

Método Oficial
TobLabNet da OMS
POP 07

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AMÔNIA EM TABACO TOTAL DE CIGARROS

**Iniciativa Livre do Tabaco Rede de
Laboratórios de Tabaco (TobLabNet)**

OPAS



**Organização
Pan-Americana
da Saúde**



**Organização
Mundial da Saúde**
ESCRITÓRIO REGIONAL PARA AS
Américas

**Método Oficial
TobLabNet da OMS
POP 07**

**Procedimento operacional padrão
para determinação de amônia
em tabaco total de cigarros**

Versão oficial em português da obra original em inglês

Standard operating procedure for determination of ammonia in cigarette tobacco filler. WHO TobLabNet Official Method SOP 07

© Organização Mundial da Saúde, 2016

ISBN: 978 92 4 151605 1 (versão eletrônica)

Método Oficial TobLabNet da OMS - POP 7. Procedimento operacional padrão para determinação de amônia em tabaco total de cigarros

ISBN: 978-92-75-72901-4 (PDF)

ISBN: 978-92-75-22901-9 (versão impressa)

© **Organização Pan-Americana da Saúde, 2024**

Alguns direitos reservados. Esta obra está disponível nos termos da licença Atribuição-NãoComercial-Compartilhável 3.0 Organizações Intergovernamentais da Creative Commons ([CC BY-NC-SA 3.0 IGO](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/)).



De acordo com os termos da licença, é permitido copiar, redistribuir e adaptar a obra para fins não comerciais, desde que se utilize a mesma licença ou uma licença equivalente da Creative Commons e que ela seja citada corretamente, conforme indicado abaixo. Nenhuma utilização desta obra deve dar a entender que a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) endossa uma determinada organização, produto ou serviço. Não é permitido utilizar o logotipo da OPAS.

Adaptações: em caso de adaptação da obra, deve-se acrescentar, juntamente com a forma de citação sugerida, o seguinte aviso legal: “Esta publicação é uma adaptação de uma obra original da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). As opiniões expressas nesta adaptação são de responsabilidade exclusiva dos autores e não representam necessariamente a posição da OPAS”.

Traduções: em caso de tradução da obra, deve-se acrescentar, juntamente com a forma de citação sugerida, o seguinte aviso legal: “Esta publicação não é uma obra original da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). A OPAS não assume nenhuma responsabilidade pelo conteúdo nem pela exatidão da tradução”.

Citação sugerida: Organização Pan-Americana da Saúde. Método Oficial TobLabNet da OMS - POP 7. Procedimento operacional padrão para determinação de amônia em tabaco total de cigarros. Brasília, D.F.; 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.37774/9789275729014>.

Dados da catalogação: podem ser consultados em: <http://iris.paho.org>.

Vendas, direitos e licenças: para adquirir publicações da OPAS, entrar em contato com sales@paho.org. Para solicitações de uso comercial e consultas sobre direitos e licenças, ver www.paho.org/es/publicaciones/permisos-licencias.

Materiais de terceiros: caso um usuário deseje reutilizar material contido nesta obra que seja de propriedade de terceiros, como tabelas, figuras ou imagens, cabe a ele determinar se necessita de autorização para tal reutilização e obter a autorização do detentor dos direitos autorais. O risco de ações de indenização decorrentes da violação de direitos autorais pelo uso de material pertencente a terceiros recai exclusivamente sobre o usuário.

Avisos legais gerais: as denominações utilizadas nesta publicação e a forma como os dados são apresentados não implicam nenhum juízo, por parte da OPAS, com respeito à condição jurídica de países, territórios, cidades ou zonas ou de suas autoridades nem com relação ao traçado de suas fronteiras ou limites. As linhas tracejadas nos mapas representam fronteiras aproximadas sobre as quais pode não haver total concordância.

A menção a determinadas empresas comerciais ou aos nomes comerciais de certos produtos não implica que sejam endossados ou recomendados pela OPAS em detrimento de outros de natureza semelhante. Salvo erro ou omissão, nomes de produtos patenteados são grafados com inicial maiúscula.

A OPAS adotou todas as precauções razoáveis para confirmar as informações constantes desta publicação. Contudo, o material publicado é distribuído sem nenhum tipo de garantia, expressa ou implícita. O leitor é responsável pela interpretação do material e seu uso; a OPAS não poderá ser responsabilizada, de forma alguma, por qualquer prejuízo causado por sua utilização.

BRA/NMH/2024

Nº: POP 07

Data: julho de 2016



Organização Mundial da Saúde Rede de Laboratórios de Tabaco

Determinação de amônia no tabaco total de cigarro

Método:	determinação de amônia no tabaco total de cigarros
Analitos:	amônia (CAS 7664-41-7)
Matriz:	Tabaco total de cigarros
Última atualização:	julho de 2016

Nº: POP 07

Data: julho de 2016

A menção de empresas específicas ou de certos produtos de fabricantes não implica que eles sejam endossados ou recomendados pela OMS em detrimento de outros de natureza similar que não são mencionados. Com exceção de erros e omissões, os nomes de produtos proprietários são diferenciados por letras maiúsculas iniciais.

Nenhum regime de tragada obtido por máquinas é capaz de representar plenamente o comportamento humano de fumar: os ensaios realizados em máquinas de fumar são úteis para caracterizar as emissões de cigarro para fins de design e regulação, mas a divulgação aos fumantes das medições em máquinas pode resultar em interpretações equivocadas a respeito das diferenças de exposição e risco existentes entre as marcas. Os dados de emissão de fumaça obtidos por medições em máquinas podem ser usados como elementos para a avaliação do perigo do produto, mas não são e nem se destinam a ser medidas válidas de exposição ou risco para os seres humanos. A apresentação de diferenças nas medições em máquina como diferenças de exposição ou risco constitui uso indevido dos resultados do ensaio com métodos recomendados da TobLabNet da OMS.

Nº: POP 07

Data: julho de 2016

PREÂMBULO

Este documento foi preparado por membros da Rede de Laboratórios de Tabaco (TobLabNet) da Organização Mundial da Saúde (OMS) como um procedimento operacional padrão (POP) de método analítico para medição de amônia em tabaco total de cigarro.

INTRODUÇÃO

Para estabelecer medidas equivalentes para o ensaio de produtos de tabaco em escala mundial é necessário que hajam métodos consensuais de medição do conteúdo e das emissões específicas dos cigarros. A Conferência das Partes da Convenção-Quadro da OMS para o Controle do Tabaco (CQCT), em sua terceira sessão, realizada em Durban (África do Sul), em novembro de 2008, “recordando as decisões FCTC/COP1(15) e FCTC/COP2(14) sobre a elaboração de diretrizes para a implementação dos artigos 9 (*Regulamentação do conteúdo dos produtos de tabaco*) e 10 (*Regulamentação da divulgação das informações sobre os produtos de tabaco*) da CQCT da OMS, observando as informações contidas no relatório de progresso do grupo de trabalho para a terceira sessão da Conferência das Partes sobre o progresso de suas atividades () solicitou ao Secretariado da da Convenção que convidasse a Iniciativa Livre do Tabaco da OMS para () validar, no prazo de cinco anos, os métodos de química analítica para ensaio e medição dos conteúdos e emissões dos cigarros” (FCTC/COP/3/REC/1).

A partir dos critérios de priorização estabelecidos na terceira reunião, realizada em Ottawa (Canadá), em outubro de 2006, o grupo de trabalho sobre os artigos 9 e 10 identificou os seguintes conteúdos cujos métodos de análise e medição (química analítica) devem ser validados prioritariamente:

- nicotina;
- amônia;
- propilenoglicol (propano-1,2-diol);
- glicerol (propano-1,2,3-triol);
- trietilenoglicol [2,2-etilenodioxibis(etanol)].

A medição desse conteúdo exigirá a validação de três métodos: um para nicotina, um para amônia e um para umectantes.

A partir dos critérios de priorização estabelecidos na reunião em Ottawa supramencionada, o grupo de trabalho identificou as seguintes emissões na corrente primária, cujos métodos de ensaio e medição (química analítica) devem ser validados prioritariamente:

- 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK);
- N-nitrosornicotina (NNN);

- acetaldeído;
- acrilaldeído (acroleína);
- benzeno;
- benzo[a]pireno;
- 1,3-butadieno;
- monóxido de carbono;
- formaldeído.

A medição dessas emissões com os dois regimes de fumada descritos adiante exigirá a validação de cinco métodos: um para nitrosaminas específicas do tabaco (NNK e NNN), um para benzo[a]pireno, um para aldeídos (acetaldeído, acroleína e formaldeído), um para compostos orgânicos voláteis (benzeno e 1,3-butadieno) e um para monóxido de carbono.

A tabela a seguir mostra os dois regimes de fumada para validação dos métodos de ensaio supracitados.

Regime de fumada	Volume da tragada (mL)	Frequência da tragada	Poros de ventilação do filtro
Regime ISO: ABNT NBR ISO 3308: Análise de rotina de cigarros em máquina de fumar – Definições e condições-padrão	35	Uma vez a cada 60s	Sem modificação
Regime intenso: igual ao estabelecido na norma ABNT NBR ISO 3308, porém com as modificações indicadas	55	Uma vez a cada 30s	Todos os poros de ventilação devem estar completamente ocluídos, conforme descrito no POP 01 da TobLabNet da OMS.

Este POP foi preparado para descrever o procedimento de determinação de amônia em fumo de cigarro.

1 ESCOPO

Este procedimento operacional padrão é apropriado para a determinação quantitativa de amônia no fumo de cigarro por cromatografia de íons.

2 REFERÊNCIAS

- 2.1** ABNT NBR ISO 8243: Cigarros – Amostragem. (ISO 8243: Cigarettes – Sampling).
- 2.2** Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime. *Guidelines on representative drug sampling*. Viena: Laboratory and Scientific Section; 2009. Disponível em inglês em: https://www.unodc.org/documents/scientific/Drug_Sampling.pdf.

- 2.3** ABNT NBR ISO 5725-1: *Exatidão (veracidade e precisão) dos métodos e dos resultados de medição – Parte 1: Princípios gerais e definições. [ISO 5725-1: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions].*
- 2.4** ABNT NBR ISO 5725-2: *Exatidão (veracidade e precisão) dos métodos e dos resultados de medição – Parte 2: Método básico para a determinação da repetibilidade e da reprodutibilidade de um método-padrão de medição. [ISO 5725-2: Accuracy (trueness and precision) or measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method].*
- 2.5** ABNT ISO Guia 34: *Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. (ISO Guide 34: General requirements for the competence of reference materials producers).*
- 2.6** AOAC 966.02: *Loss on drying (moisture) in tobacco. In: Official methods of analysis, 20th edition. Rockville, Maryland: AOAC International; 2016.*

3 TERMOS E DEFINIÇÕES

- 3.1** *Teor de amônia:* quantidade de amônia em fumo de cigarro, expressa em miligramas por grama de fumo de cigarro.
- 3.2** *Tabaco total do cigarro:* parte de um cigarro que contém tabaco, incluindo tabaco reconstituído, talos, tabaco expandido e aditivos.
- 3.3** *Produtos de tabaco:* são todos aqueles total ou parcialmente preparados com a folha de tabaco como matéria-prima, destinados a serem fumados, sugados, mascarados ou aspirados [artigo 1(f) da CQCT da OMS].
- 3.4** *Amostra laboratorial:* amostra destinada a ensaio em laboratório, que consiste em um único tipo de produto entregue ao laboratório em uma ocasião ou dentro de um período específico.
- 3.5** *Amostra para ensaio:* produto para ensaio, coletado aleatoriamente da amostra para laboratório.
- 3.6** *Parcela para ensaio:* parcela aleatória da amostra para ensaio a ser usada em determinação única.

4 RESUMO DO MÉTODO

- 4.1** A amônia é extraída do tabaco total do cigarro com uma solução de extração de ácido sulfúrico diluída, seguida por centrifugação (e filtração, se necessário).
- 4.2** O extrato é analisado por cromatografia de íons acoplada à detecção por condutividade.
- 4.3** A quantificação é obtida por calibração contra um padrão externo e por comparação da resposta de condutividade dos analitos nas amostras com a resposta dos padrões.

5 PRECAUÇÕES AMBIENTAIS E DE SEGURANÇA

- 5.1** Seguir as precauções ambientais e de segurança de rotina, como em qualquer atividade realizada em laboratório químico.
- 5.2** O ensaio e a avaliação de determinados produtos com esse método podem exigir o uso de material ou equipamento potencialmente perigoso ou prejudicial ao meio ambiente. Este documento não aborda todos os aspectos de segurança associados a seu uso. Todas as pessoas que apliquem esse método são responsáveis por, antes do seu uso, consultar as autoridades competentes e estabelecer práticas de proteção da saúde e da segurança, além de precauções ambientais, em conjunto com quaisquer exigências regulatórias pertinentes existentes.
- 5.3** É preciso ter especial cuidado para evitar a inalação ou exposição dérmica ao lidar com produtos químicos nocivos. Use capela de exaustão, além de jaleco, luvas e óculos de segurança apropriados, ao preparar ou manusear material não diluído, soluções-padrão, soluções de extração ou amostras coletadas.

6 UTENSÍLIOS E EQUIPAMENTO

Aparelhagem habitual de laboratório, em especial:

- 6.1** Balança analítica com resolução mínima de quatro casas decimais
- 6.2** Frascos Erlenmeyer de 250 mL, com tampa, ou equivalente
- 6.3** Béqueres (vários tamanhos)
- 6.4** Balões volumétricos (vários tamanhos)
- 6.5** Pipetas volumétricas para preparo de soluções padrão (vários tamanhos)
- 6.6** Amostrador automático
- 6.7** Frascos para amostrador automático, 2 mL, ou equivalente
- 6.8** Agitador mecânico tipo *wrist-action* ou equivalente
- 6.9** Cromatógrafo de íons equipado com detector de condutividade
- 6.10** Coluna de troca de cátions (250 × 4 mm)
- 6.11** Pré-coluna de troca de cátions (50 × 4 mm)
- 6.12** Supressor de cátions renovável (opcional)

Nota 1: essa é a configuração típica de instrumentos para essa análise. Espera-se que configurações alternativas (por exemplo, sem supressor) obtenham resultados semelhantes.

Nota 2: as amostras devem ser filtradas ou centrifugadas antes da análise.

- 6.13** Equipamento de filtração
- 6.13.1** Seringa, 10 mL, ou equivalente
 - 6.13.2** Peneira, 0,45 mm
 - 6.13.3** Filtro de membrana de fase aquosa, 15 mm × 0,45 µm, ou equivalente
 - 6.13.4** Papel de filtro quantitativo sem cinzas, por exemplo, Whatman n.º 40, 8 µm, ou equivalente
- 6.14** Equipamento de centrifugação
- 6.14.1** Microcentrífuga Micro 17, ou equivalente
 - 6.14.2** Frascos para microcentrífuga, ou equivalente

7 MATERIAIS E REAGENTES

Todos os reagentes devem ser pelo menos de grau analítico, exceto quando houver outra especificação. Quando possível, os reagentes serão identificados pelo número de registro no *Chemical Abstracts Service* (CAS).

- 7.1** Ácido metanossulfônico [75-75-2], pureza grau cromatográfico
- 7.2** Ácido sulfúrico concentrado [7664-93-9], porcentagem em massa: 95% a ~98%
- 7.3** Sulfato de amônio [7783-20-2], ou uma solução padrão aprovada pelo ISO Guia 34: [2.5] com concentração de amônia de 1.000 mg/L.
- 7.4** Água tipo 1 [7732-18-5]

8 PREPARAÇÃO DA VIDRARIA

- 8.1** Limpar e secar a vidraria de maneira a evitar contaminação.

Nota: recomenda-se não usar detergentes para a limpeza a fim de minimizar interferências.

9 PREPARO DE SOLUÇÕES

O método de preparo de soluções de extração e fase móvel descrito adiante é para fins de referência e pode ser ajustado, se necessário.

- 9.1** Solução de extração (ácido sulfúrico diluído, aproximadamente 0,0125 mol/L)
 - 9.1.1** Para obter uma solução de ácido sulfúrico a 0,0125 mol/L, usar a fórmula $\rho = m/V$, em que ρ é a densidade do ácido sulfúrico (1,84 g/mL) e m é a massa de ácido sulfúrico.

Nota: o acréscimo de 1,29 g de ácido sulfúrico a 1 L de água tipo 1 [7.4] produz uma diluição de ácido sulfúrico de 0,0125 mol/L.
 - 9.1.2** Identificar como “solução de extração de ácido sulfúrico diluído” e armazenar em refrigerador.
- 9.2** Fase móvel (ácido metanossulfônico em água, 0,02 mol/L).

Transferir exatamente 1,32 mL de ácido metanossulfônico [7.1] para um balão volumétrico de 1L [6.4] e completar o volume com água tipo 1 [7.4].

10 PREPARAÇÃO DOS PADRÕES

O método de preparo de soluções-padrão descrito adiante é para fins de referência e pode ser ajustado, se necessário.

10.1 Solução-padrão de amônia (aproximadamente 100 µg/mL)

10.1.1 Pesar com exatidão 0,092 g (\pm 0,002 g) de sulfato de alumínio [7.3], transferir para um béquer de 100 mL e dissolver em solução de extração [9.1]. Todos os solventes e as soluções devem estar em temperatura ambiente.

10.1.2 Transferir a solução de sulfato de amônio [10.1.1] para um balão volumétrico de 250 mL e completar o volume com solução de extração [9.1].

10.2 Padrões de trabalho

Tabela 1. Soluções-padrão de trabalho de amônia

Padrão	Volume de solução-padrão [10.1] (mL)	Volume final (mL)	Concentração aproximada de amônia na solução-padrão de trabalho (µg/mL)
1	0,01	10	0,1
2	0,05	10	0,5
3	0,2	10	2
4	0,5	10	5
5	1	10	10

Nota 1: todos os padrões são preparados em balões volumétricos nas diluições descritas. Completar o volume dos balões volumétricos com solução de extração [9.1].

Nota 2: a faixa das soluções-padrão pode ser ajustada, dependendo do equipamento usado (com ou sem equipamento de supressão) e das amostras para ensaio, tendo em mente um possível efeito sobre a sensibilidade do método.

Nota 3: pode haver mudança significativa da concentração das soluções-padrão durante o armazenamento, o que modificará o coeficiente linear da curva de calibração. Elas não devem ser armazenadas por mais de duas semanas.

Nota 4: ao calcular a concentração, é imprescindível levar em conta a pureza da amônia no padrão usado.

11 AMOSTRAGEM

11.1 Coletar amostras de cigarro em conformidade com a ABNT NBR ISO 8243 [2.1]. Podem ser usados outros métodos para obter uma amostra para laboratório representativa, de acordo com a prática de cada laboratório ou quando exigido por regulação específica ou em razão da disponibilidade de amostras.

11.2 Constituição de amostra para ensaio

11.2.1 Dividir a amostra para laboratório em unidades (por exemplo, maço, caixa), se for o caso.

11.2.2 Retirar uma quantidade igual de produto para cada amostra para ensaio de pelo menos \sqrt{n} [2.2] de cada unidade (por exemplo, maço, caixa).

12 PREPARO DOS CIGARROS

12.1 Retirar completamente o tabaco de todos os cigarros para ensaio ou das amostras para controle de qualidade (quando for o caso) de um maço (por exemplo, com 20 cigarros). Outra opção é usar pelo menos 7 g de fumo de cigarro processado.

12.2 Juntar e misturar tabaco de cigarro suficiente para obter parcelas para ensaio de pelo menos 7 g cada. As parcelas para ensaio são preparadas no mínimo em triplicata.

Nota: o tamanho da amostra pode ser ajustado, se necessário.

13 PREPARO DA MÁQUINA DE FUMAR

Não aplicável.

14 PRODUÇÃO DA AMOSTRA

Não aplicável.

15 PREPARO DA AMOSTRA

15.1 Retirar 0,7 g de cada parcela para ensaio bem misturada, pesar com exatidão de 0,0001 g e colocar em Erlenmeyer de 250 mL ou outro frasco adequado.

15.2 Acrescentar 50 mL da solução de extração [9.1] à amostra.

Nota: o peso e o fator de diluição da amostra podem ser ajustados de acordo com as concentrações de amônia ou a disponibilidade de amostra.

15.3 Tampar os frascos e colocá-los em agitador tipo *wrist-action* ou equivalente, em rotação mínima de 160 rpm por 30 min ou uma rotação adequada para o tipo de agitador mecânico usado.

- 15.4** Retirar as amostras do agitador e, com movimentos circulares, agitar cada frasco para dispersar todo o tabaco no solvente.
- 15.5** Deixar as amostras em repouso por 30 min até que o sobrenadante esteja límpido.
- 15.6** Filtrar o extrato com papel de filtro quantitativo sem cinzas de 8 µm.
- 15.7** Passar o extrato [15.6] através de um filtro de membrana de 0,45 µm para seringa.
- 15.8** Transferir o filtrado para um frasco do amostrador automático e analisar com o cromatógrafo de íons.

Nota: se o sinal da amostra (área do pico) não estiver dentro da faixa de trabalho da curva de calibração, as soluções devem ser ajustadas de acordo, ou seja, devem ser mais diluídas. Todas as diluições finais devem ser registradas no relatório da amostra.

Outra opção é seguir estas etapas:

- 15.9** Centrifugar 1,5 mL do sobrenadante a 13.000 rpm por 5 min.
- 15.10** Transferir o extrato centrifugado para um frasco do amostrador automático e analisar com o cromatógrafo de íons.

16 ANÁLISE DA AMOSTRA

Esse método usa a cromatografia de íons com detecção por condutividade para determinar a quantidade de amônia no fumo do cigarro. Os analitos são separados de possíveis interferentes na coluna. A comparação entre a área dos analitos com concentração desconhecida e a área das concentrações conhecidas no padrão permite conhecer a concentração de cada analito.

16.1 Condições de operação da cromatografia de íons

Fase móvel: ácido metanossulfônico em água, 0,02 mol/L [9.2]

Vazão: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 25 µL

Temperatura da coluna: 30 °C

Essas configurações de instrumentos e outras especificações (por exemplo, configuração do supressor de cátions) devem ser adaptadas para cada perfil de equipamento e coluna a fim de obter boa resolução e bom desempenho cromatográfico.

Nota 1: por exemplo, recomenda-se o uso de uma solução mais diluída de ácido metanossulfônico em água para a fase móvel (diluição até 10 vezes) ao trabalhar sem supressão.

Nota 2: poderá ser necessário ajustar os parâmetros de operação para as condições do instrumento e da coluna, bem como a resolução dos picos cromatográficos.

16.2 Tempos de retenção esperados

Nota: diferenças, por exemplo, no tipo e na idade da coluna alterarão os tempos de retenção.

Nas condições descritas, o tempo total de análise esperado será de aproximadamente 15 min.

16.3 Determinação da amônia

16.3.1 Condicionar o sistema antes do uso, por exemplo, pela injeção de duas alíquotas de 25 µL de uma solução da amostra como *primer*. Podem-se usar também outros procedimentos de equilíbrio sugeridos pelo fabricante.

Nota: dependendo da fase estacionária, pode ser necessário injetar um branco depois dos padrões de calibração. Deve-se também injetar um branco ao fim de um lote para reduzir a contaminação cruzada.

16.3.2 Após o condicionamento, injetar 25 µL de solução branco para checar se há contaminação do sistema ou dos reagentes.

16.3.3 Injetar uma alíquota de cada solução-padrão de amônia [10.2] no cromatógrafo de íons.

16.3.4 Avaliar os tempos de retenção e as respostas (contagens de área) dos padrões. Considera-se que o sistema está pronto para análise quando os tempos de retenção dos padrões forem semelhantes (definidos como $\pm 0,2$ min) aos tempos de retenção entre corridas no mesmo sistema, a resolução calculada for $\geq 1,5$ e as respostas estiverem no intervalo de 80% a 120% das respostas típicas em corridas anteriores.

16.3.5 Registrar as áreas do pico de amônia.

16.3.6 Traçar um gráfico das áreas de acordo com a concentração de amônia.

16.3.7 Deve-se usar as alternativas a seguir para calcular as concentrações de amônia.

Para cromatografia de íons com supressor:

Calcular uma equação de regressão quadrática ($y = ax^2 + bx + c$) a partir dos dados.

Se o coeficiente de regressão quadrática R^2 for $< 0,99$, deve-se repetir a calibração. Se um ponto de calibração diferir mais de 10% do valor esperado (calculado por regressão quadrática), deve ser omitido.

Para cromatografia de íons sem supressor:

Calcular uma equação de regressão linear ($y = a + bx$) a partir do coeficiente angular (b) e do coeficiente linear (a) da regressão linear. Se o coeficiente de regressão linear R^2 for $< 0,99$, deve-se repetir a calibração. Se um ponto de calibração diferir mais de 10% do valor esperado (calculado por regressão linear), deve ser omitido.

16.3.8 Nos dois casos, o coeficiente linear não deve ser significativamente diferente de zero sob o ponto de vista estatístico.

16.3.9 Injetar as amostras para controle de qualidade e as amostras para ensaio e determinar as áreas do pico com o software do instrumento.

16.3.10 O sinal (área do pico) obtido em todas as parcelas para ensaio deve estar dentro da faixa de trabalho da curva de calibração.

Nota: ver linhas de calibração e cromatogramas típicos no Anexo 1.

17 ANÁLISE DE DADOS E CÁLCULOS

17.1 Para cada parcela para ensaio, calcular as áreas do pico de amônia.

17.2 Calcular a concentração, em mg/mL, de íon amônio (NH_4^+) em cada parcela para ensaio dos coeficientes da regressão quadrática ou linear.

17.3 A quantidade de amônia (em mg/g de tabaco) é determinada pela seguinte fórmula:

$$M = \frac{C \times V \times 17,03}{m \times 18,04}$$

em que:

M é a concentração de amônia (NH_3) em tabaco total do cigarro, expressa em mg/g;

C é a concentração de NH_4^+ na solução da amostra obtida a partir da reta de calibração, expressa em $\mu\text{g/mL}$;

V é o volume da solução da amostra, expresso em mL;

m é a massa de tabaco, expressa em mg.

Nota 1: a massa molecular relativa de NH_3 é 17,03.

Nota 2: a massa molecular relativa de NH_4^+ é 18,04.

18 PRECAUÇÕES ESPECIAIS

Após a instalação de uma nova coluna, condicioná-la por injeção de um extrato da amostra de tabaco nas condições especificadas para o instrumento. As injeções devem ser repetidas até que as áreas (ou alturas) dos picos de amônia sejam reproduzíveis de acordo com os critérios de aceitação de cada laboratório.

19 APRESENTAÇÃO DE DADOS

19.1 Apresentar as medições individuais de cada amostra avaliada.

19.2 Apresentar os resultados em miligramas por grama de tabaco ou conforme solicitado.

19.3 Os resultados podem ser apresentados dessa forma ou com base na massa seca.

Nota: a umidade pode ser medida conforme o método oficial 966.02 da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [2.6] ou um método de padrão equivalente.

20 CONTROLE DE QUALIDADE

20.1 Parâmetros de controle típicos

Se as medidas de controle estiverem fora dos limites de tolerância dos valores esperados, é preciso investigar e tomar as medidas apropriadas.

Devem ser usados outros procedimentos de garantia da qualidade se necessário para cumprir as políticas do laboratório.

20.2 Branco para reagente laboratorial

Para detectar possível contaminação durante o preparo e a análise da amostra, incluir um branco para reagente laboratorial. O branco contém todos os reagentes e material usados na análise das amostras para ensaio e é analisado como uma amostra para ensaio. O resultado deve ser menor que o limite de detecção.

20.3 Amostra para controle de qualidade

Para verificar a uniformidade de todo o processo analítico, analisar um cigarro de referência, como o cigarro experimental da Universidade de Kentucky (Lexington, Kentucky, EUA) ou o cigarro-monitor CORESTA (Paris, France), em cada corrida analítica.

21 DESEMPENHO DO MÉTODO

21.1 Limite de notificação

O limite de notificação é fixado na menor concentração dos padrões de calibração usados, recalculada em aproximadamente 0,1 µg/mL.

21.2 Recuperação de matriz fortificada em laboratório

A recuperação de analito acrescentado à matriz é usada como medida substituta da exatidão. A recuperação é determinada por acréscimo de quantidades conhecidas de padrões ao tabaco, seguida por extração do tabaco pelo mesmo método usado para as amostras. O tabaco não fortificado também é analisado. A recuperação é calculada pela seguinte fórmula:

Recuperação (%) = $100 \times (\text{quantidade na amostra analítica} - \text{quantidade na amostra não fortificada}) / \text{quantidade acrescentada}$

Tabela 3. Resultados da recuperação de amônia em amostra de tabaco

Quantidade acrescentada (mg) ^a	Quantidade na amostra analítica (mg)	Quantidade na amostra não fortificada (mg)	Recuperação (%)
0,0799 (baixa)	0,1751	0,0960	98,90
0,0999 (média)	0,1944	0,0956	98,88
0,1199 (alta)	0,2141	0,0953	99,10
			Média: 98,96

^a As quantidades “baixa”, “média” e “alta” acrescentadas correspondem a cerca de 80%, 100% e 120% da amostra não fortificada.

21.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD pode ser determinado como o triplo do desvio-padrão de resultados obtidos por análise do menor padrão por um mínimo de dez vezes ao longo de vários dias. O LQ pode ser determinado como dez vezes o desvio-padrão de resultados obtidos por análise do menor padrão por um mínimo de dez vezes ao longo de vários dias.

O LD da amônia em tabaco é 0,0033 mg/g, e o LQ é 0,011 mg/g.

É possível também considerar como LQ o menor padrão usado.

22 REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Um estudo colaborativo internacional, realizado em 2014-2016, com ensaio de três cigarros de referência e duas marcas comerciais por nove laboratórios obteve os seguintes valores para esse método:

Com a aplicação normal e correta do método, a diferença entre dois resultados de ensaios de amostras pareadas de tabaco total do cigarro, realizados pelo mesmo operador, com a mesma aparelhagem, dentro do menor intervalo de tempo possível, não excederá a repetibilidade (r), em média, mais de 5% dos casos.

Com a aplicação normal e correta do método, a diferença entre os resultados de ensaios de amostras pareadas de tabaco total do cigarros realizados por dois laboratórios não será maior que a reprodutibilidade (R), em média, em mais de 5% dos casos.

Os resultados do ensaio foram analisados estatisticamente em conformidade com a ABNT NBR ISO 5725-1 [2.3] e a ABNT NBR ISO 5725-2 [2.4] para obter os dados de precisão mostrados na Tabela 4. As concentrações de amônia nas marcas comerciais estavam dentro da faixa das peças de referência.

Para calcular r e R , um resultado do ensaio foi definido como a média de sete replicatas.

Tabela 4. Limites de precisão para a determinação de amônia em tabaco de peças de ensaio de referência

Cigarro de referência	n	m	Limite de repetibilidade (mg/g), r	Limite de reprodutibilidade (mg/g), R
1R5F	9	1,214	0,002	0,153
3R4F	9	0,857	0,002	0,075
CM6	9	0,172	0,000	0,004
Cigarro comercial 1	9	0,383	0,001	0,010
Cigarro comercial 2	9	1,746	0,005	0,347

n , número de laboratórios participantes; m , valor médio de amônia por cigarro

23 RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

- uma referência a este método, ou seja, POP 07 da TobLabNet da OMS;
- data de recebimento da amostra;
- os resultados e suas unidades.

Anexo 1. Retas de calibração e cromatogramas típicos obtidos na determinação de amônia em tabaco total do cigarro

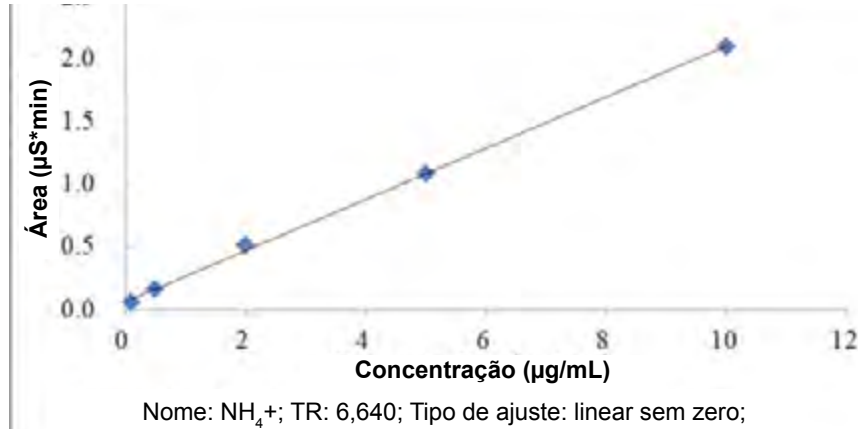


Fig. 1a. Exemplo de reta de calibração de amônia (sem supressão)

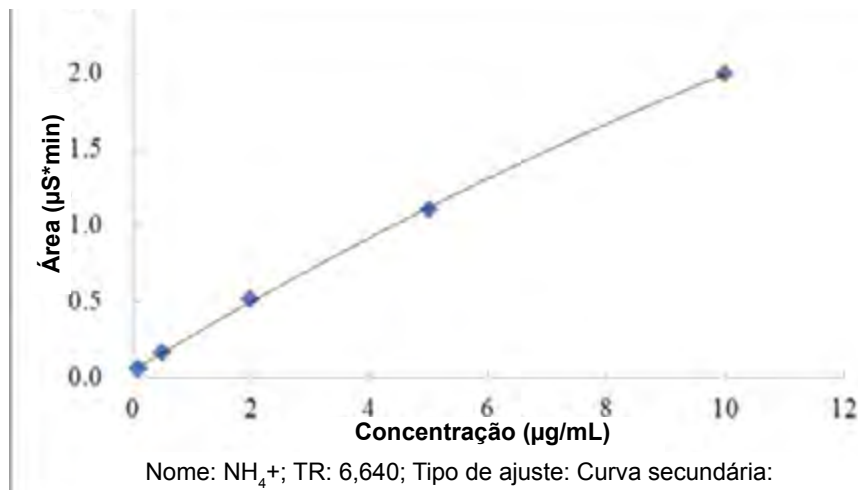


Fig. 1b. Exemplo de reta de calibração de amônia (com supressão)

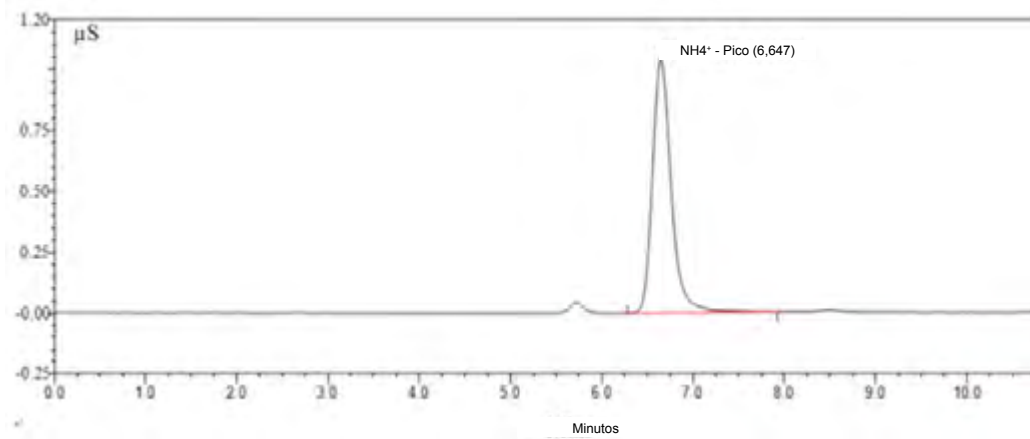


Fig. 2. Cromatograma representativo de uma solução-padrão de amônia (cerca de 5 µg/mL), com supressão

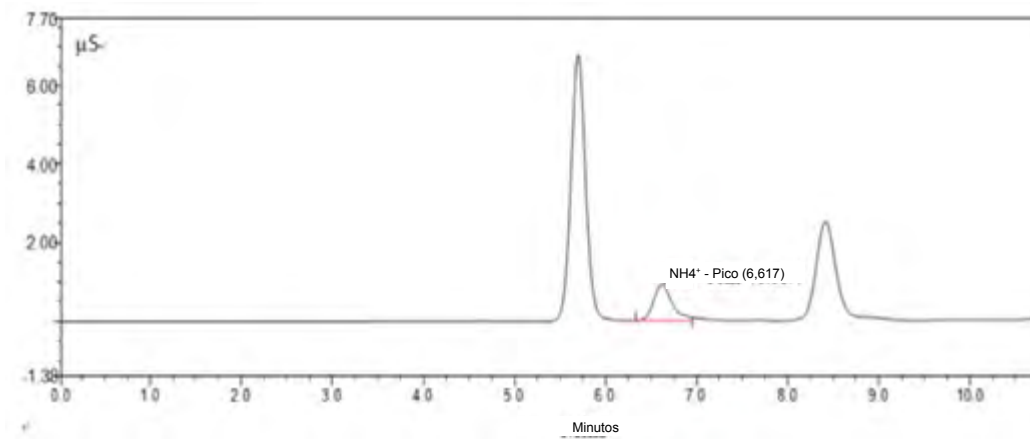


Fig. 3. Cromatograma representativo de uma solução da amostra de tabaco total, com pico de amônia, com supressão

Este documento foi preparado por membros da Rede de Laboratórios do Tabaco (TobLabNet), da Organização Mundial da Saúde (OMS), como um procedimento operacional padrão (POP) para validação de métodos analíticos para determinação de conteúdos e emissões de produtos do tabaco.

OPAS



Organização
Pan-Americana
da Saúde



Organização
Mundial da Saúde
ESCRITÓRIO REGIONAL PARA AS Américas

