

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



DETERMINACIÓN DE NICOTINA EN TABACO SIN HUMO (CHIMÓ)

MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRFÍA DE GASES

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. Angela Berenice Carrillo Paredes para optar por el título de Licenciada en Química, opción Geoquímica.

Tutores:

Dr. Luis Gómez

Lic. Beatriz Mosquera

Caracas, Marzo 2012.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“DETERMINACIÓN DE NICOTINA EN TABACO SIN HUMO MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRFÍA DE GASES”** presentado por la Br. Angela Berenice Carrillo Paredes, 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

A lo largo de los años, el consumo de tabaco se ha incrementado en el mundo notablemente convirtiéndose en la actualidad en un problema de salud pública y ocupando una alta posición en el mercado en cuanto a su producción. El tabaco está constituido por una mezcla de compuestos químicos, entre los cuales los alcaloides son considerados de gran importancia ya que entre ellos se encuentra el compuesto activo responsable de la adicción, la nicotina.

La manera más común de consumir tabaco es el cigarrillo, sin embargo, el consumo de tabaco sin humo ha tenido un notable aumento entre la población juvenil, debido a su bajo precio en comparación con el cigarrillo y al hecho de que no produce humo. Este tipo de tabaco es mejor conocido en Venezuela como “chimó” y ha pasado de ser un producto artesanal a un producto de consumo masivo sin que los usuarios en muchos de los casos estén al tanto de los riesgos a los que están expuestos. Por esta razón, ha surgido la necesidad de caracterizar el compuesto activo del tabaco.

En función de esto, se desarrollaron dos métodos para la determinación de la concentración de nicotina en productos de tabaco sin humo nacional (chimó). El primero de ellos, fue un método clásico que empleó la técnica de destilación por arrastre con vapor y medida espectrofotométrica. El segundo método, se llevó a cabo mediante una extracción líquido-líquido asistida por ultrasonido y un posterior análisis cromatográfico.

Ambos métodos arrojaron una buena reproducibilidad y exactitud medidos en función del coeficiente de varianza y el porcentaje de recuperación respectivamente. La concentración de nicotina en las diferentes marcas nacionales analizadas varía en un rango de 3 a 20 mg/g aproximadamente.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por darme la vida haciéndome la representación de ese gran primer amor. A mi mami, por ser además de mamá una gran amiga, confiando siempre en mi y acompañándome en las buenas y en las malas, por tener siempre el mejor consejo, enseñarme que es mejor decir la verdad y por darme su amor incondicional, eterna paciencia y comprensión. Eres la mejor mamá del mundo. A mi papá, porque me enseñó que nunca es tarde para comenzar si hacemos lo que nos gusta y que de los errores al final siempre queda algo bueno... gracias porque aún después de haberte adelantado me sigues enseñando.

A mis abuelos, que hicieron mi infancia más feliz. A la Viejita, quien me enseñó el maravilloso mundo de la lectura y muchas otras cosas que me han ayudado y lo seguirán haciendo a lo largo de la vida, a ella quien me quiere por sobre todas las cosas. Al Viejito, por ser esa gran figura de ejemplo, trabajo digno y honestidad, por tener siempre las palabras correctas y por enseñarme a ser una persona de convicciones. También te adelantaste, pero siempre estás conmigo. A ustedes gracias por consentirme tanto, no pude tener mejores abuelos. También a mis abuelos Francisca, Pelayo, Duquesa y Aquitano que me cuidan siempre desde donde quiera que estén.

A mi tía Hortensia, por estar siempre a mi lado y ser como una segunda madre, dándome mucho más que amor y tendiéndome la mano cada vez que lo he necesitado. A mi tío Manolo, por ser más que tío mi hermano mayor, el que siempre esta pendiente de los pequeños y grandes detalles, y el que me enseñó que esta casa de estudio te da más de lo imaginado. A ustedes, gracias por guiarme mientras crecía.

A mi padrino Livio, porque después de padre padrino y lo ha hecho a la perfección. Siempre al pie del cañón, dándome los mejores consejos y reprendiéndome cuando lo he necesitado. Gracias por ser mi padrino, padre y amigo.

A mis hermosos hermanitos Bárbara y Víctor, por llegar al mundo a alegrarme más la vida, por hacerme sentir niña de nuevo y por darme su amor puro sin pedir nada a cambio. Por ustedes lo haría todo porque son mis seres especiales.

A mi compañero a lo largo de casi todo este trayecto, el que siempre estuvo dándome ánimo cuando sentía que no podía mas, recordándome quien era y que quería y amándome incondicionalmente por sobre todas las cosas. A mi Pepo, gracias por todo. Te amo.

A mi padrino Andrés, Tía Rosa, Tío Atilano y mis primos Carrillo Carrillo, por estar siempre conmigo, en las alegrías y las tristezas porque juntos somos una gran familia.

Al Portu, por su gran paciencia y solidaridad a lo largo de estos años y por darme a uno de mis seres especiales.

A la familia Murillo Aranguren, por recibirme y tener siempre las puertas de su casa abiertas para mí, queriéndome y aceptándome como uno más de ustedes.

A Valery Gómez, la hermana que me regalo la vida, porque hemos vivido grandes momentos juntas, entendiéndonos y conociéndonos como pocos. Has sido un gran maestro haciéndome ver mas allá de lo que tengo ante mis ojos. Siempre contigo a pesar de la distancia.

Al teatro Teresa Carreño por permitirme conocer y ser parte de un mundo mágico, enseñándome cosas que solo ahí se pueden aprender.

A mis grandes amigas Karina, Erika e Isabel, por estar siempre conmigo tratando de conquistar el mundo. A mis amigos de siempre, de estudio, de risas y llantos: Arianny Roca, María Maza, Diana Ribas, Nebraska Rodríguez, Mairhelé Carrillo, Mayreli Flores, Luis Virgüez, Juan Carlos Hernández (El Chinito), juntos hemos vencido las sombras. A Carmelita, por convertirse en mi amiga en esta última etapa, haciéndonos las horas de trabajo amenas y divertidas dándonos apoyo mutuo. Los quiero mucho.

A la Universidad Central de Venezuela, por formarme como profesional y convertirme en una mejor persona, venciendo siempre las sombras.

A mi querido Tutor Luis Gómez, por permitirme trabajar junto a él y por ser un gran guía académico, enseñándome más de lo que le correspondía y darme todo su apoyo incondicional para la culminación de esta etapa. Fuiste más que un excelente tutor. Gracias por la enseñanza y la amistad.

A la Licenciada Beatriz Mosquera, por permitirme colaborar y ser parte de este proyecto que a todos nos brindará un gran beneficio. A la Profa. María Rodríguez, por brindarme siempre su apoyo y enseñanza no solo en esta última etapa sino a lo largo de toda la carrera. Al Prof. Gustavo Pérez, por apoyarme y ayudarme cuando lo necesité, siempre con esa buena energía.

Por último, agradezco a todo los que conforman el Centro de Química Analítica, por brindarme su apoyo y compañerismo durante mi paso por el laboratorio y hacerlo tan ameno. Fueron muy gratos los momentos vividos.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Generalidades del tabaco	2
2.2. Composición química del tabaco. La nicotina	6
2.3. Farmacología	7
2.4. Tabaco sin humo	12
2.5. Tabaco sin humo en Venezuela. El chimó	14
3. ANTECEDENTES	18
4. OBJETIVOS	37
4.1. Objetivo general	37
4.2. Objetivos específicos	37
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	39
5.1. Materiales y equipos empleados	39
5.1.1. Equipos	39
5.1.2. Reactivos	40
5.2. Purificación del patrón de nicotina	41
5.3. Muestra de referencia de chimó	42
5.4. Ensayo de referencia para la determinación de nicotina en chimó	42

	Página
5.4.1. Ensayo de arrastre con vapor por determinación UV	43
5.4.2. Determinación de nicotina en la muestra de referencia	47
5.4.3. Determinación de la concentración de nicotina en otras marcas nacionales de chimó	49
5.5. Ensayo por cromatografía de gases para la determinación de nicotina en chimó	51
5.5.1. Condiciones preliminares para la determinación de nicotina en chimó	52
5.5.2. Ajuste de las condiciones cromatográficas	53
5.5.3. Curva de calibración	55
5.5.4. Optimización del método de extracción	64
5.5.4.1. Elección del solvente	64
5.5.4.2. Selección del tiempo de extracción	68
5.5.5. Determinación del % de Recuperación del método desarrollado	70
5.5.6. Determinación de la concentración de nicotina en otras marcas nacionales de chimó	72

	Página
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	74
7. RECOMENDACIONES	84
8. BIBLIOGRAFÍA	85
9. APÉNDICE	90

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años el tabaco ha ocupado una alta posición en el mercado en cuanto a su producción, siendo actualmente su uso un hábito social. Está constituido por una mezcla de compuestos químicos, entre los cuales los alcaloides han sido los más estudiados. De ellos, la nicotina y sus alcaloides relacionados son considerados los más importantes.

El tabaco puede consumirse tanto fumado en pipas, cigarros y cigarrillos como mascado e inhalado, conocido este último como tabaco sin humo y especialmente en nuestro país como chimó.

El chimó es la forma autóctona de consumo de tabaco no fumado en Venezuela, el cual a lo largo de los años se ha transformado de un producto artesanal mayoritariamente de los estados andinos a un producto industrializado distribuido a lo largo de todo el país, sin un control regulatorio sanitario por parte del Estado, causando de esta forma numerosas enfermedades a quienes lo consumen. Dichos usuarios en muchos casos no son conscientes del riesgo que corren al consumir este tipo de tabaco, debido al desconocimiento de la composición química del mismo.

Es por ello que este trabajo de investigación, tiene como objetivo principal desarrollar un método de extracción y de análisis que permita determinar el contenido de nicotina en tabaco sin humo nacional.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del Tabaco

La planta del tabaco pertenece a la familia de las Solanáceas, del género *Nicotiana*, dentro del cual existen sesenta y cinco especies, de ellas las más importantes son la *Nicotiana Tabacum* y la *Nicotiana Rustica*, las cuales a su vez tienen cuatro variedades que son las más comercialmente explotadas: *Brasilensis*, *Havanensis*, *Virginica* y *Púrpurea*. Es una planta herbácea de cosecha anual, con una altura aproximada de metro y medio a dos metros, de tallo cilíndrico, con hojas alternas que disminuyen de tamaño desde la base hasta el vértice del tallo (Fig.1). Posee una gran capacidad de adaptación al medio ambiente, pudiéndose cultivar en casi todos los países del mundo. Es originaria de América y fue introducida al resto del mundo por los colonizadores europeos, cabe destacar que la planta del tabaco se denominó *Nicotiana Tabacum* en homenaje al embajador Francés Jean Nicot, quien la estudió y promovió su importación y cultivo, creyendo que tenía valor medicinal ^[1].

Los primeros que usaron las hojas de tabaco fueron los mayas hace mil quinientos años. Los grabados recuperados de sacerdotes fumando en actitud de adoración al sol, demuestran cómo este pueblo centroamericano dio al hecho de fumar tabaco un carácter religioso y ceremonial. Algunos pueblos de la América precolombina no sólo emplearon el tabaco con fines rituales, sino que llegó a ser utilizado como remedio curativo. Los nativos mayas estaban convencidos de que las enfermedades eran producidas por un mal espíritu que se apoderaba o habitaba en el enfermo, y sólo podía ser expulsado de él mediante el humo del tabaco ^[2].

A finales del siglo XII, los aztecas invadieron el territorio maya y asimilaron la costumbre de fumar tabaco. Sin embargo, dieron al fumar un carácter más social que religioso, ya que lo más importante se centró en la magnificencia y el refinamiento de los utensilios de fumar. Los aztecas conservaron la costumbre hasta la llegada de los españoles a principios del siglo XVI ^[3].

En la Venezuela precolombina, existe una leyenda de los indios Waraos que relaciona el tabaco con el origen del mundo. Cuando el "pájaro del alba" (el sol) se elevó en el cielo por primera vez, pensó en una casa situada entre la tierra y el cielo, blanca y redonda como una nube de humo. A continuación, el "pájaro del alba" crea los cuatro "bahanas", el cual es el nombre con que se conoce el tabaco en la región. Los bahanas constituyen los cuatro elementos del humo que dan su carácter al tabaco y son: la "abeja negra", que pica fuerte cuando el fumador aspira la primera bocanada, la "abeja roja", la "abeja amarilla" y la "mosca de miel azul", cuyos espíritus traspasan los cuerpos y les infunden su fuerza ^[4].

En cuanto a Europa se refiere, el tabaco fue descubierto por marinos españoles que, cumpliendo órdenes de Colón, exploraban tierra interior. Las playas de San Salvador fueron el escenario del gran hallazgo del tabaco, cuando los marinos llegaron a la orilla, los nativos les recibieron con frutas, jabalinas de madera y ciertas hojas secas que desprendían una peculiar fragancia. Fue uno de estos marinos, Rodrigo de Jeréz, quien a su regreso a España no dudó en introducir la costumbre de fumar tabaco, por lo que tuvo que pagar un alto precio, la Inquisición lo encarceló por practicar algo pecaminoso e infernal ^[5].

Sin embargo, el hábito se puso de moda y en el siglo XVI el fumar había sido adquirido por todo tipo de clases sociales, distinguiéndose entre las más populares la pipa y el rollo de hojas (como precursor del cigarro puro). Al principio, fueron los frailes en las

huertas de sus conventos los más entusiastas plantadores de tabaco, quienes lo utilizaban con fines ornamentales y medicinales. Así, el hecho de que el tabaco se cultivara preferentemente en estos lugares cerrados, llevó más tarde a dar el nombre de estancos a los comercios donde debía venderse ^[6].

Desde finales del siglo XIX y comienzos del XX, el tabaco ostenta ya una primerísima posición en el mercado. La masificación y el abaratamiento de la producción contribuyeron a que todas las clases sociales tengan un fácil acceso al tabaco. No hay duda que en la actualidad el fumar se ha convertido en un hecho universal y se ha transformado en un ingreso económico muy importante para muchos países.

El comercio del tabaco a nivel mundial se basa fundamentalmente en una mezcla de hojas de diversos orígenes, cuyas calidades vienen determinadas por numerosos factores naturales y tecnológicos, como lo son: calidad de la variedad, clima, suelo, agua de riego, técnicas de cultivo, abonado, tecnología de la transformación, etc. En cuanto a su producción, una vez recogida la hoja, pasa por las etapas de curado, fermentación e industrialización, mediante las cuales se seca, transformándose en un producto apto para el consumo. Es un cultivo intensivo en mano de obra, ya que requiere en promedio unas 2.200 horas de trabajo por hectárea, más que cualquier otro tipo de cultivo. Según fuentes de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) los mayores productores de tabaco son en Asia: China, en Europa: Italia y Grecia y en América: Brasil y Estados Unidos, tal como se muestra en la Tabla 1^[7].

A pesar de que el tabaco representa una importante contribución a los ingresos por parte del sector agrícola de muchos países, el consumo del mismo está directamente relacionado con la aparición de 29 enfermedades, de las cuales 10 son diferentes tipos de cáncer. Es la principal causa del 95 % de los cánceres de pulmón, del 90 % de las

bronquitis y de más del 50 % de las enfermedades cardiovasculares, entre otros. De allí, la importancia del conocimiento de la composición química del tabaco, en especial de las sustancias perjudiciales al ser humano.



Figura 1. Planta Nicotiana Tabacum

Tabla 1. Producción mundial de tabaco (año 2000)

Países	Producción de tabaco bruto (millones de toneladas anuales)
China	2661000
India	610000
Brasil	565317
Estados Unidos	470630
Indonesia	147000
Grecia	130000
Italia	126235
Argentina	101000
Japón	62000
Filipinas	61827
República de Corea	60000
México	44000
España	43000

2.2. Composición Química del Tabaco. La Nicotina

En general, se puede considerar que la hoja del tabaco antes de ser cortada está constituida por agua en un 80 %, 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 %) ^[8].

El tabaco está constituido por una mezcla de compuestos químicos entre los cuales están: productos celulósicos, polisacáridos, almidones, proteínas, azúcares, alcaloides, terpenos, alcanos, polifenoles, nitratos alcalinos, ácidos carboxílicos, esteroides, minerales inorgánicos, alcoholes, aldehídos, acetonas, aminas, amidas entre otros. Muchos de estos compuestos son comunes entre diversas plantas, pero solo algunos alcaloides son específicos del tabaco ^[8,9].

Los alcaloides son considerados los componentes activos del tabaco, los cuales son sintetizados por la planta para protegerse de insectos y otros animales. Tanto es así, que los restos del proceso industrial del tabaco son utilizados con éxito como insecticida agrícola y aplicado a tierras de labor y las plantas cultivadas, actuando como un efectivo exterminador de patógenos y gérmenes, sin los efectos secundarios negativos sobre el medio ambiente y la salud que pueden tener los insecticidas sintéticos. De los alcaloides, la nicotina y sus alcaloides relacionados son considerados los de mayor importancia y han sido los más estudiados ^[10].

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 ^[10] (Fig. 2).

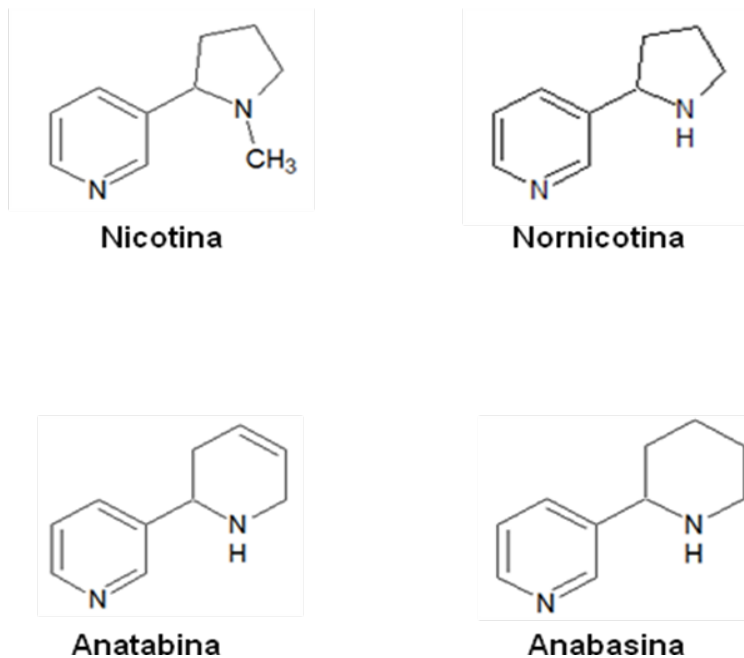


Figura 2. Alcaloides mayoritarios presentes en el tabaco

La nicotina es un alcaloide natural perteneciente al grupo de las aminas biológicamente activas. Se trata de una amina aromática terciaria que posee una molécula de piridina y cuyos precursores son algunos aminoácidos. Los átomos de nitrógeno presentes le dan una característica básica a la molécula. Según Schevelbein en 1982, este alcaloide se aisló por primera vez en el año de 1828, determinándose que es el compuesto principal del tabaco ^[11].

2.3. Farmacología

La nicotina genera una farmacodependencia por parte de 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 ^[12,13]. 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.

Además, 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. Estos estudios se han basado en la sensibilidad de algunos usuarios a estímulos térmicos; Pomerleau y colaboradores en 1984 y Ferting y colaboradores en 1986, realizaron la prueba presora al frío demostrando que usuarios que fumaban cigarrillos tenían el umbral del dolor más alto que los no fumadores. Por último, según Reavill en 1990, estudios previos indicaron que los fumadores desarrollan la enfermedad de Parkinson con baja frecuencia en comparación con los no fumadores^[12].

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^[11].

Entre algunos de los factores que influyen en la cantidad de nicotina absorbida están: el tipo de fabricante, 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 de forma protonada (con carga positiva sobre el nitrógeno) 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 ^[11].

A un pH aproximado de 5,5 en el tabaco, la nicotina presente está mayoritariamente de forma protonada y aproximadamente solo el 0,3 % es no protonada. Mientras que, a un pH de 8,5 el 75 % de la nicotina presente es no protonada, es decir que a niveles de pH altos aumenta la cantidad de nicotina absorbida ^[13]. La alteración del pH en el tabaco puede ser controlada mediante agentes alcalinizantes y todos estos aditivos son muy comunes actualmente en los productos de tabaco comerciales ^[14].

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 ^[11].

Desde un punto de vista sanitario, la principal importancia de la nicotina en el tabaco es su transformación en N-nitrosaminas que son sustancias carcinogénicas formadas durante el proceso de curado o tratamiento del tabaco y también se forman mediante el encendido del cigarrillo, encontrándose fundamentalmente en el humo generado. Hay que denotar que las N-nitrosaminas no se hallan en la planta de tabaco no procesada ^[11].

De las N-nitrosaminas específicas del tabaco, las de mayor proporción son la N-nitrosonornicotina (NNN) y la 4-(N-metil-nitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) ^[15,16]. Estos agentes son considerados los principales causantes de las enfermedades relacionadas con el tabaco. Otras de las N-nitrosaminas cancerígenas específicas del tabaco son la 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)butanol (NNA), N-nitrosoanatabina (NAT), N-nitrosoanabasina (NAB) y 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL) ^[13,16] (Fig. 3).

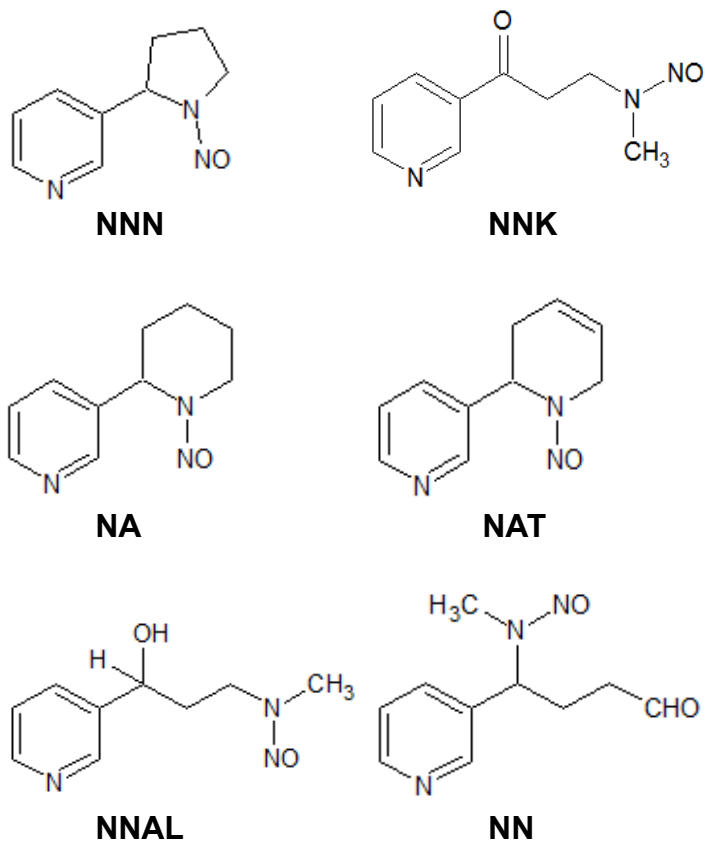


Figura 3. N-nitrosaminas específicas del tabaco

Es de esperar que la nicotina sea quizás, la mayor preocupación del fabricante dentro de la compleja elaboración del tabaco, ya que es el componente responsable de la dependencia, por otra parte es la que se transforma en otras sustancias perjudiciales para el ser humano y finalmente, es la que determina fundamentalmente la calidad de una especie cultivada.

En cuanto a la forma del consumo del tabaco, puede ser mascado (tabaco sin humo) e inhalado directamente por la nariz o fumado en pipas, cigarros o cigarrillos. Aspirando el humo, se puede absorber hasta el 90 % de la nicotina, mientras que si éste permanece

únicamente en la boca, la cifra se reduce al 20 o 35 %. Aproximadamente 8 segundos después de haber entrado a los pulmones, la nicotina alcanza el torrente sanguíneo y a más tardar en 5 minutos ha logrado traspasar la barrera hematoencefálica para llegar al cerebro. Sus efectos duran entre 5 y 10 minutos provocando fases de acción estimulante y acción depresora del sistema nervioso central. En primera instancia estimula algunos receptores sensitivos y produce una descarga de adrenalina que acelera la frecuencia cardíaca y eleva la presión arterial; posteriormente deprime todos los ganglios autónomos del sistema nervioso periférico.

En la antigüedad los marineros usaban tabaco sin humo, debido a que se prohibió fumar a bordo de los buques de madera ya que se consideraba un peligro de incendio, además se creía que era un agente de limpieza dental, lo cual le dio popularidad al producto ^[15]. En la actualidad el tabaco sin humo se ha tomado como un sustituto del cigarrillo, en especial en aquellos que no pueden fumar por cuestión de peligrosidad o aquellos que desean hacerlo en lugares donde está prohibido.

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 en el mundo entero. La Organización Mundial de la Salud (OMS) atribuye cuatro millones de muertes anuales al tabaco. Las enfermedades relacionadas con el tabaco 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. El interés particular del presente trabajo está orientado a la determinación de nicotina en el tabaco sin humo.

2.4. Tabaco sin humo

Se conoce como tabaco sin humo, aquel que para su consumo no es quemado, también es conocido como tabaco de mascar, tabaco oral, tabaco de saliva, tabaco de masticar o escupir. Se dice que una de las ventajas de este tipo de tabaco, es que se evita afectar a quienes no lo consumen, aquellos llamados fumadores pasivos. De esta manera, no estarían expuestos a los mismos riesgos causados por el humo del cigarrillo. Sin embargo, hay quienes no aprueban su uso, ya que crea desagrado y no es atractivo debido al hecho de que los usuarios deben expectorar el tabaco después de usarlo, además genera cierto temor en cuanto a la propagación de gérmenes que puedan causar alguna enfermedad, como por ejemplo la tuberculosis ^[9,15].

El tabaco sin humo actualmente es común en todo el mundo y existe en diversas formas, las cuales se diferencian en el proceso de curado o métodos de preparación, contenido y tipos de aditivos, humedad, sabor, aroma, pH y diferentes tipos de presentaciones. Algunos de los aditivos que se emplean le dan un sabor y aroma particular, entre ellos están las sales inorgánicas, azúcar, jugo de frutas, aceites, esencias, licores, melazas y cualquier tipo de químicos los cuales pueden presentarse mezclados ^[13].

Su característica principal es que se consume sin quemar el tabaco, tanto por vía oral como por vía nasal y puede ser curado al aire y al fuego. La frecuencia con la que se consume tabaco sin humo puede variar según el lugar, sexo, edad y características socioeconómicas ^[12]. Entre los diferentes tipos de tabaco sin humo se encuentra de manera general el tabaco de mascar, el rapé húmedo y el rapé seco, además se consiguen innumerables mezclas hechas a mano que son bastante comunes ^[9,13].

El tabaco de mascar se coloca generalmente en el interior de la mejilla o entre la encía y el labio inferior, se puede mantener en la boca durante varias horas y posteriormente se expectora la saliva mezclada con el extracto de tabaco. Se presenta en hojas sueltas, rollos o en barras planas o tabletas ^[15,16]. En algunos lugares se ofrecen dentro de bolsas pequeñas de tela similares a las de té, que permiten colocarlas dentro de la boca sin necesidad de tener el tabaco suelto y de esta manera permanecen los residuos en la bolsa ^[9,15].

El rapé húmedo por su parte posee una consistencia mucho más fina que el tabaco de mascar e igualmente se introduce en la boca por algunas horas para luego expectorarlo, este es mejor conocido en Venezuela como chimó. Se pueden conseguir con diferentes sabores como manzana, cereza, canela, whisky y muchos más ^[13,16].

El rapé seco o polvo de hojas de tabaco se puede usar de forma oral, aplicándose en encías y dientes o de forma nasal; se cree que este tipo de consumo nasal es originario de los indios de Brasil, que usaban tubos de hueso adornados para inhalar el tabaco en polvo y fue difundido entre los habitantes de México y las islas del Caribe ^[15].

El tabaco sin humo contiene Nitrosaminas volátiles y no volátiles, provenientes de las interacciones entre nitrato/nitrito y las aminas (nicotina y sus alcaloides relacionados). Las Nitrosaminas volátiles se encuentran presentes en alimentos como el pescado, algunos embutidos y en quesos, consiguiéndose en el tabaco en pequeñas cantidades. Las Nitrosaminas no volátiles (de alto peso molecular) se producen exclusivamente en el tabaco y son llamadas Nitrosaminas específicas del tabaco provenientes principalmente de la amina terciaria nicotina y de las aminas secundarias, nornicotina, anatabina y anabasina (mencionadas en párrafos anteriores) ^[10,15].

Se han realizado pruebas científicas en diversos países y en su mayoría indican que el hábito de consumir tabaco sin humo contribuye a aumentar el riesgo de desarrollar cáncer en la cavidad bucal, fosas nasales, faringe, esófago, páncreas y vías urinarias, con respecto a los no consumidores de algún tipo de tabaco ^[9,17]. Por otro lado, las pruebas indican que el riesgo de los consumidores de tabaco sin humo es probablemente menor al riesgo de los consumidores de cigarrillos ^[9,16]. Sin embargo, otros estudios arrojan resultados diferentes, indicando que el consumir tabaco sin humo es tan riesgoso para la salud como fumar o incluso puede serlo aún más, ya que la cantidad de nicotina absorbida al mascar una unidad de tabaco sin humo es mayor que la absorbida al fumar un cigarrillo ^[14].

2.5. Tabaco sin humo en Venezuela. El chimó

El chimó es un preparado de jalea de tabaco elaborada por los indígenas de los andes Venezolanos. Cuando los españoles comenzaron su travesía por las montañas andinas, encontraron una laguna de agua salada y varias tribus a sus alrededores, a esta le colocaron el nombre de La Lagunillas de Urao, debido al nombre que recibe la sal que produce esta laguna. Estos indígenas preparaban el Mó, el cual se obtiene a partir del cocimiento de la hoja del tabaco, llevándolo a un estado pastoso, luego colocaban sal de Urao (carbonato de sodio) y otros aliños dando el gusto esperado, obteniendo así el “Chimó”, el cuál es una de los más antiguos tabacos de mascar que existen en el mundo ^[18].

En lengua indígena al aliño se le llamaba Chi y Mó significa extracto de tabaco, así se forma la palabra indígena *Chimó*. 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 ^[18].

En líneas generales la fabricación de chimó consiste en hervir hojas de tabaco con melaza durante varios días, descartando el almidón, hasta que se produce una pasta espesa de color negro. Un kilo de esta pasta proviene de procesar varios kilos de tabaco, esta se enriquece o se "aliña" con diferentes sustancias dependiendo de la especialidad local, por ejemplo: hipoclorito de sodio, sabores artificiales, azúcar, entre otros. El producto final se expende en pequeñas cajas de lata, plástico o en envoltorios tipo caramelo.

En Venezuela se creía que el consumo de 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 evidencian 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 %), los estudiantes más jóvenes (sexto grado) y los matriculados en escuelas públicas consumen más chimó que el resto. Este mismo estudio reveló que, en mayor o menor proporción, en todos los países incluidos, existe consumo por parte de usuarios entre 13 y 15 años de edad ^[19].

En el año 2005 la Unidad de Investigación Clínica y Epidemiológica de Ascardio en Barquisimeto, encontró que el consumo de chimó en nuestro país ha ido en aumento constante en los últimos años, dejando de ser un hábito de la población rural y de los páramos andinos para incursionar con fuerza en las ciudades ^[20]. En el estudio "Consumo de chimó en los colegios", realizado por la Organización Cátedra Libre Antidrogas (ONG), quienes lo consumen tienen entre 13 y 25 años y alegan que su masticación les produce la sensación de bienestar, satisfacción, embriaguez y placer al consumirlo solo o en grupo. Lo que más les preocupa es la desinformación de los

estudiantes sobre los efectos de las drogas, que no se esté trabajando en los colegios en materia de prevención y que los padres tampoco ayudan mucho porque no hablan en casa con sus hijos. Según indica la ONG, se ve con mayor frecuencia a los estudiantes “mascar” chimó sin conocer las consecuencias. Suelen creer que no hace daño, porque no se fuma ^[20].

Más recientemente, en julio del año 2009, el Servicio Autónomo de Contraloría Sanitaria del Ministerio de Salud efectuó el primer taller Nacional Regulatorio del Chimó como producto derivado del tabaco, con representantes de la Organización Mundial de la Salud. En esa oportunidad, el director del servicio indicó que de los 3 mil componentes del chimó, 28 son carcinógenos y especialistas señalaron que el incremento de cáncer de laringe, labios y lengua en ciertas zonas del país podría estar asociado a su consumo, el cual es tradicional en Táchira, Mérida, Trujillo, Portuguesa y Lara. La intención de la reunión era crear un marco regulatorio para impedir su venta a menores de edad, pues sólo hay restricciones sobre el tabaco fumado. Hasta ahora no se ha aplicado ninguna campaña informativa sobre el chimó ^[21].

El Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel desmiente que el chimó es benévolo y su uso podría evitar el consumo de cigarrillos entre niños y jóvenes. Se demostró que el producto posee el pH más elevado de otras modalidades de tabaco para masticar que existen en otros países, por lo que favorece la absorción de la nicotina e incluso al dejar de ser su producción artesanal, el proceso industrial manipula su contenido y el pH para hacerlo más adictivo ^[20].

En vista a lo anteriormente planteado, relativo al crecimiento del consumo del chimó y la comercialización del mismo, se hace indispensable establecer normas de control, respecto del elemento adictivo. Por lo tanto, el especial interés del presente trabajo es

establecer un método de análisis que pueda determinar los niveles de nicotina en tabaco sin humo (chimó), primordialmente en los fabricados en el país.

3. ANTECEDENTES

3.1. Anders H. Laurene y T. Gibson Harrell en el año 1958 ^[22], 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 co-precipitación 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 la 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. Weeks W. W., D. L. Davis y L. P. Bush en el año 1969 ^[23], reportaron los primeros análisis por cromatografía de gases analizando nicotina y algunos alcaloides relacionados (nornicotina, anatabina y anabasina). El cromatógrafo estaba provisto de un detector de ionización a la llama y una columna empacada (3,05 m y 2 mm DI) con una fase estacionaria DC 550 (metil-fenil-silicona) y un soporte sólido Chromosorb G. La extracción de los alcaloides fue realizada con una mezcla de cloroformo y benceno en medio básico, mediante hidróxido de bario. Para el análisis, la temperatura del horno se mantuvo en 250 °C, se dispuso de nitrógeno como gas de arrastre a un flujo de 30 mL/min y utilizaron el método de estándar interno empleando quinolina. Los resultados obtenidos en estos estudios, arrojaron una buena precisión con respecto a las técnicas anteriores y fue a partir de este momento, que la cromatografía de gases se convirtió en la técnica por excelencia para la determinación de alcaloides en tabaco.

3.3. Wu Weijia, Ashley David L. y Watson Clifford H. en Atlanta en el año 2002 ^[24], 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 diferentes países: 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

popular 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°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 µm), un mezclador para la preparación de las muestras a inyectar y una fibra SPME de dimetilsiloxano de 100 µm. La extracción con la fibra de los alcaloides en la muestra, se realizó durante 2 minutos a 40 °C y la desorción en el cromatógrafo fue durante 4 minutos a 260 °C. Se empleó helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min y la temperatura del horno inició en 100°C por 0,5 minutos incrementándose luego a una rampa de 40 °C/min hasta 280°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 µL de pirrolidina, 4 mL de 0,01 N de fosfato de sodio tribásico, y la mezcla de estándar interno de 100 µg de metil-²H₃- nicotina y 20 µg de 3', 4', 5'-¹³C₃-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 2.1 y 2.2) 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, 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 2.1. 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 2.2. 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)
Japón	Mild Seven	16,7 $\pm$ 1,4	1,30 $\pm$ 0,38	0,094 $\pm$ 0,021	0,86 $\pm$ 0,39
Japón	Marlboro	17,7 $\pm$ 1,9	1,10 $\pm$ 0,50	0,085 $\pm$ 0,008	0,68 $\pm$ 0,20
Kenya	Sportsman	12,5 $\pm$ 0,8	0,50 $\pm$ 0,10	0,051 $\pm$ 0,003	0,49 $\pm$ 0,11
Kenya	Marlboro	15,6 $\pm$ 1,1	0,82 $\pm$ 0,28	0,084 $\pm$ 0,011	0,44 $\pm$ 0,08
México	Boots	16,3 $\pm$ 0,9	1,27 $\pm$ 0,14	0,071 $\pm$ 0,012	0,55 $\pm$ 0,20
México	Marlboro	21,2 $\pm$ 0,8	1,50 $\pm$ 0,48	0,106 $\pm$ 0,003	0,56 $\pm$ 0,15
Nigeria	High S	8,1 $\pm$ 0,4	0,36 $\pm$ 0,14	0,044 $\pm$ 0,013	0,13 $\pm$ 0,02
Nigeria	Marlboro	17,6 $\pm$ 1,9	0,77 $\pm$ 0,28	0,077 $\pm$ 0,013	0,69 $\pm$ 0,16
Pakistán	Embassy	18,1 $\pm$ 0,6	0,63 $\pm$ 0,03	0,163 $\pm$ 0,062	0,31 $\pm$ 0,10
Pakistán	Marlboro	18,2 $\pm$ 0,8	0,84 $\pm$ 0,30	0,089 $\pm$ 0,009	0,58 $\pm$ 0,10
Rusia	Prima	15,3 $\pm$ 2,8	0,73 $\pm$ 0,06	0,060 $\pm$ 0,006	0,43 $\pm$ 0,04
Rusia	Marlboro	16,2 $\pm$ 1,6	0,85 $\pm$ 0,19	0,071 $\pm$ 0,019	0,76 $\pm$ 0,29
E.U	Doral	13,6 $\pm$ 0,6	0,66 $\pm$ 0,12	0,074 $\pm$ 0,009	0,50 $\pm$ 0,10
E.U	Marlboro	18,1 $\pm$ 1,5	0,75 $\pm$ 0,01	0,071 $\pm$ 0,011	0,55 $\pm$ 0,12

3.4. Jibao Cai, Baizhan Liu, Ping Lin y Qingde Su en Shanghai, China en el año 2003 ^[10], desarrollaron un método para el análisis de 7 alcaloides relacionados con la nicotina mediante un cromatógrafo de gases Shimadzu 14B con una columna capilar Megabore y un detector FID, en 5 muestras de tabacos diferentes y una muestra de humo de cigarrillo. Entre los alcaloides analizados están la nicotina, nornicotina, myosmina, nicotirina, anabasina, anatabina y 2,3-dipiridilo.

Para la recolección del humo del cigarrillo, se empleó una maquina que hace la acción de fumar provista de un filtro Cambridge donde se recolectó el humo de 5 cigarrillos, siendo la duración de cada soplo de 2 segundos con una frecuencia de 1 soplo/min; la extracción se realizó añadiendo 20 mL de éter, 5 mL de NaOH al 10% y 10 µg/mL de n-heptadecano como estándar interno a las almohadillas del filtro Cambridge y fueron ultrasonificados por 15 minutos. Posteriormente fueron separadas ambas capas, del extracto con los alcaloides se inyectó 1 µL en el cromatógrafo. La extracción para el tabaco, se realizó empleando la misma mezcla de extracción e igual metodología. El análisis se realizó con una temperatura de 250 °C tanto en el inyector como en el detector y empleando hidrógeno como gas de arrastre con un flujo de 20 mL/min. La cuantificación se llevó a cabo usando el método de estándar interno con n-heptadecano.

Los resultados obtenidos (Tabla 3) indicaron que el análisis de los alcaloides no se vió afectado por los componentes químicos extraídos por el éter, lográndose con este tipo de columna una alta resolución, pudiendo así identificar y cuantificar los diferentes alcaloides, llegando a la conclusión de que diferentes tipos de tabaco tienen cantidades diferentes de nicotina y sus alcaloides relacionados, y que este método podría ser empleado posteriormente para la determinación de estos alcaloides tanto en el tabaco como en el humo del cigarrillo.

Tabla 3. Contenido de alcaloides en tabaco y en humo de cigarrillo. ^a basado en el peso seco, ^b mg/cigarrillo

Muestra	Total de alcaloides (%) ^a	Distribución (%)				
		Nicotina	Nornicotina	Anabasina	Anatabina	2,3-dipiridilo
Tabaco						
C1F	4,27	17,1	71,6	2,6	4,0	1,2
C2F	4,13	91,7	3,2	1,0	3,0	0,3
B1F	4,28	93,7	1,5	0,6	3,0	0,9
B2F	5,82	94,3	2,6	0,6	2,4	0,7
C3F	5,41	94,7	1,5	0,6	2,7	0,4
Cigarrillo^b	1,23	98,3	0,1	-	-	-

3.5. Sheng L. Q, Ding L, Tong H. W, Yong G.P, Zhou X. Z y Liu S. M. en China en el año 2004 ^[25], desarrollaron un método para la determinación de nicotina, nornicotina, anabasina, anatabina, 2,3-dipiridilo y cotinina presentes en el tabaco y en el humo del tabaco, empleando extracción ultrasónica y una maquina que realiza la acción de fumar de 20 puertos (Bargwaldt Technik RM 20/cs, Alemania). Para ello, se analizaron dos marcas de cigarrillos del mismo país, uno de Estados Unidos (Marlboro) y dos tipos de tabaco. Se realizaron análisis cuantitativos y cualitativos. Para el análisis cuantitativo se empleó un cromatógrafo de gases HP 6890 con un detector FID, un auto-inyector y una columna capilar HP 1MS (30 m x 0,25 mm DI x 0.25 µm); el volumen de inyección fue de 1 µL y se empleó nitrógeno como gas de arrastre a un flujo constante de 1 mL/min. La temperatura en el puerto de inyección fue de 230 °C, la del detector de 300 °C y la temperatura inicial del horno fue de 60 °C usándose luego una rampa de calentamiento de 15 °C/min hasta 180°C y 40 °C/min hasta 280°C. Se usó el método de adición de estándar interno.

La elección del solvente más óptimo para la extracción de los alcaloides, se efectuó comparando diferentes extracciones realizadas bajo las mismas condiciones, empleando metanol, diclorometano, una mezcla 1:3 de metanol-diclorometano, acetona y hexano. La mezcla de metanol-diclorometano fue elegida como el solvente más óptimo por tener un mayor poder de extracción.

Para la preparación de las muestras, el tabaco del relleno de los cigarrillos se secó en un horno a 40 °C por 4 horas y posteriormente se pesaron 500 mg en un matraz, al cual se le añadió una solución acuosa de amoníaco y 20 mL de la solución de extracción. Se usó quinaldina como estándar interno. La mezcla se dejó en un baño ultrasónico por 15 min y una alícuota del extracto se filtró antes de ser inyectado en el cromatógrafo, esto se realizó para cada marca de tabaco. Para el análisis en el humo, los cigarrillos fueron fumados usando la máquina de 20 puertos, con una duración de soplo de 2 segundos, a una frecuencia de 1 solplo/min y un volumen de 35 mL. El humo de 20 cigarrillos se recolectó en un filtro Cambridge de 92 mm el cual fue sometido a un baño ultrasónico durante 15 minutos en una mezcla de solución de HCl de 1 mol/L y 0,2 mL de quinaldina. Se realizó una extracción con dos alícuotas de 25 mL de diclorometano y fueron separadas ambas capas. Posteriormente la capa acuosa se llevó a un pH de 13 mediante la adición de una solución acuosa de NaOH y se realizó nuevamente una extracción con 3 alícuotas de 25 mL de diclorometano. El extracto se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a 1 mL mediante un rota vapor EB 2000 conectado a una bomba de vacío.

Mediante los resultados obtenidos (Tabla 4), los investigadores concluyeron que el método de recolección del humo de cigarrillo es efectivo, el cual podría entonces emplearse posteriormente y que ambos métodos son útiles para la determinación de los alcaloides presentes en el tabaco y en el humo del cigarrillo en cuanto a parámetros de aceptabilidad.

Tabla 4. Contenido de alcaloides en humo de cigarrillo y en tabaco. ^a como un porcentaje del total de alcaloides, ^b mg/cigarrillo, ^c porcentaje w/w, ^d traza

Muestra	Total de alcaloides	Distribución (%) ^a					
		Nicotina	Nornicotina	Anabasina	Anatabina	2,3-dipiridil	Cotinina
Cigarrillo							
Tuopai	1,26 ^b	98,04	0,71	0,12	0,12	0,76	0,25
Zhongnan	0,72 ^b	97,75	0,67	0,14	0,26	0,8	0,37
Marlboro	0,81 ^b	97,64	0,82	0,13	0,22	0,68	0,5
Tabaco							
Burley	3,57 ^c	90,21	4,76	0,49	4,16	0,38	tr ^d
Curado al humo	1,31 ^c	93,59	2,56	0,55	3,3	tr	tr

3.6. Richter Patricia y Spierto Francis W. en Atalanta, Estados Unidos en el año 2002 ^[14], determinaron la cantidad de nicotina total, la humedad, el pH y el contenido de nicotina no protonada de las marcas de tabaco sin humo más vendidas en Estados Unidos en el año 2000. Se analizaron 18 marcas de tabaco sin humo: 8 muestras de tabaco de mascar húmedo y 10 muestras de tabaco de mascar en hojas sueltas, las cuales fueron comprados en varios establecimientos durante junio y julio de 2001 en el área metropolitana de Atlanta por el personal de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés).

Las muestras fueron almacenadas en sus empaques originales a -70°C hasta que fueron enviadas a un laboratorio analítico privado en Ontario, Canadá, *Labstat International Inc.* La extracción de nicotina a una determinada cantidad de tabaco, se realizó con metil-terbutil-éter y los análisis se hicieron por triplicado empleando cromatografía de gases, pero la publicación no arroja información de las condiciones cromatográficas utilizadas. Por otro lado, la cantidad de nicotina no protonada se calculó mediante la ecuación de Henderson y Hasselbach en porcentaje y mg/g, el

porcentaje de humedad se determinó mediante la diferencia de peso de una cantidad de tabaco sin humo antes y después de secarse por 3 horas en un horno a 99 °C y el pH del producto fue medido con un medidor de pH en agua destilada desionizada.

Los resultados obtenidos (Tabla 5), indicaron que de manera general todas las marcas de tabaco de mascar húmedo contienen mayor cantidad de nicotina que el tabaco de mascar en hojas sueltas, al igual que la humedad, el pH y el porcentaje de nicotina no protonada, con la excepción de una de ellas, la cual presentó un porcentaje bajo de nicotina no protonada como consecuencia de un pH bajo ($\text{pH} \approx 5,35$) y una baja cantidad de nicotina total.

Además concluyeron que los productos con un pH alto tienen un alto porcentaje de nicotina no protonada, siendo esta forma de nicotina la que más fácilmente atraviesa las membranas biológicas y que en el caso del tabaco de mascar húmedo son justamente estos productos los que mayoritariamente se venden en el mercado. Por último, concluyen que a pesar de que todos los productos de tabaco sin humo son producidos a partir de la hoja de tabaco, varios factores como por ejemplo el cultivo o alteraciones de la mezcla generan variación de la concentración de nicotina entre diferentes lotes.

Tabla 5. Contenido de nicotina, humedad y pH en 18 productos de tabaco de mascar húmedo. ¹ Hawken Wintergreen, ² Skoal Bandits Mint, ³ Timber Wolf Long Cut Straight, ⁴ Silver Creek Long Cut Wintergreen, ⁵ Copenhagen Long Cut, ⁶ Copenhagen Snuff, ⁷ Skoal Long Cut Straight, ⁸ Kodiak Wintergreen, ⁹ Chattanooga Chew Premier Flavor, ¹⁰ Beech-nut Wintergreen, ¹¹ H. B. Scott's Private Blend, ¹² Beech-nut, ¹³ Taylor's Pride, ¹⁴ Red Man, ¹⁵ Red Man Golden Blend, ¹⁶ Red Man Select, ¹⁷ Granger Select, ¹⁸ Levi Garret.

Marca	Nicotina $\pm$ s (mg/g)	Total humedad $\pm$ s (%)	pH $\pm$ s
1	4,28 $\pm$ 0,10	26,0 $\pm$ 0,6	5,35 $\pm$ 0,04
2	8,49 $\pm$ 0,23	47,3 $\pm$ 0,2	7,13 $\pm$ 0,03
3	13,54 $\pm$ 0,22	50,8 $\pm$ 0,1	7,14 $\pm$ 0,01
4	6,39 $\pm$ 0,04	53,5 $\pm$ 0,1	7,64 $\pm$ 0,03
5	10,35 $\pm$ 0,20	53,5 $\pm$ 0,0	7,41 $\pm$ 0,04
6	12,71 $\pm$ 0,15	53,0 $\pm$ 0,1	7,52 $\pm$ 0,03
7	12,94 $\pm$ 0,34	54,6 $\pm$ 0,1	7,62 $\pm$ 0,02
8	9,00 $\pm$ 0,02	53,4 $\pm$ 0,1	8,28 $\pm$ 0,03
9	8,26 $\pm$ 0,09	25,0 $\pm$ 0,1	5,33 $\pm$ 0,05
10	4,06 $\pm$ 0,09	22,4 $\pm$ 0,1	5,70 $\pm$ 0,01
11	4,11 $\pm$ 0,06	23,4 $\pm$ 0,1	5,71 $\pm$ 0,01
12	6,79 $\pm$ 0,12	22,0 $\pm$ 0,2	5,61 $\pm$ 0,04
13	4,69 $\pm$ 0,05	21,2 $\pm$ 0,1	5,77 $\pm$ 0,05
14	7,44 $\pm$ 0,09	24,0 $\pm$ 0,1	5,83 $\pm$ 0,03
15	6,23 $\pm$ 0,03	24,0 $\pm$ 0,1	6,03 $\pm$ 0,04
16	3,73 $\pm$ 0,06	25,1 $\pm$ 0,0	6,26 $\pm$ 0,02
17	4,90 $\pm$ 0,02	21,3 $\pm$ 0,1	6,34 $\pm$ 0,02
18	4,45 $\pm$ 0,09	23,0 $\pm$ 0,3	6,41 $\pm$ 0,02

3.7. Richter Patricia, Hodge Knachelle, Stanfill Stephen, Zhang Liqin y Watson Clifford en Atlanta, Estados Unidos en el año 2007 ^[17], realizaron un estudio para determinar la cantidad total de nicotina, el pH, la humedad, el contenido de N-nitrosaminas y de nicotina no protonada en 40 marcas de tabaco de mascar húmedo de

mayor venta, fabricados por 5 empresas diferentes. Adicionalmente examinaron la relación entre las características de los productos, como el empaquetamiento, corte, sabor y precio, con los niveles de nicotina no protonada y las N-nitrosaminas. Cinco paquetes de cada una de las 40 marcas fueron adquiridas por el personal de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) en el área metropolitana de Atlanta en el año 2004. Las muestras fueron almacenadas en su presentación original a -70 °C hasta su uso y posteriormente los 5 paquetes de cada marca se combinaron y las muestras homogéneas fueron utilizadas para los análisis.

La extracción de las muestras se realizó con etil acetato a 100°C y 1500 psi por 5 minutos usando un extractor de solvente acelerado Dionex ASEH 200, posteriormente los extractos fueron secados con nitrógeno y reconstituidos en 10 mL de metanol. Luego las muestras se diluyeron 10 veces en una solución acuosa de acetato de amonio para el análisis por el método de cromatografía líquida con espectrometría de masas.

Los resultados (Tabla 6), mostraron que existe una correlación significativa entre el pH, la humedad y la cantidad de nicotina no protonada, siendo entonces el pH un buen indicador del contenido de este tipo de nicotina en los productos de tabaco sin humo. Adicionalmente, en base a la información que poseían de los productos más vendidos, concluyeron que justamente son aquellos que contienen mayor cantidad de nicotina no protonada, siendo esta la nicotina que se absorbe con mayor facilidad y rapidez.

Adicionalmente, indicaron que el tipo de empaquetado tiene cierta relación con la humedad, el pH y la cantidad de nicotina no protonada, pero no existe relación con el contenido de N-nitrosaminas. De igual forma no se consiguió una correlación significativa entre la humedad y las N-nitrosaminas. Por último, concluyen que entre las

marcas de mayor venta el contenido de nicotina no protonada y de las N-nitrosaminas cancerígenas varía ampliamente.

Tabla 6. Contenido de nicotina total, humedad y pH en 10 productos de tabaco de mascar húmedo de las 40 marcas analizadas. ND no detectada

Marca	Nicotina $\pm$ s (mg/g)	Total humedad $\pm$ s (%)	pH $\pm$ s
W. B. Cut Regular	25,03 $\pm$ 0,10	33,0 $\pm$ 0,3	5,71 $\pm$ 0,01
Red Seal Fine Cut Wintergreen	14,19 $\pm$ 0,08	53,3 $\pm$ 0,2	7,55 $\pm$ 0,00
Grizzly Fine Cut Regular	13,17 $\pm$ 0,07	53,8 $\pm$ 0,2	7,81 $\pm$ 0,00
Copenhagen Long Cut Regular	12,99 $\pm$ 0,02	53,7 $\pm$ 0,3	7,91 $\pm$ 0,01
Silver Creek Fine Cut Wintergreen	11,96 $\pm$ 0,04	52,6 $\pm$ 1,2	7,08 $\pm$ 0,00
Silver Creek Long Cut Straing	10,26 $\pm$ 0,14	50,7 $\pm$ 0,1	6,64 $\pm$ 0,01
Cougar Long Cut Natural	9,14 $\pm$ 0,06	53,0 $\pm$ 0,1	8,16 $\pm$ 0,03
Skoal Bandits Mint	7,64 $\pm$ 0,10	44,5 $\pm$ 0,7	6,72 $\pm$ 0,00
Hawken Rough Wintergreen	4,42 $\pm$ 0,02	27,4 $\pm$ 0,2	5,54 $\pm$ 0,01
Oregon Mint Snuff	ND	3,23 $\pm$ 0,34	6,51 $\pm$ 0,03

3.8. 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 ^[26], 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 μ 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 µm). 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. Este método implementado, es 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 µL 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 µL 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 7. 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, 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 7. 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

3.9. Stanfill Stephen B., Jia Lily T, Ashley David L. y Watson Clifford H. en Atlanta, Estados Unidos en el año 2009 ^[13], realizaron la comparación de dos métodos: cromatografía de gases con ionización a la llama (CG-FID) y espectrometría de masa (CG-MS), mediante el análisis paralelo de 7 muestras de tabaco sin humo convencionales. Adicionalmente, determinaron el porcentaje de nicotina no-protonada

mediante la ecuación de Henderson y Hasselbach, midiendo el pH y el porcentaje de humedad.

Para cada producto, 5 paquetes se homogeneizaron, se transfirieron a una botella ambar que fue sellada con una cubierta de teflón y se almacenaron a -70°C hasta que fueron usadas, llevándolas primero a temperatura ambiente. Se empleó quinolina como estándar interno para la cuantificación de nicotina y la solución de extracción se preparó mezclando aproximadamente 500 mg de quinolina con 4 L de metil-terbutil-éter. Para la determinación de nicotina en las muestras de tabaco sin humo se añadió 50 mL de la solución de extracción y 5 mL de NaOH al 10 % a 1 gr de tabaco homogeneizado, la mezcla fue agitada por 2 horas y se separaron ambas capas para los posteriores análisis mediante la inyección de 1 μL del extracto.

Ambos métodos, emplearon condiciones de corrida similares, manteniendo una temperatura en el inyector de 230°C y un flujo de 1,7 mL/min de helio como gas de arrastre. El método CG-FID tuvo un tiempo total de corrida de 26,7 minutos y el método CG-MS de 3,7 minutos.

Los resultados obtenidos por ambos métodos (Tabla 8), mostraron una excelente precisión, además una comparación entre ellos arrojó que no son estadísticamente diferentes. Por otro lado, en los cromatogramas obtenidos mediante el análisis por el método CG-FID de extractos de tabaco sin humo convencionalmente saborizados, los picos de quinolina y nicotina se encontraron separados en la línea base y no se observaron interferencias, el mismo análisis por el método CG-MS, indicó una excelente separación cromatográfica de la quinolina y la nicotina, con mayor rapidez en la elución. Ambos métodos mostraron excelentes resultados, sin embargo algunos productos mostraron interferencias mediante el uso del método CG-FID, donde la nicotina co-eluyó con el eugenol mostrando un largo pico en el tiempo de retención de la nicotina, lo

cual lleva a que un pico de nicotina que contenga eugenol es indistinguible de uno que solo contenga nicotina, pero por el método CG-MS se observó la separación cromatográfica de ambos compuestos. Otro caso similar se dió con la carvona que co-eluye con la quinolina (Tabla 9).

En base a estos resultados, concluyeron que el método CG-MS es el más eficiente para la cuantificación total de la nicotina en los casos donde están presentes algunas interferencias que no sean posibles detectar por el método CG-FID, además de necesitar un menor tiempo de corrida y una mayor resolución, pero requiere de mayor gasto de equipamiento.

Tabla 8. Contenido de nicotina total en productos saborizados de tabaco sin humo

Muestras	CG-MS		CG-FID	
	Total Nicotina $\pm$ s (mg/g)	CV	Total Nicotina $\pm$ s (mg/g)	CV
Muestra A	4,39 $\pm$ 0,04	3,23	4,39 $\pm$ 0,04	3,20
Muestra B	8,95 $\pm$ 0,06	2,32	8,92 $\pm$ 0,07	2,50
Muestra C	10,24 $\pm$ 0,04	1,49	10,29 $\pm$ 0,03	1,02
Muestra D	10,36 $\pm$ 0,06	1,84	10,30 $\pm$ 0,05	1,68
Muestra E	12,24 $\pm$ 0,05	1,54	12,23 $\pm$ 0,05	1,50
Muestra F	15,19 $\pm$ 0,09	1,93	15,11 $\pm$ 0,08	1,83
Muestra G	26,45 $\pm$ 0,10	1,29	26,46 $\pm$ 0,13	1,67

Tabla 9. Comparación de la cuantificación de nicotina por CG-MS y CG-FID de productos que contienen carvona y eugenol

Descripción del producto	Origen de la muestra	Compuesto de interferencia	Nicotina (mg/g)	Nicotina (mg/g)	%Sesgo
			CG-MS	CG-FID	
Tabaco con sabor a menta	Estados Unidos	Carvona	12,07	12,35	2,32
Mainpuri	Pakistán	Eugenol	2,26	7,76	243
Tabaco saborizado	Suecia	Eugenol	8,64	9,74	12,7
Bolsa con sabor a canela	Estados Unidos	Eugenol	10,97	11,13	1,46

3.10. Stanfill Stephen B, Zhang Ligin, Jia Lily T, Lawler Tamka, Watson Clifford H. y Ashley David L. en enero del año 2009 ^[27], 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; esta determinación analítica fue realizada 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 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 10) se reportan los resultados obtenidos para las 5 diferentes marcas comerciales de chimó Venezolano analizadas.

Tabla 10. 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

4. OBJETIVOS.

Objetivo General:

El principal objetivo de este estudio, es desarrollar un método de extracción y análisis de nicotina en tabaco sin humo, específicamente en los de consumo nacional (chimó).

Objetivos Específicos:

- ***Muestra de referencia de chimó:*** Debido a que no se dispone de un estándar certificado de chimó, es necesario contar con una muestra de producción nacional. En base a ella se realizarán las diferentes modificaciones experimentales con miras a conseguir las mejores condiciones de análisis. Por otra parte, el chimó es un producto artesanal que tiene un bajo control de calidad, por lo tanto, su composición puede variar entre lotes. Esto hace necesario obtener del mercado una cantidad suficientemente grande de diferentes lotes, homogeneizarlo para disponer de ella como una muestra de referencia.
- ***Ensayo convencional:*** Desarrollar un método no cromatográfico para la determinación de nicotina en chimó y su posterior comparación con la técnica de Cromatografía de Gases.
- ***Ensayo cromatográfico preliminar:*** en base a la revisión bibliográfica y la disponibilidad de materiales y equipos, ajustar las mejores condiciones de separación e identificación de nicotina por Cromatografía de Gases, para ello emplearemos estándares puros de nicotina.

- **Ajuste de la condiciones cromatográficas:** con un método de extracción inicial y de acuerdo a la complejidad de la matriz de la muestra de referencia de chimó, reajustar las condiciones cromatográficas, para establecer la mejor separación de la nicotina en el menor tiempo posible.
- **Figuras de merito de la técnica de medida:** bajo las condiciones cromatográficas anteriormente desarrolladas, evaluar las figuras de mérito de la técnica de medida (Reproducibilidad, Rango Dinámico Lineal, Linealidad, etc).
- **Estudio de las condiciones de extracción:** esta etapa comprende la evaluación de diferentes solventes de extracción, así como las mejores condiciones de los mismos, además de determinar las respectivas figuras de mérito del sistema extracción - medida (Reproducibilidad, Exactitud a través del porcentaje de recuperación, etc).
- **Análisis de muestras comerciales:** determinar la concentración de nicotina en diferentes marcas comerciales venezolanas.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1. Materiales y equipos empleados

5.1.1. Equipos

- Espectrofotómetro de UV-Visible Genesys 10 UV.

Fuente de la lámpara	Xenón
Sistema óptico	Haz simple, dividido
Rango (nm)	190 – 1100
Ancho de banda espectral (nm)	5
Precisión	± 1,0 nm
Rango fotométrico	0,3 – 125 % T; 0,1 – 3,0 A; 0 – 9999 C Transmitancia; Absorbancia; Concentración

- Cromatógrafo, modelo Trace GC de Thermo Finnigan. Detector de ionización a la llama (FID, Flame Ionization Detector).
- Columna capilar DB-5 de Agilent Technologies (J&W Scientific), 30 metros de longitud, 0,32 milímetros de diámetro interno y 0,25 µm de espesor pelicular. *Comúnmente empleada para propósitos de baja polaridad, compuestos cíclicos, aromáticos, drogas, fenoles, hidrocarburos aromáticos, pesticidas, herbicidas. Rango de temperatura -60 a 325/350 °C (-76 a 617/662 °F). Es equivalente en USP a la fase G27. Composición de la fase, según fabricante: cross-linked/surface bonded 5% phenyl, 95% methylpolysiloxane. Especificaciones en EPA métodos: 507, 508, 515, 515.2, 524.2, 525, 548.1, 680, 1625, 1653, 8081, 8141, 8270 y 8280.*
- Agitador Thermolyne, modelo Maxi Mix Plus.

- Freezer Thermo Electron Corporation. Freezer Forma Pharmacy con un rango de temperatura de 0 - 30 °C.
- Ultrasonido. Cole - Parmer. Modelo 8890.

5.1.2. Reactivos

- Patrón de Nicotina ($C_{10}H_{14}N_2$) al 99 %. Sigma - Aldrich.
- Patrón de Hexadecano ($C_{16}H_{34}$). Calidad CG. Poly Science Corp.
- Dietileter ($C_4H_{10}O$). Grado CG, 99,5 %. Merck EM SIENCE.
- Hexano (C_6H_{14}). Grado CG, 99,9 %. Burdick & Jackson.
- Cloroformo ($CHCl_3$). Contiene 1 % de Etanol. Grado CG, 99,98 %. Merck.
- Metanol (CH_3OH). Grado CG, 99,9 %. Merck.
- Diclorometano (CH_2Cl_2). Grado CG, 99,9 %. Burdick & Jackson.
- Metil-terbutil-éter ($C_5H_{12}O$). Grado CG, 99,5 %. Merck.
- Acetona (C_3H_6O). 99,5 %. Merck.
- Hidróxido de sodio (NaOH). 99 %. Merck.
- Cloruro de Sodio (NaCl). 99,8 %. Fisher Scientific.
- Ácido Clorhídrico (HCl). 37 %. Riedel-de Haën.
- Marcas de chimó analizadas: Matheus, San Benito, Chain, y El Águila facilitadas por el Laboratorio de Análisis de Derivados de Tabaco de la Unidad de Fármaco-Toxicología del Instituto "Rafael Rangel" de la Universidad Central de Venezuela. El Tigrito, Las delicias, Matheitos y San Francisco adquiridas en el mercado municipal de Valera - Edo. Trujillo.

5.2. Purificación del patrón de nicotina

A pesar de que se partió de un estándar de nicotina de alta pureza, este tiende a descomponerse en el tiempo, siendo evidenciado por un cambio de coloración (de incoloro a un tono amarillento). La bibliografía recomienda su empleo recién destilado [10,22], por lo que se procedió a purificarlo mediante una destilación a presión reducida, tal y como se muestra en el montaje esquematizado en la Figura 4. Posteriormente, para su conservación, el estándar fue almacenado en un recipiente de vidrio ámbar y mantenido a una temperatura de $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

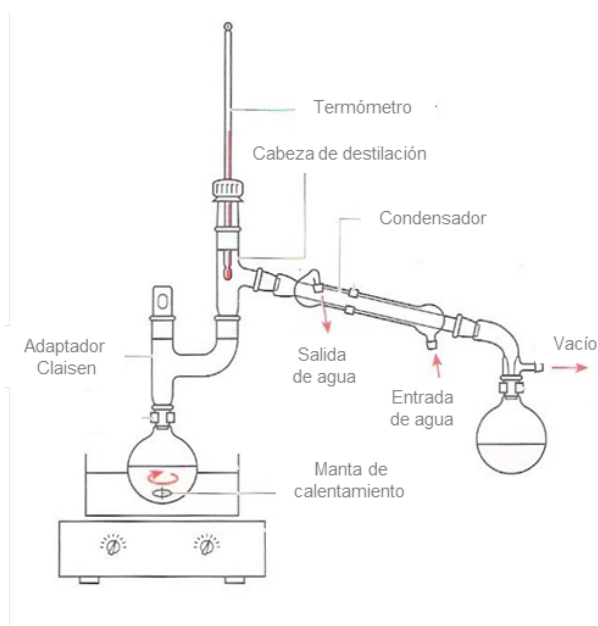


Figura 4. Montaje de destilación a presión reducida.

5.3. Muestra de referencia de chimó

Puesto que se debían ensayar diversas metodologías, la primera etapa consistió en tratar de obtener un estándar que pudiera servir como referencia para la comparación de resultados. Sin embargo, debido a que no se disponía de un patrón certificado de nicotina en una matriz con las características físico-químicas del chimó, se procedió a elaborar una muestra de referencia. Aunque no se conoce la concentración exacta de nicotina en dicha muestra, puede servir como sistema de comparación entre técnicas de análisis. Para su elaboración, se empleó la marca de mayor comercialización nacional “*El Tigrito*” y con el objetivo de disponer de suficiente cantidad, se combinaron varios envases en un baño de maría (18 g c/u) para hacerlo más fluido y así facilitar la mezcla. La pasta homogénea resultante fue tomada como “**muestra de referencia**”.

5.4. Ensayo de referencia para la determinación de nicotina en chimó

Al igual, de no disponer de un estándar certificado de nicotina en chimó, tampoco existe un método estándar para la determinación de nicotina en este tipo de matriz. Por lo tanto, se procedió a la búsqueda de un análisis alternativo, que se pudiera emplear para efectos de comparación con el futuro método cromatográfico a desarrollar. Se optó por el análisis convencional: ***Alkaloids (Total as nicotine) in Tobacco***, establecido en la Norma: ***Oficial 960.07 del año 2000 de la Official Methods of Analysis of AOAC International*** ^[28]. Hay que hacer notar, que este método determina los alcaloides totales, sin embargo la nicotina representa más del 95 % de ellos ^[10, 25, 26], por lo tanto, puede servir en una primera instancia como sistema de referencia. Para efectos prácticos, cuando se mencionan los resultados por esta metodología se reportan como nicotina en lugar de alcaloides totales, tal y como lo sugiere la norma ^[28].

Dicho método consiste en la destilación por arrastre con vapor de los alcaloides en tabaco (hojas, cigarros, picaduras, etc), seguida de la medida de los alcaloides totales, y su posterior reporte como nicotina. Para esto, se coloca una cantidad determinada de muestra en una disolución alcalina de hidróxido de sodio al 40 % (p/v), saturada con cloruro de sodio. Se destila por arrastre con vapor y el destilado es recolectado en ácido clorhídrico al 7,4 % (p/p, corresponde a una dilución 1 a 4 del HCl al 37 % p/p en agua destilada). Posteriormente, se lleva a volumen y la determinación de los alcaloides totales es realizada mediante un método espectrofotométrico o gravimétrico (a escoger). En nuestro caso se escogió el método espectrofotométrico debido a su simplicidad.

5.4.1. Ensayo de arrastre con vapor por determinación UV

Ya que la técnica de medida escogida para la determinación de nicotina (recolectada del arrastre con vapor) fue la espectroscopia molecular UV, la primera etapa consistió en la selección de la longitud de onda de trabajo. Para ello, se escogió un patrón de nicotina de 50 mg/L, disuelta en HCl al 7,4 % (el medio ácido corresponde al ambiente donde es “atrapada” la nicotina, a consecuencia del arrastre con vapor).

Se escogió un barrido en el espectrofotómetro en el rango de 200 a 300 nm. Primeramente se realizó el barrido con el blanco (HCl 7,4 %) y seguidamente se efectuó el del patrón de nicotina. El espectro obtenido se muestra en la Figura 5.

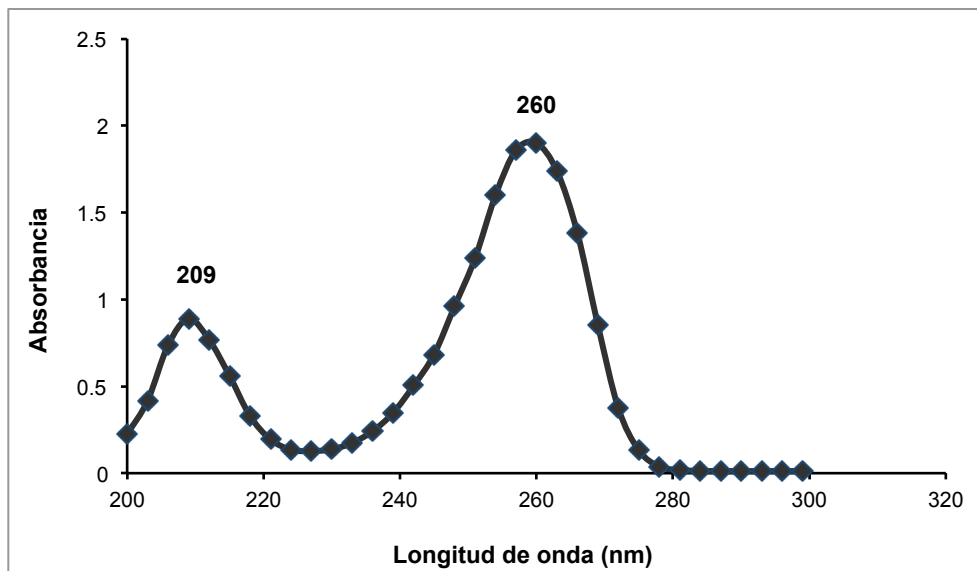


Figura 5. Barrido para la selección de la longitud de onda de trabajo

Se observa que el espectro UV de la nicotina está formado por dos bandas, una con un máximo a 209 nm y otro mayor a 260 nm. Se escogió la longitud de onda correspondiente a 260 nm por tener mayor coeficiente de absortividad y por lo tanto, mayor sensibilidad.

Seguidamente, se procedió a realizar la curva de calibración, estableciéndose un rango dinámico lineal desde 1,8 a 30 mg/L. En la Figura 6 se muestra la curva de regresión lineal ajustada por mínimos cuadrados y el análisis de residuales en la Figura 7. En base al valor del coeficiente de determinación y el análisis de residuales, se observa que el modelo lineal por mínimos cuadrados se ajusta bastante bien.

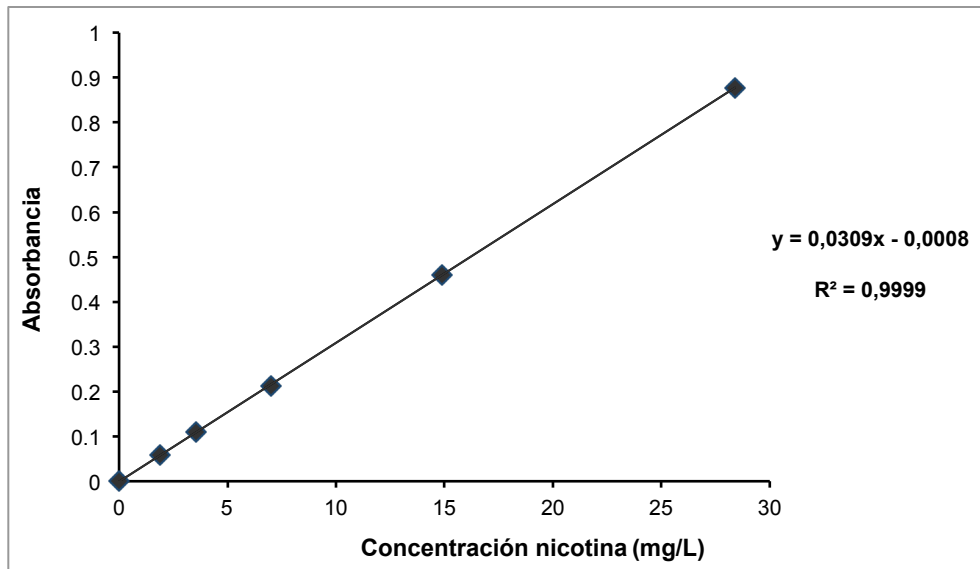


Figura 6. Curva de regresión lineal ajustada por mínimos cuadrados

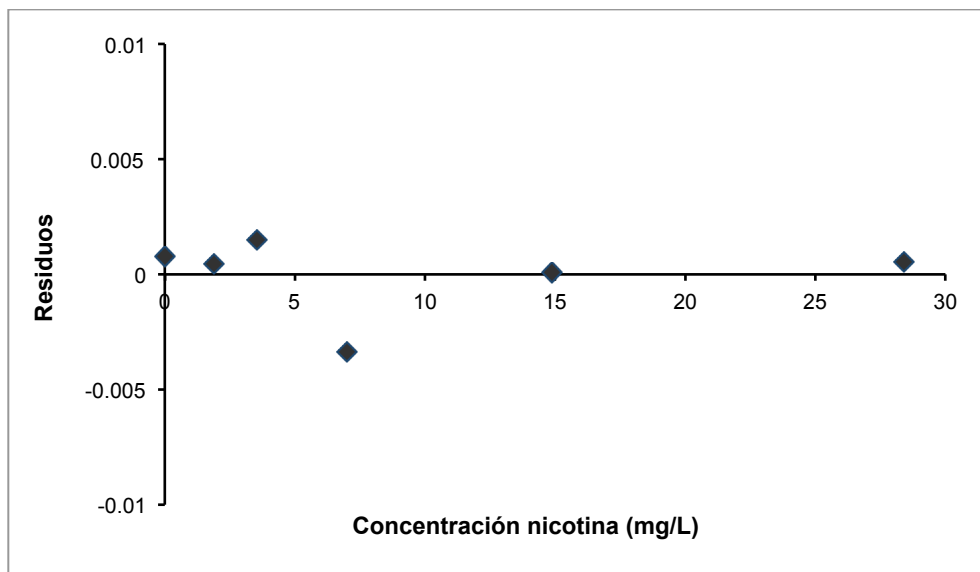


Figura 7. Gráfico de residuales

Un detalle importante es que los patrones debían prepararse periódicamente, ya que la estabilidad de la concentración en función del tiempo mostró una degradación al cabo de una semana, por tanto se rehacían las curvas de calibración semanalmente.

Seguidamente, se realizaron destilaciones preliminares con la finalidad de corregir cualquier detalle, así como también de afinar ciertas condiciones como: peso de muestra, volumen de destilado, volumen de recolección, tiempo de destilación y temperatura, ya que las condiciones establecidas en la norma no necesariamente se ajustan a la matriz en estudio (chimó). Una fotografía del montaje final se muestra en la Figura 8.



Figura 8. Montaje de la destilación por arrastre con vapor

El tiempo de destilación fue optimizado en función de garantizar que toda la nicotina fuese destilada. Para ello, se recogieron varias fracciones del destilado a diferentes tiempos, las cuales fueron medidas en el espectrofotómetro. La última fracción recogida

fue aquella donde la señal de absorbancia era cercana a la señal de absorbancia del blanco. En base a esto y después de un gran número de experiencias, el procedimiento quedó establecido de la siguiente manera:

Se pesan 0,3 g de muestra (precisión de 0,1 mg) y se transfieren cuantitativamente a un balón de destilación de 250 mL, luego se adiciona 20 mL de una disolución acuosa de NaOH al 40 % p/v, saturada de NaCl. Deben emplearse perlas de vidrio para evitar desprendimientos bruscos por la ebullición y así mismo prevenir la contaminación del destilado. Una vez comenzada la destilación, se añade agua de manera constante para mantener aproximadamente el mismo volumen de muestra durante toda la destilación. El destilado es recuperado en un balón de recolección con 5 mL de HCl al 7,4 %. Finalmente, es transferido a un matraz aforado de 250 mL, para ser medido en el espectrofotómetro. El tiempo total del análisis corresponde a 5 horas aproximadamente.

5.4.2. Determinación de nicotina en la muestra de referencia

Una vez establecido el método de arrastre de vapor con medida espectrofotométrica, se procedió a la determinación de nicotina en la muestra de referencia. Para ello se realizaron seis réplicas y los resultados se muestran en la Tabla 11.

En base a los resultados obtenidos, se puede considerar que para un método volumétrico clásico que lleva numerosos pasos experimentales un CV del orden del 3 % es satisfactorio.

Seguidamente, con la concentración de nicotina de la muestra de referencia ($12,9 \pm 0,4$ mg/g) se procedió a determinar el porcentaje de recuperación, a manera de conocer la exactitud del método. Para ello, la muestra de referencia fue contaminada con una

cantidad conocida de nicotina (recién destilada). Se realizaron cuatro réplicas y los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 11. Resultados de la concentración de nicotina en la muestra de referencia

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

El porcentaje de recuperación, se calculó de la siguiente manera:

$$\% R = \frac{M_{total} - M_{nativa}}{M_{spike}} \times 100 \quad [1]$$

Donde M_{nativa} es la cantidad inicial de nicotina en la muestra de referencia, M_{spike} es la cantidad de nicotina añadida a la muestra de referencia y M_{total} es la cantidad total de nicotina medida.

Los resultados de la Tabla 12, muestran que la exactitud es $1,76 - (3,8 - 2,1) = 0,06$; y medida como el porcentaje de recuperación está en el orden del 97 %, es decir, el valor obtenido se acerca al valor de referencia en un 97 % aproximadamente.

Tabla 12. Resultados de la contaminación de la muestra de referencia y porcentaje de recuperación

Réplicas	Peso muestra (mg)	Nicotina nativa (mg)	Nicotina añadida (mg)	Nicotina total (mg)	% Recuperación
1	163,8	2,1	1,76	3,8	97
2	178,0	2,3	1,76	4,0	97
3	150,2	1,9	1,76	3,6	97
4	153,6	2,0	1,76	3,7	97

En líneas generales, se puede concluir que la exactitud del método medido a través del porcentaje de recuperación es del 97 % (Tabla 12), mientras que la reproducibilidad medida por el CV es del orden del 3 % (Tabla 11).

5.4.3. Determinación de la concentración de nicotina en otras marcas nacionales de chimó

Esta etapa, consistió en la determinación de nicotina en varias marcas nacionales de chimó y una muestra proveniente de Brasil conocida como Miel de Chimó, llamada de esta manera por tener muy baja viscosidad (bastante fluida con respecto al chimó nacional). Cada marca fue destilada por triplicado y en la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos.

En base a estos resultados, se puede observar que la cantidad de nicotina en las diferentes marcas de chimó varía en un rango de 5 a 25 mg/g aproximadamente.

Tabla 13. Concentración de nicotina en varias marcas de chimó. ^a muestra de lote diferente al de referencia, ^b presentación en bolsa y ^c presentación en caja

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

Es importante destacar en este punto, que el tiempo de destilación requerido para garantizar la recuperación total de la nicotina (97 %), puede variar dependiendo de la concentración en las diferentes marcas de chimó. Los ensayos arrojaron, que aquellas marcas que contienen una concentración menor a 13 mg/g (aprox.) de nicotina, requieren de un tiempo de destilación menor y las marcas que contienen una concentración superior a este valor requieren un tiempo de destilación mayor. Sin embargo, con la finalidad de establecer un tipo de norma única se decidió emplear el mismo tiempo para todas las marcas. Este tiempo correspondió a 5 horas de destilación

y 30 min de medida espectrofotométrica, para un tiempo total de 5 ½ horas por muestra (aprox.).

Por otro lado, algunas de las marcas fueron más difíciles de destilar que otras, debido a que ocurrían efervescencias bruscas que ocasionaban la contaminación del destilado, a pesar de tener un control constante y riguroso de la temperatura. Estas ebulliciones súbitas inutilizaban el proceso de destilación, lo cual conllevó en muchos casos a un consecuente arruino del ensayo, con la consiguiente pérdida de tiempo y la posterior repetición de la experiencia.

Finalmente, una vez establecido el método de referencia para la determinación de nicotina, se procedió a desarrollar el análisis por Cromatografía de Gases, ya que debido a su menor “complejidad”, menor gasto de consumibles, tiempo de análisis y la mayor posibilidad para estudios sistemáticos y rutinarios, es la técnica por excelencia para este tipo de estudios.

5.5. Ensayo por cromatografía de gases para la determinación de nicotina en chimó

La primera etapa de este ensayo consistió en seleccionar de la literatura, aquellas condiciones cromatográficas que se ajustaran más a las necesidades de insumos y condiciones operativas del laboratorio.

Se empleó un cromatógrafo de gases con detector de ionización a la llama. Posee un divisor de flujo en la cámara de inyección (split-splites) y una columna capilar comúnmente empleada para propósitos de polaridad intermedia, de 30 metros de longitud, diámetro interno de 0,32 milímetros y 0,25 µm de espesor pelicular. Se utilizó

inyección manual con una jeringa de 10 µL y el gas de arrastre fue nitrógeno de alta pureza.

Seguidamente con patrones puros de nicotina y partiendo de condiciones cromatográficas obtenidas de la bibliografía, se realizaron numerosos ajustes y modificaciones, hasta lograr obtener tiempos de retención parecidos a los reportados por la literatura.

5.5.1. Condiciones preliminares para la determinación de nicotina en chimó

Aún cuando los patrones pueden ser preparados en cualquier tipo de solvente, fueron elaborados en dietiléter, debido a que es uno de los solventes reportados para la extracción de la nicotina para este tipo de técnicas ^[10,26]. Para conseguir condiciones cromatográficas satisfactorias, se modificaron diversos parámetros tales como: programación de la temperatura de la columna, flujo del gas de arrastre, relación de split, etc. Las condiciones preliminares son reportadas en la Tabla 14 y el cromatograma de un patrón de nicotina bajo estas condiciones es mostrado en la Figura 9.

Tabla 14. Condiciones cromatográficas preliminares

T Columna	T Inyector	T Detector	Flujo de entrada (inyector)	Relación Split	Flujo del gas de arrastre (columna)	Vol aprox de inyección
(100-250)°C 10°C/min	250 °C	250 °C	75 mL/min	50:1	1,5 mL/min	1 µL

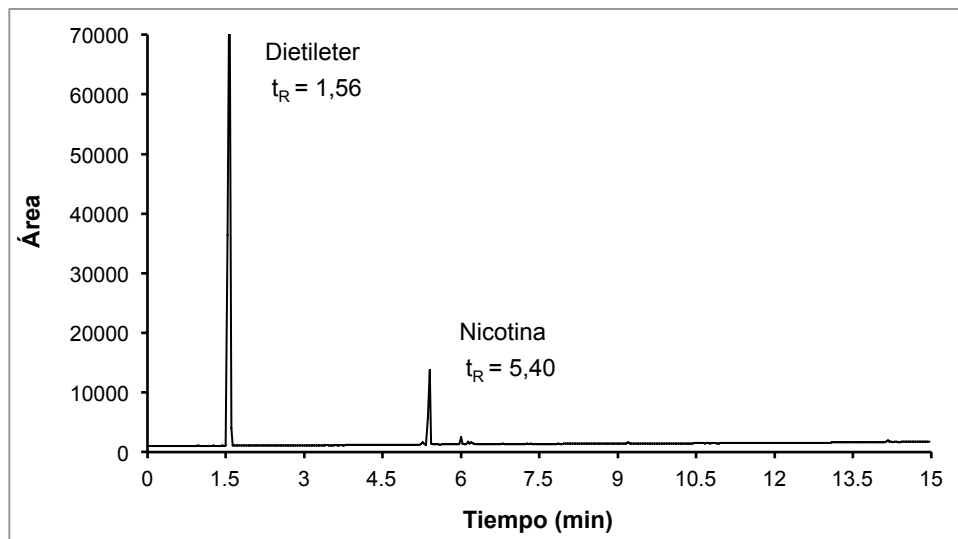


Figura 9. Cromatograma de un patrón de nicotina bajo las condiciones cromatográficas preliminares reportadas

En el cromatograma se pueden observar solamente dos bandas, una a un tiempo de retención (t_R) de 1,56 min, correspondiente al solvente (dietiléter) y otra a un tiempo de retención de 5,40 min, el cual corresponde a la nicotina. Los tiempos de retención para la nicotina reportados en la literatura en condiciones cromatográficas similares oscilaban entre 5 y 6 min aproximadamente ^[13,24]. Por lo tanto, el tiempo de retención obtenido es considerado satisfactorio. La siguiente etapa consistió en comprobar si las condiciones cromatográficas preliminares, servían para la determinación de nicotina en la matriz de chimó.

5.5.2. Ajuste de las condiciones cromatográficas

Seguidamente, se le realizó una extracción preliminar a la muestra de referencia empleando dietiléter, con la idea de establecer si algún componente del chimó interfería o co-eluía con el analito de interés (nicotina). Hay que hacer notar, que los procedimientos de extracción reportados en la literatura son muy parecidos entre ellos,

por lo tanto, el procedimiento preliminar realizado es una combinación de estos y se llevó a cabo de la siguiente manera: se pesó 0,1 g de la muestra y se le adicionó 2,5 mL de NaOH al 5 % (p/v) y 5 mL de dietiléter, colocándose en el ultrasonido por 15 min, se dejó reposar y una vez separadas ambas capas se procedió a analizar la fase orgánica por cromatografía de gases (capa donde se encuentra la nicotina). La Figura 10 muestra el cromatograma obtenido.

Del cromatograma del extracto de la muestra de referencia y en base a los tiempos de retención de los patrones, se pueden observar dos bandas principales, una del solvente y la otra correspondiente a la nicotina, adicionalmente, se observan una serie de bandas más pequeñas, las cuales posiblemente se deban a la presencia de otros alcaloides minoritarios. Por otra parte, se nota que al emplear altas cantidades de dietiléter (solvente), se produce una ligera pérdida de la línea base.

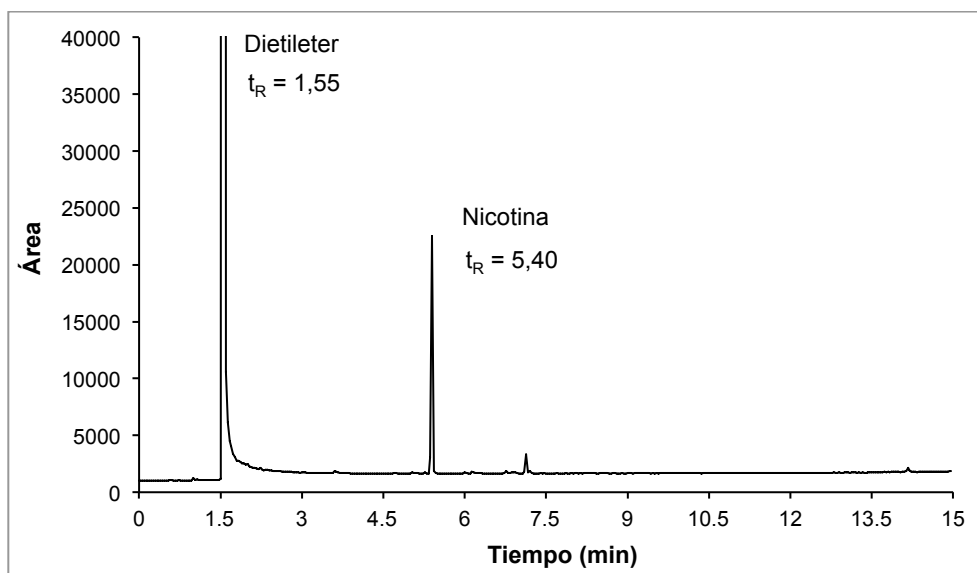


Figura 10. Cromatograma de una extracción preliminar de la muestra de referencia

Asumiendo que el t_R del dietiléter, corresponde al tiempo muerto (t_M), entonces el factor de retención (k) de la nicotina fue de 2,46. Los factores de retención para cromatografía de gases pueden oscilar entre 2 y 20 aproximadamente, por lo tanto, un factor de 2,46 pudiera ser considerado poco retenido (relativamente). Sin embargo, como no hay alguna banda proveniente de la matriz de la muestra que pudiera interferir con la nicotina, se estima como muy satisfactorio, en especial por el corto tiempo de análisis. Hay que hacer notar que una cromatografía exitosa es aquella que realiza la óptima separación en el menor tiempo posible.

Estos resultados indicaron que no era necesario realizar modificaciones adicionales a las condiciones cromatográficas preliminares, por esta razón, las reportadas en la Tabla 14 fueron establecidas como las condiciones cromatográficas definitivas para los análisis posteriores. El tiempo de equilibrio de la columna (lapso que tarda la columna en nivelar la temperatura a las condiciones iniciales, para la realización de la próxima inyección) correspondió a 2 min, por lo tanto el tiempo total del análisis cromatográfico fue de 17 min.

La siguiente etapa consistió, en la realización de la curva de calibración bajo las condiciones cromatográficas definitivas.

5.5.3. Curva de calibración

El sistema de inyección implementado durante todo el desarrollo de la técnica fue manual, lo cual conlleva a cierta irreproducibilidad, por lo que se decidió realizar la curva de calibración y las posteriores extracciones empleando el método de estándar interno.

De la literatura fue escogido el hexadecano como estándar interno y se procedió a inyectar un extracto de nicotina y el estándar interno, para corroborar que no existiera interferencia entre ambos. En la Figura 11 se puede observar el cromatograma obtenido, el cual muestra que el hexadecano puede ser empleado satisfactoriamente como estándar interno, debido a que no interfiere con el analito de interés y eluye en un tiempo relativamente cercano a la nicotina.

Posteriormente, se realizó la curva de calibración (en la Tabla 15 se muestran las concentraciones de nicotina y estándar interno). El rango escogido fue de 0,3 y 2,3 correspondiendo a un rango de concentración de nicotina entre 3 y 23 mg/L respectivamente, con una concentración fija del estándar interno de 10,02 mg/L. En la Tabla 16 se muestra la relación de concentraciones y áreas cromatográficas. El ajuste lineal por mínimos cuadrados se muestra en la Figura 12 y el análisis de residuales correspondiente en la Figura 13.

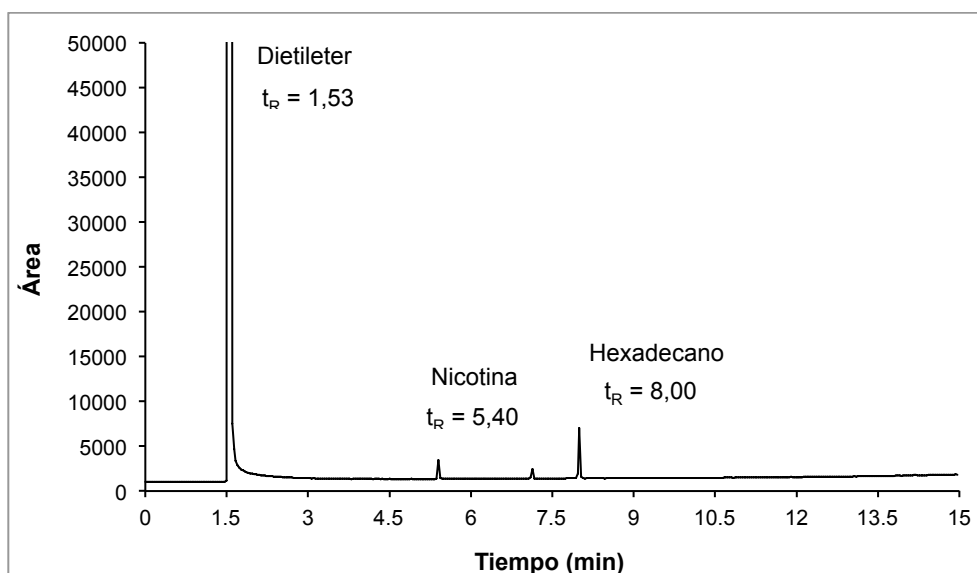


Figura 11. Extracto de Nicotina – Estándar Interno

Tabla 15. Concentración de los patrones de nicotina para la realización de la curva de calibración en dietiléter

Patrón	C _{nicotina} (mg/L)	C _{E.I} (mg/L)	C _{nicotina} /C _{E.I}
1	0	10,02	0
2	3,34	10,02	0,33
3	7,53	10,02	0,75
4	11,05	10,02	1,10
5	15,30	10,02	1,53
6	19,40	10,02	1,94
7	23,22	10,02	2,32

Tabla 16. Relación de concentraciones y áreas de los patrones obtenidas del cromatograma, para la realización de la curva de calibración en dietiléter

Patrón	Réplicas	$C_{\text{nicotina}}/C_{\text{E.I}}$	A_{nicotina} (cuentas)	$A_{\text{E.I}}$ (cuentas)	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{E.I}}$
1	1	0	0	63467	0
	2		0	65325	0
	3		0	68543	0
2	1	0,33	7463	54382	0,1372
	2		9629	66932	0,1439
	3		11130	77330	0,1439
3	1	0,75	26486	79514	0,3331
	2		20556	65390	0,3144
	3		24453	72322	0,3381
4	1	1,10	33321	106378	0,3132
	2		40819	117798	0,3465
	3		25344	79261	0,3198
5	1	1,53	60001	113389	0,5292
	2		58713	109294	0,5372
	3		56231	103810	0,5417
6	1	1,94	49568	195757	0,2532
	2		73887	262708	0,2813
	3		82392	263268	0,3130
7	1	2,32	55596	71373	0,7790
	2		43089	57813	0,7453
	3		46016	62585	0,7353

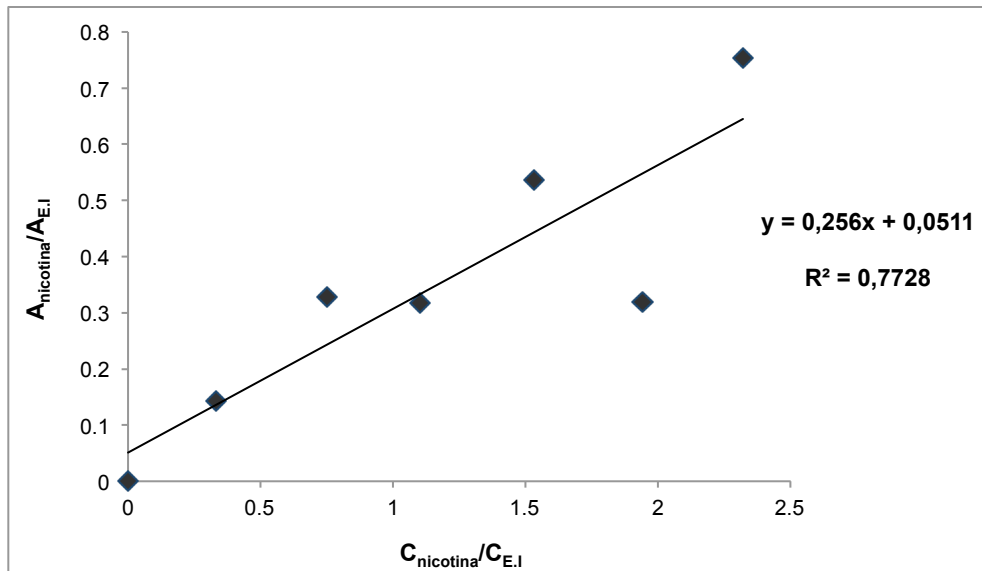


Figura 12. Curva de regresión lineal ajustada por mínimos cuadrados

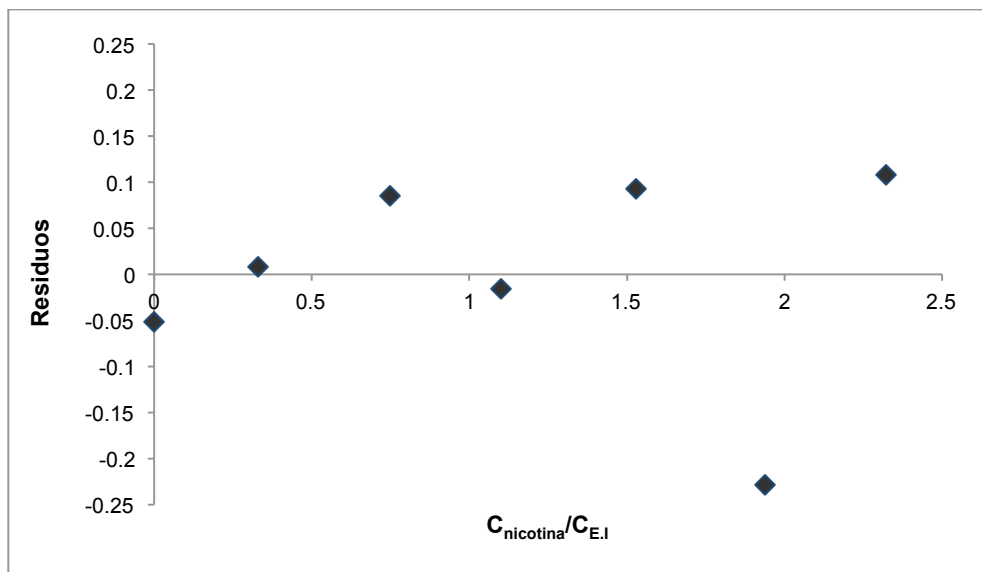


Figura 13. Análisis de residuales

La curva de calibración empleando dietiléter como solvente, no arrojó resultados satisfactorios ya que un coeficiente de determinación del orden de 0,7728 es poco conveniente. Por otra parte, se observó un incremento de los residuales con el aumento de la concentración (heterocedasticidad), lo que recomendaría una regresión lineal ponderada. Este hecho, puede ser atribuido a la alta volatilidad del dietiléter, que produce una variación de la concentración durante la preparación de los patrones.

Por tanto, se decidió escoger un solvente menos volátil, seleccionando el hexano de los reportados por la literatura. Por otra parte, se decidió ampliar el rango dinámico lineal en vista de los resultados obtenidos del análisis por el método convencional de destilación por arrastre con vapor. De esta forma, al momento de realizar el análisis de dichas muestras, se garantiza que la concentración de las mismas se encuentre dentro del rango establecido para la curva de calibración y así se prescinde de la necesidad de realizar diluciones.

Se estableció un rango dinámico lineal desde 19 a 130 mg/L. La concentración de nicotina y estándar interno de los patrones se muestra en la Tabla 17 y las relaciones de concentración y áreas se muestra en la Tabla 18. El ajuste lineal por mínimos cuadrados se muestra en la Figura 14 y el análisis de residuales en la Figura 15.

Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,9995, lo que indica que el método de mínimos cuadrados se ajustó bastante bien. El análisis de residuales osciló entre - 0,1 y 0,1, mucho mejor que el obtenido con dietiléter como solvente. Por lo tanto, se eligió el hexano como solvente para la preparación de los patrones.

Una vez realizada la curva de calibración, la próxima etapa consistió en la optimización del proceso de extracción.

Tabla 17. Concentración de los patrones de nicotina para la realización de la curva de calibración en hexano

Patrón	C _{nicotina} (mg/L)	C _{E.I} (mg/L)	C _{nicotina} /C _{E.I}
1	0	10,12	0
2	19,30	10,12	1,91
3	23,02	10,30	2,23
4	29,89	10,24	2,92
5	50,15	10,63	4,72
6	70,07	10,07	6,96
7	90,43	10,07	8,98
8	110,15	10,18	10,82
9	130,22	10,67	12,20

Tabla 18. Relación de concentración y áreas de los patrones obtenidas del cromatograma, para la realización de la curva de calibración en hexano

Patrón	Réplicas	$C_{\text{nicotina}}/C_{\text{E.I}}$	A_{nicotina} (cuentas)	$A_{\text{E.I}}$ (cuentas)	$A_{\text{nicotina}}/A_{\text{E.I}}$
1	1	0	0	23678	0
	2		0	23576	0
	3		0	24837	0
2	1	1,91	26826	22406	1,1973
	2		28655	23429	1,2231
	3		27353	21461	1,2745
3	1	2,23	36903	24879	1,4833
	2		35570	23113	1,5390
	3		33097	21611	1,5315
4	1	2,92	45922	22199	2,0687
	2		45424	21708	2,0925
	3		47050	23860	1,9719
5	1	4,72	88283	26274	3,3601
	2		91470	27401	3,3382
	3		87077	26494	3,2867
6	1	6,96	131313	26151	5,0213
	2		138205	26797	5,1575
	3		135508	26752	5,0653
7	1	8,98	135375	20770	6,5178
	2		138540	21335	6,4936
	3		139389	20829	6,6921
8	1	10,82	195417	24119	8,1022
	2		193159	23675	8,1588
	3		205060	25627	8,0017
9	1	12,20	205183	22972	8,9319
	2		204187	23108	8,8362
	3		211267	23078	9,1545

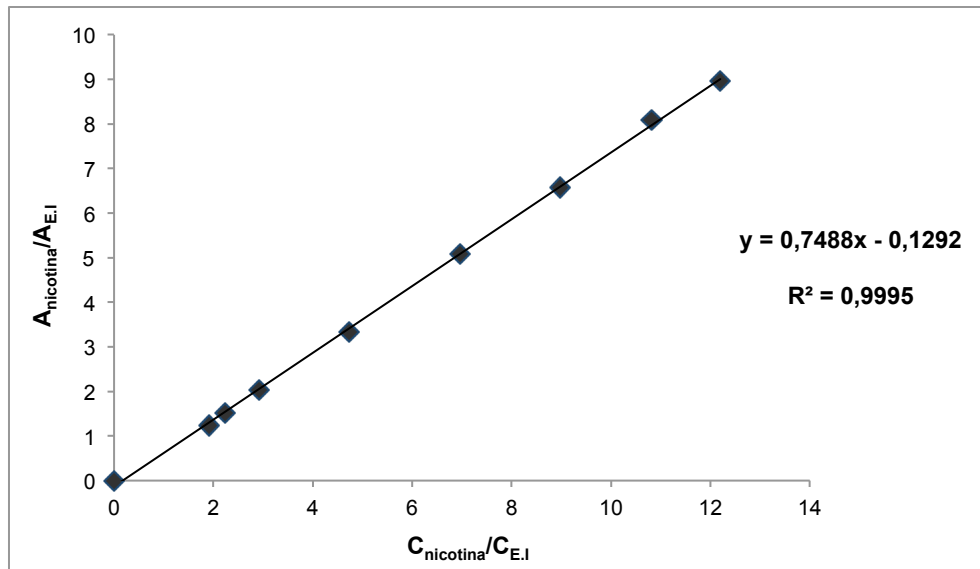


Figura 14. Curva de regresión ajusta por mínimos cuadrados de la zona de trabajo

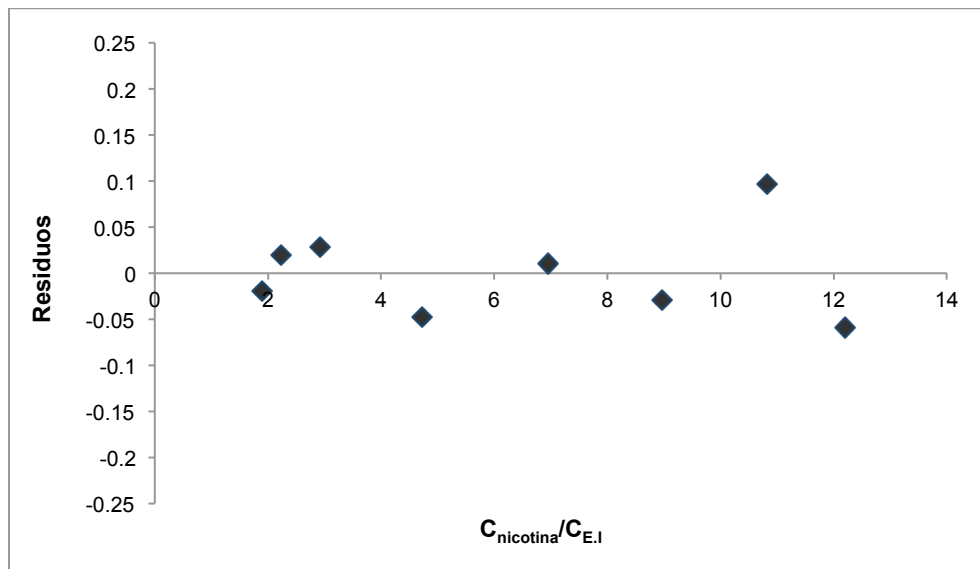


Figura 15. Análisis de residuales

5.5.4. Optimización del método de extracción

5.5.4.1. Elección del solvente

La optimización de la extracción empleando la muestra de referencia, se realizó mediante una disolución, seguida de una extracción líquido-líquido asistida por ultrasonido. En esta etapa, se realizaron varias experiencias empleando diferentes solventes en cuanto a solubilidad y volatilidad (sugeridos por la literatura), con la finalidad de seleccionar el solvente más apropiado. Aunque se desconoce el valor exacto de nicotina en la muestra de referencia, para efectos prácticos no es requerido, ya que debe seleccionarse aquel solvente que genere la mayor extracción de nicotina y mejor reproducibilidad de análisis.

A manera de comparación, todas las extracciones se realizaron bajo el mismo procedimiento, el cual es muy similar al empleado en la etapa de extracción preliminar, salvo algunas modificaciones, en cuanto a la cantidad de solventes empleados. Consistió en lo siguiente:

Se pesó 0,15 g de muestra (aprox) y se le adicionó 10 mL de NaOH al 5 % (p/v) y 20,0 mL del solvente extractor. Seguidamente se agitó por 3 minutos y fue sometido a ultrasonido por una hora. Finalmente, se dejó reposar para la separación de ambas capas y una vez ocurrida, una fracción de la capa orgánica fue inyectada en el cromatógrafo.

Los solventes a ensayar fueron: metanol-diclorometano (1:3), cloroformo, metil-terbutil-éter y hexano.

Aunque los análisis fueron realizados de manera individual, para efectos prácticos los resultados serán mostrados de manera simultánea. En la Tabla 19 se reporta el contenido de nicotina con los diferentes solventes y los respectivos cromatogramas en las Figuras 16, 17 y 18.

Durante el proceso de ultrasonificación de las extracciones realizadas con la mezcla de metanol-diclorometano, se observó una variación considerable en el volumen del solvente, mostrando de antemano poca reproducibilidad. Esta variación del volumen se debió posiblemente a la alta volatilidad del diclorometano, por ello, se decidió descartar dicho solvente.

Tabla 19. Contenido de nicotina en la muestra de referencia empleando diferentes solventes

Solvente	Réplicas	Nicotina (mg/g)	Media	s	CV
Metil-terbutil-éter	1	10,3	10,3	0,2	2
	2	10,4			
	3	10,2			
Cloroformo	1	11,3	11,2	0,2	2
	2	11,4			
	3	11,1			
Hexano	1	10,4	10,2	0,2	2
	2	10,1			
	3	10,3			

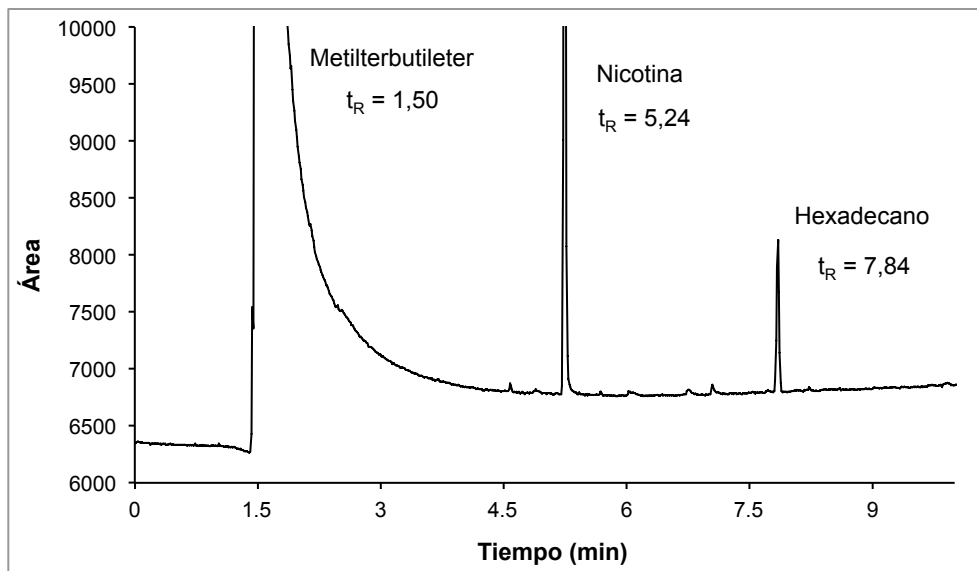


Figura 16. Extracción de la muestra de referencia con Metil-terbutil-éter

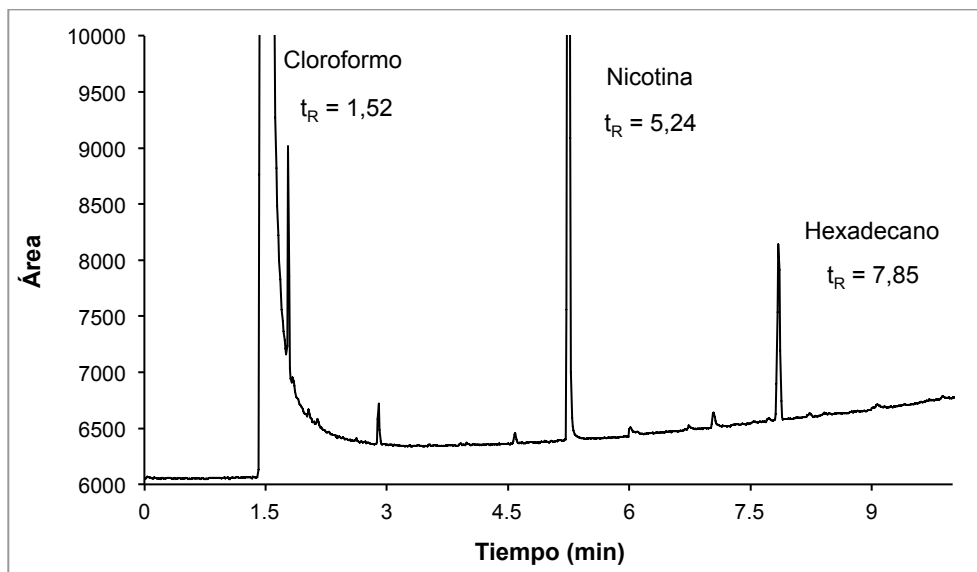


Figura 17. Extracción de la muestra de referencia con Cloroformo

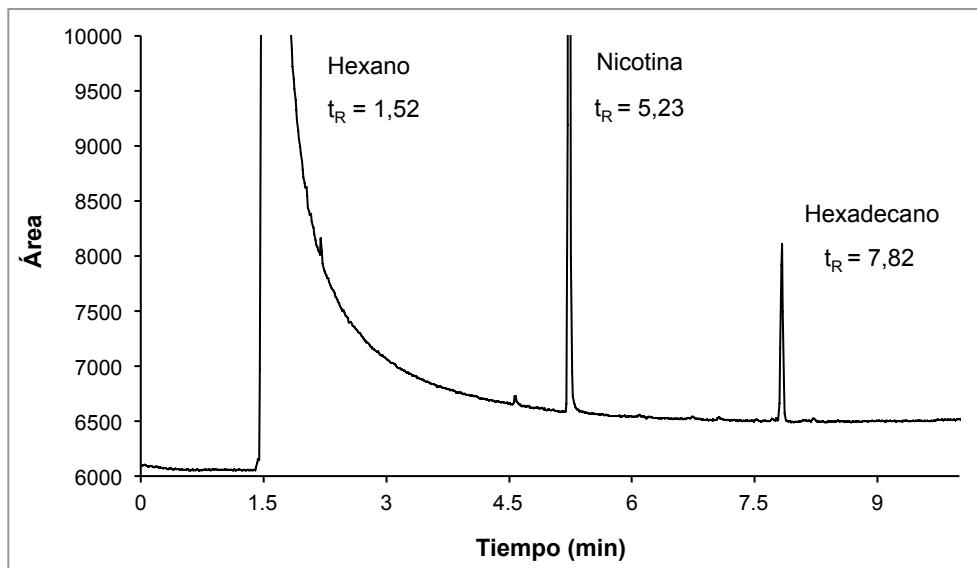


Figura 18. Extracción de la muestra de referencia con hexano

En cuanto a la comparación de los resultados obtenidos, se observa una buena reproducibilidad con un CV del 2 %. Por otro lado, realizando una comparación de los valores de la concentración de nicotina, se encontró que mediante la determinación del *t estadístico* de dos colas, para un intervalo de confianza del 95 %, la extracción con cloroformo difiere significativamente de las extracciones realizadas con metil-terbutil-éter y hexano, indicando que existe una mayor extracción empleando cloroformo como solvente extractor.

Adicionalmente, en los cromatogramas correspondientes a las extracciones con metil-terbutil-éter y cloroformo, se observan unas pequeñas bandas que no están presentes en la extracción con hexano, las cuales pueden ser atribuidas a los alcaloides minoritarios (nornicotina, anatabina, anabasina, etc). Aunque no es el objetivo del presente trabajo, estas observaciones son de gran interés debido a que se busca que la extracción sea lo más efectiva posible, no solo para el alcaloide mayoritario (nicotina), sino también para los otros alcaloides, ya que se pretende determinar en posteriores

investigaciones la concentración de estos alcaloides en el chimó, bajo el mismo análisis de la nicotina.

En base a lo descrito anteriormente, fue escogido el cloroformo como el solvente más óptimo para las extracciones posteriores.

La siguiente etapa, consistió en la optimización de la extracción, con la idea de acortar la duración de análisis, ya que un tiempo de extracción de 60 minutos es relativamente largo.

5.5.4.2. Selección del tiempo de extracción

En esta etapa empleando el solvente seleccionado, se efectuaron varias extracciones bajo las mismas condiciones, variando únicamente el tiempo de permanencia de la muestra en el ultrasonido en un rango de 20 a 90 min. Se analizaron tres réplicas para cada tiempo de extracción establecido. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 20.

Tabla 20. Contenido de nicotina empleando diferentes tiempos de extracción

Réplicas	Tiempo agitador (min)	Tiempo ultrasonido (min)	Nicotina (mg/g)	Media	s
1	3	20	5,1	4,8	0,3
2			4,8		
3			4,6		
1	3	30	8,4	8,2	0,3
2			7,9		
3			8,2		
1	3	60	11,0	11,2	0,3
2			11,0		
3			11,5		
1	3	90	10,6	11,1	0,4
2			11,4		
3			11,4		

Estos resultados indicaron, que la efectividad de la extracción aumentaba conforme se empleaba mayor tiempo de ultrasonificación. Sin embargo, para un tiempo de 90 minutos la cantidad de nicotina extraída no difería del valor obtenido en 60 minutos, por lo que se consideró 60 minutos como un tiempo óptimo de extracción.

Una vez seleccionado tanto el solvente como el tiempo de extracción, el procedimiento para la determinación de la concentración de nicotina quedó establecido de la siguiente manera:

- ✓ Pesar aproximadamente 0,15 g de chimó (0,1 mg de precisión).
- ✓ Añadir una cantidad conocida del estándar interno.
- ✓ Adicionar 10 mL de una disolución acuosa de NaOH al 5 % p/v.

- ✓ Agitar durante 3 minutos.
- ✓ Colocar en el ultrasonido por 60 minutos.
- ✓ Adicionar 20,0 mL de cloroformo.
- ✓ Agitar por 3 minutos.
- ✓ Colocar en el ultrasonido por 60 minutos.
- ✓ Dejar reposar por 60 minutos.
- ✓ Una vez separadas ambas capas, inyectar aproximadamente 1 μL de la capa orgánica en el cromatógrafo.

Este procedimiento requiere de un tiempo de 4 horas (aprox) y ofrece la ventaja de poder manejar un amplio número de muestras. Finalmente, se procedió a la determinación del porcentaje de recuperación.

5.5.5. Determinación del % de Recuperación del método desarrollado

La determinación del porcentaje de recuperación se realizó empleando la ecuación [1] anteriormente mostrada en el desarrollo del ensayo de referencia.

La primera etapa, consistió en determinar la cantidad de nicotina en la muestra de referencia (M_{nativa}), para ello se realizaron cuatro réplicas y cada una de ellas fue inyectada por triplicado. Los resultados obtenidos son reportados en la Tabla 21.

Tabla 21. Resultados de la concentración de nicotina en la muestra de referencia

Réplicas	Peso muestra (g)	Nicotina (mg/g)
1	0,1618	11,3
2	0,1508	11,4
3	0,1569	11,1
4	0,1509	11,2
	Media	11,3
	s	0,2
	CV	1
	LC 95%	0,3

Seguidamente, una vez conocida la concentración de nicotina de la muestra de referencia se procedió a determinar el porcentaje de recuperación para conocer la exactitud del método. Para ello, la muestra de referencia fue contaminada con una cantidad conocida de nicotina (recién destilada). Se realizaron tres réplicas y los resultados se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Contaminación de la muestra de referencia y porcentaje de recuperación

Réplicas	Peso muestra (mg)	Nicotina nativa (mg)	Nicotina añadida (mg)	Nicotina total (mg)	% Recuperación
1	147,9	1,66	0,82	2,47	99
2	159,2	1,78	0,82	2,59	99
3	154,4	1,73	0,81	2,53	99

De las tablas anteriores, los resultados indican que la exactitud del método medido a través del porcentaje de recuperación se encuentra del orden del 99 %, y una reproducibilidad medida a través del CV del 1%.

Posteriormente, se procedió a la determinación de nicotina en otras marcas nacionales de chimó.

5.5.6. Determinación de la concentración de nicotina en otras marcas nacionales de chimó

Esta última etapa, estuvo comprendida por la determinación de la concentración de nicotina en marcas nacionales de chimó ya analizadas por el método convencional anteriormente desarrollado. Por razones de tiempo, fueron seleccionadas cuatro muestras: la muestras de menor y mayor concentración de nicotina y dos de concentración media.

Se realizaron tres replicas de cada muestra bajo el procedimiento ya establecido y cada una de ellas fue inyectada por triplicado. Los resultados obtenidos son reportados en la Tabla 23.

Tabla 23. Concentración de nicotina en otras marcas nacionales de chimó.^a presentación en caja

Marca	Réplicas	Nicotina (mg/g)	Media	s	CV
Chain	1	3,4	3,3	0,1	2
	2	3,4			
	3	3,3			
El Águila	1	8,6	9,0	0,4	4
	2	8,9			
	3	9,4			
San Francisco	1	14,1	14,1	0,1	1
	2	14,3			
	3	14,1			
San Benito ^a	1	20,5	21,1	0,5	2
	2	21,6			
	3	21,1			

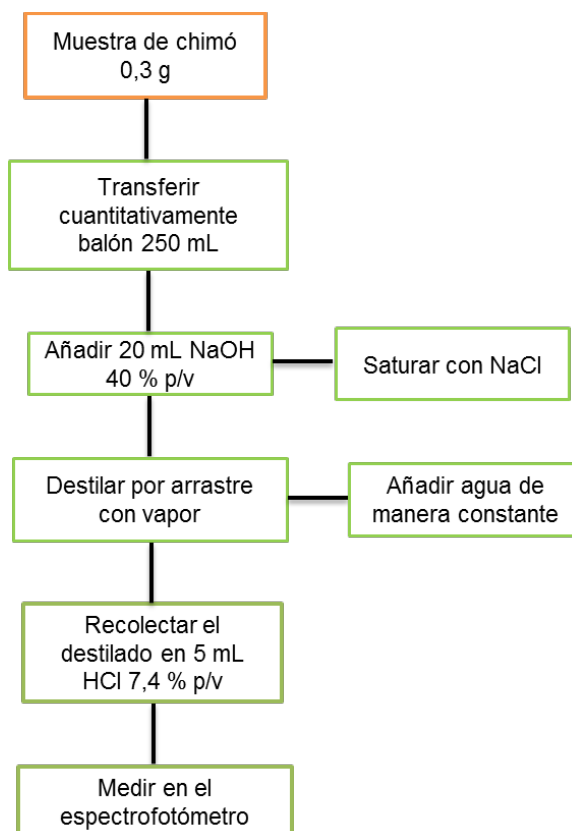
La concentración de nicotina en las diferentes marcas nacionales analizadas varía en un rango de 3 a 20 mg/g aproximadamente.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

- **Ensayo de referencia para la determinación de nicotina en chimó**

Se diseñó un método clásico para la determinación de alcaloides totales en chimó, mediante la destilación por arrastre con vapor con detección espectrofotométrica. Este método presentó una exactitud del 97 % medida a través del porcentaje de recuperación, mientras que la reproducibilidad medida por el CV fue del orden del 3 %.

Un diagrama del procedimiento establecido se muestra a continuación:



El tiempo de análisis correspondió a 5 horas de destilación y 30 min de medida espectrofotométrica, para un tiempo total de 5 ½ horas por muestra aproximadamente.

- Los resultados obtenidos de la determinación de alcaloides totales en diferentes marcas nacionales de chimó fueron los siguientes:

Marca	Nicotina (mg/g)	s	CV
Las Delicias	5,1	0,1	2
Chain	6,2	0,2	3
El Águila	10,5	0,3	2
El Tigrito ^a	12,9	0,4	3
El Tigrito ^b	13,6	0,6	4
Matheitos	14,0	0,5	4
Matheus	15,7	0,4	2
San Francisco	16,6	0,4	3
San Benito ^c	17,8	0,6	4
San Benito ^d	23,8	0,5	2
Miel de chimó	6,2	0,2	4

donde ^a es la muestra de referencia, ^b un lote diferente a la muestra de referencia, ^c presentación en bolsa y ^d presentación en caja.

Los resultados indicaron, que la concentración de nicotina varió entre 5 y 25 mg/g (aproximadamente).

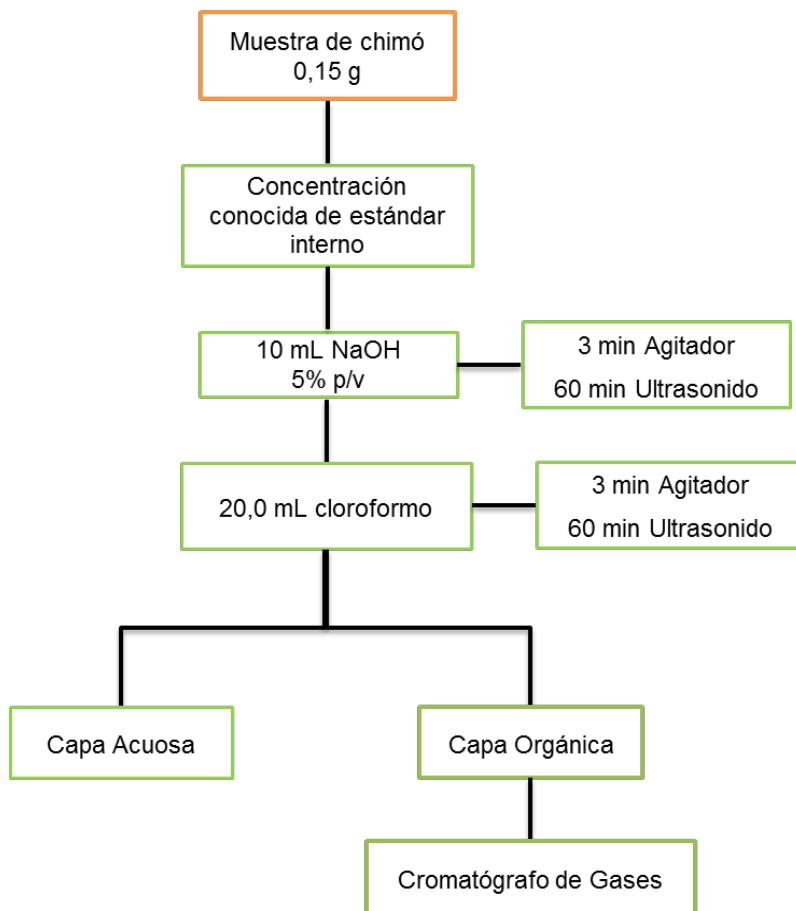
Por otro lado, debido a que en muchas de las destilaciones se producían efervescencias bruscas que contaminaban el destilado, ocasionándose una pérdida del ensayo y una consecuente pérdida de tiempo, el método resulta bastante tedioso ya que requiere de un control intenso y riguroso de la temperatura, además de disponer de altas cantidades de consumibles y un largo tiempo de análisis, lo cual resulta poco práctico para estudios sistemáticos y rutinarios con la manipulación de grandes números de muestra.

Sin embargo, en caso de no disponer de alguna otra herramienta analítica, este método es una alternativa para la determinación de alcaloides totales en chimó.

- **Ensayo por Cromatografía de gases para la determinación de nicotina en chimó**

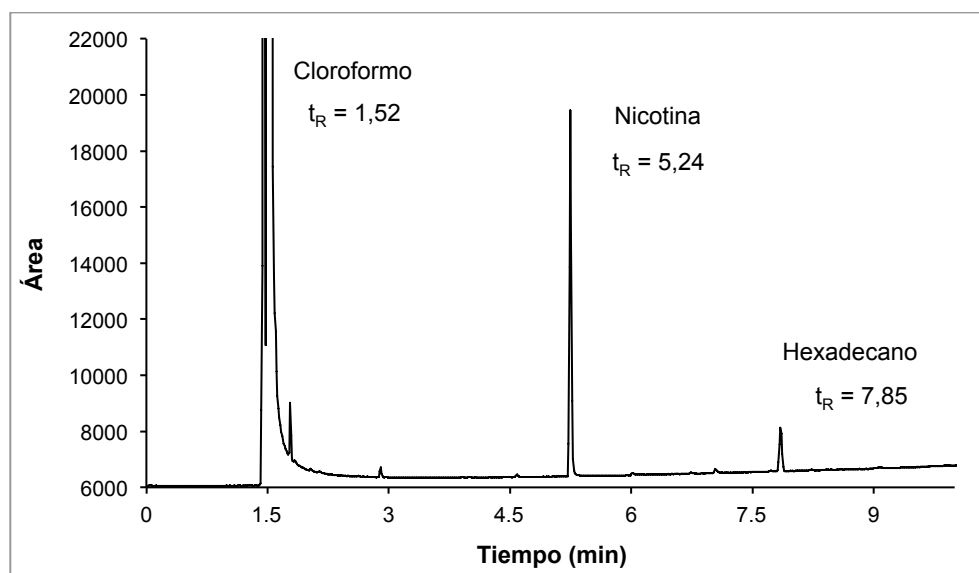
Se diseñó un sistema de tratamiento de muestra mediante una extracción líquido-líquido asistida por ultrasonido con un posterior análisis cromatográfico, para la determinación de nicotina en chimó. La exactitud de este método, medida a través del porcentaje de recuperación se encontró en el orden del 99 % y la reproducibilidad medida a través del CV del 1%.

Un diagrama del procedimiento establecido se muestra a continuación:



La escogencia del solvente extractor es un punto importante en este procedimiento, especialmente en cuanto a su volatilidad ya que dependiendo de ella se puede conducir a una falta de reproducibilidad en los cálculos de la composición. El solvente escogido en este caso (cloroformo), ofrece una ventaja adicional debido a su densidad, ya que al ser mas denso que el agua, ocupa la capa inferior de la disolución inmiscible, evitándose la evaporación del mismo.

El tiempo total de tratamiento de muestra está en el orden de 4 horas y la determinación cromatográfica de unos 20 minutos por muestra, incluyendo el tiempo de equilibrio de la columna, para un tiempo de análisis total de 4 ½ horas aproximadamente. Un cromatograma típico del análisis se muestra a continuación:



- Los resultados obtenidos de la determinación de nicotina para algunas de las muestras de chimó disponibles, son los siguientes:

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

donde ^a es la muestra de referencia y ^b presentación en caja.

A pesar de que este método posee un tiempo de análisis similar al método clásico, tiene la ventaja de disponer de una menor cantidad de consumibles y posee además la capacidad de manejar altos volúmenes de muestra (análisis en batch).

- **Comparación entre ensayos**

A continuación se muestran los resultados para cinco muestras analizadas por ambos métodos:

Marca	Método de referencia	Método cromatográfico
	Nicotina $\pm$ s (mg/g)	Nicotina $\pm$ s (mg/g)
Chain	6,2 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,1
El Águila	10,5 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 0,4
El Tigrito	12,9 $\pm$ 0,4	11,3 $\pm$ 0,2
San Francisco	16,6 $\pm$ 0,4	14,1 $\pm$ 0,1
San Benito	23,8 $\pm$ 0,5	21,1 $\pm$ 0,5

Realizando una comparación de estos resultados obtenidos de cada marca, se encontró que mediante la determinación del *t estadístico* de dos colas, para un intervalo de confianza del 95 %, los resultados para cada método son significativamente diferentes.

Estos valores obtenidos por el método clásico de referencia, en todas las muestras resultaron superiores a los valores obtenidos por el método cromatográfico. Esta

diferencia se debe, a que la determinación por el método convencional no es selectiva ante la nicotina como alcaloide mayoritario, siendo este resultado referido a los alcaloides totales presentes en el chimó. Por otra parte, esta diferencia podría ser atribuida también a cualquier otro compuesto volátil y/o poco soluble en agua presente en el chimó que pueda ser destilable por arrastre con vapor y no únicamente a los alcaloides minoritarios.

En bases a estos resultados, el método cromatográfico ofrece las siguientes ventajas con respecto al método de referencia desarrollado:

- Alta aplicabilidad como herramienta de separación de los alcaloides presentes
 - Permite la determinación cuantitativa de la nicotina como alcaloide mayoritario (selectividad)
 - Mayor exactitud y reproducibilidad en base al porcentaje de recuperación y CV respectivamente
 - Menor complejidad en cuanto al tratamiento de la muestra
 - Menor gasto de consumibles
 - Manejo de un alto volumen de muestras
-
- **Comparación de la concentración de nicotina con otras publicaciones**

A continuación se muestran los resultados de otras investigaciones para la determinación de nicotina en muestras de tabaco sin humo de diferentes países:

- Stanfill Stephen B, Zhang Ligin, Jia Lily T, Lawler Tamka, Watson Clifford H. y Ashley David L ^[27].

País	Marca	Nicotina $\pm$ s (mg/g)
Venezuela	Fabrica de chimó	5,29 $\pm$ 0,14
	El Tigrito	10,39 $\pm$ 0,33
	Vencedor	16,13 $\pm$ 0,19
	El tabacote	27,51 $\pm$ 1,19
	La Chinata C.A	30,13 $\pm$ 2,24
India	Rajdarbar Gutkha	1,57 $\pm$ 0,17
Sudan	Toombak 2	9,56 $\pm$ 0,23
Pakistán	Naswar 1	14,20 $\pm$ 0,12
Bangladesh	Sada Pata tobacco leaf	19,7 $\pm$ 0,20
Bangladesh	Special Gul Powder	34,12 $\pm$ 0,14

- Stanfill Stephen B., Jia Lily T, Ashley David L. y Watson Clifford ^[13]

País	Muestra	Nicotina $\pm$ s (mg/g)
Estados Unidos	Muestra A	4,39 $\pm$ 0,04
	Muestra B	8,92 $\pm$ 0,07
	Muestra C	10,29 $\pm$ 0,03
	Muestra D	10,30 $\pm$ 0,05
	Muestra E	12,23 $\pm$ 0,05
	Muestra F	15,11 $\pm$ 0,08
	Muestra G	26,46 $\pm$ 0,13

Se puede observar que los valores de nicotina se encuentran en un rango de 1 a 34 mg/g aproximadamente. Estos resultados indican que los valores de nicotina de las

muestras analizadas por los dos métodos desarrollados, pueden ser favorablemente comparados a los valores de nicotina reportados para este tipo de tabaco.

- **Comparación de la concentración de nicotina entre tabaco sin humo y cigarrillos**

Realizando una comparación, entre los resultados del análisis de la determinación de nicotina en cinco marcas internacionales de cigarrillos por Wu Weijia, Ashley David L. y Watson Clifford H. ^[24] y los resultados obtenidos de las cinco marcas de chimó analizadas en esta investigación, se observa que la concentración de nicotina en cigarrillos varía en un rango de 8,1 a 22,1 mg/g y en el chimó de 3,3 a 21,1 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	3,3 $\pm$ 0,1
El Águila	9,0 $\pm$ 0,4
El Tigrito	11,3 $\pm$ 0,2
San Francisco	14,1 $\pm$ 0,1
San Benito	21,1 $\pm$ 0,5

Estos resultados indican que los niveles de nicotina pueden variar dependiendo del tipo de tabaco, por lo que resulta difícil establecer si el contenido de nicotina en cigarrillos es mayor o menor al contenido de nicotina en tabaco sin humo.

Esta variación puede ser atribuida, a las diferentes materias primas que son empleadas para la fabricación de cada producto a pesar de que todos son elaborados a partir de la hoja de tabaco, ya que 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.

Otro de los factores que resulta difícil establecer, es la cantidad de nicotina absorbida por el cuerpo al fumar un cigarrillo o al consumir una unidad de tabaco sin humo, ya que esto puede variar dependiendo de la frecuencia de uso, la cantidad de humo que se aspira en el caso de los cigarrillos y el tiempo de permanencia en la boca, la intensidad al mascar y la cantidad que se expectora en el caso del tabaco sin humo.

7. RECOMENDACIONES

Ampliar el método cromatográfico desarrollado, para la determinación de los alcaloides minoritarios en el mismo análisis en el que se determina la concentración de nicotina, ya que el mismo requiere un largo tratamiento de muestra que debería ser aprovechado para el análisis de otros alcaloides.

Liofilizar la muestra de chimó y luego pulverizarla con la finalidad de aumentar el área superficial y de esta manera facilitar la extracción con la disolución alcalina.

En la etapa de separación de la fase acuosa y la fase orgánica, se recomienda centrifugar para agilizar el tiempo de separación de ambas fases, disminuyendo así uno de los pasos lentos del tratamiento de la muestra.

Emplear el método establecido por Labstat International ULC para la determinación de nicotina en chimó (una vez liofilizada y pulverizada la muestra), el cual establece una extracción con MeOH/KOH con un tiempo de permanencia en el ultrasonido de 3 horas, con la finalidad de optimizar el método de extracción desarrollado, empleando un tiempo de extracción más corto y un solvente menos peligroso.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. P. Font Quer. Plantas Medicinales. **El Dioscórides Renovado**. Tabaco. Editorial Labor S. A. Barcelona. 1980.
2. Martínez Llamas Antonio. Patología del consumo del tabaco. **El tabaco como planta fumable**. Consideraciones históricas. Editorial Glosa. Barcelona. 1989.
3. Martínez Llamas Antonio. Manual de patología tabáquica. **El tabaco y su historia**. Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección general de Salud Pública. 1982.
4. Historia del tabaco. Viernes 07 de mayo de 2010. Disponible en: <http://www.bigot.com.ve>.
5. Brosse Jacques. **La Magie des Plantes**. Tabac (286 - 292) Paris. Espaces libres. Paris. 1990.
6. González Enciso Agustín, Torres Sánchez Rafael. **Tabaco y Economía en el siglo XVII**. EUNSA.
7. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Sala de prensa. Disponible en: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2003>.
8. Report of the advisory committee to the surgeon general of the public health service. Department of health, education and welfare. Public Health service publication N° 1103. **Smoking and Health**. U.S. 1963. Chapter 6, 49 - 62.

9. Informe de un grupo de estudio de la Organización Mundial de la Salud. **Lucha contra el uso del tabaco sin humo**. N° 773. Ginebra. 1987.
10. 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.
11. Deniz Yildiz. **Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects**. Turkía. 2003.
12. Yue Xue, Edward F. Domino. **Tobacco/nicotine and endogenous brain opioids**. Estados Unidos. 2007.
13. Stephen B. Stanfill, Lily T. Jia, David L. Ashley, Clifford H. Watson. **Rapid and chemically selective nicotine quantification in smokeless tobacco products using GC-MS**. Estados Unidos. 2009.
14. Ritcher Patricia, Spierto Francis W. **Surveillance of smokeless tobacco nicotine, pH,moisture, and unprotonated nicotine content**. Marzo. 2003.
15. P. Grasso, A. H. Mann. **Smokeless Tobacco and Oral Cancer: An Assessment of Evidence Derived from Laboratory Animals**. Reino Unido. 1998.
16. Boffetta Paolo, Hecht Stephen, Gray Nigel, Gupta Prakash, Straif Kurt. **Smokeless tobacco and cancer**. Francia. 2008.

17. Ritcher Patricia, Hodge Knachelle, Stanfill Stephen, Zhang Liqin, Watson Clifford. **Surveillance of moist snuff: total nicotine, moisture, pH, un-ionized nicotine, and tobacco-specific nitrosamines.** 2007.
18. El verdadero origen del tabaco de mascar. 2010. Disponible en: <http://www.chimo.com.ve>.
19. Prensa Web YVKE, ABN. Disponible en: <http://www.radiomundial.com.ve>. Lunes, 21 de Julio de 2008.
20. Boletín BC Digital. Valencia – Venezuela. 2010. Disponible en: <http://www.cid.uc.edu.ve>.
21. Prensa venezolana Últimas Noticias. **Los chamos mascan chimó sin saber las consecuencias.** Viernes, 20 de febrero de 2009. Publicado por Fundación Fames.
22. Anders H. Laurene y T. Gibson Harrell. **Improved Spectrophotometric Method for determination of Nicotine in Tobacco Smoke.** Sociedad Americana de Química. Noviembre.1958.
23. Weeks W.W., D. L. Davis y L. P. Bush. **Gas Chromatographic separation of tobacco alkaloids.** Journal of Chromatography. Volume 43. Pages 506-509. U.S.A. 1969.
24. 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.

25. L.Q. Sheng, L. Ding, H.W. Tong, G.P. Yong, X.Z. Zhou, S.M. Liu. **Determination of Nicotine-Related Alkaloids in Tobacco and Cigarette Smoke by GC-FID.** China. 2004.
26. 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.
27. 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.
28. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** Dr. William Horwitz Editor. The Scientific Association dedicated to Analytical Excellence. Volumen I. Chapter 3, p. 32. 17th Edition. 2000.
29. Miller James N y Miller Jane C. **Estadística y Quimiometría para Química Analítica.** Editorial Prentice Hall. Cuarta edición. 2002.
30. Skoog Douglas, West Donald, Holler James, Crouch Stanley. **Química Analítica.** Editorial Mc Graw Hill. Séptima edición. 2001.
31. Martínez Grau M. Ángeles, Csáky Aurelio G. **Técnicas Experimentales en Síntesis Orgánicas.** Editorial Síntesis. 2001.
32. Pavia D. L., Lampman G. M. y Kriz G. S. **Química Orgánica Experimental.** Editorial Eunibar. 1976.

33. Skoog Douglas, Holler James y Nieman Timothy. **Principios de Análisis Instrumental**. Editorial Mc Graw Hill. Quinta edición. 2001.
34. Rowland Fred. **La Práctica de la Cromatografía de Gases**. División de Avondale. Segunda edición. 1977.
35. McNair Harold M. **Cromatografía de gases**. Department of Chemistry College of Arts and Sciences. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. 1981.

9. APÉNDICE

- ✓ Datos del barrido para la selección de la longitud de onda de trabajo.

λ (nm)	Absorbancia (A)	λ (nm)	Absorbancia (A)
200	0,224	251	1,237
203	0,417	254	1,600
206	0,737	257	1,859
209	0,889	260	1,899
212	0,769	263	1,739
215	0,561	266	1,382
218	0,330	269	0,853
221	0,195	272	0,374
224	0,135	275	0,132
227	0,127	278	0,038
230	0,137	281	0,018
233	0,174	284	0,013
236	0,242	287	0,012
239	0,348	290	0,012
242	0,504	293	0,012
245	0,684	296	0,012
248	0,961	299	0,012

- ✓ El t estadístico de dos colas para un intervalo de confianza del 95 % ^[29], se calculó de la siguiente manera:

$$t = \frac{\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Calculándose s a partir de:

$$s = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Donde $\bar{x}$ es el valor promedio, n el número de réplicas, s la desviación estándar y t tiene $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad.

- ✓ La determinación del porcentaje de recuperación se calculó de la siguiente manera:

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

Donde, M_{nativa} es la cantidad inicial de nicotina en la muestra de referencia, M_{spike} es la cantidad conocida de nicotina añadida a la muestra de referencia y M_{total} es la cantidad total de nicotina medida.

- ✓ **Fundamentos teóricos**

Extracción

El término extracción se refiere a la transferencia de una sustancia de una fase a otra. Es una técnica de separación selectiva de una o varias especies de interés de una matriz determinada, como por ejemplo agua, suelos, sedimentos, tejidos biológicos o alimentos ^[30]. La realización de este procedimiento de separación sin la alteración de la composición de las especies de interés, principalmente en matrices sólidas, es de suma

importancia. Existen varias técnicas de extracción, entre las cuales están: la extracción líquido-líquido, líquido-sólido y extracción con sonda de ultrasonido.

- *Extracción líquido-líquido*: este tipo de extracción es la que se lleva a cabo entre dos líquidos inmiscibles, formándose dos fases. Una de las fases es una solución acuosa y la otra un solvente orgánico inmiscible con el agua. La extracción se refiere al paso de un compuesto orgánico de interés desde la fase acuosa a la fase orgánica ^[31].

- *Extracción líquido-sólido*: en este tipo de extracción, el soluto se particiona entre dos fases, hasta llegar a una condición de equilibrio. Sin embargo, la partición entre una fase líquida (matriz) y una fase sólida (adsorbente) no es sencilla y se logra pasando la muestra líquida a través de una columna, cartucho, tubo o disco que contiene el adsorbente, el cual retiene al analito, y la recuperación subsecuente mediante la elución con el solvente adecuado. El mecanismo de retención depende de la naturaleza del adsorbente, y puede incluir adsorción simple, procesos para quelatar el analito, intercambio iónico o intercambio de par iónico. Los compuestos iónicos pueden ser selectivamente pre-concentrados usando cartuchos catiónicos o aniónicos. Los cartuchos para la extracción en fase sólida se han utilizado para análisis de especiación obteniéndose tiempo de análisis de 1,5 minutos, y mejorando los límites de detección.

- *Extracción con sonda de ultrasonido (UPS, Ultrasound probe sonication)*: 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.

En los procesos de extracción, uno de los problemas más comunes que suelen presentarse es la formación de emulsiones. Una *emulsión* es una suspensión coloidal de un líquido en otro y ocasiona que las dos fases líquidas inmiscibles no se separen completamente o se separen con mucha dificultad, quedando dicha emulsión en la zona intermedia. Para facilitar la separación completa de las dos fases se puede dejar la solución en reposo durante algún tiempo y de vez en cuando girar el recipiente alrededor de su posición vertical para que poco a poco ambas fases se estabilicen; también ayuda a la separación, el movimiento suave de la interfase con una espátula. Estas suspensiones se forman con más frecuencia cuando la fase acuosa y la fase orgánica tienen densidades similares y cuando se utilizan soluciones acuosas básicas^[31].

Destilación a presión reducida

Este tipo de destilación también llamada destilación al vacío, es usada cuando los compuestos a destilar tienen un alto punto de ebullición (por encima de 200 °C) o cuando se descomponen a la temperatura que se requiere para ser destilados a presión atmosférica. El fundamento de la técnica consiste en disminuir la presión externa, para que la presión de vapor del líquido se iguale a ella a una temperatura inferior a la del punto de ebullición normal. El resultado, es que el punto de ebullición del compuesto se reduce sustancialmente mediante la reducción de la presión y de esta forma la destilación puede llevarse a cabo a una temperatura mucho más baja ^[31,32].

Destilación por arrastre con vapor

Este tipo de destilación, es una técnica empleada para la separación de sustancias volátiles e insolubles en agua de sustancias no volátiles y solubles en agua o simplemente solubles en agua. Su basamento es la destilación de líquidos no miscibles, siendo unos de los líquidos el agua y el otro líquido un compuesto orgánico relativamente volátil. Esta técnica no es usada como técnica de purificación sino de aislamiento o separación que en la actualidad se encuentra superada por las técnicas cromatográficas aunque siga teniendo ciertas aplicaciones a nivel industrial.

La destilación ocurre a una temperatura por debajo de los 100 °C y se realiza adicionando un exceso de agua a la mezcla que contiene el compuesto que se desea separar ^[31,32].

Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación que agrupa un conjunto de diversos métodos, que permite además identificar y cuantificar componentes químicos en mezclas complejas ^[33].

Esta técnica se basa principalmente en la distribución de la muestra en dos fases. Una de ellas es estacionaria, que puede ser un sólido o una película líquida delgada que recubre el sólido y la otra fase es móvil, inmisible con la fase estacionaria, la cual percola sobre y alrededor de ella ^[33,34]. Esta distribución obedece diversas interacciones físico-químicas entre los componentes de la muestra y cada una de las fases, lo cual genera la separación de dichos componentes. Entre las interacciones físico-químicas se

encuentran las de Van der Waals (dipolo-dipolo, dispersión de London), puentes de hidrogeno, interacción iónica, exclusión por tamaño, etc.

El fundamento general de la separación es que los componentes que son fuertemente retenidos o que presentan mayor interacción con la fase estacionaria, se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil y tardan más en eluir; de manera contraria, los componentes débilmente retenidos por la fase estacionaria eluyen con mayor rapidez.

Existen diferentes clases de cromatografía de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil empleada, entre ellas están: cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y cromatografía de fluidos supercríticos.

La cromatografía de gases utiliza como fase móvil un gas inerte, el cual es llamado gas portador o gas de arrastre, cuya finalidad como su nombre lo indica es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna. 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 ^[30].

La cromatografía de gas-líquido fue ideada por Martin y James en 1952, pero el primer cromatograma fue publicado en 1954 por Ray y fue en 1955 cuando empezó a utilizarse en grado creciente con la aparición en el comercio de los primeros instrumentos ^[34].

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 (Fig.19). La inyección de la muestra se realiza con una jeringa graduada en microlitros, 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^[34,35].

Los gases portadores más comunes son: helio, nitrógeno y argón; el flujo del gas puede y debe ser regulado por un controlador de flujo (EPC) para obtener tiempos de retención reproducibles.

La columna es la parte más importante del cromatógrafo y es de sumo cuidado la elección de la apropiada. Está constituida por un recipiente, una fase líquida y un soporte sólido que inmoviliza la fase líquida. Existen columnas capilares o rellenas, las cuales se diferencian por su longitud y por el material con el que se elaboran.

El detector también es parte importante del cromatógrafo y existen diversos tipos como: detectores de ionización a la llama (FID), conductividad térmica (TCD), captura de electrones (ECD), emisión atómica (AED) y detectores termoiónicos (TID).

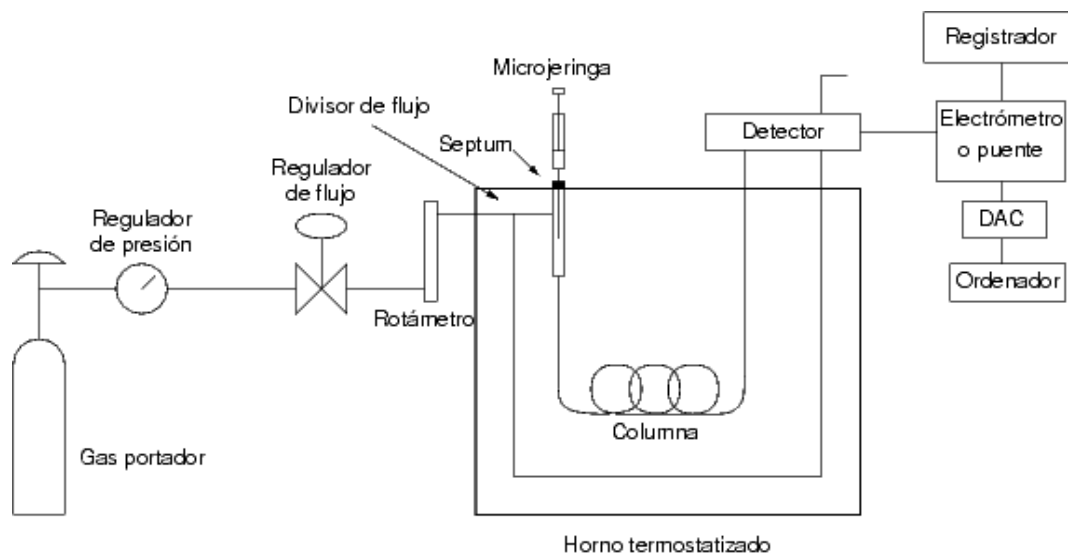


Figura 19. Esquema de un cromatógrafo de gas

El detector de ionización a la llama es uno de los más utilizados en cromatografía de gases. En este detector, el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y aire encendiéndose eléctricamente en un quemador (Fig.20). Posee ciertas ventajas como alta sensibilidad, gran intervalo de respuesta lineal y un bajo ruido. Sin embargo existen algunos compuestos que no generan respuesta con este detector, entre los cuales están: CO_2 , SO_2 , H_2O y óxidos de nitrógeno. Como una desventaja se puede mencionar la destrucción de la muestra para el análisis.

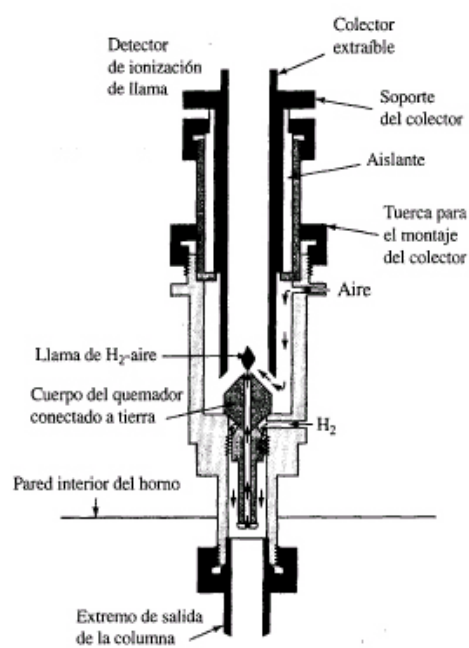


Figura 20. Detector de ionización a la llama