

Método Oficial
TobLabNet da OMS
POP 06

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE UMECTANTES NO TABACO DO CIGARRO

**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 06**

**Procedimento operacional
padrão para determinação de
umectantes no tabaco do cigarro**

Versão oficial em português da obra original em inglês

WHO TobLabNet SOP 06 - Standard operating procedure for determination of humectants in cigarette tobacco filler.

© Organização Mundial da Saúde, 2016

ISBN: 978 92 4 151606 8 (versão eletrônica)

Método Oficial TobLabNet da OMS - POP 06. Procedimento operacional padrão para determinação de umectantes no tabaco do cigarro

ISBN: 978-92-75-72898-7 (PDF)

ISBN: 978-92-75-22898-2 (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 06. Procedimento operacional padrão para determinação de umectantes no tabaco do cigarro. Brasília, D.F.; 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.37774/9789275728987>.

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 06

Data: junho de 2016



Organização Mundial da Saúde Rede de Laboratórios de Tabaco

Determinação de umectantes no tabaco do cigarro

Método:	determinação de umectantes no tabaco do cigarro
Analitos:	propilenoglicol (propano-1,2-diol) (CAS 57-55-6) glicerol (propano-1,2,3-triol) (CAS 56-81-5) trietilenoglicol [2,2'-etilenodioxibis(etanol)] (CAS 112-27-6)
Matriz:	fumo de cigarro
Última atualização:	junho de 2016

Nº: POP 06

Data: junho 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 06

Data: junho 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 determinação de umectantes no tabaco do cigarro.

INTRODUÇÃO

Para estabelecer medidas equivalentes para o ensaio de produtos de tabaco em escala mundial é necessário que haja 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 OMS), 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 do grupo de trabalho para a terceira sessão da Conferência das Partes sobre o progresso de seu trabalho () solicitou à Secretaria 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 do conteúdo e das 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 o seguinte conteúdo cujos métodos de análise e medição (química analítica) devem ser validados como prioridade:

- 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 como prioridade:

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

- acetaldeído;
- acrilaldeído (acroleína);
- benzeno;
- benzo[a]pireno (B[a]P);
- 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 B[a]P, 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: <i>Análise de rotina de cigarros em máquina de fumar – Definições e condições-padrão</i>	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 umectantes em fumo de cigarro.

1 ESCOPO

Este procedimento operacional padrão é apropriado para a determinação quantitativa dos umectantes propilenoglicol, glicerol (propano-1,2,3-triol) e trietilenoglicol no tabaco do cigarro por cromatografia gasosa (CG).

2 REFERÊNCIAS

- 2.1** ABNT NBR ISO 8243: Cigarros – Amostragem. (ISO 8243: Cigarettes – Sampling).
- 2.2** *Guidelines on representative drug sampling*. Nova York: Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime; 2009. Disponível em inglês em: https://www.unodc.org/documents/scientific/Drug_Sampling.pdf.
- 2.3** *Method validation report of WHO TobLabNet official method: Determination of humectants in cigarette tobacco filler*. Genebra: Organização Mundial da Saúde, Rede de Laboratórios de Tabaco (no prelo)
- 2.4** *Procedimento operacional padrão para validação de métodos analíticos de conteúdos e emissões de produtos de tabaco*. Genebra: Organização Mundial da Saúde, Rede de Laboratórios de Tabaco (POP 02 da TobLabNet da OMS).
- 2.5** 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].
- 2.6** 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) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method].

3 TERMOS E DEFINIÇÕES

- 3.1** *Teor de umectantes*: quantidades individuais de glicerol, propilenoglicol e trietileno-glicol em fumo de cigarro, expressas em miligramas por grama de fumo.
- 3.2** *Tabaco do cigarro*: parte do 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, mascados ou aspirados [artigo 1(f) da CQCT da OMS].
- 3.4** *Amostra para laboratório*: 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. O número de produtos coletados deverá ser representativo da amostra para laboratório.
- 3.6** *Parcela para ensaio*: parcela aleatória da amostra para ensaio a ser usada em determinação única. O número de parcelas obtidas deverá ser representativo da amostra para ensaio.

4 RESUMO DO MÉTODO

- 4.1 Os umectantes são extraídos do fumo de cigarro com uma mistura de metanol e solução de 1,3-butanediol.
- 4.2 O extrato é analisado com um detector por ionização em chama ou detector por espectrometria de massas.
- 4.3 A razão entre a área do pico de cada umectante e do padrão interno é comparada em uma curva de calibração criada pela análise de padrões com concentrações conhecidas de cada umectante para determinar o teor de umectante em cada parcela para ensaio.

5 PRECAUÇÕES AMBIENTAIS E DE SEGURANÇA

- 5.1 Seguir as precauções ambientais e de segurança de rotina, como em qualquer atividade realizada em laboratório de análises químicas.
- 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 ao uso do método. 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 de extração: balões com tampa ou vidraria equivalente.
- 6.3 Agitador mecânico tipo *wrist-action* ou equivalente.
- 6.4 Cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama.
- 6.5 Coluna capilar para cromatógrafo a gás capaz de obter boa separação dos picos de solvente, padrão interno, propilenoglicol, glicerol, trietilenoglicol e outros componentes do tabaco (p. ex., coluna de sílica fundida DB-Wax, 30 m × 0,32 mm × 1 µm, ou equivalente).
- 6.6 Centrífuga.

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** Metanol, pureza cromatográfica [67-56-1].
- 7.2** Glicerol [56-81-5].
- 7.3** Trietilenoglicol [112-27-6].
- 7.4** Propilenoglicol [57-55-6].
- 7.5** 1,3-Butanediol [107-88-0] (usado como padrão interno).
- 7.6** Gás de arraste: hélio [7440-59-7] de pureza adequada.
- 7.7** Gases auxiliares: hidrogênio [1333-74-0] e ar de pureza adequada para ionização em chama.

8 PREPARO DA VIDRARIA

Limpar e secar a vidraria de maneira a evitar contaminação por resíduos.

9 PREPARO DE SOLUÇÕES

Solução estoque primária de 1,3-butanediol (aproximadamente 200 mg/mL):

- 9.1** Pesar aproximadamente 20 g (\pm 0,05 g) de 1,3-butanediol.
- 9.2** Colocar o 1,3-butanediol pesado em um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com metanol.
Solução de extração (aproximadamente 2 mg/mL):
- 9.3** Com a pipeta, transferir 20 mL da solução estoque primária para um balão volumétrico de 2 mL e completar o volume com metanol. O volume da solução pode ser aumentado ou diminuído, conforme a necessidade. Misturar bem. Armazenar a 4°C-8°C.

10 PREPARO DE PADRÕES

- 10.1** Padrão primário de glicerol (aproximadamente 100 mg/mL):
Pesar com exatidão 10 g (\pm 0,05 g) de glicerol em um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com solução de extração [9.3].
- 10.2** Padrão primário de propilenoglicol (aproximadamente 50 mg/mL):
Pesar com exatidão 5 g (\pm 0,05 g) de propilenoglicol em um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com solução de extração [9.3].
- 10.3** Padrão primário de trietilenoglicol (aproximadamente 25 mg/mL):
Pesar com exatidão 2,5 g (\pm 0,05 g) de trietilenoglicol em um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com solução de extração [9.3].

10.4 Padrão secundário misto (glicerol a 4 mg/mL; propilenoglicol a 3 mg/mL; trietilenoglicol a 1,5 mg/mL):

Com uma pipeta, transferir uma alíquota de 4 mL de glicerol [10.1] e alíquotas de 6 mL de cada estoque primário preparado de propilenoglicol [10.2] e trietilenoglicol [10.3] para um balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com solução de extração [9.3].

Armazenar as soluções-padrão a 4°C-8°C..

10.5 Padrões de trabalho

Todos os padrões são preparados em balões volumétricos nas diluições indicadas.

Tabela 1. Soluções-padrão de trabalho

Nº	Solução-padrão secundária mista (mL)	Volume final (mL)	Concentração aproximada de glicerol na solução-padrão de trabalho (mg/mL)	Concentração aproximada de propilenoglicol na solução-padrão de trabalho (mg/mL)	Concentração aproximada de trietilenoglicol na solução-padrão de trabalho (mg/mL)
1	0,2	10	0,08	0,06	0,03
2	0,5	10	0,20	0,15	0,08
3	1,0	10	0,40	0,30	0,15
4	2,0	10	0,80	0,60	0,30
5	4,0	10	1,60	1,20	0,60
6	8,0	10	3,20	2,40	1,20

Tabela 2. Soluções-padrão de trabalho para baixos níveis de propilenoglicol

Nº	Solução-padrão secundária mista (mL)	Volume final (mL)	Concentração aproximada de propilenoglicol na solução-padrão de trabalho (mg/mL)
1	0,017	10	0,005
2	0,050	10	0,015
3	0,100	10	0,030
4	0,250	10	0,075
5	0,500	10	0,150
6	1,000	10	0,300

Completar o volume em balões volumétricos com solução de extração [9.3] contendo o padrão interno.

Nota: a faixa das soluções-padrão pode ser ajustada de acordo com o equipamento usado e as amostras a serem analisadas, tendo em mente um possível efeito sobre a sensibilidade do método.

Pode-se preparar uma concentração menor ou maior dos padrões com o volume necessário de estoque secundário misto para completar 10 mL em um balão volumétrico com solvente de extração para um limite de quantificação menor ou maior, se necessário. A Tabela 2 apresenta o exemplo do propilenoglicol; é importante ajustar a faixa de calibração, se necessário. Todos os solventes e as soluções devem estar em temperatura ambiente antes do uso.

11 AMOSTRAGEM

11.1 Coletar amostras de cigarro em conformidade com a ABNT NBR ISO 8243 [2.1] ou conforme necessário para a aplicação específica do método. Podem ser usados outros métodos para obter uma amostra representativa 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 de venda, 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 de venda.

11.2.3 Se não houver unidades de venda individuais, juntar toda a amostra para laboratório em uma unidade.

12 PREPARO DOS CIGARROS

12.1 Retirar o tabaco dos cigarros ou das amostras para controle de qualidade (quando for o caso) de dois maços, ou usar pelo menos 10 g de tabaco de cigarro processado.

12.2 Juntar e misturar tabaco de cigarro suficiente para que cada parcela para ensaio tenha pelo menos 10 g.

12.3 Moer e homogeneizar o tabaco de cigarro e guardar em frasco ou recipiente âmbar hermeticamente fechado. Dividir a amostra em parcelas.

13 PREPARO DA MÁQUINA DE FUMAR

Não aplicável.

14 PRODUÇÃO DA AMOSTRA

Não aplicável.

15 PREPARO DA AMOSTRA

15.1 Retirar 4 g da amostra para ensaio moída e bem misturada, pesar com exatidão de 0,001 g em frasco de extração adequado.

15.2 Misturar a parcela para ensaio com 50 mL de solução de extração [9.3].

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

- 15.3** Tampar os frascos e colocá-los em agitador tipo *wrist-action* ou equivalente, com rotação mínima de 210 rpm durante pelo menos 60 min.
- 15.4** Retirar as amostras do agitador e, com movimentos circulares, agitar para dissolver todo o tabaco.
- 15.5** Deixar as amostras em repouso até que o sobrenadante esteja límpido. Outra opção é usar a centrífuga.
- 15.6** Transferir o sobrenadante para um frasco do amostrador automático e analisar no cromatógrafo a gás.

16 ANÁLISE DA AMOSTRA

Este método usa o cromatógrafo a gás acoplado a um detector por ionização em chama para determinar a quantidade de umectantes no tabaco de 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 gasosa: exemplo

Coluna do cromatógrafo a gás:	sílica fundida DB-Wax, 30 m × 0,32 mm (diâmetro interno) × 25,0 µm
Revestimento:	DB-Wax ou equivalente
Gás de arraste:	hélio em vazão de 1,8 mL/min
Volume de injeção:	1 µL
Modo de injeção:	com divisão de fluxo (<i>split</i>) 25:1
Programa de temperatura:	
Temperatura de injeção:	220 °C
Temperatura do detector:	260 °C
Temperatura inicial:	120 °C por 3 min
Taxa de aquecimento:	10 °C/min até 180 °C, manter por 11 min
Tempo total de corrida:	20 min

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

16.2 Tempos de retenção esperados

- 16.2.1** Para as condições descritas neste documento, a sequência de eluição esperada será propilenoglicol, 1,3-butanediol (padrão interno), glicerol e trietilenoglicol.
- 16.2.2** Diferenças, por exemplo, de temperatura, vazão de gás ou idade da coluna podem alterar os tempos de retenção.
- 16.2.3** É preciso verificar a ordem de eluição e os tempos de retenção antes de iniciar a análise.

16.3 Determinação de umectantes

A sequência das etapas de determinação seguirá as práticas de cada laboratório. As etapas adiante são apresentadas a título de orientação.

- 16.3.1** Condicionar o sistema imediatamente antes do uso pela injeção de duas alíquotas de 1 µL de uma solução da amostra como iniciador (*primer*).
- 16.3.2** Injetar um padrão (solução de [9.3]) nas mesmas condições das amostras para verificar o desempenho do sistema de cromatografia gasosa.
- 16.3.3** Injetar uma solução branco (solvente [7.1]) para checar se há contaminação do sistema ou dos reagentes.
- 16.3.4** Injetar uma alíquota de cada solução-padrão [10.5] no cromatógrafo a gás.
- 16.3.5** Avaliar os tempos de retenção e as respostas (contagens de área) dos padrões. Se os tempos de retenção forem semelhantes ($\pm 0,2$ min) aos tempos de retenção em injeções anteriores e as respostas estiverem no intervalo de 80% a 120% das respostas típicas em injeções anteriores, o sistema está pronto para a análise. Se as respostas estiverem fora das especificações, adotar medidas complementares de acordo com a política do laboratório.
- 16.3.6** Registrar a área do pico de cada umectante e do padrão interno.
- 16.3.7** Calcular o fator de resposta relativa (RF) como a razão entre as áreas dos picos dos umectantes e a área do pico do padrão interno. $RF = A_{\text{umectantes}} / A_{\text{PI}}$ para cada solução-padrão de umectante, incluindo os brancos do solvente.
- 16.3.8** Traçar o gráfico da concentração de umectantes adicionados (eixo X) de acordo com as razões de área (RF, eixo y).
- 16.3.9** O coeficiente linear não deve ser significativamente diferente de zero sob o ponto de vista estatístico.
- 16.3.10** A curva-padrão deve ser linear ao longo de toda a faixa-padrão.
- 16.3.11** Calcular uma equação de regressão linear ($y = a + bx$) a partir desses dados, e usar tanto o coeficiente angular (b) quanto o coeficiente linear (a). Se o coeficiente de regressão linear R^2 for $< 0,99$, a calibração deve ser repetida. Se um ponto de calibração diferir mais de 10% do valor esperado (calculado por regressão linear), esse ponto deve ser omitido. Injetar os controles de qualidade e as amostras e determinar as áreas de pico com o software apropriado do instrumento.
- 16.3.12** Os sinais (áreas do pico) obtidos em todas as parcelas para ensaio devem estar dentro da faixa de trabalho da curva de calibração; caso contrário, devem-se ajustar as soluções.

Ver um exemplo de cromatograma no Anexo 1.

17 ANÁLISE DE DADOS E CÁLCULOS

- 17.1** Injetar alíquotas em duplicata dos extratos da amostra em condições idênticas.
- 17.2** Para cada parcela para ensaio, calcular a razão entre a resposta de cada umectante (glicerol, propilenoglicol e trietilenoglicol) e a resposta do padrão interno (Y_t) pela área do pico.
- 17.3** Para cada umectante (glicerol, propilenoglicol e trietilenoglicol), calcular a concentração em mg/mL de cada alíquota para ensaio a partir dos coeficientes de regressão linear ($m_t = (Y_t - a) / b$).
- 17.4** Para cada umectante (glicerol, propilenoglicol e trietilenoglicol), calcular o teor m_h da amostra de tabaco, expresso em miligramas por grama, a partir da seguinte fórmula:

$$mh = \frac{(m_t \times V_e)}{m_o}$$

em que:

m_h é o teor do umectante (glicerol, propilenoglicol e trietilenoglicol) em mg/g;

m_t é a concentração de cada umectante (glicerol, propilenoglicol e trietilenoglicol) na solução de ensaio, em mg/g;

V_e é o volume da solução de extração, em mL;

m_o é a massa da parcela para ensaio, em g.

18 PRECAUÇÕES ESPECIAIS

- 18.1** Após instalar uma nova coluna, condicioná-la, conforme especificação do fabricante, depois injetar um extrato da amostra de tabaco nas condições para o instrumento descritos. As injeções devem ser repetidas até que as áreas (ou alturas) dos picos dos umectantes (propilenoglicol, glicerol e trietilenoglicol) e do padrão interno sejam reproduzíveis. Serão necessárias cerca de quatro injeções.
- 18.2** Recomenda-se a purgação de componentes com alto ponto de ebulição da coluna de cromatografia gasosa após cada série de amostras mediante a elevação da temperatura da coluna a 220 °C por 30 min.
- 18.3** Quando a área (ou altura) do pico do padrão interno é significativamente maior que o esperado, recomenda-se que a amostra de tabaco seja extraída sem padrão interno na solução de extração. Desse modo, é possível determinar se há coeluição de algum componente com o padrão interno, o que causaria valores artificialmente menores de umectantes.

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.

20 CONTROLE DE QUALIDADE

20.1 Parâmetros de controle

Nota 1: se as medidas de controle estiverem fora dos limites de tolerância dos valores esperados, é preciso investigar e tomar as medidas apropriadas.

Nota 2: devem ser usados outros procedimentos de garantia da qualidade de acordo com as práticas de cada 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, conforme descrição em **16.3.2**. 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 de acordo com as práticas de cada laboratório.

20.4 Podem ser acrescentadas outras amostras para controle de qualidade, conforme a política de cada laboratório.

21 DESEMPENHO DO MÉTODO

21.1 Limite de notificação:

O limite de notificação é fixado na menor concentração dos padrões de calibração, recalculada em mg/g (p. ex., 0,08 mg/mL para glicerol, 0,06 mg/mL para propilenoglicol e 0,03 mg/mL para trietilenoglicol como as menores concentrações). Portanto, os limites de notificação são 1,0 mg/g para glicerol, 0,75 mg/g para propilenoglicol e 0,375 mg/g para trietilenoglicol.

Para as soluções-padrão de trabalho de propilenoglicol (Tabela 2), o limite de notificação é fixado na menor concentração dos padrões de calibração, recalculada em 0,063 mg/g. (Na concentração de 0,005 mg/mL, o limite de notificação é de 0,063 mg/g.)

21.2 Recuperação de matriz fortificada em laboratório:

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

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

Tabela 3. Recuperação média de matriz fortificada em laboratório

Propilenoglicol			Glicerol			Trietilenoglicol		
Quantidade acrescentada (mg/g)	Média (mg/g)	Recuperação (%)	Quantidade acrescentada (mg/g)	Média (mg/g)	Recuperação (%)	Quantidade acrescentada (mg/g)	Média (mg/g)	Recuperação (%)
5,00	4,94	99	5,00	5,47	109	5,00	5,70	114
10,00	9,87	99	10,01	10,04	100	10,00	11,05	110
20,00	19,64	98	20,02	19,74	99	20,01	20,76	104

21.3 Especificidade analítica:

O tempo de retenção do analito de interesse é usado para verificar a especificidade analítica. Um intervalo predefinido das razões entre a resposta do componente e a do componente-padrão interno de tabaco do cigarro para controle de qualidade é usado para verificar a especificidade dos resultados de uma amostra desconhecida.

21.4 Linearidade:

As curvas de calibração dos umectantes são lineares na faixa de concentração-padrão: 0,08–3,2 mg/mL para glicerol, 0,005–0,30 mg/mL para propilenoglicol e 0,03–1,2 mg/mL para trietilenoglicol.

21.5 Possível interferência:

Por ocasião da validação, não havia componentes conhecidos que causassem interferência em razão de tempos de retenção semelhantes aos do propilenoglicol, trietilenoglicol, glicerol ou padrão interno (1,3-butanediol).

22 LIMITES DE REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Um estudo colaborativo internacional com detecção por ionização em chama [2.3], realizado em 2012-2014 por 13 laboratórios e com 7 amostras (cinco cigarros de referência e duas marcas comerciais de cigarro), em conformidade com o POP 02 da TobLabNet da OMS [2.4], obteve os seguintes valores para esse método:

- Com a aplicação normal e correta do método, a diferença entre dois resultados de ensaio de amostras pareadas de tabaco do cigarro, realizado pelo mesmo operador, com a mesma aparelhagem, dentro do menor intervalo de tempo possível, não excederá a repetibilidade (r), em média, em 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 do cigarro realizados por dois laboratórios não será maior que a reprodutibilidade (R), em média, em mais de 5% dos casos.

Um estudo colaborativo com detecção por espectrometria de massas, realizado em 2012-2014 por sete laboratórios e com sete amostras (cinco cigarros de referência e duas marcas comerciais de cigarro), obteve valores equivalentes (Anexo 2).

Os resultados do ensaio foram analisados estatisticamente em conformidade com a ABNT NBR ISO 5725-1 [2.5] e a ABNT NBR ISO 5725-2 [2.6] para determinar os limites de repetibilidade e de reprodutibilidade mostrados nas Tabelas 4 a 6 para análise por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. Os limites de repetibilidade e de reprodutibilidade da cromatografia gasosa em análises com desvio-padrão médio são apresentados nas Tabelas A2.2 a A2.4 no Anexo 2.

Tabela 4. Limites de repetibilidade e reprodutibilidade para a determinação de propilenoglicol em tabaco de peças para ensaio de referência e cigarros comerciais por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama

Cigarros de referência	<i>n</i> *	\hat{m} (mg/g)	Limite de repetibilidade (<i>r</i>) (mg/g)	Limite de reprodutibilidade (<i>R</i>) (mg/g)
1R5F	12	0,231	0,001	0,005
3R4F	12	0,180	0,000	0,001
CM6	12	0,140	0,000	0,004
Cigarro comercial n.º 1	12	5,496	0,244	1,972
Cigarro comercial n.º 2	12	0,078	0,000	0,001

* Os resultados de um conjunto de dados foram retirados, pois eram discrepantes.

Tabela 5. Limites de repetibilidade e de reprodutibilidade para a determinação de glicerol em tabaco de peças para ensaio de referência e cigarros comerciais por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama

Cigarro de referência	<i>n</i> *	\hat{m} (mg/g)	Limite de repetibilidade (<i>r</i>) (mg/g)	Limite de reprodutibilidade (<i>R</i>) (mg/g)
1R5F	11	21,603	1,490	6,082
3R4F	11	21,203	1,299	7,638
CM6	11	1,160	0,006	0,063
Cigarro comercial n.º 1	11	14,376	0,648	3,621
Cigarro comercial n.º 2	11	1,222	0,015	0,049

* Os resultados de um conjunto de dados foram retirados, pois eram discrepantes.

Tabela 6. Limites de repetibilidade e reprodutibilidade para a determinação de trietilenoglicol em tabaco de peças para ensaio de referência por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama

Cigarro de referência	<i>n</i> *	\hat{m} (mg/g)	Limite de repetibilidade (<i>r</i>) (mg/g)	Limite de reprodutibilidade (<i>R</i>) (mg/g)
Amostra TG n.º 1	12	0,891	0,207	0,409
Amostra TG n.º 2	11	8,078	1,565	2,621

Os resultados de um conjunto de dados foram retirados da amostra TG n.º 1, e os resultados de dois conjuntos de dados foram retirados da amostra TG n.º 2, pois eram discrepantes.

23 RELATÓRIO DE ENSAIO

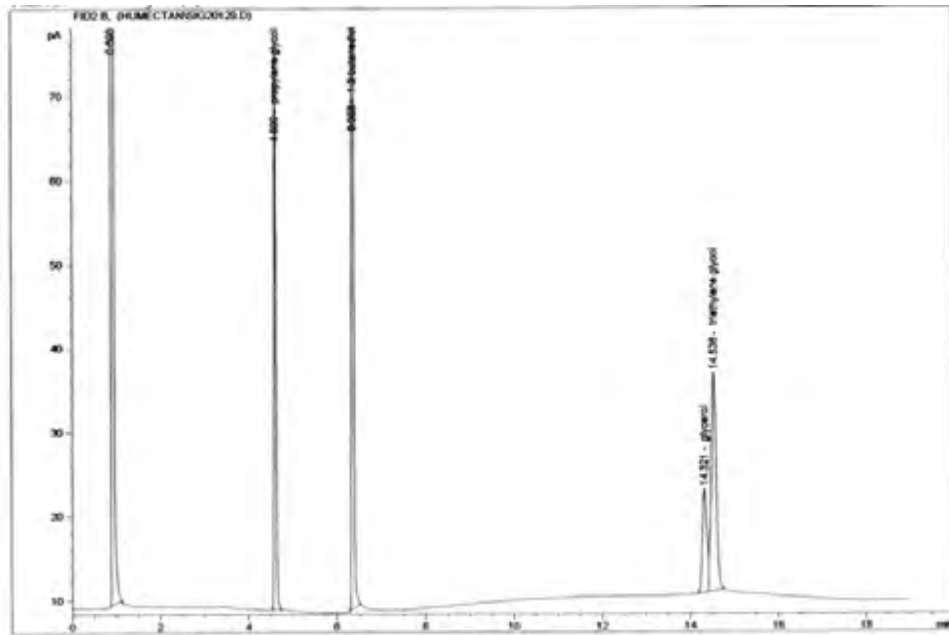
As informações a seguir deverão ser incluídas no relatório de ensaio:

- a) uma referência a este método, ou seja, POP 06 da TobLabNet da OMS;
- b) data de recebimento da amostra;
- c) os resultados e suas unidades.

Anexo 1. Exemplo de cromatograma de uma solução padrão por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama

Ordem de eluição de umectantes:

1. Propilenoglicol
2. 1,3-Butanediol (padrão interno)
3. Glicerol
4. Trietilenoglicol



Instrument 1 11/23/2011 3:46:12 AM B. SOURABE

ANEXO 2. Principais pontos a considerar ao usar um detector por espectrometria de massas em vez de um detector por ionização em chama

A.2.1.1 RESUMO DO MÉTODO

O método é a cromatografia gasosa com coluna de sílica e um detector por espectrometria de massas. Extrair 4 g de tabaco do cigarro moído com 50 mL de um solvente de extração à base de metanol em agitador mecânico por 60 min. Pipetar 2 mL do extrato da amostra em um cartucho para extração em fase sólida dispersiva contendo 150 mg de MgSO₄ anidro e 25 mg de *N*-propiletlenodiamina. Agitar o cartucho em oscilador tipo vórtex a 2.000 rpm por 2 min e, em seguida, centrifugar a 10.000 rpm por 10 min, se necessário. Transferir o sobrenadante para um frasco do amostrador automático e analisar no cromatógrafo a gás.

A2.1.2 APARELHAGEM E EQUIPAMENTO

Balança analítica com resolução mínima de quatro casas decimais

Frascos Erlenmeyer de 125 mL com tampa, ou equivalente

Balões volumétricos de 10 mL, 100 mL e 2.000 mL

Pipeta de 20 mL para preparo do solvente de extração

Pipetas volumétricas para preparo de soluções padrão (vários tamanhos)

Pipetas de transferência descartáveis

Dispensador Brinkmann (10–50 mL) ou equivalente

Frascos de 2 mL para amostrador automático e tampas com septo revestido de politetrafluoroetileno (PTFE)

Filtro de membrana de 0,22 µm

Oscilador tipo vórtex

Centrífuga

Desintegrador de alta velocidade

Peneira de 0,45 mm

Cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama

Coluna capilar para cromatógrafo a gás capaz de obter boa separação dos picos de solvente, padrão interno, propilenoglicol, glicerol, trietilenoglicol e outros componentes do tabaco (por exemplo, coluna de sílica fundida DB-Wax, 30 m × 0,32 mm × 1 µm, ou equivalente).

A2.1.3 MATERIAIS E REAGENTES

Se necessário, acrescentar:

A2.1.3.1 MgSO₄ anidro [7487-88-9].

A2.1.3.2 N-Propiletilenodiamina [111-39-7].

Nota: A1.3.1 e A1.3.2 podem ser substituídos por um cartucho para extração em fase sólida dispersiva comercial com 150 mg de MgSO₄ anidro [7487-88-9] e 25 mg N-propiletilenodiamina [111-39-7].

A2.1.4 PREPARO DE PADRÕES

Igual ao preparo para o método de cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama [**10.1–10.5**].

A2.1.5 PREPARO DA AMOSTRA

A2.1.5.1 Com a pipeta, colocar 1 a 2 mL do extrato da amostra em um cartucho para extração em fase sólida dispersiva com 150 mg de MgSO₄ anidro e 25 mg de N-propiletilenodiamina, se necessário.

A2.1.5.2 Agitar o cartucho em oscilador tipo vórtex a 2.000 rpm por 2 min e, em seguida, centrifugar a 10.000 rpm por 10 min. Filtrar o sobrenadante em filtro de membrana de 0,22 µm para seringa até que esteja límpido.

A2.1.5.3 Transferir o sobrenadante para um frasco do amostrador automático e analisar no cromatógrafo a gás.

A2.1.6 ANÁLISE DA AMOSTRA

A2.1.6.1 Condições de operação do cromatógrafo a gás: exemplo

Modo de injeção: com divisão de fluxo (*split*), proporção 100:1

Coluna: DB-WAX, 30 m × 0,25 mm × 1,0 µm

Detector: espectrômetro de massas

Gás de arraste: hélio em vazão de 1,0 mL/min

Programa de temperatura:

Injetor: 250 °C

Temperatura inicial: 90 °C, manter por 0 min

Taxa de aquecimento: 15 °C/min até 180 °C, manter por 8 min, 50 °C/min até 230 °C, manter a 230 °C por 5 min, pós-corrída a 250 °C por 10 min

Tempo total de corrida: 17 min

Condições do amostrador automático: volume de injeção: 1,0 µL

A2.1.6.2 Condições de operação do espectrômetro de massas

Temperatura da linha de transferência: 280 °C

Modo de ionização: ionização por *electrospray*

Tensão de ionização: 70 eV

Temperatura da fonte de íons: 250 °C

Temperatura do quadrupolo: 150 °C

Atraso do solvente: 3 min

Nota: essas condições de operação da cromatografia gasosa-espectrometria de massas devem ser adaptadas para obter a resolução correta dos picos do glicerol, trietilenoglicol e propilenoglicol. O Anexo 3 apresenta um cromatograma típico (cromatograma de íons totais).

Tabela A2.1. Íons qualitativos e quantitativos de umectantes e padrão interno

Umectante	Íons quantitativos	Íons quantitativos secundários	Íons qualitativos (razão de abundância)
Glicerol	61	43	61:43 (100:79)
Trietilenoglicol	45	89	45:89 (100:19)
Propilenoglicol	45	43	45:43 (100:20)
1,3-Butanediol	72	43	43:72 (100:28)

Tabela A2.2. Limites de repetibilidade e reprodutibilidade para determinação de propilenoglicol em tabaco de peças para ensaio de referência por cromatografia gasosa-espectrometria de massas

Cigarro de referência	<i>n</i> *	\hat{m} (mg/g)	Limite de repetibilidade (<i>r</i>) (mg/g)	Limite de reprodutibilidade (<i>R</i>) (mg/g)
1R5F	6	0,215	0,001	0,003
3R4F	6	0,179	0,000	0,001
CM6	6	0,113	0,000	0,002
Cigarro comercial n.º 1	6	6,310	0,128	0,668
Cigarro comercial n.º 2	6	0,037	0,000	0,001

* Os resultados de um conjunto de dados foram retirados, pois eram discrepantes.

Tabela A2.3. Limites de repetibilidade e de reprodutibilidade para determinação de glicerol em tabaco de peças para ensaio de referência por cromatografia gasosa-espectrometria de massas

Cigarro de referência	<i>n</i> *	\hat{m} (mg/g)	Limite de repetibilidade (<i>r</i>) (mg/g)	Limite de reprodutibilidade (<i>R</i>) (mg/g)
1R5F	5	21,147	0,659	1,941
3R4F	5	21,510	0,715	1,331
CM6	5	1,466	0,006	0,106
Cigarro comercial n.º 1	5	14,762	0,512	1,164
Cigarro comercial n.º 2	5	1,457	0,005	0,110

* Os resultados de um conjunto de dados foram retirados, pois eram discrepantes.

Tabela A2.4. Limites de repetibilidade e reprodutibilidade para determinação de trietilenglicol em tabaco de peças para ensaio de referência por cromatografia gasosa-espectrometria de massas

Cigarro de referência	n^*	\hat{m} (mg/g)	Limite de repetibilidade (r) (mg/g)	Limite de reprodutibilidade (R) (mg/g)
Amostra TG n.º 1	6	0,971	0,006	0,010
Amostra TG n.º 2	6	8,450	0,189	0,617

* Os resultados de um conjunto de dados foram retirados, pois eram discrepantes.

Anexo 3. Exemplo de cromatogramas obtidos com espectrometria de massas

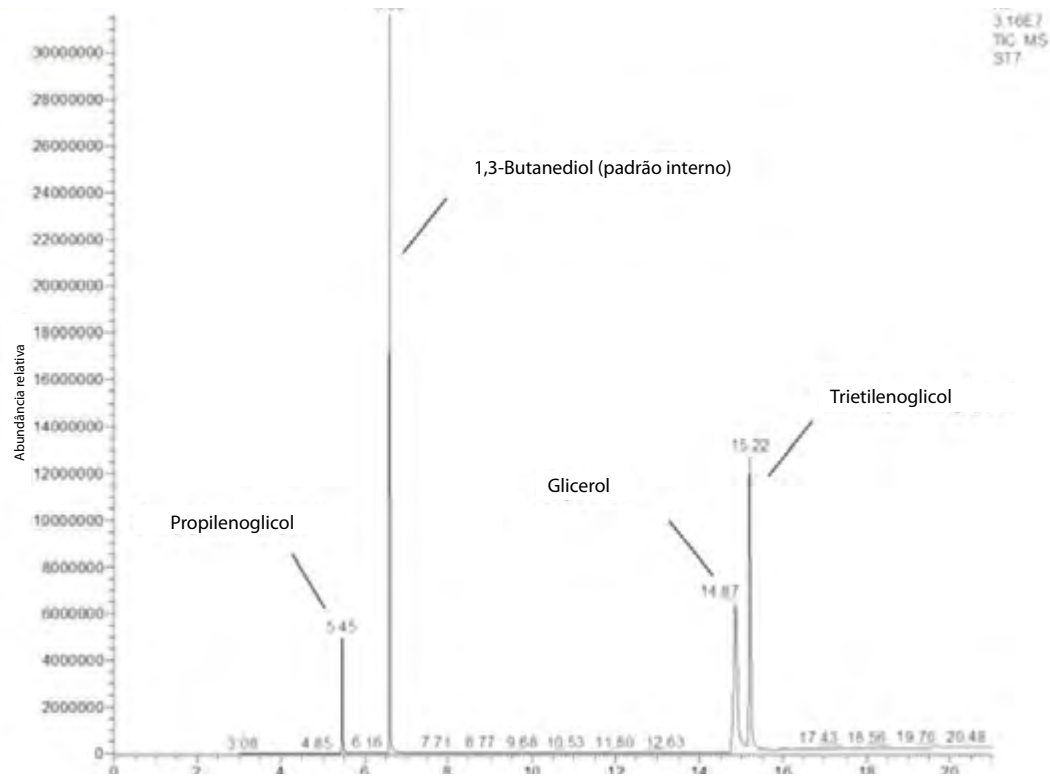


Fig. A3.1. Cromatograma de uma solução-padrão



Fig. A3.2. Espectros de massa de propilenoglicol em modo de varredura

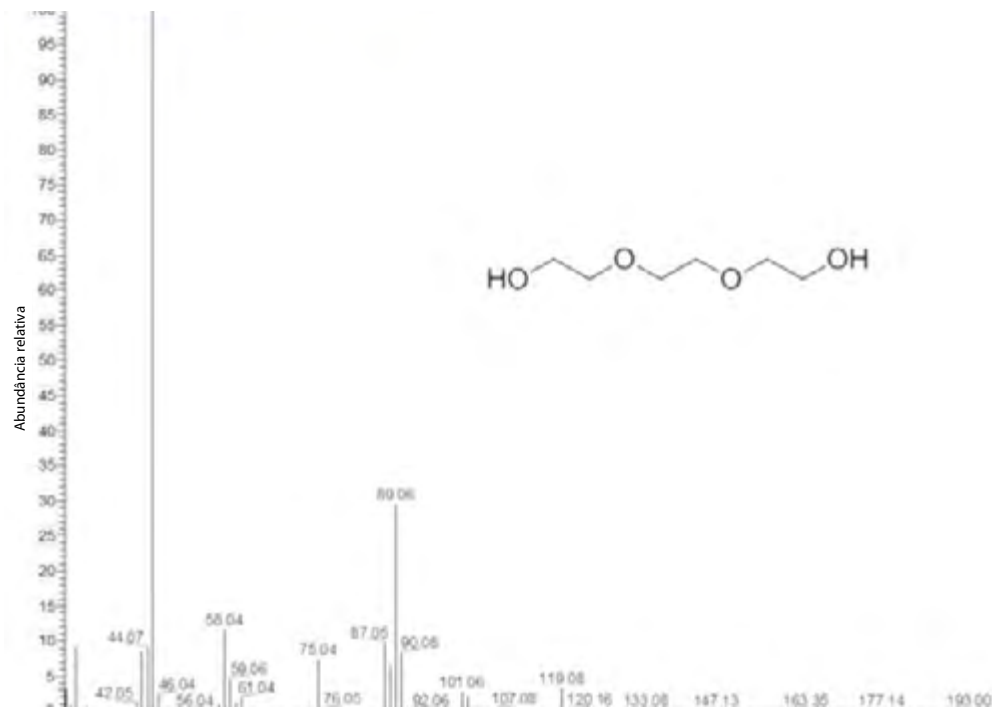


Fig. A3.3. Espectros de massa de trietilenoglicol em modo de varredura

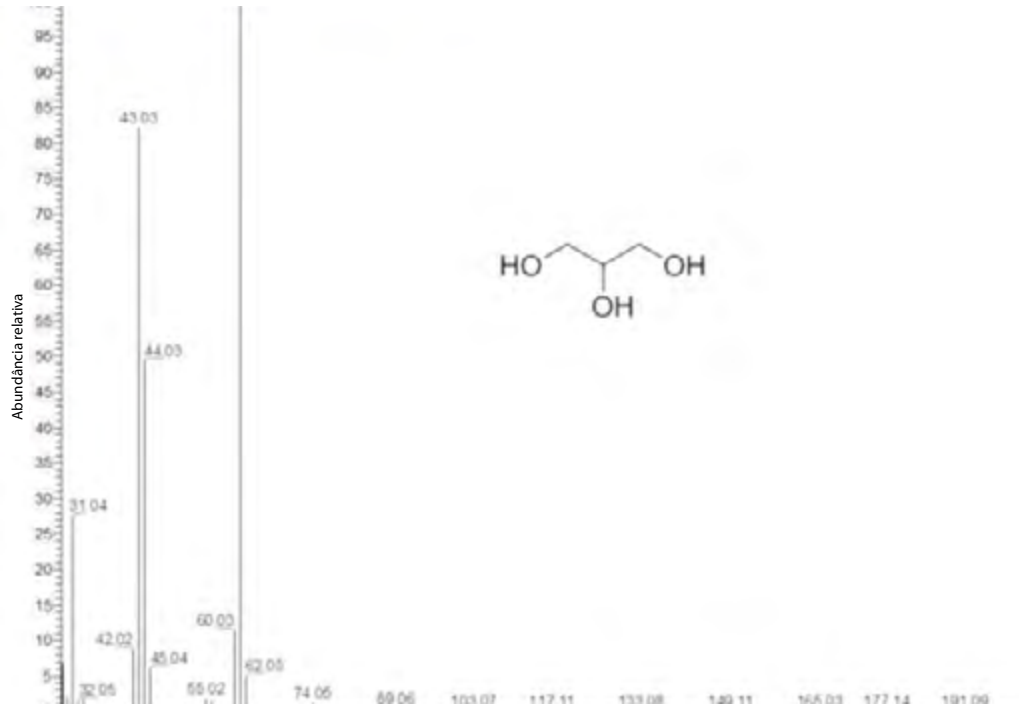


Fig. A3.4. Espectros de massa de glicerol em modo de varredura

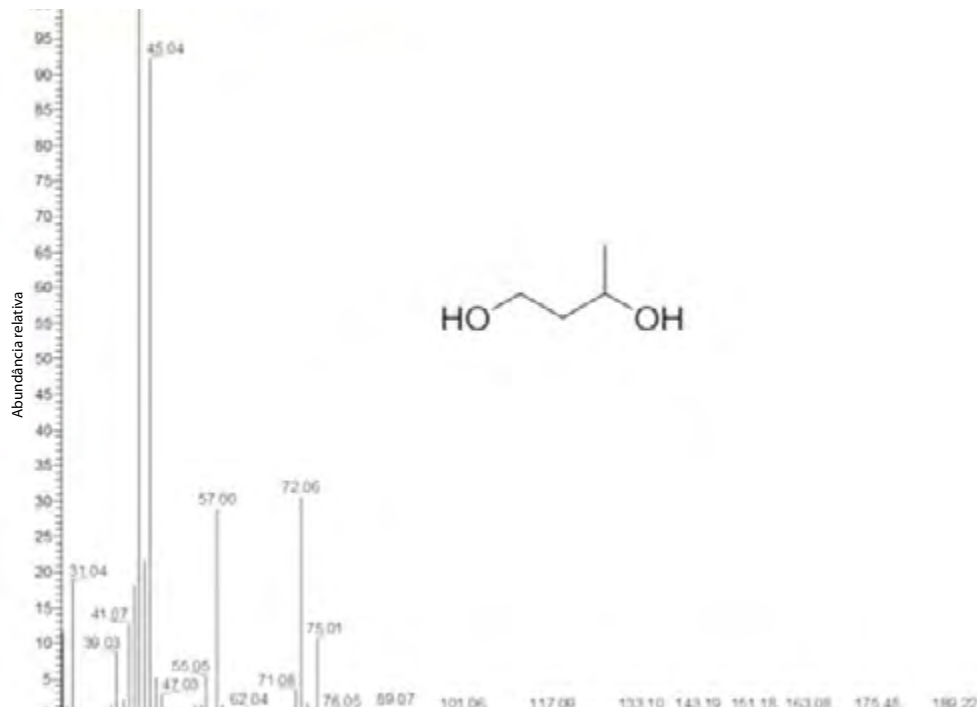


Fig. A3.5. Espectros de massa de 1,3-butanediol (padrão interno) em modo de varredura

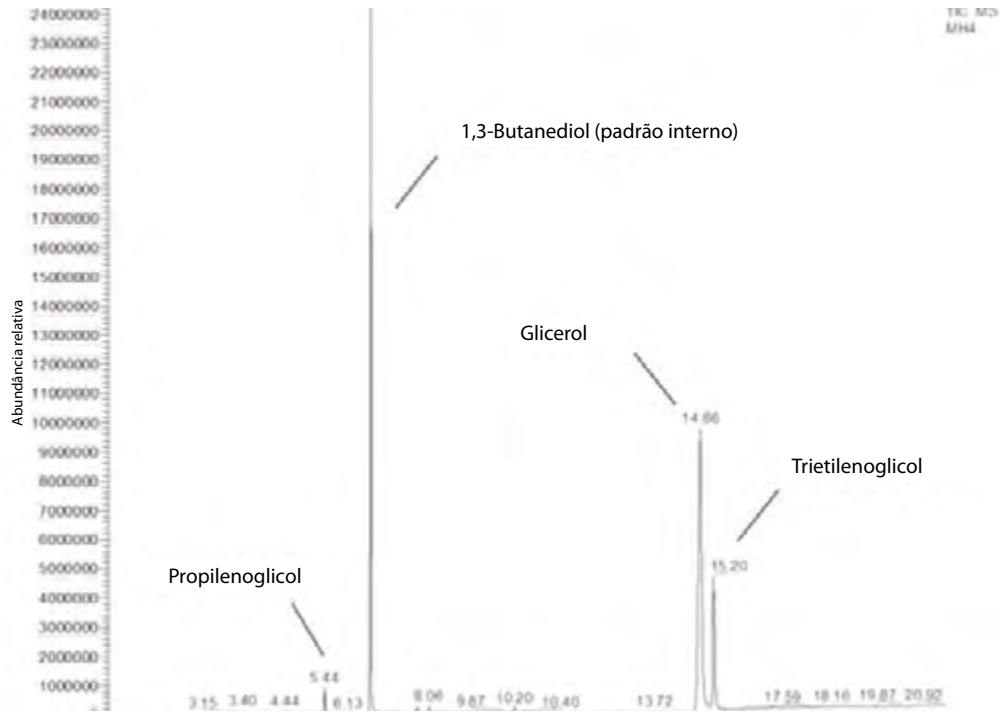


Fig. A3.6. Cromatograma de uma solução da amostra

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

