aquellas personas que no nombre, por una u otra razón, pero que llevo en el corazón y recuerdo con cariño, a cada una de esas personas que estuvieron a mi lado en este largo camino y aportaron su granito de arena para el éxito, sencillamente Gracias.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	2
2.1. Particularidades del tabaco	2
2.2. Tabaco sin humo en Venezuela. El chimó	5
2.3. Composición del chimó	6
2.4. Farmacología	9
<b>3. ANTECEDENTES</b>	12
<b>4. OBJETIVOS</b>	27
4.1. Objetivo general	27
4.2. Objetivos específicos	27
<b>5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	29
5.1. Materiales y equipos empleados	29
5.2. Estudio y ajustes del método de referencia para la determinación de nicotina en chimó	32
5.2.1. Ajuste de las condiciones cromatográficas	33
5.2.2. Ajuste de la metodología de tratamiento de muestra	45
5.3. Determinación de la concentración de nicotina en marcas nacionales de chimó	61

	<b>Página</b>
<b>6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES</b>	67
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	81
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	82
<b>9. APÉNDICE</b>	86

## 1.- INTRODUCCIÓN

El tabaquismo se ha convertido en un hábito social muy extendido, tanto es así, que desde el punto de vista comercial, de los finales del siglo XIX hasta la actualidad, el tabaco ha ocupado una considerable posición en el mercado internacional. En contra posición, algunos de sus constituyentes químicos o sus derivados son considerados de altísimo riesgo para la salud, provocando muchas enfermedades y deterioro en la calidad de vida de las personas, lo cual conlleva a un costo importante en los servicios de atención sanitaria en los países.

En cuanto a la forma de consumirlo, puede ser tanto fumado (pipas, puros, cigarros, etc) como mascado e inhalado (tabaco en rama, rape, chimó, etc), esta última forma de consumo es denominada “tabacos sin humo”, la cual ha resurgido en los últimos años con mucho impulso, en especial, entre la población joven del país. El chimó es la forma autóctona del consumo de tabaco no fumado en Venezuela, el cual a lo largo de los años se ha ido transformando de un producto artesanal (mayoritariamente de los estados andinos) a un artículo industrializado (distribuido a lo largo de todo el país). No obstante, hasta los momentos por parte del estado, no se disponen de normas regulatorias que pudiera controlar o dar información de los componentes químicos del chimó, por tanto, el desconocimiento de tal información implica que en muchos casos, los usuarios no son conscientes del riesgo que corren al consumir este tipo de derivado del tabaco.

La siguiente investigación, forma parte de un proyecto integral del Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela con el Instituto Nacional de Higiene, Rafael Rangel. En el caso particular del presente trabajo, el objetivo principal consistió en el desarrollo de un método para la determinación de nicotina en tabaco sin humo, chimó mediante la técnica de cromatografía de gases.

## 2.- REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1.- Particularidades del Tabaco

#### Descripción taxonómica:

La planta del tabaco pertenece a la familia de las Solanáceas, al género *Nicotiana*, existiendo sesenta y cinco especies, agrupadas en cuatro sub especies: *Tabacum*, *Petunoides*, *Rustica* y *Polidiclia*. La especie *Nicotiana tabacum*, a su vez tiene cuatro variedades: *Brasilensis*, *Havanensis*, *Virginica* y *Púrpurea*<sup>1</sup>.

La planta es originaria del continente americano y fue llevada por los colonizadores españoles a Europa, donde hasta entonces era desconocida. Es una herbácea de cosecha anual, de 1,5 a 2 metros de altura, tallo cilíndrico, hojas alternas que disminuyen de tamaño desde la base hasta el vértice del tallo tal y como se muestra en la figura 1. Posee una gran capacidad de adaptación al medio ambiente, por lo que pueda cultivarse en casi todos los países del mundo.



Figura1.- Planta de *Nicotiana Tabacum*

El uso del tabaco se remonta entre los años 5000 a 3000 antes de Cristo, donde tuvieron lugar los primeros cultivos en la zona andina entre Perú y Ecuador. Existen evidencias que sugieren que el hábito del tabaquismo pudo haber aflorado a consecuencia de la vida rigurosa que existía en la antigüedad, presentándose como el comienzo de un “pasatiempo agradable”. El explorador Amerigo Vesputio, pensó que los habitantes de una pequeña isla en la costa de Venezuela mascaban tabaco para saciar su sed, aliviar los efectos de fatiga y el hambre. También se creía que poseía propiedades medicinales, y era usado en sus ceremonias religiosas<sup>2</sup>. Cuando se coloniza América, a finales del siglo XV, su consumo ya se había extendido por todo el continente.

Con la llegada de los españoles a América, el tabaco alcanzó a Europa de la mano de Rodrigo de Jerez quien fue el primer europeo que (junto a Luís de la Torre), desembarcó en Cuba y tomó el hábito de fumar de los nativos de la región. Al volver a España, Jerez continuó con su costumbre la cual fue repudiada por la población ya que al ver cómo le salía humo por la nariz y la boca, creían que estaba poseído por el demonio<sup>2</sup>. Su desarrollo comenzó en la marinería, y es con los grandes viajes marítimos de los siglos XVI, XVII y XVIII, que se extendió rápidamente por todo el mundo.

El abaratamiento en la producción y la consiguiente masificación, contribuyen a que todas las clases sociales tengan un fácil acceso al tabaco. No hay duda que en la actualidad, el consumo del tabaco se ha convertido en un hecho universal y se ha transformado en un ingreso económico muy importante para muchos países. Desde

finales del siglo XIX y comienzos del XX, el tabaco ostenta ya, una primerísima posición en el mercado internacional.

Muchas son las personas que han adoptado la costumbre de consumir dicho producto y “beneficiarse” de sus propiedades para producir placer o relajación ante ciertas circunstancias. Algunos de los compuestos químicos contenidos en el tabaco son adictivos y cada vez que se usa, el cuerpo se adapta a la cantidad necesaria para obtener un buen resultado. En consecuencia, la próxima vez que se utiliza, el cuerpo necesita un poco más para conseguir la misma sensación<sup>2</sup>.

Por otra parte, a nivel mundial, el tabaco es sin lugar a dudas, una de las drogas que provoca más enfermedades y deterioro en la calidad de vida de las personas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) le atribuye cuatro millones de muertes anuales al consumo del tabaco. Las enfermedades relacionadas con el mismo suponen un gasto importante para los servicios de atención sanitaria de todos los países, y las enfermedades y muertes producidas son una causa seria de pérdida de aportación a la población activa<sup>4</sup>.

En cuanto a la forma del consumo del tabaco, puede ser fumado o aspirado en pipas, puros o cigarrillos, y en la modalidad conocida como tabaco sin humo: inhalado directamente en la nariz (rape), mascado (hojas de tabaco empacado en bolsas) y absorbido por vía bucal en forma de pasta (jalea de tabaco). Nuestro interés particular está centrado en este último, conocido nacionalmente como “chimo”, ya que en Venezuela, es la forma de tabaco sin humo más popular.

## 2.2.- Tabaco sin humo en Venezuela

El chimó es un preparado de jalea de tabaco elaborada originalmente por los indígenas de los andes Venezolanos. Cuando los españoles comenzaron su travesía por las montañas andinas, encontraron varias tribus en los alrededores de una laguna de agua salada, la cual denominaron Lagunillas de Urao, debido al calificativo que recibe la sal que produce esta laguna. Los indígenas preparaban el Mó, el cual se obtiene a partir del cocimiento de la hoja del tabaco, llevándolo a un estado pastoso, luego colocaban unos “aliños”, entre ellos la sal de la laguna de Urao (bicarbonato de sodio) dando el gusto esperado. Este último se le llamaba Chi. Así se forma la palabra indígena CHI-MÓ, el cuál es uno de los más antiguos tabacos de mascar que existen en el Mundo <sup>5</sup>. En la figura 2 se observa una vista de Lagunillas y la laguna de Urao.



**Figura 2.- Población de Lagunillas y la Laguna de Urao**

Muchos exploradores y visitantes del antiguo continente pudieron apreciar este producto indígena, algunos manifestaron su asombro, estupor y gusto. Luego de comenzar el proceso de colonización y facilitar la comunicación con las regiones aledañas, se propagó el gusto por el chimó entre los nuevos pobladores.

En la Venezuela contemporánea, el consumo del chimó estaba limitado a la población anciana y obrera de las zonas agrícolas o rurales, pero en 1999 los resultados de la encuesta mundial sobre tabaquismo en jóvenes, evidenciaron que el consumo de chimó es un fenómeno urbano sin distinción de clases socioeconómica, siendo más frecuente entre varones (7,8 %) que en hembras (3,5 %). Se evidenció un aumento del consumo por parte de los estudiantes jóvenes (sexto grado) y en especial los matriculados en escuelas públicas <sup>6</sup>.

### **2.3.- Composición del chimó**

En líneas generales, la fabricación del chimó consiste en hervir por varias horas hojas de tabaco, previamente secadas al sol. Seguidamente, la extracción acuosa se filtra (descartando el almidón) y se combina con melaza, para ser hervida nuevamente hasta que se produce una pasta espesa de color negro. Un kilo de esta pasta proviene de procesar 10 kilos de tabaco aproximadamente. Finalmente, se enriquece o se "aliña" con diferentes sustancias dependiendo de la especialidad local, por ejemplo: hipoclorito de sodio, bicarbonato de sodio, nitrato de sodio, ceniza de concha de plátano o cambur, harina de trigo, pimienta, clavos de especia, sabores artificiales (canela, vainilla, chocolate, entre otros). El producto final se expende en pequeñas cajas de lata, plástico o en envoltorios tipo caramelo. En la figura 3 se muestra una paila del cocimiento de chimo.

El chimó se coloca entre el labio inferior y en la encía, una pizca es todo lo que se necesita para liberar los compuestos químicos que lo constituyen, estos son rápidamente absorbidos, en altas proporciones en el torrente sanguíneo.



**Figura 3.- Paila de cocimiento del Chimo**

El tabaco, es el constituyente fundamental del chimo, y en general, se puede considerar que la hoja del tabaco antes de ser cortada está constituida en un 80 % por agua, pero una vez curada y seca, el agua solo representa aproximadamente el 20 %, el resto corresponde a compuestos muy variados: orgánicos (75 a 89 %) e inorgánicos (11 a 25 %)<sup>7</sup>.

Los compuestos químicos del tabaco (no tratado industrialmente), son una mezcla compleja de más de 2500 constituyentes reconocidos, entre los cuales se encuentran: polisacáridos, proteínas, alcaloides, alcanos, terpenos, polifenoles, fitoesteroles, ácidos carboxílicos, nitrato alcalino, almidones, productos celulósicos y minerales inorgánicos<sup>3</sup>.

Los alcaloides son considerados los componentes activos del tabaco, y de ellos, la nicotina y sus relacionados son estimados como los de mayor importancia y por tanto los más estudiados, representando entre 0,2 al 9 % del tabaco, pero generalmente se encuentran del 1 al 2 % <sup>3</sup>.

En el tabaco comercial o procesado, la nicotina puede alcanzar de un 85 a 95 % de la fracción total de los alcaloides, le siguen en abundancia la nornicotina y la anatabina que pueden estar entre un 2 a 3 % y por último la anabasina en un 0,3 % aproximadamente<sup>3</sup>. En la Figura 4 se muestran la estructura química de los alcaloides típicos del tabaco.

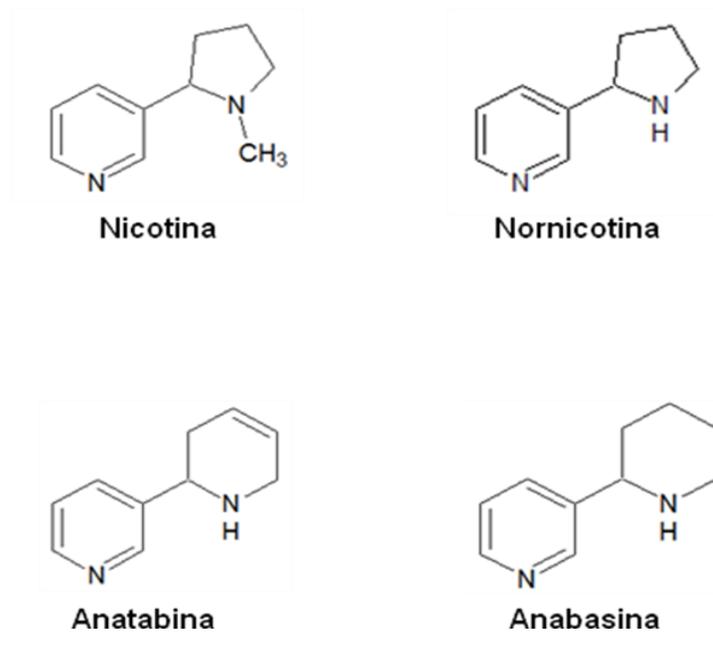


Figura 4.- Alcaloides presentes en el tabaco

## 2.4.- Farmacología

La nicotina genera farmacodependencia en los usuarios. Entre sus principales efectos se encuentra el aumento del ritmo cardíaco, de la presión arterial y el volumen sistólico, también reduce el flujo sanguíneo uterino y afecta directamente a la función fetal<sup>8,9</sup>. Sin embargo, a pesar de estos efectos, también se le atribuye algunos beneficiosos, entre los cuales el principal es la capacidad de aliviar estrés y ansiedad, teniendo entonces un efecto ansiolítico que genera sensaciones placenteras.

Por otro lado, algunos estudios han indicado que posee ciertas propiedades que ayudan a la reducción del dolor a pesar de no ser considerado como un agente clínicamente analgésico en los seres humanos.

La nicotina puede ser absorbida a través de la cavidad y mucosa oral, los pulmones y la piel. Los usuarios del tabaco sin humo y los fumadores que no inhalan (aspiran) el humo del cigarrillo, absorben la nicotina principalmente por la mucosa oral; mientras que los fumadores que si inhalan el humo la absorben principalmente por los pulmones<sup>2</sup>.

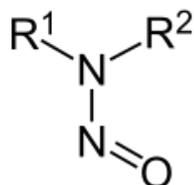
Entre algunos de los factores que influyen en la cantidad de nicotina absorbida están: el tipo de fabricación, el pH, la presentación, frecuencia de uso, la intensidad al mascar, humedad y el tiempo de permanencia en la boca. De todos estos factores, es el pH uno de los más importantes, ya que según su valor la nicotina puede conseguirse como sal de amina o de forma no protonada, también llamada nicotina libre. Esta última es la que se absorbe con mayor facilidad a través de las membranas orales, por lo tanto, mientras mayor sea la cantidad de nicotina libre en el tabaco, mayor será la absorción de esta por parte del usuario y mayor la adicción que se genera<sup>2</sup>.

Por otro lado, así como la nicotina se absorbe, también puede ser excretada a través de la orina, saliva, bilis, heces y sudor. El pH de la orina afecta su nivel de excreción; cuando la orina tiene un pH alto la nicotina no protonada es reabsorbida y la proporción que se excreta es muy baja. Por lo contrario, cuando el pH es ácido ocurre la excreción sin reabsorción <sup>2</sup>.

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

En general, los compuestos N-nitrosos son formados mediante una reacción química denominada N-nitrosación, en ella se incluyen la formación de las nitrosamidas y las nitrosaminas, estas últimas son las de mayor interés debido a que después del procesamiento de los alimentos son mucho más estables.

Las nitrosaminas generalmente se originan debido a la reacción de una amina secundaria con los nitritos en un medio muy ácido (por ejemplo, dentro del estómago). Son compuestos cuya estructura química es  $R_1N(-R_2)-N=O$ , tal como se muestra en la figura 5.



**Figura 5.- Estructura química de la nitrosaminas**

Las TSNA (siglas en ingles de Tobacco Specific Nitrosamines, ya que solo se encuentran en el mismo) se encuentran en pequeñas proporciones en la parte superior de las hojas frescas del tabaco verde. Sin embargo se forman principalmente en el tabaco a partir de los procesos de curado fermentación y envejecimiento de sus alcaloides precursores (nicotina, anabatina, nornicotina y anabasina) con los nitratos y nitritos presentes <sup>10</sup> y son el objetivo principal de estudio de este trabajo. En la figura 6 se observan las estructuras de las nitrosaminas específicas del tabaco.

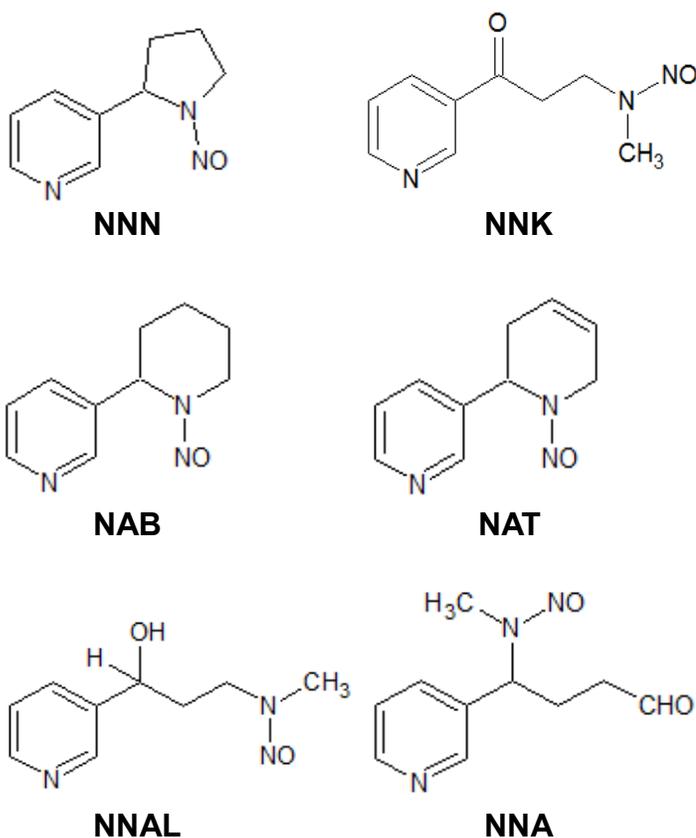


Figura 6.- N- nitrosaminas específicas presentes en el tabaco.

La NNN (N-nitrosoanornicotina), N-nitroanatabina (NAT) y la N-nitroanabasina (NAB) se forman principalmente a partir de la correspondiente amina secundaria en las primeras etapas del procesamiento del tabaco, mientras que la mayoría de NNK (4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona), se forma a partir de nicotina, amina terciaria, en la etapa posterior del curado y fermentación del tabaco <sup>11</sup>.

### 3. ANTECEDENTES

3.1. **Anders H. Laurene y T. Gibson Harrell en el año 1958** <sup>12</sup>, realizaron una extensa revisión de los métodos implementados para la determinación de

nicotina en tabaco desde el año 1935 hasta 1976. El primero de ellos, fue desarrollado por Jesen C. O y Haley D. E. en 1935 el cual se trataba de un método analítico para la determinación de nicotina en tabaco y en humo de tabaco, basado en una determinación gravimétrica empleando la precipitación de nicotina con ácido silico-tungstenico, en un medio de ácido clorhídrico. Este método requería de un gran tiempo de análisis y además estaba sujeto a la coprecipitación de otros constituyentes básicos y a la pérdida de solubilidad del complejo formado, sin embargo, fue el método analítico más aceptado en los años 50 para la determinación de nicotina bajo algunas modificaciones y además fue establecido en la Norma Oficial 920.35 de la Official Methods of Analysis of AOAC International del año 2000.

En el año 1948 Wolff W. A., Hawkins M. A. y Giles W. E. y en 1955 Morani V. y Giovannini E., emplearon métodos espectrofotométricos UV-Visible buscando minimizar el tiempo de análisis de los métodos gravimétricos y una mayor especificidad. Estos se basaban en la extracción de la nicotina con etanol-ácido clorhídrico y la posterior determinación cuantitativa del alcaloide en tabaco mediante el uso de un espectrofotómetro; pero se presentaron los problemas típicos de absorción de fondo por parte de los diferentes componentes de la matriz del tabaco.

En función de estos resultados, Griffith R. B. en el año 1957, Harvey W. R., Stahr H. M., Smith W. C. en 1969 y R. F. Davis en 1976, desarrollaron métodos de destilación de la nicotina por arrastre con vapor y posterior determinación espectrofotométrica, con la finalidad de disminuir los efectos de absorción de fondo presentes en los métodos espectrofotométricos UV-Visible. Se basaban en el control del pH de la disolución empleada para la extracción de la nicotina, realizando de esta manera la limpieza de la matriz de sustancias no deseadas. Sin embargo, continuaba existiendo una contaminación por parte de los alcaloides minoritarios presentes, por lo que eran

requeridos pasos adicionales. Fue entonces, con la finalidad de conseguir una mayor especificidad para así eliminar la interferencia causada por alcaloides minoritarios, cuando se comenzaron a desarrollar los métodos cromatográficos para la determinación de nicotina en tabaco.

**3.2. El programa de control de tabaco de salud de Canadá (Health Canadá) en diciembre de 1999** <sup>13</sup> desarrollo un método de análisis de alcaloides totales (nicotina, nor nicotina, anatabina, anabasina, myosina y 2,4- Dipiridilo (ISTD)) en el tabaco mediante cromatografía de gases utilizando un detector termoiónico específico (TSD).

El tratamiento de la muestra consistía en pesar 25 mg de tabaco liofilizado y molido, esto se extrajo con 1,0 mL de una solución metanólica de KOH (Que contiene 2,4-dipiridilo como patrón interno) en un baño de ultrasonidos durante tres horas. La mezcla se centrifuga luego a baja velocidad para separar el tabaco sólido de la solución. El sobrenadante se transfiere a un vial de automuestreador donde se analiza por GC.

Los alcaloides se analizaron en una columna capilar de sílice fundida -30 CAM m x 0,25 mm x 0,25 micras que tiene polietilenglicol (PEG) en la fase estacionaria, la cual se utiliza específicamente para el análisis de aminas volátiles. Con un detector termoiónico específico (TSD) a una temperatura de 300 °C, la temperatura del inyector se mantuvo en 220 °C y se utilizó He como gas de arrastre. La rampa de temperatura en la columna se inicia en: 110 °C durante un min, luego con una velocidad de 5 ° C / min hasta 225 °C durante dos min y se mantiene constante hasta terminar el análisis en un tiempo total de 26 min.

Un cromatograma de dicho análisis se muestra en la figura 7. A continuación:

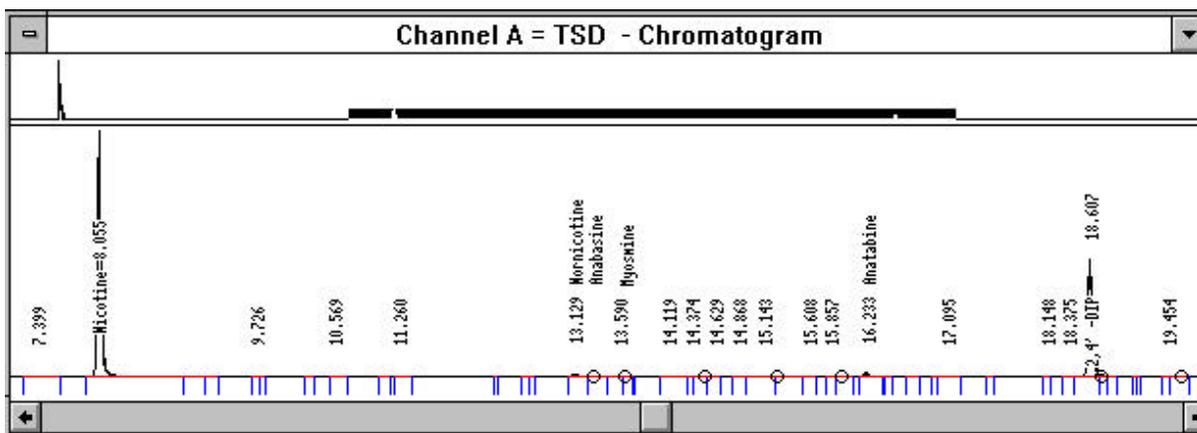


Fig. 7. Cromatograma típico del análisis por cromatografía de gases.

Los tiempos de retención son las siguientes:

- Nicotina: 8.055 min.
- Nornicotina: 13.129 min.
- Anabasina: 13.307 min.
- Myosmina: 13.622 min.
- Anatabina: 16.233 min.
- 2,4-dipiridilo (ISTD): 18.607 min.

En esta investigación se desarrolló un método para el análisis de los alcaloides totales del tabaco mediante cromatografía de gases es bastante satisfactorio debido a que se observan tanto la nicotina (alcaloide mayoritario) como los alcaloides minoritarios presentes.

**3.3. Wu Weijia, Ashley David L. y Watson Clifford H. en Atlanta en el año 2002**<sup>19</sup>, desarrollaron la técnica de micro-extracción en fase sólida combinada con CG/MS para el análisis de algunos alcaloides presentes en el tabaco del relleno de cigarrillos. El análisis se realizó en cigarrillos de 14 países diferentes: Estados

Unidos, China, India, Indonesia, Brasil, Pakistán, la Federación de Rusia, Japón, Bangladesh, Nigeria, México, Alemania, Egipto y Kenya, seleccionados según la Organización Mundial de la Salud. Se emplearon dos marcas de cada país, una de ellas fue Marlboro (marca internacionalmente conocida) y la otra una marca popular de mayor venta local, para un total de 28 muestras y fueron adquiridos tres paquetes de cada una en locales comerciales, las cuales se almacenaron en sus envases originales a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para el análisis se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 6890, equipado con un inyector automático y un detector de masa selectivo, una columna DB 1701 (30m x 0,25 mm DI x 0,25  $\mu\text{m}$ ), un mezclador para la preparación de las muestras a inyectar y una fibra SPME de dimetilsiloxano de 100  $\mu\text{m}$ . La extracción con la fibra de los alcaloides en la muestra, se realizó durante 2 minutos a  $40^{\circ}\text{C}$  y la desorción en el cromatógrafo fue durante 4 minutos a  $260^{\circ}\text{C}$ . Se empleó helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min y la temperatura del horno inició en  $100^{\circ}\text{C}$  por 0,5 minutos incrementándose luego a una rampa de  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $280^{\circ}\text{C}$ . El método empleado fue el de estándar interno.

Para la preparación de las muestras, se combinó el relleno de los cigarrillos elaborándose una muestra homogénea. Posteriormente se añadían 30 mg de relleno a viales de 10 mL con 5  $\mu\text{L}$  de pirrolidina, 4 mL de 0,01 N de fosfato de sodio tribásico, y la mezcla de estándar interno de 100  $\mu\text{g}$  de metil- $^2\text{H}_3$ - nicotina y 20  $\mu\text{g}$  de 3', 4', 5'- $^{13}\text{C}_3$ -DL-nornicotina, los viales se agitaron con el mezclador durante toda una noche. Las muestras de referencia se prepararon con cantidades determinadas de nicotina, nornicotina, anabasina y anatabina adquiridas en Canadá.

Los resultados obtenidos (Tabla 1 y 2) indican que los niveles de los alcaloides pueden variar dependiendo del tipo de tabaco y que el nivel de nicotina específicamente varía del 1 al 3% del peso total del tabaco. Además se observaron diferencias significativas

en los niveles de nicotina de las dos marcas en algunos países (China, Kenya, México, Nigeria, Estados Unidos), donde Marlboro presentó niveles más altos de nicotina que las marcas locales en 4 de estos 5 países. De manera general, la nornicotina fue el alcaloide minoritario de mayor abundancia en todas las marcas. Por último, se atribuyeron las variaciones en los niveles de alcaloides a los diferentes tabacos empleados para la fabricación de los cigarrillos debido a la poca información que poseían o que pudieron recolectar de las cajetillas de presentación, además concluyeron que el método empleado ofrece algunas ventajas en cuanto a la fácil preparación de la muestra, el alto rendimiento y la buena reproducibilidad del análisis.

**Tabla 1. Niveles de alcaloides de varias marcas de cigarrillos**

País	Marca	Nicotina $\pm$ s (mg/g)	Nornicotina $\pm$ s (mg/g)	Anabasina $\pm$ s (mg/g)	Anatabina $\pm$ s (mg/g)
Bangladesh	JP Gold L	16,4 $\pm$ 0,7	1,03 $\pm$ 0,29	0,101 $\pm$ 0,017	0,56 $\pm$ 0,15
Bangladesh	Marlboro	14,1 $\pm$ 1,6	0,71 $\pm$ 0,07	0,069 $\pm$ 0,027	0,42 $\pm$ 0,11
Brasil	Derby	16,1 $\pm$ 2,8	1,06 $\pm$ 0,16	0,125 $\pm$ 0,053	0,59 $\pm$ 0,04
Brasil	Marlboro	18,0 $\pm$ 1,0	0,77 $\pm$ 0,08	0,082 $\pm$ 0,011	0,97 $\pm$ 0,41
China	Hongtashan	22,1 $\pm$ 0,6	1,02 $\pm$ 0,22	0,143 $\pm$ 0,013	1,12 $\pm$ 0,07
China	Marlboro	16,4 $\pm$ 0,9	0,85 $\pm$ 0,07	0,100 $\pm$ 0,026	0,51 $\pm$ 0,07
Egipto	Cleopatra	16,5 $\pm$ 2,4	1,12 $\pm$ 0,74	0,089 $\pm$ 0,034	0,67 $\pm$ 0,20
Egipto	Marlboro	21,0 $\pm$ 0,5	0,76 $\pm$ 0,24	0,094 $\pm$ 0,019	0,59 $\pm$ 0,03
Germania	West	16,5 $\pm$ 1,7	0,67 $\pm$ 0,12	0,060 $\pm$ 0,008	0,61 $\pm$ 0,22
Germania	Marlboro	15,3 $\pm$ 1,3	1,16 $\pm$ 0,72	0,076 $\pm$ 0,012	0,54 $\pm$ 0,11
India	Gold Flake	13,6 $\pm$ 0,6	0,51 $\pm$ 0,03	0,089 $\pm$ 0,029	0,31 $\pm$ 0,07
India	Marlboro	18,9 $\pm$ 3,4	0,61 $\pm$ 0,09	0,096 $\pm$ 0,022	0,92 $\pm$ 0,37
Indonesia	Ardath	16,0 $\pm$ 0,5	0,39 $\pm$ 0,02	0,073 $\pm$ 0,011	0,69 $\pm$ 0,10
Indonesia	Marlboro	17,0 $\pm$ 1,1	0,95 $\pm$ 0,12	0,092 $\pm$ 0,023	0,54 $\pm$ 0,06

**Tabla 2. Niveles de alcaloides de varias marcas de cigarrillos**

<b>País</b>	<b>Marca</b>	<b>Nicotina ± s (mg/g)</b>	<b>Nornicotina ± s (mg/g)</b>	<b>Anabasina ± s (mg/g)</b>	<b>Anatabina ± s (mg/g)</b>
<b>Japón</b>	Mild Seven	16,7 ± 1,4	1,30 ± 0,38	0,094 ± 0,021	0,86 ± 0,39
<b>Japón</b>	Marlboro	17,7 ± 1,9	1,10 ± 0,50	0,085 ± 0,008	0,68 ± 0,20
<b>Kenya</b>	Sportsman	12,5 ± 0,8	0,50 ± 0,10	0,051 ± 0,003	0,49 ± 0,11
<b>Kenya</b>	Marlboro	15,6 ± 1,1	0,82 ± 0,28	0,084 ± 0,011	0,44 ± 0,08
<b>México</b>	Boots	16,3 ± 0,9	1,27 ± 0,14	0,071 ± 0,012	0,55 ± 0,20
<b>México</b>	Marlboro	21,2 ± 0,8	1,50 ± 0,48	0,106 ± 0,003	0,56 ± 0,15
<b>Nigeria</b>	High S	8,1 ± 0,4	0,36 ± 0,14	0,044 ± 0,013	0,13 ± 0,02
<b>Nigeria</b>	Marlboro	17,6 ± 1,9	0,77 ± 0,28	0,077 ± 0,013	0,69 ± 0,16
<b>Pakistán</b>	Embassy	18,1 ± 0,6	0,63 ± 0,03	0,163 ± 0,062	0,31 ± 0,10

<b>Pakistán</b>	Marlboro	18,2 ± 0,8	0,84 ± 0,30	0,089 ± 0,009	0,58 ± 0,10
<b>Rusia</b>	Prima	15,3 ± 2,8	0,73 ± 0,06	0,060 ± 0,006	0,43 ± 0,04
<b>Rusia</b>	Marlboro	16,2 ± 1,6	0,85 ± 0,19	0,071 ± 0,019	0,76 ± 0,29
<b>E.U</b>	Doral	13,6 ± 0,6	0,66 ± 0,12	0,074 ± 0,009	0,50 ± 0,10
<b>E.U</b>	Marlboro	18,1 ± 1,5	0,75 ± 0,01	0,071 ± 0,011	0,55 ± 0,12

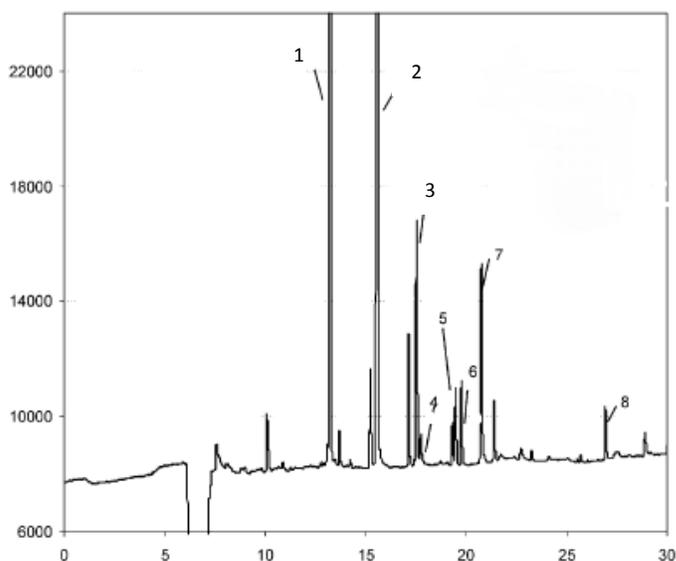
**3.4. K.D. Brunnemann y J. Qi, D. Hoffmann en el 2002** <sup>14</sup> realizaron un trabajo para la caracterización de dos marcas de tabaco sin humo, producido y distribuido en cinco estados de USA, con el fin de medir la humedad, pH, nicotina, alcaloides minoritarios, además de los compuestos de interés para este trabajo, las nitrosaminas.

Para el análisis de las muestras se recolectaron dos marcas bien diferenciadas por las condiciones climáticas de producción y sus formas de elaboración, las cuales se denominaron Snuff A y Snuff B. Adicionalmente se empleó una muestra de referencia suministrada por la Universidad de Kentucky, denominada SKY 1S3. Las muestras fueron adquiridas en mercados minoristas de los 5 estados escogidos, y para su análisis se homogenizaron 50 latas de cada marca, con la idea de tener una muestra representativa. Finalmente fueron almacenadas a una temperatura baja, para evitar la formación adicional de TSNA.

Primero, se realizó el estudio del pH de cada una de las marcas de tabaco, para esto se tomó aproximadamente una porción de 2 g de tabaco y se disolvió en 20 mL de agua des-ionizada, se agitó durante 15 minutos y se midió el pH de la disolución sobrenadante. Para el análisis de la Nicotina y los alcaloides minoritarios, se usó la técnica de cromatografía de gases con un detector NPD (fosforo/nitrógeno), con el

empleo de un estándar interno quinolina. Para la preparación de la muestra, se tomó 200 mg de tabaco húmedo al cual se le agregó 4 ml de metanol que contiene 1% de potasio hidróxido. La quinolina (50 mg/ml) se agrega como estándar interno y la solución se extrae en ultrasonido durante de 1 hora, para luego ser filtrada. De la disolución filtrada se toma una alícuota de 100 mL la cual es diluida 10 veces con metanol que contenía 50 mg/ mL del estándar interno.

Los alcaloides se fueron separados cromatográficamente utilizando una columna de 60 m 0,32 mm de diámetro interno (0,25 mm espesor de la película) HP-5 capilar de sílice fundida. Las condiciones de la CG fueron: el puerto de inyección 220 °C, 230 °C NPD, un programa de temperatura en el horno de, 2 min a 50 °C, 30 °C / min a 150 °C, se mantuvo durante 3 min, luego 2 °C / min a 180 °C, el cual se mantiene durante 0,5 min y finalmente, a 10 °C / min a 220 °C, y se mantuvo durante 5 min. El gas portador fue helio, a un caudal de 0,875 mL/min. Un cromatograma típico de este análisis se muestra en la siguiente figura:



- 1.- Quinolina (E.I).
- 2.- Nicotina.
- 3.- Nornicotina.
- 4.- Miosimina (myosimine)
- 5.- Nicotirina.
- 6.- Anabasina.
- 7.- Anatabina.
- 8.- Cotinina.

**Fig. 8 Cromatograma típico del análisis por cromatografía de gases de los alcaloides presentes en el tabaco sin humo.**

Como conclusión de esta investigación se obtuvo que los porcentajes de alcaloides presentes en las dos marcas varían fundamentalmente en función del pH de la muestra. En aquella donde el pH es más básico (5,84 Vs 7,99) el contenido de nicotina en el tabaco fue de 0,42% Vs 2,73 %. En conclusión, pH 5,84, sólo el 1% de la nicotina está presente como base libre, mientras que 59% de la nicotina se encuentra presente en forma no protonada a pH 7,99.

**Tabla 3. Los resultados obtenidos por K.D Brunnemann y J. Qi, D. Hoffmann, las marca analizadas son Snuff tipo A y Snuff tipo B, mientras KY es una marca de referencia.**

Analyte	Snuff type A	Snuff type B	KY 1S3
Moisture (%)	24.0	52.7	52.0
pH	5.84	7.99	6.93
Nicotine (%)	0.42	2.73	2.52
Nornicotine (%)	0.012	0.037	0.036
Myosmine (%)	0.001	0.003	0.003
$\beta$ -Nicotyrine (%)	0.003	0.007	0.007
Anabasine (%)	0.002	0.009	0.010
Anatabine (%)	0.008	0.028	0.026
Cotinine (%)	0.008	0.011	0.011
Total alkaloids (%)	0.45	2.83	2.61
Nitrate (%)	0.94	2.17	2.50
Nitrite ( $\mu\text{g/g}$ )	7	1176	7
NNN ( $\mu\text{g/g}$ )	3.1	15.4	12.6
NAT ( $\mu\text{g/g}$ )	0.8	18.5	5.4
NAB ( $\mu\text{g/g}$ )	0.2	1.2	0.6
NNK ( $\mu\text{g/g}$ )	0.5	2.5	2.2
Total TSNA ( $\mu\text{g/g}$ )	4.6	37.6	20.8

**3.5. Jae Gon Lee, Chang Gook Lee, Jae Jin Kwag, Moon Soo Rhee, Alan J. Buglass y Gae Ho Lee en Korea en el año 2007<sup>15</sup>**, realizaron la comparación de los resultados obtenidos por dos métodos empleados para la determinación cuantitativa de

nicotina en una marca de tabaco Koreano B10. El primer método desarrollado, empleó un pirolizador de doble tiro (DSP, modelo 2020ID), compuesto por un émbolo para la muestra, una aguja para la conexión al cromatógrafo y un horno. El pirolizador, se conectó al inyector de un cromatógrafo de gases Agilent 6890 con espectrometría de masas (DSP-GC-MS), equipado con una columna capilar HP-5 (30 m, 0,25 mm D.I, 0,25  $\mu$ m) y una programación de temperatura del horno de 50 a 300 °C incrementándose 60 °C/min. El helio, fue usado como atmosfera inerte para la desorción térmica y como gas de arrastre en el cromatógrafo, en el cual se estableció un flujo de 1 mL/min, una relación split 100:1, la temperatura del inyector a 230 °C y la temperatura del horno inició en 50 °C por 3 min y luego incrementó en 8°C/min hasta 250 °C manteniéndose por 20 min. El n-heptadecano fue empleado como estándar interno y bajo estas condiciones fueron analizadas 5 réplicas.

El segundo método desarrollado, se basó en la extracción de la nicotina por solvente. Para ello se emplearon: éter, cloroformo y hexano. Para el análisis, se empleó un cromatógrafo de gases HP 5890 provisto de un detector FID y una columna capilar HP-5 MS (30m, 0,25 mm D.I, 0,25  $\mu$ m). La temperatura del inyector y del detector fue de 230 y 250 °C respectivamente y para la temperatura del horno se empleó el mismo gradiente que en el método anterior, la relación de Split fue de 100:1. Fueron analizadas cinco extracciones con cada solvente. Siendo este método de nuestro interés por lo que se detallara el procedimiento realizado con cada uno de los solventes:

- *Extracción con éter:* a 1 gr de muestra, se añadieron 20 mL del solvente y 10 mL de hidróxido de sodio al 5 %. La mezcla se sometió a ultrasonificación por 20 min y una vez separadas ambas capas, se inyectó 1  $\mu$ L de la capa orgánica en el cromatógrafo. Como estándar interno fue empleado n-heptadecano.
- *Extracción con cloroformo:* se realizó de igual manera que la extracción con éter pero como estándar interno fue empleado quinolina.

- *Extracción con hexano:* a 1 gr de muestra, se añadieron 40 mL del solvente y 10 mL de hidróxido de sodio 6N. La mezcla fue agitada por 60 min, posteriormente ambas capas fueron separadas y 1  $\mu$ L de la capa orgánica fue inyectada en el cromatógrafo. Como estándar interno fue usado n-heptadecano.

Los resultados obtenidos por ambos métodos, pueden ser observados en la Tabla 10. En base a ellos, los investigadores concluyen que pueden ser comparados favorablemente, en especial si se compara el porcentaje de nicotina obtenido por el método DSP-GC-MS con el porcentaje obtenido por la extracción con cloroformo, siendo estos bastante similares. Sin embargo, estos investigadores opinan que el método DSP-GC-MS tiene algunas ventajas sobre los métodos de extracción por solvente, dentro de las cuales están: mayor rapidez de análisis, menos tedioso y que no requiere del uso de solventes para la determinación de la nicotina en el tabaco por lo que puede considerarse un método menos peligroso.

**Tabla 4. Contenido de nicotina en tabaco Koreano B10 usando DSP-GC-MS y método de extracción por solvente.**

Método	DSP	Éter	Cloroformo	Hexano
Nicotina (%)	1,95	1,87	1,96	1,66
	1,92	1,89	1,99	1,71
	2,00	1,83	1,95	1,62
	1,93	1,95	1,98	1,62
	1,98	1,82	1,99	1,63
Promedio	1,96	1,87	1,98	1,65
s	1,9	2,7	0,91	2,3

**3.6. Stanfill Stephen B, Zhang Ligin, Jia Lily T, Lawler Tamka, Watson Clifford H. y Ashley David L. en enero del año 2009** <sup>16</sup>, determinaron los niveles de nicotina total, nicotina no protonada, pH y cinco nitrosaminas específicas del tabaco en 57 productos internacionales seleccionados, dentro de los cuales se encuentran 5 marcas de chimó Venezolano. La nicotina total fue cuantificada empleando cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS); para ello las muestras de chimó fueron preparadas mediante el protocolo estándar CDC, empleando un tiempo de extracción de 4 horas con 50 mL de metil-erbutil-éter a 1 g de tabaco y usando quinolina como estándar interno; este ensayo analítico fue realizado por triplicado para todas las muestras. El pH fue medido con un electrodo de pH estándar y un pH metro Pinnacle M545P en agua destilada desionizada y la determinación de nicotina no protonada se realizó empleando la ecuación de Henderson-Hasselbalch, recurriendo a los resultados de nicotina total y pH de las muestras.

Las muestras analizadas, presentaban grandes diferencias en su apariencia física y los resultados obtenidos indicaron que varían considerablemente en pH, contenido de nicotina total y de nicotina no protonada. Los niveles de nicotina total, presentaron una variación de 0,16 - 34,12 mg/g, en algunas marcas estos niveles se encontraron por debajo del límite de detección por lo que fueron reportados como no detectados. La nicotina no protonada, osciló entre 0,00129 - 29,1 mg/g y los niveles de nitrosaminas específicas del tabaco abarcaron niveles de más de 5 órdenes de magnitud. En la tabla que se muestra a continuación (Tabla 5) se reportan los resultados obtenidos para las 5 diferentes marcas comerciales de chimó Venezolano analizadas.

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

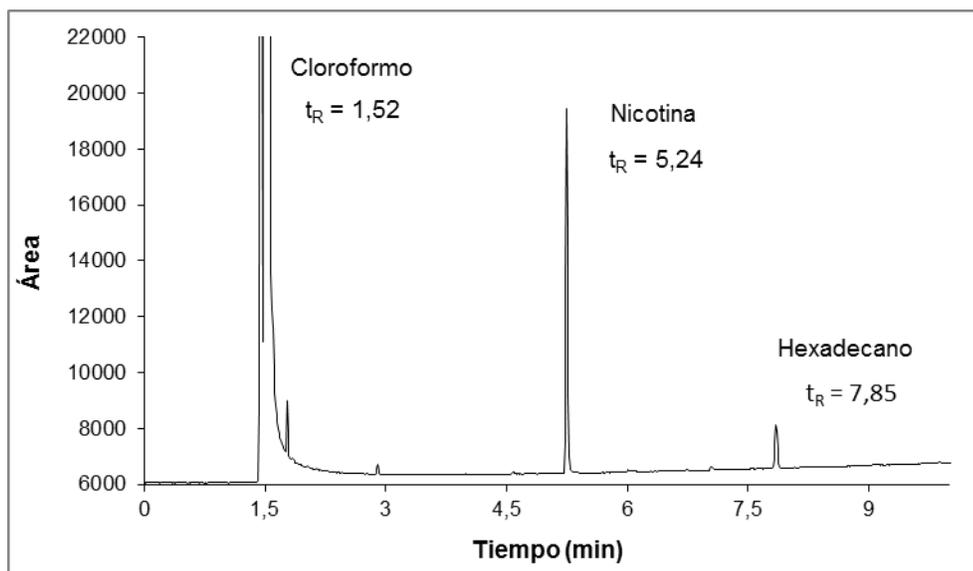
Muestra	pH $\pm$ s	Nicotina $\pm$ s (mg/g)	Nicotina no protonada (%)	Nicotina no protonada (mg/g)
Chimó Vencedor	6,98 $\pm$ 0,09	16,13 $\pm$ 0,19	8,18	1,32
Chimó El Tigrito	8,56 $\pm$ 0,03	10,39 $\pm$ 0,33	77,2	8,02
Chimó La Chinata	9,04 $\pm$ 0,01	30,13 $\pm$ 2,24	91,1	27,4
Chimó El Tabacote	9,12 $\pm$ 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

**3.7 Carrillo Ángela y colaboradores en el 2012<sup>17</sup>** desarrolló un método de análisis de Nicotina en tabaco sin humo, (Chimó), en algunas marcas de consumo nacional, incluyendo en esta la marca de más comercialización, el Tigrito. La caracterización de dicho alcaloide se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases con un detector de FID dentro del laboratorio de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela.

Este método consistió en dos etapas fundamentales, la etapa de tratamiento de muestra y la etapa de análisis cromatográfico. En cuanto al tratamiento de muestra este se realizó de la siguiente manera: se pesaron aprox 0,15 g de muestra, a esto se le adicionó 10 g de NaOH al 5 % (p/v) y se procede a agitar en baño de ultrasonido por un periodo de 60 min. Posterior a esto se realizó la extracción en el cloroformo, agregándole al extracto acuoso 20 mL de dicho solvente el cual incluía un estándar interno (hexadecano) de concentración conocida y colocando nuevamente en un baño de ultrasonido por un periodo de 60 min mas 3 min con agitación mecánica, se dejó reposar y se procedió al análisis por cromatografía.

El análisis cromatográfico se realizó utilizando un Cromatógrafo, modelo Trace GC de Thermo Finnigan. Detector de ionización a la llama (FID) el cual posee una Columna

capilar DB-5 de Agilent Technologies (J&W Scientific) ,30 metros de longitud, 0,32 milímetros de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor pelicular, comúnmente empleada para propósitos de baja polaridad, compuestos cíclicos, aromáticos, drogas, fenoles, hidrocarburos aromáticos, pesticidas, herbicidas con un rango de temperatura -60 a 325/350  $^{\circ}\text{C}$  (-76 a 617/662  $^{\circ}\text{F}$ ). Se desarrolló un gradiente de temperatura de 100 a 250  $^{\circ}\text{C}$  a una rampa de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Se utilizó inyección manual de 1  $\mu\text{L}$  aproximado de volumen de muestra, con una relación de división de flujo en el inyector de 50:1 y un flujo a la entrada de la columna de 1,5 mL/min. El gas de arrastre fue nitrógeno de alta pureza. La temperatura del inyector y del detector fue de 250  $^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Un cromatograma típico del análisis se muestra a continuación:



**Fig. 9** Cromatograma típico de la técnica de análisis para la determinación de nicotina en chimó.

Como resultado de esta investigación se obtuvo la caracterización de 5 marcas de chimó de producción nacional como se refleja en la siguiente tabla:

**Tabla 6. Concentración de nicotina en marcas de Chimó de producción nacional.**

<b>Marca</b>	<b>Nicotina (mg/g)</b>	<b>s</b>	<b>CV</b>
<b>Chain</b>	3,3	0,1	2
<b>El Águila</b>	9,0	0,4	4
<b>El Tigrito</b>	11,3	0,2	1
<b>San Francisco</b>	14,1	0,1	1
<b>San Benito</b>	21,1	0,5	2

#### **4.- OBJETIVOS**

##### **4.1.- Objetivo General:**

El objetivo fundamental de este estudio, fue optimizar un método para la extracción y análisis del alcaloide mayoritario (nicotina), presente en los tabacos sin humo, (chimó) de mayor consumo nacional.

##### **4.2.- Objetivos Específicos:**

- ***Revisión y ajuste del método cromatográfico:***

Consistió en la revisión y estudio del método por cromatografía de gases que desarrollado por Carrillo y colaboradores, para la determinación de nicotina. Evaluadas las condiciones de operación, se reajustaron para lograr la optimización de las mismas. Bajo las condiciones cromatográficas mejoradas, se evaluaron las figuras de merito de la técnica de medida, como reproducibilidad, límite de detección y cuantificación, rango dinámico lineal, etc.

- ***Revisión y ajuste del método de extracción de la nicotina en el chimó:***  
Consistió en el estudio y evaluación del método para la extracción de nicotina en chimo, que previamente desarrollado por Carrillo y colaboradores. Debido a que no se dispuso de un estándar certificado de chimó, fue necesario asistirse de una muestra modelo para efectos de comparación de los resultados. Se realizaron diferentes modificaciones experimentales en función de optimizar la calidad de la extracción y los tiempos de análisis.
- ***Evaluación de la metodología extracción-análisis cromatográfico:***  
Consistió en la determinación de las figuras de merito analíticas de la metodología en extracción-análisis cromatográfico, como reproducibilidad, exactitud a través del porcentaje de recuperación, límite de detección y cuantificación, etc. Para ello se empleó la muestra modelo.
- ***Análisis de muestras comerciales:***  
Con la nueva metodología de extracción-análisis cromatográfico se determinó la concentración de nicotina en las diferentes marcas comerciales

venezolanas y los resultados fueron comparados con las determinaciones realizadas por otros autores.

## 5.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 5.1.- Materiales empleados

#### Equipos

- Cromatógrafo, modelo Trace GC. Thermo Finnigan. Detector de ionización a la llama.
- Columna capilar DB-5. Agilent Technologies (J&W Scientific), 30 metros de longitud, 0,32 milímetros de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor pelicular. Rango de temperatura -60 a 325/350 °C. Fase estacionaria: cross-linked/surface bonded 5% phenyl, 95% methylpolysiloxane.
- Agitador de disoluciones, modelo Maxi Mix Plus. Thermolyne,
- Ultracentrifuja, modelo ICE Central CL2. Thermo Electron Corporation.
- Ultrasonido, modelo 8890. Cole - Parmer.
- Freezer, modelo Forma. Thermo Electron Corporation. Rango de temperatura de 0 - 30 °C.

#### Reactivos

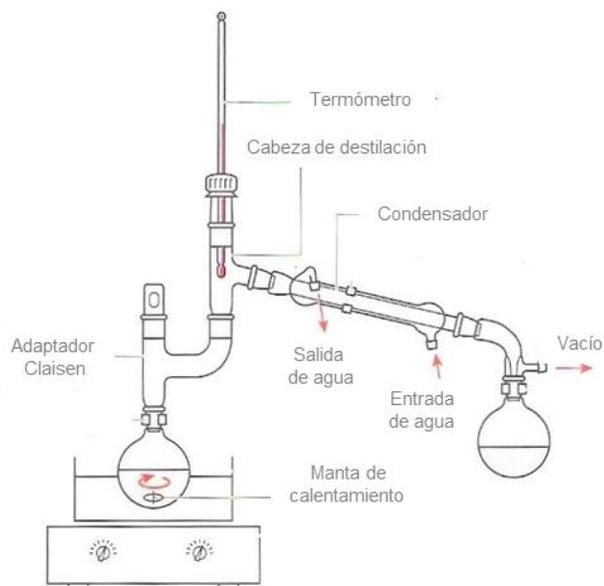
- Gases  $\text{N}_2$   $\text{H}_2$  y Aire de alta pureza. AGA gases industriales de Vzla.
- Heptadecano ( $\text{C}_{17}\text{H}_{36}$ ). Calidad CG. Poly Science Corp.
- Heptano ( $\text{C}_7\text{H}_{16}$ ). Grado CG, 99,9 %. Burdick & Jackson.
- Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ). Contiene 1 % de Etanol. Grado CG, 99,98 %. Merck.
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Grado CG, 99,9 %. Merck.
- Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ). 99,5 %. Merck.
- Hidróxido de potasio (KOH). 99 %. Merck.
- Cloruro de Sodio (NaCl). 99,8 %. Fisher Scientific.

- Agua grado 18 MΩ. Desionizador: Barnstead / Thermolyne.
- Patrón de Nicotina (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>) al 99 %. Sigma - Aldrich.

### **Purificación del patrón de nicotina**

A pesar de que partimos de un estándar de nicotina de alta pureza, este compuesto tiende a descomponerse en el tiempo, siendo evidenciado por un cambio de coloración (de incoloro a un tono amarillento), por lo tanto, se recomienda su empleo recién destilado<sup>2,18</sup>. Se procedió a purificarlo mediante una destilación a presión reducida, tal y como se muestra en el montaje esquematizado en la figura 10.

Posteriormente, y para su conservación, el estándar fue almacenado en un recipiente de vidrio ámbar y mantenido a una temperatura de -21 °C hasta el momento de emplearlo, donde se deja reposar hasta llegar a la temperatura ambiente. El procedimiento de destilación se realizó cada vez que se consideró necesario.



**Figura 10. Montaje de destilación a presión reducida.**

## Muestras de Chimo

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

– **Matheus**

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

– **San Benito (Caja y bolsita)**

Suarez Q. La Fría, Edo. Trujillo. RIF V-10038223-3

– **Chain**

Sabor criollo. La Fría, Edo. Trujillo-Valera. Rif V-02614464-3

– **San Francisco**

– **Matheitos**

Luis Matheus, Valera, Edo. Trujillo. RIF V-04058878-3

– **Tigrito II**

Auelino Molina, Vía Quibor, Edo. Lara. RIF J-09028158-4

– **Tigrito Ice**

Avelino A. Molina, Barquisimeto, Edo. Lara. RIF J-09028158-4

– **El Águila**

Mendoza. La Fría, Edo. Trujillo

Marcas adquiridas en una distribuidora en San Felipe, Edo. Yaracuy:

– **Taparo**

Hnos. Gutiérrez Prado. Comercializado por Dist. El Cacique CA. RIF J-30517242-0

– **La Chinata**

La Chinata C.A. 0273-5325948, Edo. Barinas.

## **5.2.- Estudio y ajustes del método de referencia<sup>17</sup> para la determinación de nicotina en chimó**

El objetivo básico de este estudio, fue el ajusté de un método de extracción y medida para la determinación de nicotina en tabaco sin humo de consumo nacional (Chimó). El método a optimizar había sido previamente elaborado en nuestros laboratorios y por cuestiones prácticas en el desarrollo del presente manuscrito lo llamaremos “método de referencia”.

El método de referencia fue descrito en dos etapas, la primera correspondiente al método de tratamiento de muestra y la segunda a la medida de nicotina por una técnica

cromatográfica. A continuación mientras esbozamos ambas etapas, iremos mostramos los ajustes realizados a algunas de las condiciones operativas, comenzando con la técnica de medida y seguidamente con el método de tratamiento de muestra.

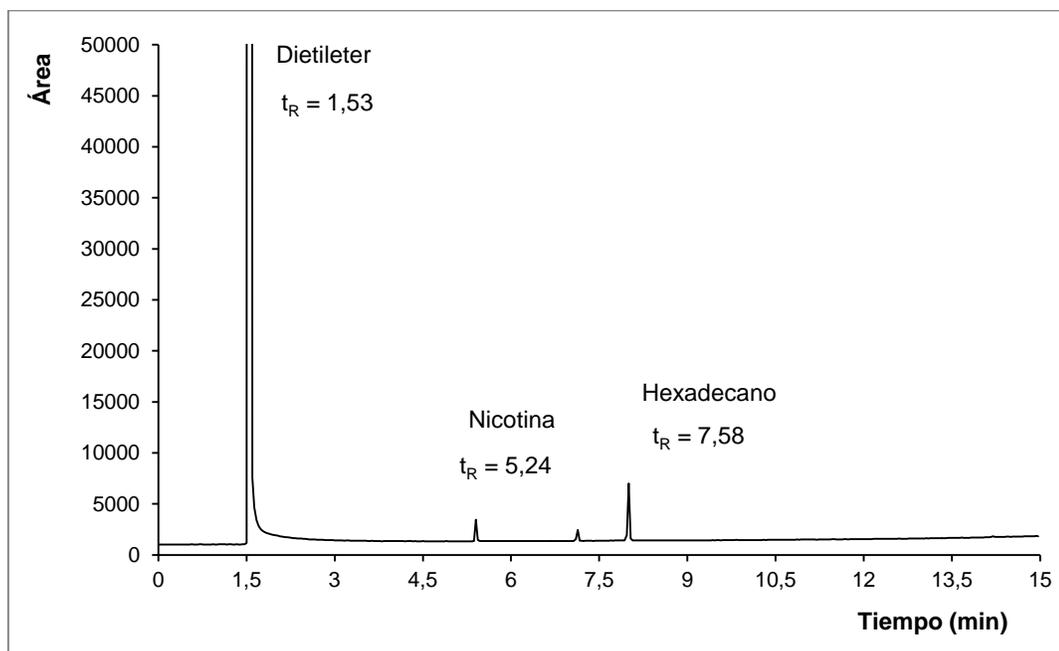
### **5.2.1.- Ajuste de las condiciones cromatográficas**

Posterior a la extracción de nicotina de la muestra de chimo, el método de referencia reporta el análisis de dicho compuesto por la técnica de cromatografía de gases. Para ello, se dispuso de un Cromatógrafo con detector de ionización a la llama, el cual dispone de un divisor de flujo en la cámara de inyección (Split, del inglés divisor). Un resumen de las condiciones cromatográficas descritas en el método de referencia se muestra a continuación:

*Se usó una columna capilar de polaridad baja, comúnmente empleada para propósitos generales (DB-5 de Agilent Technologies, 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor pelicular). Se desarrolló un gradiente de temperatura de 100 a 250  $^{\circ}\text{C}$  a una rampa de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Se utilizó inyección manual de 1  $\mu\text{L}$  aproximado de volumen de muestra, con una relación de división de flujo en el inyector de 50:1 y un flujo a la entrada de la columna de 1,5 mL/min. El gas de arrastre fue nitrógeno de alta pureza. La temperatura del inyector y del detector fue de 250  $^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Para el ajuste de las condiciones cromatográficas se empleó un patrón de nicotina recién destilado y el análisis cuantitativo implicó el empleo del método de estándar interno.*

Un cromatograma típico del análisis se muestra en la figura 11. Se reportó un tiempo total de la corrida cromatográfica de unos 20 minutos por muestra, incluyendo el tiempo

de equilibrio de la columna (15 minutos del gradiente a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 4 minutos isotérmicos a  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 1,0 minuto de equilibrio).



**Fig.11.- Cromatograma típico del ensayo cromatográfico de referencia**

La primera banda corresponde al solvente de extracción con un  $t_R$  de 1,53 minutos (diétiléter), la segunda banda a la nicotina con un  $t_R$  de 5,24 minutos y finalmente el estándar interno con un  $t_R$  de 7,85 minutos (hexadecano). En este ensayo asumieron que el  $t_R$  del diétiléter corresponde al tiempo muerto ( $t_M$ ), entonces el  $k$  (factor de retención) de la nicotina fue de 2,46.

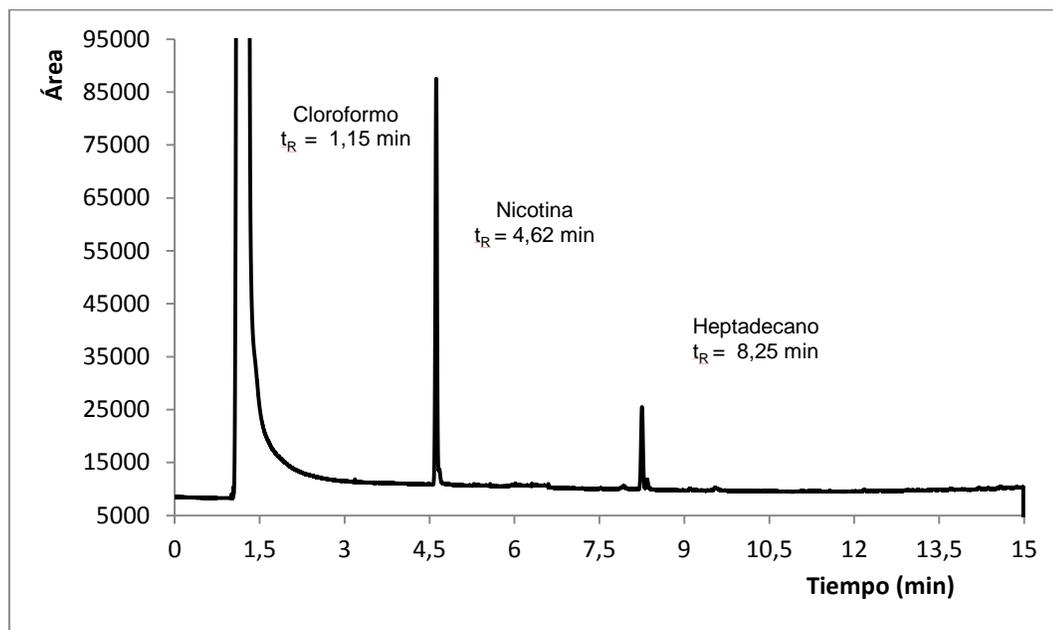
En el mismo estudio, al analizar los resultados de los reportes de las muestras reales de chimo por el ensayo de referencia, no se observaron otros compuestos de

concentración significativa antes del  $t_R$  de la nicotina y posterior al  $t_R$  del estándar interno, por lo tanto, decidimos realizar ciertos ajustes. Aumentamos el flujo en la columna de 1,5 a 2,0 mL/min respectivamente, en aras de disminuir el tiempo total de análisis y paralelamente mejorar la “cola” en las bandas. Por otra parte, con la idea de aumentar la cantidad mínima medida, procedimos a cambiar la relación de split de un valor 50:1 a 10:5. Por motivos de disponibilidad se cambió el estándar interno hexadecano por heptadecano. Las condiciones cromatográficas modificadas se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.- Condiciones cromatográficas modificadas**

<b>T Columna (rampa)</b>	<b>T Inyector</b>	<b>T Detector</b>	<b>Relación Split</b>	<b>Flujo del gas portador</b>	<b>Vol. de inyección (aprx.)</b>
<b>100 - 250 °C 10 °C/min</b>	250 °C	250 °C	10:5	2,0 mL/min	1 µL

Con las nuevas condiciones cromatográficas se procedió a inyectar patrones puros de nicotina y estándar interno disueltos en cloroformo. En la figura 12 se muestra el cromatograma obtenido.

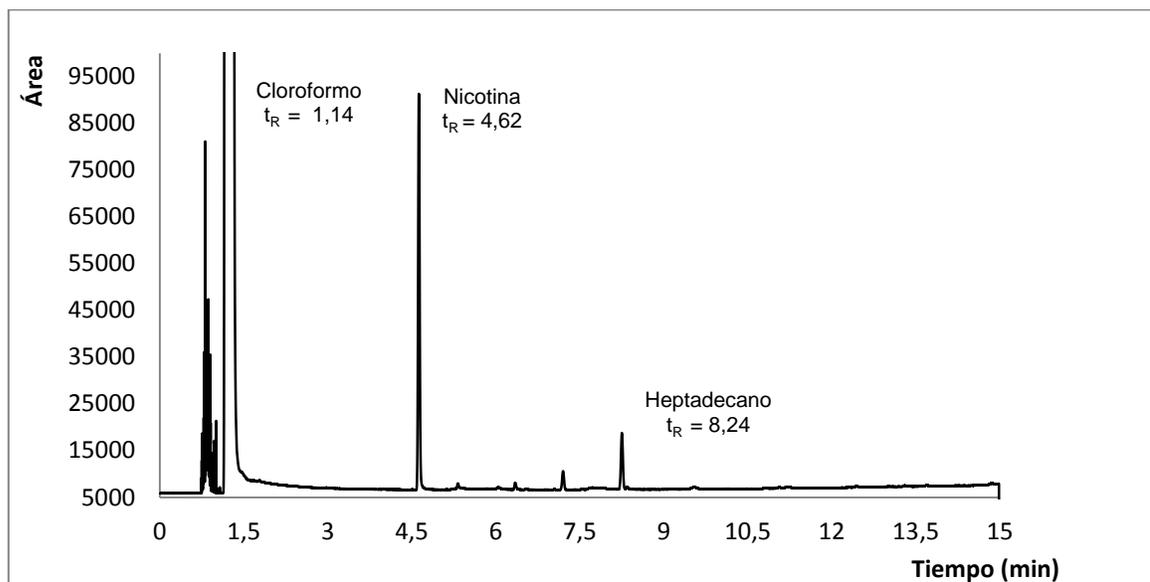


**Fig 12.- Cromatograma de patrones puros con el ensayo cromatográfico modificado**

La banda cromatográfica más significativa corresponde al solvente (cloroformo) con un  $t_R$  de 1,15 minutos, luego la nicotina con un  $t_R$  de 4,62 minutos y el estándar interno con un  $t_R$  de 8,25 minutos.

Seguidamente, se procedió a inyectar un extracto de una muestra real, con el objetivo de notar si algún componente de la muestra pudiera coeluir con los analitos de interés. El procedimiento de extracción ejecutado fue el descrito en el método de referencia y el cromatograma resultante se muestra en la figura 13.

Del análisis de una de las muestra se observaron tres bandas principales más una serie de bandas de compuestos desconocidos. Un grupo muy solapado antes del cloroformo y tres bandas menores pero bien resueltas entre el  $t_R$  de la nicotina y el heptadecano.



**Fig.13.- Cromatograma de un extracto de muestra con el ensayo cromatográfico modificado**

Las pequeñas bandas entre la nicotina y el estándar interno, se deben posiblemente a los alcaloides minoritarios, que en estas condiciones cromatográficas se alcanzan a notar por la mayor cantidad de muestra empleada en el split y por lo tanto mayor capacidad de medir compuestos minoritarios.

Previo al  $t_R$  del cloroformo se observaron una serie de bandas de compuestos desconocidos. Se escogió el de menor  $t_R$ , (0,74 min) como el valor correspondiente al  $t_M$ , resultando un factor de retención para la nicotina de 5,24. A pesar de emplear la misma columna y que el factor de retención es independiente del flujo volumétrico, este aumento con respecto al ensayo de referencia, lo anterior se debe a que en el cálculo de dicho valor se empleó una banda desconocida de menor retención, en vez del dietileter, siendo el compuesto desconocido más representativo para estimar el  $t_M$ . Por otra parte, el tiempo de análisis fue de 15 minutos más dos minutos de equilibrio, para

un tiempo total por muestra de 17 minutos, 3 minutos menos por muestra con respecto al método de referencia. Adicionalmente, se dispuso de un tiempo de equilibrio mayor, que nos pudiera mejorar la reproducibilidad, ya que disponemos de 2 minutos para llevar de 250 a 100 °C respectivamente, en vez de 1 minuto.

### ***Reproducibilidad de la técnica de medida***

Una prueba que no se realizó en el ensayo de referencia fue el estudio de la reproducibilidad de la técnica de medida. Para ello, empleamos un patrón de nicotina y estándar interno de moderada concentración y bajo las condiciones cromatográficas modificadas realizamos replicas de las inyecciones. En la tabla 8, se muestra la relación de áreas obtenidas y el estudio de la reproducibilidad cromatográfica arrojó un CV del orden del 1,5 %, el cual se considera bastante satisfactorio.

**Tabla 8.- Reproducibilidad Cromatográfica**

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

### **Curva de calibración**

En vista del cambio de la relación de split, que permitió una mayor entrada de cantidad de muestra a la columna, se decidió trabajar en un rango de relaciones de concentraciones menores a la reportada por el método de referencia (el primer punto de la curva de calibración en el método de referencia fue de 2 expresada como relación de concentraciones, correspondiente a 20 y 10 mg/Kg de nicotina y estándar interno respectivamente).

Después de numerosos ensayos tomando en cuenta la relación señal ruido, se consiguió como el menor punto de relación de concentraciones, 0,5; el cual corresponde a una concentración aproximada de nicotina de 5 mg/Kg y del estándar interno de 10 mg/kg. El valor anterior lo tomamos como el límite de cuantificación de la técnica de medida (*LOQ, Limit of Quantitation*), es decir, el primer punto de la curva de calibración medido con una precisión aceptable).

Se estableció un rango dinámico lineal aproximado de 0,5 a 10 como relación de concentraciones, que corresponde a rango de concentración de nicotina de 5 a 120 mg/Kg aproximadamente. En la tabla 9 se muestra las concentraciones finales exactas de nicotina y estándar interno empleadas para realizar la curva de calibración.

**Tabla 9.- concentración de nicotina y estándar interno.**

<b>Concentración de Nicotina (mg/Kg)</b>	<b>Concentración E.I. (mg/Kg)</b>
<b>0,0000</b>	10,4647
<b>5,3132</b>	10,8492
<b>20,4047</b>	10,4956
<b>40,7025</b>	10,5919
<b>120,0349</b>	10,4176

Bajo las condiciones cromatográficas presentadas en la tabla 9, los patrones fueron inyectados por triplicado, en la tabla 10 se muestra las réplicas de las áreas obtenida.

**Tabla 10.- Relaciones de concentración Vs relación de áreas**

<b>Relación de concentraciones (Nicotina / E.I.)</b>	<b>Relación áreas (Nicotina / E.I.)</b>
0,000	0,00
0,000	0,00
0,000	0,00
0,490	0,26
0,490	0,27
0,490	0,29
1,944	1,14
1,944	1,17
1,944	1,19
3,843	2,29
3,843	2,33
3,843	2,32
11,522	7,12
11,522	7,07
11,522	7,08

Seguidamente se realizó la curva de calibración mediante un ajuste de regresión lineal por mínimos cuadrados. La curva ajustada se muestra en la figura 14 y el análisis de residuales en la figura 15.

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

excepción de un residual que está en el orden de los -0,06. En todo caso, es menor que el reportado por el método de referencia, que oscilaba entre - 0,1 y 0,1.

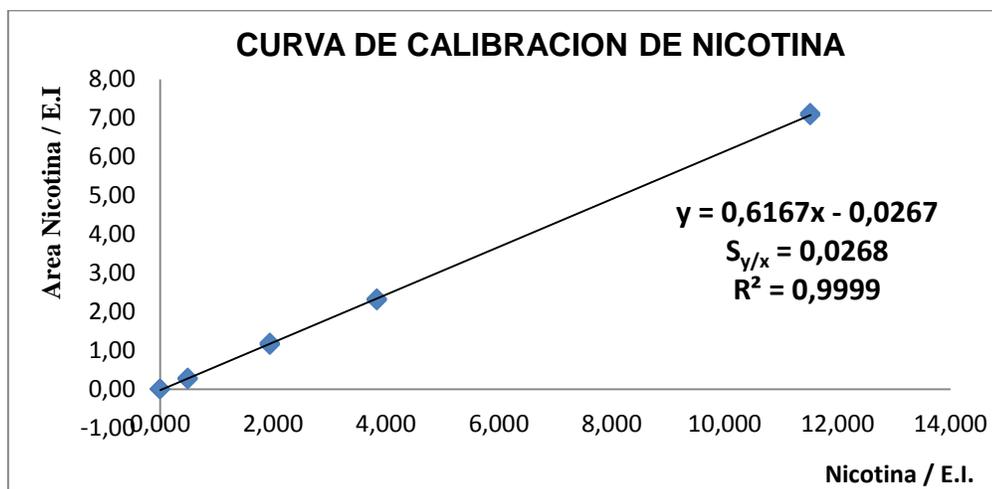


Fig.14.- Curva ajustada por regresión lineal por mínimos cuadrados

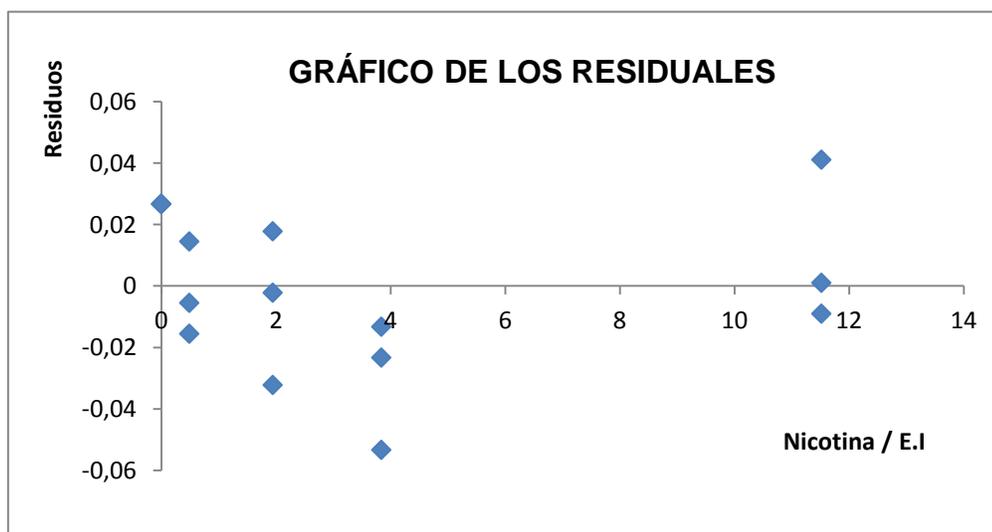


Fig.15.- Análisis de residuales

La ecuación de la recta fue  $y = 0,6167 x - 0,0267$ , con un error típico de 0,0268. La sensibilidad de la técnica medida a través de la pendiente es muy parecida a la del método de referencia (0,6167 Vs 0,7488). Esto es de esperar ya que en ambas situaciones se empleó el método de estándar interno y los cambios que le ocurren a la señal de nicotina le suceden en la misma proporción al estándar interno, por lo tanto la relación de áreas casi no se ve afectada y consecuentemente la pendiente varió muy poco.

### ***Límite de detección de la técnica de medida***

Basándonos en la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal, se procedió a realizar el cálculo del límite de detección (*LOD, Limit of Detection*) de la técnica de medida. Para ello, empleamos la siguiente expresión para el cálculo de la señal del límite de detección ( $y_{LOD}$ ):

$$y_{LOD} = PC + Z S_{y/x}$$

Donde PC es el punto de corte de la ecuación de la recta desarrollada por mínimos cuadrados,  $S_{y/x}$  es la desviación estándar de dicha regresión o error típico y escogimos 3 para el valor de z, de manera tal que:

$$y_{LOD} = - 0,0267 + 3 (0,0268) = 0,0537$$

Al sustituir el valor de  $y_{LOD}$  en la ecuación  $y = 0,6167 x - 0,0267$ , el LOD fue de 0,13 expresado en relación de concentraciones. Para una concentración del estándar interno de 10 mg/Kg, corresponde una concentración de nicotina de 1,3 mg/Kg. Redondeando concluimos que el LOD de la técnica de medida está en el orden de 1 mg/kg.

No hay que perder de vista que el LOD anterior, corresponde al límite de detección de la técnica de medida, no incluye la etapa correspondiente al tratamiento de la muestra. Sin embargo, el valor obtenido es de sumo interés, ya que nos permitió estimar el LOD de metodología completa, claro está, asumiendo que nos valiéramos del procedimiento de tratamiento de muestra establecido en el método de referencia. Dicho procedimiento lo vamos a describir a continuación:

- Para la estimación del LOD del metodología completa, partimos del hecho que en la etapa correspondiente al tratamiento de la muestra el método de referencia reporta el empleo de 0,15 g de muestra, seguida de una extracción-disolución en 10 mL de hidróxido de potasio al 5 %. Finalmente los 10 mL del extracto acuoso anterior, se ponen en contacto con 20 mL de cloroformo para la extracción final de la nicotina. En este último extracto es que se realiza la determinación cromatográfica.
- En los 14 g del extracto orgánico es donde se ejecuta la determinación cromatográfica y en el cual deberíamos encontrar la concentración correspondiente al LOD de la técnica de medida (1 mg/Kg). Es decir que en los 14 g del extracto orgánico deberían estar 0,014 mg de nicotina.

- Los 0,014 mg de nicotina deben haber migrado de los 10 mL de la fase acuosa, que a su vez provienen de la cantidad de muestra sólida original.
- Los 0,014 mg llevados a los 0,15 g de muestra, corresponde a un límite de detección de la metodología completa extracción-análisis del orden de los 0,1 mg/g. Hay que hacer notar, que todos los cálculos anteriores parten de que el porcentaje de recuperación fue del orden del 100 %, es decir, que no hay pérdidas del analito de interés en el procedimiento de tratamiento de muestra.

En conclusión con las nuevas condiciones cromatográficas y partiendo del hecho que pudiéramos seguir el mismo tratamiento de muestra al reportado por el método de referencia, el LOD de metodología completa debe estar en el orden de los 0,1 mg/g.

Sin embargo, el límite de detección es una figura de mérito que nos permite apreciar la cantidad mínima detectable, más no medible con precisión aceptable. La figura de mérito que nos permite reportar un valor con una precisión razonable es el LOQ. El análisis anterior igualmente puede ser realizado para estimar el LOQ de la metodología completa extracción-análisis. Partiendo que el LOQ de la determinación cromatográfica fue 5 mg/Kg, el LOQ de la metodología completa resultó 0,5 mg/g.

Este último valor nos permitió en experiencias subsiguiente tomar decisiones en cuanto a las posibilidades de modificaciones del método de tratamiento de muestra, especialmente para no hacer factores de dilución que nos condujera a valores de concentración por debajo de 0,5 mg/g.

Tomando en cuenta las nuevas condiciones cromatográficas y todos los detalles descritos en esta etapa, lo siguiente correspondió a la modificación del método de tratamiento de muestra.

### **5.2.2.- Ajuste de la metodología de tratamiento de muestra**

#### **Muestra modelo de chimó**

En la exposición del método de referencia se hace reseña a la preparación de una muestra de referencia, lo cual se planteó de la siguiente manera:

*“Al no disponer de un patrón certificado de nicotina en una matriz con las características físico-químicas del chimó, se procedió a elaborar una muestra de referencia o muestra modelo, que aunque no se conoce la concentración exacta de nicotina en la misma, nos puede servir como sistema de comparación entre metodologías y técnicas de análisis”.*

En el presente trabajo se partió del mismo hecho y el procedimiento para su elaboración se modificó ligeramente. Se muestra a continuación:

Se empleó la marca de mayor consumo y comercialización nacional “El Tigrito”, y con el objetivo de disponer de suficiente cantidad, se procedió a homogenizar una porción conformada por 10 latas de 18 g cada una (no hubo garantías de que se trataran de un mismo lote). Para su elaboración las diferentes latas se sometieron a un baño de vapor (calentamiento indirecto por convección térmica) para hacerlas más blandas y

maleables con el objetivo de mezclarlas y homogeneizarlas. En vez de denominarla muestra de referencia se decidió llamarla “*muestra modelo*”, para evitar confusión con el término empleado para el método de referencia.

Para manipular la muestra modelo en el momento de realizar los análisis, con el objetivo de disponer de la cantidad requerida, había que someterla a calentamiento en baño de vapor. Se notó que al emplear repetidamente este procedimiento, la muestra fue cambiando su apariencia física. Se iba haciendo más viscosa, 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 lleva un alto contenido de melaza. Estos cambios en la composición del chimo pudieran afectar los futuros resultados.

Para remediar la situación anterior, se decidió calentar la muestra modelo solo una vez y aprovechar el calentamiento para fraccionarla en las cantidades aproximadas requeridas para los análisis. De manera tal de no someterla a reiterados calentamientos. Las porciones de la muestra modelo fraccionada fueron conservadas en refrigeración, hasta el momento de los análisis.

### **Método de referencia**

El método de referencia del cual partimos como base para el análisis de la nicotina en chimó fue descrito de la siguiente manera:

*Se pesó 0,15 g aproximadamente de chimó, el cual se extrae en una primera etapa en 10 mL de una disolución de hidróxido de potasio al 5 % (p/v). A manera de disgregar la muestra en su totalidad esta fue colocada por un periodo de 60 min*

*en ultrasonido y posteriormente en agitación mecánica por 3 min. La siguiente etapa consistió en adicionar a la disolución acuosa 20 mL de cloroformo como solvente orgánico, el cual contiene una cantidad conocida de estándar interno. Para la extracción final se colocó la muestra en ultrasonido por un periodo de 60 min con 3 min adicionales de agitación mecánica.*

Al tratar de reproducir el procedimiento anterior en las diferentes muestras de chimó se presentaron diversas dificultades. En especial dos pasos críticos y relativamente lentos, las cuales separamos en dos etapas, para proceder a abordarlos:

1<sup>ra</sup> etapa. Disgregación de la muestra y disolución de la nicotina en el solvente acuoso (hidróxido de potasio al 5 %). Este proceso demora 1 hora en el mejor de los casos, ya que existen muestras de muy difícil disgregación, que evitan la disolución de la nicotina. El chimo en la mayoría de los casos es una sustancia muy densa, pastosa y viscosa, por lo cual una alícuota de muestra forma una especie de bola compacta de difícil disgregación, inclusive con ultrasonido.

2<sup>da</sup> Etapa. Extracción de la nicotina en el solvente orgánico (cloroformo). El tiempo para llevarla a cabo fue más dramático que en la primera etapa, ya que la mayoría de las muestras forman emulsiones estables muy difíciles de romper.

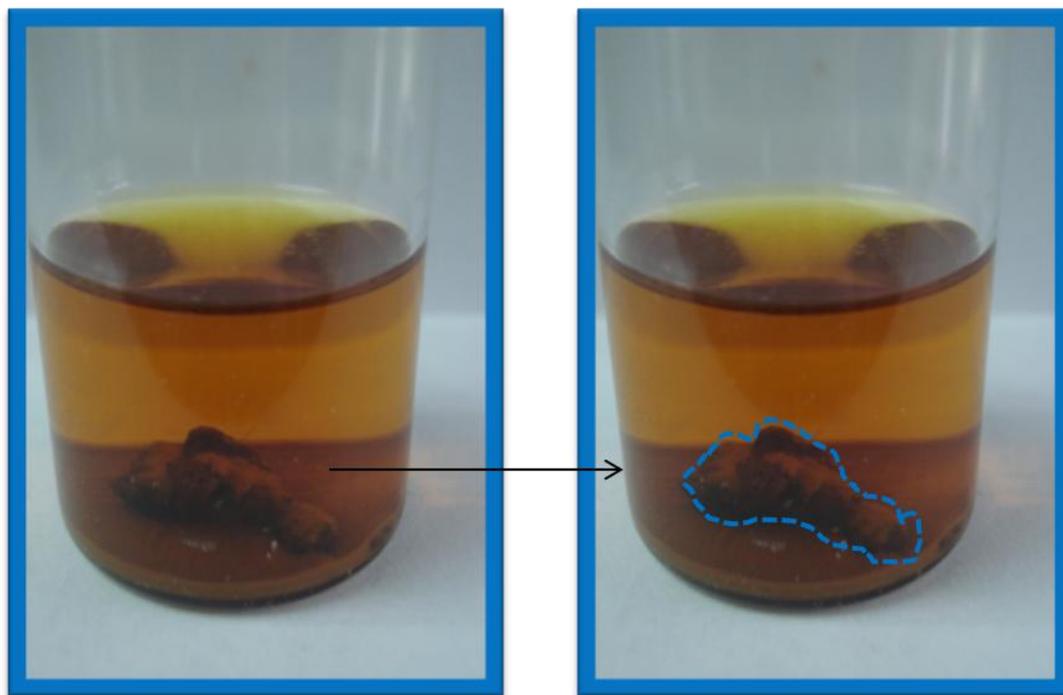
De lo puntualizado en los párrafos anteriores, nos enfocamos en la optimización de ambas etapas.

### **Ajuste de la etapa de la disgregación de la muestra y disolución de la nicotina**

Para abordar esta etapa decidimos emplear un método que logramos obtener a través del Instituto Nacional de Higiene, Rafael Rangel. Fue desarrollado para el análisis de derivados del tabaco por la Organización Salud de Canadá (Health Canada) en la norma Test Method T-301<sup>13</sup>.

En resumen, la norma plantea realizar la disgregación de la muestra y extracción de la nicotina en un solo paso. Para ello la norma establece pesar 25 mg del derivado del tabaco previamente seco (liofilizado) y extraerlo en 1 mL de una disolución de hidróxido de potasio en metanol (0,05 N). Se coloca en un baño de ultrasonido por 3 horas.

Al someter la muestra de chimó al procedimiento descrito, el sólido fue muy poco disgregado y por consiguiente no había suficiente disolución de la nicotina. En la figura 16 se observa una fotografía de la muestra en metanol- hidróxido de potasio, donde se nota el sólido en líneas punteadas muy poco disgregados.



**Figura 16. Fotografía de la extracto de chimo en KOH en metanol, resaltando la muestra**

Dado el resultado obtenido, se procedió a liofilizar la muestra de chimó tal y como establecía la norma Salud de Canadá, con la idea de observar si aumentaba la disgregación y solubilidad de la nicotina en metanol-hidróxido de potasio.

Los ensayos revelaron que se requirió de unas 48 horas para liofilizar completamente la muestra, en la figura 17 se presenta una fotografía en pleno proceso de liofilización.



**Fig .17** Proceso de liofilización de la muestra.

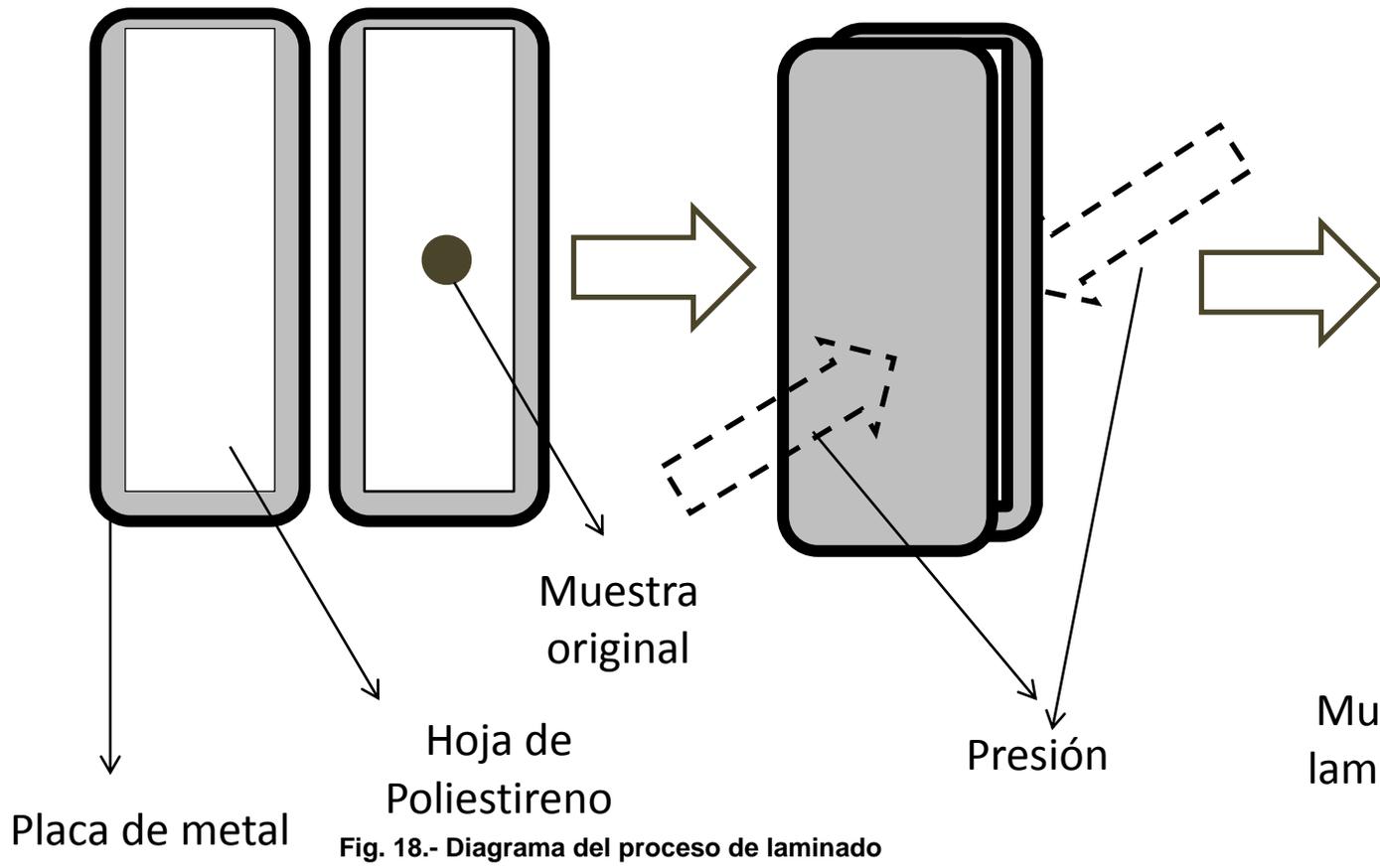
La liofilización permitió la fácil disgregación de la muestra, ya que al eliminar el contenido de agua en la misma, pudo ser posteriormente pulverizada. Sin embargo, dicha pulverización debía hacerla lo más rápido posible ya que la muestra reabsorbía humedad y su consistencia se volvía pastosa.

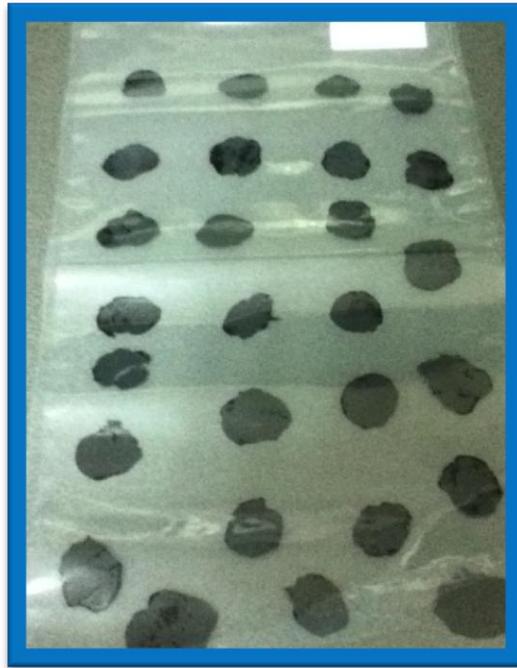
Finalmente, se pesó una cantidad de la muestra pulverizada y se colocó en 10 mL de una disolución de hidróxido de potasio-metanol, por una hora en agitación con ultrasonido. Se observó que aunque la suspensión se tornaba más amarillenta que el caso anterior (sin liofilizar), todavía se mantenida abundante cantidad compuestos disgregados sin disolver.

Los resultados obtenidos nos llevan a concluir que la muestra era poco soluble en metanol y por otra parte, un tiempo de secado de 48 horas por muestra es poco práctico, por lo tanto, descartamos el método en cuestión. La menor solubilidad del chimo en metanol tiene sentido, ya que el mismo es fabricado en un extracto netamente acuoso. Por otra parte, la norma establece el análisis para derivados del tabaco en forma de hojas, picaduras, polvo o matrices muy similares, no para una matriz tan compleja y diferente como la pasta de Chimo.

Una idea que surgió de la liofilización de la muestra, fue que al pulverizarla se hizo más fácil la disgregación, debido a una mayor área superficial. Por lo tanto, si lográbamos aumentar el área superficial de la muestra original podríamos disgregarla más fácilmente y proseguir con el método de referencia, que emplea hidróxido de potasio en disolución acuosa al 5 %. Se nos ocurrió laminar las muestras.

Para ello, una porción de la muestra modelo fue colocada entre dos rectángulos metálicos con superficies altamente planas, las cuales estaban cubiertas de unas hojas de polietileno de alta densidad, tal y como se muestra en la figura 18. Se colocó una porción de la muestra entre ambas superficies y se sometió a compresión en una prensa manual. Una fotografía de las muestras laminadas se muestra en la figura 19.





**Fig. 19- Fotografía de un grupo de muestras laminadas.**

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

Para proseguir con el ensayo, las muestras fueron desprendidas de las hojas de polietireno con una lanceta. Fueron pesadas y sometidas al proceso de extracción acuosa de hidróxido de potasio al 5 %, asistida con ultrasonido. Los resultados fueron muy adecuados, la disgregación y disolución fue bastante inmediata y satisfactoria, sin embargo, siempre quedó una cantidad pequeña de residuos sólidos en suspensión. Al analizarlos en detalle, notamos que posiblemente se trataba de partículas muy pequeñas de carbón y silicatos insolubles, aunque en los primeros 5 minutos la muestra modelo estaba prácticamente disuelta, se dejó por un lapso de 15 minutos para asegurar su completa disolución. Se ahorró 45 minutos con respecto al método de referencia.

La 1<sup>ra</sup> etapa quedo establecida de la siguiente manera:

- La muestra debe ser previamente laminada mediante una prensa y conservadas en refrigeración entre dos láminas de poliestireno hasta el momento de su análisis.
- Un peso determinado de la muestra laminada es colocada en 10 mL de hidróxido de potasio al 5 % (p/v), para luego ser asistida con ultrasonido por un periodo de 15 minutos.

Resuelto el inconveniente de la primera etapa, se enfocó en la problemática de la segunda, la extracción de la nicotina del solvente acuoso hacia el orgánico.

### **Ajuste de la etapa extracción de la nicotina a la fase orgánica**

La etapa consiste en extraer la nicotina de la fase acuosa a una fase orgánica para poder ser medida por cromatografía de gases. Se observó que en la mayoría de las muestras la capa acuosa y el cloroformo formaban una fuerte emulsión que tardaba mucho tiempo en romper.

Para tratar de resolver el problema anterior, se invirtió mucho tiempo en un conjunto de experiencias que no arrojaron resultados positivos en un tiempo razonable. Alguno de

ellas fueron: emplear modos de agitación menos intensos, centrifugación, filtración, efecto salino, añadir compuestos orgánicos para romper la emulsión, etc, etc.

Por otra parte, al analizar con detalle la muestra modelo disuelta en hidróxido de potasio y cloroformo, se observó que el ligero residuo sólido se situaba en la inter-fase de ambas capas inmiscibles, dándole mucha estabilidad a la emulsión.

Para corregir esta situación decimos que una vez que la muestra era disgregada y disuelta en hidróxido de potasio, someterla a centrifugación a alta velocidad, para tratar de llevar el sólido al fondo de la disolución. Para ello, los 10 mL de la muestra proveniente de la primera etapa fueron centrifugados a 5000 vueltas por minuto, durante 15 minutos.

Una vez centrifugados, una alícuota de 5 mL fue aspirada del sobrenadante, teniendo mucho cuidado de no contaminar con algún sólido. Seguidamente se añadió en un recipiente que contenía una alícuota de 20 mL de cloroformo. La muestra fue agitada en ultrasonido durante 15 minutos y se dejó en reposo para la completa separación de las capas.

Se observó que a la hora y media, las capas ya estaban prácticamente separadas, apropiadas para el análisis por cromatografía de gases. El tiempo total de esta etapa es aproximadamente de dos y media horas.

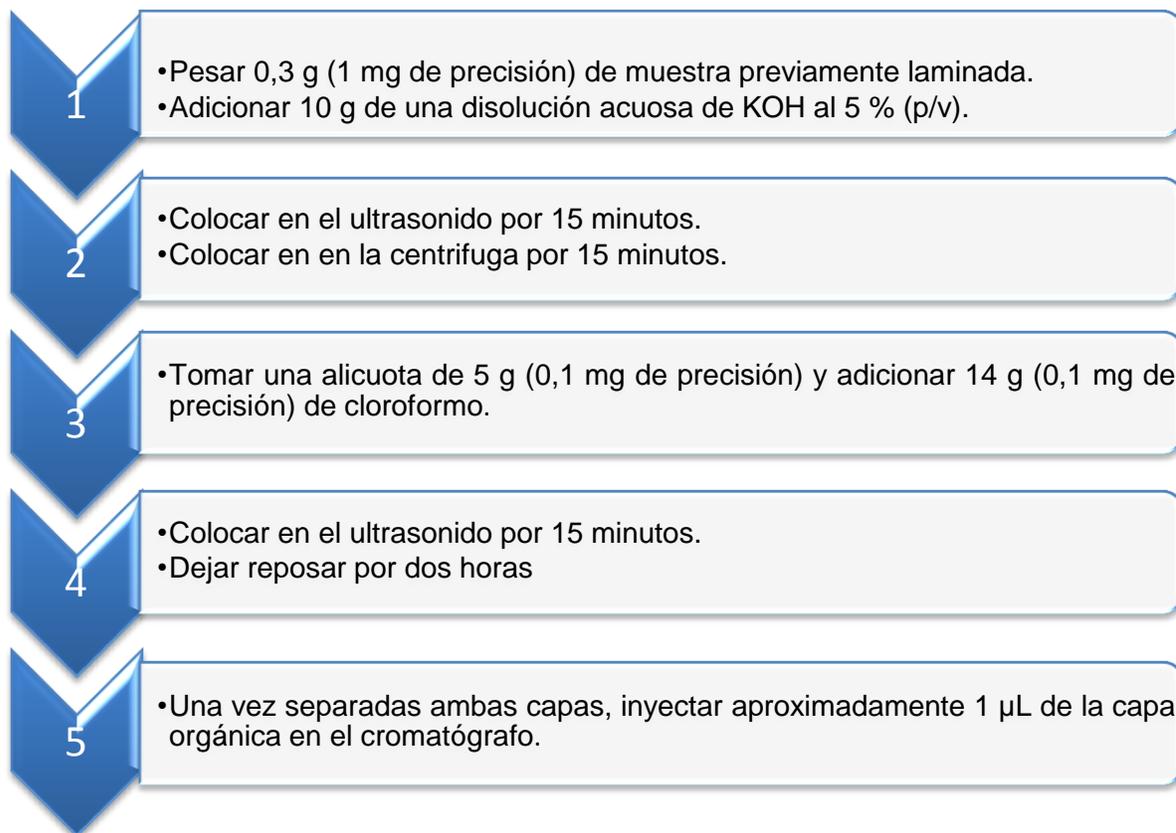
La 2<sup>da</sup> etapa quedó establecida de la siguiente manera:

- Los 10 mL de la muestra disuelta es colocada en una centrifuga a 5000 rpm durante 15 minutos.
- Se toma una alícuota de 5 mL del centrifugado acuoso y se coloca en 20 mL de cloroformo, se somete a ultrasonido por 15 minutos y se deja reposar por dos horas.
- Se realiza el análisis cromatográfico

Como podemos observar, para poder aislar los sólidos en suspensión hay una diferencia con respecto al método de referencia, que consistió en someter los 10 mL de extracto acuoso a centrifugación y por otra parte tomar solo una alícuota de 5 mL para ser sometida a la siguiente etapa de extracción con los 20 mL de cloroformo. La diferencia fundamental radica en utilizar solo la mitad del volumen del extracto acuoso para extraerlo en el solvente orgánico. Para evitar perdida tanto del LOD como del LOQ decidimos aumentar la cantidad de muestra con respecto a la establecida por el método de referencia, de 0,15 a 0,30 g respectivamente.

Se consideró que no era necesario hacer un estudio exhaustivo de la máxima cantidad de muestra que se puede emplear por volumen de extracción, ya que la mayoría de las publicaciones emplearon cantidades de por encima de 0,15 g de muestra en 10 mL de disolución (15 mg en 1 mL). Por ejemplo la norma de Salud de Canadá emplea 25 mg por mL de metanol.

Finalmente la metodología del tratamiento de muestra modificada quedó establecida de la siguiente manera (para efectos de mayor precisión todas las alícuotas de líquidos fueron medidas gravimétricamente y expresadas en gramos).



Una vez modificado el método de referencia, se procedió a estimar la precisión y exactitud del método desarrollado.

### **Estudio de la reproducibilidad del método desarrollado**

Para el estudio de la reproducibilidad del método, se realizaron tres réplicas de la muestra modelo y cada una de ellas fue inyectada por triplicado. Los resultados obtenidos son reportados en la tabla 11, encontrándose un valor promedio de 8,6 mg/g con un coeficiente de variación del 4 %.

**Tabla 11. Concentración de nicotina en la muestra modelo**

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

Vale la pena destacar 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 %. Este valor es razonable y se considera bastante satisfactorio.

### **Determinación del porcentaje de recuperación del método desarrollado**

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

Para ello se empleó 0,3072 g de la muestra modelo, se le añadió una alícuota de 0,9100 mL de un patrón de 1151 mg/Kg de nicotina. Se homogenizó y se dejó reposar por una hora, para luego someterla al procedimiento de extracción y análisis modificado. Se empleó la siguiente expresión:

$$\% R = \frac{M_{total} - M_{nativa}}{M_{spike}} \times 100$$

Donde  $M_{nativa}$  es la cantidad inicial de nicotina en la muestra modelo,  $M_{spike}$  es la cantidad de nicotina añadida a la muestra modelo y  $M_{total}$  es la cantidad total de nicotina medida. El resultado se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12. Tabla de resultados, porcentaje de recuperación.**

<b>Peso de muestra (mg)</b>	<b>Peso de nicotina nativa (mg)</b>	<b>Peso de nicotina spike (mg)</b>	<b>Peso de nicotina total (mg)</b>	<b>% de recuperación</b>
307,2	2,64	1,05	3,53	85

De la tabla anterior, los resultados indican que la exactitud del método medido a través del porcentaje de recuperación se encuentra del orden del 85 %. Menor al obtenido por el método de referencia, que fue reportado del orden del 100 %.

### **Estimación del límite de detección y cuantificación del método desarrollado**

Partiendo del hecho que el límite de detección de la técnica de análisis fue de 1 mg/kg y que el método de tratamiento de muestra ajustado establece que dicho valor debe ser

obtenido en los 14 g del extracto. 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 gr 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.

Aunque el porcentaje de recuperación fue menor al reportado por método de referencia, los valores del LOD y el LOQ obtenidos para el método modificado no difieren considerablemente y se consideran satisfactorios.

Seguidamente, establecido el método de determinación de nicotina en muestra de chimó se procedió a la determinación de nicotina en otras marcas nacionales.

### **5.3.- Determinación de la concentración de nicotina en marcas nacionales de chimó**

Se analizaron 12 marcas fabricadas y distribuidas en el territorio nacional, para cada marca se realizaron tres réplicas de cada muestra bajo el procedimiento ya establecido y cada una de ellas fue inyectada por triplicado. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figuras 20, 21, 22 y 23 y los resultados de nicotina reportados en la Tabla 13.

En cuanto a los resultados de nicotina, la concentración de nicotina en las diferentes marcas nacionales analizadas variaron en un rango de 3 a 26 mg/g, aproximadamente.

**Tabla 13. Concentración de Nicotina obtenido en algunas de las marcas de chimó nacionales.**

N°	Marca	Concentración (mg/g)	Promedio	S	CV
1	Chain	3,3	3,4	0,1	3,0
		3,5			
		3,5			
2	Tigrito Ice	8,0	7,9	0,2	3,0
		7,9			
		7,8			
3	Tigrito 1	9,0	8,6	0,4	4,0
		8,2			
		8,6			
		8,2			
4	Taparo	8,6	8,7	0,3	3,8
		9,0			
		8,4			
5	El Águila	9,8	9,6	0,3	3,0
		9,8			
		9,3			
6	Tigrito 2	9,3	9,4	0,3	3,2
		9,4			
7	Matheitos	11,7	11,8	0,4	3,4
		11,8			
		11,8			
8	San Francisco	14,3	14,4	0,5	3,5
		14,4			
9	Matheus	15,2	15,5	0,5	3,2
		15,5			
		15,8			
10	San Benito bolsita	15,9	16,8	0,8	4,6
		17,1			
		17,3			
11	San Benito caja	23,4	23,4	0,8	3,4
		23,3			
		23,4			
12	La Chinata	25,6	25,7	0,8	3,1
		26,4			
		25,1			

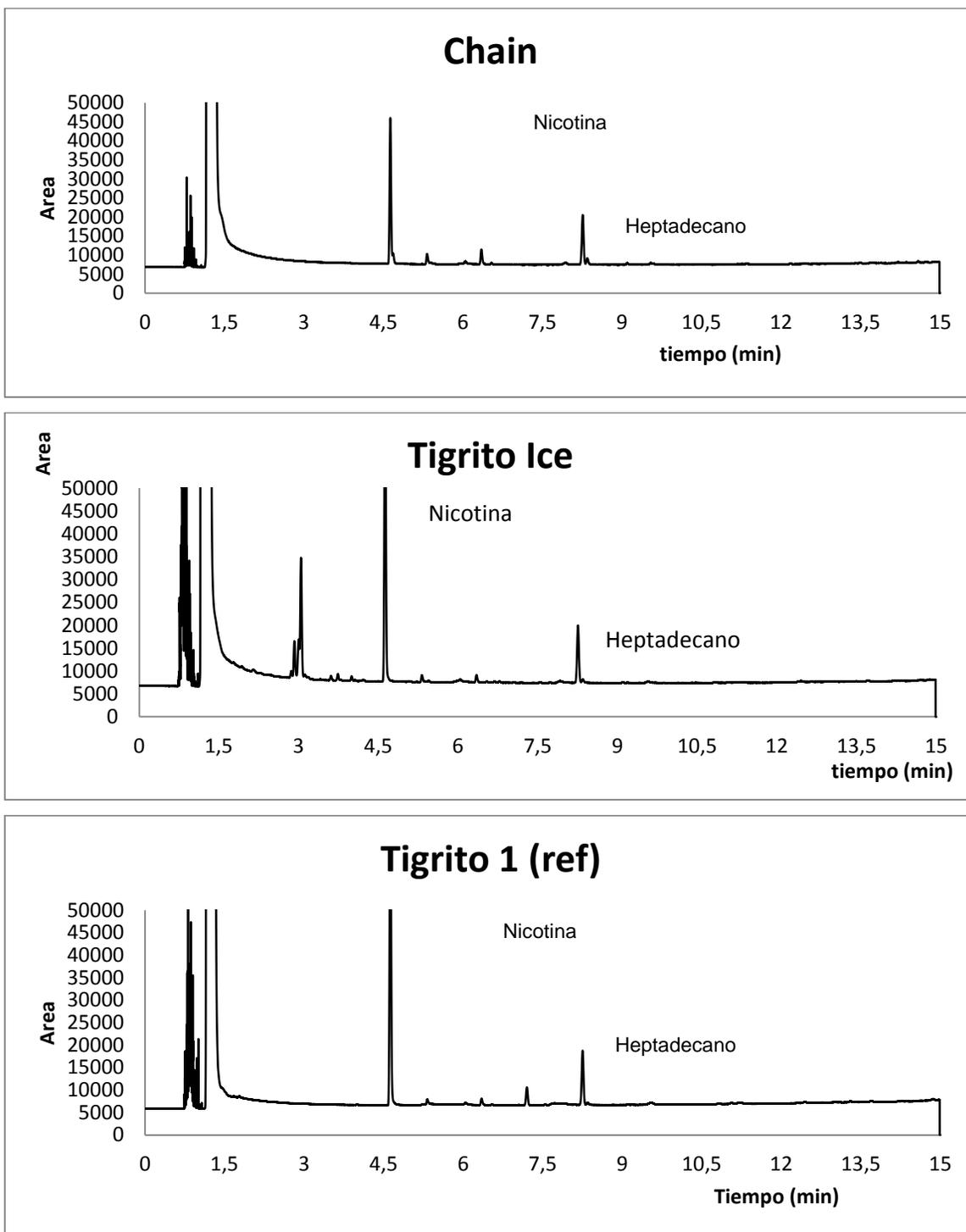


Fig 20. Cromatogramas de las muestras Chain, Tigrito Ice y Tigrito 1 (ref)

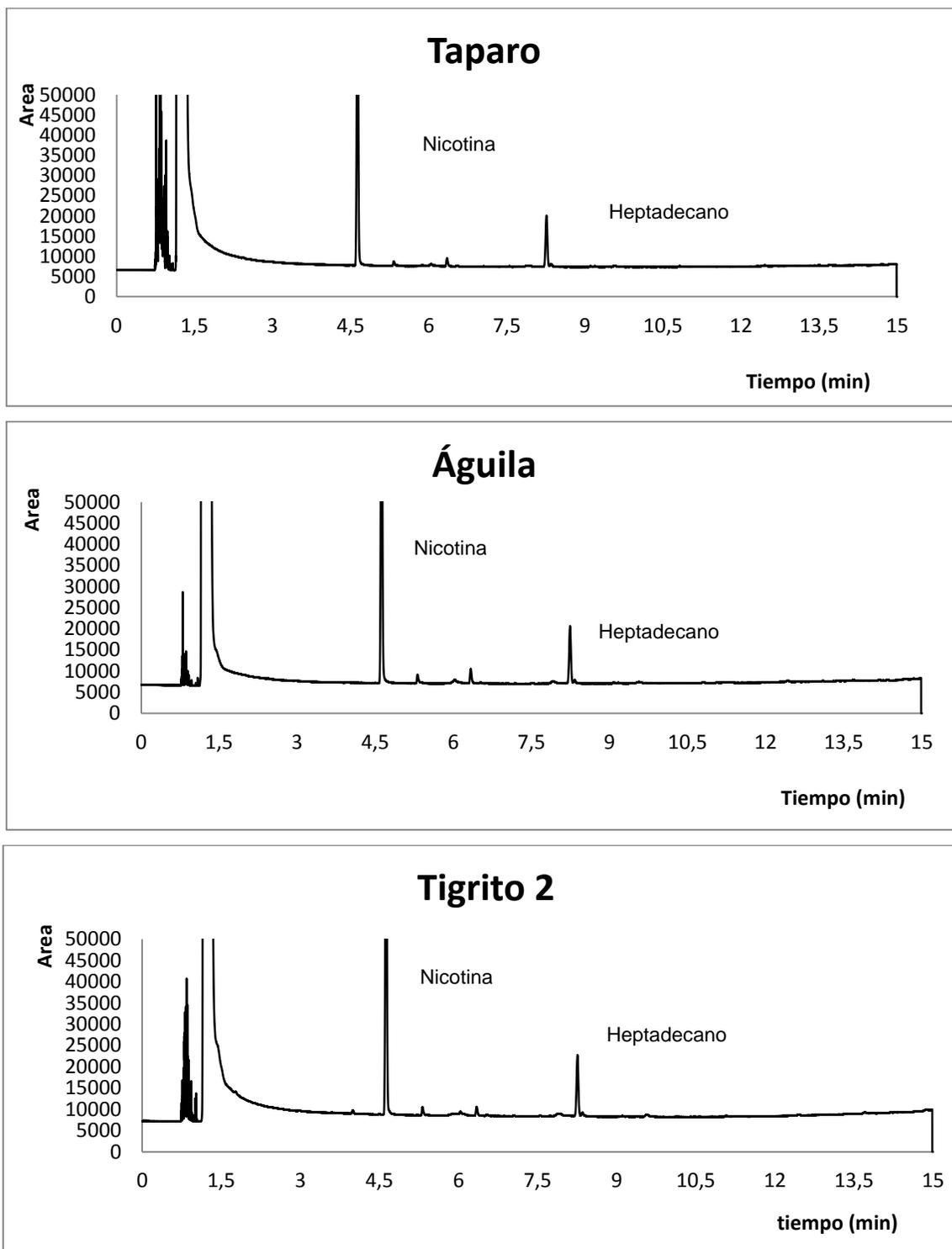


Fig 21. Cromatogramas de las muestras Taparo, Águila y Tigrito 2

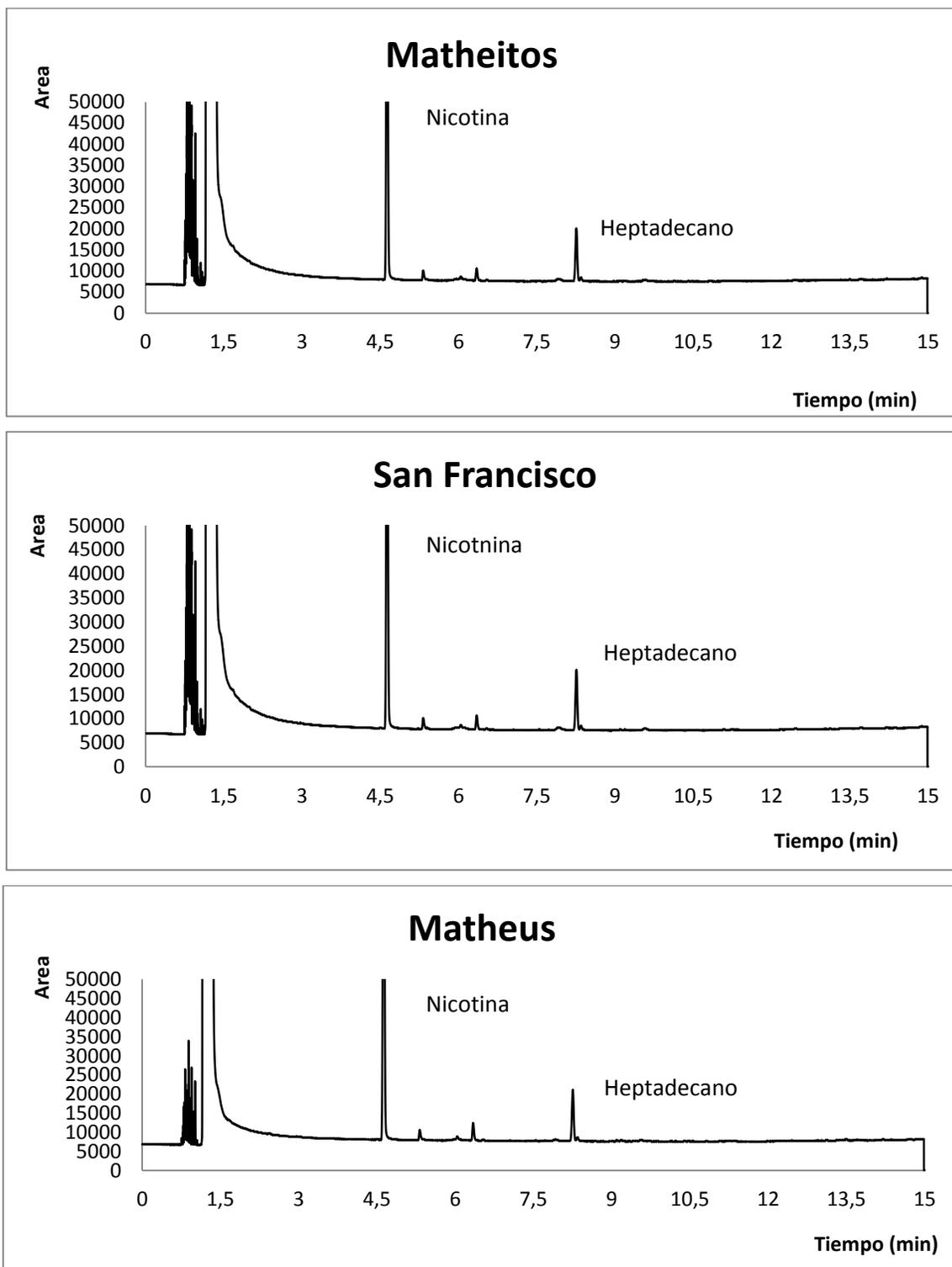


Fig 22. Cromatogramas de las muestras Matheitos, San Francisco y Matheus

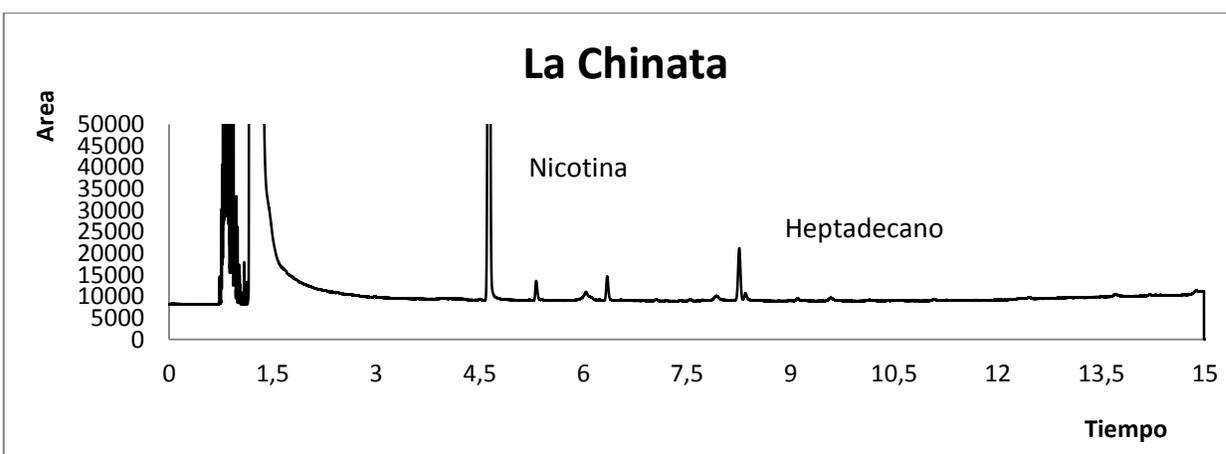
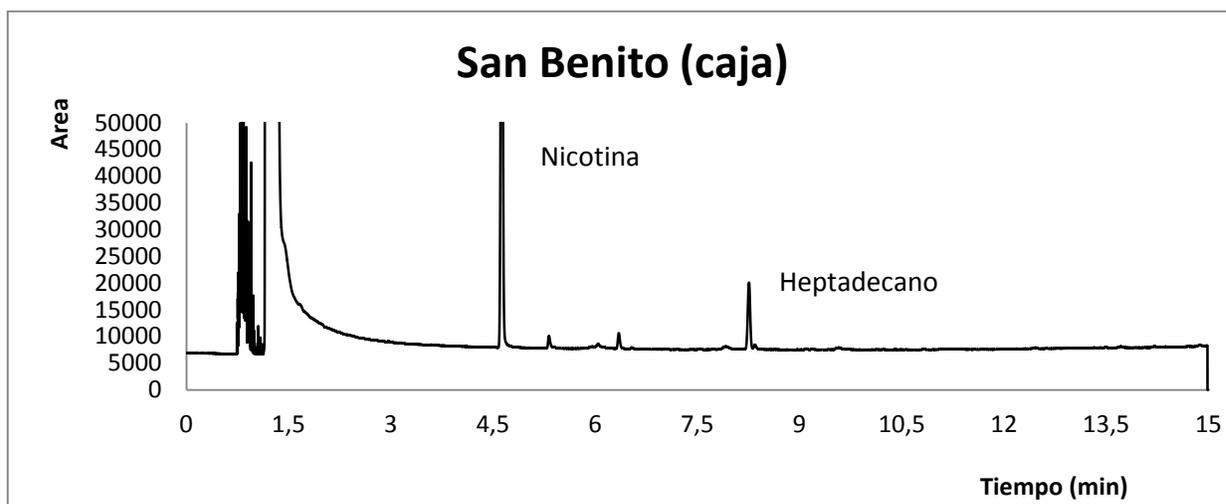
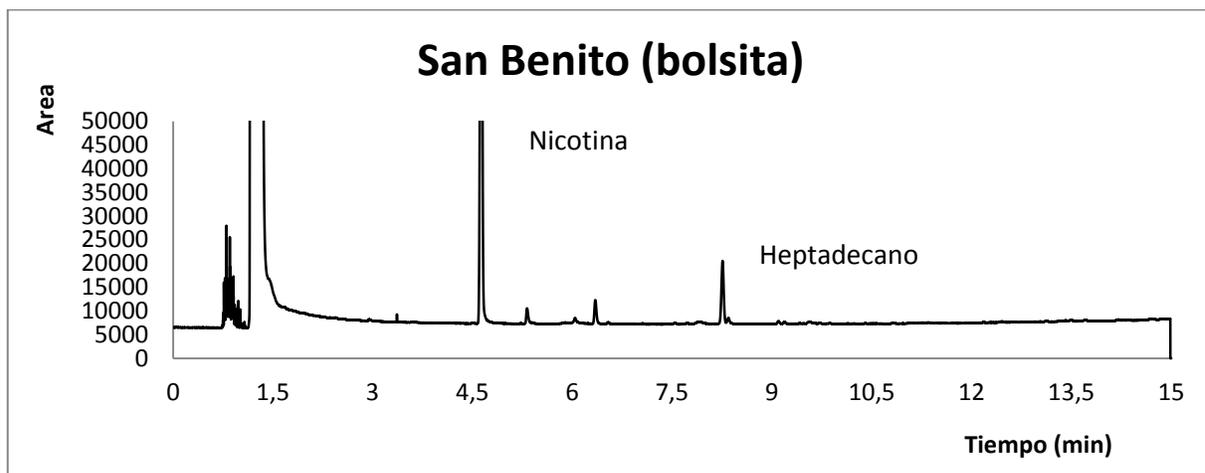


Fig 23. Cromatogramas de las muestras San Benito (bolsita, San Benito (caja) y La Chinata

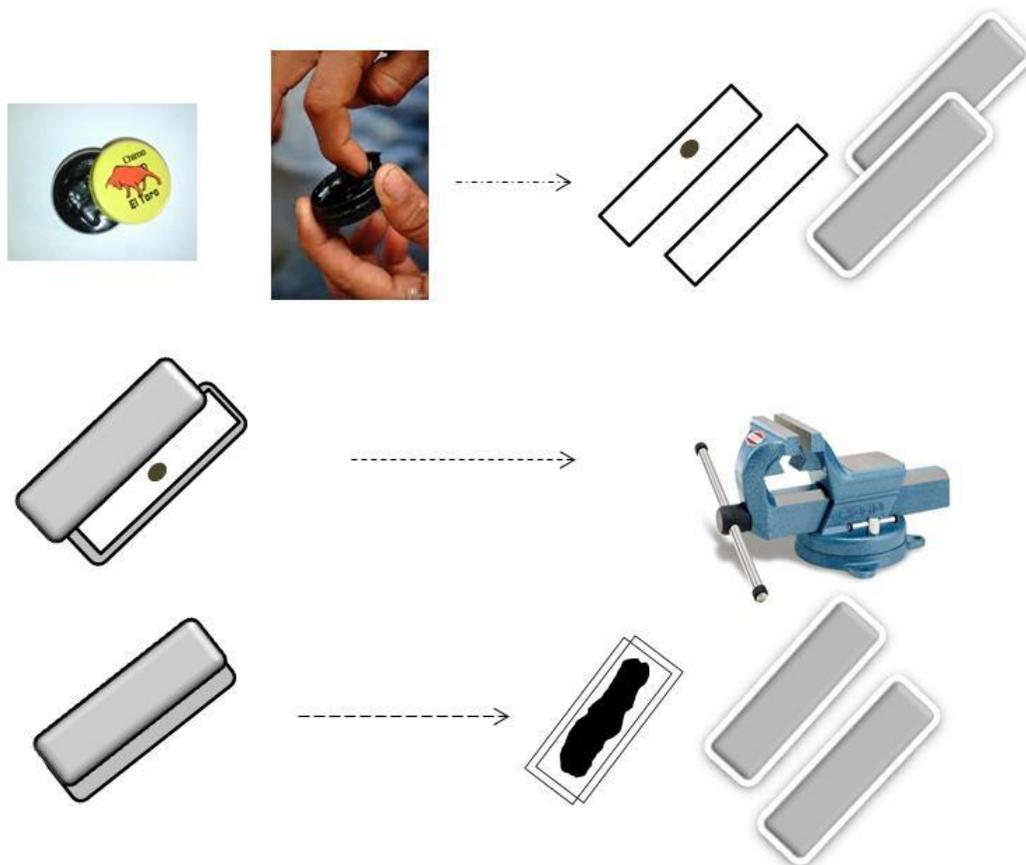
## 6.- Discusión de resultados y conclusiones

### 6.1.- Metodología de tratamiento de muestra y análisis por cromatografía

Se diseñó una metodología de tratamiento de muestra y análisis por cromatografía de gases para la determinación de nicotina en muestra de chimó, quedando establecido de la siguiente manera:

1<sup>ro</sup>

*La muestra debe ser laminada mediante una prensa y conservadas entre dos hojas de poliestireno en refrigeración.*



2<sup>do</sup>

**Pesar 0,3 g de muestra laminada con una precisión de 0,1mg y añadir 10 g de una disolución de KOH al 5 % p/v, pesados con una precisión de 0,1 mg.**

3<sup>ro</sup>

**Colocar en ultrasonido por 15 minutos**

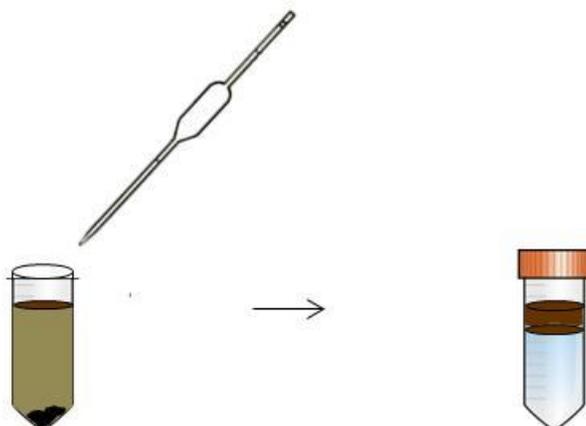


4<sup>to</sup>

**Centrifugar por 15 minutos a 5000 rpm**

5<sup>to</sup>

**Tomar una alícuota de 5 g del sobrenadante (0,1 mg de precisión y añadirlo en un recipiente que contenga 10 g de cloroformo con 10 mg/L de E.I. (0,1 mg de precisión))**



6<sup>to</sup>

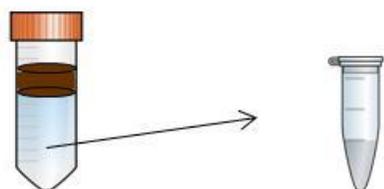
**Colocar en ultrasonido por 15 minutos**



**Dejar reposar por 2 horas, hasta que se separen completamente ambas capas**

7<sup>to</sup>

**Tomar una alícuota de la capa orgánica y analizar por cromatografía**



El resultado de nicotina en la muestra se determinó por la siguiente expresión:

$$\text{Nicotina} \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{Z \times A}{1000} \times \frac{C}{B} \times \frac{1}{D}$$

Dónde:

Z = Es la concentración de nicotina analizada por cromatografía (mg/Kg).

A = Peso del cloroformo (g).

B = Peso de disolución de KOH al 5 % en contacto con el cloroformo (g).

C = Peso total de disolución de KOH al 5 % empleado (g).

D = Peso de muestra (g)

Para facilitar la discusión en detalle de la metodología desarrollada, se decidió descartarla por los ensayos particulares, comenzando por el análisis cromatográfico, seguido por el de tratamiento de muestra y finalmente la performance de las metodologías combinadas.

### **Ensayo cromatográfico.**

#### ***En cuanto a las condiciones operativas:***

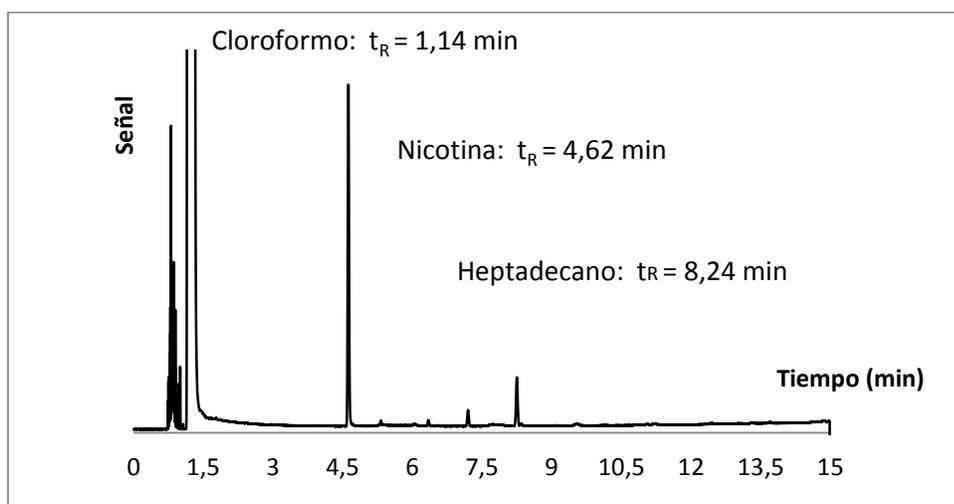
Se empleó un cromatógrafo de gases con detector de ionización a la llama, empleando nitrógeno como gas de arrastre y una columna DB-5 de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor pelicular. Las condiciones cromatográficas quedaron establecidas de la siguiente manera:

T Columna (rampa)	T Inyector	T Detector	Relación Split	Flujo del gas portador	Vol. de inyección (aprx.)
100 - 250 °C 10 °C/min	250 °C	250 °C	10:5	2,0 mL/min	1 µL

El tiempo total de análisis fue de 17 minutos por muestra, correspondiente a 15 minutos de un gradiente de elución de 100 a 250 °C respectivamente, a una rata de 10 °C/min y 2 minutos de equilibrio para regresar a las condiciones iniciales de 100 °C.

El tiempo de retención de la nicotina fue de 4,62 minutos para un k de 5,24. Es un factor de separación idóneo ya que para cromatografía de gases se establece un rango óptimo entre 1 y 20. Por otra parte, la reproducibilidad de la medida establecidas por las réplicas de las áreas, estuvo en el orden del 1,5 % como CV.

Un cromatograma característico se muestra a continuación:



En comparación con el método de referencia apreciamos:

- ✓ La disminución el tiempo de análisis cromatográfico en 3 minutos por muestra.
- ✓ Un mayor lapso de equilibrio entre inyecciones.
- ✓ Una estimación más correcta del factor de retención.
- ✓ Se estimó la reproducibilidad de la medida cromatográfica.

***En cuanto a la calibración:***

Para la nicotina, empleando la técnica de estándar interno, se encontró un LOD de 1 mg/Kg y un LOQ de 5 mg/Kg, estableciéndose un rango dinámico lineal de 5 a 120 mg/Kg, respectivamente. La sensibilidad de curva de calibración fue 0,6167 #cuentas Kg /mg. El ajuste de regresión lineal por mínimos cuadrados estableció una linealidad con un  $R^2$  de 0,9999 y un análisis de residuales de - 0,04 a + 0,04.

En comparación con el método de referencia apreciamos:

- ✓ Se pudo medir una menor cantidad de nicotina al aumentar la relación de split de 50:1 vs 10:5. Se establecieron el LOD y LOQ de la técnica de medida.
- ✓ Por otra parte, se pudo observar con mayor detalle otras bandas de compuestos desconocidos, que en futuro nos permitiría

caracterizarlas, en vías de determinar los alcaloides minoritarios u otros compuestos de interés.

- ✓ El rango de los residuales disminuyó aproximadamente 3 veces con respecto al método de referencia, esto posiblemente se debe a la mayor tiempo de equilibrio entre inyecciones.
- ✓ La sensibilidad medida a través de la pendiente de la recta se mantuvo aproximadamente sin cambios.
- ✓ El cambio de estándar interno de hexadecano por heptadecano fue solo por cuestiones de disponibilidad.

### **Ensayo del tratamiento de muestra.**

#### ***En cuanto a la etapa de disgregación de la muestra - disolución de la nicotina:***

- La muestra de chimó debe ser previamente laminada mediante compresión y conservada en refrigeración entre dos láminas de polietileno hasta el momento de su análisis.
- 3 g de muestra laminada (0,1 mg de precisión), se coloca en tubo de centrifugación con 10 g (0,1 mg de precisión), de hidróxido de potasio al 5 % (p/v), para luego ser asistida con ultrasonido por un periodo de 15 minutos.

El tiempo total empleado en esta etapa fue de unos 15 minutos con la disolución total de la nicotina. Todas las muestras presentaron un residuo insoluble, probablemente de alquitrán, carbón o sales inorgánicas.

Una nota que es importante a destacar es que no todas las marcas analizadas en este trabajo pudieron ser laminadas, aquellas muy fluidas, que fueron relativamente pocas, se disgregaban fácilmente sin necesidad de laminarlas.

En comparación con el método de referencia apreciamos:

- ✓ La muestra al no ser sometida a reiterados calentamientos, evita los cambios físicos o descomposición de la misma.
- ✓ La laminación de la muestra aumentó considerablemente el área superficial, permitiendo la disgregación del chimo, casi que inmediatamente.
- ✓ Logramos reducir el tiempo de esta etapa en 45 minutos con respecto al método de referencia.

***En cuanto a la etapa de extracción de la nicotina a la capa orgánica:***

- Los 10 g de la suspensión de muestra se somete un proceso a centrifugado a una velocidad de 5000 rpm durante 15 min.
- Del sobrenadante de la disolución acuosa se toma una alícuota de 5 g (0,1 mg de precisión) y se añade en 14 g de cloroformo (0,1 mg de

precisión) que contienen 10 mg/Kg del estándar interno (heptadecano).

- Se agita en ultrasonido por 15 minutos y se deja reposar por 1½ horas.
- Se toma una de la porción de la fracción orgánica para el análisis cromatográfico.

El tiempo total de dicha etapa fue de 1½ horas para asegurar la separación completa de ambas fases. Hay que asegurarse que todos los residuos quedaran depositados en el fondo y proceder a realizar la extracción de la alícuota con suma cuidado para evitar su contaminación, ya que los mismos son los causantes de la estabilidad de la emulsión.

En comparación con método de referencia apreciamos:

- ✓ Un ahorro considerable en el tiempo de extracción, al evitar la presencia de sólidos en suspensión.
- ✓ En contraposición se realiza un paso adicional al centrifugar la suspensión de la muestra y adicionalmente se fracciona para la posterior extracción.
- ✓ Para compensar la menor alícuota a extraer, fue necesario aumentar la cantidad de muestra al doble.

## **Evaluación de metodología combinada extracción-análisis para la determinación de nicotina:**

Para evaluar la metodología final se empleó una muestra modelo resultando:

Tiempo total de análisis por muestra: 3 horas

Reproducibilidad del 3 al 4 % como CV

Recuperación: 85 %

LOD: 0,1 mg/g

LOQ: 0,6 mg/g

El tiempo total de análisis fue considerablemente menor con respecto al método de referencia, el cual en muchos casos fue muy difícil evaluar, ya que forman emulsiones muy estables.

La reproducibilidad del 3 al 4 % es semejante a la del método de referencia. Lo anterior indica que aunque se logró mejorar la reproducibilidad en el sistema cromatográfico lo que determina la reproducibilidad de la metodología en conjunto es la etapa correspondiente al tratamiento de muestra. En definitiva se considera satisfactoria.

El porcentaje de recuperación fue menor al encontrado por el método de referencia, sin embargo dicha disminución no afectó considerablemente el LOD y el LOQ.

Un valor de LOQ de 0,6 mg/g es satisfactorio ya que la mayoría de los valores reportados por la literatura para productos derivados del tabaco están por encima de este valor.

## 6.2.- Análisis de la muestra de chimo de consumo nacional

Los resultados de este análisis se muestran a continuación:

Marca	Nicotina (mg/g)	s	CV
CHAIN	3,4	0,1	3,0
TIGRITO ICE	7,9	0,2	3,0
TIGRITO 1	8,6	0,4	4,0
TAPARO	8,7	0,3	3,4
EL ÁGUILA	9,6	0,3	3,0
TIGRITO 2	9,4	0,3	3,2
MATHEITOS	11,8	0,4	3,4
SAN FRANCISCO	14,4	0,5	3,5
MATHEUS	15,5	0,5	3,2
SAN BENITO (BOLSITA)	16,8	0,8	4,6
SAN BENITO (CAJA)	23,4	0,8	3,4
LA CHINATA	25,7	0,8	3,1

Es valores oscilaron entre 3 y 25 mg/g aproximadamente, no obstante no se encontró especificaciones sobre la cantidad máxima de nicotina permitida en los derivados del tabaco.

Sin embargo, los valores permitidos tanto en los Estados Unidos como en Europa establecen un máximo de 1 mg de nicotina por cigarrillo. El cigarrillo de mayor consumo nacional (Belmont) pesa aproximadamente 0,84 g, de los cuales tiene un promedio de 0,62 g corresponde al puro tabaco y el resto al papel mas el filtro.

Por lo tanto, si dicho cigarrillo conservara el máximo permitido, implica que un cigarrillo debe tener 1 mg de nicotina, es decir en los 0,62 g del tabaco. En conclusión el máximo permitido de nicotina para dicho cigarrillo sería de 1,6 mg/g.

Partiendo del hecho que la bolita de chimo que se ingiere normalmente tiene un peso de 0,5 g, haciendo el análisis anterior implicaría que el máximo permitido en el chimo sería 2 mg/g. Como se observa de la tabla anterior, asumiendo que se consume 0,5 g de todos, todas las marcas de chimo están por encima de este valor.

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.

#### **Comparación de métodos.**

<b>Marca</b>	<b>Método de referencia</b>	<b>Método cromatográfico optimizado.</b>
	<b>Nicotina <math>\pm</math> s (mg/g)</b>	<b>Nicotina <math>\pm</math> s (mg/g)</b>
<b>Chain</b>	3,3 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,1
<b>El Águila</b>	9,0 $\pm$ 0,4	9,6 $\pm$ 0,3
<b>El Tigrito (ref.)</b>	11,3 $\pm$ 0,2	8,6 $\pm$ 0,4
<b>San Francisco</b>	14,1 $\pm$ 0,1	14,4 $\pm$ 0,1
<b>San Benito caja</b>	21,1 $\pm$ 0,5	23,4 $\pm$ 0,1

En la tabla anterior observamos los resultados en 5 de las muestras analizadas en ambos métodos. De esta manera podemos observar que a pesar de las modificaciones realizadas tanto en el tratamiento de muestra como en la técnica de análisis obtenemos

resultados muy similares, sin embargo, la mayoría de las marcas arrojaron concentraciones ligeramente mayores a las obtenidas por el ensayo de referencia.

No obstante, se observa una importante diferencia entre la concentración obtenida de nicotina de la muestra modelo en el ensayo de referencia y el método optimizado de análisis, esto se puede atribuir a que no se trabajó con el mismo lote del producto cuando se realizó la caracterización de la nicotina con ambos métodos.

### Comparación de la concentración de nicotina entre cigarrillos y tabaco sin humo

Dado a que los resultados obtenidos por el método de referencia y el obtenido en este trabajo son muy similares al comparar con otras investigaciones realizadas, en este caso en cigarrillos internacionales por Wu Weijia, Ashley David L. y Watson Clifford H.<sup>20</sup> observamos que el rango de concentraciones de mantiene la concentración entre 8,1 a 22,1 (mg/g) y en el chimó de 3,4 a 25,7 (mg/g).

País	Marca	Nicotina $\pm$ s (mg/g)
Nigeria	High S	8,1 $\pm$ 0,4
E.U	Doral	13,6 $\pm$ 0,6
México	Boots	16,3 $\pm$ 0,9
Brasil	Marlboro	18,0 $\pm$ 1,0
China	Hongtashan	22,1 $\pm$ 0,6

Marca	Nicotina $\pm$ s (mg/g)
Chain	3,4 $\pm$ 0,1
Tigrito ice	7,9 $\pm$ 0,2
Tigrito 1	8,6 $\pm$ 0,4
Taparo	8,7 $\pm$ 0,3
El águila	9,6 $\pm$ 0,3
Tigrito 2	9,4 $\pm$ 0,3
Matheitos	11,8 $\pm$ 0,4
San Francisco	14,4 $\pm$ 0,5
Matheus	15,5 $\pm$ 0,5
San Benito (bolsita)	16,8 $\pm$ 0,8
San Benito (caja)	23,4 $\pm$ 0,8
La chinata	25,7 $\pm$ 0,8

Observamos entonces que la concentración de nicotina variara dependiendo del tipo de producto de tabaco en el que se encuentra y a varios factores como: el cultivo, el proceso de curado y específicamente en el chimó: la humedad, pH, el contenido y tipo de aditivos o aliños, pueden generar variación de la concentración de nicotina entre diferentes marcas y lotes.

## **7.- Recomendaciones**

Se recomienda realizar un análisis de la nicotina con un detector específico para compuestos nitrogenados, de esta manera se aumentara la sensibilidad del análisis.

Otra recomendación importante se refiere a la caracterización de los picos que se observaron gracias a los cambios de las condiciones en el análisis cromatográfico de la nicotina ubicados entre el  $t_R$  de la misma y el estándar interno, ya que probablemente puedan tratarse de los alcaloides minoritarios que se encuentran en la matriz del Chimó, esto puede realizando el análisis con un CG/MS.

## **8. Bibliografía**

1. [http://www.saludalia.com/Saludalia/privada/web\\_club/doc/tabaco/doc/composicion.htm](http://www.saludalia.com/Saludalia/privada/web_club/doc/tabaco/doc/composicion.htm).
2. Jibao Cai, Baizhan Liu, Ping Lin, Qingde Su. Fast analysis of nicotine related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by megabore capillary gas chromatography. China. 2003
3. P.Grasso, H.Mann, "Smokeless tobacco and oral Cancer: An Assessment of Evidence Derived from Laboratory Animals", food and Chemical toxicology, vol 36, pág. 1015-1029, 1998 UK.
4. Grupo de Estudio De La OMS Sobre la lucha contra el uso del tabaco sin humo, Organización mundial de la salud, Nº 773, Ginebra 1988.
5. Vincent Cogliano, Kurt Straif, Robert Baan, Yann Grosse, Béatrice Secretan, Fatiha El Ghissassi Oncology Vol 5 December 2004 <http://oncology.thelancet.com>.
6. Presn WebYVKE, ABN <http://www.radiomundial.com.ve/yvke/noticia.php?8234> 2008.

7. Richard A. Scanlan, Ph.D. Nitrosamines and Cancer the Linus Pauling Institute, November, 2000.
8. Deniz Yildiz. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. Turkía. 2003.
9. Yue Xue, Edward F. Domino. Tobacco/nicotine and endogenous brain opioids. Estados Unidos. 2007.
10. World health Organization international agency for research on cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volumen 89. Smokeless Tobacco. Lyon, France 2007, pag 57-85
11. Dominique Kavvadias, Gerhard Scherer, Michael Urban, Francis Cheung, Graham Errington, Jim Shepperd, Mike McEwan “Simultaneous determination of four tobacco-specific *N*-nitrosamines(TSNA) in human urine” Journal of Chromatography B 877,pag 1185–1192,2009.
12. Anders H. Laurene y T. Gibson Harrell. Improved Spectrophotometric Method for determination of Nicotine in Tobacco Smoke. Sociedad Americana de Química. Noviembre.1958.
13. Health Canada, Tobacco control programme, Determination of Alkaloids in Whole Tobacco, N° T-301, Canadá 1999.

14. K.D. Brunnemann, J. Qi, D. Hoffmann "Chemical profile of two types of oral snuff tobacco", Food and Chemical Toxicology vol. 40, pág. 1699–1703, 2002, USA.
15. Jae Gon Lee, Chang Gook Lee, Jae Jin Kwag, Moon Soo Rhee, Alan J. Buglass y Gae Ho Lee. Fast Analysis of Nicotine in Tobacco Using Double - Shot Pyrolysis - Gas Chromatography - Mass Spectrometry. Korea. 2007.
16. Stanfill Stephen B, Zhang Liqin, Jia Lily T, Lawler Tamka, Watson Clifford H. y Ashley David L. Determination of nicotine (total and non-protonated), pH and five tobacco-specific nitrosamines in international smokeless products. 2009.
17. Carrillo Ángela, Determinación de la nicotina en tabaco sin humo (chimó) mediante la técnica de cromatografía de gases, Caracas, 2012.
18. Anders H. Laurene y T. Gibson Harrell. Improved Spectrophotometric Method for determination of Nicotine in Tobacco Smoke. Sociedad Americana de Química. Noviembre.1958.
19. Wu Weijia, Ashley David L, and Watson Clifford H. Determination of Nicotine and Other Minor Alkaloids in International Cigarettes by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Estados Unidos. 2002.
20. D.A. Skoog, Fundamentos De Química Analítica, 8ª edición, International Thomson Editores, S.A, 2005, cap. 30, pág. 622-627.
21. David Harvey, Química Analítica Moderna, Mc Graw Hill, España 2002.

22. Martínez Grau M. Ángeles, Csáky Aurelio G. Técnicas Experimentales en Síntesis Orgánicas. Editorial Síntesis. 2001.
23. Liofilización de alimentos. Obtenido de: <http://www.invap.com.ar>. Junio 2012.
24. Crio-concentración y Liofilización. Universidad Nacional de Colombia. Recursos virtuales. Dirección nacional de Servicios Académicos Virtuales. Obtenido de: <http://www.virtual.unal.edu.co>
25. Skoog, Holler , Nieman, Principios De Analisis Instrumental, 5ta edicion, Mc Graw Hill, Madrid 2001

## 9. Apéndice

## Fundamentos teóricos

- **Extracción:** Se empleó una extracción del tipo líquido-sólido, la cual fue asistida por una extracción con sonda de ultrasonido. Si posterior a la extracción la solubilidad es total se llevó a volumen, pero si queda un residuo, este se filtró y luego se llevará a volumen.

La técnica de la extracción como método de separación tiene como principio el reparto de un soluto en dos fases no miscibles, este es un fenómeno de equilibrio que se rige por la ley de distribución<sup>20</sup>.



Existen diferentes tipos de extracciones entre las cuales se encuentran:

- Extracciones líquido – líquido<sup>21</sup>: en una extracción líquido simple, el soluto se divide entre dos fases no miscibles, en la mayoría de los casos, una de las cuales es una fase acuosa y la otra es un disolvente orgánico como el éter di etílico o cloroformo. Como las fases no son miscibles, se forman dos capas, con la más densa en posición inferior. El soluto se encuentra inicialmente en una de las fases, pero tras la extracción aparece en las dos fases.

La eficacia de una extracción líquido-líquido depende de la constante de equilibrio para el reparto del soluto entre las dos fases así como las reacciones secundarias en las que interviene el soluto. A una temperatura determinada, la relación de concentraciones del compuesto en cada disolvente es siempre

constante, y esta constante es lo que se denomina *coeficiente de distribución o de reparto* ( $K = \text{concentración en disolvente 2} / \text{concentración en disolvente 1}$ ).

- b) Extracción en fase sólida (SPE) <sup>20</sup>: en la técnica de extracción en fase sólida se usan membranas o pequeñas jeringas o cartuchos desechables. Para formar la fase de extracción sólida, se recubren o se ligan químicamente un compuesto orgánico hidrofóbico a sílice en polvo. Los compuestos pueden ser no polares, medianamente polares o polares.

Un empaquetamiento común es el ligado octadecil-silice (C<sub>18</sub>) (ODS) en el cual los grupos funcionales ligados al empaquetamiento atraen a los compuestos hidrofóbico de la muestra por interacciones Van Der Waals y los extraen de la disolución acuosa.

- c) *Extracción con sonda de ultrasonido (UPS, Ultrasound probe sonication)*<sup>22</sup>: este método se utiliza para acelerar extracciones de algunas muestras o para acelerar procesos de mezclado. El uso de baños ultrasónicos estándar operando a 40 KHz son muy fáciles de implementar y tienen una alta eficiencia. Aquí se induce la cavitación acústica, provocada por la formación de burbujas a partir de ondas sónicas en un líquido continuamente comprimido y descomprimido. El colapso de las burbujas creadas dan como resultado temperaturas y presiones extremas generadas en el líquido, y como consecuencia, cuando un sólido está presente en el solvente, los compuestos presentes en el sólido pueden ser extraídos parcial o completamente dentro del medio líquido con mayor rapidez que en otros métodos clásicos.

- **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.<sup>23</sup>

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.<sup>24</sup>

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 microbiológica. Asimismo, el hecho de no requerir refrigeración facilita su distribución y almacenamiento.<sup>[45]</sup>

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.<sup>23</sup>

- **Cromatografía:**

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diversos de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones

cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de manera que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria.<sup>25</sup>

Para poner en contacto la fase móvil y la fase estacionaria existen dos métodos, la cromatografía en columna y la cromatografía plana<sup>21</sup>.

- a) En la Cromatografía plana la fase estacionaria reviste una lámina plana de vidrio, metal o plástico que se coloca en una cámara de revelado. Un reservorio contiene la fase móvil que se halla en contacto con la fase estacionaria, de forma que se desplaza por acción capilar.
- b) En la cromatografía en columna la fase estacionaria se introduce en una columna estrecha a través de la cual pasa la fase móvil por efecto de la gravedad o de una presión aplicada. La fase estacionaria es sólida o una delgada película líquida que reviste un material formado por partículas sólidas empaquetadas o las propias paredes de la columna.

Dentro del grupo de cromatografía en columna podemos mencionar:

- En la cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, una muestra líquida o una muestra sólida disuelta en un disolvente adecuado se hace pasar por una columna cromatográfica junto con una fase móvil líquida. La separación se efectúa gracias a las interacciones entre la fase soluble y estacionarias, tales como la adsorción líquido-sólido, el reparto líquido-líquido, el intercambio de iones y la exclusión por tamaño, y por las interacciones entre las fases soluto y móvil.

La HPLC consta típicamente de dos columnas: una columna analítica responsable de la separación y una guarda columna que se coloca antes de la columna analítica para protegerla de la contaminación.

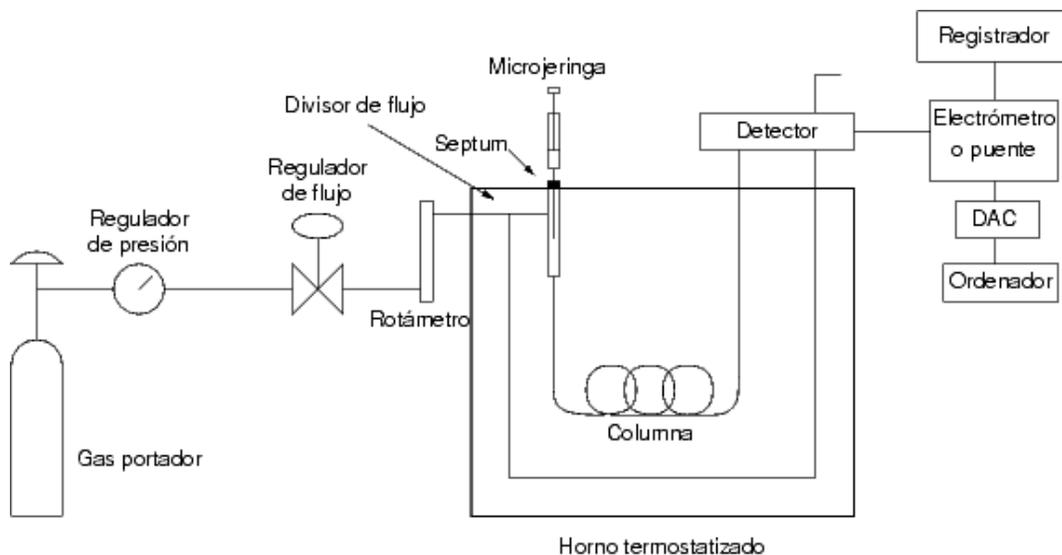
Dependiendo de la fase estacionaria empleada en la cromatografía líquida de alta eficiencia se habla de: cromatografía de fase normal, en la cual se utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar. O cromatografía de fase inversa, la cual, es la forma más habitual de HPLC en donde se utiliza una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar.

En la cromatografía gaseosa (CG) <sup>21</sup> la muestra que puede ser gaseosa o líquida, se inyecta en una corriente de gas inerte que constituye la fase móvil (a la que a menudo se denomina gas portador). La muestra es transportada a través de una columna empaquetada o capilar, en la que sus componentes se separan según su capacidad para distribuirse entre la fase móvil y la fase estacionaria. Existen dos tipos de cromatografía de gases: cromatografía gas-sólido (GSC) y cromatografía gas-líquido (GLC), las cuales son diferenciadas de acuerdo a la fase estacionaria empleada. En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los componentes se produce por adsorción física, mientras que en la GLC la fase estacionaria trata de una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.<sup>25</sup>

Un cromatógrafo de gas está compuesto principalmente por: cilindro de gas portador, puerto de inyección de la muestra, columna, detector y registrador gráfico o procesador de la señal. La inyección de la muestra se realiza con una jeringa graduada en micro litros, a través de un septum de hule en el puerto de inyección calentado, donde se vaporiza y se arrastra a la columna por el gas portador. Ya en la columna, la muestra se distribuye entre el gas portador y la fase estacionaria, separándose en cada uno de sus componentes, para finalmente llegar al detector, el cual mide la concentración y

genera una señal eléctrica que luego es procesada generándose un registro gráfico<sup>25</sup>(Ver figura 12).

Existen muchos tipos de detectores usados en la cromatografía de gas entre los más importantes se encuentra: el detector de conductividad térmica, el detector de ionización de la llama (FDI), el detector de captura de electrones (DCE). Existen otros detectores de diseño similar al de ionización de la llama, el detector fotométrico de llama y el detector termoiónico. También existen detectores que se usan habitualmente pero son instrumentos independientes, estos son, los espectrómetros de infrarrojo de transformada Fourier (IR-TR) y los espectrógrafo de masas (EM).<sup>21</sup>



**Figura 24.- Esquema de un cromatografo de gas.**

