

Método Oficial
TobLabNet da OMS
POP 03

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS ESPECÍFICAS DO TABACO NA CORRENTE PRIMÁRIA DA FUMAÇA DO CIGARRO SOB CONDIÇÕES DE TRAGADA DO REGIME ISO INTENSO

**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 03

**Procedimento operacional
padrão para determinação de
nitrosaminas específicas do
tabaco na corrente primária da
fumaça do cigarro sob condições
de tragada do regime ISO intenso**

Versão oficial em português da obra original em inglês

WHO TobLabNet SOP 03 - Standard operating procedure for determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions

© Organização Mundial da Saúde, 2014

ISBN: 978-92-4-150666-3 (versão eletrônica)

Método Oficial TobLabNet da OMS - POP 03. Procedimento Operacional Padrão para determinação de nitrosaminas específicas do tabaco na corrente primária da fumaça do cigarro sob condições de tragada do regime ISO e intenso

ISBN: 978-92-75-72885-7 (PDF)

ISBN: 978-92-75-12885-5 (versão impressa)

© Organização Pan-Americana da Saúde, 2024

Alguns direitos reservados. Esta obra está disponível nos termos da licença Atribuição-NãoComercial-Compartilhual 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 03. Procedimento Operacional Padrão para determinação de nitrosaminas específicas do tabaco na corrente primária da fumaça do cigarro sob condições de tragada do regime ISO e intenso. Brasília, D.F.; 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.37774/9789275728857>.

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 03

Data: junho de 2014

OPAS



Organização
Pan-Americana
da Saúde



Organização
Mundial da Saúde
ESCRITÓRIO REGIONAL PARA AS
Américas

Organização Mundial da Saúde
Rede de Laboratórios de Tabaco
Procedimento operacional padrão
Determinação de nitrosaminas específicas do tabaco
na corrente primária da fumaça do cigarro sob
condições de tragada do regime ISO e intenso

Método:	Determinação de nitrosaminas específicas do tabaco na corrente primária da fumaça do cigarro sob condições de tragada do regime ISO e intenso
Analitos:	3-(1-nitrosopirrolidina-2-il)piridina (CAS 16543-55-8) 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (CAS 64091-91-4) N-nitroso anatabina (CAS 71267-22-6) N-nitroso anabasina (CAS 37620-20-5)
Matriz:	material particulado de corrente primária da fumaça do cigarro de tabaco
Última atualização:	junho de 2014

Nº: POP 03

Data: junho de 2014

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.

N.º: POP 03

Data: junho de 2014

PREÂMBULO

Este documento foi preparado por membros Rede de Laboratórios de Tabaco (TobLabNet) da Organização Mundial da Saúde (OMS) como um procedimento operacional padrão (POP) do método analítico para determinar nitrosaminas específicas do tabaco (TSNA) na corrente primária da fumaça sob o regime de tragada da Organização Internacional de Normalização (ISO) intenso.

INTRODUÇÃO

Para estabelecer medidas equivalentes para o ensaio de produtos de tabaco em escala mundial é necessário que haja métodos consensuais de mensuração 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, na 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 ao Secretariado 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, no Canadá, em outubro de 2006, o grupo de trabalho para os artigos 9 e 10 identificou a seguinte composição, 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 deste conteúdo exigirá a validação de três métodos: um para nicotina, um para amônia e um para umectantes.

A partir dos critérios para priorização estabelecidos na reunião em Ottawa mencionada, o grupo de trabalho identificou as seguintes emissões em corrente primária, cujo ensaio e medição (química analítica) devem ser validados como prioridade:

- 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK);
- N-nitroso nornicotina (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.

O quadro a seguir mostra os dois regimes de fumada para validação dos métodos de ensaio supracitados.

Regime de fumada	Volume de tragada (mL)	Frequência de tragada	Orifícios de ventilação do filtro
Regime ISO: ISO 3308: <i>Máquina de fumar cigarros na rotina analítica – definições e condições-padrão</i>	35	Uma vez a cada 60s	Nenhuma modificação
Regime intenso: idem à ISO 3308, mas modificado conforme indicado	55	Uma vez a cada 30s	Todos os orifícios de ventilação devem estar totalmente ocluídos, conforme descrito no POP 01 da TobLabNet da OMS.

Este POP foi preparado para descrever o procedimento para determinação de TSNA em corrente primária em condições de regime ISO de fumada e regime intenso de fumada.

1 ESCOPO

1.1 Este método serve para a determinação quantitativa das seguintes quatro TSNA em corrente primária: 3-(1-nitrosopirrolidina-2-il)piridina (NNN), 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*-nitroso anatabina (NAT) e *N*-nitroso anabasina (NAB) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).

Nota: a Conferência das Partes recomendou medir apenas NNN e NNK. As instruções para NAT e NAB são aqui incluídas para os laboratórios que optarem por realizar essas medições.

1.2 A NNN e a NNK são carcinógenos potentes. A NAB é um carcinógeno menos potente e a NAT não é carcinogênico. A NNN e a NNK não estão presentes naturalmente em folhas de tabaco, mas se formam pela nitrosação da nicotina na cura e no armazenamento do tabaco. A NAB é formada pela nitrosação de anabasina e a NAT pela nitrosação de anatabina. Após serem absorvidas pelo organismo, a NNN e a NNK são hidroxiladas a compostos que formam adutos com a hemoglobina ou o DNA.

2 REFERÊNCIAS

2.1 ABNT NBR ISO 3402: *Tabaco e produtos de tabaco – Atmosfera para condicionamento e ensaio.*

2.2 ABNT NBR ISO 4387: *Cigarro – Determinação de material particulado total e material particulado seco livre de nicotina, utilizando análise de rotina em máquina de fumar.*

- 2.3** Organização Mundial da Saúde. *Procedimento operacional padrão para regime intenso de fumada de cigarro*. Genebra: Rede de Laboratórios de Tabaco (POP 01 da TobLabNet da OMS).
- 2.4** ABNT NBR ISO 3308: *Máquina de fumar cigarros na rotina analítica – definições e condições padrão*.
- 2.5** ABNT NBR ISO 8243: *Cigarros – Amostragem*.
- 2.6** Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime. *Guidelines on representative drug sampling*. Viena: Divisão de Análises Científicas e Laboratoriais, 2009 (http://www.unodc.org/documents/scientific/Drug_Sampling.pdf).
- 2.7** Organização Mundial da Saúde. *Procedimento operacional padrão para validação de métodos analíticos para o conteúdo e emissões de produtos do tabaco*. Genebra, Rede de Laboratórios de Tabaco (POP 02 da TobLabNet da OMS).
- 2.8** Organização Mundial da Saúde. *Method validation report of World Health Organization TobLabNet official method: Determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions*. Genebra, Rede de Laboratório de Tabaco, em processo de publicação.
- 2.9** ABNT NBR ISO 5725-1: *Exatidão (veracidade e precisão) dos métodos e dos resultados de medição – Parte 1: Princípios gerais e definições*.
- 2.10** ABNT NBR ISO 5725-2: *Exatidão (veracidade e precisão) dos métodos e dos resultados de medição – Parte 2: Método básico para determinação da repetibilidade e reprodutibilidade de um método-padrão de medição*.

3 TERMOS E DEFINIÇÕES

- 3.1** MPT: material particular total.
- 3.2** TSNA: nitrosaminas específicas do tabaco.
- 3.3** NNN: 3-(1-nitrosopirrolidina-2-il)piridina.
- 3.4** NNK: 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona.
- 3.5** NAT: N-nitroso anatabina.
- 3.6** NAB: N-nitroso anabasina.
- 3.7** *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).
- 3.8** *Regime intenso*: parâmetros para fumada de produtos de tabaco que consistem de um volume de tragada de 55 mL, intervalo de tragada de 30 segundos, duração de tragada de 2 segundos e oclusão total dos orifícios de ventilação do filtro.

- 3.9** *Regime ISO:* parâmetros para fumada de produtos de tabaco que consistem de um volume de tragada de 35 mL, intervalo de tragada de 60 segundos, duração de tragada de 2 segundos e ausência de oclusão dos orifícios de ventilação do filtro.
- 3.10** *Amostra laboratorial:* amostra para ensaio em laboratório, consistindo de um único produto enviado ao laboratório em um determinado ponto ou período de tempo.
- 3.11** *Amostra para ensaio:* produto a ser analisado, obtido de forma aleatória da amostra laboratorial.
- 3.12** *Parcela para ensaio:* parcela aleatória da amostra para ensaio a ser usada em uma única determinação.

4 RESUMO DO MÉTODO

- 4.1** A corrente primária da amostra de cigarro para ensaio é retida em um filtro de fibra de vidro (em geral denominado filtro Cambridge).
- 4.2** Deve-se ajustar o número de cigarros para evitar supersaturar o filtro. Se o MPT ultrapassar 600 mg no filtro de 92 mm ou 150 mg no filtro de 44 mm, deve-se reduzir o número de cigarros fumados em cada filtro.
- 4.3** Uma solução contendo uma mistura de dois (ou quatro) padrões internos isotopicamente marcados é adicionada ao filtro, que é extraído com acetato de amônio.
- 4.4** O extrato é filtrado e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) com ionização por electrospray. Os íons dos analitos são detectados no modo EM/EM.
- 4.5** A razão da área do pico do analito natural em relação ao padrão interno marcado, obtida no cromatograma de íons reconstruído, é comparada em uma curva de calibração criada com a análise dos padrões com concentrações conhecidas de TSNA para determinar o conteúdo/teor de TSNA de cada parcela para ensaio.

5 PRECAUÇÕES AMBIENTAIS E DE SEGURANÇA

PRECAUÇÃO: as nitrosaminas são carcinógenos potentes. Deve-se tomar precauções para evitar a exposição humana.

As nitrosaminas e as respectivas soluções devem ser manuseadas em um exaustor de fumaça, compartimento ou equivalente com ventilação adequada.

O laboratório deve estabelecer os procedimentos para o descarte de soluções contendo nitrosaminas.

- 5.1** Seguir as precauções ambientais e de segurança rotineiras, como em qualquer atividade de laboratório químico.
- 5.2** O ensaio e a avaliação de certos produtos com este método para ensaio podem requerer o uso de materiais ou equipamentos potencialmente perigosos ou nocivos ao ambiente. Este documento não tem o objetivo de abordar todos os aspectos de segurança associados ao seu uso. Todos os usuários têm a responsabilidade de consultar as autoridades compe-

tentes e instituir práticas de saúde e segurança, assim como precauções ambientais, com os requisitos regulamentares relevantes antes do uso deste método.

- 5.3** Tomar cuidado especial para evitar a inalação ou a exposição da pele a produtos químicos nocivos. O usuário deve usar um exaustor de fumaça química e paramentar-se com avental próprio para laboratório, luvas e protetores oculares ao preparar ou manusear os materiais não diluídos, soluções-padrão, soluções diluentes ou amostras coletadas.

6 UTENSÍLIOS E EQUIPAMENTO

Aparelhagem de uso comum em laboratório como:

- 6.1** Equipamento para condicionar os cigarros, conforme especificado na ISO 3402 [2.1].
- 6.2** Equipamento para marcar o comprimento da guimba do cigarro, conforme especificado na ISO 4387 [2.2].
- 6.3** Equipamento para tapar os orifícios de ventilação do filtro no regime intenso de fumada como específico no POP 01 da TobLabNet da OMS [2.3].
- 6.4** Equipamento para realizar a fumada de produtos de tabaco, conforme especificado na ISO 3308 [2.4].
- 6.5** Balança analítica com precisão mínima de quatro casas decimais.
- 6.6** Agitador tipo vórtex ou tipo wrist action, ou equivalente.
- 6.7** Pipetas e pontas com capacidade de dispensação com exatidão de volumes entre 100 e 1.000 µL.
- 6.8** Pipetas volumétricas de 2 mL, ou equivalente.
- 6.9** Cilindros de vidro graduados de 25 mL e 2 L.
- 6.10** Septos revestidos de politetrafluoretileno (PTFE), ou equivalente.
- 6.11** Frascos volumétricos (10 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 1 L e 2 L).
- 6.12** Garrafas de vidro âmbar (60 mL, 1 L, ou frascos apropriados).
- 6.13** Filtros para seringa de nylon GD/X (25 mL x 0,45 µm).
- 6.14** Seringa de 5 mL, ou equivalente.
- 6.15** Filtros da membrana de nylon (47 mm x 0,45 µm), ou equivalente.
- 6.16** Pipetas para transferência de vidro, ou equivalente.
- 6.17** Frascos autoamostradores de 2 mL ou equivalente.
- 6.18** Instrumento de CLAE com interface à EM/EM.
- 6.19** Espectrômetro de massas de triplo quadrupolo sequencial EM/EM.

6.20 Coluna analítica de CLAE com capacidade de separação diferenciada dos picos de TSNA e de TSNA isotopicamente marcadas dos picos de outros componentes das emissões do cigarro, por exemplo, Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (tamanho de partícula 3,5 µm, 2,1 x 150 mm).

6.21 Pré-coluna RP C18 Opti-Guard, ou equivalente apropriado (opcional).

7 MATERIAIS E REAGENTES

Todos os reagentes são de grau analítico ou superior, a menos que indicado de outra maneira. Quando possível, os reagentes são identificados com o respectivo número do registro *Chemical Abstracts Services* (CAS).

7.1 3-(1-nitrosopirrolidina-2-il)piridina (NNN) [16543-55-8].

7.2 3-(1-nitrosopirrolidina-2-il)piridina marcada com deutério (NNN-d₄).

7.3 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) [64091-91-4].

7.4 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona marcada com deutério (NNK-d₄).

7.5 N-nitroso anatabina (NAT) [71267-22-6].

7.6 N-nitroso anatabina marcada com deutério (NAT-d₄).

7.7 N-nitroso anabasina (NAB) [37620-20-5].

7.8 N-nitroso anabasina marcada com deutério (NAB-d₄).

7.9 Acetato de amônio, de grau analítico para CLAE [631-61-8].

7.10 Ácido acético glacial [64-19-7].

7.11 Água tipo 1 [7732-18-5], água deionizada ou equivalente.

7.12 Acetonitrila de grau analítico para CLAE [75-05-8].

7.13 Metanol de grau analítico para CLAE [67-56-1].

8 PREPARO DE VIDRARIAS

Vidrarias limpas e secas para evitar contaminação.

9 PREPARO DE SOLUÇÕES

O método para o preparo de soluções aqui descrito serve para referência e, se necessário, pode ser adaptado.

9.1 Acetato de amônio (100 mmol/L): solução de extração.

9.1.1 Pesar aproximadamente 7,7 g de acetato de amônio.

9.1.2 Dissolver em água o acetato de amônio que foi medido, em um frasco volumétrico de 1 L, ou outro frasco apropriado (por exemplo, béquer).

9.1.3 Tampar hermeticamente e agitar o conteúdo até misturar completamente.

9.1.4 Transferir a uma garrafa de vidro âmbar de 1 L e armazenar em temperatura entre 4 °C e 10 °C.

9.2 Fase móvel A (ácido acético a 0,1% em água (v/v)).

- 9.2.1** Transferir aproximadamente 1,4 L de água para um frasco volumétrico de 2 L, ou outro frasco apropriado (por exemplo, béquer).
- 9.2.2** Pipetar 2 mL de ácido acético glacial no frasco.
- 9.2.3** Misturar e adicionar água para completar o volume.
- 9.2.4** Tampar e misturar a solução. Armazená-la em temperatura entre 4 °C e 10 °C.

9.3 Fase móvel B (ácido acético a 0,1% em metanol (v/v))

- 9.3.1** Transferir aproximadamente 1,4 L de metanol para um frasco volumétrico de 2 L, ou outro frasco apropriado (por exemplo, béquer).
- 9.3.2** Pipetar 2 mL de ácido acético glacial no frasco.
- 9.3.3** Misturar e adicionar metanol até completar o volume.
- 9.3.4** Tampar e misturar a solução. Armazená-la em temperatura entre 4 °C e 10 °C.

10 **PREPARO DE PADRÕES**

O método para o preparo de soluções-padrão descrito adiante serve para referência e, se necessário, pode ser adaptado.

10.1 Padrões internos isotopicamente marcados.

10.1.1 Solução estoque do padrão interno de TSNA (0,4 mg/mL).

- 10.1.1.1** Pesar aproximadamente 4 mg (m_{is}) de cada TSNA isotopicamente marcada em frascos volumétricos de 10 mL em uma balança analítica com precisão de quatro casas decimais e registrar o peso com precisão de 0,1 mg.
- 10.1.1.2** Dissolver cada um dos padrões internos de TSNA medidos em 10 mL de acetonitrila. Misturar bem.
- 10.1.1.3** Rotular e armazenar em temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ em frascos âmbar. A solução permanece estável por dois anos.

10.1.2 Solução de padrão interno misturado de TSNA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

- 10.1.2.1** Pipetar 1,25 mL (V_{is}) de cada estoque do padrão interno preparado em **10.1.1** em um frasco volumétrico de 100 mL.
- 10.1.2.2** Diluir até a marca com 100 mmol/L de acetato de amônio. Misturar bem.
- 10.1.2.3** Rotular e armazenar em temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ em frascos âmbar. A solução permanece estável por duas semanas.

10.2 Padrões naturais.

As soluções (estoque) padrão são preparadas em acetonitrila e armazenadas em temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. As soluções-padrão misturadas intermediárias são preparadas a partir das soluções (estoque) padrão.

10.2.1 Soluções estoque do padrão de TSNA (0,4 mg/mL).

10.2.1.1 Pesar aproximadamente 4 mg (m_s) de cada uma das quatro TSNA em uma balança analítica com precisão de quatro casas decimais e registrar o peso.

10.2.1.2 Dissolver cada um dos padrões de TSNA medidos em 8 mL de acetonitrila em um frasco volumétrico de 10 mL.

10.2.1.3 Encher até a marca com acetonitrila e misturar bem.

10.2.1.4 Rotular e armazenar em temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ em frascos âmbar. A solução permanece estável por dois anos.

10.2.2 Solução-padrão misturada intermediária de TSNA (1 $\mu\text{g/mL}$)

10.2.2.1 Pipetar 25 μL (V_{ss}) de cada uma das quatro soluções (estoque) padrão preparadas em **10.2.1** em um frasco volumétrico de 10 mL.

10.2.2.2 Diluir até a marca com 100 mmol/L de acetato de amônio e misturar bem.

10.2.2.3 Rotular e armazenar em temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ em um frasco âmbar. A solução permanece estável por duas semanas.

10.2.3 Soluções-padrão misturadas finais de TSNA.

10.2.3.1 Preparar as soluções-padrão finais, conforme indicado na Tabela 1.

10.2.3.2 Adicionar volumes variáveis da solução-padrão misturada intermediária (**10.2.2**) em um frasco volumétrico de 10 mL.

10.2.3.3 Adicionar 100 μL da solução de padrão interno (**10.1.2**), encher até a marca com 100 mmol/L de acetato de amônio e misturar bem.

10.2.3.4 As concentrações finais dos padrões internos podem ser determinadas com a seguinte fórmula:

Concentração final (IS) (ng/mL)

$$= \frac{m_{IS}}{10} \times \frac{V_{IS}}{100} \times \frac{0,1}{10} \times 10^6$$

em que:

m_{IS} é o peso original (em mg) do padrão interno determinado em 10.1.1.1.

V_{IS} é o volume da solução de padrão interno misturada (em mL), pipetada em 10.1.2.1.

Nota: 106 é o fator de conversão de mg em ng.

10.2.3.5 As concentrações finais dos padrões são determinadas com a seguinte fórmula:

Concentração final (ng/mL)

$$= \frac{m_{IS}}{10} \times \frac{V_{IS}}{10} \times \frac{V_{MIX}}{10} \times 10^6$$

em que:

m_s é o peso original (em mg) do padrão determinado em **10.2.1.1**.

V_{ss} é o volume da solução-padrão misturada (em mL), pipetado em **10.2.2.1**.

V_{mix} é o volume da solução-padrão misturada (em mL), indicado na Tabela 1.

10.2.3.6 Outras concentrações maiores dos padrões podem ser necessárias para ampliar a faixa de calibração a fim de englobar os produtos com altos teores de TSNA.

Tabela 1. Padrões de calibração de TSNA

Padrão	Volume de solução-padrão intermediária misturada de TSNA (1µ g/mL) (mL) (V_{mix})	Volume de solução de padrão interno misturada de TSNA (mL) (V_{is})	Volume total (mL)	Concentração aproximada de cada TSNA na solução-padrão final misturada (ng/mL)
1	0,005	0,100	10	0,5
2	0,010	0,100	10	1,0
3	0,020	0,100	10	2,0
4	0,050	0,100	10	5,0
5	0,200	0,100	10	20,0
6	0,500	0,100	10	50,0
7	1,000	0,100	10	100,0
8	2,000	0,100	10	200,0

A faixa de soluções-padrão pode ser ajustada de acordo com o instrumento usado e as amostras a serem analisadas, considerando-se a possibilidade de ocorrer um efeito nos limites de sensibilidade do método.

Os solventes e as soluções devem ser equilibrados à temperatura ambiente antes do uso.

11 AMOSTRAGEM

11.1 Coletar uma amostra de cigarro conforme descrito na ISO 8243 [2.5]. Podem ser usados métodos alternativos para obter uma amostra laboratorial representativa de acordo com a prática do laboratório ou conforme regulamentação específica ou disponibilidade de amostras.

11.2 Constituição da amostra para ensaio

11.2.1 Dividir a amostra laboratorial em unidades (por exemplo, maço ou recipiente), conforme o caso.

11.2.2 Obter uma quantidade igual de produto para cada amostra para ensaio de, pelo menos, \sqrt{n} [2.6] das unidades (por exemplo, maço ou recipiente).

12 PREPARO DE CIGARROS

12.1 Condicionar todos os cigarros a serem fumados, conforme especificado na ISO 3402 [2.1].

12.2 Marcar os cigarros no comprimento da guimba, conforme descrito na ISO 4387 [2.2] e no POP 01 da TobLabNet da OMS [2.3].

12.3 Preparar as amostras a serem fumadas para ensaio de acordo com as condições de regime ISO intenso, conforme especificado no POP 01 da TobLabNet da OMS [2.3].

13 PREPARO DA MÁQUINA DE FUMAR

13.1 Condições ambientais

As condições ambientais para fumada estão especificadas na ISO 3308 [2.4].

13.2 Especificações de máquinas de fumar

Seguir as especificações da ISO 3308 [2.4] para máquinas de fumar, exceto para o regime intenso de tragada, quando a máquina de fumar deve ser preparada, conforme descrito no POP 01 da TobLabNet da OMS [2.3].

14 GERAÇÃO DE AMOSTRAS

Realizar a fumada de um número suficiente de cigarros na máquina de fumar especificada evitando a supersaturação e mantendo as concentrações de NNN, NNK, NAT e NAB dentro da faixa de calibração preparada para a análise.

14.1 Realizar a fumada das amostras para ensaio do cigarro e coletar o MPT, conforme especificado na ISO 4387 [2.2] ou no POP 01 da TobLabNet da OMS [2.3].

14.2 Incluir, pelo menos, uma amostra para ensaio de referência para controle de qualidade, se necessário.

14.3 Ao analisar diferentes tipos de amostras pela primeira vez, avaliar se ocorre a supersaturação do filtro. Deve-se ajustar o número de cigarros. Se o MPT ultrapassar 600 mg no filtro de 92 mm ou 150 mg no filtro de 44 mm, reduzir o número de cigarros fumados em cada filtro.

14.4 O número de cigarros a serem fumados por medição em máquinas de fumar linear e rotatória em condições de regime ISO de fumada e regime intenso de fumada é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Número de cigarros a serem fumados por medição em máquinas de fumar linear e rotatória

	Regime ISO de fumada		Regime intenso de fumada	
	Linear	Rotatória	Linear	Rotatória
N.º de cigarros por filtro (n)	5	20	3	10
N.º de filtros por resultado	4	1	7	2

14.5 Registrar o número de cigarros e o número total de tragadas por filtro.

14.6 Após realizar a fumada do número necessário de amostras para ensaio, efetuar cinco tragadas de limpeza e retirar o suporte do filtro da máquina de fumar.

15 PREPARO DE AMOSTRAS

15.1 Extração do filtro

- 15.1.1** Retirar o filtro do suporte. Dobrar o filtro ao meio, e novamente ao meio, deixando o MPT na parte interna. Utilizar o lado oposto ao da coleta de MPT para limpar a superfície interna do suporte do filtro, limpando também as partículas presentes no suporte. Depositar cada filtro em uma garrafa âmbar de 60 mL, ou equivalente.
- 15.1.2** Adicionar a cada filtro a solução de padrão interno misturada de TSNA (**10.1.2**), contendo TSNA isotopicamente marcada (200 µL no filtro de 44 mm e 500 µL no filtro de 92 mm).
- 15.1.3** Pipetar 100 mmol/L de solução aquosa para extração de acetato de amônio (20 mL no filtro de 44 mm e 50 mL no filtro de 92 mm) dentro da garrafa âmbar.
- 15.1.4** Utilizando um agitador tipo wrist action, agitador circular ou equivalente, extrair as TSNA do filtro agitando a 250 rpm por 30 min.
- 15.1.5** Retirar alíquotas (por exemplo, com um volume de 1 mL a 2 mL) do extrato. Fazer a filtração em um filtro de membrana com poros de 0,45 µm, ou menores, e depositá-las em um frasco autoamostrador.

16 ANÁLISE DE AMOSTRAS

Este método para quantificar TSNA em corrente primária utiliza CLAE acoplada a um espectrômetro de massas de triplo quadrupolo. Os analitos são isolados de outras possíveis substâncias interferentes em uma coluna de CLAE. Maior seletividade pode ser obtida com o uso de espectrômetro de massas de triplo quadrupolo com ionização por electrospray no modo EM/EM. A comparação da razão da área (área do analito natural em relação à área do analito isotopicamente marcado) das amostras desconhecidas com a razão da área (área do analito natural em relação à área do analito isotopicamente marcado) das concentrações-padrão conhecidas permite obter as concentrações de cada analito de forma individual.

16.1 Características operacionais da CLAE e do espectrômetro de massas, exemplo:

Coluna de CLAE:	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (tamanho de partícula 3,5 µ, 2,1 x 150 mm), ou equivalente
Volume de injeção:	5 µL
Temperatura do forno da coluna:	40°C ± 1°C (alterar se apropriado para a coluna usada)
Degaseificador:	acionado
Fluxo da bomba binária:	0,2 mL/min
Fase móvel A:	ácido acético a 0,1% em água
Fase móvel B:	ácido acético a 0,1% em metanol
Gradiente:	indicado na Tabela 3
Tempo de análise total:	12 min

Tabela 3. Gradientes de CLAE para separação de TSNA

Tempo (min)	Vazão (µL/min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	200	50	50
3,0	200	10	90
4,0	200	0	100
5,0	200	0	100

5,5	200	50	50
12,0	200	50	50

Características operacionais do espectrômetro de massas

Tempo de espera:	40 ms
Modo de ionização:	Fonte de ionização por electrospray / modo de íons positivos
Voltagem de electrospray:	1.500 V
Temperatura do TurbolonSpray:	450 °C
Gás de cortina:	nitrogênio
Gás de dissociação induzida por colisão:	nitrogênio
Gás nebulizador:	nitrogênio

Nota: pode ser preciso fazer o ajuste dos parâmetros operacionais de acordo com o instrumento, as características das colunas e a resolução dos picos cromatográficos.

As transições iônicas de quantificação e de confirmação de NNN, NNK, NAT e NAB são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Pares de íons para quantificação e confirmação de cada TSNA

Analito	Par de íons Q1/ Q3 (m/z)
NNN: quantificação	178/148
NNN: confirmação	178/120
NNN-d ₄	182/152
NNK: quantificação	208/122
NNK: confirmação	208/106
NNK-d ₄	212/126
NAT: quantificação	190/160
NAT: confirmação	190/106
NAT-d ₄	194/164
NAB: quantificação	192/162
NAB: confirmação	192/133
NAB-d ₄	196/166

Nota: a razão de íons para confirmação pode orientar a determinação da integridade de cada analito de forma individual.

16.2 Tempo de retenção esperado

16.2.1 Nas condições aqui descritas, a sequência esperada de eluição deve ser NNN, NNN-d₄, NNK, NNK-d₄, NAT, NAT-d₄, NAB e NAB-d₄.

16.2.2 Diferenças na vazão, concentração das fases móveis e fase da coluna podem causar alteração no tempo de retenção.

16.3 Determinação de TSNA

A sequência de determinação deve ser definida de acordo com a prática do laboratório. Esta seção ilustra um exemplo de sequência de determinação para TSNA.

- 16.3.1** Injetar uma solução em branco (solução de extração menos padrões internos isotopicamente marcados) para verificar a presença de contaminação no instrumento ou nos reagentes.
- 16.3.2** Injetar a solução em branco (branco com padrões internos isotopicamente marcados) para verificar o desempenho do instrumento de CLAE-EM/EM.
- 16.3.3** Injetar os padrões de calibração, o controle de qualidade e as amostras.
- 16.3.4** Registrar as áreas do pico de cada TSNA e dos padrões internos.
- 16.3.5** Calcular a razão de resposta relativa (RF) do pico de TSNA em relação ao pico do padrão interno ($RF = A_{TSNA} / A_{IS}$) para cada uma das soluções padrão de TSNA, inclusive para os brancos-padrão.
- 16.3.6** Traçar no gráfico a concentração de cada TSNA (eixo X) em relação às razões das áreas (eixo Y).
- 16.3.7** O coeficiente linear não deve ser significativamente diferente de zero.
- 16.3.8** A curva-padrão deve ser linear em toda a faixa-padrão.
- 16.3.9** Calcular a regressão linear ($Y = a + bx$) desses dados utilizando o coeficiente angular (b) e o coeficiente linear (a) da regressão linear. Se a regressão linear R^2 for menor que 0,99, repetir a calibração. Se um ponto de calibração diferir em mais de 10% do valor esperado (estimado por regressão linear), deve-se omitir este ponto.
- 16.3.10** Injetar os controles de qualidade e as amostras e determinar as áreas dos picos com o software apropriado.
- 16.3.11** A razão dos picos obtida para todas as parcelas para ensaio deve estar dentro da faixa de trabalho da curva de calibração. Se isso não ocorrer, deve-se ajustar as concentrações das soluções-padrão ou da parcela para ensaio.

Ver os cromatogramas representativos no Anexo 1.

17 ANÁLISE DE DADOS E CÁLCULOS

O coeficiente angular e o coeficiente linear são determinados a partir das respostas relativas do analito e do padrão marcado em relação às concentrações relativas do analito e do padrão marcado.

- 17.1** Calcular a razão de resposta relativa das áreas dos picos para cada TSNA para cada um dos padrões de calibração (**10.2.3**):

$$RF = \frac{A_a}{A_{IS}}$$

em que:

RF é a razão de resposta relativa.

A_a é a área do analito considerado.

A_{IS} é a área do respectivo padrão interno.

Traçar um gráfico do fator de resposta relativa, A_a/A_{IS} , (eixo Y) em relação à concentração (eixo X) de cada TSNA. Calcular a regressão linear ($Y =$

$a + bx$) desses dados utilizando o coeficiente angular (b) e o coeficiente linear (a) da regressão linear.

17.2 A curva-padrão deve ser linear em toda a faixa-padrão.

17.3 O conteúdo/teor M_{ts} de uma certa TSNA no analito considerado (ng/cigarro) é determinado pela razão de resposta relativa calculada para a parcela para ensaio, o coeficiente angular e o coeficiente linear obtidos da curva de calibração apropriada a partir da seguinte equação:

$$M_{ts} = \frac{Y - a}{b} \times \frac{V}{n}$$

em que:

M_{ts} é o conteúdo/teor calculado em nanograma por cigarro.

Y é a razão de resposta relativa (A_a/A_{ts}).

a é o coeficiente linear da regressão linear obtido da curva-padrão de calibração.

b é o coeficiente angular da regressão linear obtida da curva-padrão de calibração.

V é o volume da solução de extração (20 mL no filtro Cambridge de 44 mm ou 50 mL no filtro Cambridge de 92 mm).

n é o número de cigarros fumados por filtro (ver Tabela 2).

Podem ser usados procedimentos alternativos de cálculo, se necessário.

18 PRECAUÇÕES ESPECIAIS

18.1 Após estabelecer uma nova coluna, condicioná-la conforme especificado pelo fabricante injetando um extrato de amostra de tabaco sob as condições especificadas para o instrumento. Repetir as injeções até que as áreas dos picos (ou alturas) para cada uma das TSNA e padrões internos sejam reproduzíveis.

19 APRESENTAÇÃO DE DADOS

19.1 Informar as medições para cada amostra avaliada.

19.2 Informar os resultados em ng/cigarro, ou conforme exigido.

20 CONTROLE DE QUALIDADE

20.1 Parâmetros de controle

Nota: se as medições para controle estão fora dos limites de tolerância dos valores esperados, deve-se investigar adequadamente e tomar as medidas cabíveis.

Nota: deve-se realizar outros procedimentos de garantia da qualidade em cumprimento das políticas implantadas no laboratório.

20.2 Branco para reagentes laboratoriais

Para detectar potencial contaminação no preparo e na análise das amostras, realizar uma determinação do branco para os reagentes laboratoriais, conforme descrito em 16.3.2. O branco consiste em todos os

reagentes e materiais usados para analisar as amostras para ensaio e é analisado como uma amostra para ensaio. O branco deve ser avaliado de acordo com as práticas do laboratório.

20.3 Amostra de controle de qualidade

Para comprovar a constância de todo o processo analítico, analisar um cigarro de referência (ou uma amostra adequada para controle de qualidade) de acordo com as práticas do laboratório.

20.4 Refazer a curva de calibração após 20 injeções da amostra para ensaio (20 extratos da amostra).

21 ESPECIFICAÇÕES DPARA DESEMPENHO DO MÉTODO

21.1 Limite de notificação

O limite de notificação é estabelecido na menor concentração dos padrões de calibração usados, recalculado para ng/cigarro (por exemplo, 20 ng/cigarro corresponde à menor concentração-padrão de calibração de 0,5 ng/mL).

21.2 Recuperação de matriz fortificada no laboratório

A recuperação dos analitos adicionados à matriz é usada como medida substituta da exatidão. A recuperação é determinada ao adicionar uma quantidade conhecida do padrão (após a fumada) ao filtro com fumada de cigarro e extrair o filtro utilizando o mesmo método para extrair as amostras. Os filtros não fortificados também devem ser analisados. A recuperação é calculada a partir da seguinte equação, conforme indicado na Tabela 5:

$$\text{Recuperação (\%)} = 100 \times (\text{resultado analítico} - \text{resultado não fortificado}) / \text{quantidade adicionada}$$

Tabela 5. Médias e recuperação de TSNA adicionadas à matriz

Quantidade adicionada (ng)	NNN		NNK		NAT		NAB	
	Média (ng)	Recuperação (%)	Média (ng)	Recuperação (%)	Média (ng)	Recuperação (%)	Média (ng)	Recuperação (%)
150	146,3	97,5	145,3	96,8	161,3	107,5	149,1	99,4
500	452,8	90,6	473,8	94,8	516,5	103,3	509,4	101,9
1.000	962,5	96,3	973,8	97,4	1.015,8	101,6	1001,1	100,1

21.3 Especificidade analítica

A CL-EM/EM fornece excelente especificidade analítica. O tempo de retenção e a razão dos íons de confirmação, uma faixa estabelecida de razões de resposta dos íons de quantificação em relação aos íons de confirmação e as amostras de controle de qualidade são usados para confirmar a especificidade dos resultados para uma amostra desconhecida.

21.4 Linearidade

As curvas de calibração de TSNA estabelecidas são lineares em toda a faixa de concentração-padrão de 0,5 ng/mL a 200 ng/mL.

21.5 Possibilidade de interferência

Nenhum componente conhecido apresenta tempo de retenção e razão dos pares de íons de confirmação semelhantes aos das TSNA ou padrões internos.

22 REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Um estudo colaborativo internacional [2.8] realizado entre 2009 e 2012, em nove laboratórios e com a análise de três cigarros de referência (1R5F, 3R4F e CM6) e de cigarros de duas marcas comerciais, determinou os limites de precisão para o método, conforme indicado nas Tabelas 6, 7, 8 e 9.

A diferença entre dois resultados obtidos em análise de amostras pareadas de cigarro, feita pelo mesmo usuário com o uso da mesma aparelhagem no menor tempo factível pode ultrapassar o limite de repetibilidade (r), em média, não mais que uma vez em 20 casos com a prática usual correta do método.

Os resultados únicos para amostras pareadas de cigarro informados por dois laboratórios podem diferir acima do limite de reprodutibilidade (R), em média, não mais que uma vez em 20 casos com a prática usual correta do método.

Os resultados do ensaio foram analisados estatisticamente, conforme especificado na ISO 5725-1 [2.9] e na ISO 5725-2 [2.10] para fornecer os dados de precisão apresentados nas Tabelas 6 a 9.

No cálculo de r e R , o resultado de um ensaio em condições de regime ISO de fumada foi definido como a média de sete réplicas do rendimento médio de quatro filtros Cambridge (cinco cigarros fumados por filtro) em máquina de fumar linear e um filtro Cambridge (20 cigarros fumados por filtro) em máquina de fumar rotatória. No regime intenso de fumada, o resultado de um ensaio foi definido como a média de sete réplicas de rendimento médio de duas séries de três filtros Cambridge (três cigarros fumados por filtro) em máquina de fumar linear e duas séries de um filtro Cambridge (10 cigarros fumados por filtro) em máquina de fumar rotatória. Para mais informações, ver a referência [2.8].

Nota: os níveis de TSNA nas marcas comerciais de cigarros estavam dentro da faixa dos cigarros de referência do ensaio. Portanto, eles não são informados nesta tabela.

Tabela 6. Limites de precisão para determinação de NNN (ng/cigarro) em corrente primária de cigarros de referência

Cigarro de referência	Regime ISO de fumada				Regime intenso de fumada			
	N	m_{cig}	r_{limite}	R_{limite}	N	m_{cig}	r_{limite}	R_{limite}
1R5F	9	45,55	6,15	11,22	9	256,72	23,44	53,37
3R4F	9	113,76	12,24	20,02	9	302,24	26,94	60,77
CM6	8	21,02	3,97	8,05	8	40,26	6,77	18,18

Tabela 7. Limites de precisão para determinação de NNK (ng/cigarro) em corrente primária de cigarros de referência

Cigarro de referência	Regime ISO de fumada				Regime intenso de fumada			
	N	m_{cig}	r_{limite}	R_{limite}	N	m_{cig}	r_{limite}	R_{limite}
1R5F	9	23,31	6,17	11,90	9	128,28	21,23	49,05
3R4F	9	95,81	12,65	33,78	9	259,25	34,27	84,70
CM6	8	28,47	6,63	13,46	9	55,91	14,03	29,35

Tabela 8. Limites de precisão para determinação de NAT (ng/cigarro) em corrente primária de cigarros de referência

Cigarro de referência	Regime ISO de fumada				Regime intenso de fumada			
	N	m _{cig}	r _{limite}	R _{limite}	N	m _{cig}	r _{limite}	R _{limite}
1R5F	7	102,43	11,52	48,66	7	264,63	24,41	129,21
3R4F	6	39,7	6,95	12,97	7	225,58	19,36	116,45
CM6	7	32,03	4,45	15,41	7	62,48	8,84	30,59

Tabela 9. Limites de precisão para determinação de NAB (ng/cigarro) em corrente primária de cigarros de referência

Cigarro de referência	Regime ISO de fumada				Regime intenso de fumada			
	N	m _{cig}	r _{limite}	R _{limite}	N	m _{cig}	r _{limite}	R _{limite}
1R5F	6	12,85	1,87	3,46	6	31,95	5,65	10,38
3R4F	6	6,36	1,87	2,12	6	29,48	3,49	7,62
CM6	7	4,67	1,55	6,21	7	8,98	2,88	10,93

em que:

1R5F, 3R4F e CM6 são três cigarros de referência analisados neste estudo
ng é nanograma.

N é o número de laboratórios participantes.

m_{cig} é o valor médio da nitrosamina correspondente.

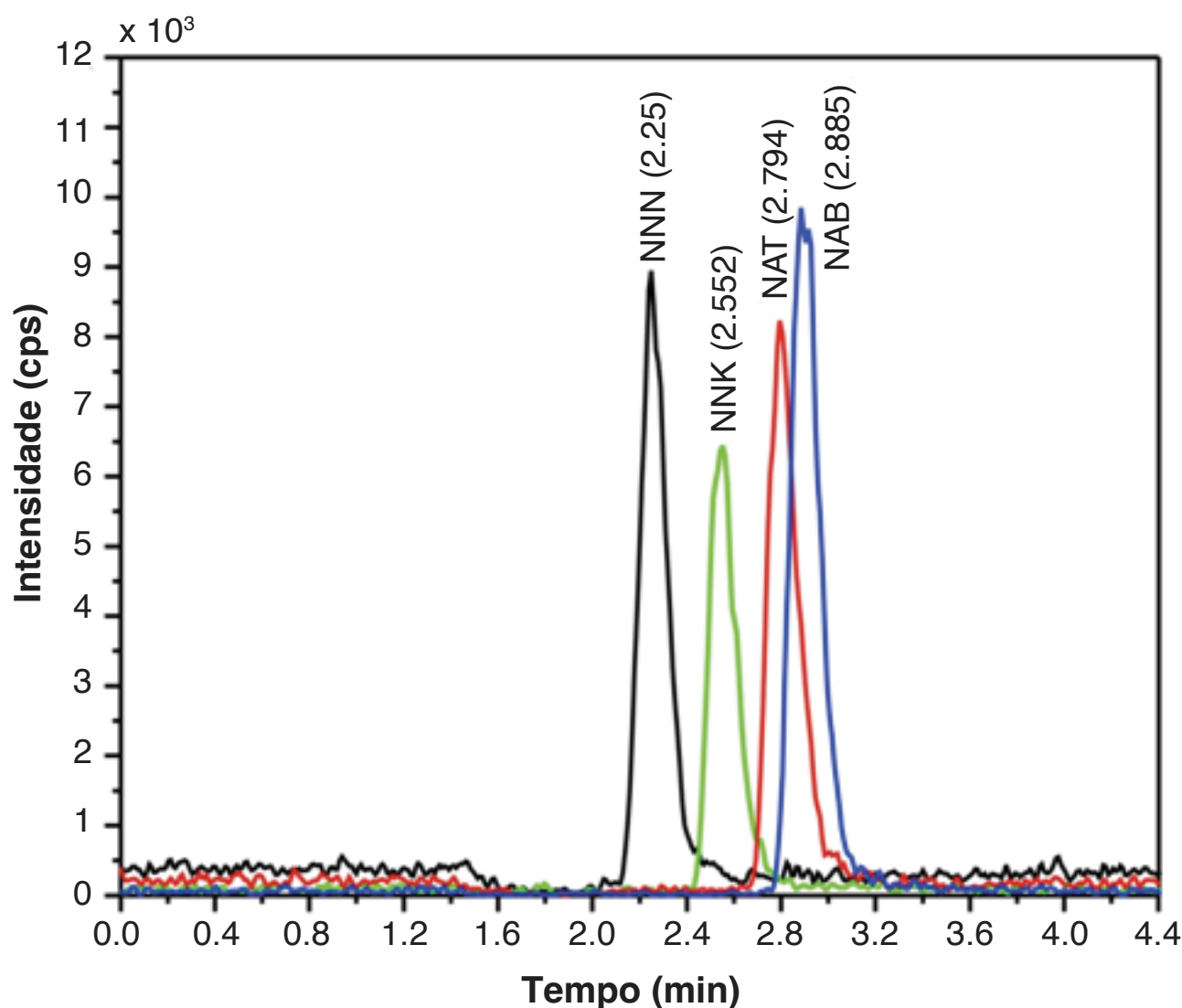
r_{limite} é o limite de repetibilidade da nitrosamina correspondente.

R_{limite} é o limite de reprodutibilidade da nitrosamina correspondente.

23 Relatório para ensaio

As seguintes informações devem constar do relatório do ensaio:

- uma referência ao método, ou seja, POP 03 da TobLabNet da OMS;
- data de recebimento da amostra;
- resultados com as respectivas unidades.

Anexo 1. Cromatogramas característicos obtidos na determinação de nitrosaminas específicas de tabaco em corrente primária**Figura 1. Cromatograma representativo do padrão 2¹**

¹ Obtido em um estudo colaborativo internacional realizado em 2009 e divulgado pelos Centros para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos exclusivamente para consulta.

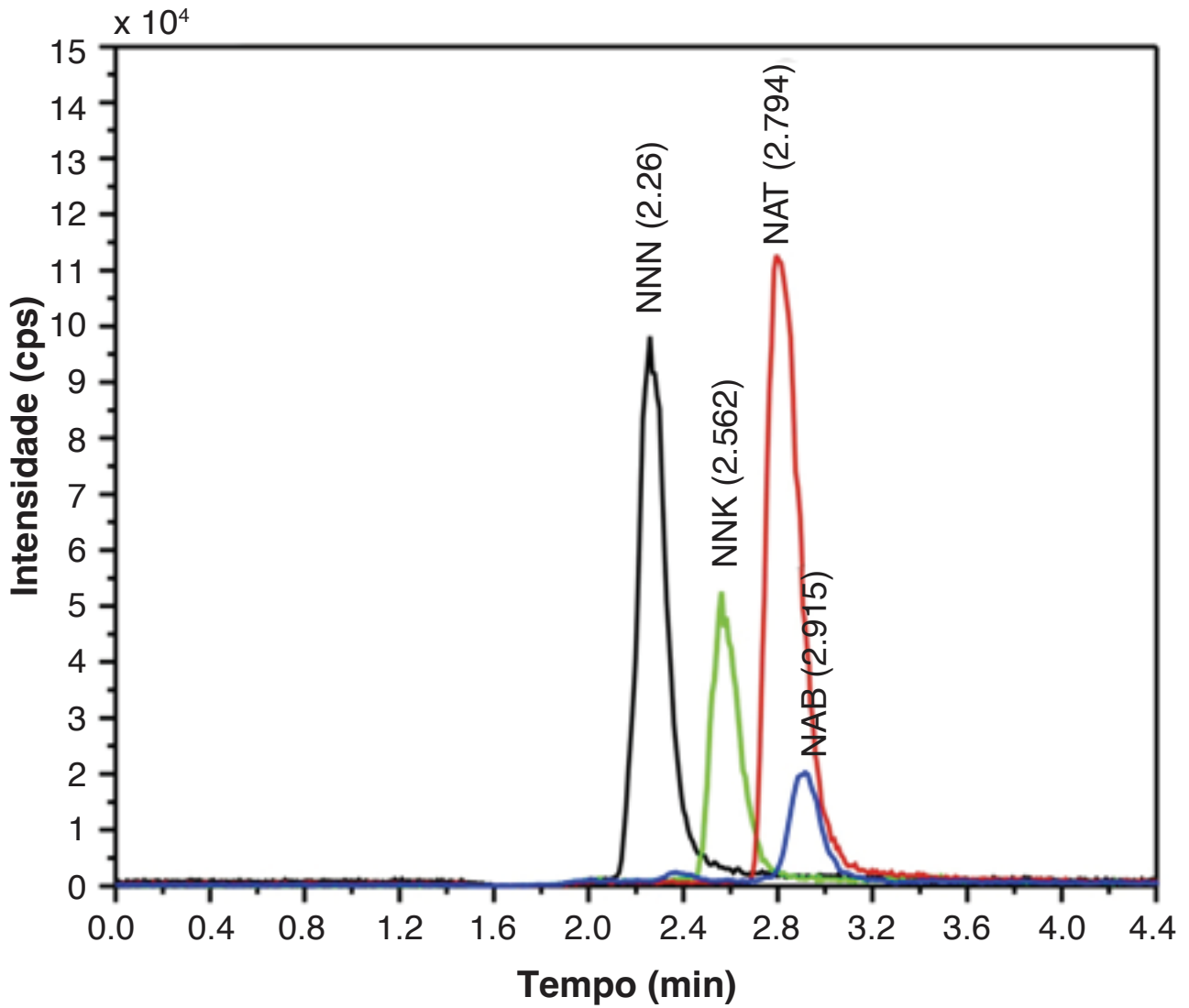


Figura 2. Cromatograma representativo de TSNA em corrente primária de cigarro¹

¹ Obtido em um estudo colaborativo internacional realizado em 2009 e divulgado pelos Centros para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos exclusivamente para consulta.

OPAS



Organização
Pan-Americana
da Saúde



Organização
Mundial da Saúde
ESCRITÓRIO REGIONAL PARA AS Américas

