



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Hyrlam Sousa Ferreira

**Estratégias analíticas para avaliação da composição mineral e
estimativa da bioacessibilidade de elementos essenciais e
potencialmente tóxicos em produtos de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*)**

Salvador/ BA, março de 2020

Hyrlam Sousa Ferreira

**Estratégias analíticas para avaliação da composição mineral e
estimativa da bioacessibilidade de elementos essenciais e
potencialmente tóxicos em produtos de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química, área de concentração em Química Analítica.

Linhas de pesquisas:

Química Analítica Aplicada

Métodos Óticos de Análise

Quimiometria

Orientador: Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araujo

Salvador/ BA, março de 2020

SOUSA FERREIRA, HYRLAM
ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
MINERAL E ESTIMATIVA DA BIOACESSIBILIDADE DE
ELEMENTOS ESSENCIAIS E POTENCIALMENTE TÓXICOS EM
PRODUTOS DE TABACO (NICOTINA TABACUM L.) / HYRLAM
SOUSA FERREIRA. -- , 2020.
174 f. : il

Orientador: Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira
Araujo.

Tese (Doutorado - Química - Química Analítica) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química,
2020.

1. PRODUTOS DE TABACO. 2. CONSTITUINTES
INORGÂNICOS . 3. PREPARO DE AMOSTRA. 4. FERRAMENTAS
QUIMIOMÉTRICAS. 5. ICPOES. I. Oliveira Araujo, Prof.
Dr. Rennan Geovanny. II. Título.

À Deus,

*“Obrigado Senhor,
pela inteligência que me destes
e através de vossa sabedoria,
permitiste-me realizar mais um sonho
na minha vida”*

*“Dê-me, senhor,
agudeza para entender,
capacidade para reter,
método e faculdade para aprender,
sutileza para interpretar,
graça e abundância para falar,
acerto ao começar,
direção ao progredir
e perfeição ao concluir”...*

São Tomás de Aquino

*À minha mãe, Antonia Sousa,
À minha esposa, Louise Airam,
à meus filhos, Hyrlam Junior e Hyrla
e a meus irmãos, Hadla, Hadma, Harlam e Hyderlam.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado vida, força, perseverança, proteção e estado sempre presente comigo, sem ele não conseguiria.

A minha família, por todo amor, carinho, incentivo, apoio e compreensão.

Ao professor Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araujo, por ter me recebido no seu grupo de pesquisa e me dado uma oportunidade de crescimento profissional; por sua orientação presente no desenvolvimento do meu doutorado; seu apoio, carinho e, sobretudo sua valiosa amizade.

A Dra. Hadma e Dra. Hadla pelo apoio, força, incentivo e atenção a minha vida acadêmica.

Ao Professor Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira pela sua contribuição para minha formação de mestre e doutor; seu apoio e incentivo.

As professoras, Neyla e Ana Pinto pelo incentivo e amizade.

Ao coordenador da pós-graduação e a todos os professores e funcionários que fazem parte e contribuem para formação de mestres e doutores.

A Michel, Luciana e Vitor, funcionários competentes e adoráveis, que facilitam nossas vidas em todas as horas.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa para Estudos em Química Analítica e Ambiental (GPEQA²).

Aos meus colegas Sidimar, Samir, Humberto, Tarcísio pelo apoio e pela amizade.

À equipe do Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO), pelos equipamentos cedidos para as análises das amostras.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas do Ensino Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo auxílio financeiro através de projetos aprovados.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
ABREVIATURAS	15
RESUMO	22
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	24
2.OBJETIVOS	28
2.1. Geral	28
2.2. Específicos	28
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
1.1. O tabaco	29
1.1.1 Característica da planta e abordagem história	29
1.1.2. Produção no Brasil	31
1.1.3. Produtos de tabacos comercializados na Bahia	33
1.1.4. Perigo e malefícios do consumo do tabaco	34
1.2. Elementos químicos presentes no tabaco	37
1.2.1. Macroelementos	38
1.2.1.1. Nitrogênio	38
1.2.1.2. Potássio	40
1.2.1.3. Cálcio	41
1.2.1.4. Magnésio	42
1.2.1.5. Fósforo	43
1.2.1.6. Enxofre	44
1.2.2. Microelementos e elementos traço	44

1.2.2.1. Alumínio	44
1.2.2.2. Bário.....	45
1.2.2.4. Cobre.....	47
1.2.2.5. Cobalto.....	48
1.2.2.6. Ferro.....	48
1.2.2.8. Molibdênio	50
1.2.2.9. Níquel.....	50
1.2.2.10. Zinco	51
1.3. Metodologias para determinação de constituintes inorgânicos em amostras de produtos de tabaco.....	53
1.3.1. Determinação multielementar em produtos de tabaco	53
1.3.2. Otimização de métodos analíticos usando planejamentos de experimentos	55
1.3.3. Parâmetros analíticos para método analítico	58
1.3.3.1. Limite de detecção e limite de quantificação	58
1.3.3.2. Precisão	60
1.3.3.3. Exatidão.....	60
1.4. Preparo de amostra para determinação de constituintes em amostras de tabaco.....	62
1.4.1 Pré-tratamento de amostra.....	62
1.4.1.1 Secagem	62
1.4.1.2. Moagem.....	62
1.4.2. Procedimentos para digestão de amostras de tabaco.....	63
1.4.2.1. Parâmetros para avaliar a eficiência de digestão da amostra.....	68
1.4.3. Técnica de extração assistida por ondas ultrassônicas	71
1.5. Análise multivariada de dados empregando métodos não supervisionados.....	72
1.6. Bioacessibilidade de elementos químicos em amostras de tabaco	77
CAPÍTULO 2. Caracterização da composição mineral de produtos do tabaco (charuto, desfiado e corda).....	80
2.1. Introdução	80

2.2. Experimental	80
2.2.1. Instrumentação	80
2.2.2. Materiais e métodos	82
2.2.3. As amostras de produtos de tabaco e os materiais de referência certificados	83
2.2.4. Pré-tratamento e digestão das amostras	83
2.2.5. Ferramentas quimiométricas aplicadas para análise de produtos de tabaco	84
2.3. Resultados e discussão	86
2.3.1. Otimização das condições de digestão	86
2.3.2. Otimização de parâmetros operacionais do espectrômetro	89
2.3.3. Parâmetros de desempenho do método analítico	92
2.3.4. Aplicação do método proposto	97
2.3.5. Análise elementar de nitrogênio	101
2.3.6. Análise Multivariada de dados	106
2.4. Considerações Finais	111
CAPÍTULO 3. Otimização de um procedimento de extração assistido por ultrassom para determinação de constituintes inorgânicos em amostras de produtos de tabaco por ICP OES . 113	
3.1. Introdução	113
3.2. Experimental	114
3.2.1. Instrumentação	114
3.2.2. Pré-tratamento de amostra	115
3.2.3. Digestão das amostras	115
3.2.4. Extração ácida assistida por ultrassom	116
3.2.5. Otimização do método de extração ultrassônica	117
3.3. Resultados e discussão	119
3.3.1. Tamanho da partícula	119
3.3.2. Otimização aplicando o planejamento Box-Behnken	121
3.3.3. Validação do método analítico	126

3.3.3.1 Limite de detecção e limite de quantificação	126
3.3.3.2 Precisão, exatidão e aplicação analítica	127
3.3.4. Aplicação do método.....	132
3.4. Considerações finais.....	134
CAPÍTULO 4. Estimativa da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em produto de tabaco sem fumaça usando o método SBET.....	135
4.1. Introdução	135
4.2. Experimental	137
4.2.1 Instrumentação	137
4.2.2. Materiais e reagentes.....	138
4.2.3 Amostras de fumo de corda.....	139
4.2.4. Estimativa de bioacessibilidade in vitro usando método de extração SBET	139
4.3. Resultados e discussão	141
4.3.1. Validação do método proposto.....	141
4.3.1.1. Avaliação do Efeito de Matriz.....	141
4.3.1.2. Limite de detecção e limite de quantificação	143
4.3.1.3. Exatidão.....	144
4.3.2 Aplicação.....	148
4.4. Considerações finais.....	151
CAPÍTULO 5. Avaliação da composição mineral dos produtos de tabaco comercializados na cidade de Salvador	153
5.1. Introdução	153
5.2. Resultados e discussão	153
CONCLUSÕES FINAIS.....	163
PERSPECTIVAS DE TRABALHOS	165
REFERÊNCIAS.....	166

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ilustração do tabaco em (a) planta (<i>Nicotiana tabacum L.</i>) e (b) folhas (<i>Nicotiana tabacum L.</i>).....	29
Figura 1.2. (a) Charuto (b) fumo de Corda (folha de tabaco enroladas) (c) fumo desfiado.....	34
Figura 2.1. Gráfico de Pareto para o planejamento Box–Behnken. Legenda: (L): linear, (Q): Quadrático.....	89
Figura 2.2. Superfície de contorno para resposta múltipla usando o planejamento Doehlert.....	90
Figura 2.3. Conteúdo de nitrogênio encontrado nas amostras de charuto, fumo de desfiado e de corda.....	102
Figura 2.4. Análise de componente principal para amostras de produtos de tabaco: (a) gráfico de peso para PC2 versus PC1 (b) gráfico de peso para PC3 versus PC1.....	108
Figura 2.5. (a) gráfico de escore para PC2 versus PC1 e (b) gráfico de escore para PC3 versus PC1.....	109
Figura 2.6. Dendrograma: Calculado da distância Euclidiana e método de Ward's para avaliar similaridade entre as amostras de produtos de tabaco.....	110
Figure 3.1. MEV das amostras de charuto (a), fumo de corda (b) e fumo desfiado (c).	

.....120

Figura 3.2. Superfície de resposta obtida através do planejamento Box-Behnken para o procedimento de extração.....123

Figura 3.3. Perfis para os valores preditos das desejabilidades individuais e global na otimização dos dados gerados usando-se planejamento Box-Behnken na otimização do método para extração de metais usando-se energia de ultrassom.....124

Figura 5.1- Conteúdo de potássio, nitrogênio, cálcio e magnésio nos produtos de tabaco, expresso em porcentagem de massa seca..... 157

Figura 5.2- Razão do conteúdo de (a) potássio e enxofre (b) potássio e nitrogênio nos produtos de tabaco.....157

Figura 5.3- Histogramas das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Cd e Ni nas amostras de tabacos comercializadas na cidade de Salvador.....161

Figura 5.4 -Histogramas das concentrações de macroelementos expressos em porcentagem nas amostras de tabacos comercializadas na cidade de Salvador162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Fumicultura brasileira no período de 2018/2019.....	32
Tabela 1.2 Trabalhos reportados na literatura sobre métodos de preparo de amostra para determinação de constituintes inorgânicos em amostras de tabaco.....	70
Tabela 2.1. Matriz do planejamento Box-Behnken para otimização das condições do procedimento de digestão da amostra de tabaco.....	88
Tabela 2.2 Matriz do planejamento Doehlert para a otimização das condições operacionais do ICP OES.....	91
Tabela 2.3. Valores de LD estabelecidos em mg L ⁻¹ e de acordo com a massa de amostra em µg g ⁻¹	93
Tabela 2.4. Valores de LDs para determinação multielementar em amostras de tabaco por ICP OES.....	95
Tabela 2.5. Determinação da composição inorgânica dos CRMs, folhas de tabaco oriental (CTA-OTL-1), folha de tomate Agro C1003a e folha de maçã (NIST 1515) por ICP OES, após digestão das amostras em bloco digestor	96
Tabela 2.6. Concentração dos elementos traços Al, Ba, Cd, Co,Cu,Fe, Mn, Mo, Ni, Sr, V e Zn em produtos de tabaco (µg g ⁻¹ , massa seca).....	103

Tabela 2.7. Concentração dos macroelementos Ca, K, Mg, Na, P and S em produtos de tabaco ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa seca).....	104
Tabela 2.8. Concentração de constituintes inorgânicos($\mu\text{g g}^{-1}$, massa seca) em produtos de tabaco combustíveis reportados na literatura.....	105
Tabela 3.1. Matrix do planejamentoBox-Behnken e respostas para a otimização da extração ácida assistida por ultrassom da amostra de tabaco.....	122
Tabela 3.2. Limite de detecção e quantificação obtidos para determinação multielementar em produtos de tabaco por ICP OES usando os métodos de extração ácida assistida por ultrassom e digestão total.....	127
Tabela 3.3. Desvio padrão relative (RSD) de sete análises independente da amostra para determinação multielementar em produtos de tabaco por ICP OES usando o método de extração ácida assistida por ultrassom.....	128
Tabela 3.4. Comparação da regressão linear para extração ácida assistida por ultrassom e digestão total.....	130
Tabela 3.5. Valores certificados, encontrados e porcentagem de concordância para análise das CRMs, folhas de tabaco oriental (CTA-OTL-1), folha de tomate Agro C1003a e folha de maçã (NIST 1515) empregando extração ácida assistida por ultrassom e detecção por ICP OES.....	131

Tabela 3.6. Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$, dos elementos presentes em tipos de tabacos usando os procedimentos de extração ácida assistida por ultrassom e digestão total. Determinação por ICP-OES.....133

Tabela 4.1. Equações da curva de calibração aquosa e da adição de analito na presença de glicina.142

Tabela 4.2. Limites de detecção e quantificação obtidos para determinação multielementar em produtos de tabaco por ICP OES usando o método de extração *in vitro* SBET e digestão total.144

Tabela 4.3. Determinação de elementos em amostras de fumo de corda após a estimativa do método *in vitro* SBET.....146

Tabela 4.4. Ensaio da extração *in vitro* SBET para análise do material de referência certificado por ICP OES, em $\mu\text{g g}^{-1}$ 147

Tabela 5.1 – Concentração de cádmio e níquel presentes em produtos de tabaco queimados/combustíveis.....151

ABREVIATURAS

AFUBRA	Associação dos Fumicultores do Brasil
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BEC	Concentração equivalente de fundo, do inglês <i>Concentration equivalent background</i>
CF-LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por Laser sem calibração, do inglês <i>calibration free laser-induced breakdown spectroscopy</i>
CE	Concentração do extrator
CQCT	Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco
CRM	Materiais de referência certificados, o inglês <i>Certified reference material or standard reference material</i>
DOC	Carbono orgânico dissolvido do inglês <i>Dissolved organic carbon</i>
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês <i>Electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
EDMO	Eficiência da decomposição da matéria orgânica

F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
FAO STAT	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês <i>Graphite furnace atomic absorption spectrophotometer</i>
HCA	Análise de agrupamento hierárquico, do inglês <i>Hierarchical cluster analysis</i>
HG AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto, do inglês <i>hydride generation atomic absorption spectrometry</i>
HR-CS GF AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização eletrotérmica em forno de grafite, do inglês <i>High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre câncer, do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICP MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>

ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por Laser, do inglês <i>Laser induced breakdown spectrometry</i>
LD	Limite de detecção do inglês <i>limit of detection</i>
LQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscópio de varredura eletrônica
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBET	Teste de extração baseado em fisiologia, do inglês <i>Physiological based extraction test</i>
PC	Componentes principais, do inglês <i>principal component</i>
PCA	Análise de componente principal, do inglês <i>Principal component analysis</i>

PTFE	Politetrafluoroetileno, do inglês <i>Polytetrafluoroethylene</i>
PRF	Potência de radiofrequência
RCC	Conteúdo residual de carbono do inglês <i>Residual carbon content</i>
RM	Resposta múltipla
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
SBET	Extração simples de bioacessibilidade do inglês, <i>Simple Bioaccessibility Extraction</i>
TS FF-AAS	Espectrometria de absorção atômica com tubo na chama, do inglês <i>Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
UBM	Método de bioacessibilidade Unificado do inglês, <i>Unified bioaccessibility method</i>

RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos analíticos para determinação de constituintes inorgânicos em amostras de produtos de tabacos (charuto, fumo desfiado e fumo de corda), utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). As condições operacionais do ICP OES foram otimizadas aplicando planejamento Doehlert. O planejamento Box-Behnken foi empregado para determinação das condições ótimas do processo de digestão das amostras usando bloco digestor em sistema fechado. Os limites de quantificação (LQ) variaram entre 0,09 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Ba e Ti) e 116 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Na). O método analítico foi aplicado para a determinação de dezenove elementos químicos (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, S, Sr, Ti, V e Zn) nas amostras de produtos de tabaco. A análise dos componentes principais (PCA) e análise do agrupamento hierárquica (HCA) foram aplicadas para avaliar os diferentes tipos de produtos do tabaco, considerando a composição elementar. Foi também desenvolvido um método para determinação de constituintes inorgânicos em amostras de produtos de tabaco por ICP OES, após extração assistida por ultrassom. O planejamento Box-Behnken e a função desejabilidade foram utilizados para otimizar o procedimento de extração dos analitos nas amostras. Após as condições experimentais otimizadas, o método analítico permitiu a determinação de Ba, Ca, K, Mg, Mn, Na, P e Sr, com limites de detecção de 0,0007; 4,6; 115; 2,3; 0,08; 14; 7,2 e 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A exatidão dos métodos analíticos foi confirmada pela análise do material de referência certificado (CRM) de folhas de tabaco oriental (CTA-OTL-1), folhas de macieira (NIST 1515) e folhas de tomateiro (CRM-Agro C 1003a). A estimativa da bioacessibilidade de Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Na, P, Ti, V e Zn em fumo de corda foi realizada utilizando o método de extração *in vitro* para ensaio da simples extração da bioacessibilidade (*Simple Bioaccessibility Extraction Test* - SBET). As frações bioacessíveis obtidas em porcentagem foram: 4,06 - 7,8 (Al); <LQ- 24,4 (Ca); <LQ - 59,1 (Cd); <LQ - 25,8 (Cu); 17,4 - 34,8 (Fe); 67,4-72,2 (K); <LQ -73,7 (Na); <LQ -85,9 (P); <LQ- 35,3 (Ti); <LQ- 44,8(V); <LQ- 44,8 (Zn). Todas as amostras apresentaram elevados teores de potássio sendo o principal elemento químico relacionado com parâmetro de qualidade do tabaco, teor de açúcar e combustibilidade conforme a literatura.

Palavras Chaves: Produtos de tabaco; Constituintes inorgânicos; Preparo de amostras; Ferramentas quimiométricas; ICP OES; bioacessibilidade.

ABSTRACT

In this work, analytical methods were developed to determine inorganic constituents in tobacco products samples (cigar, shredded smoke and rope smoke), using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP OES). The operating conditions of spectrometer were optimized by applying Doehlert design. A Box-Behnken design was used to determine the optimal conditions for sample digestion process using closed digester block. The limits of quantification (LQ) varied between 0.09 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Ba and Ti) and 116 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Na). The analytical method was applied to determine nineteen chemical elements (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, S, Sr, Ti, V and Zn) in tobacco products. Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were applied to assess the different types of tobacco products, considering the elemental composition. A method was also developed to determine inorganic constituents in samples of tobacco products by ICP OES, after ultrasound-assisted extraction. Box-Behnken design and the desirability function were used for optimize the procedure for extracting analytes. After optimized experimental conditions, the analytical method allowed the determination of Ba, Ca, K, Mg, Mn, Na, P and Sr, with limits of detection of 0.0007, 4.6, 115, 2.3, 0.08, 14, 7.2 and 0.03 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. The accuracy of the analytical methods was confirmed by analysis of the certified reference material (CRM) of oriental tobacco leaves (CTA-OTL-1), apple leaves (NIST 1515) and tomato leaves (CRM-Agro C 1003a). The bioaccessibility estimate of Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Na, P, Ti, V and Zn in rope smoke was performed using in vitro extraction method for Simple Bioaccessibility Extraction Test (SBET). The bioaccessible fractions obtained in percentage were: 4.06 - 7.8 (Al); <LQ - 24.4 (Ca); <LQ - 59.1 (Cd); <LQ - 25.8 (Cu); 17.4 - 34.8 (Fe); 67.4 - 72.2 (K); <LQ - 73.7 (Na); <LQ - 85.9 (P); <LQ - 35.3 (Ti); <LQ - 44.8 (V); LQ - 44.8 (Zn). All samples showed high levels of potassium, being the main chemical element related to tobacco quality parameter, sugar content and combustibility according to the literature.

Keywords: Tobacco products, Inorganic composition, Chemometric tools, ICP OES, Ultrasonic extraction, bioaccessibility.

1. INTRODUÇÃO

A planta do tabaco possui grande capacidade de absorver elementos traços do solo, como cádmio, chumbo e níquel, que se acumulam em suas folhas em alta concentração [1]. Desta forma, o tabagismo é uma fonte de ingestão de elementos químicos potencialmente tóxicos e provavelmente agente cancerígenos, não apenas para o fumante, mas também para não-fumantes por meio do fumo passivo [2]. Por outro lado, a presença de macronutrientes em produtos de tabaco como magnésio e potássio estão relacionados com o aumento da produtividade e boa qualidade do produto [3]. Considerando estes aspectos, a caracterização da composição química dos produtos de tabaco tem sido frequentemente necessária, devido a sua importância na sociedade bem como, as consequências do tabagismo para a saúde [4,5].

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é uma técnica requisitada para análise de rotina de constituintes inorgânicos em amostras de tabaco, pois permite a determinação de vários elementos químicos que podem estar relacionados tanto com o risco do consumo do tabaco para a saúde humana, como para a qualidade dos produtos na indústria do tabaco [6,7,8]. Entretanto, em análises empregando ICP OES, o desenvolvimento de procedimentos eficientes para digestão de amostras, que resultam em baixos níveis de carbono dissolvido, faz-se necessário para evitar interferências não espectrais [9]. Além disso, a otimização das condições de operação do espectrômetro, como a potência de radiofrequência e a vazão

do gás de nebulização, pode melhorar os parâmetros de desempenho do método analítico [8].

Neste contexto, as técnicas de planejamento de experimento são aplicadas na otimização de métodos analíticos utilizando ICP OES, com intuito de avaliar o efeito e interações entre as variáveis e gerar uma grande quantidade de informações, a partir de um pequeno número de experimentos [10]. Logo, faz-se necessária a escolha da variável dependente para avaliar a significância de cada efeito no planejamento proposto, sendo que a função de resposta múltipla e a função da desejabilidade podem ser aplicadas para obter o valor ideal em experimentos, que demandam várias respostas para uma condição de compromisso [11].

No preparo de amostras, a técnica de extração assistida por ultrassom vem sendo relatada na literatura, como uma alternativa para substituir os procedimentos de digestão por via seca e via úmida na determinação de constituintes inorgânicos em diferentes tipos de amostras. Com isso, os métodos de extração de metais assistido por ultrassom usando ácido nítrico como extrator foram, empregados na preparação de amostras de tabaco do enchimento do cigarro [12,13].

A combinação dos métodos analíticos validados, com técnicas de análise multivariadas de dados é adequada para monitoramento da composição química dos tabacos, no intuito de avaliar possíveis adulterações ou tendências entre estas amostras [14,15,16]. Os métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados como a análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (HCA), podem contribuir para se verificar as tendências e similaridade dos produtos do tabaco e a identificação dos elementos químicos responsáveis por sua diferenciação. Os

resultados obtidos são fundamentais para identificar a autenticidade ou realizar a diferenciação por região, contribuindo desta forma, para evitar o contrabando dos produtos industrializados, padronizar a fabricação de produtos de tabaco; e o mais importante, alertar a população global sobre os efeitos nocivos do tabagismo.

Método da simples extração da bioacessibilidade *in vitro* (*Simple Bioaccessibility Extraction Test - SBET*) pode ser adotado para estimar o risco a saúde de elementos químicos presentes em amostras [17,18]. Estes procedimentos possuem vantagens em relação aos testes *in vivo*, por serem mais simples, rápidos, fáceis de realizar, evitando também o uso de modelo animal. A bioacessibilidade é definida como a fração de um elemento químico que é solúvel no trato gastrointestinal e, portanto, é disponível para absorção, que é especificamente referido quando modelos de avaliação *in vitro* são usados [17].

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação de constituintes inorgânicos, essenciais e potencialmente tóxicos em produtos de tabaco, utilizando diferentes estratégias para análise química dessas amostras, como a digestão via úmida usando bloco digestor em sistema fechado empregando ácido nítrico diluído, assim como, a análise do extrato, após as amostras serem submetidas à extração assistida por ultrassom. A análise multivariada de dados (PCA e HCA) foi aplicada para avaliar os diferentes produtos do tabaco comercializados em Salvador, Bahia, Brasil, através da composição elementar. Por fim, o método de extração *in vitro* foi aplicado para estimar a bioacessibilidade de elementos essenciais e a potencialidade de elementos químicos em produtos de tabaco.

Esta Tese de Doutorado consta de uma parte introdutória com fundamentações teóricas a respeito da folha de tabaco, seus produtos e do seu conteúdo inorgânico, além dos métodos analíticos desenvolvidos existentes na forma do primeiro capítulo. As informações científicas foram elencadas em cinco capítulos. Os três capítulos subsequentes descrevem os trabalhos relacionados as estratégias analíticas propostas para determinação de constituintes inorgânicos em produtos de tabaco (charuto, fumo desviado e fumo de corda), bem como, a estimativa da bioacessibilidade de onze elementos químicos. No quinto capítulo será apresentada uma avaliação da composição mineral dos produtos de tabaco comercializados na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. E, por fim, serão descritas as conclusões desta Tese de Doutorado e suas perspectivas de trabalho.

2.OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver estratégias analíticas para determinação de constituintes inorgânicos essenciais e potencialmente tóxicos em produtos de tabaco empregando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e, estimar a bioacessibilidade desses elementos químicos proveniente do consumo destes produtos.

2.2. Específicos

Empregar os planejamentos de experimentos, Doehlert e Box-Behnken, na otimização dos procedimentos de preparo de amostra e condições operacionais do equipamento ICP OES;

Caracterizar os parâmetros do desempenho dos métodos analíticos propostos;

Empregar a análise multivariada de dados para avaliar tendência e similaridade entre tipos de produtos de tabaco comercializados na cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

Estimar a bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em produtos de tabaco.

Avaliar a qualidade dos produtos de tabaco comercializados na cidade de Salvador, Bahia, Brasil através da composição elementar.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. O tabaco

1.1.1 Característica da planta e abordagem história

O tabaco é uma planta herbácea da família das *Solanáceas* de nome científico *Nicotiana tabacum L.* conhecida popularmente como fumo ou erva santa. A planta é pouco ramificada, com grandes folhas verdes e brancas podendo atingir até 2,5 metros de altura. As folhas secas da *Nicotiana tabacum L.* são usadas para fumar, mascar ou aspirar. Na Figura 1(a) e (b) são apresentadas as ilustrações da planta e da folha de tabaco, respectivamente. Existem mais de 60 espécies de tabaco; no entanto, apenas a *Nicotiana tabacum L.* sintetiza a nicotina, um alcalóide que estimula a síntese de dopamina no cérebro provocando uma sensação de bem-estar [19,20].



Figura 1.1. Ilustração do tabaco em (a) planta (*Nicotiana tabacum L.*) e (b) folhas (*Nicotiana tabacum L.*). Fonte: www.google.com.br/imagens.

Na América Central, aproximadamente 1.000 a.C., o tabaco era utilizado em rituais religiosos, com a crença de purificar, proteger e fortalecer os temores dos guerreiros, além de profetizar o futuro. Historiadores acreditam que foi através da migração de tribos tupis-guaranis que a planta chegou ao Brasil. Os termos *tabacum* e tabaco vêm do nome de um tipo de junco vazado que era usado pelos indígenas para inalar o fumo. O nome botânico do gênero e do princípio ativo do tabaco, a nicotina, foi derivado do nome de Jean Nicot, embaixador da França em Portugal, que introduziu a planta na França em 1561 para usos medicinais [21].

Entre os séculos, XVI e XIX o tabaco ganhou grande importância comercial no Brasil, servindo até de intercâmbio com a Inglaterra, na compra de escravos. Durante o período do império, o seu cultivo e comércio passaram a figurar como o principal produto exportador [22]. A produção de folhas de tabaco no Brasil começou nos estados da Bahia e Pernambuco. Durante a tomada de Pernambuco pelos holandeses no século XVII, o cultivo do produto foi de grande importância no comércio da Companhia das Índias Ocidentais. As províncias de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, também se sobressaíram na produção do tabaco [23,24].

O tabaco que, inicialmente, foi introduzido na Europa com a finalidade terapêutica, tornou-se uma demonstração de ostentação originada na Espanha, através do uso de charuto. Em seguida, o uso para fins terapêuticos deu lugar ao hábito de fumar apenas por prazer. As folhas de tabaco foram levadas a vários continentes e, em 1840, começaram os relatos do uso de cigarro. No século XIX, foi difundido o hábito do cigarro e, a partir da primeira guerra (1914-1918), tomou enormes proporções no mundo [25].

1.1.2. Produção no Brasil

Atualmente, o tabaco é uma das maiores culturas agrícolas em todo o mundo, sendo raros os países que não o produzem. As taxas que incidem sobre ele, representam valores consideráveis nos orçamentos de muitos países. A China, a Índia, o Brasil, os Estados Unidos da América, o Zimbábue e a Indonésia são responsáveis por 70% da produção mundial de folhas de tabaco, sendo 30% do total, voltado à exportação [26,27]. A maior produtora mundial é a China, seguida pelo Brasil que é o segundo maior produtor desde 1993, e o maior exportador mundial de fumo em folha [26,28]. Entretanto, em relação à China, o Brasil produz todos os tipos de tabaco em folha, além de produzir charutos [29].

No Brasil, a produção de folhas de tabaco concentra-se nos estados da região sul e, a maioria de sua lavoura, é destinada ao mercado de exportação para mais de 100 países. Os produtores caracterizam-se por serem agricultores minifundiários, as chamadas fumicultura na agricultura familiar brasileira, ocupando um total de 200 mil famílias, que englobam 4,4 milhões de estabelecimentos rurais [30]. A região sul do Brasil possui mais de 651 municípios que produzem tabaco, totalizando 323 mil hectares, além de envolver mais de 2,5 milhões de empregos nos processos produtivos e de industrialização, concentrando cerca de 98,1% da produção nacional (Tabela 1). Os estados da Bahia, Sergipe e Alagoas possuem o restante da produção nacional, sendo especializados no cultivo de tabacos escuros, apropriados à manufatura de charutos, cigarrilhas, cigarros escuros e fumo de corda [23, 31].

O Brasil produz, atualmente, as três variedades de tabaco Virginia, Burley e Oriental, que são destinadas a indústrias de cigarros e charutos. O tabaco predominante é o tipo Virgínia, produzido na região sul do Brasil; que é o mais utilizado na produção de cigarros. O tipo Virgínia é um tabaco claro, com *flavour*, sabor e aroma médios entre suave e forte. Na Bahia, cultiva-se o tabaco escuro próprio para charuto e cachimbo [21].

Tabela 1.1. Fumicultura brasileira no período de 2018/2019.

REGIÃO	Nº de	Famílias	Hectares	Produção	Participação	Valor
	Estados	Produtoras	Plantados	Toneladas	%	R\$/kg Total
Sul	3	149.060	297.310	664.355	96,8	8,83 5.863.792.410
Nordeste	7	9.997	19.471	21.498	3,1	5,97 128.315.689
Outras	4	263	426	357	0,1	13,39 4.781.261
Total	14	159.320	317.207	686.210	100	8,74 5.996.889.360

Fonte: Afubra/ IBGE [32]

1.1.3. Produtos de tabacos comercializados na Bahia

Existem diferentes produtos de tabaco preparados de diversas formas. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a responsável por regular e registrar os produtos de tabacos. No site dessa Agência reguladora, os produtos derivados do tabaco são classificados em três tipos: produtos de tabaco queimados/combustíveis; produtos de tabaco não geradores de fumaça (do inglês *smokeless*); produtos de tabaco aquecidos/vaporizados [33]. Dentre os produtos de tabaco queimados/combustíveis, ou seja, que produzem fumaça, os que se destacam na Bahia são o charuto, fumo desfiado e o fumo de rolo ou de corda. A Figura 1.2. mostra as ilustrações das três formas de tabaco.

O charuto é definido como folhas de tabaco enroladas formando um rolo que habitualmente é fumado sem filtro [34]. O fumo de corda, ou fumo de rolo é um tipo de fumo (tabaco) torcido e enrolado, normalmente utilizado para confeccionar cigarros de palha. É, também, consumido mascando-se pequenos pedaços. As cordas de fumo são fabricadas com as folhas enrolada através de um artefato chamado sarilho. O fumo de corda é curado ao Sol durante 60 a 90 dias; neste período a corda é torcida várias vezes, passando de um sarilho para outro [35]. O fumo desfiado é fabricado através do fumo seco e picado, utilizado na fabricação do cigarro artesanal, enrolado em uma palha de milho ou em papel industrializado. Na palha, o fumante coloca a quantidade desejada para fumar. Também é utilizado nos cachimbos, muito fumado nas zonas rurais e cidades do interior [23].



Figura 1.2. (a) Charuto (b) fumo de Corda (folha de tabaco enroladas) (c) fumo desfiado. Fonte: www.google.com.br/imagens.

1.1.4. Perigo e malefícios do consumo do tabaco

O consumo dos vários produtos de tabaco, juntamente com o álcool, é uma das principais causas de morte prematuras no mundo. Já foram registradas dez mil mortes por dia, sendo associado à causa de vários tipos de doenças tais como, acidentes vasculares cerebrais, hipertensão arterial e doenças cancerígenas, entre outros [36, 37]. O uso do tabaco é a causa número um de mortes evitáveis em todo o mundo, contribuindo para seis milhões de mortes a cada ano [38]. As doenças associadas ao tabagismo são causadas por compostos tóxicos de muitos tipos de gases e partículas, que são geradas pela fumaça do tabaco [39]. Há várias substâncias químicas que causam malefícios ao fumante. Contudo, a maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que a nicotina é o principal agente responsável pelo desenvolvimento da dependência ao tabaco [40]. As pesquisas mostraram que 75% dos pacientes tratados, voltam ao vício após cinco anos de abstinência [41].

No passado, as mortes pelo tabagismo afetaram, sobretudo, os países do primeiro mundo. Nas últimas décadas, o número de mortes expandiu-se rapidamente nos países emergentes. Aproximadamente 80% das mortes decorrentes do consumo de tabaco, ocorreram em países com renda baixa e média [42]. Hoje, observa-se que os vários meios de comunicações, entidades e os órgãos do governo (municipal, estadual, e federal), na maioria dos países, buscam informar e prevenir sobre os problemas causados pelo tabagismo. Na maioria dos países, o hábito de fumar é uma das principais causas de problemas de saúde. Estima-se, que mais de 400 milhões de adultos poderão morrer até 2050, vítimas do tabagismo. Nos Estados Unidos da América, um dos principais consumidores mundial, o tabaco é o maior responsável pela causa de doenças (440 mil óbitos prematuros por ano). Em países em desenvolvimento, como a Argentina, mais de 40 mil pessoas morrem por ano na juventude devido ao tabagismo ou à exposição ao fumo passivo e, outras 18 mil possuem uma doença grave [43].

O aroma das folhas de tabaco implica uma resposta integrada ao seu olfato, o paladar e a sensação de prazer do fumante. Entretanto, os componentes neutros do aroma do tabaco são compostos tóxicos, o que faz com que os fumantes ao utilizarem, podem estar contraindo doenças cancerígenas provenientes destes compostos [44]. O consumo na forma de charuto é mais nocivo que o cigarro. A sua fumaça, tem maior concentração de nicotina, fazendo com que seus usuários desenvolvam um maior grau de dependência em menor tempo de uso, comparados aos fumantes de cigarro. O charuto quando fumado, libera através da fumaça compostos altamente carcinogênicos como: as nitrosaminas, os hidrocarbonetos e as aminas aromáticas, em níveis significativamente mais elevados quando comparado ao cigarro. Isto pode explicar

porque os fumantes de charutos apresentam o risco de terem câncer de pulmão até nove vezes maior que os não fumantes.

Vale ressaltar, que os índices de mortalidade por câncer de pulmão nestes fumantes estão relacionados com os elevados níveis de nicotina ativa, que pode causar dependência, mesmo sem a inalação direta da fumaça [23,38]. Um cigarro pode conter de 1 a 2 mg de nicotina, enquanto que o charuto de 100 a 400 mg, com até 17 g de tabaco. A sua fumaça, também é mais alcalina que a do cigarro, o que facilita sua dissolução na saliva e sua absorção pela mucosa oral. Ao ser considerado o número de gramas de tabaco fumado, através de análises bioquímicas, observou-se que o alcatrão, o monóxido de carbono e a amônia são produzidos em quantidades maiores através da queima de charutos do que da queima de cigarros. Além disso, o alcatrão derivado do charuto tem altas concentrações de carcinogênicos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos [40].

Somado aos compostos orgânicos, existem evidências suficientes que sugerem exposição ao tabaco fumado por inalação ou de produtos do tabaco sem fumaça que por exposição oral resulta em captação significativa de muitos elementos químicos potencialmente tóxicos. Essas exposições também podem ter implicações significativas na saúde, incluindo aumento de doenças do pulmão e cânceres, doenças inflamatórias orais, asma e supressão da resistência imune [2,4].

Atualmente, não existem meios em larga escala para reduzir os níveis de metais nos produtos de tabaco. Dado o potencial de risco significativo à saúde associado aos metais, parar de consumir os produtos é o único meio comprovado de reduzir os riscos à saúde associados aos elementos químicos e exposição de metalóide. Logo, parar

de consumir reduz, mas, não elimina os riscos para a saúde causados pelo consumo do tabaco. Assim, ainda é preferível evitar o consumo e exposição aos produtos do tabaco [4].

1.2. Elementos químicos presentes no tabaco

O crescimento saudável das plantas está relacionado com a absorção de água, e elementos químicos do solo e dióxido de carbono (CO₂) através das folhas. Os minerais devem estar adequadamente disponíveis no solo, para que ocorra o crescimento e desenvolvimento das plantas. No caso de solos deficientes de nutrientes, estes elementos químicos podem ser facilmente fornecidos através da aplicação de fertilizantes. Isto é muito importante para a produção do tabaco, cujo objetivo é produzir folhas com uma composição química relativamente específica para alcançar importantes padrões de qualidade e gerar rendimentos [30].

Por outro lado, o uso de fertilizantes pode de ser uma fonte de elementos químicos potencialmente tóxicos, que causam sérios males à saúde humana. As plantas de tabaco capturam com facilidade metais potencialmente tóxicos do solo e os concentram nas folhas. Seus conteúdos também podem ser provenientes do solo nativo ou do uso de pesticidas, herbicidas e fungicidas. Os fertilizantes e pesticidas contêm elevadas concentrações de elementos tóxicos como arsênio, cádmio, cromo, chumbo e níquel [45,46,47].

Assim, é de fundamental importância conhecer a função dos nutrientes e identificar os sintomas de deficiência ou excesso destes constituintes, bem como os riscos da presença de elementos químicos potencialmente tóxicos na planta. Os nutrientes que as plantas necessitam em grande quantidade são denominados macronutrientes e, os nutrientes que as plantas necessitam menores concentrações são denominados micronutrientes.

1.2.1. Macronutrientes

1.2.1.1. Nitrogênio

As plantas necessitam de elevadas quantidades de nitrogênio para o seu desenvolvimento, o qual é diretamente responsável pelo transporte de água, e carboidratos, entre outros compostos. Nas plantas herbáceas, normalmente existe entre 1,5 a 4,5% de nitrogênio, em toda a matéria seca [48,49].

No tabaco, o nitrogênio é essencial para o crescimento da planta, sendo importante no processo de fotossíntese, determina o desempenho da lâmina foliar e, desta forma, contribui diretamente na produção e qualidade. O nitrogênio, no tabaco curado, influencia no sabor, aroma e fumaça. A presença de nitrogênio na planta está relacionada com a concentração de nicotina, uma vez que este elemento representa 17,3% do massa molecular da nicotina [50, 51].

A nicotina é o principal alcalóide tóxico encontrado no tabaco, representando uma fração de 90% do total da composição de suas folhas (0,60 a 3,00% da matéria seca de tabacos) [52,53]. A concentração de nicotina é um dos índices mais importantes da qualidade das folhas porque afeta diretamente a disponibilidade industrial e a segurança do tabaco curado. Recomenda-se que a concentração de nicotina nas folhas de tabaco deve ser limitada entre 1,75 a 2,00% [54]. A falta de nitrogênio no solo diminui a quantidade de ácido jasmônico, uma importante substância que regula a síntese de nicotina nas raízes do tabaco. Por outro lado, o excesso de nitrogênio disponível no solo aumenta a concentração de nicotina nas folhas de tabaco [55].

A nicotina é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma droga psicoativa, devido à ação direta e rápida (aproximadamente 10 e 19 s) no sistema nervoso central. No cérebro, estimula células cerebrais a produzirem mais dopamina, um neurotransmissor associado à sensação de bem-estar. Os sintomas de abstinência levam o fumante ao desejo de um novo cigarro [40].

A nicotina, também é absorvida pelo trato respiratório, mucosas orais e pele. Em tabacos para charutos e cachimbos, a nicotina é encontrada na forma não-protonada, o que facilita a absorção pela mucosa bucal devido ao pH alcalino. Por isto os fumantes de charuto e cachimbo não necessitam tragar o fumo para se satisfazer [56]. A determinação de nitrogênio é de interesse devido aos efeitos na saúde [57]. Nas folhas de tabaco, o nitrogênio também pode estar associado a compostos como aminas, nitratos e nitritos, que podem ser convertidos a óxidos de nitrogênio (NO_x) através do processo de pirólise. Após a combustão, pode ser potencialmente emitido na forma de óxidos como óxido nítrico, óxido nitroso e dióxido de nitrogênio (NO, N₂O e NO₂) [58,59].

1.2.1.2. Potássio

O potássio é um elemento essencial para o ser humano. É o principal cátion do fluido intracelular; desempenha um papel na regulação da pressão osmótica, pressão arterial e equilíbrio ácido-base. É também, essencial para o crescimento das plantas, formação e o amadurecimento dos frutos, além de aumentar a rigidez dos tecidos e a resistência das plantas às pragas e moléstias [60].

Este macroelemento é responsável, elasticidade, flexibilidade, textura e alteração da cor das folhas; características que definem a qualidade dos produtos de tabaco. Sua concentração nas folhas de tabaco varia de 2 a 8% podendo chegar até 10 % [61]. Estudos relatam que concentrações de potássio maiores do que 2 % em massa seco, são geralmente essenciais para produzir folhas superiores. Entretanto, concentrações abaixo de 2 % reduzem a qualidade do tabaco. As folhas que não contém quantidade suficiente de potássio, após a cura, são quebradiças, enquanto as folhas com quantidades adequadas apresentam coloração amarelada [62,63].

No tabaco curado, este elemento químico aumenta a quantidade de açúcar, devido à conversão do dióxido de carbono em glicose. Ele também é um dos principais constituintes da cinza resultante da combustão contínua sem chama dos charutos [5,64].

1.2.1.3. Cálcio

O cálcio é encontrado naturalmente nas rochas, sedimentares e metamórficas, pode precipitar na forma de sulfatos, fosfatos ou carbonatos. No solo, encontra-se como componente da matéria orgânica ou adsorvido em colóides. O enriquecimento adicional de Ca em terras agrícolas é feito através do uso de calcário para a correção da acidez do solo. Este elemento influencia, de modo predominante, no equilíbrio entre a acidez e a alcalinidade do meio e da seiva.

Ele é um elemento químico essencial para os organismos vivos, particularmente na fisiologia celular, onde o movimento do íon cálcio (Ca^{2+}) para dentro e para fora do citoplasma, funciona como um sinal para muitos processos [65]. Nas plantas, é absorvido como íons Ca^{2+} , essencial para o estabelecimento de endossimbioses micorrízicas arbusculares, que fixam o nitrogênio, liberam fósforo e neutraliza as toxicidades de outros íons metálicos [66].

O cálcio é um dos principais constituintes inorgânicos do tabaco, sendo o segundo mais absorvido, antecedido somente pelo potássio. Seu conteúdo, em uma folha curada, geralmente varia entre 1,5 e 2,0%. Este macroelemento quando aplicado em elevadas concentrações na cultura de tabaco pode influenciar de forma positiva ou negativa na absorção de minerais. O aumento da concentração de cálcio pode causar uma diminuição gradual na concentração de fósforo e magnésio. Enquanto que influencia de forma positiva, nas concentrações dos micronutrientes ferro, manganês, zinco e cloro [66,67].

1.2.1.4. Magnésio

O magnésio, elemento essencial para o ser humano, encontra-se no organismo em maior quantidade nos ossos. O íon Mg^{2+} tem uma função estabilizadora na estrutura de cadeias do ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN). Os íons de magnésio também atuam na atividade de coenzimas e, em reações que dependem da adenosina trifosfato (ATP) [68].

As plantas absorvem o magnésio do solo na forma de cátion divalente (Mg^{2+}) cujo equilíbrio é restabelecido pelo Mg trocável. É um elemento fundamental para o desenvolvimento da planta; sendo um dos componentes do pectato de clorofila, tendo grande importância na fotossíntese. É essencial para a formação de carotenóides e requerido por um grande número de enzimas ligadas à transferência de fosfato [69].

No tabaco, o aumento do conteúdo de magnésio nas folhas (até 2%) aumenta a combustibilidade e a aparência das cinzas (cor e textura), resultando em cinzas porosas, soltas e de cor clara, que melhora a combustão. A deficiência de magnésio reduz a qualidade das folhas, produzindo folhas escuras e curadas, com coloração irregular. Além de reduzir o teor de açúcar, também conduz a um aumento na quantidade de cinzas [69,70,71].

1.2.1.5. Fósforo

O fósforo é um macroelemento considerado essencial para os seres vivos, estando entre os seis elementos químicos mais presente na composição dos seres vivos. Através dos processos geoquímicos e biológicos os fosfatos naturais presentes nas rochas são transformados em formas orgânicas e inorgânicas estáveis, que são transferidas para o meio ambiente. O fósforo é absorvido pelas raízes das plantas e se incorpora na cadeia trófica dos consumidores, sendo devolvido ao solo, nos excrementos ou através da morte [72].

O fósforo é essencial para o desenvolvimento das raízes e crescimento das plantas. Também, melhora a cor e a qualidade das folhas. No tabaco curado, a quantidade adequada de fósforo aumenta o teor de açúcar, mas, em excesso este elemento causa a secagem e resulta em folhas irregulares, além de produzir cinzas pretas ao invés de cinzas brancas [69,73].

1.2.1.6. Enxofre

As plantas absorvem o enxofre do solo como íon sulfato, o qual auxilia a planta na defesa contra pragas e doenças. É importante para os processos metabólicos e produção de proteínas. Além disso, o aumento da absorção deste nutriente eleva também a absorção de outros como: nitrogênio, fósforo e zinco, que são essenciais para o desenvolvimento da planta [74].

Na planta de tabaco, a deficiência de enxofre é caracterizada pelo crescimento atrofiado, amarelecimento e rolagem de folhas jovens. Por outro lado, o excesso de enxofre nos produtos de tabaco, afeta a combustibilidade e diminui a alcalinidade das cinzas. Além disso, a concentração de S acima de 1% nas folhas pode afetar o aroma, uma característica fundamental do tabaco 'curado por combustão' que é usado como aromatizante nas misturas de cigarros [69,71].

1.2.2. Microelementos e elementos traço

1.2.2.1. Alumínio

O alumínio é o elemento metálico mais abundante da crosta terrestre, porém não possui função biológica significativa. Os alumínio silicatos presentes nas rochas, quando decompostos pela água contendo de gás carbônico, liberam o alumínio na forma trocável (Al^{3+}). Trata-se de um elemento anfótero, que pode atuar como cátion em meio

ácido ou como ânion em meio básico, assim, o pH é o principal fator que controla a sua disponibilidade no solo [75]. O alumínio presente no solo pode ser tóxico para as plantas, pois, inibe o crescimento e o desenvolvimento das raízes, alterando a absorção de água e nutrientes [76]. Nos seres humanos, sua toxicidade está associada à alteração do metabolismo do cálcio no cérebro [77].

Estudos relataram que exposições por inalação ocupacional do alumínio em algumas formas químicas ocasionam bronquite crônica, pneumoconioses de alumínio, fibrose pulmonar, granulomatoses, respostas anafiláticas e neurotoxicidade [78,79]. No caso de pessoas que fumam, o alumínio absorvido atinge a via olfativa e se acumula nos pulmões [80]. Elevados níveis de concentrações de alumínio no condensado da respiração exalada, tem sido observado em indivíduos fumantes com transtorno pulmonar obstrutivo crônico (DPOC) [81].

1.2.2.2. Bário

O bário é um elemento químico que pode causar lesões dérmicas. Quando ingerido oralmente ou inalado pode causar taquicardia, hipertensão e pneumoconiose granulomatosa benigna [82]. Apesar de não ser considerado cancerígeno, é muito tóxico, se acumula nos ossos e dentes e sua toxicidade é antagonista dos canais de potássio, resultando em hipocalcemia [83]. A toxicidade dos compostos de bário depende de espécies específicas; entretanto, doses letais em humanos geralmente variam de 1 a 30 g [84].

1.2.2.3. Cádmio

O cádmio é um elemento que ocorre naturalmente no solo em concentrações que podem diferir consideravelmente, dependendo do tipo de solo, mas que geralmente são inferiores a $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$. O enriquecimento adicional do Cd em solos agrícolas em muitas partes do mundo pode ocorrer devido ao uso em longo prazo de fertilizantes fosfatados ricos deste elemento. Também, pela aplicação de lodo de esgoto contaminado com Cd, bem como através da deposição atmosférica provenientes de atividades indústrias próximas das zonas de cultivo [85]. Desta forma, esse elemento pode ser encontrado em concentrações relativamente elevadas nas plantas cultivadas. Este, quando absorvido diminui a formação de espécies reativas de oxigênio [86].

A planta de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) pode acumular concentrações relativamente elevadas de cádmio em suas folhas (incluindo nervuras e veias). As concentrações geralmente variam em menos de $0,5$ a $5 \mu\text{g g}^{-1}$; porém alguns valores mais elevados já foram relatados [14,87]. Entretanto, a concentração de Cd nas plantas de tabaco depende de vários fatores, como pH e matéria orgânica do solo e o padrão de translocação e acúmulo de Cd podem diferir entre espécies e cultivares [88].

O cádmio é considerado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) como um dos principais carcinogênicos presente na fumaça do tabaco [89]. Ao ser inalado, este metal é eficientemente transportado na fumaça até o trato respiratório. Como metal livre, cloreto ou óxido, é mais volátil do que muitos outros metais ou seus

óxidos. Cada cigarro contém em média de 1 a 2 µg de Cd e os fumantes absorvem de 1 a 3 µg Cd / dia durante o tabagismo [90]. A meia-vida da depuração pulmonar do cádmio é de 13 a 24 anos, desta forma o Cd pode exercer efeitos carcinogênicos muito tempo após o término da exposição ambiental [91]. Além de ser cancerígeno, o cádmio está associado ao desenvolvimento de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e nefrotoxicidade [92].

1.2.2.4. Cobre

O cobre em reduzidas concentrações é um elemento necessário para os seres vivos. Sendo, essencial para as plantas em processos de oxidação e redução. Além disso, é um micronutriente necessário para a produção e desenvolvimento saudável do tabaco, contribuindo para a saúde integral da planta e regulando sua imunidade natural [93]. Entretanto, o cobre pode ser tóxico para os seres humanos [94].

A contaminação ocorre através da mastigação de um tipo de tabaco chamado *gutka*, sendo uma importante fonte de fibrose nas cavidades bucais [95]. O cobre inalado causa migração alveolar de macrófagos, eosinofilia, formação de granulomas histiocíticos, fibrose pulmonar e formação de nódulos fibro-hialinos, semelhante aos encontrados na silicose, como consequência de exposições ocupacionais. Um estudo realizado na determinação de metais em sangue humano relatou concentrações de cobre, significativamente, mais elevadas no sangue de fumantes do que de não fumantes [96].

1.2.2.5. Cobalto

O cobalto é um elemento fundamental para o homem. Ele é um componente importante da vitamina B12 (cobalamina). Entretanto, quando a concentração deste metal aumenta no corpo humano, a vitamina B12 torna-se contaminada, restringindo a respiração celular e também o ciclo do ácido cítrico mediado por enzimas [97]. O cobalto está classificado no grupo 2b da IARC como possível cancerígeno para o homem. Também, está relacionado com sensibilizações de metais, incluindo de contato alérgico epidérmico e oral, a inflamações por dermatite de contato, inflamações pulmonares, pneumoconioses e condições asmáticas [98].

1.2.2.6. Ferro

O ferro é um metal encontrado em praticamente todos os seres vivos e é responsável por várias funções no organismo. A deficiência de ferro nos seres humanos causa anemia. Nas plantas a deficiência dificulta a capacidade fotoquímica e a síntese da clorofila [93]. Por outro lado, o ferro em elevadas concentrações é tóxico. Devido à sua química redox, o ferro também é conhecido por catalisar a formação de radical hidroxila, altamente reativo a partir do íon superóxido e peróxido de hidrogênio pela reação de Fenton em duas etapas, assim como o cobre [99].

Como consequência, o ferro inalado pode contribuir para a lesão pulmonar induzida por radicais livres. Se o ferro estiver em níveis normais, este processo é

controlado pelos mecanismos antioxidantes do organismo. Em excesso, se acumula no fígado provocando danos a este órgão. O tabagismo é uma fonte de contaminação de ferro. Padmavathi e colaboradores [100] determinaram ferro em concentrações, significativamente mais elevadas no soro de fumantes crônicos.

1.2.2.7. Manganês

O manganês é um microelemento essencial para todos os seres vivos. Nas plantas, o manganês é necessário na formação da clorofila, na redução de nitratos e na respiração. Este elemento é muito importante para cultura do tabaco, pois ativa a respiração das raízes, reduz a nervuras das folhas, melhora a elasticidade da lâmina. Durante o tabagismo, promove a formação de cinzas claras, assim como uma fumaça também mais clara [93]. O manganês quando inalado, pode entrar no tecido cerebral através das vias olfativas. Em níveis elevados pode levar ao manganismo, caracterizado por sinais motores e posturais consistentes com aqueles inerentes à doença de Parkinson [101].

Os complexos de manganês (II) foram investigados no tabaco [102]. O manganês (III) e (IV) existe em formas ligadas a complexos, como proteínas do fotossistema II da planta [103]. Os estados de oxidação (III), (IV), (V), (VI) e (VII) são geralmente mais tóxicos em formas não complexas. A capacidade dos óxidos de manganês em oxidar cromo (III) a cromo (VI) acrescenta a dimensão oxidação-redução a potencialização da toxicidade do cromo [104]. Segundo os relatórios da Agência de

Proteção Ambiental dos EUA, há indícios de que os compostos de manganês podem induzir ou exacerbar asma [105].

1.2.2.8. Molibdênio

O molibdênio é um elemento químico essencial para vida dos animais, sendo responsável pelo metabolismo saudável dos seres humanos. Nas plantas, participa da bioquímica da absorção e do transporte e fixação de nitrogênio. Faz parte da enzima nitrato redutase e nitrogenase. A deficiência de molibdênio nas plantas ocasiona a diminuição do crescimento [93]. Entretanto, a exposição prolongada ao pó molibdênio pode causar irritação nos olhos, nariz, garganta e pele [106].

1.2.2.9. Níquel

O níquel é o vigésimo segundo elemento mais abundante na crosta terrestre. Ocorre naturalmente no solo em concentrações que dependem do material de origem. O maior teor é encontrado em solos desenvolvidos de serpentina e o menor em solos derivados de granitos e arenito. Além da sua concentração natural, os solos recebem Ni oriundo da atividade antrópica através da exploração agrícola dos solos, com uso de insumos (pesticidas, corretivos e fertilizantes); uso de lodos de esgoto, escórias de siderúrgicas, deposição atmosférica a partir de combustíveis fósseis e atividades da indústria metalúrgica. O níquel emitido no ambiente por fontes naturais ou

antropogênicas, circula por todos os compartimentos ambientais devido a processos químicos e físicos, além de ser biologicamente transportado por organismos vivos [107].

Exposição excessiva ao níquel pode levar ao câncer nasal e pulmonar ou aumentar a possibilidade de desordens cutâneas (níquel-eczema). A IARC classificou o níquel no um grupo 1 "carcinogênico para humanos" [108]. Outra importante via de exposição ao níquel é o tabaco. O cigarro pode conter de Ni entre 1,3 a 4,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estudos relataram que as concentrações de níquel são significativamente superior nos cinco lobos dos pulmões de fumantes em comparação aos pulmões de não fumantes [4].

Em outro estudo, o níquel foi relatado presente em concentrações significativamente mais altas em amostras de placenta de pais fumantes do que na placenta de pais não-fumantes, afirmando a absorção sistêmica dos pulmões [109].

1.2.2.10. Zinco

O zinco é um elemento químico essencial para os seres humanos, pois, participa do metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, estimulando a atividade de mais de 100 enzimas, e contribuindo com bom funcionamento do sistema imunológico. Ainda, auxilia na cicatrização dos ferimentos, e é necessário na síntese do ADN. No entanto, o zinco em excesso pode diminuir a função imunológica e alterar a função do ferro no organismo. A ingestão de alguns sais de zinco provoca náuseas e diarreia e a

inalação de óxido de zinco pode provocar lesões nos pulmões e em todo o sistema respiratório [110].

Nas plantas, o zinco atua no crescimento pela sua participação na formação do ácido indol acético (AIA) e desempenha papéis metabólicos essenciais para as plantas. Ele está presente em numerosas enzimas que atuam na respiração e outros processos enzimáticos vinculados ao metabolismo de carboidratos, proteínas e fosfato. Participa da transformação de hidratos de carbono e consumo de açúcares que fornece energia para a síntese de clorofila, fosforilação da glicose e, através dela, na produção de amido. Além disso, o Zn pode estimular a resistência das plantas ao tempo seco e quente e, também, a doenças bacterianas e fúngicas [93].

O zinco está presente em cigarros em média de 24 mg g⁻¹ e cerca de 70% do seu total são transferidos para fumaça [111]. O tabagismo pode influenciar na redução do conteúdo do zinco no organismo. Níveis reduzidos de Zn podem constituir um fator pró-carcinogênico, além de afetar a função do sistema imunológico. Acredita-se que o mecanismo pelo qual o fumo reduz os níveis de Zn é resultado de um aumento da concentração de Cd no sangue, que induz a expressão de metalotioneínas, no qual ligam Cd e Zn [112].

1.3. Metodologias para determinação de constituintes inorgânicos em amostras de produtos de tabaco

1.3.1. Determinação multielementar em produtos de tabaco

A determinação simultânea de vários elementos químicos presentes em tabaco é de grande importância para o setor econômico e na área de saúde pública, porque fornece uma visão geral da qualidade desses produtos na indústria, bem como dos riscos do tabagismo à saúde. Neste sentido, as técnicas instrumentais multielementares como espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) são atrativas, devido aos limites de detecção adequados, dependendo do elemento químico, elevada precisão e exatidão. Além disso, permitem análise de elevados rendimento da maioria dos elementos químicos em, praticamente, qualquer matriz de amostras de plantas [113]. Estas são consideradas como técnicas rápidas, podendo analisar uma grande quantidade de amostras de diversos tipos de tabaco, em um único estudo [6,7,14].

A técnica ICP-MS associa quantificação multielementar e limites de detecção na ordem de ng L^{-1} . A sensibilidade elementar do ICP-MS permite a quantificação de elementos químicos potencialmente tóxicos presentes no tabaco em concentrações traços e ultra-traços [15,114,115]. Entretanto, em análises de rotina, o ICP OES oferece

vantagens em relação ao ICP-MS, devido ao custo de compra e operação reduzidos, elevada tolerância a sólidos dissolvido e menor número de problemas referentes à interferência [8,113].

A técnica de ICP OES foi utilizada para determinar as concentrações de sete metais considerados potencialmente tóxicos (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) em 30 amostras de várias marcas de cigarros, charutos e biri (tabacos enrolados em folha seca e fumados sem filtro) e rapé comercializados em mercados indianos. Neste trabalho, foi possível quantificar Cd e Pb que geralmente, encontram-se em reduzidas concentrações nas amostras de tabacos, mas que apresentam maior risco à saúde com a prática do tabagismo, por serem cancerígenos e voláteis. A menor concentração encontrada para cádmio em média, foi de $0,45 \pm 0,17$ e $0,71 \pm 0,33 \mu\text{g g}^{-1}$ em cigarros e charutos, respectivamente. Chumbo apresentou a menor concentração média de $2,20 \pm 0,94 \mu\text{g g}^{-1}$ no produto charuto [6].

Crispino e colaboradores [16] determinaram macro e microelementos (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Sr) em 24 amostras por ICP OES, de três tipos diferentes de cigarros (convencional, leve e com sabor). Os valores dos limites de detecção encontrados em $\mu\text{g g}^{-1}$ foram: 0,28; 0,73; 2,60; 1,17; 0,71; 1,25; 1,16; 0,75; 1,18; 0,35 e 1,25 para Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Sr, respectivamente.

Armendáriz e colaboradores [116] analisaram amostras de 33 marcas de cigarros comercializados na Espanha e determinaram as concentrações de oito metais (Al, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Sr) por ICP OES. Os valores dos limites de detecção encontrados em mg L^{-1} foram 0,004; 0,0003; 0,0006; 0,003; 0,002; 0,0007; 0,0003 e 0,0007 para Al, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb e Sr, respectivamente.

Um dos fatores responsáveis para o bom desempenho do ICP OES na quantificação de vários elementos em diferentes amostras de tabaco é a capacidade de introdução da amostra. A robustez do plasma representa a eficiência da energia transferida e sua resposta às alterações nas condições de atomização e excitação dos elementos químicos e/ou íons da solução aspirada. Uma das formas de avaliar a robustez do plasma e o desempenho analítico é através da razão Mg II/Mg I. A razão é considerada ótima quando for maior ou igual do que 8,0 [117,118].

Nas análises por ICP OES, o plasma deve estar em equilíbrio termodinâmico com energia suficiente para atomizar totalmente e ionizar, satisfatoriamente, os analitos contidos na amostra [119]. Desta forma, alguns parâmetros operacionais do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado tais como: a potência incidente fornecida pela fonte geradora de radiofrequência (RF), as vazões do gás na tocha e a taxa de fluxo de gás de nebulização, podem ser otimizados com a finalidade de garantir o plasma robusto e obter resultados precisos. A otimização destes parâmetros geralmente tem sido realizada, usando as técnicas de planejamento experimental, como planejamento fatorial, planejamento Doehlert e planejamento Box-Behnken [10].

1.3.2. Otimização de métodos analíticos usando planejamentos de experimentos

Nas últimas décadas, a otimização de procedimentos experimentais usando técnicas de planejamentos experimentais de dois e três níveis tornou-se rotineiro em

laboratórios de química analítica, pois apresenta vantagens como rapidez e baixo custo em relação aos procedimentos univariados [10,120,121,122].

Na otimização de procedimentos para determinação multielementar simultânea, geralmente incluem mais de uma resposta. Neste caso, deve-se obter uma resposta global que esteja incluída em uma região ideal sem comprometer a eficiência do sistema empregado. Desta forma, o uso da função de resposta múltipla e função de desejabilidade vêm sendo proposto para otimização simultânea de múltiplas respostas, obtidas nas condições experimentais de métodos analíticos [11,123].

A função de resposta múltipla (RM) baseia-se na resposta em uma escala adimensional que varia de 0 a 1 através da divisão de cada valor que compõe o vetor de resposta (y_i) pelo valor máximo obtido no conjunto (y_{\max}) e, posteriormente, esses valores adimensionais são somados, de acordo com a Equação (1) [11]

$$RM = (y_1/Y_{\max 1} + y_2/Y_{\max 2} \dots + y_n/Y_{\max n}) \text{ Equação (1)}$$

Apesar da função de resposta múltipla atender à necessidade de simplicidade matemática, na sua forma original, não permite estabelecer critérios de otimização. Através do método de desejabilidade é possível determinar as melhores condições de ajuste de processo, com a finalidade de obter as condições de resposta ótima simultaneamente, minimizando-se, maximizando-se ou buscando-se valores nominais de especificações, de forma conveniente para o processo [124].

Neste método, cada conjunto de respostas obtido pela aplicação de um desenho experimental (y_1, y_2, \dots, y_m) é transformado em valores sem dimensão chamados desejabilidades individuais (d_i), que são agregadas em uma única resposta chamada desejabilidade geral (D). Ajustando um modelo matemático para os valores de D , a fim de descrever adequadamente seu comportamento, é possível otimizar as variáveis em estudo considerando todas as respostas disponíveis [11].

O primeiro passo na aplicação deste método é calcular a desejabilidade individual (d_i) para cada experimento, cujos valores podem variar dentro de uma escala de 0 (resposta indesejável) a 1 (resposta completamente desejável). Valores intermediários de d_i indicam mais ou menos as respostas desejáveis, dependendo de sua aproximação à unidade de valor. A Equação (2) é utilizada para calcular a d_i [125]:

$$d_i = \left(\frac{y - L}{T - L} \right)^S \quad \text{Equação (2)}$$

em que, y é a resposta de um determinado experimento; L são os valores de mínima aceitável para uma dada resposta no conjunto dos experimentos; T são valores de máxima aceitável; S é considerado a função de desejabilidade linear.

A partir dos valores da desejabilidade individual é possível calcular a desejabilidade global (D), que é calculada pela média geométrica dessas desejabilidades individuais, usando a Equação (3):

$$D = (d_1 d_2 \dots d_m)^{1/m} \quad \text{Equação (3)}$$

em que, m é o número de variáveis de resposta; d_1 , d_2 e d_m são funções de desejabilidade individuais; D é o índice também pertencente ao intervalo $[0, 1]$. Quanto mais próximo de 1 estiver D , melhor a otimização simultânea, ou seja, existe uma região de interseção que satisfaz as respostas avaliadas de acordo com os critérios estabelecidos.

1.3.3. Parâmetros analíticos para método analítico

1.3.3.1. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração ou massa mínima do analito em uma amostra, que pode ser detectada em um nível conhecido confiável. Enquanto, o limite de quantificação (LQ) do método, representa a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sobre determinadas condições experimentais [126].

Os métodos analíticos utilizando a técnica ICP OES, os valores de LD e LQ geralmente são calculados considerando a concentração equivalente a radiação de fundo (BEC), que é a concentração do analito que produz um sinal equivalente à intensidade

de emissão de fundo para a linha medida [127], calculado a partir da razão sinal ruído (SBR). Os valores de BEC inseridos no cálculo do LD permitem a avaliação de qualquer alteração nas condições operacionais [128]. O BEC, o LD e LQ são calculados usando as seguintes expressões:

$$\text{BEC} = C_{\text{padrão}} / \text{SBR}, \text{ Equação (4)}$$

$$\text{SBR} = (I_{\text{padrão}} - I_{\text{branco}}) / I_{\text{branco}}$$

em que, os valores de $I_{\text{padrão}}$ e I_{branco} são as intensidades de emissão para o elemento de referência e soluções do branco, respectivamente, no comprimento de onda selecionado. O valor de $C_{\text{padrão}}$ é a concentração do elemento de referência na solução.

$$\text{LD} = (3 \times \text{BEC} \times \text{RSD}_{\text{branco}}) / 100, \text{ Equação (5)}$$

e

$$\text{LQ} = (10 \times \text{BEC} \times \text{RSD}_{\text{branco}}) / 100, \text{ Equação (6)}$$

em que, RSD é o desvio padrão relativo para 10 medições da intensidade de emissão da solução do branco no comprimento de onda selecionado.

1.3.3.2. Precisão

A precisão dos resultados analíticos é o grau de concordância mútua entre as medidas que foram obtidas de modo similar em relação a uma média [126]. A precisão de um método analítico é expressa matematicamente, como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (RSD), conforme a Equação (7):

$$RSD = \frac{\sigma}{CMD} \times 100 \text{ Equação (7)}$$

em que, σ é o desvio padrão de várias medidas em uma dada concentração e CMD, a concentração média determinada.

A precisão pode ser expressa como repetitividade ou como reprodutibilidade. A repetitividade indica a concordância dos resultados individuais obtidos pelo mesmo método sob as mesmas condições (operador, equipamento, laboratório, etc.) em um curto período de tempo. A reprodutibilidade indica a concordância de resultados individuais obtidos sob diferentes condições [129].

1.3.3.3. Exatidão

Um material de referência certificado (CRM) é frequentemente, usado para avaliar a exatidão dos métodos analíticos. Na análise quantitativa por ICP OES, um nível de exatidão entre 80 e 120% é geralmente usado como critério de inclusão de

resultados [130]. No entanto, é essencial que o CRM seja semelhante à amostra analisada para evitar a introdução de interferências durante a variação significativa da composição elementar [113].

1.4. Preparo de amostra para determinação de constituintes em amostras de tabaco

1.4.1 Pré-tratamento de amostra

1.4.1.1 Secagem

O procedimento de secagem, geralmente é requerido como pré-tratamento de amostras sólidas, pois permite expressar os resultados analíticos em massa seca e preservar a amostra, inibindo a atividade microbiana. A secagem de materiais biológicos geralmente é feita em estufa, dessecador ou por liofilização. Entretanto, a liofilização é preferível aos demais métodos de secagem porque o procedimento é realizado a partir das amostras congeladas, em uma forma quimicamente menos ativa. Por ser conduzido sob vácuo, minimiza os efeitos da oxidação de espécies químicas. Além disso, evita a contaminação da amostra [131].

1.4.1.2. Moagem

As amostras quando moídas tornam-se mais homogêneas, podendo ser consideradas como grosseiras e finas. O procedimento de moagem, também diminui o tamanho das partículas aumentando assim, a relação entre área superficial e o volume da solução, o que facilita os processos de dissolução, de digestão e de extração. O moinho

com bolas é bastante utilizado em indústrias e laboratórios para o processamento de diversas amostras. Neste tipo de moinho, as partículas são reduzidas através da sucessiva colisão de esferas com as amostras, podendo fragmentar o material em partículas entre 0,1 e 100 μm [131].

1.4.2. Procedimentos para digestão de amostras de tabaco

A escolha do método de digestão depende do tipo e quantidade da amostra e elemento de interesse. Os métodos utilizados para digestão de matéria orgânica baseiam-se na oxidação a alta temperatura (cinza a seco) ou digestão úmida usando ácidos fortes com ou sem adição de agentes oxidantes. A digestão úmida é geralmente realizada através de várias combinações de ácidos com propriedades oxidantes. Os ácidos mais usados são: o ácido nítrico (HNO_3), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido clórico (HClO_4). Estes também podem ser utilizados combinados a agentes auxiliares para aumentar a oxidação, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [132,133].

O ácido sulfúrico (H_2SO_4) tem uma maior capacidade de digestão e ponto de ebulição, comparado com outros agentes oxidantes. O ponto de ebulição de 339°C é alcançado no sistema água-ácido sulfúrico a 98,3% (mm^{-1}). Isso é vantajoso no preparo de amostra, pois a capacidade de oxidação aumenta com a temperatura e o processo de dissolução sob elevada temperatura, pode ser realizado mesmo em recipientes abertos. Entretanto, o processo de oxidação é bastante lento. Desta forma, o H_2SO_4 é frequentemente usado em combinação com outros agentes para aumentar o ponto de ebulição [131,133]. Levent e colaboradores. [133] utilizaram um procedimento de

digestão por via úmida com uma mistura de H_2SO_4 , HNO_3 e H_2O_2 na preparação de amostras de tabaco. As concentrações de macroatômos (K, Mg, Ca) e metais traço (Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Cr) nas amostras de tabaco foram determinadas, após digestão, por Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

O ácido perclórico (HClO_4) apresenta alta capacidade de oxidação e é disponível em alto grau de pureza. No entanto, sua instabilidade o torna um ácido extremamente perigoso, sendo usado apenas na digestão em sistemas abertos. Quando aquecido se decompõe liberando o oxigênio e cloro no estado gasoso e água. Por outro lado, a combinação de HNO_3 e o HClO_4 origina sais solúveis (nitratos e cloratos) com a maioria dos elementos de interesse. As misturas de HNO_3 e HClO_4 são muito eficazes para digestão e solubilização de material biológico [134,135,136]. Pelit e colaboradores [135] empregaram o HNO_3 e HClO_4 para digerir amostras de folha de tabaco, ponta e cinzas de cigarro. As amostras foram digeridas por via úmida aquecendo as misturas na placa quente na faixa de 100-130°C. Em seguida, os digeridos foram analisados por espectrometria de absorção atômica em chama e foram determinados cobre, zinco, cádmio e manganês.

O ácido nítrico (HNO_3) é um agente oxidante bastante utilizado na digestão de amostras biológicas [14,15,114], devido a facilidade de encontrá-lo com elevada pureza, permitindo a oxidação à temperatura ambiente, bem como a elevada temperatura e elevada pressão e seus produtos são geralmente nitratos metálicos solúveis em meio aquoso [131].

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um oxidante atrativo para procedimentos de digestão de amostras, pois o produto de redução é água e oxigênio. Entretanto, sua

capacidade de oxidação não é suficiente para digerir o material biológico em condições ambientais. Por isso, geralmente é usado em combinação com outros agentes oxidantes tais como HNO₃ [137] e H₂SO₄ [133].

Viana e colaboradores [138] utilizaram a mistura de HNO₃ e H₂O₂ para digerir o tabaco do preenchimento do cigarro em forno de micro-ondas. A metodologia permitiu a determinação de Pb, Cd, As, Ni e Cr por GF AAS.

Swami e colaboradores [132] investigaram várias combinações de HNO₃, H₂O₂ e HF no procedimento de digestão de amostras de tabaco do preenchimento do cigarro por micro-ondas. As melhores recuperações dos analitos, entre 90% e 120% para a maioria dos elementos, ocorreram usando uma mistura de 2,0 mL de HNO₃ e 4,0 mL de H₂O₂. O método desenvolvido utilizando as melhores condições foi aplicado para a determinação de Be, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sb, Ba, Tl e Pb por ICP-MS e Hg por espectrometria de absorção atômica a vapor frio em amostras de tabaco de cigarro.

Ácido clorídrico (HCl) é um ácido forte que não apresenta propriedades oxidantes. Entretanto, na dissolução de muitos metais e óxidos com ele é mais eficiente que os ácidos minerais oxidantes. É usado para dissolver a maioria dos metais mais eletropositivos que o hidrogênio, além de seus óxidos e hidróxidos. Ácido clorídrico é bastante utilizado em mistura com ácido nítrico, conhecida como água régia, na proporção de 1:3.

Pérez-Bernal e colaboradores [7] desenvolveram uma metodologia para analisar as cinzas de cigarros após o tabagismo. As amostras de cinzas foram previamente submetido à digestão ácida em vasos abertos de politetrafluoroetileno

(PTFE), com uma mistura de HNO₃/HCl na razão 1:3 (v v⁻¹). O conteúdo metálico (Zn, B, Mn, Fe, Mg, Cu, Ti, Al, Sr, Ca, Ba, Na, Li e K) das cinzas de cigarro foram determinados por ICP OES. Outras proporções da mistura de HNO₃/HCl, também podem ser utilizadas.

Pourkhabbaz e Pourkhabbaz [139] utilizaram HNO₃ e HCl numa razão de 4:1 (v v⁻¹) para digerir amostras de tabacos por radiação de micro-ondas. Os autores determinaram os teores de Zn, Ni, Cu, Co, Cd e Pb por Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).

Ácido fluorídrico (HF) é o mais poderoso ânion complexante dos ácidos de uso comum no preparo de amostras, formando fluoro-complexos com muitos elementos. Reage, especialmente, com aqueles elementos que formam óxidos refratários, os quais são difíceis de serem dissolvidos [131].

Todavia, é um ácido muito perigoso, em contato com a pele causa graves queimaduras e pode levar até a morte. Além disso, HF pode dissolver o material de vidro no sistema de introdução de amostras dos espectrômetros (ICP-MS e ICP OES) e causar interferências baseadas em Si, B e Al.

Verma e colaboradores [6] utilizaram uma mistura de 10 mL HNO₃, 1 mL HClO₄ e 5 mL HF sequencialmente para digestão de cigarros, charutos e biri (tabacos enrolados em folhas secas) em um cadinho de Teflon. A digestão foi realizada em três etapas, sendo lavada com ácido nítrico entre as etapas para remover vestígios de HClO₄ / HF, que podem interferir na análise e /ou causar danos na tocha do ICP OES. O digerido foi recuperado com HNO₃ e levado para a determinação de Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn por ICP OES.

Papas e colaboradores [115] usaram uma mistura de 9,0 mL HNO₃, 0,5 mL HF e 0,5 mL H₂O₂ para digestão de charutos pequenos em forno de micro-ondas. Os autores determinaram os teores de 10 elementos, As, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Se e U por ICP MS.

Na Tabela 1.2 encontra-se um resumo das principais características dos métodos utilizados no preparo de amostras de tabaco. Como observado na revisão bibliográfica, a digestão úmida de amostras de tabaco pode ser realizada em vasos abertos com diferentes aparelhos de aquecimento, como placas de aquecimento, cadinhos ou fornos de micro-ondas, permitindo uma digestão da amostra com bons rendimentos.

No entanto, em sistemas de recipientes abertos, a digestão é limitada pelo ponto de ebulição dos agentes oxidantes, podendo ocorrer perdas significativas de elementos voláteis e contaminação das amostras. Por outro lado, os sistemas fechados permitem a digestão de amostras orgânicas com ácido nítrico, com menor conteúdo de carbono residual dissolvido em comparação com sistemas abertos, uma vez que, pode operar com elevadas temperaturas e pressão [131,140].

Isto é um fator que deve ser considerado, principalmente em técnicas baseadas em elevadas em plasma ICP-MS e ICP OES, pois os resíduos orgânicos podem causar desvios analíticos e bloquear o sistema de introdução de amostras, comprometendo o desempenho das análises. Estudos mostraram que a amostra digerida que contém elevada concentração de carbono, pode promover severas variações espectrais e interferências não espectrais, aumentando a emissão de fundo (BEC) e diminuindo a capacidade de detecção da técnica [9,131,141].

Entretanto, a concentração de ácido residual do processo de digestão das amostras também, podem ser considerados uma fonte de interferência na determinação de analitos por ICP OES [142]. Em elevadas concentrações, ácidos residuais alteram as propriedades físicas da solução e promovem mudanças nos fenômenos de formação de aerossóis podendo modificar o transporte da amostra para o plasma e desta forma, levar a uma redução na emissão do sinal. Além disso, pode aumentar o sinal do branco devido a elementos presentes como contaminantes. Uma alternativa para evitar esses problemas é usar soluções ácidas diluídas [9]. Neste caso, os sistemas fechados são vantajosos em relação aos sistemas abertos, devido ao fato de que altas pressões e temperaturas são atingidas em vasos fechados [143].

1.4.2.1. Parâmetros para avaliar a eficiência de digestão da amostra

A eficiência de digestão de amostras orgânica foi estabelecida determinando-se o teor de carbono residual (RCC, do inglês *Residual Carbon Content*), o teor de carbono orgânico dissolvido (DOC, do inglês *dissolved organic carbon*), e a concentração da ácido residual [131].

O valor de RCC representa a proximidade do procedimento à oxidação total da matéria orgânica transformando em CO₂ e, é calculado a partir dos teores de carbono original da amostra (C_O) e o remanescente após a digestão (C_R), de acordo com a Equação (8). E o DOC consiste na concentração de carbono presente no digerido final, sem relacionar com a massa inicial de carbono, normalmente expresso em mg L⁻¹.

$$\%RCC = (C_R/C_O) \times 100 \text{ Equação (8)}$$

A concentração do ácido residual representa a acidez do digerido diluído que será introduzido no instrumento. A concentração do ácido não deve ser superior a 20% (v v⁻¹) para evitar dificuldades no processo de introdução da amostra no nebulizador [131].

Na Tabela 1.2 pode-se observar uma diversidade de métodos de preparo de amostras combinados com os diferentes tipos de ácido minerais com ou sem agente auxiliar (H₂O₂) em sistemas abertos ou fechados. Estes procedimentos foram aplicados em elementos traço potencialmente tóxicos em diferentes técnicas espectroanalíticas, mostrando a diversidade de material encontrado na literatura. Porém, nenhum menciona o uso de ácido diluído usando o bloco digestor em sistema fechado.

Tabela 1.2. Trabalhos reportados na literatura sobre métodos de preparo de amostra para determinação de constituintes inorgânicos em amostras de tabaco.

Método	Reagentes	Sistema	Analito	Técnica	LD	Ref.
Digestão via úmida	HNO ₃ , HClO ₄ e HF	Aberto/Cadinho de Teflon	Cd, Ni, Pb, Cr, Cu, Fe e Zn	ICP OES	-	[6]
Digestão via úmida	HNO ₃ /HCl	Aberto/Sistema aberto de PTFE	Zn, B, Mn, Fe, Mg, Cu, Ti, Al, Sr, Ca, Ba, Na, Li e K	ICP OES	-	[7]
Digestão via úmida	HNO ₃ , H ₂ O ₂ e HF	Fechado/Forno de micro-ondas	Be, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sb, Ba, Tl e Pb	ICP-MS	0,005; 0,018; 0,032; 0,090; 0,007; 0,028; 0,142; 0,040; 0,135; 0,060; 0,013; 0,004; 0,004; 0,004; 0,029; 0,005; 0,021 µg g ⁻¹	[132]
Digestão via úmida	HNO ₃ , HF e H ₂ O ₂	Fechado/Forno de micro-ondas	As, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Se e U	ICP MS	0,024; 0,0030; 0,016; 0,018; 0,088; 2,85; 0,217; 0,012; 0,019; 0,0022 µg g ⁻¹	[115]
Digestão via úmida	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Fechado/Forno de micro-ondas	Pb, Cd, As, Ni, Cr	GF AAS	0,01; 0,02; 0,01; 0,03; 0,01 µg g ⁻¹	[138]
Digestão via úmida	HNO ₃ e HCl	Fechado/Forno de micro-ondas	Zn, Ni, Cu, Co, Cd e Pb	GF AAS	-	[139]
Digestão via úmida	H ₂ SO ₄ , HNO ₃ e H ₂ O ₂	Aberto/ Bequer	K, Mg, Ca; Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Cr	FAAS	-	[133]
Digestão via úmida	HNO ₃ e HClO ₄	Aberto/Placa quente	Cu; Mn; Zn; Cd	FAAS	0,06; 0,12; 0,08; 0,03 mg L ⁻¹	[135]
Extração ultrassônica	HNO ₃	Banho ultrassônico	Al; As, Cd, Ni e Pb	FAAS / ET AAS	1,2; 0,22; 0,05; 0,15 e 0,55 µg L ⁻¹	[12]
Extração ultrassônica	HNO ₃	Banho ultrassônico	Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni e Pb	ICP-MS	0,2; 0,01; 0,01; 0,1; 0,1; 0,001; 0,1; 0,05 µg g ⁻¹	[13]

1.4.3. Técnica de extração assistida por ondas ultrassônicas

A técnica de extração assistida por ondas ultrassônica vem sendo relatado na literatura científica como uma alternativa para substituir os procedimentos de digestão de amostras por via seca ou úmida. Esta técnica evita grandes diluições da concentração dos analitos, pois permite o uso de soluções ácidas diluídas, aumentando desta forma a sensibilidade dos métodos para determinação de elementos potencialmente tóxicos como As, Cd e Pb, que estão presentes no tabaco em quantidades traços.

Além disso, pode minimizar contaminação, perda de analitos voláteis e evitar longas etapas de preparo das amostras. No procedimento de extração assistida ultrassônica, a amostra é submetida a ondas através de um banho ultrassônico e, com a ação de um meio extrator, os analitos migram da matriz da amostra para o meio líquido. Algumas variáveis como tempo de sonicação, massa e tamanho da amostra são fatores que podem influenciar na precisão e exatidão do método, e por isto precisam ser otimizados [131].

Métodos de extração de elementos químicos assistida por ondas ultrassônicas usando ácido nítrico como extrator vêm sendo empregados para preparar amostras de tabaco. Kazi e colaboradores [12] desenvolveram um método de preparação de amostra baseado na extração ácida assistida ultrassônica de Al, As, Cd, Ni e Pb em tabaco de enchimento de diferentes marcas de cigarros locais e importadas consumidos no Paquistão. Os analitos foram determinados por FAAS e ET AAS. Os parâmetros que influenciam no processo de extração, como tempo de pré-sonicação de 10-15 min,

tempo de sonicação de 2-10 min, massa de amostra 0,1-0,5 g, tamanho de partícula <35-125 µm e concentrações de extrator (ácido nítrico) (2-10%) foram otimizados para obter a recuperação quantitativa de elementos potencialmente tóxicos. O método proposto foi validado com um material de referência certificado (CRM), folhas de tabaco Virginia (ICHTJ-cta-VTL-2). As eficiências de extração para CRM foram próximas a 97,1%, 97,5%, 98,5%, 97,8% e 96,7% para Al, As, Cd, Ni e Pb, respectivamente.

Almeida e colaboradores [13] também usaram a extração assistida ultrassônica para extrair de Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni e Pb em amostras tabaco de cigarro. Os elementos foram determinados posteriormente por ICP-MS. Os autores realizaram a extração dos analitos utilizando uma concentração de 0,7 mol L⁻¹ de HNO₃, como meio extrator e um tempo de sonicação de 30 min. Os limites de detecção em µg g⁻¹ foram de 0,2; 0,01; 0,01; 0,1; 0,1; 0,001; 0,1; 0,05 para Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni e Pb, respectivamente.

1.5. Análise multivariada de dados empregando métodos não supervisionados

A análise multivariada de dados envolve as técnicas de informações que consistem em inúmeras variáveis medidas a partir de várias amostras, com objetivo de determinar todas as variações no estudo da matriz de dados. Desta forma, as ferramentas quimiométricas tentam encontrar a relação entre as amostras e as variáveis em um determinado conjunto de dados e convertem-se em novas variáveis latentes, permitindo uma visão geral das informações de forma rápida [144].

Os métodos quimiométricos usados no reconhecimento de padrões, como análise de componentes principais (do inglês, *Principal Component Analysis- PCA*) e análise de agrupamento hierárquico (do inglês, *Cluster Analysis Hierarchical – HCA*) vêm sendo utilizados para resumir e visualizar os dados da melhor forma possível sem perda de informações, visando evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados [145]. A PCA e HCA são métodos não supervisionados, pois, dependem apenas de um conjunto de variáveis descritivas, ou seja, dados quantitativos com uma representação vetorial [146].

Na análise de componentes principais, a redução da dimensionalidade de um conjunto de dados é feita criando novas variáveis não correlacionadas que maximizam sucessivamente a variância. Encontrando essas novas variáveis, os componentes principais reduzem a resolução de um problema de autovalor / autovetor [147]. Geralmente, os resultados da análise dos componentes principais são visualizados em um gráfico bi- ou tridimensional. Projetando-se os resultados analíticos de cada amostra no espaço formado é possível observar, através dos gráficos de escore, as diferenças entre as amostras utilizadas e a partir do gráfico de peso (*loading*) determinar quais são as principais variáveis envolvidas. Os pesos descrevem a contribuição das variáveis individuais para uma dada componente principal de forma decrescente de variabilidade [148].

A HCA, assim como o PCA, é uma técnica de reconhecimento de padrões que possui a função de classificar diferentes objetos dentro de um grupo de acordo com as suas similaridades e as tendências, respectivamente. No HCA a matriz de dados é diminuída em uma dimensão, pela reunião de pares semelhantes, até a reunião de todos

os pontos em um único grupo. O grau de associação entre dois ou mais objetos será máxima se pertencer ao mesmo grupo ou mínima se forem diferentes. A representação gráfica do HCA é feita através de um dendrograma que representa uma visão bidimensional da similaridade ou dissimilaridade de todo o conjunto de amostras utilizado no estudo [149,150].

As técnicas de HCA e PCA são ferramentas para avaliação aplicadas em diferentes áreas, inclusive em Química Analítica. Geralmente, são utilizadas juntas nos estudos não supervisionados de reconhecimento de padrões para aumentar a consistência das interpretações e o entendimento do conjunto dos dados [151].

A combinação dos métodos analíticos validados, com a análise multivariada de dados é uma alternativa promissora para monitoramento dos constituintes inorgânicos em produtos de tabaco. Os resultados obtidos são fundamentais para; identificar adulteração, fazer a diferenciação por região, o que dificulta o contrabando; padronizar a fabricação de produtos de tabaco e reduzir as concentrações de substâncias tóxicas, e o mais importante, alertar a população global sobre os efeitos nocivos do tabagismo [7,14,15,46].

Prata e colaboradores [152] propuseram um método analítico para determinar compostos orgânicos em amostras de charuto através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A HCA e PCA foram usadas com ferramenta na classificação dos charutos. Aplicando a HCA, o dendrograma obtido discriminou as amostras em três grupos principais. O primeiro formado pela amostra de charuto cubano H; o segundo pelas amostras A, B e C; e o terceiro por D, E e F. Na discriminação complementar das amostras, aplicou-se a análise de componentes principais à matriz de

dados. A decomposição dos dados obtida pela PCA determinou que PC1 representa 74,44% da variância, e PC2 explicou 13,24% da variabilidade total dos dados. Assim, o gráfico PC1 contra PC2 representa 87,66% da variância acumulada dos dados. Os autores observaram com a PCA que a projeção sobre a nicotina é suficiente para distinguir as 7 marcas em 3 grupos característicos. Desta forma, os autores concluíram que o teor nicotínico foi responsável pela discriminação das amostras em três grupos de qualidade distintas.

A análise multivariada de dados foi aplicada por Lugon-Moulin e colaboradores [14] para discriminar tipos de tabaco, com base em concentrações de vários elementos. A PCA foi aplicada em todas as variáveis retidas. Segundo os autores, as representações gráficas nas coordenadas do componente principal sugeriram que as concentrações dos elementos químicos podem discriminar os três tipos de tabaco analisados. Diferenças significativas foram encontradas entre os tipos de tabaco e entre os países. A correlação entre a concentração de cádmio e de outros elementos diferiu entre os tipos de tabaco (Flue-cured, Burley e Oriental), e assim puderam ser discriminados com base nas concentrações de 20 elementos (Li, Be, B, Mg, V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Sr, Cs, Ba, e Pb).

A técnica de PCA foi empregada para desenvolver modelos de classificação para detectar e discriminar diferentes marcas de tabaco comercializadas na Espanha. Diferenças intrínsecas foram encontradas entre diferentes marcas, sendo possível estudar a relação entre cada marca e sua concentração metálica e comparar essa relação com outras marcas. Em termos gerais, o tabaco preto era mais relacionado a altos níveis

de Sr, Li, Mg, Cu, Zn e Mn. Enquanto, o tabaco amarelo foi relacionado as concentrações de Ca, Al, B, Ti, Fe, Ba, K e Na [7].

Crispino e colaboradores [16] aplicaram HCA e PCA, para avaliar a similaridade e a tendência de diferentes tipos de cigarros comercializados no Brasil, de acordo com seu conteúdo mineral. A técnica de ICP OES foi empregada na determinação de Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Sr em cigarros *light*, convencional e aromatizados. A análise multivariada de dados mostrou diferenças nos cigarros de acordo com o tipo e composição mineral. As amostras de cigarro foram divididas em 3 grupos de acordo com a composição mineral. Os elementos Ca, Sr, Cu, K e Na foram mais importantes na classificação do cigarro, e apenas essas 5 variáveis foram suficientes para a classificar e discriminar os tipos de cigarro avaliados.

No trabalho realizado por Musharraf e colaboradores [15], a análise multivariada de dados foi aplicada para avaliar a correlação e as variações entre produtos de tabaco. Foram 12 colunas expressando elementos e 55 linhas indicando produtos individuais. Foi encontrado, que o Cu não apresentou correlação significativa com nenhum dos elementos analisados, estando em um grupo separado. Os demais elementos foram facilmente agrupados em duas classes distintas após a interpretação da matriz de correlação: Grupo 1 formado pelas concentrações de Al, Fe, Co, Ni, As, Cr e Pb, Grupo 2 foi composto pelas concentrações de Mn, Zn, Se e Cd, Grupo 3 foi somente com a concentração de Cu. As componentes principais geraram quatro componentes. A primeira componente (PC1) contribuiu com 49,1%, a PC explicou 18,4%, a PC3 explicou com 9,3% e PC4 somou 8,7% de variabilidade dos dados. A contribuição total destes quatro primeiras componentes principais foi de 85,7% da variação total. A

análise fatorial no modo Q foi realizada para verificar a variabilidade entre os produtos do tabaco. Através desta análise, os autores concluíram que os produtos de tabaco sem fumaça passam por muitas etapas de processamento e têm mais chance de contaminação elementar do que os produtos de tabaco fumados que passam por poucas etapas de processamento.

Saha e colaboradores [46] identificaram a relação das concentrações de metais com solo, raiz e folha de tabaco. A técnica de PCA foi empregada para determinar as fontes de metais pesados em plantas de tabaco. Os valores do coeficiente de correlação de *Pearson* indicaram a mesma origem ou fator de controle dos metais pesados em plantas de tabaco. Através dos resultados da análise de correlação de *Pearson* e a PCA, os autores consideraram o solo como a principal fonte de metais potencialmente tóxicos nas plantas de tabaco estudadas.

Os estudos relatados na literatura científica mostraram que a análise multivariada de dados é uma ferramenta essencial na identificação e discriminação dos produtos de tabaco. Desta forma, os dados quantitativos podem ser incluídos na análise de monitoramento e o controle da qualidade dos produtos de tabaco.

1.6. Bioacessibilidade de elementos químicos em amostras de tabaco

É sabido que a fumaça de produtos de tabaco, quando inalada, transporta muitas substâncias químicas através da boca e garganta até os pulmões, onde uma porção substancial do material particulado e volátil é depositada. Desta forma,

procedimentos de lavagem pulmonar e biópsia são realizados em pacientes fumantes para estimar potenciais, relativos à exposição a metais nos produtos de tabaco [114]. Entretanto, como estes procedimentos são invasivos, as análises de concentrações de metais na fumaça originada dos produtos de tabaco são, geralmente, usadas para estimar potenciais relativos à exposição a metais [134].

Por outro lado, os procedimentos *in vitro* como parâmetro de ensaio da bioacessibilidade pode ser uma alternativa para estimar o risco à saúde humana causada pelos constituintes inorgânicos presentes no fumo de corda (um dos produtos de tabaco). O fumo de corda ao ser mascado pode chegar ao estômago, que prevalece em condições ácidas, aonde para a maioria dos metais a parte da fração bioacessível é liberada [153]. A bioacessibilidade pode ser definida como a fração de um composto que é liberado de sua matriz no trato gastrointestinal e, assim, torna-se disponível para absorção gástrica e intestinal, e posteriormente entra na corrente sanguínea [154].

Os testes de bioacessibilidade *in vitro*, consistem em procedimentos de lixiviação usando fluidos corporais simulados, que geralmente, são realizados de modo descontínuo, visando à avaliação dos riscos de exposição a elementos químicos, através do trato gastrointestinal. Estes testes possuem vantagens em relação aos testes *in vivo*, por serem mais simples, rápidos, e de baixo custo, evitando o uso do modelo animal, de enzimas e de proteínas. Várias abordagens *in vitro* foram desenvolvidas, e recentemente revisadas, para simular os efeitos do processo de digestão do ser humano [17,155,156].

A maior parte da fração bioacessível da maioria dos elementos é liberada sob as condições ácidas que prevalecem no estômago [157]. Assim, foi desenvolvido um método simplificado simulando *in vitro* com ação dos sucos gástricos numa extração em

única etapa conhecida como simples extração de bioacessibilidade (do inglês, *Simple Bioaccessibility Extraction*, SBET).

No procedimento SBET, utiliza-se a glicina, um aminoácido simples, produzido pelo corpo humano e o ácido clorídrico. A simulação das condições gástricas do estômago considera a temperatura do corpo e o tempo de digestão, sem considerar o compartimento intestinal. Este método pode ser usado para processar grande número de amostras em um tempo relativamente curto em relação aos métodos de extração sequencial tal como, o teste fisiológico de extração com base de dados do teste de extração com base fisiológica (do inglês, *Physiological Based Extraction Test*, PBET), que simula parâmetros gastrointestinais de humanos.

Também pode ser aplicado um método mais completo o teste de extração com base fisiológica (do inglês, *Unified Bioaccessibility Method*, UBM) que não só simula a extração de metais pelo líquido gástrico e intestinal, mais também pela saliva, no sistema digestivo humano [158, 159].

CAPÍTULO 2. Caracterização da composição mineral de produtos do tabaco (charuto, desfiado e corda)

2.1. Introdução

O presente trabalho teve como objetivo otimizar e validar um método analítico para a determinação de constituintes inorgânicos em produtos de tabaco (charuto, fumo desfiado e fumo de corda) por ICP OES. Ferramentas quimiométricas foram aplicadas na otimização do procedimento de digestão para amostras de produtos de tabaco usando um bloco digestor em sistema fechado e as condições operacionais do espectrômetro. As amostras foram então classificadas de acordo com suas composições químicas, empregando análise multivariada de dados, utilizando PCA e HCA.

2.2. Experimental

2.2.1. Instrumentação

A determinação multiementar nas amostras de tabaco foi obtida usando um espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado com

análise simultânea com arranjo axial e detector de estado sólido (Vista-PRO, Varian, Mulgrave, Austrália).

O gás usado para geração do plasma foi argônio com pureza de 99.9999% (White Martins, São Paulo, Brazil). A câmara de nebulização de passagem única e o nebulizador pneumático do tipo *One Neb* (Agilent, Santa Clara, EUA) foram empregados para a introdução da amostra. As condições de operações do sistema do espectrômetro foram às seguintes: vazão do gás no plasma de 15 L min⁻¹, vazão do gás auxiliar de 1,5 L min⁻¹, gerador de radiofrequência de 40 MHz. A potência de radiofrequência (PRF) de 1350 W e a vazão do gás de nebulização (VGN) de 0,9 L min⁻¹ foram obtidos após avaliação de planejamento Doehlert no decorrer do trabalho.

Os elementos químicos tiveram as suas concentrações determinadas usando os comprimentos de ondas: Al (I) 396,152 nm, As (I)193,696 nm, Ba (II) 455,403 nm, Ca(II) 317,933 nm, Cd (II)214,439, Co (II)228,615, Cu (I)324,754, Fe (II) 259,940, K (I) 324,754 nm, Mg (II) 279,800 nm, Mn (II) 260,568 nm, Mo (II) 202,032 nm, Na (I) 330,237 nm, Ni (II) 221,648 nm, P (I) 213,618 nm, S(I)182,562 nm, Sr (II) 215, 283, Ti (II) 336,122 nm, V(II) 292,401 nm, Zn (I) 213,857 nm, sendo (I) linhas atômicas e (II) linhas iônicas.

As concentrações de nitrogênio nas amostras foram determinadas usando um analisador de carbono, nitrogênio e enxofre da LECO (CN 628/S) Instrument, série 3049. Um liofilizador, Liotop Modelo L10 e um moinho de bolas (PM 100; Retsch, Düsseldorf, Alemanha) foram utilizados para pré-tratamento das amostras. Um sistema de bloco de digestão com sistema fechado (modelo TE-007MP, Tecnal (São Paulo, Brasil) com controlador de temperatura analógico foi usado para digestão das amostras.

Um sistema de purificação de água Milli-Q *system* (Millipore, Bedford, USA) a resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ foi empregado para produção de água de alta qualidade.

2.2.2. Materiais e métodos

As soluções foram preparadas em água deionizada, com uma resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Utilizou-se ácido nítrico 65% m m⁻¹ e peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha) para o preparo das amostras de produtos de tabaco.

As curvas de calibração externa foram preparadas a partir de diluições de padrões (Specsol, São Paulo, Brasil) contendo 1000 mg L^{-1} de Al, As, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Ti, V e Zn; soluções de 10000 mg L^{-1} de Ca, K, Na e de soluções contendo 4000 mg L^{-1} para Mg, P, S, sendo diluídas de acordo com as faixas de trabalho requeridas.

Para avaliação do teor de carbono orgânico dissolvido (%DOC) na amostra digerida, usou-se uma solução de referência de $20,000 \text{ mg L}^{-1}$ de carbono preparada a partir de ácido cítrico (J.T.Baker, Upper Saucon Township, EUA).

A concentração ácida residual das amostras digeridas foi determinada através da titulação ácido-base usando uma solução padronizada de hidróxido de sódio ($0,1022 \text{ mol L}^{-1}$) e o indicador fenolftaleína (1,0 % m v⁻¹ em etanol). A mesma concentração ácida foi utilizada para preparar os padrões da curva de calibração externa.

2.2.3. As amostras de produtos de tabaco e os materiais de referência certificados

Vinte duas amostras de várias marcas de tabaco na forma de charuto (8), fumo desfiado (8) e fumo de corda (6) foram coletadas em feiras da cidade de Salvador, Estado da Bahia. Os materiais de referência certificados (CRM) folhas de tabaco oriental (CTA-OTL-1) foi adquirido no Instituto de Química Nuclear e Tecnologia (*Institute of Nuclear Chemistry and Technology* - INCT/ICHTJ) na Polónia; folhas de macieira (CRM NIST 1515) foi adquirido do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (Gaithersburg, MD, EUA) e folhas de tomateiro (CRM-Agro C1003a), por meio do exercício colaborativo CRM-AGRO FT_012016 realizado pelo Laboratório de Radioisótopos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura Universidade de São Paulo (LRi/CENA/USP).

2.2.4. Pré-tratamento e digestão das amostras

No laboratório, as amostras foram cortadas em pedaços, no caso de charutos e fumo de corda, e liofilizadas por 72 h. Depois, processadas por 10 min em moinho de bolas para homogeneizar o material e obter uma granulometria menor do que 150 µm. Os materiais finais, em pó, foram armazenados em dessecadores até a análise.

Aproximadamente 200 mg de amostras homogeneizadas (em triplicata) foram pesadas, com precisão, em recipientes de digestão com PTFE. Em seguida foram adicionados 2,1 mL de HNO₃ (65% m m⁻¹), 1,2 mL de H₂O₂ (30% m m⁻¹) e 6,7 mL de

água deionizada às amostras, completando um volume final 10 mL no frasco reacional. Os frascos digestores foram fechados e mantidos a 180 °C no sistema de bloco de digestor em sistema fechado (model TE-015-1, TECNAL, São Paulo, Brasil) durante 120 min.

As soluções resultantes foram diluídas com água deionizada até um volume final de 15 mL. As soluções do branco analítico e amostras de CRM foram preparadas da mesma maneira. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Os parâmetros empregados no procedimento de digestão das amostras foram obtidos aplicando um planejamento Box-Behnken, que será mostrado na parte de discussão e resultados.

2.2.5. Ferramentas quimiométricas aplicadas para análise de produtos de tabaco

A fim de obter o melhor desempenho do método analítico para determinação de constituintes inorgânicos em produtos de tabaco por ICP OES, foram aplicados planejamentos de experimentos multivariados para otimização do processo de digestão de amostras e parâmetros instrumentais do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória e réplicas do ponto central foram feitos para avaliação do erro experimental da matriz de Doehlert e Box-Behnken. Os dados experimentais foram processados usando um programa Statistica 6.0.

A partir das informações obtidas sobre as concentrações de constituintes inorgânicos nos produtos de tabaco foi construída uma matriz de dados, sendo auto escalonada para realizar a análise multivariada dos dados, empregando PCA e HCA.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Otimização das condições de digestão

A matriz Box-Behnken foi aplicada para investigar os efeitos simultâneos das variáveis envolvidas no procedimento de digestão das amostras, sendo escolhidos os seguintes fatores: tempo de digestão, concentrações de HNO₃ e H₂O₂, no processo de digestão de amostras de produtos de tabaco utilizando um bloco digestor fechado. A temperatura foi fixada em 180 °C. A resposta (variáveis dependentes) foi avaliada através da concentração de carbono orgânico dissolvido (% DOC), pois esse parâmetro reflete a eficiência da mineralização da matriz orgânica na amostra de tabaco. A concentração de carbono (em % m v⁻¹) foi determinada pelo ICP OES, usando a linha de emissão em 193,027 nm. Neste estudo, utilizou-se uma amostra de charuto como modelo.

O gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento Box-Behnken mostrou que os termos lineares e quadráticos e interações do modelo matemático não eram significativos a um nível de confiança de 95% (Figura 2.1). Isso indica que o tempo de digestão, as concentrações de H₂O₂ e HNO₃ não afetaram estatisticamente a concentração de carbono dissolvido nos domínios experimentais estudados, mostrando qualidade no processo de digestão utilizando o bloco digestor com sistema fechado. Entretanto, a condição que apresentou a menor percentual de DOC pode ser observada no experimento 8 (Tabela 2.1), onde as condições das variáveis otimizadas foram de:

3,0 mol L⁻¹ de HNO₃, 3,5% (m m⁻¹) H₂O₂ e tempo de aquecimento de 120 min. Assim, essas condições experimentais foram escolhidas para a digestão das amostras de tabaco de uma massa de 0,2 g de amostra de produtos de tabaco, com uma temperatura fixada em 180 °C.

Após realização do procedimento de digestão das amostras utilizando os valores ótimos, a acidez residual encontrada foi de 2 mol L⁻¹ a partir de uma titulação ácido-base, usando fenolftaleína 0,1% m v⁻¹, como indicador. As soluções padrões da curva calibração externa foram preparadas com esta concentração ácida.

Tabela. 2.1. Matriz do planejamento Box-Behnken para otimização das condições do procedimento de digestão da amostra de tabaco.

Nº Experimentos	^a HNO ₃ , mol L ⁻¹	^a H ₂ O ₂ , % m m ⁻¹	^a Tempo, min	^b DOC, % m v ⁻¹
1	1,00 (-1)	2 (-1)	90 (0)	0,180
2	1,00 (-1)	5 (+1)	90 (0)	0,466
3	3,00 (+1)	2 (-1)	90 (0)	0,231
4	3,00 (+1)	5 (+1)	90 (0)	0,229
5	1,00 (-1)	3,5 (0)	60 (-1)	0,190
6	1,00 (-1)	3,5 (0)	120 (+1)	0,224
7	3,00 (+1)	3,5 (0)	60 (-1)	0,254
8	3,00 (+1)	3,5 (0)	120 (+1)	0,147
9	2,00 (0)	2 (-1)	60 (-1)	0,212
10	2,00 (0)	2 (-1)	120 (+1)	0,220
11	2,00 (0)	5 (+1)	60 (-1)	0,372
12	2,00 (0)	5 (+1)	120 (+1)	0,224
13	2,00 (0)	3,5 (0)	90 (0)	0,390
14	2,00 (0)	3,5 (0)	90 (0)	0,342
15	2,00 (0)	3,5 (0)	90 (0)	0,313

^aValores codificados em parênteses ^bDOC (carbono orgânico dissolvido).

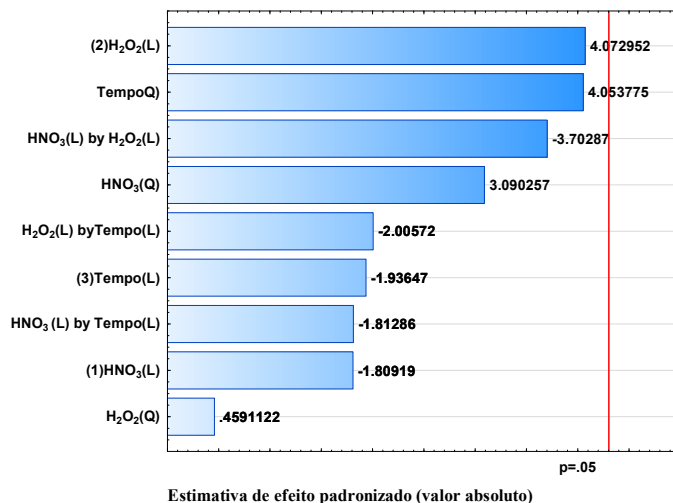


Figura 2.1. Gráfico de Pareto para o planejamento Box–Behnken. Legenda: (L): linear, (Q): Quadrático.

2.3.2. Otimização de parâmetros operacionais do espectrômetro

O planejamento Doehlert foi escolhido para otimizar as condições operacionais do espectrômetro, sendo os fatores vazão do gás de nebulização(VGN) e potência de rádiofrequência (PRF) estabelecidos para proposta dos experimentos. O planejamento proposto foi avaliado usando uma função de resposta múltipla (RM) para determinação simultânea das melhores condições de trabalho em relação a essas variáveis usando intensidade de emissão. Desta forma, a RM foi calculada pela expressão:

$$RM = \sum [I_{\text{analito}} / I_{\text{máximo}}] \quad \text{Equação (1)}$$

em que, I_{analito} é a intensidade de emissão do sinal analítico para cada analito e $I_{\text{máximo}}$ é o valor máximo da intensidade de emissão obtido no conjunto dos experimentos.

A Tabela 2.2 mostra os domínios experimentais de cada parâmetro com valores codificados e reais, a resposta para cada analito individual e as respostas múltiplas. Os resultados obtidos na RM geraram um modelo quadrático com máxima condição para $0,9 \text{ L min}^{-1}$ de vazão do gás do nebulizador e potência de radiofrequência de 1362 W (Figura 2.2). Assim, um reajuste foi feito nos valores crítico de $0,9 \text{ L min}^{-1}$ da vazão do gás do nebulizador e 1350 W da potência de radiofrequência, sem comprometer a máxima resposta de intensidade de emissão, uma vez que estas condições experimentais impedem que o sistema opere sobre condições extremas [10,160].

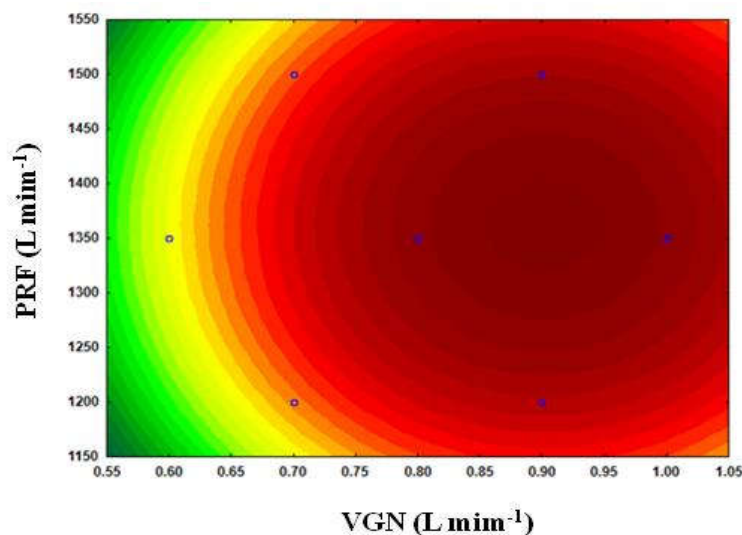


Figura 2.2. Superfície de contorno para resposta múltipla usando o planejamento Doehlert.

Tabela 2.2. Matriz do planejamento Doehlert para otimização das condições operacionais do ICP OES.

Exp.	Variáveis		Intensidades de Emissão / cps													
	^a VGN	^a PRF	Ba	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mg	Mn	Na	P	S	Sr	Zn	^b MR
1	0,7 (-0,5)	1200 (-0,866)	1319,05	3310,06	22,6676	256,303	92603,9	12616,6	22225,9	28,7969	12647	4076,61	1438,79	2008,13	2,89331	1,022
2	0,9 (0,5)	1200 (-0,866)	1113750	1843060	231,948	9754,11	1651850	960224	397516	4685,9	150741	11091	2083,3	1001610	6552,1	10,115
3	0,6 (-1)	1350 (0)	1830,01	4569,78	39,485	383,756	67821,9	10131,9	19018,5	29,5404	10862,7	3737,09	1488,71	2374,89	70,2268	1,075
4	1,0 (1)	1350 (0)	1226020	1880910	235,678	10003,1	1343210	855906	338424	4113,24	135260	11277,3	2198,34	1035770	7068,6	9,904
5	0,8 (0)	1350 (0)	1057200	2155930	240,735	11072,9	2174810	1261710	490175	4939,2	179042	14770,4	2833,88	899072	7183,41	11,607
6	0,8 (0)	1350 (0)	1053720	2188330	202,228	11538,9	2843430	1251610	487360	4900,96	181628	15528,9	2910,52	913178	7592,95	11,862
7	0,8 (0)	1350 (0)	1049510	2201330	252,704	11607,4	2216900	1250860	487960	4997,17	181889	15692,4	2871,1	911168	7684,3	11,872
8	0,8 (0)	1350 (0)	1057450	2187450	244,016	11703,0	2027530	1255370	489748	4900,47	181781	15788,3	2948,91	904957	7704,75	11,799
9	0,8 (0)	1350 (0)	1021730	2137620	221,445	11177,7	1929320	1235160	475773	4666,76	176907	15012,5	2863,68	876506	7417,74	11,340
10	0,7 (-0,5)	1500 (0,866)	1975,02	3952,86	20,8338	389,918	83835	14993,9	22262,6	29,7336	12320,3	4927,83	1767,86	2585,04	49,0172	1,194
11	0,9 (0,5)	1500 (0,866)	1232250	2455700	245,842	13218,9	1782650	1226690	473202	6076,01	159149	15665,9	2917	1108170	8862,08	12,394

^aValores codificados em parênteses; VGN: Vazão do gás de nebulização; PRF: Potência de radio frequência; ^bRM: Resposta Múltipla

2.3.3. Parâmetros de desempenho do método analítico

Depois de estabelecidas as condições ótimas do método proposto, foram determinados os principais parâmetros de desempenho, como limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e exatidão. Os valores de LD e LQ calculados considerando a concentração equivalente em radiação de fundo (BEC), de acordo com as equações do item 1.3.3.1, e ajustados para massa de amostra e fator de diluição empregado estão resumidos na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Valores de LD e LQ (em massa seca) obtidos para determinação dos produtos de tabaco por ICP OES.

Elementos	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al	1,9	6,2
As	3,6	12
Ba	0,03	0,09
Ca	3,8	13
Cd	0,06	0,2
Co	0,3	0,9
Cu	0,08	0,3
Fe	1,8	6,0
K	25	84
Mg	12	39
Mn	0,04	0,13
Na	35	116
Ni	0,7	2,3
P	11	36
S	13	44
Sr	0,8	2,7
Ti	0,03	0,09
V	0,06	0,21
Zn	0,4	1,3

Uma comparação dos LDs obtidos neste trabalho para os elementos químicos com outros métodos desenvolvidos da literatura empregando a técnica de ICP OES encontra-se na Tabela 2.4. Como se pode observar, os LDs ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidos, para a

maioria dos elementos químicos, usando o método analítico desenvolvido foram inferiores do que os encontrados na literatura. Isto indica uma vantagem deste trabalho para estimar a concentração de 19 elementos químicos em amostras de produtos de tabaco.

A exatidão do método analítico foi avaliada pela análise de três materiais de referência certificados: folhas de macieira (NIST 1515), folhas de tomateiro (Agro C1003a) e folhas de tabaco orientais (CTA-OTL-1). Os resultados obtidos para os CRM preparadas pelo método analítico proposto apresentaram uma boa concordância com os valores certificados.

Considerando todas as amostras analisadas, os percentuais de concordância entre os valores encontrados e certificados estiveram entre $91 \pm 4\%$ (V) e $117 \pm 4\%$ (Sr), com erros menores que $\pm 20\%$ (Tabela 2.5). Isto indica que o método analítico proposto não foi afetado pelos efeitos de matriz, fornecendo uma boa determinação multielementar e resultados quantitativos com boa exatidão, usando o procedimento de digestão com HNO_3 em bloco digestor com sistema fechado usando ácido nítrico diluído [161].

Tabela 2.4. Valores de LDs para determinação multielementar em amostras de tabaco por ICP OES em comparação com literatura.

Limites de detecções (LD = $\mu\text{g g}^{-1}$)			
Elementos	Neste Trabalho	Referência [162]	Referência [16]
As	3,6	0,781	n.i.
Ba	0,03	1,25	0,73
Cd	0,06	0,281	n.i.
Co	0,3	0,188	n.i.
Cu	0,08	0,594	1,17
Fe	1,8	1,840	0,71
Mn	0,04	0,250	0,75
Ni	0,7	0,250	n.i.
Sr	0,8	0,031	1,25
Ti	0,03	0,150	n.i.
V	0,06	0,420	n.i.
Zn	0,4	0,460	n.i.

n.i. = não informado

Grupo de Pesquisa para Estudo em Química Analítica e Ambiental (GPEQA²)

Tabela 2.5. Determinação da composição inorgânica dos CRMs, folhas de tabaco oriental (CTA-OTL-1), folha de tomate Agro C1003a e folha de maçã (NIST 1515) por ICP OES, após digestão das amostras em bloco digestor com sistema fechado.

Elementos	SRM CTA- OTL			CRM Agro C1003a			NIST1515		
	Valor	Valor	Concordância (%)	Valor	Valor	Concordância (%)	Valor	Valor	Concordância (%)
	Certificado	Encontrado		Certificado	Encontrado		Certificado	Encontrado	
Al / mg kg ⁻¹	1740±290	1758±240	101 ± 14	1990±520	1973 ± 2	99 ± 2	286±9	315±48	110 ± 15
As / mg kg ⁻¹	0,539±0,060	<12	n.d.	19,0±2,8	21,3 ±1,4	112 ± 7	0,038±0,007	<12	n.d.
Ba / mg kg ⁻¹	84,2±11,5	82,0±2,5	97 ± 3	n.d.	n.d.	n.d.	49±2	47±1,4	96 ± 4
Ca / (%)	3,17±0,12	3,60±0,09	113±3	2,74±0,44	2,87 ± 0,10	105 ± 4	1,526±0,015	1,623±0,023	106 ± 2
Cd / mg kg ⁻¹	1,12±0,12	1,20±0,14	107±12	26,6±2,1	30,0 ± 0,3	113 ±1	0,014	0,19	n.d.
Co / mg kg ⁻¹	0,879±0,039	1,00 ±0,14	114 ± 16	0,33±0,14	<0,9	n.d.	0,09	<0,8	n.d.
Cu / mg kg ⁻¹	14,1±0,5	13,3 ±0,4	94 ±3	1130±140	1037±10	92 ± 1	5,64±0,24	5,72±0,17	101 ± 4
Fe / mg kg ⁻¹	989	1150±36	116 ±4	1120±190	1288±16	115 ± 3	83 ± 5	76,6±8,9	92 ± 11
K / (%)	1,56±0,05	1,68±0,02	108±2	4,33±0,38	4,07± 0,07	94 ± 2	1,61±0,020	1,58± 0,04	98 ± 3
Mg / mg kg ⁻¹	4470±210	4914±153	110 ±2	4110±360	4665±62	113 ± 2	*0,271±0,008	0,288±0,005	106 ±20
Mn / mg kg ⁻¹	412±14	434±14	105 ±4	470±69	453±10	96 ± 2	54±3	50,3±1,3	93 ± 2
Na / mg kg ⁻¹	345	394 ± 98	114±28	2710±840	3065± 47	113± 3	24,4±1,20	<116	n.d.
Ni / mg kg ⁻¹	6,32±0,65	6,75±0,87	107±16	3,16±0,87	3,29±1,30	104±21	0,91±0,12	<2,3	n.d.
S / (%)	0,732±0,081	0,738±0,090	101±12	n.i.	n.d.	n.d.	1800	<44	n.d.
P / mg kg ⁻¹	2892±134	2922±109	101±4	4370±740	5079±215	116 ± 3	1590±110	<36	n.d.
Sr / mg kg ⁻¹	201±20	236 ±8	117 ±4	154±49	155± 3	101 ± 2	25±2	23 ± 0,3	92 ± 1
V / mg kg ⁻¹	3,08±0,42	2,80±0,09	91 ±4	n.d.	n.d.	n.d.	0,26±0,03	0,278 ± 0,02	107 ± 8
Zn / mg kg ⁻¹	49,9 ± 2,4	54 ±3	108 ±6	37,5±5,0	41,6 ± 0,5	111 ±1	12,5±0,3	<1,3	<1,3

^a Resultados expressos (media ± intervalo de confiança para nível de 95%, n = 3); n.d. = não determinado; n.i. = não informado; *valor expresso em %.

2.3.4. Aplicação do método proposto

O método analítico proposto foi aplicado para a determinação multielementar simultânea de 19 constituintes inorgânicos (seis macroelementos e treze microelementos) em 22 amostras de várias marcas de três diferentes tipos de produtos de tabaco (charuto, fumo desfiado e fumo de corda) comercializados na cidade de Salvador, Nordeste, Estado da Bahia, Brasil. As concentrações médias de cada elemento e desvio padrão juntamente com a faixa de concentração mínima e máxima em todos os tipos de produtos selecionados encontram-se nas Tabelas 2.6 e 2.7.

As concentrações dos macroelementos, expressas em média, faixa mínima e máxima de concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$), respectivamente, variaram da seguinte forma para as amostras de charuto: Ca (27563 e 24656-31656), K (50316 e 35564-65563), Mg (11552 e 10841–13066), Na (634 e 421–893), P (4781 e 2316–7249) e S (17358 e 5191 a 30140). Amostras de fumo desfiado, Ca (21984 e 17530 a 27198), K (21807 e 12356 a 29983), Mg (6420 e 4410–8219), Na (428 e 158–805), P (1500 e 1080–2671), S (1658 e 1030-3440). Amostras de fumo de corda, Ca (21344 e 13829–27864), K (17600 e 7379–29354), Mg (6716 e 4850–8272), Na (906,5 e 106–2090), P (1085 e 726–1289) e S (1488 e 1025-2649).

De acordo com os resultados, as amostras de charutos apresentam as maiores concentrações de macroelementos, sendo K o elemento químico que apresentou a maior concentração. No entanto, o fumo de corda relevou a maior concentração de Na em relação às amostras de charutos. O cálcio foi o macroelemento que teve a segunda maior

concentração. As concentrações médias desse macroelemento foram semelhantes para as amostras de fumo desfiado e de corda.

Entre os microelementos, o alumínio foi o metal presente na maior concentração na composição dos produtos do tabaco. As concentrações, expressas em média, faixa mínima e máxima (em $\mu\text{g g}^{-1}$), respectivamente, variando entre 1354 e 1028-1979 para charutos; 1562,6 e 398-4552 para fumo desfiado e 2568 e 1263-5272 para fumo de corda. O teor médio de Al foi maior no fumo de corda, sendo o dobro do encontrado nas amostras de charutos. Ferro foi o microelemento que mostrou a segunda maior concentração. A média, mínima e as concentrações máximas de Fe (em $\mu\text{g g}^{-1}$) estiveram entre 883 e 415-1719 para charuto, 826,2 e 257-2048 no fumo desfiado, 1054 e 391-1813 para fumo de corda. O conteúdo de Fe é quase o mesmo em todos os tipos de produtos e semelhantes aos relatados no tabaco fumado no Paquistão ($981,18 \mu\text{g g}^{-1}$) [15] e mercados indianos ($927 \mu\text{g g}^{-1}$) [6].

Cádmio e Ni, elementos potencialmente tóxicos e declarados cancerígenos humanos pela International Agência de Pesquisa do Câncer [89], também foram encontrados em todos os produtos de tabaco. Concentração média de Cd, mínima e máxima ($\mu\text{g g}^{-1}$) foram de 0,96 e 0,26-1,66 para charuto, 0,49 e $<0,2$ -1,01 para fumo desfiado e 0,292 e $<0,2$ -0,69 para fumo de corda. A concentração média de Cd ($0,58 \pm 0,34$) nos produtos de tabaco foi menor do que a relatada nas folhas de tabaco ($0,75 \pm 0,61$), coletados no Brasil entre 2001 e 2003 [14].

No entanto, a concentração de Cd foi semelhante aos encontrados nos produtos de tabaco indianos [6] e em charutos pequenos comercializados nos Estados Unidos da América [115]. A concentração média do Ni foi quase à mesma nos produtos defumo

desfiado e fumo de corda ($2,3$ e $<2,3-4,26 \mu\text{g g}^{-1}$ no fumo desfiado e $2,3$ e $<2,3-5,93 \mu\text{g g}^{-1}$ em fumo de corda). No entanto, o charuto apresentou a maior concentração de Ni ($8,18$ e $<2,3-27,19 \mu\text{g g}^{-1}$) quando comparada aos outros produtos do tabaco. A concentração média de Ni nos charutos foi próxima as relatadas nos produtos comercializados em mercados indianos ($8,86 \pm 2,46$) [6].

O bário, também um elemento potencialmente tóxico que pode causar lesões dérmicas, apresentou média de concentração e faixas mínimas e máximas de 108 e $68,2-223 \mu\text{g g}^{-1}$, 116 e $21-174 \mu\text{g g}^{-1}$ e $111,5$ e $56-143 \mu\text{g g}^{-1}$ para charuto, fumo desfiado e fumo de corda, respectivamente.

Cobalto, Cu, Mn e Zn são elementos essenciais para a sobrevivência humana, uma vez que, são metais traço que desempenham muitas funções biológicas. No entanto, um aumento de suas concentrações e acúmulo intracelular implica em efeitos tóxicos. As concentrações desses microelementos, expressas em média, faixa mínima e máxima (em $\mu\text{g g}^{-1}$), variaram da seguinte forma: para charutos, Co ($0,99$ e $<0,8-6,59$), Cu ($16,35$ e $5,30-50,8$), Mn (215 e $114-351$) e Zn ($198,4$ e $103-298$); para fumo desfiado, Co ($0,69$ e $<0,8-1,93$), Cu ($14,4$ e $1,08-29,2$), Mn ($345,5$ e $110-818$) e Zn ($42,6$ e $8,0-67$); e para amostras de fumo de corda, Co ($1,25$ e $<0,8-4,19$), Cu ($33,6$ e $1,74-130$), Mn ($657,2$ e $63,6-3219$) e Zn (71 e $48,9-128$).

A concentração de V, expressa em média, mínimo e máximo (em $\mu\text{g g}^{-1}$) variou da seguinte forma: $1,47$ e $0,46-3,8$ para o charuto e $2,30$ e $0,31-4,4$ para as amostras de fumo de corda. No entanto, o conteúdo de V foi encontrado em apenas duas amostras de fumo desfiado ($0,22 \pm 0,02$ e $0,82 \pm 0,10$).

Em todas as amostras de produtos de tabaco, as concentrações de As estavam abaixo do LQ ($<12 \mu\text{g g}^{-1}$) estabelecido para o método analítico. O titânio também foi encontrado na composição química dos produtos de tabaco. Os níveis foram semelhantes nas amostras de fumo desfiado e de corda, com valores de 4,56 (2,00-15) e 3,71 (1,28-10). A concentração média de Ti nos charutos foi cerca de 11 a 14 vezes maior que a encontrada nas amostras de fumo desfiado e de corda, respectivamente.

Em resumo, a ordem decrescente do conteúdo de constituintes inorgânicos foi Al> Fe> Mn> Sr> Zn> Ba> Ti> Cu> Ni> V> Co> Cd para charutos; e Al> Fe> Mn> Sr> Ba> Zn> Cu> Ti> Ni> Co> Cd para fumo desfiado e de corda.

Entre os tipos de produto de tabaco estudados, o charuto foi o mais enriquecido em metais. Isto pode ser devido ao fato dos charutos serem produzidos por empresas destinadas a exportação do produto, o que provavelmente devem utilizar maior quantidade de fertilizantes para aumentar a qualidade e produtividade. Além disso, o maior conteúdo de cádmio presente nas amostras de charuto pode vir a confirmar esta hipótese, pois é conhecido que o cádmio está presente como contaminante nos produtos de fertilizantes.

Em trabalhos encontrados na literatura, pesquisadores quantificaram o conteúdo de metais em produtos do tabaco fumado, entretanto a maioria foi em cigarros. As informações da literatura científica estão limitados para produtos de charuto e ao que se sabe, não existe nenhum relatório sobre o conteúdo de metais em fumo desfiado e de corda.

Na Tabela 2.8 encontram-se os valores médios dos elementos encontrados neste trabalho e as informações da literatura científica. Comparando com as

informações da literatura foi possível verificar que poucos trabalhos foram encontrados para macronutrientes, e para os elementos P, S e V não foram encontrados dados. Assim, o presente trabalho é a mais recente fonte de informação com referência ao teor de macro e microelementos nos produtos tabaco fumados, especialmente formulações de fumo desfiado e de corda.

2.3.5 Análise elementar de nitrogênio

Sabendo-se que o nitrogênio está relacionado com a presença de nicotina e a qualidade dos produtos do tabaco. A sua concentração, também foi determinada nas amostras usando a análise elementar [55].

A concentração de nitrogênio, expressa em porcentagem (%), está apresentada na Tabela 2.7 e em forma de gráfico na Figura 2.3. O conteúdo médio nas amostras foram de 3,77; 3,15 e 3,8% para charuto, fumo desfiado e fumo de corda, respectivamente. Estes valores estão entre os normalmente encontrados na matéria seca de plantas herbáceas, 1,5 a 4,5% [48].

Analisando a Figura 2.3, observou-se que o maior percentual de nitrogênio estava presente em uma amostra de fumo de corda (5,09%). Entretanto, este valor é inferior a 7,9% que, foi o maior valor encontrado na literatura para amostra de Dokha, um tipo de tabaco de origem Árabe comercializado nos Emirados Árabes Unidos (UEA) [163]. Contudo pode-se intuir que a quantidade de nicotina está presente em menor quantidade nas amostras de tabaco comercializadas na Bahia.

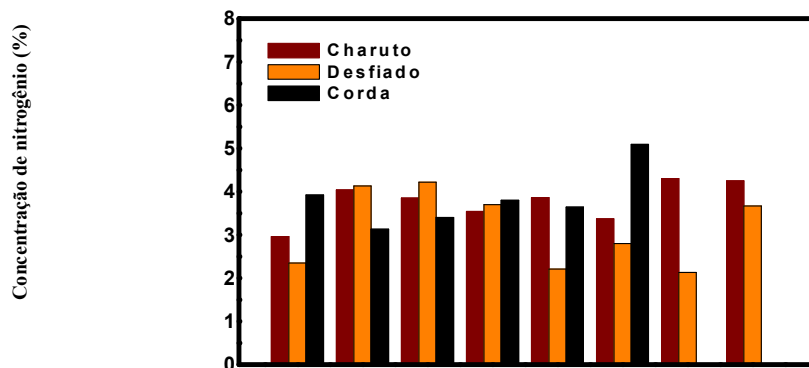


Figura 2.3. Concentração de nitrogênio determinados nas amostras de charuto, fumo de desfiado e de corda (n=22)

Tabela 2.6. Concentração (em mg kg⁻¹, massa seca, n= 3) de Al, Ba, Cd, Co,Cu,Fe, Mn, Mo, Ni, Sr, V e Zn em produtos de tabaco por ICP OES.

Amostras	Al	Ba	Cd	Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Sr	Ti	V	Zn
Charuto												
1	1979 ± 56	119 ± 2	1,19 ± 0,02	6,59 ± 0,11	6,68 ± 0,07	1719 ± 36	315 ± 5	10,14±1,12	176 ± 2	84,0 ± 8,6	3,80 ± 0,10	189 ± 3
2	1246 ± 35	79,5 ± 2,0	0,60 ± 0,05	<0,8	10,1 ± 0,5	640 ± 18	114 ± 4	4,92 ± 0,96	227 ± 8	50,0 ± 3,2	1,09 ± 0,06	164 ± 4
3	1028 ± 43	75,0 ± 2,9	0,62 ± 0,02	<0,8	16,8±0,08	582 ± 13	196 ± 2	6,11 ± 1,43	186 ± 1	43,6 ± 0,4	0,91 ± 0,05	298 ± 2
4	1349 ± 22	68,2 ± 17,4	1,29 ± 0,02	<0,8	50,8±0,88	1122 ± 12	128 ± 1	8,82 ± 0,95	207 ± 10	47,0 ± 5,7	1,25 ± 0,02	243 ± 5
5	1659 ± 47	111 ± 3	1,16 ± 0,02	<0,8	8,91±0,33	832 ± 24	351 ± 10	8,24 ± 0,18	205 ± 7	37,5 ± 1,7	1,50 ± 0,08	258 ± 6
6	1247 ± 76	223 ± 7	1,66 ± 0,05	1,32 ± 0,02	7,19±0,07	1231 ± 17	334 ± 5	27,19±2,19	168 ± 9	64,7 ± 3,0	2,19 ± 0,11	177 ± 2
7	1158 ± 19	72,0 ± 0,9	0,90 ± 0,02	<0,8	25,0±0,30	415 ± 9	154 ± 1	<2,3	218±4	31,0 ± 1,30	0,46 ± 0,03	155 ± 4
8	1167 ± 55	116 ± 4,0	0,26 ± 0,02	<0,8	5,30±0,30	520 ± 11	125 ± 3	<2,3	228±2	56,0 ± 3,9	0,54 ± 0,005	103 ± 7
Média	1354	108	0,96	0,99	16,35	883	215	8,18	202	51,72	1,47	198,4
Mínimo	1028	68,2	0,26	<0,8	5,30	415	114	<2,3	168	31	0,46	103
Máximo	1979	223	1,66	6,59	50,8	1719	351	27,19	228	84	3,80	298
Fumo Desfiado												
1	1380 ± 35	174 ± 1	1,01 ± 0,10	<0,8	5,00 ± 0,21	484 ± 9	818 ± 11,6	<2,3	105 ± 2	3,00 ± 0,22	<0,2	34,2 ± 1,07
2	1734 ± 51	72 ± 1	0,36 ± 0,03	<0,8	15,3 ± 0,20	677 ± 8	298 ± 4,71	4,00 ± 0,93	165 ± 1	2,04 ± 0,06	<0,2	55,2 ± 1,20
3	4552 ± 23	102 ± 1	0,38 ± 0,01	1,93 ± 0,40	29,2 ± 0,90	2048 ± 39	351 ± 2,68	4,26 ± 0,50	155 ± 2	4,00 ± 0,26	<0,2	67,0 ± 0,46
4	1755 ± 39	129 ± 1	0,44 ± 0,04	1,86 ± 0,03	28,1 ± 0,42	1503 ± 67	392 ± 4,51	4,17 ± 0,52	162 ± 2	4,45 ± 0,12	<0,2	62,4 ± 1,24
5	458 ± 70	160 ± 1	0,73 ± 0,11	<0,8	4,10 ± 0,11	386 ± 8	143 ± 1,56	<2,3	97,3 ± 1,6	2,00 ± 0,11	<0,2	14,4 ± 1,14
6	857 ± 26	154 ± 3	0,62 ± 0,01	0,95 ± 0,26	16,0 ± 1,63	634 ± 18	254 ± 3,21	<2,3	120 ± 2	3,00 ± 0,18	<0,2	35,4 ± 1,31
7	398 ± 11	21,0 ± 0,7	<0,2	<0,8	1,08 ± 0,12	257 ± 6	110 ± 3,6	<2,3	33,0 ± 0,9	3,00 ± 0,10	0,22 ± 0,02	8,0 ± 0,1
8	1367 ± 70	115,0±5,4	0,37 ± 0,04	0,77± 0,03	16,7 ± 0,60	621 ± 16	398 ± 16	3,05 ± 0,71	169 ± 8	15,0 ± 3,00	0,82 ± 0,10	64 ± 1,7
Média	1562,6	116	0,49	0,8	14,4	826,2	345,5	2,3	126	4,56	0,52	42,6
Mínimo	398	21	<0,2	<0,8	1,08	257	110	<2,3	33	2,00	<0,2	8,0
Máximo	4552	174	1,01	1,93	29,2	2048	818	4,26	169	15,0	0,82	67
Fumo de Corda												
1	2190 ± 119	117 ± 1	0,41 ± 0,03	2,31 ± 0,31	130 ± 0,74	1284 ± 18	140 ± 1	2,45 ± 0,20	77,54 ± 0,86	2,23±0,13	3,70±0,02	78,2 ± 1,5
2	5272 ± 120	115 ± 1	<0,2	<0,8	4,13 ± 0,21	1813 ± 42	63,6 ± 1,2	2,3 ± 0,31	63,1 ± 2,2	4,34±0,49	4,40±0,10	53,0 ± 1,2
3	2378 ± 360	143 ± 2	0,30 ± 0,03	4,19 ± 0,21	3,01 ± 0,14	918 ± 32	139 ± 2	<2,3	153 ± 2	1,28±0,12	2,30±0,10	51,6 ± 0,9
4	1470 ± 870	110 ± 4	0,69 ± 0,03	0,99 ± 0,11	59,0 ± 1,07	845 ± 14	3219 ± 72	5,93 ± 1,03	260 ± 8	2,00±0,06	1,10±0,10	128 ± 2
5	2833 ± 126	128 ± 1	0,35 ± 0,10	<0,8	3,90 ± 0,11	1073 ± 28	149 ± 1	<2,3	187 ± 65	2,41±0,20	2,00±0,10	48,9 ± 1,5
6	1263±114	56,0 ± 2,8	<0,2	<0,8	1,74 ± 0,31	391 ± 40	233 ± 1	<2,3	84,0±1,8	10 ± 4,2	0,31 ± 0,03	65,0 ± 4,3
Média	2568	111,5	0,292	1,25	33,6	1054	657,2	2,3	137,4	3,71	2,30	71
Mínimo	1263	56	<0,2	<0,8	1,74	391	63,6	<2,3	63,1	1,28	0,31	48,9
Máximo	5272	143	0,69	4,19	130	1813	3219	5,93	260	10	4,4	128

Resultados expressos (media ± intervalo de confiança para nível de 95%)

Tabela 2.7. Concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$, massa seca, n=3) dos macroelementos Ca, K, Mg, Na, P, S e N em produtos de tabaco por ICP OES.

Amostra	Ca	K	Mg	Na	P	S	N*
Charuto							
1	31656 ± 263	56494 ± 1699	10926 ± 166	893 ± 26	3889 ± 382	10072 ± 403	2,96
2	25852 ± 790	43301 ± 1300	13066 ± 324	573 ± 16	5916 ± 194	15992 ± 615	4,04
3	29693 ± 190	57929 ± 1141	12178 ± 25	620 ± 23	7249 ± 143	24054 ± 645	3,85
4	24656 ± 255	44740 ± 568	11028 ± 229	421 ± 10	5104 ± 152	26262 ± 1037	3,54
5	28566 ± 697	58883 ± 2609	10881 ± 233	647 ± 28	6968 ± 147	30140 ± 899	3,86
6	29019 ± 444	65563 ± 2679	10841 ± 236	867 ± 31	4353 ± 138	20939 ± 1574	3,37
7	25572 ± 66,0	40053 ± 1706	11178 ± 166	546 ± 14	2453 ± 22	6210 ± 81	4,30
8	25490 ± 499	35564 ± 1275	12322 ± 36	502 ± 9,1	2316 ± 23	5191 ± 111	4,25
Média	27563	50316	11552	634	4781	17357,5	3,77
Mínimo	24656	35564	10841	421	2316	5191	2,96
Máximo	31656	65563	13066	893	7249	30140	4,30
Fumo Desfiado							
1	21859 ± 700	18368 ± 876	5347 ± 118	487 ± 120	1080 ± 112	1142 ± 11	2,35
2	20372 ± 162	18722 ± 170	7080 ± 223	451 ± 65	1190 ± 298	1301 ± 32	4,13
3	27198 ± 334	23960 ± 172	7341 ± 94	247 ± 44	1080 ± 153	1463 ± 25	4,22
4	21733 ± 499	23346 ± 989	6687 ± 178	356 ± 118	1370 ± 141	1347 ± 11	3,70
5	20325 ± 68	23691 ± 476	4410 ± 30	503 ± 47	1335 ± 2,99	1299 ± 3	2,21
6	22260 ± 577	24029 ± 762	6478 ± 145	417 ± 26	1310 ± 63,8	1030 ± 12	2,80
7	17530 ± 488	12356 ± 285	5795 ± 132	158 ± 7,0	1967 ± 59	2240 ± 77	2,13
8	24599 ± 946	29983 ± 2890	8219 ± 643	805 ± 43	2671 ± 249	3440 ± 248	3,67
Média	21984,5	21807	6420	428	1500	1658	3,15
Mínimo	17530	12356	4410	158	1080	1030	2,13
Máximo	27198	29983	8219	805	2671	3440	4,22
Fumo de Corda							
1	27864 ± 275	7379 ± 57	7197 ± 113	487 ± 160	1268 ± 78	1685 ± 30	3,92
2	24209 ± 676	22150 ± 642	6325 ± 172	106 ± 77	1289 ± 103	1155 ± 23	3,13
3	18940 ± 289	13918 ± 113	8272 ± 60	1732 ± 297	742 ± 24	1025 ± 45	3,40
4	25263 ± 297	29354 ± 941	5711 ± 66	828 ± 90	1269 ± 160	1338 ± 52	3,80
5	17959 ± 259	16664 ± 221	7940 ± 52	2090 ± 32	726 ± 68	1074 ± 10	3,64
6	13829 ± 446	16132 ± 47	4850 ± 63	196 ± 8,0	1218 ± 37	2649 ± 179	5,09
Média	21344	17600	6716	906,5	1085	1488	3,83
Mínimo	13829	7379	4850	106	726	1025	3,13
Máximo	27864	29354	8272	2090	1289	2649	5,09

Resultados expressos (média ± intervalo de confiança para nível de 95%); *valor expresso em %. * Determinado por equipamento de combustão LECO.

Tabela 2.8. Concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$, massa seca) de constituintes inorgânicos em produtos de tabaco reportados na literatura usando diferentes técnicas espectroanalíticas.

País	Al	Ba	Cd	Ca	Co	Cu	Fe	Mg	Mn	Na	K	Ni	Sr	Ti	Zn	Ref.
Paquitão	716	n.a	0,72	n.a	0,75	21,1	981,18	n.a	124,04	n.a	n.a	3,13	n.a	n.a	34,27	[15]
Paquistão	n.a	n.a	0,501	n.a	3,344	7,889	n.a	n.a	45,03	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	14,34	[164]
Turco ¹	n.a	n.a	1,50	n.a	n.a	48,8	n.a	n.a	47,4	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	29,0	[165]
Brasil ¹	n.a	n.a	0,75	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[14]
Índia	n.a	n.a	0,71	n.a	n.a	n.a	927	n.a	n.a	n.a	n.a	8,86	n.a	n.a	35	[6]
Índia	n.a	n.a	0,49	n.a	n.a	17	963	n.a	n.a	n.a	n.a	7,10	n.a	n.a	22	[6]
Tunísia	443	100,5	<0,969	20892,5	<0,625	14,5	414,75	5033	131,5	395	26450	1,5	129,5	20,5	30,25	[162]
UEA	n.a	n.a	0,09-0,13	n.a	5,00-8,00	n.a	306-565	n.a	454-505	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[163]
Brasil	n.a	n.a	0,65	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	1,26	n.a	n.a	n.a	[138]
Paquistão	n.a	n.a	0,501	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	2,076	n.a	n.a	n.a	[134]
China	n.a	n.a	0,52-1,76	n.a	n.a	4,75-15,25	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	0,57-2,16	n.a	n.a	n.a	[166]
Brasil	n.a	70-120	n.a	25000-30000	n.a	n.a	n.a	n.a	120-250	n.a	30000-40000	n.a	n.a	n.a	n.a	[167]
EUA	n.a	n.a	1,0-1,7	n.a	0,44-1,11	n.a	n.a	n.a	131-245	n.a	n.a	2,1-3,9	n.a	n.a	n.a	[168]
EUA	n.a	n.a	1,19	n.a	0,81	n.a	n.a	n.a	187,4	n.a	n.a	2,56	n.a	n.a	n.a	[115]
Espanha	428	n.a	0,810	n.a	0,558	n.a	n.a	n.a	112,026	n.a	n.a	2,238	82,206	n.a	n.a	[169]
Espanha	667,2	123	0,79	n.a	0,84	n.a	n.a	n.a	148,4	n.a	n.a	2,10	n.a	n.a	25,2	[114]
Brasil/Charuto	1354,1	108	0,96	27563	0,99	16,35	882,6	11552	214,6	634	50316	8,18	202	51,72	198,4	Neste Trabalho
Brasil/Desfiado	1562,6	116	0,49	21984,5	0,8	14,4	826,2	6420	345,5	428	21807	2,3	126	4,56	42,6	Neste Trabalho
Brasil/Corda	2568	111,5	0,292	21344	1,25	33,6	1054	6716	657,2	906,5	17600	2,3	137,4	3,71	71	Neste Trabalho

n.a = não informado. ¹Folha de tabaco

2.3.6. Análise Multivariada de dados

Com objetivo de avaliar a tendência e a similaridade das amostras os produtos do tabaco foram aplicados a PCA e a HCA, respectivamente. Considerando como variáveis a concentração média dos elementos químicos de cada amostra. A matriz de dados foi construída usando 18 variáveis (Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, S, Sr, Ti, V, Zn) como colunas e as 22 amostras de produtos de tabaco como linhas (18×22). Os dados foram pré-processados, através do escalonamento usando programa computacional do Statistica, versão 6.0.

A Figura 2.4 mostra os gráficos dos valores de peso (2.4-a e 2.4-b) e Figure 2.5 escores (2.5-c e 2.5-d) para PCA. As três primeiras componentes principais (PC) representaram 65,02% da variação total dos dados; ou seja, as informações relevantes podem ser explicadas usando as três primeiras PCs.

A primeira componente principal (PC1) representou 37,99% da variabilidade dos dados. As variáveis com os maiores valores de pesos foram as concentrações de Ca, Cd, K, Mg, Ni, P, S, Sr, Ti e Zn. Essas variáveis apresentaram valores de pesos positivos, indicando correlação nas concentrações desses elementos químicos nas amostras. A PC2 explicou 16,28% da variância total dos dados e teve valores de pesos negativos nas concentrações de Al, Fe e V, o que influenciou as amostras dos produtos de tabaco. A PC3 explicou 10,73% da variância total, tendo como valores de pesos negativos as concentrações de Ba, Cd e Co, que influenciaram as amostra de fumo desfiado (1, 5 e 6) e fumo de corda (3, 4 e 5).

As Figuras 2.5-c e 2.5-d mostram os gráficos de escore para a PC2 versus PC1 e PC3 versus PC1, respectivamente. Observou-se a separação das amostras de acordo com o tipo de produto de tabaco na PC1, com eixo de carga positiva. O primeiro grupo consistiu nas oito amostras de charuto e o segundo grupo foi composto das 14 amostras do somatório de fumo desfiado e de corda. O fato das amostras de charuto estarem no mesmo grupo deve-se à presença em sua composição de maior concentração de Ca, Cd, K, Mg, Ni, P, S, Sr, Ti e Zn, que influenciaram o PC1. As amostras de tabaco de fumo desfiado e de corda compuseram o grupo 2, sem formação de subgrupos, provavelmente porque as amostras não foram processadas, como mostrado no gráfico de PC2 versus PC1 (Figura.2.5-c) e PC3 versus PC1 (Figura. 2.5-d).

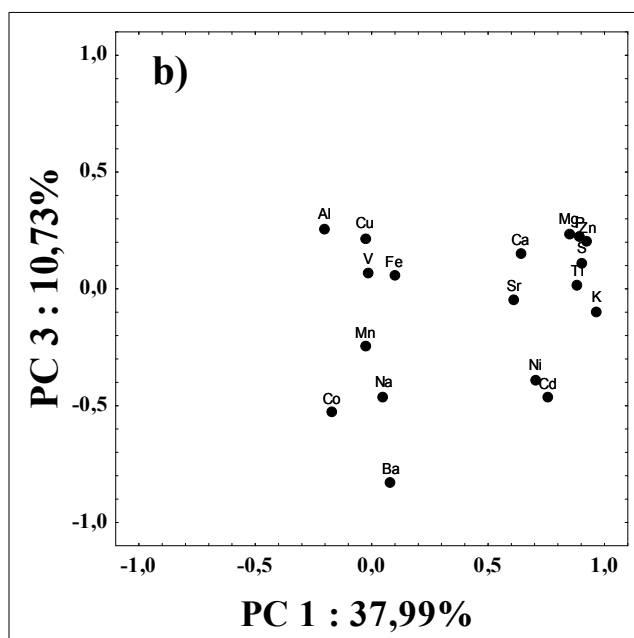
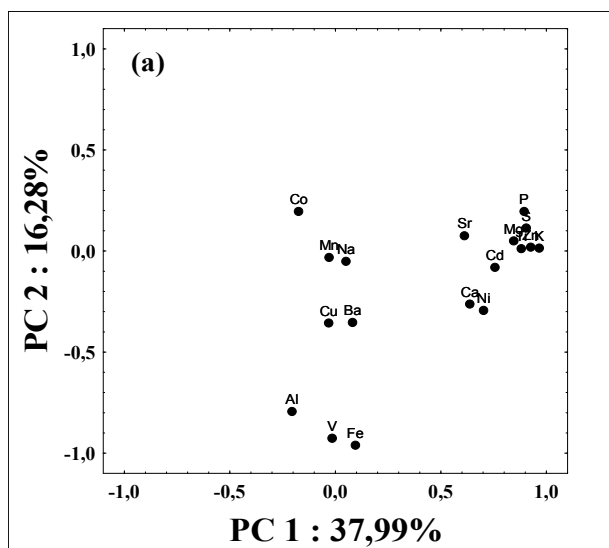


Figura 2.4. Análise de componente principal para amostras de produtos de tabaco: (a) gráfico de peso para PC2 versus PC1 (b) gráfico de peso para PC3 versus PC1

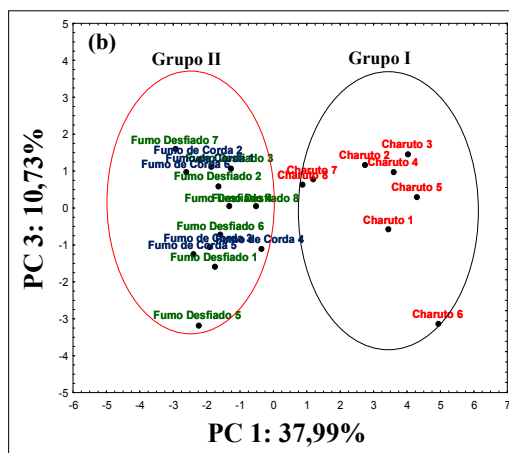
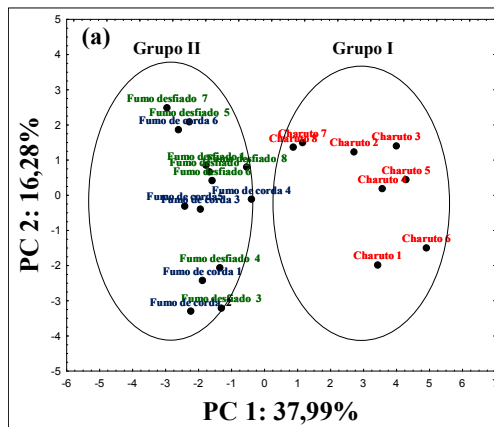


Figura 2.5. Análise de componente principal para amostras de produtos de tabaco: (a) gráfico de escore para PC2 versus PC1 e (b) gráfico de escore para PC3 versus PC1.

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) também foi aplicada as concentrações de constituintes inorgânicos com o objetivo de avaliar a similaridade das amostras de produto do tabaco. Os dados também foram autoescalados. O cálculo da distância euclidiana foi utilizado na medida interponto entre as amostras, e o método de Ward's foi utilizado para ligá-las.

Como pode ser visto na Figura. 2.6, o dendrograma mostra a formação de dois grupos, como foi observado na PCA. O primeiro cluster foi composto apenas por amostras de charuto e o segundo por amostras de fumo desfiado e corda. Isso pode ser atribuído à origem geográfica, tipo de solo, tratamento das folhas de tabaco, além de uso de fertilizantes baseados em metais para aumentar a produção das plantas de tabaco, entre as amostras agrupadas localizadas na base do dendrograma.

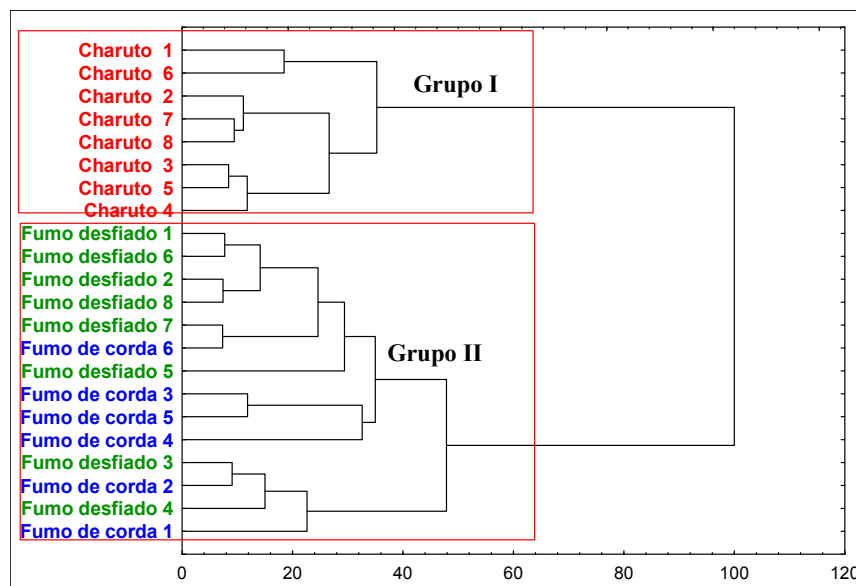


Figura 2.6. Dendrograma: Calculado da distância Euclideana e o método de ligação Ward's para avaliar similaridade entre as amostras de produtos de tabaco.

2.4. Considerações Finais

A otimização empregando os planejamentos Box-Behnken e Doehlert foi eficiente para determinar as melhores condições do processo de digestão das amostras usando o bloco digestor com sistema fechado, e das condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. O bloco de digestão com sistema fechado foi uma alternativa vantajosa de baixo custo, comparada à digestão assistida por micro-ondas, para o tratamento de amostras de tabaco, e permitiu uma digestão com baixa concentração de carbono orgânico dissolvido.

Uma boa precisão e exatidão do método analítico indicou que as condições experimentais obtidas foram satisfatórias para a determinação de 19 elementos (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, S, Sr, Ti, V, Zn) em produtos de tabaco por ICP OES. Neste estudo, foram quantificados 18 elementos químicos em amostras de charuto, fumo de desfiado e de corda, através do método analítico otimizado. A concentração de arsênio nas amostras estava abaixo do limite de quantificação do método analítico.

O nitrogênio, também foi determinado nas amostras usando a análise elementar. Os resultados mostraram que as concentrações médias dos macronutrientes foram maiores nas amostras de charuto, com exceção da concentração de Na, que foi maior no fumo de corda. As concentrações de K e N foram superiores em todas as amostras, pois são os nutrientes mais absorvidos pela planta.

Dos microelementos e elementos traço determinados, as amostras de charuto apresentaram em média maior teor de sete metais traço (Zn>Ba>Ti>Ni>Co>Cd) em relação às amostras de fumo desfiado e corda. As amostras de fumo desfiado apresentaram maior concentração de Fe e fumo de corda, as maiores concentrações de Al>Mn>Cu. No entanto, o Cd apresentou as menores concentrações nas amostras, em relação aos outros elementos químicos.

A análise multivariada de dados mostrou ser uma ferramenta quimiométrica útil na identificação de tipos de tabaco a partir de seus conteúdos inorgânicos. O tabaco tipo charuto apresentou padrões diferentes no conteúdo inorgânico em relação ao fumo de corda e desfiado.

Através dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o método analítico desenvolvido tem potencial para ser aplicado na quantificação rotineira de constituintes inorgânicos em produtos de tabaco. Os resultados de outros produtos do tabaco, diferente do cigarro, apresentados neste trabalho podem contribuir para o conjunto de informações existentes na literatura.

CAPÍTULO 3. Otimização de um procedimento de extração assistido por ultrassom para determinação de constituintes inorgânicos em amostras de produtos de tabaco por ICP OES

3.1. Introdução

Nos últimos anos, a crescente preocupação com as consequências do tabagismo para saúde e o meio ambiente, tem levado os cientistas do mundo inteiro a desenvolver métodos para determinar constituintes químicos presentes em produtos do tabaco. Além disso, na indústria do tabaco necessita de métodos analíticos validados, simples e rápidos para a análise de rotina de seus produtos, a fim de monitorar a qualidade dos mesmos. Neste sentido, a etapa de preparo de amostras tem sido crucial no desenvolvimento desses métodos analíticos que serão aplicados.

Os procedimentos para preparo de amostras usando sistemas abertos e fechados apresentam como principal desvantagem, o uso de alta quantidade de reagentes que podem aumentar o risco de contaminação da amostra, afetando elementos químicos que estão em baixas concentrações, e perdas através de volatilização [170]. Desta forma, neste trabalho, um procedimento simples e de baixo custo, com um menor tempo de preparação da amostra, em relação ao bloco digestor e a digestão assistida por micro-ondas foi desenvolvido.

O procedimento desenvolvido permitiu a determinação de Ba, Ca, K, Mg, Mn, Na, P e Sr em produtos de tabaco empregando ICP OES. O planejamento Box-Behnken juntamente com a função da desejabilidade foram utilizados para otimização simultânea das principais variáveis do procedimento de extração ácida assistida por ultrassom de constituintes inorgânicos em amostras de charuto, fumo desfiado e fumo de corda.

3.2. Experimental

3.2.1. Instrumentação

A determinação simultânea dos analitos em produtos de tabaco foi realizada um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com vista axial e detector de estado sólido (modelo E-720, Agilent, Santa Clara, EUA).

O gás usado para geração do plasma foi argônio com pureza de 99.9999% (White Martins, São Paulo, Brazil). A câmara de nebulização de passagem única e o nebulizador One Neb (Agilent, Santa Clara, EUA) foram empregados para a introdução da amostra. As condições de operações do sistema do espectrômetro foram às seguintes: potência de radiofrequência (PRF) de 1350 W, vazão do gás no plasma de 15 L min⁻¹, vazão do gás auxiliar de 1,5 L min⁻¹ e vazão do gás de nebulização (VGN) de 0,9 L min⁻¹. Com um gerador de radiofrequência de 40 MHz.

Os elementos químicos tiveram as suas concentrações determinadas usando os comprimentos de ondas: Ba (II) 455,403 nm, Ca(II) 317,933 nm, K (I) 766,689 nm, Mg

(II) 279,800 nm, Mn (II) 260,568 nm, Na (I) 330,237 nm, P (I) 213,618 nm e Sr (II) 215, 283, sendo (I) linhas atômicas e (II) linhas iônicas.

3.2.2. Pré-tratamento de amostra

No laboratório, as amostras de charuto e de fumo de corda foram cortadas em pedaços, e juntamente com a de fumo desfiado, foram liofilizadas (Liotop Modelo L10) por 72 h. Depois, processadas por 10 min em moinho de bolas (PM 400; Retsch, Düsseldorf, Alemanha) com 5 min de intervalo a 400 rpm para homogeneização do material e obtenção de partículas menores. Os materiais finais foram armazenados em dessecadores. A medida do tamanho das partículas e a morfologia da amostra foram estimadas usando um microscópio de varredura eletrônica (MEV, modelo JSM-6610 Séries Scanning Electron Microscope).

3.2.3. Digestão das amostras

Com a finalidade de comparação com o método de extração por ultrassom, as amostras foram digeridas utilizando as condições ótimas estabelecidas no capítulo 2. Desta forma, aproximadamente 200 mg de amostras homogeneizadas foram medidas (em triplicata) em tubos de digestão de politetrafluoretileno (PTFE). Em seguida foram adicionados um volume de 2,1 mL de HNO₃ 65% m m⁻¹ e 1,2 mL de H₂O₂ 30% m m⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 6,7 mL com sistema de água deionizada produzida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA) às estas amostras.

Os tubos digestores foram aquecidos condutivamente por 120 min uma temperatura de 180 °C em bloco digestor com sistema fechado (Modelo TE-015-1; TECNAL, São Paulo, Brasil). Os digeridos foram aferidos com água deionizada para o volume final de 15,0 mL. Em seguida, a determinação simultânea de Ba, Ca, K, Mg, Mn, Na, P e Sr foi realizada por ICP OES.

3.2.4. Extração ácida assistida por ultrassom

Foram medidas aproximadamente 100 mg de tabaco de charuto, fumo de corda e fumo desfiado, com tamanho de partículas aproximadamente de 80 µm, dentro de um tubo de polietileno de 15 mL. As amostras foram tratadas com 5,0 mL de uma solução de 1,0 mol L⁻¹ de HNO₃ por 10 min, em um banho ultrassônico (modelo EASY 30H Elma, Hohentwiel, Alemanha).

Após o tratamento, a amostra foi diluída para 10 mL com água deionizada. Os sobrenadantes foram separados por centrifugação (centrífuga modelo: DT 4500, fabricante DaiKi, São Paulo, Brasil) por 10 min com rotação de 4000 rpm, sendo solução sobrenadante separada em outro tubo para análise. As soluções dos brancos analíticos e amostras de material de referência certificado (CRM) foram preparadas da mesma forma e em triplicatas. A determinação simultânea de Ba, Ca, K, Mg, Mn, Na, P e Sr foi realizada por ICP OES usando as mesmas condições do equipamento empregadas para análise das amostras digeridas apresentada na seção 2.2.1. As análises de todas as amostras e das soluções do branco analítico foram realizadas em triplicatas.

3.2.5. Otimização do método de extração ultrassônica

Um planejamento Box-Behnken foi escolhido para otimizar as variáveis, tempo de sonicação (TS), concentração do extrator (CE) e tipo de extrator (TE), consideradas críticas no procedimento de extração ácida assistida por ultrassom [13,171]. Uma amostra de charuto (charuto 01) foi selecionada para ser usada na etapa de otimização. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória com triplicata do ponto central, para avaliação do erro experimental.

Os dados experimentais foram processados usando o software Statistica versão 6.0 program (StatSoft, Tulsa, USA). As respostas obtidas foram em percentagem de extração ácida de oito analitos estudados (Ba, Ca, K, Mg, Mn, Na, P, Sr) obtidos em comparação com procedimento de digestão ácida da amostra.

Na otimização simultânea do método de extração ácida assistida por ultrassom foram avaliada as técnicas de metodologia de superfície de resposta usando como resposta a função de resposta múltipla (RM) e função de desejabilidade (D). Desta forma, a RM foi calculada de acordo a trabalho prévio pela expressão [172]:

$$RM = \sum [\%R \text{ analito} / \%R \text{ máximo}] \text{ Equação (1),}$$

em que, %R analito a percentagem de extração de cada analito e %R máximo é o valor máximo a percentagem de extração no conjunto dos experimentos.

Com objetivo de converter as respostas individuais em resposta múltipla fazendo uso da função desejabilidade D, primeiro calculou-se a desejabilidade individual (di) para cada experimento usando a equação abaixo [125]:

$$d_i = \left(\frac{y - L}{T - L} \right)^S$$

em que, y é a resposta de um determinado experimento, L e T são os valores de mínima e máxima porcentagem de extração de cada analito no conjunto dos experimentos, respectivamente. A letra S foi adotado igual a 1 considerando a função de desejabilidade linear. A partir dos valores da desejabilidade individual foi possível calcular a desejabilidade global (D) usando a equação seguinte:

$$D = (d_1 d_2 \dots d_m)^{1/m}$$

em que, m é o número de variáveis de resposta e d_1 d_2 e d_m as funções de desejabilidade individuais.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Tamanho da partícula

O tamanho da partícula pode ser um parâmetro crítico no procedimento de extração assistida por ultrassom, pois, quanto menor o tamanho da partícula, maior será a área superficial de contato com solução extratora, e conseqüentemente melhora os efeitos sonoquímicos. Trabalhos na literatura empregaram tamanhos de partículas inferiores do que 50 μm para extração de elementos químicos [12,173]. Neste trabalho, as análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que as amostras de tabaco tinham partículas de tamanhos (em amarelo na imagem) menores do que 80 μm (Figura 3.1). Nas amostras variam de 15,2 a 56 μm para charuto, entre 24,4 a 66 μm para fumo de corda e entre 20 a 78,6 μm para fumo desfiado. As imagens mostraram a presença de aglomerados de partículas com morfologia em sua maioria esférica, com tamanhos heterogêneos. Observa-se que na amostra de charuto, há formação de aglomerados menores quando comparada as amostras de fumo de corda e fumo desfiado.

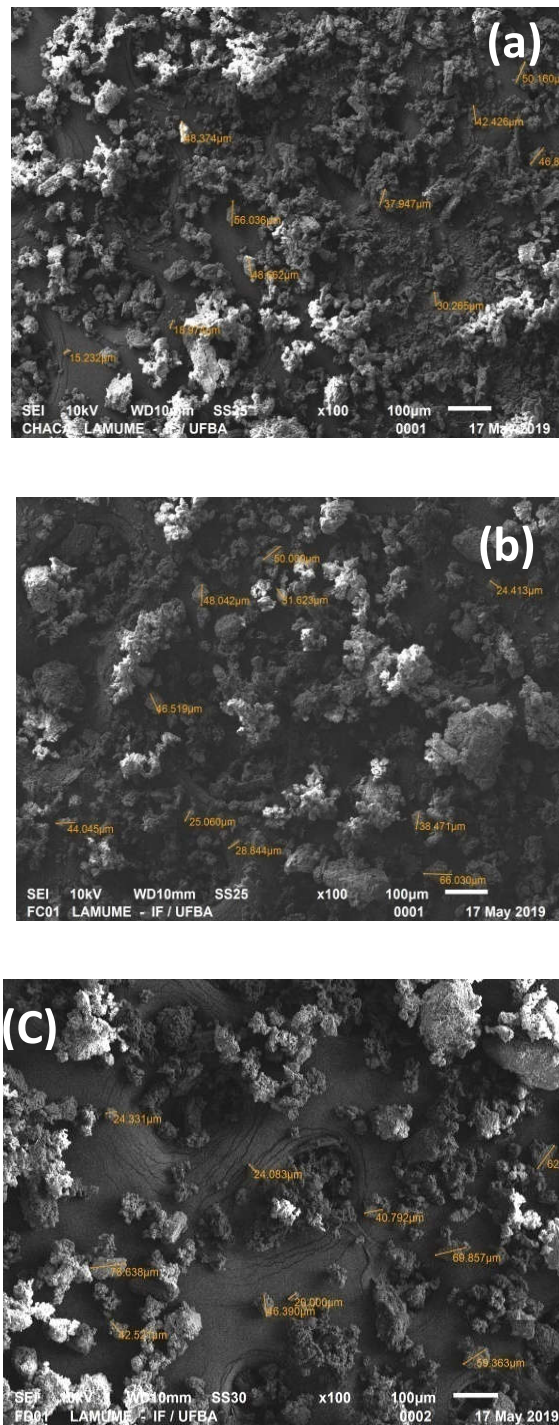


Figure 3.1. Imagens de MEV das amostras de charuto (a), fumo de corda (b) e fumo desfiado (c).

3.3.2 Otimização aplicando o planejamento Box-Behnken

Na Tabela 3.1, está apresentado a matriz do planejamento Box-Behnken aplicado na extração assistida por ultrassom. As variáveis selecionadas foram tipo de extrator (TE: ácido nítrico – ácido clorídrico), concentração do extrator (CE: 1,0 - 4,0 mol L⁻¹) e tempo de banho ultrassônico (TS: 10 - 40 minutos). O volume do extrator foi fixado em 5,0 mL para uma massa de aproximadamente 100 mg de amostra. Nesta etapa da otimização foi escolhida a amostra de charuto 01.

Notou-se que o intervalo de percentual de extração para cada elemento foi de Ba (85-103%), Ca (88,2 -103%), K (86,9-101%), Mg (87,3-103,5), Mn (84,2-100,4%), Na (79,7-105,3%), Sr (86-104,2%) e P (79,6-97,6%). Estes resultados mostraram uma boa extração dos elementos pelo método de extração assistida por ultrassom, aproximadamente entre 80% e 120%. Os demais elementos químicos (Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, P, Ti, V e Zn) não tiveram valores de recuperações adequados para uma análise química quantitativa, ou seja, abaixo de 40% de percentual de extração quando comparada com os valores obtidos pelo método de digestão ácida.

Na Tabela 3.1 também, encontram-se os domínios experimentais de cada variável com valores reais e as respostas (**RM** e **D**) para cada experimento. A superfície de resposta obtida através do planejamento Box-Behnken usando como resposta a RM foi caracterizada como superfície de sela, não podendo fornecer os pontos críticos para a máxima ou mínima resposta. E a visualização através do uso do gráfico de contorno não foi nítida para encontrar uma única condição que satisfaça, simultaneamente, todas as

variáveis estudadas (Figura 3.2). Assim, as condições de melhor extração simultânea dos analitos foram encontradas aplicando a função desejabilidade.

Tabela 3.1. Matriz do planejamento Box-Behnken e respostas para a otimização da extração ácida assistida por ultrassom da amostra de tabaco.

Experimentos	Concordância entre digestão ácida e a extração (%)											Desejabilidade global (D)	
	TE	CE (mol L ⁻¹)	TS (min)	Ba	Ca	K	Mg	Mn	Na	Sr	P		RM*
1	HNO ₃	1,0	25	103,0	103,0	98,9	103,5	100,4	105,3	104,2	97,2	7,98	0,9769
2	HCl	1,0	25	89,0	91,9	93,1	93,8	86,7	83,0	92,7	81,8	6,93	0,2338
3	HNO ₃	4,0	25	88,3	88,2	86,9	87,3	84,2	79,7	90,5	79,6	6,71	0,0000
4	HCl	4,0	25	85,0	89,3	93,9	88,3	85,5	83,5	86,2	81,3	6,75	0,0000
5	HNO ₃	2,5	10	90,7	93,6	97,0	92,8	89,0	85,1	94,3	87,9	7,13	0,3721
6	HCl	2,5	10	87,8	88,8	94,6	90,0	86,2	81,6	90,0	81,2	6,83	0,1329
7	HNO ₃	2,5	40	91,2	92,5	93,6	88,4	86,9	85,1	92,9	83,0	6,98	0,2319
8	HCl	2,5	40	97,8	99,2	101,0	97,1	94,9	94,1	99,9	97,6	7,64	0,7399
9	HNO ₃ :HCl	1,0	10	95,8	97,4	98,8	95,6	93,2	92,0	99,5	93,4	7,47	0,6284
10	HNO ₃ :HCl	4,0	10	91,9	93,5	94,8	91,3	88,4	87,6	93,6	88,4	7,12	0,3636
11	HNO ₃ :HCl	1,0	40	96,5	100,7	101,0	99,1	96,4	93,8	100,4	93,8	7,61	0,7509
12	HNO ₃ :HCl	4,0	40	93,9	93,1	95,5	89,4	92,1	85,6	96,5	91,5	7,23	0,3916
13	HNO ₃ :HCl	2,5	25	92,9	93,3	96,2	91,3	89,1	86,2	94,1	88,1	7,14	0,3757
14	HNO ₃ :HCl	2,5	25	90,8	91,2	94,7	91,7	89,5	84,6	93,9	85,6	7,06	0,3117
15	HNO ₃ :HCl	2,5	25	90,8	93,4	96,5	91,6	88,1	85,9	94,1	85,5	7,08	0,3378
16	HNO ₃ :HCl	2,5	25	93,8	97,7	97,6	93,4	91,2	94,6	96,8	92,8	7,38	0,5590

*Resposta múltipla (MR) do somatório do percentual do valor de extração comparada com os resultados obtidos da digestão da amostra. Fatores: TE = tipo de extrator, CE =

concentração do extrator e TS = tempo de sonicação

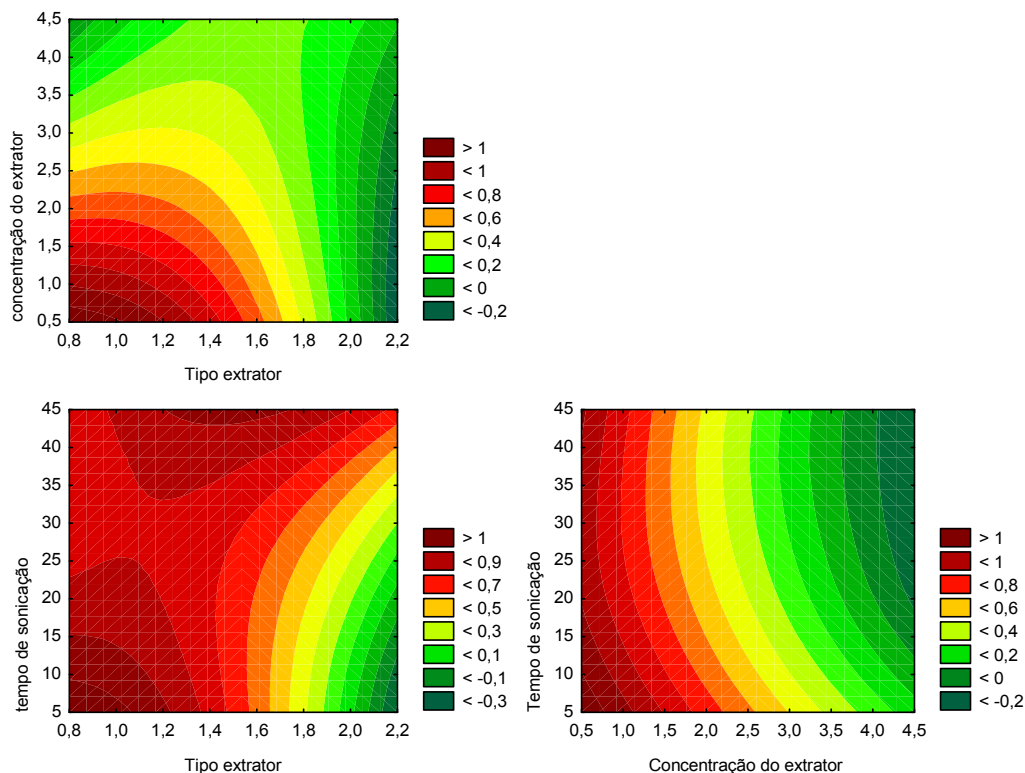


Figura 3.2. Superfície de resposta obtida através do planejamento Box-Behnken para o procedimento de extração assistido por ultrassom.

A Figura 3.3 mostra os perfis e os valores para a desejabilidade individuais para cada analito e desejabilidade geral, obtido através do software Statistica, versão 6.0. As linhas verticais vermelhas indicam os valores máximos das variáveis para a melhor resposta de cada elemento químico individual e os valores máximos das concentrações das variáveis para o melhor compromisso de respostas para todos os elementos juntos. O índice de desejabilidade geral máxima encontrado foi de 0,95, ou seja, 95% de nível de confiança para a condição ótima. Sabendo-se que quanto mais próximo da unidade for este valor, melhor será a otimização simultânea, assim pode-se

constatar que os valores obtidos para essa condição otimizada atendem às especificações requeridas [11].

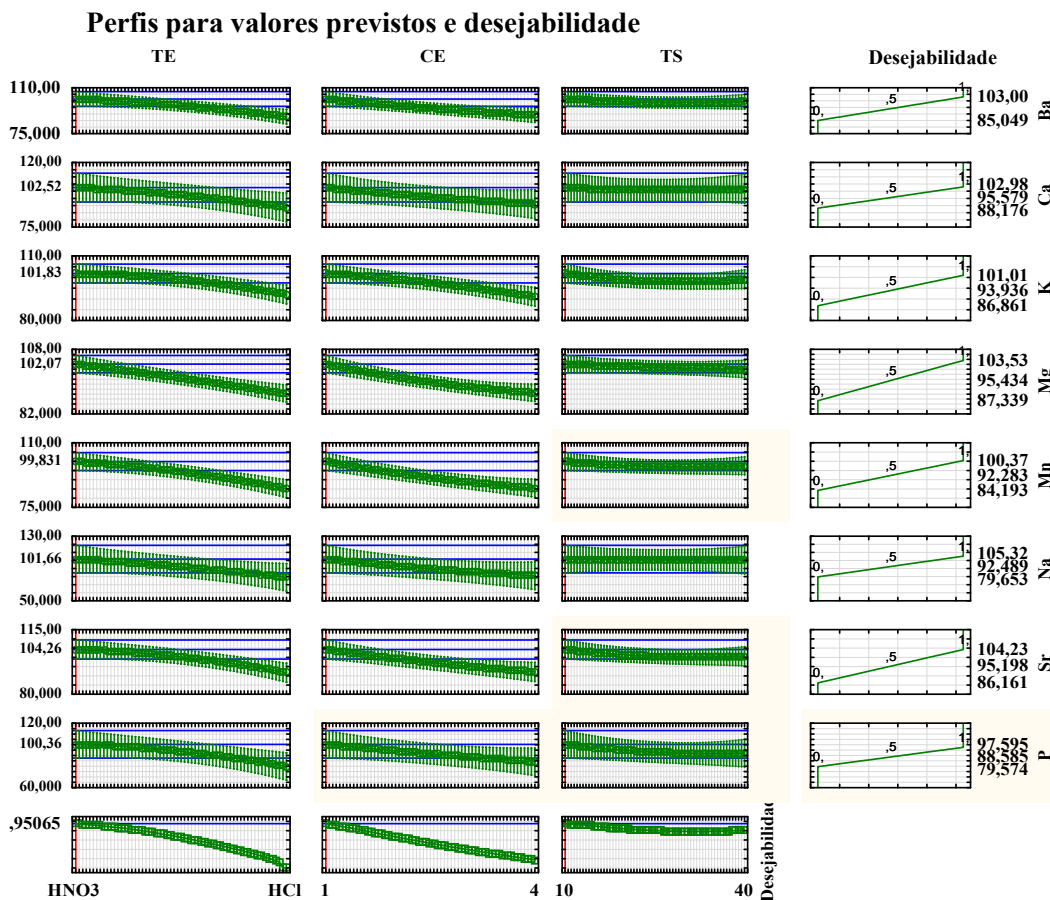


Figura 3.3. Perfis para os valores preditos das desejabildades individuais e global na otimização dos dados gerados usando-se planejamento Box-Behnken na otimização do método para extração de metais usando-se energia de ultrassom. Fatores: TE= Tipo de extrator; CE= Concentração do extrator e TS= Tempo de sonicação.

Portanto, as condições ótimas obtidas através da função desejabildade serão utilizadas no procedimento de extração das amostras de produtos de tabaco, como

HNO₃ como ácido de extrator; 1,0 mol L⁻¹ da concentração do extrator e 10 minutos de tempo de sonicação (TS).

3.3.3. Validação do método analítico

3.3.3.1 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores de LD e LQ foram calculados através da concentração equivalente ao background (BEC), usando as seguintes equações: $LD = (3 \times BEC \times RSD_{\text{branco}})/100$ e $LQ = (10 \times BEC \times RSD_{\text{branco}} / 100)$. Na Tabela 3.2 encontram-se os valores de LD e LQ do método analítico proposto e do método de digestão total ajustado para massa de amostra e fator de diluição empregado para cada experimento. Pode-se observar que ambos os métodos têm sensibilidade suficiente para determinação de Ba, Ca, K, Mg, Mn, Na, P e Sr em amostras de produto de tabaco por ICP OES.

Comparando os valores encontrados para os dois métodos, observou-se que os elementos determinados obtiveram LDs inferiores para o método de extração assistida por ultrassom do que para os obtidos pelo método de digestão total. Isto pode ser atribuído ao uso de soluções ácidas mais diluídas pelo procedimento de extração ácida assistida por ultrassom, em relação ao procedimento de digestão total, melhorando a razão sinal ruído.

Tabela 3.2. Valores de LD e LQ obtidos para determinação multielementar em produtos de tabaco por ICP OES, usando os métodos de extração ácida assistida por ultrassom e digestão total.

Elementos	Digestão total		Extração assistida por ultrassom	
	LD	LQ	LD	LQ
	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)
Ba	0,03	0,09	0,0007	0,002
Ca	3,8	13	4,6	15
K	25	84	115	385
Mg	12	39	2,3	7,7
Mn	0,04	0,13	0,08	0,27
Na	35	116	14	46
P	11	36	7,2	24
Sr	0,8	2,7	0,03	0,1

*Valores foram estabelecidos em termos de $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca.

3.3.3.2 Precisão, exatidão e aplicação analítica

A precisão foi expressa como desvio padrão relativa (%RSD) para análise de sete réplicas da amostra de charuto 01. Os valores encontrados foram inferiores a 5,0%, sendo considerados aceitáveis, devido à homogeneidade das amostras como mostrado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Valores de percentage mde RSD obtidos para de sete replicas da amostra de charuto 01 para determinação multielementar em produtos de tabaco por ICP OES usando o método de extração ácida assistida por ultrassom.

Elementos	Concentração / $\mu\text{g g}^{-1}$	RSD / (%)
Ba	153 \pm 7,0	4,6
Ca	38982 \pm 1593	4,1
K	44316 \pm 2127	4,8
Mg	18256 \pm 816	4,5
Mn	170 \pm 8,0	4,7
Na	1060 \pm 34	3,2
P	5272 \pm 260	4,9
Sr	330 \pm 12	3,6

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=7)

Com o objetivo de avaliar a exatidão do método analítico proposto, o procedimento de extração assistido por ultrassom foi então comparado com o método de digestão através da análise de regressão linear. Os gráficos de regressão linear foram construídos confrontando os resultados do logaritmo dos valores dos elementos químicos obtidos pelo método de extração assistido por ultrassom versus o logaritmo dos valores de concentração dos elementos químicos obtidos pelo método de digestão.

Na Tabela 3.4 encontram-se os resultados da análise de regressão linear, com as respectivas equações da reta, expressas com nível de 95% de confiança. Observou-se que as equações das retas obtidas pelas análises de regressões lineares para os três tipos

de amostras de produtos de tabaco (06 amostras) estão dentro do intervalo de confiança para nível de 95% da idealidade, no qual os valores do intercepto também contemplam o valor ideal zero ($b=0$), a inclinação da reta contemplou o valor ideal unitário ($a=1$) e o coeficiente de correlação (r) apresentou boa correlação com valor maior do que 0,99 entre o método de digestão total e o método de extração assistido por ultrassom. Isto mostra que não houve diferença significativa entre valores dos dois métodos, indicando, portanto, uma boa exatidão do método proposto [174].

A exatidão do método foi confirmada através da análise de três amostras de material de referência certificado (CRM): folhas de tabaco oriental (*Oriental Tobacco Leaves*, CTA-OTL-1), folhas de macieira (*Apple Leaves*, NIST 1515) e folhas de tomateiro (*Tomato Leaves*, Agro C1003a).

Os resultados obtidos para CRMs preparados pelo método analítico proposto apresentam uma boa concordância entre os valores encontrados com os valores certificados. A porcentagem de concordância para todos os materiais variou entre 86 ± 8 % (Na) e 115 ± 5 % (Ca), mostrando boa exatidão do método analítico proposto, inclusive para o CRM de folha de tabaco (Tabela 3.5).

Tabela 3.4. Avaliação da análise de regressão linear para extração ácida assistida por ultrassom e digestão total

Amostras	Análise de regressão linear	Coefficiente de correlação (r)
Charuto 1	$y = 0,983(\pm 0,040)*x + 0,059(\pm 0,137)$	0,9992
Charuto 2	$y = 1,023(\pm 0,040)*x + 0,088(\pm 0,139)$	0,9992
Corda 1	$y = 1,018(\pm 0,026)*x + 0,034(\pm 0,085)$	0,9997
Corda 2	$y = 1,036(\pm 0,054)*x + 0,097(\pm 0,178)$	0,9987
Desfiado 1	$y = 1,023(\pm 0,040)*x + 0,106(\pm 0,134)$	0,9992
Desfiado 2	$y = 0,989(\pm 0,052)*x + 0,010(\pm 0,170)$	0,9986

Tabela 3.5. Valores certificados, encontrados e porcentagem de concordância para análise dos CRMs de folhas de tabaco oriental (CTA-OTL-1), folha de tomateiro Agro C1003a e folha de macieira (NIST 1515) empregando extração ácida assistida por ultrassom e detecção por ICP OES^a

Elemento	CRM CTA-OTL-1			CRM Agro C 1003a			CRM 1515		
	Valor certificado	Valor encontrado	Concordância (%)	Valor certificado	Valor encontrado	Concordância (%)	Valor certificado	Valor encontrado	Concordância (%)
Ba / $\mu\text{g g}^{-1}$	84,2 \pm 11,5	87,8 \pm 3,3	104 \pm 4	n.d.	n.d.	n.d.	49 \pm 2	45 \pm 3	92 \pm 6
Ca / %	3,17 \pm 0,12	3,64 \pm 0,16	115 \pm 5	2,74 \pm 0,44	2,94 \pm 0,31	107 \pm 11	1,526 \pm 0,015	1,451 \pm 0,120	95 \pm 8
K / %	1,56 \pm 0,05	1,51 \pm 0,10	97 \pm 6	4,33 \pm 0,38	3,76 \pm 0,15	87 \pm 3	1,61 \pm 0,02	1,45 \pm 0,06	90 \pm 4
Mg / $\mu\text{g g}^{-1}$	4470 \pm 210	4051 \pm 466	91 \pm 10	4110 \pm 360	4308 \pm 155	105 \pm 4	0,271 \pm 0,008	0,237 \pm 0,020	87 \pm 7
Mn / $\mu\text{g g}^{-1}$	412 \pm 14	454 \pm 16	110 \pm 4	470 \pm 69	487 \pm 36	104 \pm 8	54 \pm 3	<0,27	n.d.
Na / $\mu\text{g g}^{-1}$	345	297 \pm 27	86 \pm 8	2710 \pm 840	2702 \pm 77	100 \pm 3	24,4 \pm 1,2	<46	n.d.
P / $\mu\text{g g}^{-1}$	2892 \pm 134	2572 \pm 281	89 \pm 10	4370 \pm 740	4509 \pm 447	103 \pm 10	1590 \pm 110	n.d.	n.d.
Sr / $\mu\text{g g}^{-1}$	201 \pm 20	224 \pm 9	111 \pm 4	154 \pm 49	144 \pm 7	94 \pm 4	25 \pm 2	<0,11	n.d.

n.d. = não determinado n.i.=não informado.^a Resultados expressos (media \pm intervalo de confiança para nível de 95%, $n = 3$).

3.3.4. Aplicação do método

O método proposto foi aplicado para a determinação multielementar de Ba, Ca, K, Mg, Mn, Na, P, Sr em charuto, fumo de corda e desfiado, comercializados na cidade de Salvador. Como pode ser visto na Tabela 3.6, os valores de concentrações dos macroelementos encontrados nas amostras pelo método proposto variaram entre: 20559 ± 722 a $31449 \pm 3139 \mu\text{g g}^{-1}$ (Ca), 26562 ± 1685 a $54861 \pm 5211 \mu\text{g g}^{-1}$ (K), 5095 ± 270 a $12609 \pm 730 \mu\text{g g}^{-1}$ (Mg), 255 ± 69 a $2666 \pm 92 \mu\text{g g}^{-1}$ (Na), 1510 ± 48 a $3801 \pm 215 \mu\text{g g}^{-1}$ (P). Já os microelementos, apresentaram as seguintes concentrações: 72 ± 9 a $150 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$ (Ba), 126 ± 1 a $957 \pm 30 \mu\text{g g}^{-1}$ (Mn) e 94 ± 1 a $233 \pm 13 \mu\text{g g}^{-1}$ (Sr).

Tabela 3.6. Concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$) dos elementos presentes em produtos de tabaco usando os procedimentos de extração ácida assistida por ultrassom e digestão total por ICP OES

Elemento	Charuto 01		Charuto 02		Corda 01		Corda 02		Desfiado 01		Desfiado 02	
	Digestão	Extração	Digestão	Extração	Digestão	Extração	Digestão	Extração	Digestão	Extração	Digestão	Extração
Ba	82 ± 7	83 ± 7	152 ± 1	143 ± 5	115 ± 2	115 ± 3	127 ± 1	119 ± 5	167 ± 9	150 ± 8	86 ± 1	72 ± 9
Ca	31609 ± 907	28656 ± 1529	33939 ± 34	31449 ± 3139	19359 ± 333	20559 ± 722	20231 ± 154	20679 ± 127	23975 ± 764	22165 ± 664	28556 ± 217	25264 ± 1474
K	46554 ± 3168	45916 ± 6634	46095 ± 2314	54861 ± 5211	24340 ± 429	27908 ± 220	21153 ± 416	29313 ± 124	25517 ± 188	26562 ± 1685	31251 ± 219	28106 ± 1361
Mg	11305 ± 77	12609 ± 730	10084 ± 167	9630 ± 319	8854 ± 154	8938 ± 196	8948 ± 58	8560 ± 142	5955 ± 247	5095 ± 270	7824 ± 71	7093 ± 634
Mn	210 ± 2	215 ± 2	357 ± 3	360 ± 3	137 ± 5	140 ± 5	124 ± 1	126 ± 1	952 ± 29	957 ± 30	372 ± 6	375 ± 6
Na	690 ± 44	660 ± 65	943 ± 12	814 ± 36	2444 ± 25	2666 ± 92	2293 ± 23	2385 ± 21	330 ± 39	276 ± 25	209 ± 3	255 ± 69
P	4342 ± 34	3801 ± 215	2475 ± 50	2634 ± 83	1580 ± 35	1847 ± 219	1287 ± 12	1510 ± 48	1896 ± 72	2001 ± 86	1704 ± 22	1753 ± 122
Sr	191 ± 3	233 ± 13	183 ± 1	161 ± 4	161 ± 1	154 ± 3	164 ± 1	144 ± 5	114 ± 6	94 ± 1	163 ± 2	139 ± 12

^a Resultados expressos como média ± desvio padrão ($n=3$).

3.4. Considerações finais

Aplicação da extração assistida por ultrassom oferece uma alternativa simples, rápida e eficiente de preparo de amostra para determinação de Ba, K, Mg, Mn, Na, P e Sr em amostras de charuto, fumo de corda e desfiado (produtos de tabaco) por ICP OES.

O planejamento Box-Behnken em conjunto com a função desejabilidade foram eficientes para determinação das melhores condições usadas no procedimento de extração ácida assistida por ultrassom.

O ácido nítrico mostrou ser um bom extrator, permitindo a extração simultânea de Ba, K, Mg, Mn, Na, P e Sr nas amostras de tabaco. O tamanho de partícula foi adequado para introdução no nebulizador pneumático do tipo *One Neb*. O uso da extração assistida por ultrassom permitiu um preparo de amostra mais rápido e simples, pois os sobrenadantes foram introduzidos diretamente no equipamento.

O método analítico proposto apresentou uma boa exatidão, precisão e sensibilidade suficiente para determinação de Ba, K, Mg, Mn, Na, P e Sr em amostras de produtos de tabaco podendo ser uma alternativa, em relação aos métodos de digestão por via úmida, que são mais demorados e geralmente consomem mais reagentes, para ser aplicado em análise de rotina nos laboratórios de controle de qualidade de tabaco.

CAPÍTULO 4. Estimativa da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em produto de tabaco sem fumaça usando o método SBET

4.1. Introdução

O consumo de produtos de tabaco não geradores de fumaça (do inglês *smokeless*), como substitutos aos de tradicionais de tabaco queimado, logo, vem ganhando maior interesse da população [4]. Vários tipos desses produtos estão disponíveis e podem ser usados por via oral ou nasal. Os produtos de tabaco sem fumaça são amplamente classificados como tabacos de mascar (folhas soltas e pedaços), tabacos para rapé secos e úmidos, snus (um produto de tabaco em pó úmido) e outros produtos [6]. Eles variam amplamente em todo o mundo em relação à sua forma, constituintes e riscos à saúde [175,176].

No Brasil, o fumo de corda é também uma das formas de consumo do tabaco não gerador de fumaça, quando mascado em pequenos pedaços. Devido o aumento do consumo de tabaco, não geradores de fumaça, é de fundamental importância a determinação de constituintes inorgânicos em seus produtos, Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) declarou estes produtos como cancerígeno, pois contém cerca de 30 agentes causadores de câncer [177].

Entretanto, a exposição a metais tóxicos através de produtos de tabaco não geradores de fumaça e riscos à saúde associados foi estudada em um grau limitado em comparação com a toxicologia por inalação de metais no material particulado produzido

durante a queima do tabaco [4]. A exposição sistêmica ocorre por absorção oral direta ou por saliva ingerida ou partículas de tabaco no trato digestivo superior [4]. A porção de elementos potencialmente tóxicos lixiviados na saliva será absorvida na cavidade oral, alguns serão expectorados com a saliva, mas outros passarão para o trato digestivo superior (esôfago e estômago) e depois para o trato intestinal onde pode ser absorvido e, através da corrente sanguínea, depositado em outros órgãos. Consequentemente, um risco potencial associado ao uso de produtos de tabaco sem fumaça será devido à ingestão do suco salivar contendo elementos potencialmente tóxicos [179].

Alguns estudos para estimativa da eficiência biodisponível ou de extração para metais tóxicos e cancerígenos do tabaco sem fumaça, geralmente são feitos usando saliva artificial ou humana [4,178,179,180]. Entretanto, ainda não existe uma formulação padronizada de saliva para extração de tabaco [4].

Neste sentido, este estudo propõe-se uma estimativa da percentagem da bioacessibilidade de Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Na, P, Ti, V e Zn em fumo de corda usando um modelo de digestão *in vitro* SBET. Os resultados relativos de bioacessíveis dos elementos químicos presentes nas amostras fornecerá um ponto de partida para estudos mais complexos e aprofundados do ponto de vista toxicológico, a fim de estabelecer recomendações para alertar a população sobre o consumo deste produto do tabaco. Desta forma, pode ser feita uma estimativa mais precisa dos efeitos que o consumo do produto de tabaco causa a saúde humana.

4.2. Experimental

4.2.1 Instrumentação

Na determinação dos elementos químicos foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplada indutivamente (ICP OES), usando um espectrômetro com vista axial (modelo 720, View Pro, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) equipado com detector de estado sólido (CCD), sendo resfriado a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um sistema Pelletier para análise composicional.

O policromador de *Echelle* foi mantido a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ e purgado com argônio com pureza de 99,9999% (White Martins, São Paulo, Brasil), permitindo medidas na faixa espectral entre 167 e 785 nm. A zona de observação no sistema visualizado axialmente foi definida automaticamente pelo programa fornecido com o software de controle de vistas axiais usando a linha de emissão Mn II 257.610 nm, após calibração diária.

A câmara de nebulização do tipo ciclônica e o nebulizador Seaspray foram empregados para a introdução da amostra. Com um gerador de radiofrequência de 40 MHz. As condições de operações do sistema do espectrômetro foram às seguintes: potência de radiofrequência (PRF) de 1350 W, vazão do gás no plasma de 15 L min^{-1} , vazão do gás auxiliar de $1,5\text{ L min}^{-1}$ e vazão do gás de nebulização (VGN) de $0,9\text{ L min}^{-1}$.

As concentrações dos elementos químicos foram determinadas usando os comprimentos de ondas: Al (I) 396,152 nm, Ca(II) 317,933 nm, Cd (II)214,439, Cu (I)324,754, Fe (II)259,940, K (I) 324,754 nm, Na (I) 330,237 nm, P (I) 213,618 nm,

Ti (II) 336,122 nm ,V(II) 292,401 nm, Zn (I) 213,857 nm , sendo (I) linhas atômicas e (II) linhas iônicas.

Para digestão das amostras, um bloco digestor em sistema fechado (modelo TE-007MP, TECNAL, São Paulo, Brasil), com controlador de temperatura digital.

Na determinação da bioacessibilidade dos macro e microelementos extraídos da amostra fumo de corda, empregando o teste da simples extração de bioacessibilidade *in vitro* (SBET), utilizou-se uma incubadora (modelo TE-4200, TECNAL, São Paulo, Brasil), um medidor de pH modelo 510 (Vernon Hills, EUA) e uma centrífuga modelo MA-1810 (MARCONI, São Paulo, Brasil).

4.2.2. Materiais e reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados no procedimento de digestão ácida em bloco digestor em sistema fechado: ácido nítrico 65% m m⁻¹ e peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha) na digestão do produto de tabaco para avaliação do resíduo após extração para validação do balanço de massa. Foi utilizada para a estimativa da bioacessibilidade a glicina e HCl 37% m m⁻¹ (Merck, Alemanha).

As curvas de calibração externa foram preparadas a partir de diluições de acordo com as faixas de trabalho requeridas de soluções padrão (Specsol, São Paulo, Brasil) contendo 1000 mg L⁻¹ de Al, Cd, Cu, Fe, Ti, V e Zn, soluções padrão de 10000 mg L⁻¹ de soluções de Ca, K, Na e da solução padrão de 4000 mg L⁻¹ de P. As soluções foram preparadas em água deionizada, com uma resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹ obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

4.2.3 Amostras de fumo de corda

Quatro amostras de fumo de corda provenientes de diferentes lugares foram adquiridas em feiras da cidade de Salvador, Nordeste, Bahia, Brasil. O material de referência certificado (CRM) folhas de macieira (CRM NIST 1515) foi adquirido do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (Gaithersburg, MD, EUA) e folhas de tomateiro (CRM-Agro C1003a), por meio do exercício colaborativo CRM-AGRO FT_012016 realizado pelo Laboratório de Radioisótopos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura Universidade de São Paulo (LRI/CENA/USP).

4.2.4. Estimativa de bioacessibilidade *in vitro* usando método de extração SBET

Neste trabalho, a estimativa da bioacessibilidade de elementos químicos presentes no fumo de corda foi realizada usando um procedimento de extração *in vitro* SBET, adaptado de um trabalho previamente descrito por Oomen e colaboradores [154].

Aproximadamente 0,2 g da amostra de fumo de corda foi medida em um tubo de polipropileno de 50 mL. Adicionou-se 10,00 mL de uma solução de 0,4 mol L⁻¹ de glicina/HCl com pH de 1,5. As amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação orbital a 100 rpm por 1h. Em seguida foram centrifugadas por 5 min a 4000 rpm e a solução sobrenadante foi coletada com uma micropipeta. A análise química para determinação dos constituintes inorgânicos foi realizada empregando ICP OES. As análises foram realizadas em triplicatas.

Após esta fase de extração, os resíduos que ficaram no tubo de centrifuga, foram transferidos quantitativamente para tubos de PTFE, e conduzidos para o bloco digestor, onde foram levados a secura, a uma temperatura de 80 °C. Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão conforme o procedimento já otimizado (Capítulo 2) e em seguida, analisadas por ICP OES. Tanto o digerido (resíduo) como o extraído (sobrenadante) foram submetidos às mesmas condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado também conforme o Capítulo 2. As soluções dos brancos analíticos e os materiais de referência certificados (CRM) foram preparados da mesma forma, e em triplicatas.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Validação do método proposto

4.3.1.1. Avaliação do Efeito de Matriz

Visando avaliar um possível efeito de matriz ocasionado pela glicina, um dos reagentes empregados no procedimento de SBET, foi feita uma curva de calibração por adição de analito na presença de glicina e comparada com uma curva de calibração externa em meio de HNO₃. Observando-se os resultados na Tabela 4.1, verificou-se que as razões entre os coeficientes angulares das curvas de calibração com e sem glicina variaram de 99 a 104%, para os analitos estudados. Isto mostra que não houve diferença para nível de confiança de 95% entre os coeficientes angulares das duas curvas de calibração. Logo, pode-se inferir que significa que a matriz não interferiu na determinação dos elementos químicos. Desta forma, a curva de calibração aquosa foi utilizada para as determinações multiementar por ICP OES.

Tabela 4.1. Equações da curva de calibração aquosa e da adição de analito na presença de glicina.

Elementos	Equação da curva de calibração externa	r	*Equação da curva de calibração por adição de analito	r	Razão (%)
Al	$y = 65413x + 21113$	0,9997	$y = 65834x + 18224$	0,9997	101
Ca	$y = 41230x + 343194$	0,9993	$y = 40679x + 532973$	0,9986	99
Cd	$y = 61087x + 288$	0,9996	$y = 63454x + 443$	0,9990	104
Cu	$y = 60493x + 3843$	0,9990	$y = 62820x + 3296$	0,9991	104
Fe	$y = 26550x + 9129$	0,9991	$y = 27062x + 7832$	0,9990	102
K	$y = 39x + 343$	0,9990	$y = 40x + 493$	0,9990	102
Na	$y = 503x + 3146$	0,9992	$y = 518x + 1792$	0,9996	103
P	$y = 2804x + 1819$	0,9998	$y = 2870x + 3849$	0,9992	102
Ti	$y = 190082x + 21108$	0,9993	$y = 189339x + 45791$	0,9984	100
V	$y = 81119x + 97$	0,9991	$y = 80713x + 261$	0,9992	99
Zn	$y = 107040x + 2305$	0,9994	$y = 112423x + 9014$	0,9994	105

*Curva de calibração por adição de analito na presença de glicina // r= coeficiente de correlação

4.3.1.2. Limite de detecção e limite de quantificação

Na Tabela 4.2 estão expressos os valores do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o método de extração *in vitro* SBET e o método de digestão total. As soluções de glicina em pH de 1,5 foi utilizada como solução do branco analítico para obtenção do LD e LQ do método de extração *in vitro* SBET.

Comparando-se os resultados dos dois métodos pode-se observar que os LD e LQ foram mais baixos para o método de extração. Isto indica uma boa sensibilidade do método de extração *in vitro* SBET, para determinação da bioacessibilidade dos constituintes inorgânicos presentes nas amostras de tabaco.

Tabela 4.2. Valores de LD e LQ para determinação multielementar em produtos de tabaco por ICP OES aplicando a digestão total e o métodos de extração *in vitro* SBET

Elementos	Digestão Total		Metodo de extração <i>in vitro</i> SBET	
	LD	LQ	LD	LQ
	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al	1,9	6,2	0,3	0,9
Ca	3,8	13	1,7	5,7
Cd	0,06	0,2	0,05	0,18
Cu	0,08	0,3	0,1	0,4
Fe	1,8	6,0	0,09	0,29
K	25	84	1,0	3,4
Na	35	116	30	99
P	11	36	0,5	1,8
Ti	0,03	0,09	0,02	0,07
V	0,06	0,21	0,04	0,2
Zn	0,4	1,3	0,03	0,10

4.3.1.3. Exatidão

A exatidão do método de extração *in vitro* SBET foi avaliada através do balanço de massa realizada nas amostras de fumo de corda e em dois materiais de referência certificado (CRM): folhas de macieira (NIST 1515) e folhas de tomateiro

(Agro C1003a). A verificação do balanço de massa foi realizada segundo a equação abaixo:

$$\text{BM (\%)} = \frac{\text{Teor bioacessível} + \text{Resíduo}}{\text{Teor total}} \times 100$$

em que, teor bioacessível é a concentração do analito extraído no teste *in vitro*; teor total é a concentração do analito obtido pela digestão total. Os resultados do balanço de massa para as amostras de fumo de corda encontram-se na Tabela 4.3. Observa-se que as porcentagens variaram de 77 a 146%, indicando uma boa precisão do procedimento.

A exatidão do método de extração *in vitro* SBET foi também confirmada através da análise de dois CRM: folhas de macieira (NIST 1515) e folhas de tomateiro (Agro C1003a). Os resultados obtidos de balanço de massa para CRMs preparados pelo método *in vitro* SBET apresentaram valores porcentual que variam de 70 a 156% (Tabela 4.4).

Estes valores de concordância mostram que erros foram insignificantes para os elementos químicos investigados usando o método de extração SBET, verificando assim que a exatidão do procedimento foi adequada para os valores entre 80 e 120% [181,182].

Tabela 4.3. Determinação de elementos em amostras de fumo de corda após a estimativa do método in vitro SBET. FB= Fração bioacessível, BM= Balanço de mass. Intervalo de confiança para nível de 95% (n=3).

Amostra	Elemento	Teor Bioacessível ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Residual ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Conteúdo Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB (%)	BM (%)	
FCA	Al	61 ± 15	1584 ± 400	1470 ± 870	4,2%	112 ± 27	
	Ca	6106 ± 252	20506 ± 80	25263 ± 397	24,2%	105 ± 0,3	
	Cd	0,40 ± 0,02	0,58 ± 0,27	0,69 ± 0,03	58,1%	142 ± 40	
	Cu	15 ± 1	63 ± 21	59 ± 1	25,8%	132 ± 35	
	Fe	147 ± 38	963 ± 311	855 ± 14	17,4%	131 ± 36	
	K	20919 ± 1826	22012 ± 1221	29354 ± 941	71,3%	146 ± 4	
	Na	610 ± 20	457 ± 268	828 ± 90	73,7%	129 ± 32	
	P	973 ± 28	140 ± 2	1269 ± 160	76,7%	88 ± 0,2	
	V	0,5 ± 0,03	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	44,0%	136 ± 9	
	Ti	< 0,07	< 0,07	2 ± 0,1	*N.D	*N.D	
	Zn	46 ± 4	64 ± 21	128 ± 2,3	35,6%	86 ± 16	
	FCB	Al	97 ± 12	1732 ± 264	2378 ± 360	4,06%	77 ± 11
		Ca	4612 ± 45	14007 ± 1537	18940 ± 289	24,4%	99 ± 8
Cd		< 0,16	< 0,16	0,3 ± 0,03	*N.D	*N.D	
Cu		< 0,4	< 0,4	3 ± 0,1	*N.D	*N.D	
Fe		213 ± 4	671 ± 179	918 ± 32	23,3%	96 ± 19	
K		9331 ± 1311	8381 ± 5814	13918 ± 113	67,4%	127 ± 41	
Na		< 99	< 99	1732 ± 297	*N.D	*N.D	
P		< 1,8	< 1,8	742 ± 24	*N.D	*N.D	
V		0,4 ± 0,004	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,1	17,8%	91 ± 8	
Ti		< 0,07	< 0,07	1,28 ± 0,1	*N.D	*N.D	
Zn		16 ± 0,1	24,1 ± 6,0	51,6 ± 0,9	31,7%	78 ± 11	
FCC		Al	174 ± 14	2204 ± 45	2832 ± 126	6,2%	84 ± 1,58
		Ca	< 5,7	< 5,7	13829 ± 446	*N.D	*N.D
	Cd	0,21 ± 0,05	0,06 ± 0,03	0,35 ± 0,1	59,1%	77 ± 17	
	Cu	< 0,4	< 0,4	3,9 ± 0,11	*N.D	*N.D	
	Fe	290 ± 12	921 ± 57	1073 ± 28,5	27,0%	113 ± 5	
	K	120037 ± 1320	8967 ± 3143	16664 ± 221	72,2%	126 ± 19	
	Na	< 99	< 99	2090 ± 32	*N.D	*N.D	
	P	< 1,8	< 1,8	726 ± 68	*N.D	*N.D	
	V	0,63 ± 0,02	2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	31,7%	131 ± 0,05	
	Ti	< 0,07	< 0,07	2,41 ± 0,20	*N.D	*N.D	
	Zn	22 ± 1,3	21 ± 2	48,9 ± 1,5	44,8%	88 ± 4	
	FCD	Al	98 ± 2,7	1175 ± 171	1263 ± 114	7,8%	101 ± 13
		Ca	< 5,7	< 5,7	13829 ± 446	*N.D	*N.D
Cd		< 0,16	< 0,16	< 0,16	*N.D	*N.D	
Cu		< 0,4	< 0,4	1,7 ± 0,3	*N.D	*N.D	
Fe		136 ± 2	310 ± 15	391 ± 40	34,8%	114 ± 3,8	
K		11288 ± 2687	4364 ± 3115	16132 ± 47	70,0%	97 ± 19	
Na		< 99	< 99	196 ± 8,0	*N.D	*N.D	
P		1046 ± 42	114 ± 5	1218 ± 37	85,9%	95 ± 0,4	
V		< 0,2	< 0,2	0,31 ± 0,03	*N.D	*N.D	
Ti		3,5 ± 0,7	6,4 ± 1,1	10 ± 4,2	35,3%	99 ± 11	
Zn		< 0,10	< 0,10	65 ± 4,3	*N.D	*N.D	

Tabela 4.4. Concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$) dos elementos após aplicação do método de extração *in vitro* SBET para análise do material de referência certificado por ICP OES

Elemento	CRM Agro C1003a					CRM NIST 1515				
	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Conc. bioacessível ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Conc. do resíduo / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Percentual bioacessível (%)	Balanco de massa (%)	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Conc. bioacessível ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Conc. do resíduo / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Percentual bioacessível (%)	Balanco de massa (%)
Al	1990±520	80±6	1402±40	3,3%	75±2	286±9	9±0,2	295±74	4,0%	106±25
Ca	27400±440	21903±2901	19035±333	80,6%	149±1	1526±150	<LQ	<LQ	^b n.d	^b n.d
Cd	26,6±2,1	22,0±1,0	18,0±5,0	84,7%	150±18	0,013±0,002	<LQ	<LQ	^b n.d	^b n.d
Cu	1130±140	857±38	907±12	75,9%	156±1	5,64±0,24	2,1±0,16	2,2±0,06	37,2%	76±1
Fe	1120±190	136±9	1087±33	12,1%	109±3	83±5	24±1	58±6	28,4%	98±7
K	43300±1	27278±917	21241±7120	63,0%	112±16	16100±200	6371±2921	6144±1600	39,6%	78±9
Na	2710±840	2691±161	1210±155	99,3%	153±6	24,4±1,2	<LQ	<LQ	* n.d.	^b n.d
P	4370±740	3562±137	559±8	81,5%	94±0,2	1590±110	929±27	183±5	58,4%	70,0 ± 0,3
V	^c n.i	0,40±0,03	2,30±0,41	^b n.d	^b n.d	0,26 ± 0,03	0,05±0,02	0,21±0,05	17,6%	99±19
Ti	^c n.i	4,2±1,0	89± 18	^b n.d	^b n.d.	^c n.i	3,0 ±0,1	3,0± 1,7	^b n.d	^b n.d
Zn	37,5±5,0	17± 0,1	17±0,8	44,6%	91± 2,1	12,5±0,3	6,9±0,2	7,7±1,3	55,7%	117±10

^a Resultados expressos como média ± IC, ($n=3$), ^b n.d = não determinado, ^cn.i = não informado

4.3.2 Aplicação

O método de extração SBET foi aplicado em quatro amostras de fumo de corda para a determinação da bioacessibilidade de Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Na, P, Ti, V e Zn, por ICP OES. O teor bioacessível em porcentagem foi calculado segundo a equação abaixo.

$$\text{Fração bioacessível (\%)} = \frac{\text{Teor bioacessível}}{\text{Teor total}} \times 100$$

em que, teor bioacessível é a concentração do analito extraído no teste *in vitro*; Teor total é a concentração do analito obtido pela digestão total

Na Tabela 4.3 encontram-se os valores de porcentagem da bioacessibilidade dos macro e microelementos obtidos para amostras de fumo de corda. A bioacessibilidade dos macroelementos variou (em %): 22,2 - 24,4 (Ca); 67,4 - 72,2 (K); 76,7 - 85,9 (P), <LQ - 73,7 (Na), e 76,7 - 85,9 (P). Considerando todas as amostras, o valor mais elevado de bioacessibilidade foi para o P (85,9), seguido do Na (73,7). Estes elementos químicos desempenham diversas funções no organismo, mas em excesso são prejudiciais a saúde humana. Sendo que, a elevada concentração de sódio pode causar edema e hipertensão e o cálcio pode conduzir a formação de cálculos renais em seres humanos.

Em relação aos microelementos, o Al, um elemento químico não essencial e potencialmente tóxico para o ser humano, apresentou baixos valores de bioacessibilidade, variando entre 4,06 e 7,8% da sua concentração total. Cobre é elemento essencial para a sobrevivência humana, sendo que, o seu percentual de

bioacessibilidade variou de <LQ e 25,8%. Outro elemento essencial, o Fe foi bioacessível em todas as amostras de fumo de corda, com os valores percentuais variaram de 17,4 - 34,8% da concentração total.

No entanto, apesar do Cu e Fe serem considerados essenciais, um aumento de suas concentrações implica em efeitos adversos para o organismo humano. As frações bioacessíveis encontradas de V e Zn nas amostras foram similares. Os valores variaram de <LQ e 44,8 % para ambos os elementos. Já para o Ti os valores de concentrações variaram entre <LQ e 35,3 %.

Dos elementos químicos declarados cancerígenos humanos pela Agência International de Pesquisa do Câncer, o Cd apresentou bioacessibilidade nas amostras. Os valores encontrados para concentração de Cd variaram de <LQ e 59,1% para fumo de corda. O valor de 59,1% é considerado elevado, levando em consideração ao risco que este elemento químico traz a saúde humana.

Em resumo, a fração bioacessível (em %) nos elementos determinados variou de 4,06 (Al) a 85,9 (P). A ordem decrescente da média dos valores de porcentagem de bioacessibilidade dos constituintes inorgânicos foram P>Na>K>Cd>Zn>V>Ti>Fe>Cu>Ca>Al.

A baixa porcentagem de bioacessibilidade encontrada para alguns analitos no fumo de corda pode ser justificada pela presença de compostos naturalmente encontrados na planta do tabaco, como proteínas. Um elevado conteúdo de proteína no tabaco foi reportado na literatura, cerca de 10% a 20% [183]. Desta forma, alguns elementos podem se ligar a estas proteínas tornando-se inativos, mesmo que a digestão

de proteínas comece no estômago. Entretanto, poderá estar biodisponível no intestino [184].

4.4. Considerações finais

O método de extração *in vitro* SBET foi validado para amostras de fumo em corda (tabaco sem fumaça), e foi aplicado para estimar o valor de exposição de elementos químicos na forma mascada. Os resultados do balanço de massa nas amostras analisadas indicaram uma boa precisão e exatidão do método de extração *in vitro* SBET.

A fração bioacessível (em %) nos elementos determinados variou entre 4,06 (Al) e 85,9 (P). Potássio, Na, P e Cd apresentaram frações bioacessíveis superior a 50%, isto é um indicativo que a fração desses elementos químico que é ingerida por absorção está disponível para captação através do lúmen intestinal.

Os macroelementos foram mais bioacessíveis do que os microelementos nas amostras de fumo de corda. Sendo que, o fósforo apresentou um fração bioacessível de cerca de 85,9 %, o valor mais elevado entre os demais elementos químicos. O potássio foi bioacessível em todas as amostras analisadas. Dos microelementos, o Cd apresentou um maior valor da fração bioacessível, cerca de 59,1%. Este resultado tem sido preocupante, pois embora o Cd esteja em quantidade traço nas amostras, ele pode acumula-se no organismo por anos.

Os resultados mostraram também que o consumo do fumo de corda pode ser considerado potencialmente perigoso para a saúde humana, pois alguns elementos químicos presentes no consumo de tabaco poderão ser transferidos para o estômago. Apesar da fração bioacessível nem sempre estar biodisponível, ou seja, não

necessariamente será absorvido pelo organismo, estes resultados servem de alerta para o risco de danos à saúde que consumidores habituais de tabaco estão se expondo.

CAPÍTULO 5. Avaliação da composição mineral dos produtos de tabaco comercializados na cidade de Salvador

5.1. Introdução

Na indústria do tabaco tem sido importante a determinação de constituintes inorgânicos em seus produtos para o monitoramento da qualidade. O Brasil além de ser um dos maiores exportadores de folha de tabaco do mundo, também exporta charuto. Assim, um controle da qualidade dos produtos oriundos do tabaco é fundamental para aumentar o preço de mercado na exportação desses produtos.

A qualidade do tabaco curado e sua definição foram publicadas na Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A comercialização do tabaco em folha curado está sob a vigência da instrução normativa do MAPA nº 10, de 13 de abril de 2007, considerando, por exemplo, a posição da folha na planta, cor e qualidade da folha curada, textura, contaminantes, substâncias nocivas à saúde, dentre outras regulamentações [185].

O padrão de qualidade do tabaco é entendido como o balanço adequado da nicotina, proteína e do açúcar para obtenção de um sabor agradável, isto é, obtido na colheita gradativa da planta, conforme maturação, exibindo tonalidade laranja intenso após o processo de cura [186, 187].

A composição química do produto de tabaco também pode variar conforme o tipo de folhas, o modo como são cultivadas, a região de origem, as características de preparação (compactação, filtro e papel) e as variações de temperatura resultantes da combustão incompleta do tabaco [188].

5.2 . Resultados e discussão

Os macroelementos como, nitrogênio, potássio, enxofre, fósforo, magnésio e cálcio estão relacionados com o teor de açúcar, nicotina, sabor, aroma e combustão dos produtos, constituindo importantes parâmetros de qualidade. Por outro lado, a presença de alguns microelementos e elementos traço como o níquel e o cádmio, refletem negativamente na qualidade dos produtos, uma vez que, são nocivos à saúde humano.

A Figura 5.1 mostra a porcentagem dos principais elementos químicos encontrados nos três produtos de tabaco estudados neste trabalho. Note que, o conteúdo de cálcio foi superior ao de magnésio em todos os tipos de tabaco investigados, pois depois do potássio ele é o metal mais absorvido pelo tabaco. O magnésio aumenta a combustibilidade e produz uma cinza porosa solta e de cor clara. Entretanto, a presença de cálcio em excesso, em produtos como o charuto, produz uma combustão incompleta que resulta em uma cinza compacta que dificulta a passagem de ar para o produto-

Dentre os micronutrientes, o potássio é o elemento mais relacionado com o padrão de qualidade. Alguns pesquisadores defendem a idéia de que uma planta suprida com potássio pode apresentar maiores características químicas referentes à qualidade, por ser este elemento, o responsável pela cor, textura, conteúdo de açúcar, nicotina, combustibilidade e aroma [5,64,189].

Relatos na literatura informam que a presença de potássio aumenta o teor de ácidos orgânicos não-voláteis e diminui o conteúdo de ácido cítrico e de ácido

linolênico nas folhas de tabaco curadas, impactando diretamente nos compostos químicos que estão responsáveis pelo aroma [189]. O potássio é um dos constituintes inorgânicos da cinza que resulta da combustão contínua sem chama e pode alterar a composição da fumaça do cigarro, reduzindo a administração do material particulado total, nicotina e cianeto, conseqüentemente, o risco à saúde ocasionado pela fumaça do cigarro [190].

A maioria das amostras de charuto apresentou um teor de potássio superior ao do nitrogênio, diferente de outros tipos de produtos. O nitrogênio como discutido anteriormente, está relacionado com o teor de nicotina, considerado um dos maiores parâmetros de qualidade. Entretanto, o nitrogênio em excesso também produz sabores fortes e picantes. Além disso, o nitrogênio pode estar presente na fase gasosa destes produtos na forma de óxidos de nitrogênio, causando efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente [57,58].

Na Figura 5.2 encontra-se a razão K/N para os produtos de tabaco. Observa-se que a maioria dos charutos apresentou razões bastante superiores em relação ao fumo de corda. Isto pode ser um indicativo da melhor qualidade do charuto em relação ao fumo de corda.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2.7 (Capítulo 2), o teor de enxofre foi superior nas amostras de charuto, valores superiores a 1,0 %, em relação ao que foi encontrado no fumo desfiado e de corda, o que pode afetar o aroma do produto. Além disso, pode contribuir para a formação de produtos voláteis a base de enxofre na fumaça, produzindo efeitos indesejáveis para saúde e meio ambiente.

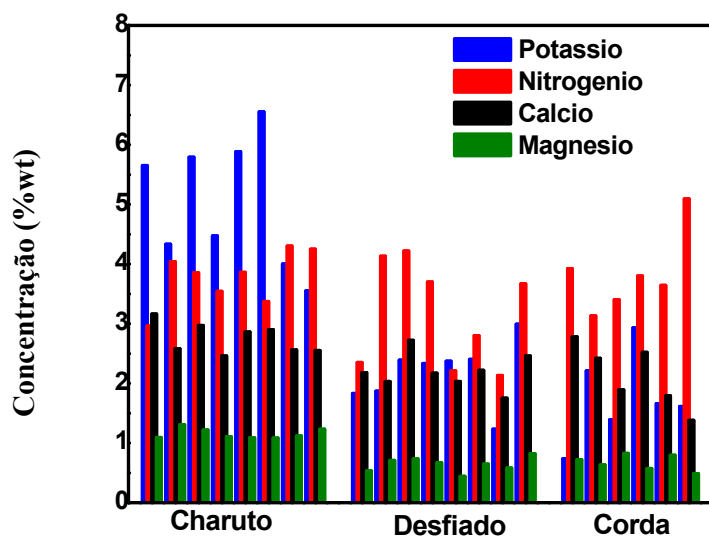


Figura 5.1- Conteúdo de potássio, nitrogênio, cálcio e magnésio nos produtos de tabaco, expresso em porcentagem de massa seca.

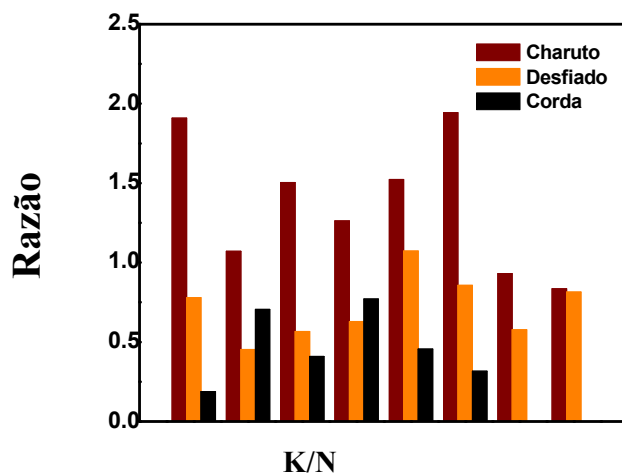


Figura 5.2- Razão do conteúdo de potássio e nitrogênio nos produtos de tabaco.

A ANVISA através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 299, de 12 de agosto de 2019, estabelece que os produtos fumígenos derivados do tabaco indiquem a concentração dos seguintes elementos em ng g^{-1} de tabaco: cádmio, chumbo, mercúrio, níquel, selênio, cromo e arsênio [191]. Neste trabalho, dentre estes elementos, o método analítico desenvolvido (Capítulo 2) foi validado para determinação de cádmio, níquel e arsênio. Entretanto, o arsênio presente nas amostras de produto de tabaco estava abaixo do limite de quantificação do método ($12 \mu\text{g g}^{-1}$).

Na Tabela 5.1 encontra-se a concentração média de cádmio e níquel presentes nos produtos de tabaco analisados neste trabalho em comparação com dados da literatura. Observa-se que, o charuto foi o produto que apresentou maior concentração de Cd e Ni. Os valores encontrados para níquel nas amostras de charutos brasileiros são similares aos encontrados nos charutos indianos.

Em relação ao Cd, a média dos valores encontrados nos charutos brasileiros é ligeiramente mais baixo do que os charutos americanos. Entretanto, a concentração de níquel encontrado foi mais baixa nos charutos americanos. Por outro lado, o fumo de corda que é o produto mais consumido pela população de baixa renda no Brasil, apresentou os menores teores de cádmio e níquel.

Vale ressaltar que, o cádmio é volátil e acumulativo. Estudos também relataram que o níquel em um cigarro aceso pode formar o composto volátil níquel tetracarbonilo, que é considerado cancerígeno em baixas concentrações [192]. Além disso, os testes de bioacessibilidade indicaram que mais de 50% do total de cádmio nas amostras de fumo de corda estavam bioacessível.

Tabela 5.1 – Concentração de cádmio e níquel presentes em produtos de tabaco queimados/combustíveis.

Produtos	Cd (ng g⁻¹)	Ni (ng g⁻¹)	Referência
Charuto/Brasil	960	8180	Neste Trabalho
Fumo desfiado/Brasil	490	2700	Neste Trabalho
Fumo de Corda/Brasil	292	2170	Neste Trabalho
Charuto/Indiano	710	8860	[6]
Charuto Pequenos/USA	1190	2560	[115]
Biri/Indiano	490	7100	[6]

As Figuras 5.3 e 5.4 encontram-se os histogramas dos resultados apresentados nas Tabelas 2.7 e 2.8 mostrados no Capítulo 2, com a média, os máximos, os mínimos e desvio padrão dos valores dos elementos mais relacionados com a qualidade de três tipos de tabacos, charuto, fumo desfiado e fumo de corda, comercializados em Salvador, Estado da Bahia. As concentrações abaixo do limite de quantificação não foram consideradas. Os macroelementos foram convertidos em porcentagem por massa do produto do tabaco.

As concentrações de Cd e Ni na maioria das amostras estavam no limite inferior da distribuição (Fig. 5.3). O Cd apresentou uma distribuição homogênea das amostras. Um total de 77% das amostras tinha concentrações de Cd inferiores a 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$. Estes valores sugerem que a maioria do cádmio pode ser proveniente da sua ocorrência natural do solo [87].

O níquel não apresentou uma distribuição homogênea, o desvio padrão foi superior à média das amostras. O valor máximo encontrado (27,1 $\mu\text{g g}^{-1}$) foi discrepante

em relação ao valor mínimo. Este valor está relacionado com uma amostra de charuto, que também relatou um valor máximo para o Cd de $1,66 \mu\text{g g}^{-1}$ apresentando na Tabela 2.6. Estes resultados sugerem que a concentração do níquel pode também ser proveniente de insumos agrícolas usados com finalidade corretiva ou nutricional no cultivo do tabaco.

Em relação aos macrossolúveis, o enxofre não apresentou uma distribuição homogênea das amostras. A maioria das amostras estava no limite inferior da distribuição. Um total de 77% das amostras tinha concentrações de Enxofre inferiores a 1%. Estes valores sugerem que a maioria do enxofre pode ser proveniente da sua ocorrência natural do solo.

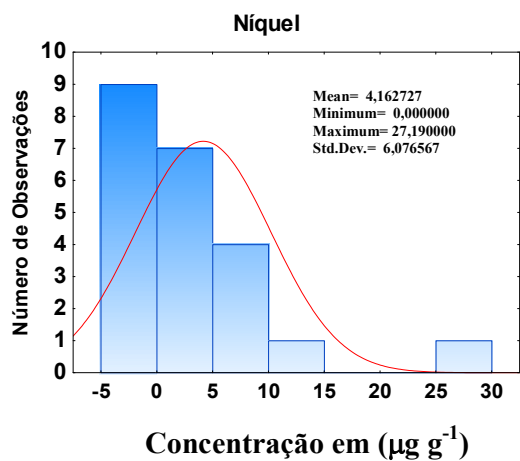
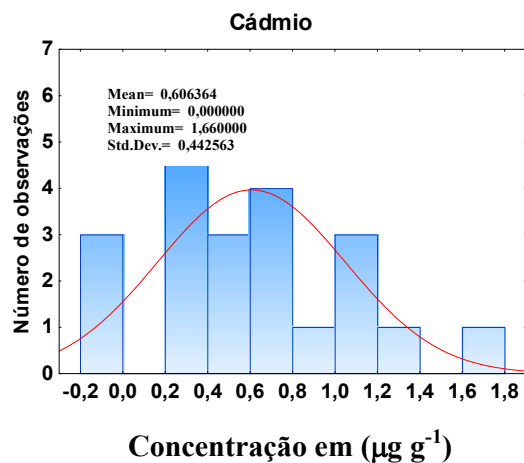


Figura 5.3 - Histogramas das concentrações (em $\mu\text{g g}^{-1}$) de Cd e Ni nas amostras de tabacos comercializadas na cidade de Salvador, Bahia (n=22).

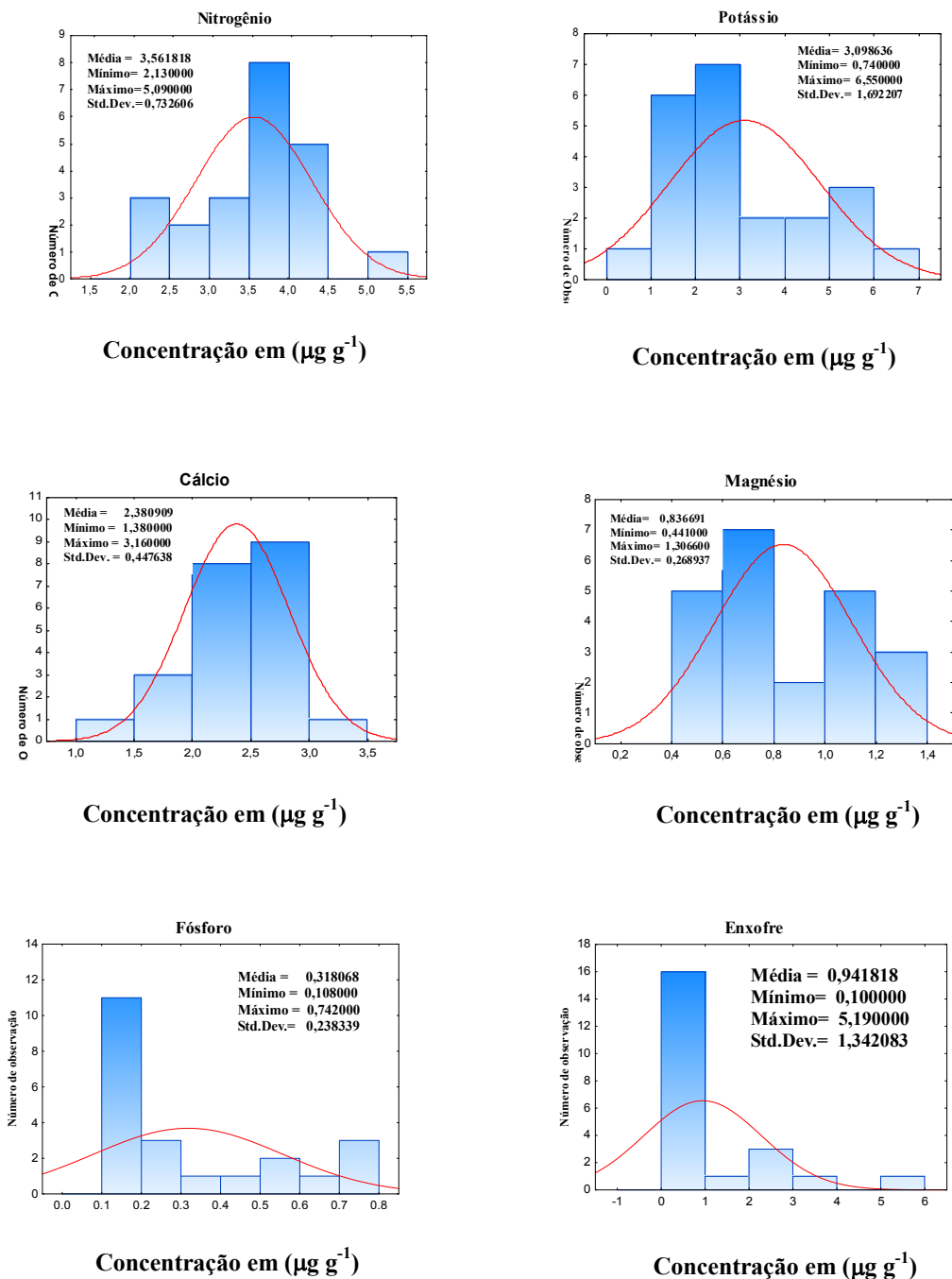


Figura 5.4 - Histogramas das concentrações de macroelementos expressos em porcentagem nas amostras de tabacos comercializadas na cidade de Salvador (n=22)

6. CONCLUSÕES FINAIS

Foram desenvolvidas metodologias analíticas para a determinação de 19 constituintes inorgânicos (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, S, Sr, Ti, V e Zn) em amostras de produtos de tabaco (charuto, fumo desviado e de corda), empregando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

As estratégias analíticas utilizadas para preparo das amostras utilizando bloco de digestor com sistema fechado empregando ácido diluído e a extração ácida assistida por ultrassom forneceram procedimentos simples, rápidos e com baixo consumo de reagentes.

Os procedimentos apresentaram condições de análise química com boa precisão, exatidão, livres de interferências com limites de quantificação adequados para determinação de Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, S, Sr, Ti, V e Zn presentes nas amostras de tabaco.

A otimização utilizando-se o planejamento Box-Behnken e Doehlert proporcionaram uma rápida e eficiente estratégia para avaliar os procedimentos de preparo de amostras e condições experimentais do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. A função desejabilidade e resposta múltipla foram adequadas para a otimização dos métodos analíticos.

A análise multivariada de dados usando PCA e HCA avaliou a tendência e a similaridade de amostras charuto, fumo desviado e de corda comercializadas em Salvador, através da composição elementar. O produto de tabaco denominado charuto apresentou padrões diferentes no conteúdo inorgânico em relação ao fumo de corda e

desafiado. Os resultados mostraram que Ca, Cd, K, Mg, Ni, P, S, Sr, Ti e Zn foram os principais elementos químicos para a tendências e similaridades entre as amostras.

O método de extração *in vitro* SBET mostrou ser uma alternativa simples e de baixo custo para estimar a bioacessibilidade de macroelementos, Ca, K, Na, P, e microelementos, Al, Cd, Cu, Fe, Ti, V e Zn presentes em amostras de fuma de corda consumido de forma mascada (sem fumaça).

Os métodos analíticos desenvolvidos apresentaram potencial para serem aplicados em análise de rotina na indústria de produtos de tabaco para atender as exigências do mercado de exportação e recomendações do MAPA e da ANVISA.

PERSPECTIVAS DE TRABALHOS

Outras estratégias analíticas de baixo custo como os métodos analíticos envolvendo sistema de pré-concentração poderão ser desenvolvidas para determinação de um maior número de elementos potencialmente tóxicos tais como, chumbo, mercúrio, arsênio, selênio, cromo, que poderão estar presentes nos produtos de tabaco, cujas informações de suas concentrações estão sendo solicitadas pela ANVISA.

Um método para estimativa da bioacessibilidade *in vitro* envolvendo outras fases poderá ser aplicado nas amostras de produtos de tabaco, levando em consideração as três áreas do sistema digestivo (boca, estômago e intestino).

A análise direta da amostra pode ser um método analítico alternativo para determinação de elementos traço em produtos de tabaco usando técnicas espectroanalíticas.

REFERÊNCIAS

- [1] ZAPRJANOVA, P.; DOSPATLIEV, L.; ANGELOVA, V.; IVANO, K. Correlation between soil characteristics and lead and cadmium content in the aboveground biomass of Virginia tobacco. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.163, p.253–261, 2010.
- [2] KHLIFI, R.; HAMZA-CHAFFAI, AMEL. Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: A review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 248, p. 71–88, 2010.
- [3] GURUMURTHY, K.T.; VAGEESH, T.S. Leaf yield and nutrient uptake by FCV tobacco as influenced by K and Mg nutrition. **Karnataka Journal of Agricultural Science**, v. 20, p.741-744, 2007.
- [4] PAPPAS, R. S. Toxic elements in tobacco and in cigarette smoke: inflammation and sensitization. **Metallomics**, v. 3, p.1181-1198, 2011.
- [5] HOYOS C, V.; MAGNITSKIY, S.; PLAZA T, G. Effect of fertilization on the contents of macronutrients and chlorine in tobacco leaves cv. flue-cured (*Nicotiana tabacum* L.) in two municipalities in Huila, Colombia. **Agronomía Colombiana**, v.33, p.174-183, 2015.
- [6] VERMA, S.; YADAV, S.; SINGH, I. Trace metal concentration in different Indian tobacco products and related health implications. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.2291–2297, 2010.
- [7] PÉREZ-BERNAL, J.L; AMIGO, J.M.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; BELLO, M.A.; CALLEJÓN-MOCHÓN, M. Trace-metal distribution of cigarette ashes as

- marker of tobacco brands. **Forensic Science International**, v.204, p. 119–125, 2011.
- [8] DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; WILLIAMS, C. B., Recent advances in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.32, p.1283-1296. 2017.
- [9] KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M.; AMARASIRIWARADENA, C. J.; FONER, H.; MARTINES, L. Determination of the residual carbon content by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after decomposition of biological samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.7, p.845–850, 1992.
- [10] NOVAES, C. G., BEZERRA, M.A., da SILVA, E. G. P., DOS SANTOS, A.M. P.; ROMÃO, I. L.S.; Neto, J. H. S. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemica Journal**, v.128, p. 331-346, 2016.
- [11] BEZERRA, M.A.; FERREIRA, S.L.C., NOVAES, C. G.; dos SANTOS, A.M. P.; VALASQUES, G. S.; CERQUEIRA, U. M. F. M.; dos ALVES, J. P. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v.194, p.941–959, 2019.
- [12] KAZI, T.G, JALBANI, N.; ARAIN, M. B.; JAMALI, M. K, AFRIDI, H. I. Determination of toxic elements in different brands of cigarette by atomic absorption spectrometry using ultrasonic assisted acid digestion, **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 154, p.155-167, 2009.

- [13] ALMEIDA, T.S.; de ANDRADE, R.M.; DE GOIS, J.S.; BORGES, D. L. G. Development of a simple and fast ultrasound-assisted extraction method for trace element determination in tobacco samples using ICP-MS. **Interntional Journal of Environmental Analtical Chemistry**, v. 94, p. 756-764, 2014.
- [14] LUGON-MOULIN,N.; MARTIN,F.; KRAUSS,M.R.; RAMEY, P.B.; ROSSI,L. Cadmium concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) from different countries and its relationship with other elements, **Chemosphere**, v. 63, p.1074–1086, 2006.
- [15] MUSHARRAF, S.G.; SHOAIB, M.; SIDDIQUI, A.J.; NAJAM-UL-HAQ, M, AHMED, A. Quantitative analysis of some important metals and metalloids in tobacco products by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). **Chemistry Central Journal**, v.6, p.56, 2012.
- [16] CRISPINO, C. C.; FERNANDES, K. G.; KAMOGAWA, MY. ; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R.A.; FERREIRA, M. M.C. Multivariate Classification of Cigarettes According to Their Elemental Content Determined by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 23, p. 435-438, 2007.
- [17] NG, J. C.; JUHASZ, A.; SMITH, E.; NAIDU, R.; Assessing the bioavailability and bioaccessibility of metals and metalloids. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 8802-8825, 2015.
- [18] INTAWONGSE, M.; DEAN, J. R.; Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. **Environmental Pollution**, v.152, p.60-72, 2008.

- [19] SOARES, E.L.C.; VIGNOLI-SILVA, M.; VENDRUSCOLO, G. S.; THODE, V. A.; da SILVA, J. G.; MENTZ, L. A. Família Solanaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 177-188, 2008.
- [20] BENOWITZ, N.L. Pharmacology of nicotine: Addiction and Therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.36, p.597-613, 1996.
- [21] MUAKAD,I.B, Tabagismo: maior causa evitável de morte do mundo. **Revista da Faculdade de Direito**, v. 109, p. 527-558, 2014.
- [22] NARDI, J. B. *O fumo brasileiro no período colonial*. São Paulo: Ed. Brasiliense, 1996.
- [23] de OLIVEIRA, J. M. C. A cultura do fumo na Bahia: refletindo sobre a convenção-quadro. **Bahia Agrícola**, v.7, p. 57-63, 2006.
- [24] SOUZA CRUZ. História do tabaco. Disponível em: <<http://www.souzacruz.com.br>. acesso: 02 de novembro de 2018].
- [25] VALLE, L,B,S.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; DELUCIA, R.; OGA S. **Farmacologia Integrada**, 3ª edição, Rio de Janeiro, Editora Revinter, 2007.
- [26] <http://www.sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/exportacao/> acesso: 05/01/2019.
- [27] FIGUEIREDO, A. Programa de diversificação de lavouras de tabaco nas encostas da serra geral, atividades e potencialidades. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias, 2008.
- [28] HEEMANN, F. O cultivo do fumo e condições de saúde e segurança dos trabalhadores rurais. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do

Sul. Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, 2009.

- [29] <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias/2014/09/22/exporta-de-fumo-mantem-cultivo-local>.
- [30] REICHERT, J.M.; PELLEGRINI, A.; RODRIGUES, M. F.; TIECHER, T.; dos SANTOS, D. R. Impact of tobacco management practices on soil, water and nutrients losses in steeplands with shallow soil. **Catena**, v.183, p.104215, 2019.
- [31] WEISS, C.; SANTOS, M.A. A Cadeia Agroindustrial Do Tabaco Após Dez Anos Do Tratado De Saúde Pública Internacional, **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11,p.1 2015.
- [32] <https://afubra.com.br/fumicultura-mundial.html>. Acesso: 06/01/2020.
- [33] <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106510/106594/Guia+para+o+profissional+do+SNVS+-+Controle+de+produtos+derivados+do+tabaco/5028297a-e473-4e72-b6e0-693cb79a46e6> (acesso 03 janeiro de 2020).
- [34] VIEGAS, C. A. A. Noncigarette forms of tobacco use. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, p.1069-1073, 2008.
- [35] http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_62_2010_COMP.pdf/cf4410ed-ed85-48c9-bbd8-d78934e9cbbc Acesso: 05 de fevereiro de 2020.
- [36] Brasil. Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva. A situação do tabagismo no Brasil: dados dos inquéritos do Sistema Internacional de

- Vigilância, da Organização Mundial da Saúde, realizados no Brasil, entre 2002 e 2009. Rio de Janeiro: Inca; 2011.
- [37] MOKDAD, AH.; MARKS, J.S, STROUP, D.F.; GERBERDING, JL. Actual causes of death in the United States, 2000. **JAMA**, v.291, p.1238-1245, 2004.
- [38] YOUSUF,H.; HOFSTRA, M.; TIJSSEN, Jan.; LEENEN, B.; LINDEMANS, J. W.; ROSSUM, A.; Narula, J.; HOFSTRA, L. Estimated Worldwide Mortality Attributed to Secondhand Tobacco Smoke Exposure, 1990-2016. **JAMA NETWORK OPEN**, v.3, p.2020.
- [39] PACOTE, E. C.; JANG, D. Y.; KIM, H. S.; LEE, S. H.; KIM, H.J.;CHO, H. S.; KWON, K. H.; PARQUE, K. H.; LIM, K.; CHOI, D. W. Avaliação do risco de mistura de constituintes de fumo de cigarro convencionais gerados a partir de cigarros de baixo rendimento em fumadores sul-coreanos. **Toxicologia Regulatória e Farmacologia**, v.94, p.152-162, 2018.
- [40] da CUNHA, G. H.; JORGE, A. R. C.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; VASCONCELOS, S. M. M. Nicotina e tabagismo. Artigos de revisão. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 1, p. 1-10, 2007.
- [41] MARQUES, A. C. P. R.; CAMPANA, A.; GIGLIOTTI, A.P.; LOURENÇO, M. T. C, FERREIRA, M. P.; LARANJEIRA, R. Consenso sobre o tratamento da dependência de nicotina. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, p.200-214, 2001.
- [42] <http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/AGENCIAS/ANVISA/RS0320-210799.PDF>. Acesso: 21 de junho de 2018.

- [43] CASETTA, B.; VIDELA, A.J.; BARDACH, A.; MORELLO, P.; SOTO, N.; LEE, K.; CAMACHO, P. A.; MOQUILLAZA, R. V. H.; CIAPPONI, A. Association Between Cigarette Smoking Prevalence and Income Level: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 19, 2017.
- [44] WANGA, J-A.; YANGA, G-H.; LIA, C-X. Zonal distribution of neutral aroma components in flue-cured tobacco leaves. **Phytochemistry Letters**, v.24, p.125-130, 2018.
- [45] ZOFFOLI, H. J.O.; AMARAL-SOBRINHO, N. M. B.; ZONTA, E.; LUISI, M. V.; MARCON,G.; TOLÓN-BECERRA, A. Inputs of heavy metals due to agrochemical use in tobacco fields in Brazil's Southern Region. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.185, p.2423-2437, 2013.
- [46] SAHA, N.; RAHMAN, M.S.; JOLLY, Y. N.; RAHMAN, A.; SATTAR, M. A.; HAI, M. A. Spatial distribution and contamination assessment of six heavy metals in soils and their transfer into mature tobacco plants in Kushtia District, Bangladesh. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, p.3414-3426, 2016.
- [47] LIU, H.; WANG, H.; ZHANG, Y.; YUAN, J, PENG, Y.; LI, X.; SHI, Y.; HE, K.; ZHANG, Q. Risk assessment, spatial distribution, and source apportionment of heavy metals in Chinese surface soils from a typically tobacco cultivated area. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p.16852-16863, 2018.

- [48] MENG, L.; DONG, J-X.; WANG, S-S.; SONG, K.; LING, A-F.; YANG, J-G.; XIAO, Z-X.; LI, W.; SONG, W-J, LIANG, H-B. Differential responses of root growth to nutrition with different ammonium/nitrate ratios involve auxin distribution in two tobacco cultivars. **Journal of Integrative Agriculture**, v.18, p.2703-2715, 2019.
- [49] VIDAL, E.A.; GUTIERREZ, R.A. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p.521-529, 2008.
- [50] PARKER, R.G. 2009. Evaluation of nitrogen sources and rates on yield and quality of modern flue-cured tobacco cultivars. PhD thesis. North Carolina State University, Raleigh, NC.
- [51] COLLINS, W.K.; HAWKS, S.N Jr. Principles of flue-cured tobacco production. Raleigh: Raleigh, North Carolina State University; 1993.
- [52] LI, H.; LI, X.; DUAN, Y., ZHANG, K.Q.; YANG, J. Biotransformation of nicotine by microorganism: the case of *Pseudomonas* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.86, p.11–17, 2010.
- [53] HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I. Chemistry and toxicology. In: Shopland D. Cigars: health effects and trends. Darby: Diane Publishing; p.55-104.1998.
- [54] NAGARAJAN, K.; PRASADRAO, J.A.V. Textbook of field crops production. New Delhi: Directorate of Information and Publication of Agriculture Indian Council of Agricultural Research Krishi Anusandhan Bhavan; 2004.

- [55] ZHIJIAN, X.; YAQIN, H.; CHANGXU, X.; SHUXIN, T. Effects of Transplanting Time on 15-Nitrogen Utilization and Industrial Quality of Flue-Cured Tobacco **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.41:e0160537,2017.
- [56] VALLE LBS; OLIVEIRA-FILHO RM; DELUCIA R; OGA S. Farmacologia Integrada, 3ª edição, Rio de Janeiro, Editora Revinter, 2007.
- [57] KAMPA, M.; CASTANAS, E.; Human health effects of air pollution. **Environmental Pollution**, v.151, p.362–367, 2008.
- [58] MEULENBELT, J. Nitrogen and nitrogen oxides, **Medicine**, v.31, p.64. 2003.
- [59] SHIHADDEH, A.; SALMAN, R.; JAROUDI, E.; SALIBA, N.; SEPETDJIAN, E.; BLANK, M.D.; COBB, C.O.; EISSENBERG, T. Does switching to a tobacco-free waterpipe product reduce toxicant intake? A crossover study comparing CO, NO, PAH, volatile aldehydes, “tar” and nicotine yields. **Food and Chemical. Toxicology**. v.50, p.1494–1498, 2012.
- [60] YELLEN, G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. **Nature**, v.419, p. 35- 42, 2002.
- [61] HAGHIGHI, H.; DALIRI, M. S.; MOBASER, H. R.; MOOSAVI, A. A.Effect of Different Nitrogen and Potassium Fertilizer Levels on Quality and Quantity Yield of Flue-Cured Tobacco (Coker 347). **World Applied Sciences Journal**, v.15, p.941-946, 2011.
- [62] MINER, G.S.; TUCKER, M.R. 1990. Plant analysis as an aid in fertilizing tobacco. pp. 645-657. In: Westerman, R.L. (ed.).

Soil testing and plant analysis. 3rd ed. Soil Science Society of America Book Ser. 3. SSSA, Madison, WI.

- [63] ZHAO, Z.; LI, C.; YANG, Y.; ZHANG, F.. 2010. Why does potassium concentration in flue-cured tobacco leaves decrease after apex excision? **Field Crops Res.** v.116, p.86-91.
- [64] DAVIS, D.L.; NIELSEN, M.T.; Eds. Tobacco : Production, Chemistry, and Technology. Malden, MA: Blackwell Science, 1999. Pp. 265-284.
- [65] M. C. Latham, *In FAO Foods and Nutrition Series 29*. Rome, Italy: FAO (1997).
- [66] ANTOSIEWICZ, D. M. Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. **Environmental Pollution**, v.134, p. 23–34, 2005.
- [67] LÓPEZ-LEFEBRE, L.R.; RIVERO, R.M.; GARCÍA, P.C.; SÁNCHEZ, E.; RUIZ, J.M.; ROMERO, L. Effect of calcium on mineral nutrient uptake and growth of tobacco. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.1334-1338, 2001.
- [68] CAMPOS, B, A.; **Benefícios do magnésio para a saúde**. Graduação, Departamento de Ciências Exatas e da Terra da Fundação Educacional do Município de Assis, Assis, 2012.
- [69] SMITH, W. 2009. Managing nutrients. pp. 58-81. In: Flue-cured tobacco guide. North Carolina State University, Raleigh, NC.

- [70] PINKERTON, A. Recovery of flue-cured tobacco from magnesium deficiency: changes in leaf magnesium content and effects on leaf quality. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.23, p.641-649, 1972.
- [71] ROJO L., W. 2008. Guía de manejo nutrición vegetal de especialidad: tabaco. SQM, Santiago.
- [72] DOS SANTOS, D. R.; GATIBONIII, L. C.; KAMINSKII, João. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v.38, p.576-586, 2008.
- [73] BALLARI, M.H. 2005. Tabaco Virginia: Aspectos ecofisiológicos de la nutrición en condiciones de cultivo. Editorial Alejandro Graziani, Cordoba, Argentina.
- [74] ABREU.S. O enxofre como agente fertilizante na linha de plantio. Blog Nutrição de Safras. Disponível em: <https://www.nutricaoodesafras.com.br/o-enxofre-como-agente-fertilizante-na-linha-de-plantio/>. Acesso em: 03 janeiro de 2020.
- [75] MALAVOLTA, E. Elementos de Nutrição Mineral de Plantas. São Paulo: Editora agronômica Ceres Ltda. 1980. 251 p.
- [76] FOY, C. D. Effects of aluminum on plant growth. In: CARSON, E. W. Ed. The plant root and its environment. Charlottesville: University Press of Virginia, 1974. p. 601-642.
- [77] GOYER, RA: Toxic effects of metals. In Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 5th edition. Edited by Klaasen CD. McGraw-Hill: New York; 1996:691–736.

- [78] BURGE, P. S.; SCOTT, J.A.; MCCOACH, J. Occupational asthma caused by aluminum. **Allergy**, v.55, p.779–780, 2000.
- [79] KELLEHER, P.; PACHECO, K.; Newman, L.S. Inorganic Dust Pneumonias: The Metal-Related Parenchymal Disorders. **Environ Health Perspect**, v.108(Supplement 4), p.685–696, 2000.
- [80] PERL, D. P.; GOOD, P. F. Uptake of aluminium into central nervous system along nasal-olfactory pathways. **Lancet**, 1987, v.1, p.1028.
- [81] MUTTI, A.; CORRADI, M.; GOLDONI, M.; VETTORI, M.V.; BERNARD, A. APOSTOLI, P., Chest, Exhaled Metallic Elements and Serum Pneumoproteins in Asymptomatic Smokers and Patients With COPD or Asthma. v.129, p.1288–1297, 2006.
- [82] ATSDR. Toxicological Profile for Barium. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp24.pdf>, 2007, 10, 29, 57.
- [83] ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Draft toxicological profile for barium and barium compounds. Toxicological profile, barium. U.S. Department of Health and Human Services (2005).
- [84] LUKASIK-GLEBOCKA, M.; SOMMERFELD, K.; HANC, A.; GRZEGOROWSKI, A.; BARALKIEWICZ, D.; GACA, M.; ZIELINSKA-PSUJA, B. Barium determination in gastric contents, blood and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry in the case of oral barium chloride poisoning. **Journal of Analytical Toxicology**, v.38, p.380–38, 2014.

- [85] MCLAUGHLIN, M.J., SINGH, B.R., 1999. In: Cadmium in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- [86] ZHANG, B.; SHANG, S.; JABEEN, Z. Guoping Zhang. Involvement of ethylene in alleviation of Cd toxicity by NaCl in tobacco plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.101, p. 64–69, 2014.
- [87] LUGON-MOULIN, N.; ZHANG, M.; GADANI, F.; ROSSI, L.; KOLLER, D.; KRAUSS, M., et al.,. Critical review of the science and options for reducing cadmium in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and other plants. **Advances in Agronomy**, v.83, p.111–180, 2004.
- [88] ROSÉN, K.; ERIKSSON, J.; VINICHUK, M. Uptake and translocation of ¹⁰⁹Cd and stable Cd within tobacco plants (*Nicotiana sylvestris*). **Journal of Environmental Radioactivity**, v.113, p.16-20, 2012.
- [89] International Agency for Research on Cancer. [accessed 20 November 2012] Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans. 2009. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthgr01.php>
- [90] Research Triangle Institute (RTI) and Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1999. Toxicological profile for cadmium. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
- [91] SUWAZONO, Y.; KIDO, T.; NAKAGAWA, H.; NISHIJO, M.; HONDA, R.; KOBAYASHI, E.; DOCHI, M.; NOGAWA, K. Biological half-life of cadmium

- in the urine of inhabitants after cessation of cadmium exposure. **Biomarkers**, v. 14, p.77–81, 2009.
- [92] MARK, R.; FRESQUEZ, R.; STEVEN, P.; WATSON, C.H. Establishment of Toxic Metal Reference Range in Tobacco from U.S. Cigarettes, **Journal of Analytical Toxicology**, v.37, p.298–304, 2013.
- [93] Profigen. Nutrição Mineral. Disponível em:
<https://profigen.com.br/informacoes/dicas/nutricao-de-mineral-96>. Acesso 03 janeiro de 2020.
- [94] TRIVEDY, C.; MEGHJI, S.; WARNAKULASURIYA, K.; JOHNSON, N.W, HARRIS, M. Copper stimulates human oral fibroblasts in vitro: a role in the pathogenesis of oral sub mucous fibrosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.30, p.465–470, 2001.
- [95] ATSDR, Toxicological Profile for Copper, <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp132-c3.pdf>, 2004, 16, 22–23.
- [96] MASSADEH, A.; GHARIBEH, A.; OMARI, K.; AL-MOMANI, I.; ALOMARY, A.; ALOMARI, A.; TUMAH, H.; HAYAJNEH, W.; BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH. Simultaneous determination of Cd, Pb, Cu, Zn, and Se in human blood of jordanian smokers by ICP-OES, v.133, p. 1–11, 2010.
- [97] TRIPATHI, P.; SRIVASTAVA, S. Mechanism to combat cobalt toxicity in cobalt resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p.336–344, 2007.

- [98] LINNEBERG, A.; NIELSEN, N.H.; MENNE, T.; MADSEN, F. JØRGENSEN, T. Smoking might be a risk factor for contact allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111, p. 980–984, 2003.
- [99] HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.246, p.501–514, 1986.
- [100] PADMAVATHI, P.; REDDY, V. D.; VARADACHARYULU, N, Influence of Chronic Cigarette Smoking on Serum Biochemical Profile in Male Human Volunteers. **Journal of Health Sciences**, v.55, p.265–270, 2009.
- [101] ANDRADE, V.M.; MATEUS, M.L.; BATOREU, M.C.; ASCHNER, M.; SANTOS, A.P.M. Lead, arsenic, and manganese metal mixture exposures: focus on biomarkers of effect. **Biological Trace Element Research**, v.166, p.13–23, 2015.
- [102] MORSY, M.A.; KHALED, M. M. Direct Electron Paramagnetic Resonance Study of Tobacco. 1. Manganese(II) as a Marker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.683–686, 2001.
- [103] HAKALA, M.; RANTAMAKI, S.; PUPUTTI, E.-M.; TYYSTJARVI, T.; TYYSTJARVI, E. Photoinhibition of manganese enzymes: insights into the mechanism of photosystem II photoinhibition. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1809–1816, 2006.
- [104] KIM, J.G.; DIXON, J.B.; CHUSUEI, C.C.; DENG, Y. Oxidation of Chromium(III) to (VI) by Manganese Oxides. **Soil Science Society of America Journal**, v.66, p.306–315, 2002.

- [105] LEIKAUFF, G.D. Hazardous Air Pollutants and Asthma. (Supplement 4), **Environmental Health Perspectives**, v.110, p. 505–526, 2002.
- [106] BASTARACHE, E. Molybdenum and compounds, 2003. Retrieved October 23, 2007, from <http://ceramic-materials.com/ceramat/education/186.html>
- [107] ADRIANO, D.C. Trace elements in the terrestrial environment. New York, Springer, 1986.
- [108] International Agency for Research on Cancer: Tobacco Smoke and Involuntary Smoking, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. France 2004, 83:121–844.
- [109] TSUCHIYAMA, F.; HISANAGA, N.; SHIBATA, E.; AOKI, T.; TAKAGI, H.; ANDO, T.; TAKEUCHI, Y. Pulmonary metal distribution in urban dwellers. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v.70, p.77–84, 1997.
- [110] BAKIRCIOGLU, D.; KURTULUS, Y. B.; UCAR, G. Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.202-207, 2011.
- [111] CHIBA, M. and MASIRONI, R. Bull. World Health Organization. v.70, p.269 - 275, 1992.
- [112] BERNHARD, D.; Rossmann, A.; Wick, Georg. Critical Review. Metals in Cigarette Smoke. IUBMB Life, v.57, p.805-809, 2005.

- [113] HUSTED, S.; PERSSON, D. P.; LAURSEN, K.H.; HANSEN, T. H.; PEDAS, P. SCHILLER, M.; HEGELUND, J. N.; SCHJOERRING, J.K. Review: The role of atomic spectrometry in plant science, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.26, p. 52-79, 2011.
- [114] PINTO, E.; CRUZ, M.; RAMOS, P.; SANTOS, A.; ALMEIDA, A. Metals transfer from tobacco to cigarette smoke: Evidences in smokers' lung tissue. **Journal of Hazardous Materials**, v, 325, p.31–35, 2017.
- [115] PAPPAS, R. S.; MARTONE, N.; GONZALEZ-JIMENEZ, N.; FRESQUEZ, M. R.; WATSON, C.H. Determination of Toxic Metals in Little Cigar Tobacco with 'Triple Quad' ICP-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v.39, p.347-352, 2015.
- [116] ARMENDÁRIZ, C.R.; GARCIA, T.; SOLER, A.; GUTIÉRREZ, Á. J.; GLEZ-WELLER, F. D.; GONZÁLEZ, G. L.; CONSUELO, A. H. la T, Revert Gironés. Heavy metals in cigarettes for sale in Spain. **Environmental Research**, v.143, p.162-169, 2015.
- [117] MERMET, J.M., Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics. **Analytica Chimica Acta**, v.250 p.85–94,1991.
- [118] SILVA, F.V.; TREVIZAN, L.C.; SILVA, C.S.; NOGUEIRA, A. R. A.; NOBREGA, J.A. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. **Spectrochimica Acta PartB**, v.57, p.1905–1913, 2002.

- [119] MERMET, J. M. Ionic to atomic line intensity ratio and residence time in inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry. **Spectrochimica Acta**, v.44, p.1109-1116, 1989.
- [120] FERREIRA,S.L.C.; KORN, M.G.A.; FERREIRA, H.S.; da SILVA, E.G.P.; ARAUJO, R.G.O.; SOUZA, A.S.; MACEDO, S.M.; LIMA, D.D.C.; AMORIM, F.A.C.; BOSQUE-SENDRA, J.M. Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.42, p.475-491, 2007.
- [121] FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, G.C.; da SILVA, E.G.P.; PORTUGAL, L.A.; dos REIS, P.S. SOUZA, A.S.; dos SANTOS, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, **Analytica Chimica Acta**, v.597, p.179–186. 2007.
- [122] CALLAO, M.P. Multivariate experimental design in environmental analysis, **TrACTrends Anal. Chem.** v.62, p.86–92, 2014.
- [123] CANDIOTI, L. V.; de ZAN, M. M.; CÁMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization, Using the desirability function in analytical methods development, **Talanta**, v.124, p. 123–138, 2014.
- [124] WANG, J.; WAN, W. Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.1253-1259, 2009.
- [125] CALADO, V.; MONTGOMERY, D. Planejamento de experimentos usando o estatística, 1ª ed. Rio de Janeiro: E-Papers, 2003.

- [126] SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Principles of Instrumental Analysis. 5th ed. New York: Saunders College Publishing.1998.
- [127] SCHIAVO, D.; TREVIZAN, L.C.; FILHO, E.R.P.; NOBREGA, J.A.Evaluation of the use of multiple lines for determination of metals in water by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial viewing. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p.544–548, 2009.
- [128] MONTASER, A.; GOLIGHTLY, DW., Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic, Spectroscopy, VCH Publisher, New York, 1992.
- [129] KELNER, R.; MERMET, J.M.; OTTO, M.; WIDMER, H:M: Analytical chemistry. New York: Wiley- VCH. 1998.
- [130] Leite, F. Validação em análise química. Editora átomo, 4^a Ed, p.278. 2002.
- [131] KRUG, F. J, ROCHA, F.R.P. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. Edit. SBQ, Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, p.35-37, 2016.
- [132] SWAMI, K.; JUDD, C.D.; ORSINI, John. Trace Metals Analysis of Legal and Counterfeit Cigarette Tobacco Samples Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. **Spectroscopy Letters**, v.42, p.479-490, 2009.
- [133] LEVENT,A, YARDIM, Y, DEMIR,C. Determination of Trace Metal and Mineral Levels in the Tobacco and Cigarette samples using by FAAS. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v.35, p. 257-261, 2013.

- [134] AJAB, H.; YAQUB, A.; AKBARMALIK, S.; JUNAID, M.; YASMEEN, S.; ABDULLAH, M.A. Characterization of Toxic Metals in Tobacco, Tobacco Smoke, and Cigarette Ash from Selected Imported and Local Brands in Pakistan. **The Scientific World Journal**, v, 2014, Article ID 413614, 5 pages
- [135] PELIT, F. O.; DEMIRDÖĞEN, R. E.; HENDEN, E. Investigation of heavy metal content of Turkish tobacco leaves, cigarette butt, ash, and smoke, **Environmental Monitoring and Assessment**, v.185, p.9471-9479, 2013.
- [136] REGASSA, G; CHANDRAVANSI, B.S. Levels of heavy metals in the raw and processed Ethiopian tobacco leaves, **Springer Plus** v.5,p.232, 2016.
- [137] REN, T.; CHEN, X.; Ge, Y.; ZHAO, L.; ZHONG, R. Determination of heavy metals in cigarettes using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v.9, p. 4033, 2017.
- [138] VIANA,G.F.S.; GARCIA, K. S.; MENEZES-FILHO, J. A. Assessment of carcinogenic heavy metal levels in Brazilian cigarettes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.181, p.255–265, 2011.
- [139] POURKHABBAZ, A.; POURKHABBAZ, H. Investigation of toxic metals in the tobacco of different Iranian cigarette brands and related health issues. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v.15 p.636–644, 2012.
- [140] ENGSTRÖMA, E.; STENBERG, A.; SENIOUKH, S.; EDELBRO, R.; DOUGLAS, C.; BAXTER, I. R. Multi-elemental characterization of soft biological tissues by inductively coupled plasma–sector field mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.521, p.123–135, 2004.

- [141] BIZZI, C. A.; FLORES, E. L. M.; NOBREGA, J.A.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDTA, L.; MORTARI, S.R., Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.29, p. 332–338, 2014.
- [142] MESKO, M. F.; PEREIRA, J. S. F.; MORAES, D. P.; BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; PANIZ, J. N. G.; NOBREGA, JA.; KORN M. G. A.; FLORES, E. M. M. Focused Microwave-Induced Combustion: A New Technique for Sample Digestion, **Analytical Chemistry**, v. 82, p.2155–2160, 2010.
- [143] GOUVEIA, S.T.; SILVA,F.V.; Costa, L.M.; NOGUEIRA, A.R.A. NOBREGA J.A. Determination of residual carbon by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations, **Analytica Chimica Acta**, v.445, p.269–275, 2001.
- [144] KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G.S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p.186–199, 2014.
- [145] BRERETON, R.G. Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons, New York, 2002.
- [146] SZYMANSKA, E.; GERRETZEN, J.; ENGEL, J.; GEURTS, Br.; BLANCHET L.; BUYDENS, L.M.C. Chemometrics and qualitative analysis have a vibrant relationship. **Trends in Analytical Chemistry**,v.69, p.34–51 2015.

- [147] JOLLIFFE, I.T. CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, A 374: 20150202.
- [148] DASZYKOWSKI, M.; KACZMAREK, K.; HEYDEN, Y.V.; WALCZAK, B. Robust statistics in data analysis-a review basic concepts. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 85, 203-219, 2007.
- [149] NETO, J.M.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v.21, p.467-469, 1998.
- [150] RAMOS, G. R.; ALVAREX-COQUE, M. C. G. Quiomimetria, Editorial Sintesis S.A., **Madrid**, Espanha, p 133-181, 2001.
- [151] CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C.Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, p.481-487, 2007.
- [152] PRATA, V. M, EMÍDIO, E. S. DÓREA, H. S. Aplicação de métodos quimiométricos na caracterização de charutos utilizando extração por dispersão da matriz em fase sólida e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p.53-58, 2011.
- [153] RODRIGUES, S.M.; CRUZ, N.; CARVALHO, L.; DUARTE, A.C.; PEREIRA, E.; BOIM, A.G.F.; ALLEONI, L.R.F.; RÖMKENS, P.F.A.M. Evaluation of a single extraction test to estimate the human oral bioaccessibility of potentially toxic elements in soils: Towards more robust risk assessment; **Science of the Total Environment**, v.635, p.188–202, 2018.

- [154] OOMEN, A.G.; HACK, A.; MINEKUS, M.; ZEIJDNER, E.; CORNELIS, C.; SCHOETERS, G.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T.V.D.; WRAGG, J.; ROMPELBERG, C.J.M.; SIPS, A.J.A.M.; WIJNEN, J.H.V. Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 3326- 3334, 2002.
- [155] SCHEFFLER, G.L.; SADIQ, N.W.; POZEBON, D. BEAUCHEMIN, D. Risk assessment of trace elements in airborne particulate matter deposited on air filters using solid sampling ETV-ICPOES to measure total concentrations and leaching with simulated saliva, gastric juice and lung fluid to estimate bioaccessibility. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.33, 1486-1492, 2018.
- [156] HORNER, N. S.; BEAUCHEMIN, D. The effect of cooking and washing rice on the bio-accessibility of As, Cu, Fe, V and Zn using an on-line continuous leaching method. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 28-35, 2013.
- [157] WAISBERGA, M.; BLACK, W.D.; WAISBERGA, C.M. ; HALE, B. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.835–842, 2004.
- [158] RODRIGUES, S.M.; CRUZ, N.; CARVALHO, L.; DUARTE, A.C.; PEREIRA, E.; BOIM, A.G.F.; ALLEONI, L.R.F.; RÖMKENS, P.F.A.M. Evaluation of a single extraction test to estimate the human oral bioaccessibility of potentially toxic elements in soils: Towards more robust risk assessment. **Science of the Total Environment**, v.635, p.188–202, 2018.

- [159] RUBY, MV.; DAVIS, A.; KEMPTON, J.H.; DREXLER, JW.; BERGSTROM, PD. Lead bioavailability: Dissolution kinetics under simulated gastric conditions. **Environmental Science & Technology**. v.26, p.1242-1248, 1992.
- [160] SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; BRUM, B. C. T.; SANTOS, S. H.; GARCIA, C. A. B.; ARAUJO, R.G.O. Determination of nutrients in sugarcane juice using slurry sampling and detection by ICP OES, **Food Chemistry**, v.273, p.57-63, 2019.
- [161] CASTRO, J.T.; SANTOS, E.C.; SANTOS, W.P.C.; COSTA, L.M.; KORN, M.; NÓBREGA, J.A.; KORN, M.G.A. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v.78, 1378–1382, 2009.
- [162] HOUAS, I.; TEYEB, H.; A. ROCHINA-MARCO.; DOUKI, W.; NAJJAR, M.F.; GAHA L.; CERVERA M. L.; DE LA GUARDIA, M. Comparison of Mineral Contents in Three Different Tobacco Formulations. **Biomedical and Environmental Sciences**, v.30, p. 52-58, 2017.
- [163] ELSAYED, Y.; DALIBALTA, S.; EL KOUCHE, M. Chemical characterization and safety assessment of dokha: An emerging alternative tobacco product. **Science of the Total Environment**. v.615, p.9–14, 2018.
- [164] AJAB. H.; YASMEEN. S.; YAQUB. A.; AJAB. Z.; JUNAID. M.; SIDDIQUE. M.; FAROOQ. R.; MALIK. S.A Evaluation of trace metals in tobacco of local and imported cigarette brands used in Pakistan by spectrophotometer through microwavedigestion. **The Journal Toxicological Sciences**, v.33, p.415–420, 2008.

- [165] PELIT, F.O.; DEMIRDÖĞEN, R.E. HENDEN, E. Investigation of heavy metal content of Turkish tobacco leaves, cigarette butt, ash, and smoke. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p.9471–9479, 2013.
- [166] REN, T.; CHEN, X.; GE, Y.; ZHAO, L.; ZHONG, R. Determination of heavy metals in cigarettes using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v.9, p. 4033- 4043, 2017.
- [167] SILVESTRE, D. M.; LEME, F. O.; NOMURA, C. S.; do NASCIMENTO, A. N. Direct analysis of barium, calcium, potassium, and manganese concentrations in tobacco by laser-induced breakdown spectroscopy. **Microchemical Journal**, v.126, p.545–550, 2016.
- [168] FRESQUEZ, M.R.; PAPPAS, R. S.; WATSON, C.H. Establishment of Toxic Metal Reference Range in Tobacco from U.S. Cigarettes. **Journal of Analytical Toxicology**, v.37, p.298–304, 2013.
- [169] ARMENDÁRIZ, C.R.; GARCIA, T.; SOLER, A.; FERNÁNDEZ, A. J. G.; GLEZ-WELLER, D.; GONZÁLEZ, G. L.; de la TORRE, A. H.; GIRONÉS, C. R. Heavy metals in cigarettes for sale in Spain. **Environmental Research**, v.143, p. 162-169, 2015.
- [170] GAMELA, R.R.; COSTA, C.V.; PEREIRA-FILHO, R.E. Multivariate Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Procedure for the Determination of Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, and Zn in Pepper Samples by ICP OES, **Food Analytical Methods**, v.13, p. 69-77, 2020

- [171] FERREIRA, B. L.; CHAVES, E. S.; VIALICH, J.; SAUER, E. Ultrasound-assisted extraction from chocolate powder samples for the determination of Fe, K and Na. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.17, p. 236-242, 2014.
- [172] FERREIRA, H.S.; OLIVEIRA, S.S.; SANTOS, D.C.N.B.; FONTANA, K.B.; MARANHÃO, T.A.; ALMEIDA, T.S.; ARAUJO, R .G .O. Characterisation of the mineral composition of tobacco products (cigar, shredded andrope), **Microchemical Journal**, v.151, 2019.
- [173] FILGUEIRAS, A.V.; CAPELO, J.L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.53, p.433–441, 2000.
- [174] MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6^a ed. Londres: Pearson Education Limited, 2000, 2010.
- [175] MELI, M.A.; DESIDERI, D.; ROSELLI, C.; FEDUZI, L. ²¹⁰Po in human saliva of smokeless tobacco users. **Health Physics**, v.112/1, p.28–32, 2017.
- [176] BORGERDING, M.F.; BODNAR, J.A.; CURTIN, G.M.; SWAUGER, J.E. The chemical composition of smokeless tobacco: a survey of products sold in the United States in 2006 and 2007. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.64, p.367–387, 2012.
- [177] BOFFETTA, P.; HECH, S.; GRAY, T. N.; GUPTA, P.; STRAIF, K. Smokeless tobacco and cancer. **Lancet Oncol**. v.9, p. 667–675, 2008.

- [178] PAPPAS, R.S.; STANFILL, S.B.; WATSON, C.H.; ASHLEY, D.L. Analysis of toxic metals in commercial moist snuff and Alaskan iqmik. **Journal of Analytical Toxicology**, v.32, p.281–291, 2008.
- [179] DONATELLA, D.; ROSELLI, C.; FAGIOLINO, I.; MELI, M. A. Toxic Elements in Human Saliva of Smokeless Tobacco Users, **journal of Analytical Toxicology**, v. 42, p.417–424, 2018.
- [180] ARAIN, S. S.; KAZI, T. G.; ARAIN, J.B.; AFRIDI, H. I.; BRAHMAN, K. D. Naeemullah. Preconcentration of toxic elements in artificial saliva extract of different smokeless tobacco products by dual-cloud point extraction. **Microchemical Journal**, v.112, p. 42–49, 2014.
- [181] BERTIN, R. L.; MALTEZ, H. F.; GOIS, J. S.; BORGES, D. L.G. BORGES, G. S. C. GONZAGA, L.; FETT, V.R. Mineral composition and bioaccessibility in *Sarcocornia ambigua* using ICP-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.47, p. 45–51, 2016.
- [182] SANTANA, F. B.; SOUZA, L. A.; CARVALHO, W. C.; KORN, M. G. A. SANTOS, D. C. M. B. Determination and In Vitro Bioaccessibility Evaluation of Cu, Fe, Mn, and Zn in Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds by ICP OES. **Food Analytical Methods**, v.13, p.176–185, 2020.
- [183] SHIA, W.; LI, H.; ZENG, X.; ZHANG, H.; QIN, X. The extraction of tobacco protein from discarded tobacco leaf by hollow fiber membrane integrated process. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.58, p. 10224, 2019.

- [184] MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J.L.; KRAUSE - **Alimentos, Nutricao e Dietoterapia**, 14 ed., Elsevier, p. 12–92, 2012.
- [185]<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1559235653>. Acesso: 02 de março de 2018.
- [186] YANG, J.; CHEN, J.; YANG, R.; TANG, J.; HUANG, H. Research Progress of Factors Influencing the Yield and Quality of Flue-cured Tobacco. **Agricultural Science & Technology**, v. 16, p. 820-825, 2015.
- [187]http://www.cav.udesc.br/arquivos/id_submenu/954/dissertacao_juliano_de_jesus_final_entrega_cd.pdf.
- [188] WANG, J-A.; YANG, G-H.; LI, C-X. Zonal distribution of neutral aroma components in flue-cured tobacco leaves. **Phytochemistry Letters**, v.24 p.125-130, 2018.
- [189] YE, X. et al. Effect of Different Kinds of Potassium Fertilizer on the Contents of Potassium, Neutral Aroma Components and Non-volatile Organic Acids of Flue-cured Tobacco. **Chinese Journal of Soil Science**, v. 2, p. 025, 2008.
- [190] LEGGETT, J. E.; SIMS, J. L.; GOSSETT, D. R.; PAL, U. R.; BENNER, J. F. POTASSIUM AND MAGNESIUM NUTRITION EFFECTS ON YIELD AND CHEMICAL COMPOSITION OF BURLEY TOBACCO LEAVES AND SMOKE, **Canadian Journal of Plant Science**, v.57, p.159-166, 1977.
- [191]http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5594669/RDC_299_2019_.pdf/e75d4d44-f46c-45ee-b11d-3a0c80a6f936

- [192] TORJUSSEN, W.; ZACHARIASEN, H.; ANDERSEN, I. Cigarette smoking and nickel exposure. **Journal of Environmental Monitoring**, v.5, p.198-201, 2003.