TMUP
150
2008

Susana Daniela da Silva Martins

Caracterização de Fumo Inalável de Cigarro Quanto a Alguns Compostos Orgânicos Voláteis e Muito Voláteis



Departamento de Química

Porto, Fevereiro 2008

QD121
MARs C
2008


Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
D000119901

Susana Daniela da Silva Martins

Caracterização de Fumo Inalável de Cigarro Quanto a Alguns Compostos Orgânicos Voláteis e Muito Voláteis

Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Para obtenção do grau de Mestre em Química

U.PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Coloc. TMUP-150
Nº 10080
Depart. Química





A Presidente do Júri
M. Agostinha Matos
26.5.2008

Departamento de Química

Porto, Fevereiro 2008

À minha mãe

Ao meu pai

Ao meu irmão

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Teresa Vasconcelos, minha orientadora, pela atenção demonstrada, incentivo, ensinamentos e todo o apoio dispensados, sem os quais não teria sido possível levar a cabo este trabalho.

Ao Professor Doutor Victor Freitas, meu co-orientador, pelo apoio dado na fase de arranque do trabalho e pela disponibilidade sempre demonstrada.

À Professora Doutora Clara Basto pela troca de ideias e conhecimentos partilhados.

Ao Conselho de Prevenção do Tabagismo, presidido pelo Prof. Doutor M. Pais Clemente, o apoio recebido no âmbito de um protocolo estabelecido com a Associação para o Desenvolvimento da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

À Drª Adelina Vieira o apoio concedido.

Um agradecimento muito especial à Gabriela e à Anabela por todo o interesse que sempre demonstraram pelo meu trabalho, pela amizade, pela troca de conhecimentos e pela enorme e importante ajuda dada na fase final de escrita da tese.

A todos os colegas que passaram no laboratório principalmente ao António, ao Joaquim e ao Rafael que tiveram um papel muito importante no arranque do trabalho e mais recentemente à Ana Paula, à Cristina, ao Luiz Pinto, à Marisa, à Mafalda, à Nazaré, ao Pedro Carvalho e ao Pedro Rodrigues que muito contribuem para o excelente ambiente que se vive no laboratório.

Ao Moisés por estar sempre disponível a ajudar e por todo o apoio.

Aos meus amigos (Ana Isabel, Ana Luísa, Ana Margarida, Andreia, Cátia, Cláudia, Débora, Fred, Gabriela, Isabel, Luís, João, Pedro, Rui, Sónia...) por serem quem são e por todos os momentos que vivemos juntos.

A todos os meus familiares, principalmente à minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão por terem permitido que eu chegasse até aqui, pelo incentivo e por serem o meu suporte.

Ao Luís por estar sempre ao meu lado, por tudo...

Resumo

O tabaco é a causa de um número muito elevado de mortes prematuras. Segundo a Organização Mundial de Saúde no ano 2000, a nível mundial, morreram 5 milhões de pessoas com doenças relacionadas como consumo de tabaco, a nível mundial. Em Portugal, devido ao tabaco, morrem cerca de 5 mil pessoas por ano, correspondendo a uma morte a cada duas horas. Durante a combustão do tabaco são produzidas milhares de substâncias, muitas delas tóxicas, que são transportadas até aos pulmões do fumador.

Apesar de existirem métodos padrão para a geração e colheita de fumo inalável em máquinas de fumar (Federal Trade Commission e Organização Internacional de Normalização) e para a determinação de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono, não existem métodos padrão conhecidos para análise de outros constituintes do fumo. O principal objectivo deste trabalho foi a implementação de metodologias para determinação de compostos orgânicos gasosos presentes em fumo inalável de cigarro directamente a partir da fase gasosa. De entre a mistura muito complexa existente no fumo de cigarro o estudo incidiu em benzeno e em alguns dos seus derivados alquilados, designadamente tolueno e m/p-xileno (por serem muito nocivos para o Homem e por se dispor de meios analíticos para detecção de compostos orgânicos voláteis em amostras gasosas) e foi extensivo à acetona e 2-butanona.

Começou-se pelo estabelecimento de um método de amostragem a partir de uma máquina de fumar, eficaz e compatível com o método de análise: o fumo era recolhido num saco de gases e daí era amostrado por microextracção para fase sólida (SPME) (e também tubos com Tenax-TA, para comparação) seguido de desadsorção térmica em cromatógrafo gasoso com detecção por espectrometria de massa (GC-MS). Não se recorreu, portanto, a

extracção por solvente, evitando-se a produção de resíduos. A fibra de SPME continha um revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS).

Uma comparação de declives das rectas obtidas por calibração externa e por adição de padrão (usando SPME) mostrou que se estava na presença de efeito de matriz, o que implicou que a quantificação dos diferentes compostos fosse realizada pelo método de adição de padrão.

O estudo incidiu sobre cigarros comerciais, com filtro, de uma marca americana, muito difundida na Europa, que será aqui designada por marca *A* e em cigarros de referência, produzidos na Universidade de Kentucky (Kentucky Tobacco Research & Development Center), designados na origem por 2R4F.

Os níveis de concentração dos compostos estudados obedeceram à seguinte ordem: m/p-xileno < tolueno < benzeno < 2-butanona < acetona, quer nos cigarros de referência 2R4F quer nos de marca *A*. Nos cigarros de marca *A* os níveis (e respectivos desvios padrão) foram, em µg/cigarro, de 155 ± 36 para acetona, 47 ± 19 para 2-butanona, 44 ± 8 para benzeno, 26 ± 8 para tolueno e 9 ± 2 para m/p-xileno. No caso de cigarros de referência 2R4F, observaram-se níveis (µg/cigarro) de 172 ± 45 para acetona, 41 ± 4 para 2-butanona, 41 ± 8 para benzeno, 40 ± 4 para tolueno e 8 ± 2 para m/p-xileno.

Não se dispondo de materiais de referência com níveis certificados, procurou-se averiguar a existência de erros sistemáticos recorrendo a um método alternativo de amostragem de analitos que usa um processo de extracção bastante distinto: adsorção dos analitos em Tenax-TA contido num tubo de aço, que é depois sujeito a desadsorção térmica para análise por GC-MSD. Uma comparação dos métodos revelou que os dois procedimentos conduziram a resultados que foram estatisticamente iguais assumindo um nível de significância de 5%, para todos os compostos, com excepção dos níveis de tolueno em cigarros de referência 2R4F cujos resultados foram estatisticamente iguais apenas para um nível de significância de 1% e dos níveis de benzeno em cigarros de marca *A* que foram estatisticamente diferentes, embora da mesma ordem de grandeza. De referir ainda que as variâncias associadas às médias não diferem estatisticamente em todos os casos estudados.

Uma comparação dos resultados com outros da literatura, mostrou que os níveis de concentração dos compostos estudados foram da mesma ordem de grandeza em cigarros de diferentes marcas.

Abstract

Tobacco is responsible for a very high number of premature deaths. According the World Health Organization (WHO) tobacco is currently responsible for 5 million deaths per year. In Portugal it causes about 5 thousand deaths per year (one death in each two hours). During the smoking of cigarettes thousands of substances are produced that go to the smoker lung.

There is a lack of standardized analytical methods for smoke components except for the analysis of tar, nicotine and carbon monoxide and for smoke collection on smoking machines (FTC, ISO). The aim of this work was to implement a method for analysis of organic compounds on mainstream cigarette smoke vapour phase. From the complex cigarette smoke matrix, this work focused fundamentally on benzene, toluene and m/p-xylene because of their harmful potential for Humans and because analytical conditions were available to detect this kind of compounds on gas samples. The method was used afterwards to determine acetone and 2-butanone.

This work started by establishing an effective and compatible sampling method to couple with the analytical method: the mainstream smoke was collected on a gas sample bags. Solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were the analytical techniques used, without employing solvent extraction. SPME fibers with poly(dimethylsiloxane) (PDMS) were chosen.

The slopes obtained on the external calibration and on the method of standard addition were compared, indicating matrix effects. Therefore, the method of standard addition was used to quantify the different compounds.

The study focused commercial cigarettes, with filter, from one american brand, here defined by brand *A*. Reference cigarettes 2R4F obtained from the university of Kentucky (Kentucky Tobacco Research & Development Center) were also used.

The results obtained with 2R4F and brand *A* cigarettes, ranked the compounds concentrations in the follow order: m/p-xylene < toluene < benzene < 2-butanone < acetone. The quantified levels (and standard deviations) in μg/cigarette units were for acetone 155 ± 36, for 2-butanone 47 ± 19, for benzene 44 ± 8, for toluene 26 ± 8 and for m/p-xylene 9 ± 2, for brand *A* smoke cigarettes and were for acetone 172 ± 45, for 2-butanone 41 ± 4, for benzene 41 ± 8, for toluene 40 ± 4 and for m/p-xylene 8 ± 2 for 2R4F smoke cigarettes.

As there is no reference material with certificated levels, the existence of systematic error was investigated using an alternative method with a different extraction process: adsorption on Tenax-TA following by thermal desorption and GC-MSD analyse.

The analysis of the results obtained by the two different methods shows that there is no significant different at 5% significance level, to all compounds, except for toluene on reference cigarettes 2R4F where the means were no statistical different to 1% significance level, and for benzene on cigarettes from brand *A* that were statistical different for which level (5% or 1%). The variances of all results showed no significant differences.

The obtained results are in the same order of magnitude of the ones supported in literature.

Résumé

Le tabac est responsable d'un nombre très élevé de décès prématures. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le tabac est actuellement responsable pour 5 millions de décès par an. Au Portugal, il cause environ 5 mille décès par an (un mort dans chaque deux heures). Au cours de la fumée de cigarettes sont produites des millions des substances qui sont transporter au poumon du fumer.

Il manque des méthodes analytiques normalisées pour la fumée, sauf pour l'analyse de la teneur en *tar*, en nicotine et en monoxyde de carbone et de fumée de tabac sur la collecte des machines (FTC, ISO). L'objectif de ce travail a été d'appliquer une méthode d'analyse des composés organiques dans la fumme inhalé de cigarette a partir de la phase vapeur. Parmi les mélanges trés complexes qu'existe dans la fumme du cigarette, ce travail a porté essentiellement sur le benzène, toluène et m/p-xylène en raison de leur potentiel nocif pour l'Homme et parce que les conditions analytiques étaient disponibles pour détecter ce genre de composés sur des échantillons de gaz. La méthode a été utilisée ensuite pour déterminer l'acétone et 2-butanone.

Ce travail a commencé par la mise au point dúne méthode d'échantillonnage efficace et compatible avec la méthode d'analyse: les composés de la fumme ont été recueillies sur un sac à gaz et extraits por microextraction en phase solide (SPME), sans employer extraction par solvant, et finallment analysé por chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG-MS). Pour le SPME ont été choisis des fibres de poly(dimethylsiloxane) (PDMS).

La comparaison des pents de les charts de calibration externe et pour addition d'étalon on montre un effet matrice. Par conséquent, l'addition d'étalon a été utilisée pour quantifier les différents composés.

L'étude a été porté des cigarettes commerciales, avec filtre, d'une marque américaine, ici définie par référence les cigarettes de marque *A*, et sur cigarettes fourni pour l'université du Kentucky (Kentucky Tobacco Research & Development Center), défini comme 2R4F.

Les niveaux de concentrations obtenus pour le composés étudies sont classées dans ordre suivant: m/p-xylène < toluène < benzène < 2-butanone < acétone, pour les deux marque de cigarettes. Les niveaux déterminés (et ecart type) en unités de µg/cigarette ont été de 155 ± 36 pour l'acétone, 47 ± 19 pour le 2-butanone, 44 ± 8 pour le benzène, 26 ± 8 pour le toluène et 9 ± 2 pour le m/p-xylène pour la marque *A*; et 172 ± 45 pour l'acétone, 41 ± 4 pour le 2-butanone, 41 ± 8 pour le benzène, 40 ± 4 pour le toluène et 8 ± 2 pour le m/p-xylène pour 2R4F cigarettes.

Comme il n'ya pas de matériaux de référence certifiés avec les niveaux connue, l'existence d'une erreur systématique a été étudiée en utilisant une méthode alternative différent d'un processus d'extraction: l'adsorption sur Tenax TA suivant par désorption thermique et GC-MS analyser.

L'analyse des résultats obtenus par les deux méthodes différentes montre qu'il n'ya pas de différence significative pour un niveau de signification de 5%, pour tous les composés, à l'exception de toluène référence sur les cigarettes 2R4F lorsque les moyens n'étaient statistique différente que por un niveau de signification de 1%, et pour benzène sur les cigarettes de marque A qui ont éte statistiquement different. Les écarts de l'ensemble des résultats ne montre pas des différences significatives.

Les résultats obtenus sont dans le même ordre de grandeur de ceux decrit dans la littérature.

Índice Geral

Agradecimentos v

Resumo vii

Abstract ix

Résumé xi

Índice Geral xiii

Índice de Figuras xvii

Índice de Tabelas xxi

Símbolos e Abreviaturas xxii

1. Introdução 1

1.1. Evolução do conhecimento científico sobre o tabaco 2

1.2. Malefícios do tabaco 3

1.3. O cigarro e seus constituintes 5

1.4. Caracterização do fumo do cigarro 6

1.5. Ingredientes adicionados ao tabaco 8

1.6. Processo de queima do cigarro 9

1.7. Métodos de amostragem e análise de fumo de cigarro 11

1.7.1. Padronização do "acto de fumar" para estudar o fumo 14

1.7.2. Importância do uso de cigarros de referência 17

1.8. Métodos de recolha e análise usados neste trabalho 18

1.8.1. Microextracção para fase sólida (SPME) 18
1.8.1.1. Descrição da técnica 19
1.8.1.2. Processo de absorção/adsorção 23
1.8.1.3. Termodinâmica do processo de partição/adsorção 26
1.8.1.4. Cinética 30
1.8.1.5. A escolha da fibra 32
1.8.1.6. Aplicação de SPME à análise de tabaco 34
1.8.2. Tubos com adsorvente[63] 36
1.8.2.1. Valores do Branco 37
1.8.2.2. Volume de amostragem seguro 37
1.8.2.3. Armazenamento de amostras recolhidas[63] 38

1.9. Breve descrição da cromatografia gasosa com detector por espectrometria de massa (GC-MS) *39*

Bibliografia 43

2. Parte Experimental 49

2.1. Geração do fumo de cigarro 50
2.1.1. Interferências da própria máquina de fumar cigarros 54

2.2. Padrões e cigarros utilizados 55

2.3. Amostragem 56
2.3.1. Recolha da fase de vapor do fumo inalável de cigarro 56
2.3.2. Adsorção / Absorção para fase sólida dos compostos recolhidos 57
2.3.2.1. Microextracção para fase sólida (SPME) 57
2.3.2.2. Tubos com adsorvente 57

2.4. Descontaminação do material utilizado 58
2.4.1. Máquina de fumar 58
2.4.2. Sacos de gases 58
2.4.3. Fibras de SPME 59
2.4.4. Tubos com enchimentos 59
2.4.5. Coluna do cromatógrafo gasoso 59

2.5. Calibração 59
2.5.1. Obtenção de padrões gasosos para calibração 59
2.5.2. Calibração usando fibras de SPME 60
2.5.2.1. Adição de padrão 60
2.5.2.2. Calibração externa 61
2.5.3. Calibração usando tubos com adsorvente 61

2.6. Análise química 62
2.6.1. SPME – GC/MS 62

2.6.2. Tubos com adsorvente – GC/MSD 63

2.7. Cálculos *64*

2.7.1. Concentrações de padrão adicionadas 64

2.7.2. Parâmetros das rectas de calibração[11,12] 66

2.7.3. Tratamento dos resultados[11,12] 67

2.7.4. Comparação de médias através da aplicação do teste t [11,12] 68

Bibliografia **70**

3. Resultados e Discussão **71**

3.1. Implementação do método analítico *72*

3.1.1. Estabelecimento da quantidade de fumo a recolher 72

3.1.2. Estabilidade do fumo no interior do saco de gases 75

3.1.3. Tempo de exposição necessário para extracção por SPME 77

3.2. Comparação de fibras de SPME com revestimentos de PDMS-DVB e de PDMS *78*

3.2.1. Avaliação das características de resposta do método SPME/GC-MS 79

3.2.1.1. Fibra com revestimento de PDMS-DVB 79

3.2.1.2. Fibra com revestimento de PDMS 82

3.2.1.3. Calibração externa *vs.* adição de padrão 84

3.2.1.4. Repetibilidade dos resultados 87

3.3. Determinação dos níveis de alguns compostos no fumo inalável de cigarro por SPME/GC-MS *87*

3.3.1. Cigarros comerciais 87

3.3.2. Cigarros de referência 88

3.4. Utilização de um método de amostragem alternativo *89*

3.4.1. Resultados obtidos usando Tenax TA / GC-MSD 90

3.4.2. Comparação dos níveis determinados usando dois métodos de amostragem diferentes. 91

3.5. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com outros da literatura *94*

Bibliografia **98**

Conclusões **101**

Anexos **103**

Índice de Figuras

Figura 1.1. Representação da formação do fumo inalável (mainstream) e do fumo sidestream num cigarro.[14] .6

Figura 1.2. Representação esquemática de um dispositivo de SPME. (A) Posição com a fibra retraída na agulha; (B) Posição com a fibra exposta. O detalhe mostra as dimensões típicas da secção com revestimento de 100 μm de espessura.[47] 20

Figura 1.3. (A) Vista interna com a fibra exposta e (B) vista com a fibra exposta e o êmbolo travado pelo pino no centro da fenda em "Z".[47] 20

Figura 1.4. Modo de usar o dispositivo SPME para o processo de extracção e desadsorção do material extraído para analise cromatográfica.[47] 21

Figura 1.5. Forma de operar com SME: (a) extracção directa, (b) extracção a partir do headspace e(c) SPME usando membrana protectora.[48] 22

Figura 1.6. Comparação dos mecanismos de extracção: absorção e adsorção.[49] 25

Figura 1.7. Perfis de extracção, usando uma fibra PDMS, de 1 ppm de benzeno em água (A) segundo o teoricamente esperado e sob quatro condições de agitação: (B) 100% de agitação magnética; (C) 75% de agitação magnética; (D) 50% de agitação magnética e (E) sem agitação.[52] 31

Figura 1.8. Esquema de um cromatógrafo gasoso.[65] 39

Figura 1.9. Representação esquemática do funcionamento de um detector de massa.[66] 40

Figura 2.1. (A) Vista geral da máquina Borgwaldt, modelo RM1/Plus, usada para gerar o fumo do tabaco[1] *e (B) respectivo esquema.*[2] 50

Figura 2.2. Imagem do interior da máquina onde é possível observar o êmbolo e a cavidade cilíndrica onde ele se desloca em movimento de vai e vem, imitando o funcionamento do pulmão humano. 51

Figura 2.3. Fotografias onde se vê o anemómetro que permite controlar a velocidade do ar junto da ponta do cigarro. 52

Figura 2.4. Vista parcial da máquina, com o cigarro colocado. 53

Figura 2.5. Imagem dos porta filtros existentes na máquina de fumar, (A) sem o filtro colocado, (B) com o filtro colocado e (C) ligados por um tubo de teflon (tal como acontece no interior da máquina de fumar). 53

Figura 2.6. Saco na posição de recolha de fumo a partir da máquina de fumar. 56

Figura 2.7. Representação gráfica da pressão vapor em função da temperatura para cada um dos compostos utilizados.[10] 65

Figura 3.1. Cromatograma referente ao fumo de 6 cigarros recolhido num saco de gases de 2 L onde uma fibra de SPME foi exposta durante 15 minutos e espectro de massa da zona correspondente ao tempo de retenção do tolueno. 73

Figura 3.2. Cromatograma referente ao fumo de 1 cigarro recolhido num saco de gases de 0,6 L onde uma fibra de SPME foi exposta durante 10 minutos, e o espectro de massa da zona correspondente ao tempo de retenção do tolueno. 74

Figura 3.3. Cromatograma referente ao fumo de 1 cigarro recolhido num saco de gases de 2 L, que foi de seguida enchido com diazoto e onde a fibra de SPME foi exposta 10 minutos e espectro de massa da zona correspondente ao tempo de retenção do tolueno. 74

Figura 3.4. Cromatograma referente ao fumo de 1 cigarro recolhido num saco de gases de 1 L, onde foi exposta uma fibra de SPME durante 10 minutos. Na análise cromatográfica, foi usado split com uma razão de repartição de 5. 75

Figura 3.5. Variação das áreas dos picos obtidos por GC/MS em função do tempo, partir de fumo de cigarro armazenado um saco de gases (usando a fibra PDMS). 76

Figura 3.6. Variação das áreas dos picos obtidos por GC/MS em função do tempo de exposição de uma fibra de PDMS ao fumo de um cigarro (diluído em azoto) armazenado um saco de gases, para (A) acetona, 2-butanona, benzeno e tolueno e (B) numa escala diferente para m/p-xileno. 77

Figura 3.7. Comparação dos sinais obtidos na análise do fumo de um cigarro usando duas fibras de SPME diferentes: PDMS-DVB (a verde) e PDMS (a vermelho). 78

Figura 3.8. Curvas obtidas para (A) benzeno e (B) tolueno, usando uma fibra de PDMS-DVB, por adição de padrão à mistura contida num saco de gases de 1 L constituída pelo fumo de um cigarro. 80

Figura 3.9. Curvas obtidas para (A) benzeno e (B) tolueno, usando uma fibra de PDMS-DVB, por adição de padrão à mistura gasosa, contida num saco de gases 2 L, constituída pelo fumo de um cigarro diluído em 1 L de diazoto. 81

Figura 3.10. Curvas obtidas para (A) benzeno e (B) tolueno, usando uma fibra de PDMS-DVB, por adição de padrão à mistura gasosa contida num saco de gases de 5 L, constituída pelo fumo de um cigarro e diluído em 3 L de diazoto. 82

Figura 3.11. Rectas obtidas, usando uma fibra de PDMS, por adição de padrão à mistura gasosa contida num saco de gases de 5 L, constituída pelo fumo de um cigarro, diluído em 3 L de diazoto, para (A) benzeno, (B) tolueno, (C) m/p-xileno, (D) acetona e (E) 2-butanona. 83

Figura 3.12. Rectas obtidas com a fibra de PDMS por calibração externa, usando um saco de gases de 5 L com 1,8 L de diazoto, para (A) benzeno, (B) tolueno, (C) m/p-xileno, (D) acetona e (E) 2-butanona. Apresentam-se também os desvios médios associados a cada medição.....85

Figura 3.13. Comparação dos níveis observados no fumo inalável de (A) cigarros da marca A e (B) cigarros de referência Kentucky 2R4F, usando as diferentes técnicas de extracção (Tenax TA e SPME). Incluíram-se os respectivos desvios padrão.....93

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Efeitos de alguns dos componentes presentes no fumo inalável dos cigarros, na saúde.[10] 5

Tabela 1.2. Alguns dos compostos carcinogénicos presentes no fumo do cigarro.[14] 8

Tabela 1.3. Parâmetros utilizados na máquina de fumar, referentes às puxadas de ar.[14,17] 16

Tabela 1.4. Revestimentos de SPME comercializados: modo de uso, algumas propriedades e aplicações.[57] ... 33

Tabela 2.1. Padrões utilizados, qualidade e marca. 56

Tabela 2.2. Características do método usado no GC/MS. 62

Tabela 2.3. Parâmetros usados no sistema analítico, para amostras recolhidas em tubos com adsorvente. 64

Tabela 3.1. Parâmetros das rectas de calibração obtidas por adição de padrão ao fumo de um cigarro para os diferentes compostos. 84

Tabela 3.2. Parâmetros das rectas de calibração externa obtidos para os diferentes compostos. 86

Tabela 3.3. Resultados (média e intervalo de confiança) observados em fumo inalável de cigarros de marca A, após extracção por SPME. Apresentam-se também os valores do desvio padrão (DP) e do desvio padrão relativo (DPR). 88

Tabela 3.4. Resultados (média e intervalo de confiança) observados em fumo inalável de cigarros 2R4F, após extracção por SPME. Apresentam-se também os valores do desvio padrão (DP) e do desvio padrão relativo (DPR). 89

Tabela 3.5. Resultados (média e intervalo de confiança) observados em fumo inalável de cigarros de marca A, após adsorção em tubos com Tenax TA. Apresentam-se também os valores do desvio padrão (DP) e do desvio padrão relativo (DPR). 90

Tabela 3.6. Resultados (média e intervalo de confiança) observados em fumo inalável de cigarros 2R4F, após adsorção em tubos com Tenax TA. Apresentam-se também os valores do desvio padrão (DP), do desvio padrão relativo (DPR). 91

Tabela 3.7. Comparação dos resultados obtidos por dois métodos de extracção diferentes. 92

Tabela 3.8. Níveis de benzeno, tolueno, m/p-xileno, acetona e 2-butanona medidos por diferentes autores no fumo inalável de cigarros de diferentes marcas. 95

Símbolos e Abreviaturas

Símbolos

$[A]$	Concentração do analito na matriz
A_{ad}	Concentração de A na fase sólida por unidade de área
b	Ordenada na origem
C_0	Concentração inicial do analito na amostra (antes da extracção)
C_a^{∞}	Concentração na amostra
C_o^{∞}	Concentração do analito na fase orgânica
C^e_a	Concentração de analito na matriz, em equilíbrio
C^e_f	Concentração de analito na fase extractora (fibra), em equilíbrio
$C_{f\,max}$	Concentração máxima de sítios activos existentes no revestimento
C^e_h	Concentração de analito no *headspace*, em equilíbrio
D_a	Coeficiente de difusão do analito na amostra
D_f	Coeficiente de difusão do analito na fibra extractora
D_h	Coeficiente de difusão do analito no *headspace*
K	Coeficiente de partição
K_{ad}	Constante de equilíbrio de adsorção do analito
K_d	Constante de equilíbrio de desadsorção do analito
K_{fa}	Constante de distribuição fibra/matriz
K_{fh}	Constante de distribuição fibra/*headspace*
K_{ha}	Constante de distribuição *headspace*/matriz
Lf	Espessura do revestimento
Lh	Espessura do *headspace*
Ls	Espessura da fase aquosa (amostra)
m	Declive da recta
N	Velocidade de revolução da barra magnética

n_o	Número de moles inicial de analito na amostra (antes da extracção)
n_A	Número de moles do composto A
n^e_a	Número de moles em equilíbrio na amostra aquosa
n^e_h	Número de moles em equilíbrio no *headspace*
n^e_f	Número de moles em equilíbrio na fibra
$P_{parcialA}$	Pressão parcial do composto A
P_{vaporA}	Pressão vapor do composto A
r	Coeficiente de correlação
r_0	Raio externo do revestimento da fibra
r_{ad}	Taxa de adorção
r_d	Taxa de desadsorção
r_i	Raio interno do revestimento da fibra
R	Constante dos gases perfeitos (0,082057 atm dm^3 mol^{-1} K^{-1})
R_b	Raio da barra magnética
$[S]$	Concentração de locais não ocupados na superfície da fase sólida
s_b	Desvio padrão da ordenada na origem
s_m	Desvio padrão do declive
s_{xe}	Erro associado ao resultado da concentração na amostra
$s_{y/x}$	Desvio padrão residual da curva de calibração
T	Temperatura absoluta
t_e	Tempo requerido para extrair 95% do quantidade de analito em equilíbrio
V_a	Volume da amostra
V_f	Volume da fase extractora (fibra)
V_h	Volume do *headspace*
VS	Volume de saturação
$V_{seringa}$	Volume medido na seringa
x_e	Resultado da concentração na amostra

Acrónimos

BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
COMV's	Compostos orgânicos muito voláteis
CORESTA	Centre de Cooperation pour les Recherches Scientifiques Relative au Tabac
COV's	Compostos orgânicos voláteis
CW-DVB	Carbowax-divinilbenzeno
D.P.	Desvio padrão

D.P.R.	Desvio padrão relativo
FTC	Federal Trade Commission
GC	Cromatógrafo gasoso
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada com um espectrómetro de massa
GL	Graus de liberdade
HC	Health Canada
IARC	International Agency for Research on Cancer
Int. Conf.	Intervalo de confiança
ISO	Organização Internacional de Normalização
L.D.	Limite de detecção
L.Q.	Limite de quantificação
MDPH	Massachusetts Department of Public Health
MPT	Matéria particulada total
MSD	Detector selectivo de massa
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDSM-DVB	Polidimetilsiloxano – divinilbenzeno
SDT	Sistema de desadsorção térmica
SIM	Monotorização do ião seleccionado
SPE	Solid-phase extraction (extracção em fase sólida)
SPME	Solid-phase microextraction (microextracção em fase sólida)
VAS	Volume de amostragem seguro

Alfabeto grego

δ	Espessura de uma camada fronteira hipotética sem agitação (durante o processo de SPME)
Ψ	Constante de equilíbrio em fase adsorvente

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Evolução do conhecimento científico sobre o tabaco

1.2. Malefícios do tabaco

1.3. O cigarro e seus constituintes

1.4. Caracterização do fumo do cigarro

1.5. Ingredientes adicionados ao tabaco

1.6. Processo de queima do cigarro

1.7. Métodos de amostragem e análise de fumo de cigarro

1.8. Métodos de recolha e análise usados neste trabalho

1.9. Breve descrição da cromatografia gasosa com detector por espectrometria de massa (GC-MS)

Bibliografia

1.1. Evolução do conhecimento científico sobre o tabaco

O tabaco é uma planta, originária da América do Sul e pertencente à família das solanáceas das quais existem mais de 50 espécies diferentes. De entre estas, a *Nicotina tabacum* é a que suscita maior interesse.[1]

As primeiras publicações científicas sobre o tabaco começaram a aparecer no século XVI. Nessa época, Jean Nicot (1530 - 1600), então embaixador da França em Portugal, estudou e atribuiu propriedades medicinais à planta, que acabou sendo baptizada com o seu nome (Nicotiana).

Apesar disso, o tabaco tornou-se paulatinamente, ao longo do século XVIII, uma planta de consumo profano, visando o prazer e a diversão. Converteu-se então num grande investimento comercial. Nos Estados Unidos, as plantações da Carolina do Norte tornaram-se referência mundial para todos aqueles que se interessavam pela produção e comercialização do produto. A vocação comercial da planta apareceu associada ao glamour, à sensualidade.

No século XVIII surgiram na Europa as primeiras publicações que associam o tabaco ao cancro do lábio, boca e mucosa nasal. A Inglaterra e a Alemanha foram os países que mais estudaram o assunto. Ainda no século XIX começou a haver consciência de problemas de saúde crónicos associados ao consumo do tabaco. As primeiras vozes que se manifestavam contra o consumo livre do tabaco foram do movimento proibicionista norte-americano. Com base em estudos epidemiológicos realizados em Inglaterra e nos Estados Unidos da América (EUA) a partir dos anos 50 do século XX, a relação entre o cancro do pulmão e tabagismo foi definitivamente estabelecida. Em 1962, o Governo Britânico decretou que os produtos derivados do tabaco deveriam ter avisos sobre os riscos potenciais. Os EUA tomaram atitude semelhante em 1964. Seguiram-se duas décadas de constatações. O combate frontal ao hábito só arrancou em meados dos anos 80 do século passado. Nessa altura já não havia dúvidas acerca dos malefícios causados pelo tabaco, tendo-se intensificado as políticas públicas de prevenção e combate ao fumo. Nos EUA o consumo foi banido de locais fechados, transportes públicos e lojas. Muitos países proibiram a publicidade incentivando a venda de cigarros.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) criou em 1987 o Dia Mundial sem Tabaco (31 de Maio). Em 2003 aprovou um tratado mundial para a prevenção e controlo do tabagismo (Convenção Quadro) que foi assinado por Portugal em Janeiro de 2004. No âmbito desta Convenção Quadro têm vindo a ser desenvolvidas e implementadas diversas

directivas europeias pelos vários estados membro da União Europeia. À semelhança do que alguns países já fizeram, a partir de Janeiro de 2008 foi introduzida em Portugal uma nova legislação para a prevenção e controlo do tabagismo donde se salientam as normas de proibição ou limitação de fumar nos locais públicos e/ou nos locais de trabalho fechados.

1.2. Malefícios do tabaco

O tabaco é a segunda maior causa de morte no mundo. Segundo OMS o tabaco é responsável pela morte de um em cada 10 adultos (cerca de 5 milhões de mortes cada ano) a nível mundial. Prevê-se que cause cerca de 10 milhões de mortes por ano em 2030.[2]

Na Europa, o fumo do tabaco é responsável por um milhão e 200 mil mortes anuais, prevendo-se que, em 2020, este número ascenda a dois milhões. Em Portugal, calcula-se que 20 a 26% da população fuma e, entre 1970 e 1995, o consumo do tabaco aumentou mais de 150%, tendo sido o país da União Europeia, onde mais se tinha elevado a percentagem de fumadores.[3]

Nos países desenvolvidos 25 a 30% da totalidade dos cancros relacionam-se com o tabaco, contribuindo para o desenvolvimento de doenças respiratórias que podem ser graves e mortais, tal como 80% das situações clínicas de doença pulmonar crónica obstrutiva. O tabaco constitui ainda um factor de risco importante de doenças vasculares arteriais, sendo que 20% da mortalidade, por doença coronária, se deve ao tabaco. Os fumadores de mais de um maço de cigarros por dia têm quatro vezes mais enfartes do miocárdio que os não fumadores e estes, quando têm enfartes, têm-nos dez anos mais tarde que os consumidores de tabaco.[4] Devido ao tabaco nascem bebés de baixo peso (filhos de mães fumadoras).[3] Um grande número de estudos epidemiológicos liga o fumo de cigarro a doenças cardiovasculares, cancro do pulmão, bronquite crónica, obstrução pulmonar crónica e efisema.[5] Para além disso, um aumento do risco de vir a sofrer de cancro no estômago, na laringe, no esófago, no pâncreas e no trato urinário foi associado a fumadores.[6,7]

A Nicotina, além de provocar dependência, tem também vários efeitos hormonais, dependendo do número e frequência de cigarros fumados e dos fumadores criarem ou não tolerância à nicotina. O tabagismo associa-se também à menopausa precoce e a um aumento da osteoporose nas mulheres. Os fumadores têm normalmente um peso corporal em média de 2,7 a 4,5 kg inferior ao dos não fumadores. Isto é consequência da associação do tabagismo a um consumo mais reduzido de alimentos e um gasto energético superior. O

aumento de peso que se produz ao deixar de fumar constitui um problema para muitos ex-fumadores.[8]

No caso dos fumadores passivos, expostos a uma combinação do fumo proveniente da extremidade acesa dos cigarros com o fumo exalado por fumadores, a exposição ao fumo causa doenças, incluindo o cancro do pulmão e doenças cardíacas, podendo agravar a asma nos adultos e provocar irritações na vista, garganta e nariz. Nas crianças origina problemas tais como asma, infecções respiratórias, tosse, pieira, otites médias (infecção do ouvido médio) e síndroma de morte súbita infantil.

Uma pesquisa na literatura existente revela que dos 227 compostos químicos classificados pala *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como pertencentes ao Grupo 2B, ou seja "possíveis carcinogénicos", 48 estão presente no fumo do cigarro inalado por um fumador durante o processo de queima do mesmo cigarro.[9]

Durante a combustão do tabaco são produzidas milhares de substâncias que são transportadas até aos pulmões do fumador. Muitas dessas substâncias vão actuar principalmente sobre o aparelho respiratório, sendo algumas delas absorvidas, passando assim para a corrente sanguínea, a partir da qual actuam sobre o restante organismo. Os compostos do tabaco são classificados pela sua actividade biológica como asfixiantes, irritantes, mutagénicos, carcinogénicos, inibidores de enzimas e farmacologicamente activos. Quem fuma um maço de tabaco diariamente inala cerca de 840 centímetros cúbicos de alcatrão por ano, contém benzopireno. Esta é uma substância que lesiona o material genético das células e produz cancro nos órgãos com quem tem contacto.[8]

Focando constituintes do fumo do tabaco que foram objecto de estudo do presente trabalho, e as suas consequências na saúde, tem-se o benzeno que afecta o desenvolvimento do feto, o sistema cardiovascular, o sistema nervoso e o sistema imunológico, provocando ainda leucemia; o tolueno que afecta o sistema nervoso e o sistema digestivo, os xilenos que além do sistema nervoso, afectam também o sistema respiratório, a acetona que provoca irritação ocular e do tracto respiratório superior, assim como afecção do sistema nervoso central, e a 2-butanona que provoca irritação da pele, olhos e sistema respiratório. São apresentados na Tabela 1.1 efeitos conhecidos na saúde de alguns dos componentes tóxicos do fumo inalável dos cigarros.

Tabela 1.1. Efeitos de alguns dos componentes presentes no fumo inalável dos cigarros, na saúde.[10]

Composto	Toxicidade
Monóxido de carbono	Liga-se á hemoglobina inibindo a respiração
Amoníaco	Irritação das vias respiratórias
Óxidos de azoto (NOx)	Inflamação do pulmão
Cianeto de hidrogénio	Inibe o funcionamento normal do pulmão
Sulfureto de hidrogénio	Irritação das vias respiratórias
Acrolina	Inibe o funcionamento normal do pulmão
Metanol	Tóxico quando inalado e ingerido
Piridina	Irritação das vias respiratórias
Nicotina	Provoca dependência, afecta os sistemas cardiovascular e endócrino
Fenol	Promotor de tumor em animais de laboratório
Catecol	Carcinogénico em animais de laboratório
Anilina	Dificulta a respiração
Hidrazina maleica	Agente mutagénico

1.3. O cigarro e seus constituintes

O componente principal dos cigarros de todas as marcas é, naturalmente, o tabaco. Segundo os dados da Philip Morris (empresa americana responsável pelo fabrico de cigarros de várias marcas distribuídas por todo o mundo), o cigarro típico de mistura americana contém, pelo menos, 90% de tabaco no enchimento. Mas os cigarros contêm, para além do tabaco, uma série de componentes adicionais, tais como o papel de cigarro e filtros, nos quais também são adicionados ingredientes. Os governos de vários países aprovaram normas relacionadas com os ingredientes dos cigarros.

Existem muitas diferenças na composição de cigarros produzidos por diferentes fabricantes. Para essas diferenças contribuem os tipos e quantidades de tabaco utilizados, o ano de colheita desse tabaco, a quantidade e tipo de ingredientes adicionados e materiais não-tabaco utilizados (por exemplo o papel e filtros) e a forma física do cigarro. [11]

O tabaco é uma planta que inclui cerca de 3800 constituintes, desde pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas até biopolímeros. As moléculas mais pequenas

distribuem-se por numerosas classes diferentes de compostos, tais como hidrocarbonetos, terpenos, álcoois, fenóis, ácidos, aldeídos, cetonas, quinonas, nitrilos, compostos sulfúricos, carbohidratos, aminoácidos, alcalóides, esteróis, isoprenois, etc. Os biopolímeros consistem em celulose, hemicelulose, pectina, proteínas e péptidos, ácidos nucleicos, etc. Durante o processo de queima de um cigarro, todos os constituintes do tabaco são sujeitos a temperaturas que podem chegar aos 950ºC na presença de diferentes concentrações de oxigénio na zona de queima.[12,13]

1.4. Caracterização do fumo do cigarro

O fumo resultante da queima do cigarro é uma complexa mistura química. Estima-se que 4800 constituintes químicos tenham sido já identificados no fumo do cigarro, entre eles encontram-se mais de 100 alcanos, 150 alcenos e 55 hidrocarbonetos alicíclicos.[12]

O fumo do tabaco possui uma composição complexa. Durante a aspiração de ar é gerado um vapor muito concentrado, provavelmente sobressaturado que é puxado ao longo do cigarro, formando o fumo que é aspirado pelo fumador, designado por fumo inalável ou *mainstream* em inglês. Por outro lado, o fumo que sai da ponta do cigarro directamente para a atmosfera é denominado em inglês por *sidestream* (Figura 1.1).[9]

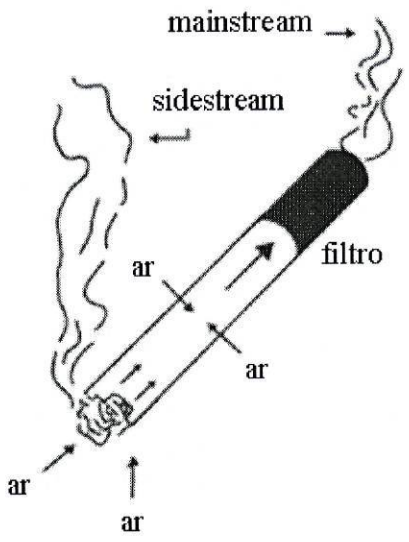


Figura 1.1. Representação da formação do fumo inalável (*mainstream*) e do fumo *sidestream* num cigarro.[14]

A composição qualitativa do fumo *sidestream* e do fumo inalável é muito semelhante na medida em que são constituídos essencialmente pelos mesmos constituintes, no entanto em termos de composição quantitativa são diferentes. De facto, o fumo *sidestream* é gerado segundo condições diferentes do fumo inalável. O fumo *sidestream* é gerado a temperaturas que variam entre 200ºC e 600ºC enquanto que o fumo inalável é gerado a 600-950ºC. Além das diferentes temperaturas a que são gerados também diferem no pH, tendo o fumo inalável um pH mais baixo (6,0 - 6,7) do que o fumo *sidestream* (6,7 - 7,5). Os índices de oxigénio também eles são diferentes, sendo de 16% para o fumo inalável e de 2% para o fumo *sidestream*.[13,14]

Do ponto de vista físico, o fumo do cigarro é constituído por uma fase particulada (ou fase descontínua), constituída por componentes de massa molecular relativamente elevada e pressão de vapor baixa e agregados de moléculas, e por uma fase de vapor (ou fase contínua), constituída por compostos mais voláteis de menor massa molecular.[9] No entanto muitos dos constituintes mais voláteis também aparecem adsorvidos a partículas.[10]

A fase particulada fica em grande parte retida, à temperatura ambiente, pelos chamados "filtros de Cambridge".[14,15] Estes filtros são formados por fibras de vidro ligadas entre si por um aglomerado poliacrílico, que retém 99,9% de todas as partículas que tenham um diâmetro superior a 0,1 μm. Geralmente substâncias com massa molecular relativa inferior a 60 tendem a estar, predominantemente, presentes na fase de vapor enquanto que, substâncias com massa molecular relativa superiores a 200 tendem a estar apenas na fase particulada.[14] A quantidade de matéria particulada (presente no fumo inalável) que fica nos filtros de Cambridge, menos água e menos nicotina é definida por alcatrão (*tar* em inglês). O alcatrão é um composto não muito bem definido porque tem na sua constituição centenas de compostos diferentes. A nicotina, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas específicas do tabaco são exemplos de constituintes associados principalmente à fase particulada.

A fase gasosa do fumo é a que passa através dos filtros de Cambridge, podendo ser recolhida, por exemplo, em sacos de gases. Esta fase é constituída por pequenas quantidades de hidrogénio, monóxido de carbono, dióxido de carbono, metano e outros hidrocarbonetos assim como certos vapores incluindo vapor de água e cianeto de hidrogénio. Os compostos de massa molecular pequena, como o amoníaco[16] e o formaldeído encontram-se preferencialmente na fase de vapor embora também tenham sido encontrados na fase particulada do fumo.[17] É principalmente na fase gasosa que são emitidos os compostos orgânicos voláteis (COV's) e compostos orgânicos muito voláteis (COMV's) estudados

neste trabalho. De referir que a OMS em 1989 introduziu uma classificação dos compostos orgânicos com base no valor do respectivo ponto de ebulição.[18] Segundo essa definição a designação de COV's aplica-se aos compostos orgânicos com ponto de ebulição entre 50 e 240 ºC, no caso de compostos apolares, e entre 100 e 260 ºC, no caso de compostos polares. Por sua vez, COMV's são todos os compostos orgânicos com ponto e ebulição inferior a 50 ºC, no caso de compostos apolares, e inferior a 100ºC, no caso de compostos polares.

Nos anexos 1 e 2 apresentam-se os constituintes principais dos conteúdos da fase gasosa e os principais constituintes da fase particulada do fumo, respectivamente. Em ambos os casos, apresentam-se também as suas concentrações que foram observadas no fumo inalável de cigarros sem filtro.

O desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis e reprodutíveis permitiram a Hoffman e Hoffman,[19] identificarem 66 compostos com efeitos carcinogénicos no fumo de cigarro. Desses compostos, 11 são conhecidos como carcinogénicos para o Homem (Grupo 1), 8 são provavelmente carcinogénicos para o Homem (grupo 2A)[20] e os restantes 47 são carcinogénicos para animais que são possivelmente também carcinogénicos em humanos (grupo 2B).[9] A Tabela 1.2 apresenta uma selecção desses compostos.

Tabela 1.2. Alguns dos compostos carcinogénicos presentes no fumo do cigarro.[14]

Composto	Grupo	Composto	Grupo
Benzo[α]pireno	1	NNAL*	2B
4-Aminobifenil	1	1,3-Butadieno	2B
2-Naftilamina	1	Acetaldeído	2B
Formaldeído	1	Isopreno	2B
Benzeno	1	Estireno	2B
Óxido de etileno	1	Catecol	2B
Cádmio	1	Níquel	2B
NNK**	1	Cobalto	2B
NNN***	1	Chumbo	2B

*NNAL = 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanol
**NNK = 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona
***NNN = N-nitrosonornicotina

1.5. Ingredientes adicionados ao tabaco

Os cigarros comercializados são fabricados a partir de uma mistura de vários tipos de tabaco e são sujeitos a diferentes processamentos. Durante a mistura e processamento do tabaco são adicionados humidificantes, tais como o glicerol e o propilenoglicol, que minimizam a troca de humidade do produto com o ambiente, além de facilitarem o

processamento do fumo. São também adicionados ingredientes aromáticos para melhorar as características do fumo em termos de sabor e aromas específicos.[11]

Enquanto que o termo "constituinte do tabaco" se refere a uma substância que está naturalmente presente no tabaco, o termo "ingrediente do tabaco" refere-se a uma substância, que foi adicionado ao tabaco durante o processo de fabrico do cigarro.[13]

Quando o cigarro é fumado, quer os constituintes quer os ingredientes podem ser parcialmente destilados, transferindo-se intactos para o fumo ou sofrerem reacções de pirólise. Os produtos da pirólise, por sua vez, podem ser transferidos intactos para o fumo ou reagirem com outros constituintes do fumo, originando compostos secundários. Consequentemente, quando se pretende saber qual a influência dos ingredientes adicionados à composição química do próprio tabaco é necessário saber se são ou não pirolisados durante a queima do cigarro e que produtos de pirólise se formam.[13]

Ensaios químicos e biológicos têm sido realizados com o objectivo de estudar o efeito dos ingredientes do tabaco.[21-24] Estes estudos indicaram que os ingredientes normalmente usados nos cigarros não alteram a toxicidade do fumo. Para além disso, esses mesmos ingredientes não produzem efeito nos níveis da maior parte dos constituintes do fumo que são conhecidos por provocarem doenças. A única excepção foi o formaldeído, cujos níveis aumentaram na presença de alguns ingredientes. Isto dever-se-á ao facto do formaldeído ter origem em pirólises de açúcares, celulose e outras substâncias polissacáridas (ingredientes adicionados aos cigarros). No entanto, no âmbito da sensibilidade e da especificidade dos bioensaios utilizados (dois ensaios genotóxicos e um ensaio citotóxico), a actividade específica da matéria particulada do fumo do cigarro não foi alterada pela adição dos ingredientes.

1.6. Processo de queima do cigarro

A queima do cigarro é um processo complexo onde muitos tipos de reacções químicas ocorrem em paralelo. Existem duas regiões principais dentro da zona da queima do cigarro: uma zona exotérmica chamada de zona de combustão e uma zona endotérmica chamada de zona de pirólise/destilação. Na zona de combustão, o oxigénio é consumido originando os produtos típicos da combustão (dióxido carbono, monóxido de carbono e água) e libertando o calor que sustenta a queima. Enquanto dura a aspiração de ar através do cigarro ocorrem temperaturas entre os 600 e 950 °C. Imediatamente a jusante da zona de combustão tem lugar a zona de pirólise/destilação onde as temperaturas são da ordem dos

200 a 600 ºC e os níveis de oxigénio são relativamente baixos. Aproximadamente um terço dos constituintes do fumo, incluindo nicotina, libertam-se nessa zona.[12,13]

O tempo de residência dos compostos na região onde se dá a sua formação é de apenas alguns milissegundos. Enquanto dura a aspiração de ar, o vapor gerado é puxado para fora da região de pirólise/destilação e arrefece muito rapidamente na presença do ar diluído que entra pela linha de queima do papel. Isto leva a que os vapores dos compostos menos voláteis atinjam rapidamente o seu ponto de saturação, ocorrendo condensação quando o vapor arrefece para temperaturas inferiores a 350ºC. Forma-se, assim, um aerossol denso, que constitui a fracção particulada.[13] Depois de formadas, as partículas passam, em fracções de segundos, desta temperatura inicial para uma temperatura próxima do ambiente, sendo que, esta queda de temperatura abrupta facilita a formação das partículas. Os núcleos que promovem a condensação (e que se encontram em grande número) podem ser fragmentos microscópicos de matéria orgânica queimada incompletamente, como cinzas, moléculas de elevada massa molecular, moléculas carregadas electricamente, etc. No entanto, nem sempre é necessária a existência destes núcleos de condensação para a formação das partículas. Existem partículas que se formam simplesmente a partir dos vapores em estado de saturação que arrefecem bruscamente.

Os hidrocarbonetos de massa molecular baixa são gerados na região de pirólise/destilação da zona de queima e encontram-se, tal como já foi mencionado, em grande quantidade na fase gasosa do fumo. N-alcanos e alcenos de cadeias longas são gerados a temperatura superior a 700ºC. À temperatura de 500ºC, formam-se mais de 75 hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos como o benzeno e o tolueno, devido à pirólise de aminoácidos, ácidos gordos, açucares e parafinas. À temperatura de cerca de 700ºC formam-se naftalenos. Existem pelo menos 80 naftalenos no fumo do tabaco. A pirólise e reacções pirosintéticas de hidrocarbonetos de cadeias longas, terpenos, fitoesterois como o estigmasterol, parafinas, açucares, aminoácidos, celuloses e reacções envolvendo radicais primários, originam numerosos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's), tendo sido já identificados cerca de 300 PAH's no fumo do tabaco.[12]

Uma técnica que tem sido usada para tentar estabelecer uma relação entre os componentes do tabaco e os produtos que constituem o fumo é a análise da radioactividade dos produtos presentes no fumo obtido a partir de cigarros que foram dopados com isótopos radioactivos marcadores. Estes estudos permitem calcular a quantidade de constituintes e ingredientes do tabaco que são transferidos para o fumo durante a queima do cigarro bem como a quantidade que sofre decomposição térmica e oxidação durante a transferência.[11]

No estudo realizado por Schmeltz *et al.*,[25] procederam à adsorção de nicotina marcada radioactivamente a sílica gel, realizaram a pirólise isotérmica da mistura em atmosfera de azoto em tubos de combustão a várias temperaturas entre os 600 e 900 °C e analisaram, na fase particulada recolhida, os produtos marcados (que deverão ter tido origem na nicotina). Durante a pirólise a nicotina degradou-se em piridinas, o que envolveu simples quebras de ligações e sofreu degradações mais extensas e rearranjos dando origem a quinolinas, arilnitrilos e hidrocarbonetos aromáticos. Neste mesmo estudo foi usada uma máquina de fumar, para fumar cigarros que continham nicotina marcada. Neste caso, foi encontrada uma porção substancial (aproximadamente 42%) de nicotina destilada, sem sofrer qualquer alteração, quer no fumo aspirado quer no fumo libertado directamente na atmosfera. Nestas condições, cerca de 11% da nicotina foi convertida em piridinas e apenas uma pequena fracção se converteu em quinolinas, arilnitrilos e hidrocarbonetos aromáticos. Além disso, no cigarro 12,5% da nicotina oxidou-se totalmente formando dióxido de carbono. Portanto, este estudo mostrou que ocorreu uma degradação térmica da nicotina mais extensa na pirólise da nicotina isolada do que na queima do cigarro.

Nesse trabalho[25] demonstrou-se que os produtos da pirólise da nicotina isolada ou inserida na queima do cigarro são diferentes e que o mesmo acontecerá com outros constituintes do tabaco. Consequentemente, para que os estudos de pirólise produzam resultados semelhantes aos que acontecem na queima do cigarro, o processo deve simular o que ocorre na zona de queima do cigarro quando este é fumado, em termos de velocidade de aquecimento, temperaturas atingidas, níveis de oxigénio e velocidade de gás, tamanho realístico da amostra a ser pirolisada e do tempo de residência dos produtos na região de alta temperatura.

1.7. Métodos de amostragem e análise de fumo de cigarro

Vários métodos têm sido usados para recolher e determinar níveis de diferentes compostos no fumo inalável de cigarros. Métodos usando filtros de Cambridge foram usados para recolher a fase particulada (técnica desenvolvida por Pillsbury *et al.* 1969, citado em [6]) assim como precipitação electrostática.

A concentração de água e nicotina na fase particulada foi determinada por Darral *et al.*,[26] usando GC-MS, após extracção com 60 mL de 2-propanol a partir do filtro com fracção particulada. O alcatrão era determinado subtraindo a massa de nicotina e água à

massa total da fase particulada, tendo Chepiga *et al.*,[11] usado a mesma técnica. Steven e Borgerding[27] usaram um método semelhante para determinar a nicotina, sendo a fase particulada extraída com 10 mL de metanol, com agitação durante 30 minutos. Na determinação, por GC, foi usado um detector de emissão atómica.

Radovanovic e Misic[28] usaram também uma máquina de fumar equipada com um filtro de fibra de vidro para recolher a fase particulada. Os componentes da fase particulada foram extraídos num extractor soxhlet durante 10 horas com 250 mL de n-hexano. Os compostos fenólicos foram extraídos e separados por extracção ácido-base, mas de um modo que não é explicitado pelos autores. A fracção do alcatrão constituída por PAH's foi separada por cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente o n-hexano. As fracções extraídas foram depois analisadas por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (FID) e captura electrónica (ECD).

Desde há muitos anos que os PAHs do fumo do tabaco constituem objecto de estudo. Sabe-se que os PAHs se encontram principalmente na fase particulada do fumo. A análise de PAHs no fumo de cigarro envolve geralmente extracção com solventes a partir da matéria particulada total (MPT), extracção para fase sólida e pré-concentração antes da análise. Técnicas cromatográficas e espectrométricas são normalmente usadas na análise.[29]

Gmeiner *et al.*,[30] desenvolveram um método para determinar quantitativamente PAHs na fase particulada do fumo inalável e aplicaram-no a cigarros de referência Kentucky 1R4F. Os cigarros foram fumados numa máquina segundo as normas ISO e foram adicionados à solução PAHs deuterados como padrões internos antes da análise. O processo envolveu extracção de PAH's com metanol a partir dos filtros, diluição em água, extracção em fase sólida (SPE) numa coluna C_{18} e eluição com ciclohexano, seguindo-se quantificação por GC-MS. O método permitiu a análise de 17 PAHs numa amostra constituída por fumo de 20 cigarros. O desvio padrão relativo encontrado foi inferior a 10% e os coeficientes de correlação superiores ou iguais a 0,99. Excepto para um composto (dibenzo[a,h]antraceno) as percentagens de recuperação foram superiores a 70%. Este método pode ser também aplicado ao fumo libertado directamente na atmosfera pela ponta do cigarro a arder (*sidestream*).[29]

Li *et al.*,[29] desenvolveram uma técnica para análise de PAHs em cada aspiração de ar, a qual permitiu obter informações sobre distribuição dos PAHs no fumo durante o consumo de um cigarro. O processo consistiu numa armadilha de empacotamento constituída por um disco laminar de alumínio, onde foi recolhida a MPT presente no fumo de uma única aspiração. A MPT foi depois pesada e dissolvida numa mistura de tolueno,

hexano e isopropanol na proporção de 5:5:1, contendo 1 μg/mL de cada um dos seguintes PAHs deuterados, naftaleno-d8, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12, que funcionaram como padrões internos. A mistura MPT/solvente foi depois colocada num banho de ultra-sons à temperatura ambiente durante 10 minutos e depois 1 μL da solução foi injectado no GC-MS e analisada usando o sistema de iões-massa seleccionados (MIS). O método permitiu determinar naftaleno, fenantreno, fluoranteno, pireno e benzo[a]pireno em cigarros de referência Kentucky 1R4F, fumados segundo as normas ISO. As concentrações típicas dos cinco PAHs estudados[29] em diferentes marcas de cigarros foram de 2-4 μg, 0,2-0,4 μg, 60-150 ng, 45-140 ng e 9-40 ng para o naftaleno, fenantreno, fluoranteno, pireno e benzo[a]pireno respectivamente, e variaram, com o tipo de tabaco, características do papel do cigarro, tamanho do cigarro, filtro e ventilação.

Os mesmos autores[29] também estudaram a influência de diferentes acendedores do cigarro na concentração de PAHs na primeira aspiração de ar. Utilizaram quatro acendedores diferentes: isqueiro eléctrico, lamparina de butano, um isqueiro de butano convencional e fósforos. Constataram níveis de incerteza associados às determinações maiores quando usaram acendedores manuais. As concentrações de PAHs foram superiores quando foi utilizado o fósforo e o isqueiro de butano convencional. As concentrações obtidas quando foi utilizado o isqueiro eléctrico e a lamparina de butano foram semelhantes. Aparentemente, os efeitos dos acendedores tornam-se mais visíveis à medida que as concentrações dos PAHs são superiores. Isto deve-se ao facto de, quando se utiliza o fósforo ou o isqueiro de butano convencional, uma grande porção dos PAHs detectados no fumo ter origem na chama, quer por contribuição directa da chama, quer por interacção da chama com o tabaco ou compostos produzidos durante a queima do cigarro.

Recentemente, Akpan *et al.*,[6] também determinaram PAHs presentes na fase particulada do fumo inalável de cigarro. A fase particulada foi recolhida em filtros de Cambridge, que é uma técnica eficiente para recolher PAHs menos voláteis, mas não é eficiente na recolha de fracções mais voláteis. Seguia-se depois extracção e purificação dos compostos e análise por HPLC com um detector fluorimétrico (tal como em [31]).

Compostos com um grupo carbonilo (por exemplo, aldeídos e cetonas) são constituintes da fase de vapor do fumo de cigarro. Têm origem principalmente na volatilização directa e pirólise do cigarro durante a combustão. Alguns dos compostos muito voláteis ou reactivos presentes no fumo de cigarro são de difícil análise directa, tendo sido caracterizados em poucos trabalhos publicados. Envolvem sempre uma derivatização depois da recolha do fumo. Entre os reagentes derivatizantes utilizados destaca-se o 2,4-

dinitrofenilhidrazina (DNPH) que origina compostos muito estáveis[32]. Os compostos contendo grupos carbonilo mais abundantes no fumo de cigarro são o acetaldeído, a acetona e o formaldeído.

Houlgate *et al.*,[33] estabeleceram métodos para determinar formaldeído e acetaldeído no fumo inalável do cigarro gerado por uma máquina de fumar. Os aldeídos foram recolhidos fazendo passar o fumo por uma solução com DNPH em meio ácido, que era posteriormente analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Miyake *et al.*,[34] determinaram níveis de formaldeído, acetona, propanal, 2 –metilpropanal, butanal, hexanal e octanal após derivatização com tiazolinas, seguindo-se quantificação por cromatografia gasosa com detecção por azoto-fósforo.

Compostos orgânicos aromáticos, tais como o benzeno e o tolueno, já foram também objecto de estudo. Brunnemann *et al.*,[35] e Byrd *et al.*,[36] fizeram a extracção deste compostos passando o fumo inalável por armadilhas que continham metanol a muito baixas temperaturas (-78°C), seguindo-se quantificação por GC-MS.

Para determinar benzeno e outros COV´s no fumo inalável do cigarro, Darrall *et al.*, [26] após gerarem o fumo numa máquina de fumar, provida de dois filtros de fibra de vidro para recolha da fase particulada, recolheram os COV´s em três frascos borbulhadores montados em série que continham metanol e eram mantidos a baixas temperaturas (-78°C). O primeiro continha 20 mL do solvente e os restantes apenas 5 mL cada um. Os COV´s recolhidos eram depois analisados por GC-MS.

A Health Canada,[37] indica como método para recolha de compostos voláteis presentes no fumo inalável de cigarro, a passagem do fumo por filtros de fibra de vidro (92 mm) seguindo-se a passagem por armadilhas contendo metanol a baixas temperaturas (-70°C). Às soluções obtidas deve ser adicionado padrão interno (benzeno deuterado) e injectadas num GC-MS para quantificação. Este método foi usado por Counts *et al.*,[17,38] para determinar os componentes que constam na regulamentação da Health Canada.[37]

1.7.1. Padronização do "acto de fumar" para estudar o fumo

Não existem dois fumadores que fumem cigarros do mesmo modo. Por isso, os valores relativos aos teores de alcatrão e nicotina associados às diferentes marcas de cigarros não são indicadores precisos das quantidades de nicotina e alcatrão inaladas por cada fumador de cigarros de determinada marca. Porém, para que se possam obter

resultados comparáveis sobre cigarros de diferentes marcas há a necessidade de se usarem métodos de aspiração de ar padronizados, realizados por máquinas adequadas, em condições laboratoriais bem definidas. Este tipo de metodologias foi introduzido por autoridades reguladoras, designadamente a Comissão Federal de Comércio dos E.U.A. (U.S. Federal Trade Commission – FTC) em cooperação com a Organização Internacional de Normalização (ISO). Tais metodologias permitem evidenciar diferenças relativas de teores de constituintes do fumo de diferentes marcas de cigarros, presumindo que cada cigarro será segurado e fumado do mesmo modo que a máquina o faz.[39]

Em 1936 a *American Tobacco Company* começou a usar máquinas de fumar com condições padronizadas, que tentaram reflectir os hábitos dos fumadores dessa altura. Os níveis médios de nicotina nos cigarros fumados eram de cerca de 2.8 mg/cigarro.[19] A FTC adaptou em 1969 o método padrão de 1936, apenas com pequenas modificações, definindo alcatrão como a fase particulada do fumo menos a quantidade de água e nicotina. A partir daí, as condições padrão da máquina de fumar são as seguintes: uma aspiração de 2 segundos, num total de 35 mL de ar, cada minuto, sendo deixados por fumar 23 mm em cigarros sem filtro e 3 mm a partir do filtro no caso de cigarros com filtro. No Canada e no Reino Unido, as condições padrão ISO de fumar cigarros foram aceites desde 1991. Noutros países Europeus, as condições padrão de fumar cigarros foram desenvolvidas pelo CORESTA (*Centre de Cooperation pour les Recherches Scientifiques Relative au Tabac*), sendo similares às condições padrão da FTC mas definindo alcatrão como o total de fase particulada menos a quantidade de água.

Por seu lado, os legisladores do Canada, na província de British Columbia (*Health Canada – HC*) consideraram que deveriam ser determinadas as concentrações máximas dos principais componentes nos cigarros. Para tal, estabeleceram os seguintes parâmetros de aspiração de ar: volume de 55 mL e um intervalo entre aspirações de 30 segundos; caso os cigarros possuam furos de ventilação junto ao filtro, estes devem ser tapados. Nestas condições, espera-se atingir um valor aproximado das concentrações máximas possíveis de obter nos cigarros.[14,40]

Por sua vez, o *Massachusetts Department of Public Health* (MDPH) defende que melhor do que obter valores de concentração máximos é preferível obter uma estimativa mais realista das concentrações médias no cigarro e propôs os seguintes parâmetros: aspiração de um volume de ar de 45 mL e um intervalo entre aspirações de 30 segundos; devendo ser tapados metade dos buracos de ventilação, simulando o fumador que segura o cigarro entre os dedos essa zona.[14,41] Nem a HC nem MDPH alteraram duração da aspiração

de ar estabelecido pelas normas ISO que é de 2,0 segundos. Aumentos no volume da aspiração de ar e diminuição do intervalo entre aspirações conduzem a aumentos na dose de exposição no fumo na fracção inalável. A Tabela 1.3 apresenta os parâmetros defendidos nas principais normas em vigor.

Tabela 1.3. Parâmetros utilizados na máquina de fumar, referentes às puxadas de ar.[14,17]

Condições	Volume (mL)	Duração (s)	Intervalo (s)	Bloqueamento da ventilação (%)
ISO	35	2	60	0
MDPH	45	2	30	50
HC	55	2	30	100

Apesar de existirem métodos padrão para a geração e colheita de fumo inalável em máquinas de fumar (FTC, ISO) e determinação de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono, não existem métodos padrão conhecidos para análise de outros constituintes do fumo.[38]

Sem métodos analíticos padronizados, torna-se difícil a comparação entre níveis de constituintes do fumo de cigarro determinados por diferentes métodos analíticos.

A influência do modo de fumar cigarros nas concentrações dos compostos do fumo tem sido tratada em diversas publicações. Counts *et al.*,[17,38] chegaram à conclusão de que, tal como seria de prever, as quantidades da maioria dos constituintes presentes no fumo do tabaco aumentam tipicamente segundo a ordem ISO < MDPH < HC. Ou seja, as concentrações no fumo aumentam à medida que aumenta o volume da aspiração de ar e há redução da ventilação – maior quantidade de tabaco fumado por aspiração de ar. A concentração de água no fumo aumenta significativamente pela mesma ordem. O aumento de água no fumo poderá afectar a filtração de alguns dos constituintes. O aumento relativo das concentrações é geralmente maior para os constituintes da fase de vapor do fumo do que para os constituintes da fase particulada. Existem alguns constituintes que são excepção como é o caso do fenol e da quinolina, onde 50 a 70 % dos cigarros analisados apresentaram concentrações similares quando foram usados os parâmetros HC e MDPH. No caso do 1-aminoftaleno e do 2-aminoftaleno também aproximadamente 50% das determinações

realizadas apresentam valores de concentrações idênticas usando quer os parâmetros HC quer os MDPH.

Os volumes de aspiração de ar maiores e ventilações menores no método HC levam a um aumento do fluxo de ar dentro do cigarro e a um aumento da temperatura, o que terá efeitos na combustão, pirólise e destilação que ocorre dentro do cigarro durante a queima.[42] Assim, quando se alteram os parâmetros usados na máquina de fumar as quantidades relativas dos constituintes que fazem parte da composição do fumo do cigarro poderão também alterar-se.

1.7.2. Importância do uso de cigarros de referência

Devido à complexidade do cigarro (atribuída aos parâmetros do *design* físico do mesmo, variações nas misturas de tabacos e ingrediente adicionados), a selecção de um cigarro de referência apropriado para ser usado por diferentes investigadores, de modo a fornecer resultados comparáveis tornou-se uma necessidade.

Assim sendo, foram desenvolvidos cigarros de referência, da marca Kentucky, como resultado da cooperação entre a *US National Cancer Institue*, a *Agriculture Research Service of the US Department of Agriculture* e a *University of Kentucky Tobacco and Health Research Institute* (Lexington, Kentucky). Esses cigarros incorporam as principais características dos cigarros que foram colocados no mercado desde 1950. Os cigarros de referência servem como um padrão internacional, com vista ao seu uso em trabalhos de investigação.

Chepiga *et al.*,[11] estudaram a composição do fumo inalável de cigarros de referência Kentucky, tendo analisado 18 constituintes específicos, que foram seleccionados por terem sido identificados como compostos que podem contribuir para os riscos associados ao fumo de cigarro: nicotina (extraída com 2-propanol a partir da fase particulada recolhida em filtro, seguindo-se analise por GC), CO (determinado por espectrofotometria no infravermelho não dispersiva – NDIR), amoníaco (determinado por calorimetria), benzo[α]pireno (analisado por HPLC com detecção por fluorescência), óxidos de azoto (determinados por quimioluminescência), formaldeído, acetaldeido, acetona e 2-propenal (determinados por HPLC com detector por fluorescência depois de derivatização com 2-difenilacetil-1,3-indadiona-1-hidrazona para formar derivados de azina), cianeto de hidrogénio (adsorvido em hidróxido de sódio, seguida extracção com água e análise por colorimetria), nitrosaminas específicas do tabaco (extracção a partir da fase particulada do fumo com

cloreto de metilo seguindo-se passagem do extracto por uma coluna de alumina à pressão atmosférica e determinação por cromatografia gasosa com detecção por análise de energia térmica (TEA)). Os resultados dos estudos de Chepiga *et al.*,[11] vieram confirmar a representatividade dos cigarros 1R4F (hoje em dia substituídos pelos 2R4F) relativamente aos cigarros do mercado americano *light*, no que diz respeito à actividade mutagénica da fase particulada do fumo inalável, corroborando resultados anteriores de Steel *et al.*.[43]

No estudo de Chepiga *et al.*,[11] concluiu-se também que os resultados obtidos da análise do fumo inalável dos cigarros de referência 1R5F são representativos dos obtidos para cigarros da categoria *ultra-light*, desde que as marcas analisados tenham concentrações de alcatrão similares à dos cigarros de referência, o que não se verifica em todas as marcas comercializadas. Esse estudo permitiu ainda concluir que a constituição química do fumo inalável assim como a actividade mutagénica estão relacionadas com a quantidade de alcatrão nos cigarros. Provavelmente, o resultado com maior importância deste estudo foi a correlação observada entre os níveis de alcatrão no fumo inalável e os níveis dos constituintes desse mesmo fumo – os níveis dos constituintes do fumo aumentam à medida que aumenta também os níveis de alcatrão. Uma relação similar foi observada entre os níveis de alcatrão a actividade mutagénica da fase particulada do fumo inalável.

1.8. Métodos de recolha e análise usados neste trabalho

1.8.1. Microextracção para fase sólida (SPME)

A microextracção para fase sólida (SPME) é definida como uma técnica em que o volume da fase extractora é muito pequeno relativamente ao volume da amostra e caracteriza-se por uma extracção não exaustiva, ou seja, apenas é extraída uma fracção de analito, cuja extensão varia com as condições experimentais, como adiante se descreverá.[44,45]

A SPME foi introduzida nos anos 90 por Pawliszyn e tem vindo a sofrer vários desenvolvimentos.[46] Nesta técnica, amostragem, extracção e concentrações são incorporadas num único passo e o uso de solventes é minimizado. A amostragem processa-se expondo uma fibra de suporte inerte recoberta com um polímero com afinidade para os analitos, a uma amostra gasosa ou líquida. A fibra adsorve/absorve uma fracção dos analitos, sendo

depois retirada da amostra e colocada no injector de um cromatógrafo, para desadsorção térmica dos analitos e análise.

O funcionamento da SPME é baseado no equilíbrio de partição (revestimentos líquidos) dos analitos entre a amostra em fase gasosa ou aquosa e o polímero que cobre a fibra. Teoricamente a fibra deverá ser exposta ao analito até que se atinja o equilíbrio de partição. Nessas condições a quantidade de analito adsorvido/absorvido será máximo nas condições experimentais usadas. Porém, o tempo necessário para alcançar esse equilíbrio pode ser demasiado longo (algumas horas). Nestas situações pode ser preferível encurtar os tempos de exposição e trabalhar em condições de não-equilíbrio, mas com tempos de exposição constantes e iguais para padrões e amostras.

A SPME começou por ser utilizada na análise de compostos relativamente voláteis, mas é hoje aplicada a uma grande variedade de compostos orgânicos voláteis ou semi-voláteis, incluindo PAH's e pesticidas, entre outros.

1.8.1.1. Descrição da técnica

A SPME é uma microtécnica, em que os processos de extracção e pré-concentração de analitos ocorrem numa escala reduzida. O dispositivo básico do SPME consiste num bastão de fibra óptica, frequentemente de sílica fundida de 100 μm de diâmetro, em que 10 mm de uma das extremidade está recoberta com um filme fino de um polímero com afinidade para os analitos ou de um sólido adsorvente. As espessuras dos revestimentos de fibras comerciais variam de 7 μm a 100 μm e os seus volumes variam de 0,03 μL a 0,7 μL. A Figura 1.2 ilustra o dispositivo da fibra de SPME. Com o dispositivo da fibra adaptado ao respectivo suporte (uma espécie de seringa, Figura 1.3) o manuseio das fibras para extracção torna-se bastante simples. O dispositivo que contém a fibra não pode ser manipulado directamente, estando a fibra presa a um êmbolo, como mostra a Figura 1.3. Na extremidade oposta ao êmbolo, o tubo hipodérmico fica exposto e além de proteger a fibra actua como a agulha com que são perfurados os septos dos contentores da amostra.

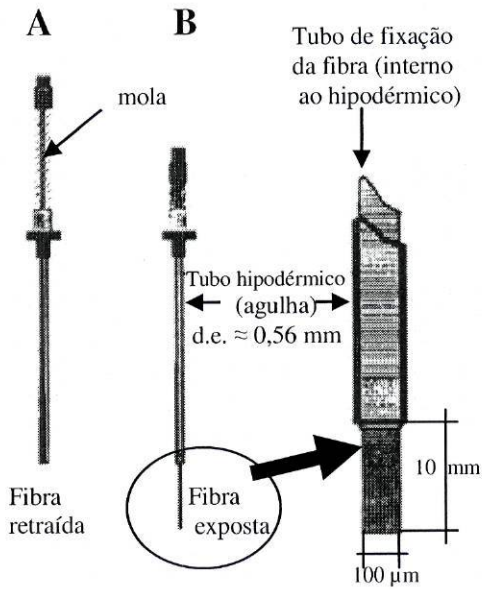


Figura 1.2. Representação esquemática de um dispositivo de SPME. (A) Posição com a fibra retraída na agulha; (B) Posição com a fibra exposta. O detalhe mostra as dimensões típicas da secção com revestimento de 100 µm de espessura.[47]

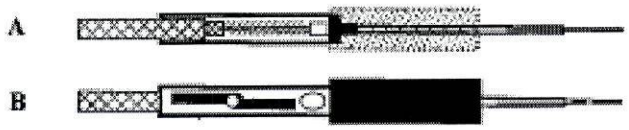


Figura 1.3. (A) Vista interna com a fibra exposta e (B) vista com a fibra exposta e o êmbolo travado pelo pino no centro da fenda em "Z".[47]

A Figura 1.4 mostra a sequência de procedimentos para realizar quer a extracção a partir da amostra quer a desadsorção no injector do cromatógrafo. Com a fibra retraída na agulha, o septo do frasco que contém a amostra é perfurado e a fibra é exposta à amostra. Terminado o tempo de extracção, a fibra é novamente recolhida, a agulha é retirada do septo e levada para inserção no cromatógrafo. Para análise, com a fibra recolhida, a agulha perfura o septo do injector do GC e a fibra é exposta para desadsorção térmica. Terminada a desadsorção a fibra é recolhida e a agulha é retirada.

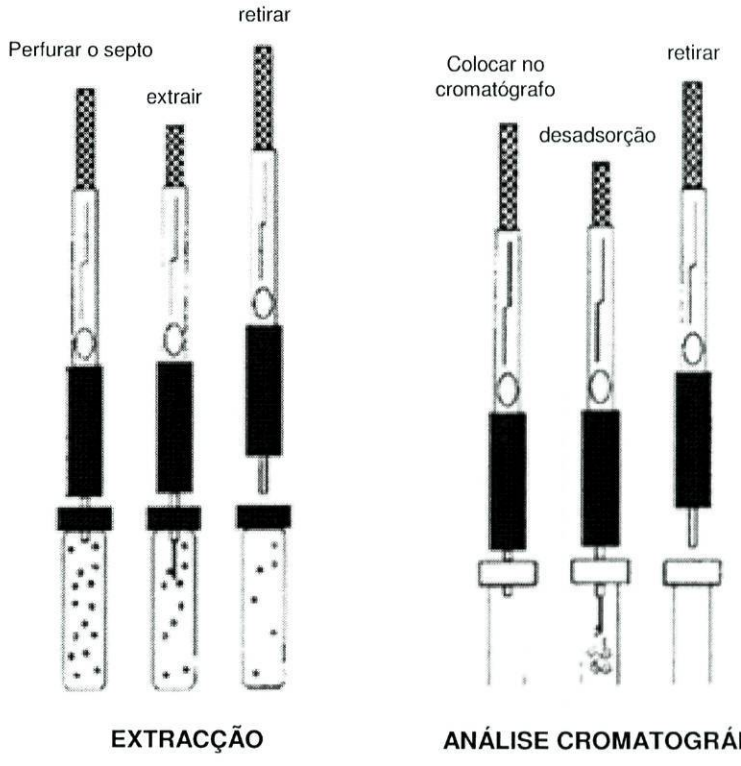


Figura 1.4. Modo de usar o dispositivo SPME para o processo de extracção e desadsorção do material extraído para analise cromatográfica.[47]

Podem ser considerados três modos de extracção por SPME: extracção directa por exposição à amostra líquida ou gasosa, extracção no *headspace* de uma amostra líquida e extracção com protecção de membrana. Na extracção directa (Figura 1.5a) a fibra é imersa directamente na amostra e os analitos são transportados directamente da matriz para a fase extractora da fibra. Para fazer extracções mais rápidas em amostras líquidas é necessário recorrer à agitação. Para amostras gasosas a convecção natural do ar é suficiente para facilitar um equilíbrio rápido.

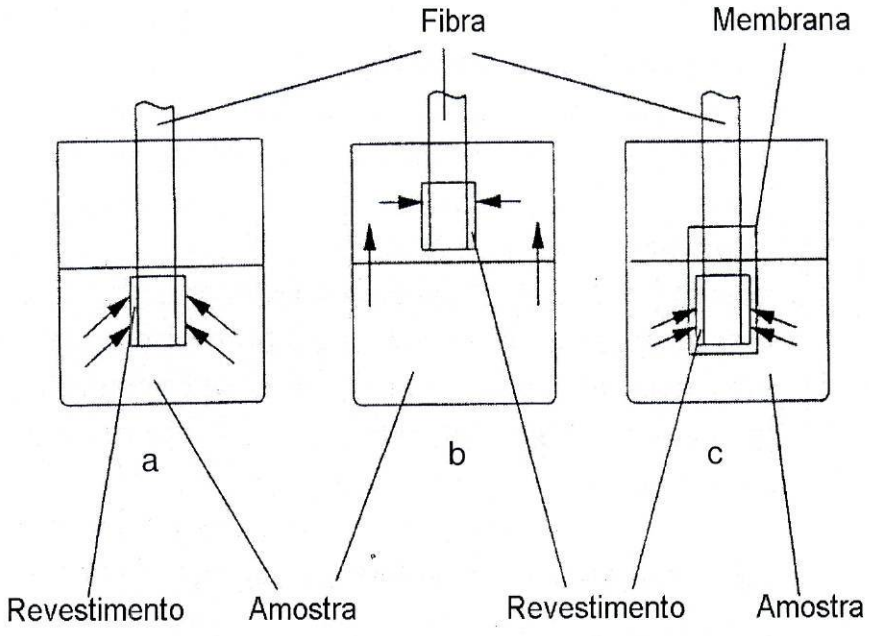


Figura 1.5. Forma de operar com SME: (a) extracção directa, (b) extracção a partir do *headspace* e(c) SPME usando membrana protectora.[48]

Quando a extracção é feita no *headspace* (Figura 1.5b) os analitos são extraídos da fase gasosa em equilíbrio com a amostra líquida. Quando a extracção é feita deste modo a fibra é protegida de efeitos adversos causados por compostos não voláteis e substâncias de massa molecular elevada presentes na matriz da amostra (por exemplo, ácidos húmicos e proteínas). No modo de extracção no *headspace*, as características da matriz da amostra, incluindo pH, não afectam a fibra. Num sistema constituído por uma amostra líquida e o seu *headspace* a quantidade de analito extraído pela fibra não depende da localização da fibra na fase líquida ou na fase gasosa, deste modo a sensibilidade na extracção no *headspace* ou na extracção directa é a mesma, desde que os volumes das duas fases sejam o mesmo nos dois casos. Mesmo quando numa extracção directa não há *headspace*, uma diferença significativa de sensibilidade entre amostragem directa e amostragem no *headspace* apenas ocorre para analitos muito voláteis (considerando a inexistência de interferentes).[48]

No terceiro modo de extracção (Figura 1.5c) a fibra está separada da amostra com uma membrana selectiva, que deixa passar o analito pretendido e bloqueia a entrada de interferentes. O principal objectivo do uso de uma membrana é proteger a fibra de efeitos adversos causados por moléculas de massa molecular elevada quando são analisadas amostras muito sujas. A extracção através do *headspace* também protege a fibra, mas a extracção usando uma membrana protectora permite a extracção de compostos menos voláteis. O processo de extracção é substancialmente mais lento quando usada a membrana

de protecção do que quando a extracção é directa, uma vez que no primeiro caso o analito tem de se difundir através da membrana antes de alcançar a fibra. O uso de membranas mais finas e o aumento da temperatura de extracção permitem diminuir o tempo de extracção.[48]

1.8.1.2. Processo de absorção/adsorção

As fibras para SPME actualmente disponíveis no mercado podem ser divididas em dois tipos distintos no que respeita a características físicas dos seus revestimentos. Os revestimentos de PDMS (polidimetilsiloxano) e de PA (poliacrilato), por exemplo, são filmes líquidos, enquanto os revestimentos de PDMS-DVB (divinilbenzeno), Carbowax-DVB, Carbowax-TR (*templated resin*) e de Carboxen têm como fase extractora principal um sólido poroso.[49]

O mecanismo do processo de extracção de cada um destes dois tipos de revestimento é diferente. Enquanto que um revestimento líquido extrai analitos via absorção (processo de partição), um revestimento sólido extrai via adsorção (processo de superfície). Na realidade, o mecanismo de absorção envolve a dissolução do analito no revestimento e a difusão para uma zona mais interior durante o processo de extracção, enquanto que a adsorção é caracterizada por o analito permanecer à superfície do revestimento.[49]

O processo de partição é baseado na distribuição do analito entre duas fases imiscíveis e é determinado pela fugacidade do composto em cada fase. Em equilíbrio pode ser descrito através de uma constante adimensional (coeficiente de partição – K):

$$K = \frac{C_0^{\infty}}{C_a^{\infty}} \qquad 1.1$$

onde C_0^{∞} é a concentração do composto na fase orgânica (por exemplo, revestimento da fibra) e C_a^{∞} é a concentração em equilíbrio na amostra.[49]

Fibras adsorventes extraem os analitos por interacções físicas. A recolha ocorre por retenção dos analitos dentro dos poros internos. As moléculas podem ser adsorvidas por várias formas como por exemplo interacções Van der Waal, dipolo-dipolo e outras ligações intermoleculares fracas. Neste tipo de fibras há um número limitado de locais de adsorção, ocorrendo competição entre os analitos por esses locais, que a certa altura ficam saturados.

Enquanto que a absorção é um processo não competitivo, adsorção é por definição um processo competitivo – as moléculas "lutam" por sítios livres existentes na superfície do sólido. Uma molécula com maior afinidade para um determinado revestimento pode substituir uma molécula com menor afinidade. Isto significa que a quantidade de analito extraído pela fibra pode ser afectada pela composição da matriz.[49]

No processo de adsorção, o comportamento da concentração de equilíbrio de um composto na fibra e a sua concentração na amostra são normalmente descritas pela isotérmica de adsorção. A isotérmica de adsorção que descreve adequadamente a extracção de analito em equilíbrio através das fibras PDMS-DVB e CW-DVB é a isotérmica de Langmuir. No modelo de Langmuir, a superfície tem um número limitado de sítios de adsorção que podem ser ocupados pelo analito. O processo de adsorção é tratado como uma reacção entre a molécula (A) e o local vazio (S) para originar um analito adsorvido (A_{ad}):

$$A + S \Leftrightarrow A_{ad}$$

As taxas de adsorção (r_{ad}) e desadsorção (r_d) são as seguintes:

$$r_{ad} = K_{ad}[A][S] \qquad 1.2$$

$$r_d = K_d[A_{ad}] \qquad 1.3$$

onde, $[A]$ é a concentração do analito na matriz e $[S]$ é a concentração de locais não ocupados na superfície da fase sólida em mol/cm^2, $[A_{ad}]$ é a concentração do analito na fase sólida em mol/cm^2 e K_{ad} e K_d são constantes de equilíbrio de adsorção e desadsorção, respectivamente.

Em condições de equilíbrio r_{ad} é igual a r_d, desta forma, o processo de adsorção é baseado em:[49]

$$\frac{[A_{ad}]}{[A][S]} = \frac{K_{ad}}{K_d} = \Psi \qquad 1.4$$

onde, Ψ é uma constante de equilíbrio.

A Figura 1.6 ilustra os processos de absorção e adsorção que ocorrem nos revestimentos das fibras de SPME. No início, independentemente da natureza do revestimento, as moléculas do analito ligam-se à superfície da fibra. O facto de depois migrarem para o interior do revestimento ou continuar na superfície depende do coeficiente de difusão do analito no revestimento. O coeficiente de difusão de moléculas orgânicas no PDMS é próximo do coeficiente de difusão dessas mesmas moléculas em solventes orgânicos, sendo que este tipo de revestimento extrai analitos via absorção. Por outro lado, o coeficiente de difusão de moléculas orgânicas em divinilbenzeno e carboxen é tão pequeno que durante a extracção por SPME as moléculas ficam essencialmente na superfície do revestimento.

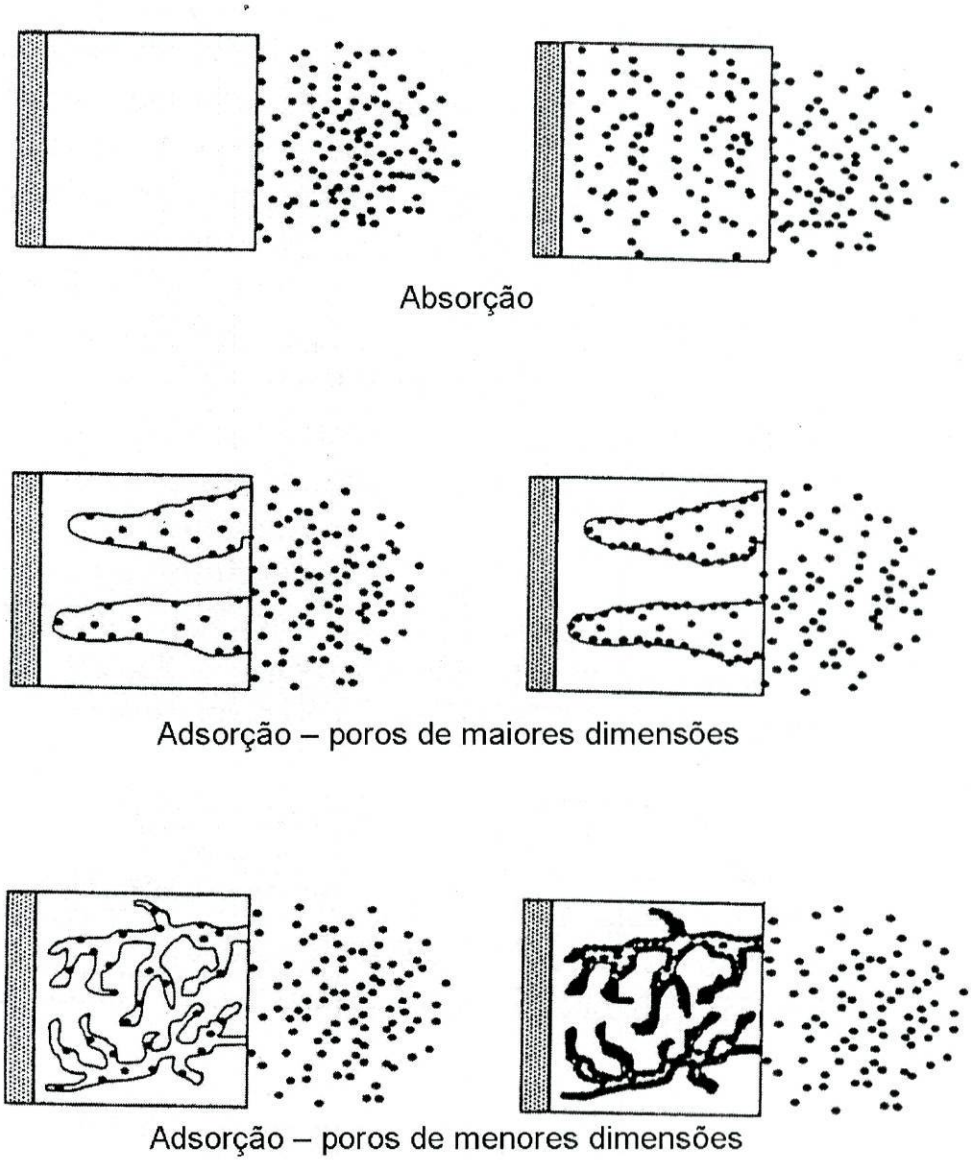


Figura 1.6. Comparação dos mecanismos de extracção: absorção e adsorção.[49]

Sendo a adsorção um processo competitivo, a composição da matriz, tal como as condições de extracção, afectam a quantidade de analito extraída pela fibra. Por isso existe apenas uma estreita gama onde a resposta de extracção do analito é linear, ao contrário do que sucede quando o processo é de absorção, em que o intervalo de concentração em que se obtém resposta linear é muito amplo. Isto faz com que a análise quantitativa usando revestimento sólidos de SPME seja mais difícil. A teoria de equilíbrio desenvolvida para revestimentos de polímeros porosos (PDMS-DVB, Carbowax-DVB) foi construída tendo em conta os efeitos causados por diferentes variáveis experimentais na quantidade de analito extraída pela fibra. Geralmente, revestimentos de polímeros porosos funcionam bem em matrizes relativamente limpas ou matrizes com composição constante desde que a concentração do analito de interesse seja baixo (de outra forma, o gama de linearidade da curva de calibração é rapidamente ultrapassada).[49]

1.8.1.3. Termodinâmica do processo de partição/adsorção

A SPME é um processo baseado em equilíbrios simultâneos em sistemas multifásicos. Um sistema trifásico ideal simples é o de uma fibra mergulhada numa matriz aquosa com um *headspace*; sistemas reais são mais complexos pois, nem o *headspace* nem a matriz são soluções ideais, os analitos podem interagir entre si, com as paredes do frasco e eventualmente com o suporte da fibra. Os fundamentos da distribuição de massas na extracção podem ser descritos a partir do que ocorreria num sistema ideal trifásico: antes da extracção, n_0 moles do analito estariam presentes, com uma concentração C_0, num volume V_a da amostra; quando a extracção está completa (isto é, o equilíbrio (e) foi atingido), os n_0 moles distribuem-se entre as fases, isto é, $n^e{}_a$ na amostra aquosa, $n^e{}_h$ no *headspace* e $n^e{}_f$ na fibra. A conservação de massa no processo é expressa da seguinte forma:[49,50]

$$n_0 = n^e{}_a + n^e{}_h + n^e{}_f \qquad 1.5$$

O balanço de massa no equilíbrio pode ser dado por:

$$C_0 V_a = C_f^e V_f + C_a^e V_a + C_h^e V_h \qquad 1.6$$

onde, C_0 é a concentração inicial de analito na amostra; V_a é o volume de amostra (matriz); C^e_f é a concentração de analito na fase extractora (fibra) em equilíbrio; V_f é o volume de fase extractora; C^e_a é a concentração de analito na matriz em equilíbrio; C^e_h é a concentração de analito no *headspace* em equilíbrio e o V_h é o volume do *headspace*.

As constantes de distribuição fibra/matriz, fibra/*headspace* e *headspace*/matriz são definidas como:[50,49]

$$K_{fa} = \frac{C^e_f}{C^e_a}$$
$$K_{fh} = \frac{C^e_f}{C^e_h} \qquad 1.7$$
$$K_{ha} = \frac{C^e_h}{C^e_a}$$

Sendo que:

$$K_{fh} \times K_{ha} = K_{fa} \qquad 1.8$$

Combinando as equações 1.6 e 1.7, após rearranjos algébricos, obtém-se a seguinte equação:[50,49]

$$n^e_f = \frac{K_{fh} K_{ha} V_f C_0 V_a}{K_{fh} K_{ha} V_f + K_{ha} V_h + V_a} \qquad 1.9$$

A equação 1.9 mostra que a quantidade extraída é proporcional à concentração inicial de analito na amostra, ao volume da fibra (fase extractora) e à constante de distribuição entre a fibra e a amostra. Isto é verdade quer a fibra se encontre em contacto directo com a matriz, quer se encontre no respectivo *headspace*. É também verdade que se $V_a >> K_{fh}K_{ha}V_f + K_{ha}V_h$, a extracção é praticamente independente do volume da amostra e do volume do *headspace*. Se, por outro lado, essa condição não se verificar, a quantidade extraída dependerá daqueles parâmetros.

De uma forma mais simplificada pode-se considerar um sistema constituído por apenas duas fases - matriz e fibra, como será o caso de um meio aquoso. Neste caso, a quantidade de analito extraído pela fibra no equilíbrio, é dada pela equação 1.10.[50,49]

$$n_f^e = \frac{K_{fa} V_f C_0 V_a}{K_{fa} V_f + V_a} \qquad 1.10$$

Neste caso, se $V_a >> K_{fa}V_f$, então a quantidade de analito extraída não é dependente do volume da amostra e a equação 10 apresenta-se da seguinte forma:

$$n_f^e = K_{fa} V_f C_0 \qquad 1.11$$

Como os revestimentos usados em SPME são escolhidos de forma a terem afinidade elevada para os compostos orgânicos a serem extraídos, os valores de K_{fa} para estes analitos são elevados. No entanto, raramente são suficientemente grandes para extrair exaustivamente o composto da matriz da amostra, razão pela qual a SPME é um método de amostragem em equilíbrio. Através de uma calibração adequada, a SPME pode ser usada para determinar a concentração de analitos numa amostra.[51]

Estritamente falando, a teoria apresentada apenas pode ser aplicada ao equilíbrio de partição que envolve as fases poliméricas líquidas tal como a de PDMS. No caso de revestimentos sólidos a teoria aplicada é análoga à apresentada quando estamos na presença de concentrações de analito baixas, de forma a que área total da superfície disponível para adsorção seja proporcional ao volume de revestimento se se assumir uma porosidade constante. Para concentrações elevadas de analito, ocorre saturação do revestimento resultando numa isotérmica não linear, tal como discutido em 1.8.1.2.

A quantidade de analito presente na fibra em equilíbrio é dado por:[50]

$$n_f^e = C_f^e V_f = \frac{K_{ad} C_0 V_a V_f (C_{f\max} - C_f^e)}{V_a + K_{ad} V_f (C_{f\max} - C_f^e)} \qquad 1.12$$

onde, C_{fmax} é a concentração máxima de sítios activos existentes no revestimento e C^e_f é a concentração de analito na fibra, em equilíbrio. A constante de equilíbrio de adsorção do analito é representada por K_{ad} e C_0 é a concentração inicial do analito na amostra. A equação 1.12 é idêntica à equação 1.10, onde a extracção era feita por absorção. A principal diferença é a presença na equação 1.12, do termo ($C_{f\ max} - C^e_f$) no numerador e no denominador. Deve também ser notado que na equação 1.12, o K_{ad} é muito diferente do K_{fa} existente na equação 1.10. O K_{fa} é um coeficiente de partição enquanto que o K_{ad} é uma constante de equilíbrio de adsorção. Para concentrações de analito na fibra muito baixas,

isto é quando a concentração de analito na fibra é desprezável comparado com o número de sítios activos totais, pode-se dizer que $C_{fmax} >> C^e_f$ e que a dependência com a concentração na amostra é linear.

Na prática é muito raro que apenas um analito da amostra tenha afinidade para a fibra, e sendo o processo de adsorção um processo competitivo, a presença de um outro composto *B* irá afectar a quantidade de analito *A* extraída pela fibra. A concentração em equilíbrio do analito *A* na fibra, na presença de um composto competitivo *B*, é dada pela seguinte equação:[50]

$$C^e_{fA} = \frac{C_{f\max} K_A C^e_{aA}}{1 + K_A C^e_{aA} + K_B C^e_{aB}} \qquad 1.13$$

onde, K_{adA} e K_{adB} são as constantes de equilíbrio da adsorção para os compostos *A* e *B* respectivamente, e C^e_{aA} e C^e_{aB} são as concentrações de *A* e *B* na amostra, em equilíbrio. A equação 1.13 pode ser rearranjada para dar a quantidade extraída, em equilíbrio, pela fibra:[50]

$$n^e_{fA} = C^e_{fA} V_f = \frac{C^0_A V_a V_f K_A (C_{f\max} - C^e_{fA})}{(1 + K_B C^e_{aB}) V_a + K_A V_f (C_{f\max} - C^e_{fB})} \qquad 1.14$$

A quantidade de analito *A* extraída, em equilíbrio, na presença do composto competitivo *B*, deverá ser menor do que a quantidade de analito *A* extraída num situação em que não existe o composto competitivo. No entanto, se o composto interferente está presente em concentrações muito baixas, ou tem pouca afinidade para com o revestimento da fibra, a diferença de quantidade de analito *A* extraída, em amostras com e sem o composto interferente *B*, é muito pequena.

A presença do composto *B* pode também ter impacto na resposta linear da curva de calibração. Na realidade, quando o composto *B* é adsorvido na superfície do revestimento da fibra, reduzem-se o número de sítios disponíveis para que ocorra adsorção de *A*. Isto significa que C_{fmax} é baixa para *A* e a não-linearidade para *A* acontece a partir de concentrações mais baixas, quando comparado com situações onde não existem interferentes.

1.8.1.4. Cinética

Considerando que uma amostra líquida ou gasosa é agitada perfeitamente, ou seja, a amostra move-se muito rapidamente em volta da fibra, então todo o analito presente na amostra tem acesso ao revestimento da fibra. Neste caso, o tempo de equilíbrio, t_e, definido como o tempo requerido para extrair 95% da quantidade de analito em equilíbrio, é dado pela seguinte equação:[48]

$$t_e \approx t_{95\%} = \frac{2(r_0 - r_i)^2}{D_f} \qquad 1.15$$

A equação 1.15, expressa o tempo para atingir o equilíbrio, t_e, em função da espessura do revestimento (dado pela diferença do raio externo, r_0, e raio interno do revestimento, r_i) e do coeficiente de difusão do analito nessa camada (D_f).

No entanto, a equação 1.15 precisa ser avaliada com cautela. Por exemplo, quando nela são substituídos os parâmetros para a fibra de PDMS, com 56 µm de espessura de revestimento e um analito como benzeno, de $D_f = 2{,}8\times10^{-6}$ cm/s, é previsto que $t_{95\%}$ seja cerca de 20 segundos[52]. Na prática este valor só é aproximado quando a extracção do benzeno é feita de uma matriz gasosa.[53] Verificou-se que,[52] em extracções de matrizes aquosas (1 ppm de benzeno em água), o tempo necessário ao trânsito de analito pela matriz até atingir a superfície da fibra (t_e) é de 200 segundos ou mais, dependendo da agitação a que a matriz está sujeita.

A Figura 1.7 mostra cinco perfis de extracção (as curvas representam a fracção extraída em função do tempo de extracção), do benzeno com fibra PDMS. A curva *A* é teórica e representa o comportamento segundo a equação 1.15, as restantes curvas são experimentais, com vários níveis de agitação da matriz aquosa (curvas B, C, D) e sem agitação (curva E). De facto, ao comparar as curvas experimentais nota-se que o t_e diminui com o aumento da agitação da matriz, porque este procedimento facilita o contacto do analito com a fibra. No entanto, mesmo existindo agitação o t_e é substancialmente maior do que o previsto pela equação 1.15. Isto ocorre porque apesar da agitação, a superfície da fibra fica em contacto com uma camada estática da matriz, com uma determinada espessura, onde não existe agitação. Ao contrário do que ocorre na região agitada, na camada estática a transferência de massa ocorre exclusivamente por difusão e, portanto, é mais lenta.

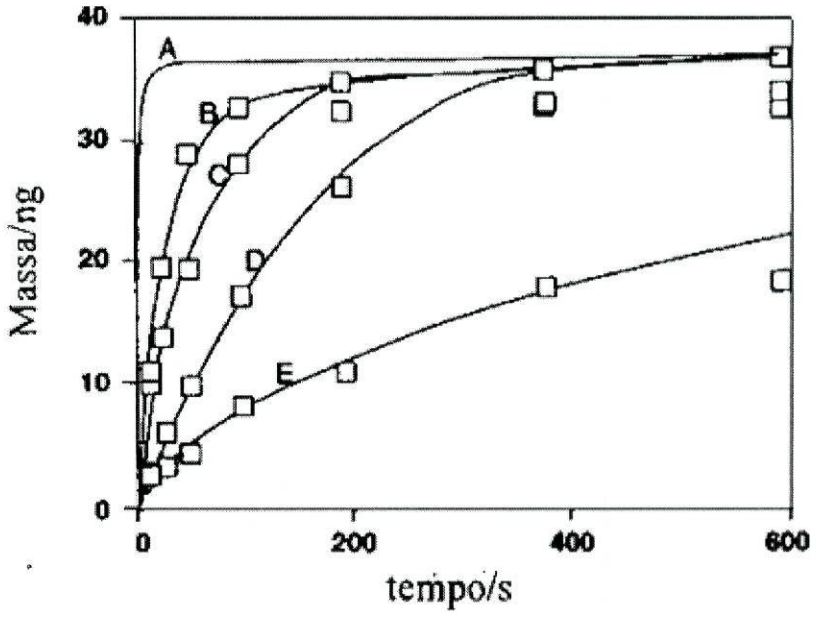


Figura 1.7. Perfis de extracção, usando uma fibra PDMS, de 1 ppm de benzeno em água (A) segundo o teoricamente esperado e sob quatro condições de agitação: (B) 100% de agitação magnética; (C) 75% de agitação magnética; (D) 50% de agitação magnética e (E) sem agitação.[52]

Na realidade a equação 1.15 representa um modelo de agitação perfeita onde todo o analito tem acesso ao revestimento da fibra. No entanto, num modelo mais realista não é isso que acontece. Para descrever melhor o que acontece na realidade, t_e deverá ser dado pela equação:[48,54]

$$t_e \approx t_{95\%} = 3\frac{\delta K_{fa}(r_0 - r_i)^2}{D_a} \qquad 1.16$$

em que, δ corresponde à espessura de uma camada fronteira hipotética sem agitação e D_a corresponde ao coeficiente de difusão do analito na amostra. Desta relação, verifica-se que o tempo de extracção aumenta com um elevado K_{fa}, com uma maior espessura do revestimento ($r_0 - r_i$) e com menor coeficiente de difusão do analito na amostra.

Por outro lado, uma agitação mais eficaz irá diminuir o tempo de extracção (diminuição do factor δ na equação 1.16) por redução da fronteira hipotética sem agitação presente junto à fibra em amostras líquidas.

Para amostras gasosas, no entanto, a agitação deixa de ser um procedimento necessário, uma vez que a convecção natural do ar é suficiente para facilitar um equilíbrio relativamente rápido.[44]

No que se refere à extracção em *headspace,* a relação dada pela equação 1.16 é apenas válida se o sistema estiver sob uma agitação perfeita, no entanto, se isso não acontecer é necessário ter em conta algumas variáveis adicionais, segundo a equação:

$$t_e \approx t_{95\%} = 1{,}8 \cdot \left(\frac{L_h}{K_{ha} \cdot \left(D_h + 2 \times 10^{-5} N R_b^{\,2} \right)} + \frac{L_a}{1{,}6 \cdot \left(D_a + 0{,}03 N R_b^{\,2} \right)} \right) \cdot K_{fa} L_f \qquad 1.17$$

onde, L_f, L_h e L_a, designam respectivamente as espessuras do revestimento, do headspace e da fase aquosa, N designa a velocidade de revolução da barra magnética, R_b o raio de revolução da barra magnética e D_h corresponde ao coeficiente de difusão do analito no *headspace*.[54]

É de realçar que, num método quantitativo, a condição de equilíbrio não é um pré-requisito, ou seja, é possível definir um tempo de extracção inferior ao tempo necessário para se estabelecer o equilíbrio (mantendo o tempo de extracção constante para um conjunto de experiências relacionadas) obtendo-se igualmente uma relação linear entre a concentração do analito e a quantidade extraída.

1.8.1.5. A escolha da fibra

A escolha do tipo de fibra a usar dependerá da estrutura química dos compostos que se pretende analisar. Geralmente, os compostos voláteis requerem revestimentos espessos, enquanto que revestimentos com menos espessura são mais eficientes para analitos semi-voláteis.[55] Na Tabela 1.4 são apresentadas as características da fibras de SPME comercializadas.

Durante o presente trabalho foram usadas duas fibras de SPME, uma de PDMS e uma de PDMS-DVB. As fibras com revestimento de PDMS encontram-se disponíveis em três espessuras 7 μm, 30 μm e 100 μm e possuem um revestimento líquido capaz de suportar elevadas temperaturas (cerca dos 300ºC). É uma fibra apolar adequado para analitos apolares[56,57] podendo, no entanto, também ser utilizada para extrair compostos polares se forem optimizadas as condições de extracção, tais como pH, concentração de sais e temperatura.

Tabela 1.4. Revestimentos de SPME comercializados: modo de uso, algumas propriedades e aplicações.[57]

Revestimento da fibra	Espessura do filme (μm)	Uso recomendado	Temperatura máxima do injector (GC)	Aplicações
PDMS	100	GC, HPLC	280 °C	Compostos orgânicos apolares tais como COVs, PAHs, benzeno/tolueno/ etilbenzeno/xileno, pesticidas
	30	GC, HPLC	280 °C	
	7	GC, HPLC	340 °C	
PA	85	GC, HPLC	320 °C	Compostos orgânicos polares tais como triazinas, pesticidas, organofosforaodos e fenois
PDMS-DVB	65	GC, HPLC	270 °C	Hidrocarbonetos aromáticos, aminas aromáticas, COVs
	60	GC	270 °C	
Carboxen-PDMS	75	GC	320 °C	COVs, hidrocarbonetos
CW-PDMS	65	GC	260 °C	Compostos orgânicos polares tais como álcoois, cetonas
CW-TR	50	HPLC		Tensoactivos aniónicos, aminas aromaticas

PDMS = Polidimetilsiloxano; PA = Poliacrilato; DVB = Divinilbenzeno; CW = Carbowax; TR = templated resin.

As fibras de PDMS-DVB dispõem de um polímero poroso de divinilbenzeno ligado a um polímero líquido de polidimetilsiloxano. Este tipo de fibra é maioritariamente mesoporosa, com alguns macroporos e microporos. As fibras de PDMS-DVB retêm melhor os analitos de pequenas dimensões do que a fibra que contem apenas PDMS. A combinação

dos dois revestimentos tem melhor afinidade para analitos polares.[58] Revestimentos poliméricos com partículas porosas incorporadas, como é caso da PDMS-DVB, apresentam a desvantagem de possuírem uma menor estabilidade mecânica relativamente às fibras com revestimentos poliméricos homogéneos, apresentando contudo, uma selectividade mais elevada. Os analitos são fisicamente retidos nos poros da fibra, ocorrendo uma forte adesão dos analitos que se encaixam adequadamente nos seus poros, tornando estas fibras aplicáveis em análises de nível vestigial.[58]

1.8.1.6. Aplicação de SPME à análise de tabaco

A SPME foi anteriormente utilizada[59] na quantificação de alcalóides (nicotina, nornicotina, miosmina, anabasina) em extractos aquosos de tabaco. Para tal, as amostras de tabaco foram extraídas com 1% de NH_4OH em água. A fibra de SPME (revestimento de PDMS) foi exposta directamente em contacto com o extracto de tabaco durante 12 minutos e depois no injector de um GC durante 60 segundos. Foi provado que expondo a fibra directamente no extracto aquoso de tabaco, às condições ambiente, se obtinha uma boa sensibilidade e precisão. No entanto foram apresentadas duas desvantagens: efeito de matriz e envelhecimento precoce da fibra. O uso de um padrão interno (2,4-dipiridil) para compensar estes efeitos é limitado pelas diferenças de natureza química entre o padrão interno e cada um dos alcalóides.

Num outro trabalho[60] foram optimizados parâmetros experimentais para a determinação de compostos voláteis numa grande variedade de amostras de tabaco usando SPME/GC-MS. A atenção foi focada no ajuste da temperatura da amostra, humidade e pH durante o processo de extracção no *headspace*. A temperatura foi ajustada para abranger compostos com uma grande gama de volatilidades enquanto o pH da mistura foi optimizado para facilitar a amostragem de certas classes de compostos, baseado na acidez ou natureza iónica dos analitos. Foram utilizados dois tipos de fases de SPME, PDMS e carbowax. Os autores concluíram que à temperatura de 100ºC, SPME pode, de uma forma efectiva, absorver hidrocarbonetos na gama C_{15} - C_{20}, não sendo tão efectiva a adsorção de hidrocarbonetos mais voláteis (C_8 - C_{14}). À temperatura ambiente, os resultados da amostragem foram opostos, com melhor adsorção para hidrocarbonetos mais voláteis. Para adsorção de hidrocarbonetos na gama alargada de C_8 a C_{20}, foi testada uma rampa de arrefecimento da temperatura. Os resultados mostraram que a amostragem por SPME de

hidrocarbonetos usando uma rampa de temperaturas entre 100 e 25ºC foi quantitativamente similar com a obtida com injecção líquida da amostra no cromatógrafo. Para avaliar a amostragem com SPME, usando uma rampa de temperaturas, na colheita de compostos voláteis do tabaco, foram estudadas duas situações: temperatura constante a 100ºC e rampa de temperatura entre os 100ºC e os 25ºC. Foram obtidos resultados similares aos anteriores.

A volatilidade de compostos iónicos, tal como a nicotina, é muito dependente do pH. A nicotina é muito solúvel em soluções aquosas, logo, ao adicionar água a amostras de tabaco a nicotina existente na fase de vapor é reduzida, sendo assim desfavorável para amostragem no *headspace* por SPME. Yang *et al.*,[60] verificaram que uma maior adsorção de nicotina se conseguia adicionando uma solução básica às amostras de tabaco. Pelo contrário, a adição de uma solução ácida convertia a nicotina em iões protonados, levando a uma diminuição da nicotina absorvida. Nesse estudo[60] verificou-se que a fibra mais polar de CW-DVB adsorvia melhor os compostos mais voláteis, a maioria deles compostos com odor que eram eluidos em primeiro lugar em GC. Verificaram também que as fibras CW-DVB eram apropriadas para a análise de ácidos orgânicos. A fibra apolar PDMS-DVB mostrou ser mais selectiva e sensível que a CW-DVB para compostos orgânicos neutros, tais como os hidrocarbonetos. Os mesmos autores[60] estudaram também a variabilidade entre fibras. Para isso analisaram tabaco de uma mesma marca usando 5 fibras diferentes de CW-DVB e verificam que de fibra para fibra ocorria uma variação superior a 20%. No entanto, réplicas usando uma mesma fibra geram resultados reprodutíveis.

Existem outros estudos que relatam o uso de SPME via *headspace* seguindo-se análise via GC-MS, para análise de compostos do tabaco. Um estudo[61] onde foram realizadas análises SPME (*headspace*)/GC-MS a três amostras, constituídas cada uma delas por uma mistura de duas variedades de tabaco, mostrou que a técnica permitia de uma forma rápida e sensível, identificar qual a variedade de tabaco que constituía cada amostra, comparando os analitos que constituíam cada amostra. As amostras de misturas de tabaco (1 g) eram colocados num vial onde era adicionado 3 ml de KCl 3M, sendo a amostra posteriormente aquecida a 95ºC para que ocorresse a extracção. Diferentes compostos presentes no tabaco eram detectados, sendo os mais significativos a nicotina, o neofitadieno, a geranilacetona e o 6-metil-5-hepten-2-ona.

Clark e Bunch[62] usaram SPME/GC-MS para análise qualitativa e quantitativa de ingredientes adicionados ao tabaco. Foram quantificados mentol, anetol, benzaldeído e tetrametilpirazina. Para isso, removeram 1 g de tabaco de cigarros de referência e colocaram num vial, onde adicionaram 2 µL de uma solução 2,6-diclorotolueno em etanol (1 µg/µL) e

1 μL da mistura de ingredientes que pretendiam quantificar (1 μg/μL de cada um dos compostos, em etanol). As amostras ficaram a equilibrar durante 2 horas à temperatura ambiente antes de serem analisadas. Uma vez que os ingredientes adicionados ao tabaco estavam, na sua maioria, em concentrações baixas, a fibra de SPME teria de ser a de maior sensibilidade para estes compostos. Como os ingredientes adicionados ao tabaco são na sua maioria compostos ligeiramente polares, são retidos por fibras mais polares dando origem a sinais com elevada intensidade, sendo que ao mesmo tempo as interferências sentidas por compostos voláteis apolares são menores. As fibras de poliacrilato foram as que mostraram reter melhor os compostos estudados.[62] A fibra de PDMS-DVB foi a segunda fibra com melhor poder de retenção dos referidos compostos, no entanto, esta fibra mostrou ter também uma elevada afinidade para hidrocarbonetos. Neste último caso, foi notório um elevado efeito de matriz que dificultou a detecção dos ingredientes adicionados ao tabaco. A fibra CW - DVB mostrou ser a fibra que permitiu identificar mais facilmente os compostos pretendidos, havendo poucas interferências da matriz do tabaco.[62]

1.8.2. Tubos com adsorvente[63]

Os adsorventes que têm sido usados, acondicionados em tubos de aço, para recolher COVs de fluxos gasosos (usando bombas de sucção) dividem-se em duas categorias: adsorventes à base de carbono e resinas poliméricas orgânicas. O Tenax TA (resina polimérica porosa baseada no óxido de 2,6-difenileno) é o adsorvente mais utilizado em estudos de COVs em ambientes interiores, pois tem uma estabilidade térmica relativamente elevada, capacidade para reter um largo intervalo de classes de compostos e uma baixa afinidade para a água. Além disso, permite níveis muito baixos de COVs nos brancos. O Tenax TA é o mais aconselhado para recolher compostos orgânicos apolares com pontos de ebulição entre 60 - 250ºC, sendo adequado para recolher hidrocarbonetos alifáticos de C_6 a C_{18}, compostos aromáticos, terpenos, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos clorados, álcoois e ésteres. Também pode ser utilizado na recolha de compostos com ponto de ebulição superiores a 250ºC desde que possam ser eficientemente desadsorvidos.

Contudo, o Tenax TA não é adequado para COMVs. O seu intervalo de aplicação pode, no entanto, ser estendido aos compostos C_3 - C_5, desde que se proceda ao arrefecimento do tubo com adsorvente durante o período de recolha.

Como nenhum dos adsorventes disponíveis actualmente permite recolher e desadsorver termicamente todos os COVs e COMVs haverá necessidade de combinar

adequadamente vários adsorventes que permitam essa recolha. Multiadsorventes típicos são constituídos por 2 ou 3 camadas sequenciais de adsorventes do tipo Tenax, Carbotrap e Carbosieve acondicionados em tubos de aço. O adsorvente com menor estabilidade térmica determina a temperatura máxima de desadsorção e o limite superior do intervalo dos pontos de ebulição dos compostos que podem ser detectados.

Outros aspectos muito importantes associados aos tubos com adsorventes são o valor do branco, contaminações devido a reacções químicas que ocorrem no próprio material adsorvente durante a amostragem ou armazenagem (artefactos), e o volume de amostragem.

1.8.2.1. Valores do Branco

Um aspecto importante a ter em consideração num adsorvente é o valor do branco que idealmente deveria ser zero. Quanto mais baixo o valor do branco, mais sensível será a determinação. Muitos dos adsorventes podem ser limpos e acondicionados por meio de um aquecimento de várias horas num fluxo de um gás puro e inerte, usando temperaturas ligeiramente superiores às usadas na desadsorção da amostra. Para alguns adsorventes a limpeza térmica não é eficiente, e é necessária uma extracção por solvente (extracção-Soxhlet) para reduzir o sinal de fundo até um nível aceitável. Mesmo após a limpeza e acondicionamento os adsorventes podem continuar a apresentar diferentes quantidades de contaminantes que são emitidos pelos próprios adsorventes devido a degradação ou derivados dos reagentes usados na produção dos polímeros.

1.8.2.2. Volume de amostragem seguro

O volume de amostragem seguro (VAS, do inglês: *safe sampling volume*, SSV) é a quantidade de gás que pode ser recolhida com a probabilidade de não se exceder a capacidade de adsorção do adsorvente relativamente aos COVs. É uma variável que tem que ser considerada com base nas condições de amostragem e nos compostos a serem detectados. O VAS para um único COV é geralmente 50% do volume de ar contendo o composto que pode passar através do tubo adsorvente sem que a concentração de vapor do composto à saída atinja 5% da concentração à entrada.[18] Quando se recolhem misturas de COVs, o VAS é determinado pelo composto que apresenta o menor volume de saturação (VS).

O VS depende das características químicas e físicas quer do composto quer do adsorvente. A adsorção de um COV da fase gasosa na superfície de um material adsorvente é influenciado pela temperatura, velocidade do gás através do tubo de amostragem, pressão parcial do composto, concentração do composto na fase gasosa e a concentração de COVs total da fase gasosa. O aumento da temperatura e da humidade do carvão e dos polímeros provoca uma diminuição do VS (citado por [18]). Um aumento 25ºC para 40 ºC originou uma diminuição do VS num factor de 2 aproximadamente. A regra geral é que um aumento de 10ºC na temperatura diminui o VS em 50%.[18] O fluxo de amostragem será também uma variável importante pois o número de pratos teóricos do tubo adsorvente varia com o fluxo. Fluxos muito altos podem prejudicar o poder de adsorção, mas também se deve evitar usar fluxos muito baixos pois, para além de originarem um número muito baixo de pratos teóricos, pode ocorrer amostragem passiva conjuntamente com a amostragem activa. Para o Tenax TA recomendam-se fluxos de amostragem no intervalo 50 - 200 ml/min.

De acordo com o conhecimento actual, o volume máximo de ar recomendado a recolher em Tenax TA é de 5 dm3 (valor estabelecido tendo em conta os dados de VAS para tubos com 200mg de tenax TA).

1.8.2.3. Armazenamento de amostras recolhidas[63]

O efeito de armazenamento nas amostras recolhidas parece ser praticamente impossível de prever. Para evitar modificações das amostras, estas devem ser guardadas a temperaturas reduzidas (no frigorífico) e analisadas assim que for possível. De Bortoli *et al.* (citado por [18]) verificaram que a concentração de n-nonano era superior em tubos de Tenax guardados à temperatura ambiente durante 50 dias à obtida em tubos analisados imediatamente após recolha da amostra. Tendo efectuado a armazenagem à temperatura de -15ºC já não verificaram um aumento significativo da concentração. Nas duas situações ocorreu um decréscimo da concentração de 1-butanol. A causa poderá ter sido a adsorção irreversível do adsorvente durante a armazenagem ou desadsorção durante esse período. Existem também relatos de perdas de α-pineno em tubos de Tenax armazenados à temperatura ambiente.

1.9. Breve descrição da cromatografia gasosa com detector por espectrometria de massa (GC-MS)

Em cromatografia gasosa (GC) os componentes de uma mistura gasosa são transportados por uma fase móvel gasosa (um gás de arraste, normalmente hélio ou azoto) através de uma coluna que contém uma fase estacionária (sólida ou um filme líquido adsorvido sobre uma fase sólida). A separação baseia-se na diferente afinidade dos analitos para a fase estacionária.[64] A amostra pode ser introduzida na coluna através de um injector, na forma gasosa ou na fase líquida. Neste último caso será vaporizada no injector. A injecção pode ser feita sem repartição (*splitless*) ou com repartição (*split*) permitindo assim a transferência total ou apenas parcial da amostra para a coluna, o que funciona como uma diluição da amostra. Os componentes básicos de um cromatógrafo gasoso encontram-se esquematizados na Figura 1.8, sendo de destacar os blocos do injector, do forno (onde se localiza a coluna de separação) e do detector.

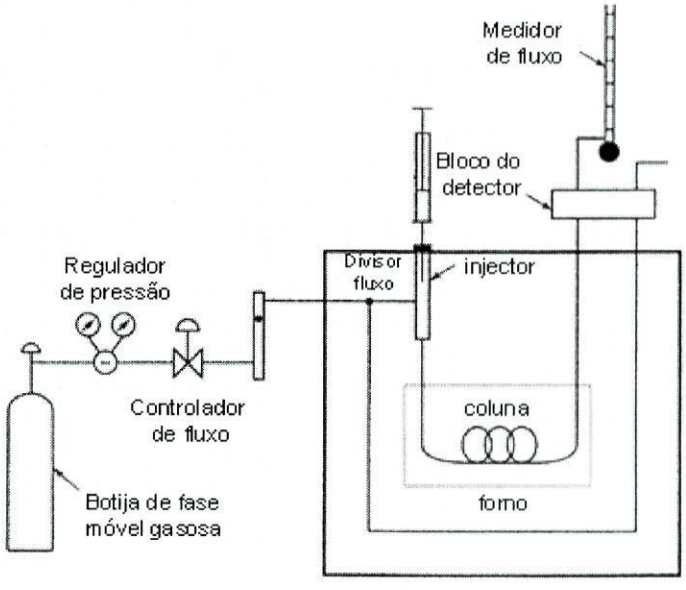


Figura 1.8. Esquema de um cromatógrafo gasoso.[65]

A detecção por espectrometria de massa (MS) associada a GC permite a identificação e determinação quantitativa de um número muito elevado e diversificado de compostos voláteis e semi-voláteis. Num espectrómetro de massa (Figura 1.9), as amostras constituídas por moléculas gasosas são convertidas em iões de maneira a poderem ser separados no analisador de massas.

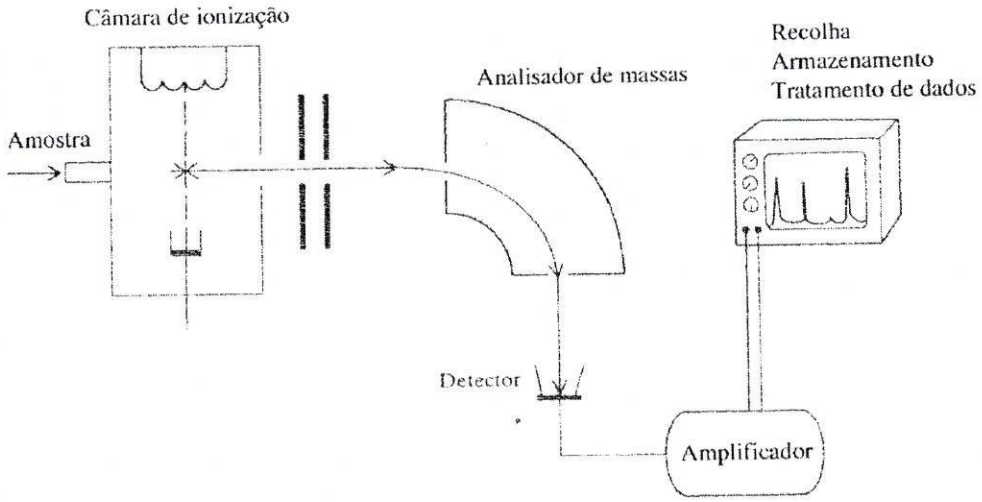


Figura 1.9. Representação esquemática do funcionamento de um detector de massa.[66]

Não existe um único método de ionização para todas as amostras, uma vez que a energia requerida difere de molécula para molécula. Assim, vários métodos de ionização são utilizados, sendo os mais comuns a ionização por impacto electrónico e a ionização química.[64] Existem também vários métodos para efectuar a separação dos iões, sendo os espectrómetros de massa classificados de acordo com o método: espectrómetros de massa de quadrupolo, espectrómetros de massa de sector magnético, e espectrómetros de armadilha de iões (do inglês, *Ion Trap*).[64]

Durante o bombardeamento electrónico numa câmara de ionização, uma amostra no estado gasoso e a muito baixa pressão (em vácuo) é bombardeada com electrões de energia suficiente para exceder a primeira energia de ionização dos compostos em estudo. Depois da molécula ter sido bombardeada por um electrão acelerado, pode ser convertida num ou mais iões positivos ou numa molécula num estado excitado. Se o electrão de bombardeamento possuir energia suficiente, a molécula pode partir-se em vários fragmentos iónicos. Os fragmentos mais estáveis estão presentes em maiores quantidades e serão os responsáveis pelos picos mais intensos do espectro. À medida que iões, radicais e outros fragmentos se formam, passam por pratos aceleradores (eléctrodos) que aceleram as partículas carregadas positivamente e por filtros que seleccionam apenas os catiões que se deslocam num determinado sentido. As partículas neutras e as carregadas negativamente não são aceleradas e são continuamente removidas pela bomba de vácuo.

Um espectrómetro de massa quadrupolo, é constituído por quatro barras cilíndricas, interligados duas a duas, sendo um analisador de massa de natureza electrostática que só permite a passagem, a cada instante, de iões de uma determinada relação massa/carga. Iões ressonantes têm uma relação massa/carga que permite que, num determinado instante, não sejam atraídos por nenhum dos pólos do quadrupolo, passando assim pelo filtro e atingindo o detector. Um espectrómetro de armadilha de iões é constituído por um eléctrodo em forma de anel a separar dois eléctrodos hemisfércos que capturam e armazenam os iões e que posteriormente, por aplicação de diferentes voltagens, expulsão os iões da *trap* que são depois encaminhados para o detector.

Nos espectrómetros de massa de sector magnético, as partículas carregadas positivamente (preferencialmente de carga +1) passam para um tubo analisador onde são submetidas a um campo magnético passando a executar um percurso curvo. O raio de curvatura depende da velocidade da partícula que por sua vez depende da intensidade do campo, da voltagem aceleradora e da massa da partícula. Para a mesma intensidade do campo e voltagem aceleradora, as partículas de maior massa têm maior raio de curvatura (menor deflexão por acção do campo magnético). Por esta técnica, partículas de razão massa/carga diferentes atingem o detector em pontos diferentes, constituindo um espectro de massa.[66]

As moléculas que não absorvem energia suficiente para fragmentar, perdem apenas um electrão, formando iões-radicais positivos com a mesma massa nominal da molécula neutra. Estes iões são os chamados iões moleculares e contém informação sobre a massa molecular. Para uma substância pura, o ião de massa mais elevada corresponde ao ião molecular; os restantes iões correspondem aos fragmentos que resultam deste por quebra de ligações.[64,66] O padrão de fragmentação obtido pode ser interpretado de acordo com um conjunto de regras de modo a permitir a reconstrução da molécula com base na sua estrutura. Os espectros de massa são reprodutíveis e específicos para a grande maioria de compostos orgânicos. Este facto permite o estabelecimento de bases de dados digitalizadas para comparação espectral e identificação. Um espectro de massa é uma representação gráfica da abundância (porções relativas dos diferentes fragmentos carregados positivamente) em função da razão massa/carga (m/z) dos fragmentos correspondentes.[66] Os dados do espectrómetro de massa podem ser obtidos de duas formas: por varrimento contínuo (SCAN, na literatura internacional) e por monitorização de ião seleccionado (MIS, ou SIM em inglês). No primeiro caso obtêm-se um traçado de corrente iónica total (TCIT, ou TIC em inglês), que corresponde a um cromatograma com diversos picos,

correspondendo a cada pico um espectro de massa. Na técnica MIS não são obtidos espectros de massa. O espectrómetro é sintonizado para medir a corrente iónica correspondente a apenas um ou vários iões pré-determinados, o que resulta num aumento de sensibilidade. O traçado MIS tem um aspecto idêntico de um cromatograma de massa, mas a sua sensibilidade é muito mais elevada, contudo não conduz à identificação segura do composto.

Bibliografia

1. Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein (SBIBHAE) História do Tabaco. http://72.21.62.210/alcooledrogas/drogas_historia_tabaco.htm (01/03/2007)

2. World Health Organization. 10 Facts on the Tobacco Epidemic and Global Tobacco Control. http://www.who.int/features/factfiles/tobacco_epidemic/tobacco_epidemic_facts/en/index.html (01/02/2007)

3. Fundação Portuguesa de Cardiologia, Algumas reflexões sobre o tabaco. http://cardiologia.browser.pt/PrimeiraPagina.aspx?ID_Conteudo=21 (31/06/2007)

4. Fundação Portuguesa de Cardiologia, Tabagismo. http://www.fpcardiologia.pt/factor4.htm (31/05/2007)

5. Tonnessen, P.; Vermeire, P. A., Promoting a future without tobacco: also a continuing task for respiratory medicine in Europe. *European Respiratory Journal* **2000,** 16, 1031-1034.

6. Akpan, V.; Huang, S.; Lodovic, M.; Dolara, P., High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in 20 brands of chinese cigarettes. *Journal of Applied Toxicology* **2006,** 26, (6), 480-483.

7. Mizoue, T.; Tokui, N.; Nishisaka, K.; Nishisaka, S.-i.; Ogimoto, I.; Ikeda, M.; Yoshimura, T., Prospective study on the relation of cigarette smoking with cancer of the liver and stomach in an endemic region. *International Journal of Epidemilogy* **2000,** 29, (2), 232-237.

8. Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologia: Apresentação da Nicotina. http://www.geocities.com/qpn_nicotina/ (04/10/2005)

9. Smith, C. J.; Perfetti, T. A.; Rumple, M. A.; Rodgman, A.; Doolittle, D. J., "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology* **2001,** 39, (2), 183-205.

10. Hoffmann, D. *Analysis of toxic smoke constituints*; US consumer product safety commission and US department of health and human services, Toxicity Testing Plan: New York, 1993.

11. Chepiga, T. A.; Morton, M. J.; Murphy, P. A.; Avalos, J. T.; Bombick, B. R.; Doolittle, D. J.; Borgerding, M. F.; Swauger, J. E., A comparison of the mainstream smoke chemistry and mutagenicity of a representative sample of the US cigarette

market with two Kentucky reference cigarettes (K1R4F and K1R5F). *Food and Chemical Toxicology* **2000,** 38, (10), 949-962.

12. Baker, R.; Proctor, C., Where there's smoke. *Chemistry in Britain* January, 2001, pp 38-41.

13. Baker, R. R.; Bishop, L. J., The pyrolysis of tobacco ingredients. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2004,** 71, (1), 223-311.

14. Geiss, O.; Kotzias, D. *Tobacco, cigarettes and cigarette smoke - an overview*; EUR 22783 EN; European Commission, Institute for Health and Consumer Protection: Luxemburgo, 2007.

15. Proctor, C.; Martin, C.; Beven, J.; Dymond, H., Evaluation of an apparatus designed for the collectio of sidestream tobacco smoke. *Analyst* **1988,** 113, (10), 1509-1513.

16. Sloan, C. J.; Morie, G. P., Determination of ammonia in tobacco and tobacco smoke with an ammonia electrode. *Analytica Chimica Acta* **1974,** 69, 243-247.

17. Counts, M. E.; Morton, M. J.; Laffoon, S. W.; Cox, R. H.; Lipowicz, P. J., Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2005,** 41, (3), 185-227.

18. Tirkkonen, T.; Mroueh, U. M.; Orko, I. *Tenax as a collection medium for volatile organic compounds*; 06:E; NKB Committee and Work reports: Helsinquia, 1995.

19. Hoffmann, D.; Hoffman, I., The changing cigarette: chemical studies and bioassays. In *Smoking and Tobacco Control Monographs no.13*, 2001.

20. Smith, C. J.; Perfetti, T. A.; Rumple, M. A.; Rodgman, A.; Doolittle, D. J., "IARC group 2A carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology* **2000,** 38, (4), 371-383.

21. Baker, R. R.; Massey, E. D.; Smith, G., An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food and Chemical Toxicology* **2004,** 42, (Supplement 1), 53-83.

22. Carmines, E. L., Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 1: cigarette design, testing approach, and review of results. *Food and Chemical Toxicology* **2002,** 40, (1), 77-91.

23. Rustemeier, K.; Stabbert, R.; Haussmann, H. J.; Roemer, E.; Carmines, E. L., Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology* **2002,** 40, (1), 93-104.

24. Roemer, E.; Tewes, F. J.; Meisgen, T. J.; Veltel, D. J.; Carmines, E. L., Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 3: In vitro genotoxicity and cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* **2002,** 40, (1), 105-111.

25. Schmeltz, I.; Wenger, A.; Hoffmann, D.; Tso, T. C., Chemical studies on tobacco smoke. On the fate of nicotine during pyrolysis and in a burning cigaret. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **1979,** 27, (3), 602-608.

26. Darrall, K. G.; Figgins, J. A.; Brown, R. D.; Phillips, G. F., Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. *Analyst* **1998,** 123, 1095-1101.

27. Stevens, N. A.; Borgerding, M. F., GC-AED studies of nicotine fate in a burning cigarette. *Analytical Chemistry* **1999,** 71, 2179-2185.

28. Radovanovic, B. S.; Misic, Z., Gas chromatographic analysis of some toxic organic compounds in mainstream cigarette smoke. *The scientific journal Facta Universitatis* **1999,** 1, 59.

29. Li, S.; Olegario, R. M.; Banyasz, J. L.; Shafer, K. H., Gas chromatography-mass spectrometry analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in single puff of cigarette smoke. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2003,** 66, (1-2), 155-163.

30. Gmeiner, G.; Stehlik, G.; Tausch, H., Determination of seventeen polycyclic aromatic hydrocarbons in tobacco smoke condensate. *Journal of Chromatography A* **1997,** 767, (1-2), 163-169.

31. Lodovici, M.; Luceri, C.; Guglielmi, F.; Bacci, C.; Akpan, V.; Fonnesu, M. L.; Boddi, V.; Dolara, P., Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Preventionn* **2004,** 13, 1342-1348.

32. Wang, T. L.; Tong, H. W.; Yan, X. Y.; Sheng, L. Q.; Yang, J.; Liu, S. M., Determination of volatile carbonyl compounds in cigarette smoke by LC-DAD. *Chromatographia* **2005,** 62, 631-636.

33. Houlgate, P. R.; Dhingra, S.; Nash, S. J.; Evans, W. H., Determination of formaldehyde and acetaldehyde in mainstream cigarette smoke by high-performance liquid chromatography. *Analyst* **1989,** 114, 355-360.

34. Miyake, T.; Shibamoto, T., Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in cigarette smoke. *Journal of Chromatography A* **1995,** 693, (2), 376-381.

35. Brunnemann, K. D.; Kagan, M. R.; Cox, J. E.; Hoffmann, D., Analysis of 1,3-butadiene and other selected gas-phase components in cigarette mainstream and

sidestream smoke by gas chromatography-mass selective detection. *Carcinogenesis* **1990,** 11, (10), 1863-1868.

36. Byrd, G. D.; Fowler, K. W.; Hicks, R. D.; Lovette, M. E.; Borgerding, M. F., Isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry in the determination of benzene, toluene, styrene, and acrylonitrile in mainstream cigarette smoke. *Journal of Chromatography A* **1990.,** 503, 359–368.

37. Tobacco Reporting Regulations. Official methods for collection of emission data on mainstream smoke. In Canada Government Tobacco Act: Registration June 26, 2000; Vol. SOR/2000-273.

38. Counts, M. E.; Hsu, F. S.; Laffoon, S. W.; Dwyer, R. W.; Cox, R. H., Mainstream smoke constituent yields and predicting relationships from a worldwide market sample of cigarette brands: ISO smoking conditions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2004,** 39, (2), 111-134.

39. Federal Trade Commission (FTC), Comunicado à imprensa. http://www.philipmorrisinternational.com/global/downloads/SH/1967_FTC_press.pdf (25/07/2005)

40. *Cigarette yields using intense smoking protocols Parte 1: NFDPM, Nicotine and carbon monoxide yields*; Report FN40/M08/00; LGC - Setting standards in analytical science: April, 2000; pp 1-26.

41. Philip Morris International; Teores de alcatrão e nicotina – o que significam e o que não significam. http://www.philipmorrisinternational.com/pages/por_PT/smoking/T_and_N_yields.asp (20/07/2005)

42. Smith, C. J.; Livingston, S. D.; Doolittle, D. J.; , An international literature survey of IARC group I carcinogens reported in mainstream cigarette smoke. *Food and Chemical Toxicology* **1997,** 35, (10), 1107-1130.

43. Steele, R.; Payne, V.; Fulp, C.; Rees, D.; Lee, C.; Doolittle, D., A comparison of the mutagenicity of mainstream cigarette smoke condensates from a representative sample of the US cigarette market with a Kentucky reference cigarette (K1R4F) *Mutation Research* **1995,** 342, 179.

44. Lord, H.; Pawliszyn, J., Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* **2000,** 885, (1-2), 153-193.

45. Gbatu, T. P.; Sutton, K. L.; Caruso, J. A., Development of new SPME fibers by sol-gel technology for SPME-HPLC determination of organometals. *Analytica Chimica Acta* **1999,** 402, (1-2), 67-79.

46. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* **1990,** 62, (19), 2145-2148.

47. Valente, A. L. P.; Augusto, F., Microextração por fase sólida. *Química Nova* **2000,** 23, 523-530.

48. Pawliszyn, J., Quantitative aspects of SPME. In *Applications of solid phase microextraction*, Pawliszyn, J., Ed. Cambridge, 1999; pp 3-21.

49. Góreki, T., Solid versus liquid coatings. In *Applications of Solid Phase Microextraction*, Pawliszyn, J., Ed. Cambridge, 1999; pp 92-108.

50. Lord, H.; Pawliszyn, J., Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A* **2000,** 902, 17-63.

51. Supelco, Solid phase microextraction: theory and optimization of conditions. *Bulletin 923* 1998.

52. Louch, D.; Motlagh, S.; Pawliszyn, J., Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry* **1992,** 64, (10), 1187-1199.

53. Martos, P. A.; Pawliszyn, J., Calibration of solid phase microextraction for air analyses based on physical chemical properties of the coating. *Analytical Chemistry* **1997,** 69, (2), 206-215.

54. Ulrich, S., Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A* **2000,** 902, (1), 167-194.

55. Valor, I.; Pérez, M.; Cortada, C.; Apraiz, D.; Moltó, J. C.; Font, G., SPME of 52 pesticides and polychlorinated biphenyls: extraction efficiencies of the SPME coatings poly(dimethylsiloxane), polyacrylate, poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene, Carboxen-poly(dimethylsiloxane), and Carbowax-divinylbenzene. *Journal of Separation Science* **2001,** 24, (1), 39-48.

56. Negrão, M. R.; de Fátima Alpendurada, M., Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A* **1998,** 823, (1-2), 211-218.

57. de Fátima Alpendurada, M., Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A* **2000,** 889, (1-2), 3-14.

58. Mani, V., Properties of commercial SPME coatings. In *Applications of Solid Phase Microextraction*, Pawliszyn, J., Ed. Cambridge, 1999; pp 57-71.

59. Yang, S. S.; Smetena, I., Determination of tobacco alkaloids using solid phase microextraction and GC-NPD. *Chromatographia* **1998,** 47, (7-8), 443-448.

60. Yang, S. S.; Huang, C. B.; Smetena, I., Optimization of headspace sampling using solid-phase microextraction for volatile components in tobacco. *Journal of Chromatography A* **2002,** 942, (1-2), 33-39.

61. Mindrup, R. F., New applications for SPME/capillary GC: screening for amphetamines in urine; identifying tobacco varieties; monitoring nitrogen-containing herbicides herbicides in water. *The Reporter* **1995,** 14, 1-3.

62. Clark, T. J.; Bunch, J. E., Qualitative and quantitative analysis of flavor additives on tobacco products using SPME-GC-mass spectroscopy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **1997,** 45, (3), 844-849.

63. Silva, G. V. A. Estudo de emissões de COVs por materiais usados em interiores de edifícios. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2000.

64. kellner, R.; Mermet, J.; Otto, M.; Widmer, H., *Analytical Chemistry*. Wiley-VCH: 1998.

65. Holler, F. J.; Nieman, T. A.; Skoog, D. A., *Principles of Instrumental Analysis*. 5 ed.; Saunders College Publishing: New York, 1998.

66. Braun, R. D., *Introduction to Instrumental Analysis*. McGraw-Hill International Editions: Singapura, 1987.

2. Parte Experimental

2. Parte Experimental

2.1. Geração do fumo de cigarro

2.2. Padrões e cigarros utilizados

2.3. Amostragem

2.4. Descontaminação do material utilizado

2.5. Calibração

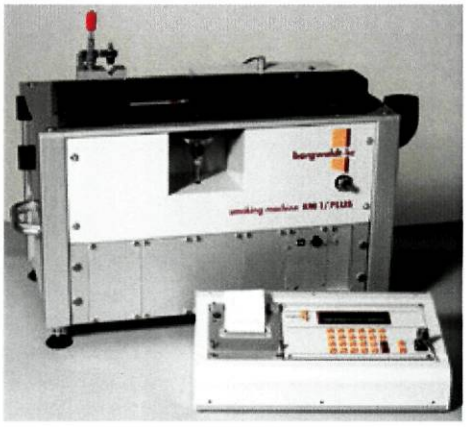
2.6. Análise química

2.7. Cálculos

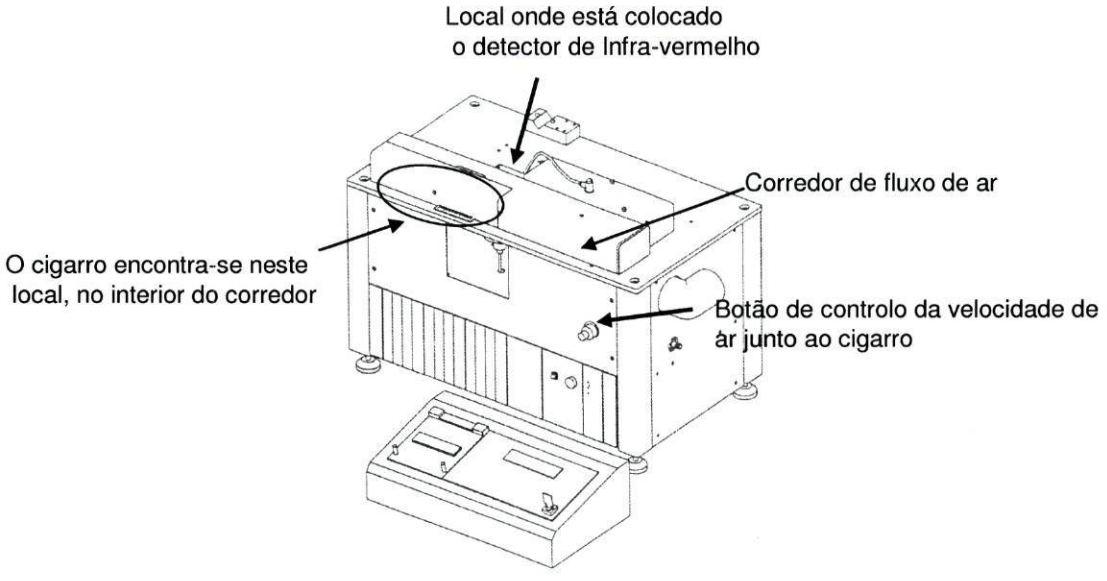
Bibliografia

2.1. Geração do fumo de cigarro

Para gerar fumo de cigarros utilizou-se um equipamento especialmente concebido para o efeito, de origem alemã, *Borgwaldt* modelo *RM1/Plus* (Figura 2.1), cujas especificações satisfazem as normas ISO 3308 e ISO 4387.



(A)



(B)

Figura 2.1. (A) Vista geral da máquina Borgwaldt, modelo RM1/Plus, usada para gerar o fumo do tabaco[1] e (B) respectivo esquema.[2]

Este equipamento imita o funcionamento do pulmão humano através do deslocamento de um êmbolo no interior de uma cavidade cilíndrica (Figura 2.2), permitindo fumar cigarros individuais mecanicamente.

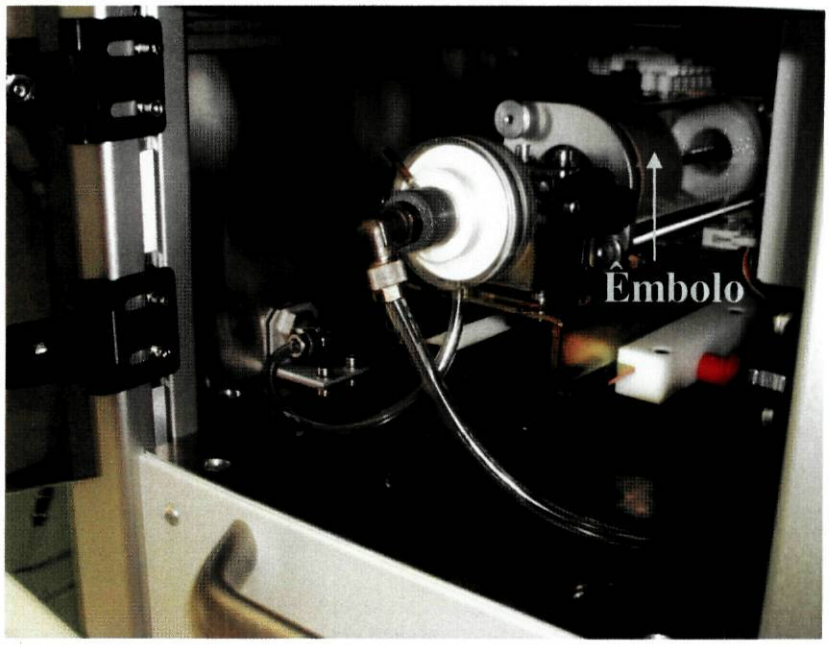


Figura 2.2. Imagem do interior da máquina onde é possível observar o êmbolo e a cavidade cilíndrica onde ele se desloca em movimento de vai e vem, imitando o funcionamento do pulmão humano.

Cada cigarro foi fumado em condições previamente estabelecidas e padronizadas (de acordo com as normas ISO anteriormente referidas), designadamente: 35 mL de volume de aspiração de ar, 2 segundos de duração da aspiração, 58 segundos de pausa entre aspirações e 30 mm de comprimento de cigarro não fumado.

O volume de aspiração de ar é o volume de ar aspirado pela máquina em cada puxada; a duração da aspiração é o tempo durante o qual a máquina aspira ar; e a pausa entre aspirações é o tempo de "descanso" entre duas puxadas consecutivas. Na pausa entre aspirações o cigarro continuava a arder mas nenhum fumo era aspirado. Cada um destes parâmetros pode ser modificado e alterado na unidade de controlo, sendo possível variar os valores dentro dos seguintes intervalos: volume de aspiração: 10 - 50 ml, duração da aspiração: 1,0 - 9,9 segundos, pausa entre aspirações: 2,0 - 99 segundos. Quando a máquina acaba de fumar um cigarro, imprime um pequeno relatório do qual consta a designação da amostra (estabelecida pelo operador antes de iniciar a queima do cigarro), a data, a hora e o número de aspirações efectuadas.

Na prática, a forma como o cigarro é queimado depende também das condições atmosféricas, particularmente da velocidade do ar junto ao cigarro. A norma ISO 3308

prescreve uma velocidade de ar junto ao cigarro de 200 ± 30 mm/s. Esta velocidade de ar é medida com um anemómetro colocado no canal de fluxo de ar, de forma fazer a medição junto à ponta do cigarro a arder. O anemómetro coloca-se preso no suporte, na posição indicada na Figura 2.3. A velocidade de ar junto ao cigarro pode ser controlado actuando no botão de velocidade.

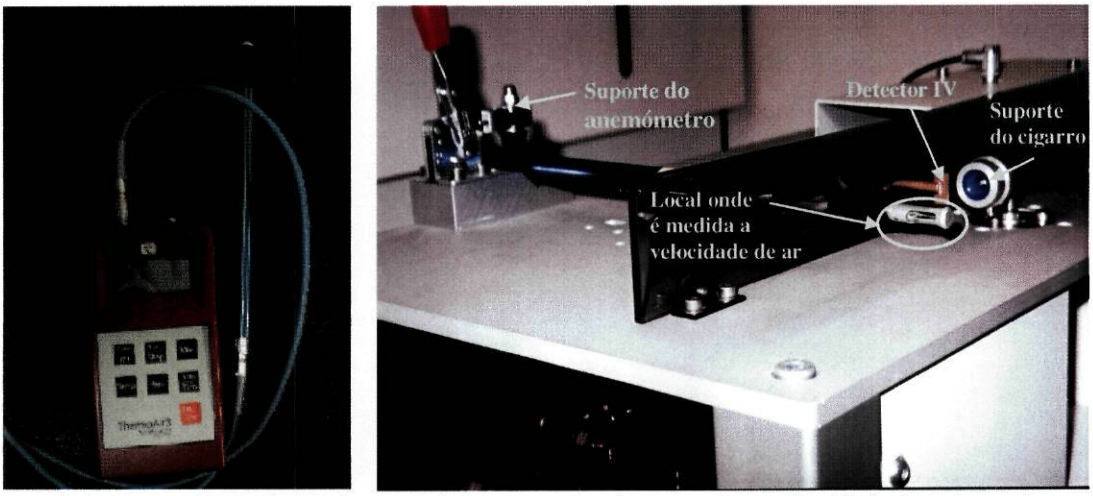


Figura 2.3. Fotografias onde se vê o anemómetro que permite controlar a velocidade do ar junto da ponta do cigarro.

A máquina possui no fundo do "corredor de fluxo de fumo" um sistema que aspira o fumo que é produzido na combustão/pirólise do cigarro e que é emitido directamente para a atmosfera. Esse fumo é depois encaminhado por um tubo para o exterior da máquina.

O equipamento foi colocado numa hotte, para não contaminar o ambiente do laboratório.

Todos os cigarros foram acesos manualmente usando um acendedor eléctrico externo. Na realidade, alguns outros métodos de ignição podem contribuir com mensuráveis quantidades de analitos na fase de vapor, contaminando a amostra.[3,4]

Antes de iniciar a queima de cada cigarro programou-se o processo de queima, definindo os valores de cada parâmetro, colocou-se o cigarro no respectivo suporte (Figura 2.4) e procedeu-se ao seu acendimento.

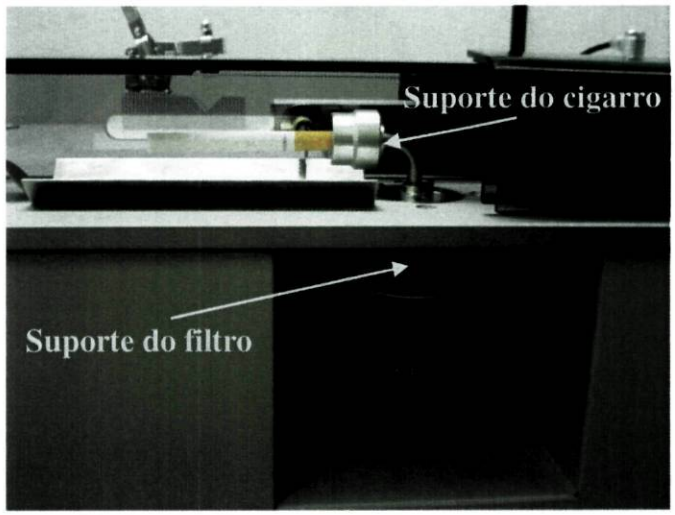


Figura 2.4. Vista parcial da máquina, com o cigarro colocado.

A referida máquina de fumar permite a recolha da fase particulada e da fase gasosa do fumo inalável. Para isso, o sistema está equipado com dois porta filtros, onde foram colocados filtros de fibra de vidro de 44 mm de diâmetro (Figura 2.5) que permitem a recolha da fase particulada do fumo. Estes filtros de fibra de vidro, são mais conhecidos como filtros de Cambridge e toda a matéria que fica retida nestes filtros corresponde à matéria particulada total (MPT).



Figura 2.5. Imagem dos porta filtros existentes na máquina de fumar, (A) sem o filtro colocado, (B) com o filtro colocado e (C) ligados por um tubo de teflon (tal como acontece no interior da máquina de fumar).

Estes filtros têm uma eficiência de 99% para partículas com um diâmetro aerodinâmico superior a 0,1 μm.[5] O primeiro filtro está ligado ao suporte onde se coloca o cigarro para ser queimado, de modo a filtrar imediatamente o fumo produzido. Um segundo filtro, chamado de segurança, está ligado ao primeiro por um tubo (Figura 2.5) e está colocado antes da seringa (ou "pulmão" da máquina) e tem como principal função garantir que a fase particulada fica completamente retida e não passa para o interior do equipamento. A fase de vapor é então encaminhada para o exterior da máquina.

2.1.1. Interferências da própria máquina de fumar cigarros

No decurso do trabalho após alguns meses de utilização da máquina, começou-se a notar uma redução significativa nos níveis determinados no fumo de cigarro. Após várias tentativas de despistagem da razão do problema, chegou-se à conclusão que a origem do problema estaria na própria máquina de fumar. De facto, colocando uma concentração conhecida de vários compostos num saco de gases, fazendo a máquina sugar essa mistura gasosa e analisando a mistura recolhida à saída da máquina verificou-se a ocorrência de perdas significativas. De referir que essas perdas variaram bastante, não sendo reprodutíveis. As perdas eram superiores para o m/p-xileno, sendo que a concentração mais baixa determinada era cerca de 16 vezes menor que a real. Para o tolueno a menor concentração determinada foi 5 vezes inferior à real. No caso da acetona, 2-butanona e benzeno as menores concentrações determinadas foram cerca de metade das reais. Estas perdas ocorrem de um modo aleatório sendo que uma determinação que apresente níveis mais baixos pode anteceder uma determinação com níveis mais elevados.

Uma pesquisa na literatura[5,6] permitiu constatar que este problema foi já sentido noutros estudos. Nas máquinas convencionais de fumar de cigarros o fumo é inicialmente aspirado para um tubo de vidro, sendo de seguida expulso para o exterior através do funcionamento de um pistão. No entanto, parecem existir nestas máquinas efeitos importantes de memória para compostos voláteis e semi-voláteis: mesmo depois do cigarro ser retirado na máquina, nas aspirações seguintes verifica-se a existência de sinal associado aos compostos.[6] Este efeito de memória pode ser explicado pelo facto de algum do fumo permanecer no volume morto existente nas tubagens (antes de chegar ao tubo de vidro). Para além disso, e uma vez que é detectado sinal nas cinco aspirações após o cigarro ter sido retirado da máquina, há evidência da ocorrência de condensação e adsorção dos compostos

no interior da máquina. No caso da fase gasosa do fumo, esta poderá condensar quando em contacto com os filtros existentes na máquina. Determinações de níveis de alguns compostos, nomeadamente acetona, benzeno e tolueno, fazendo a recolha apenas das aspirações necessários para queimar o cigarro e por outro lado fazendo a recolha dessas aspirações acrescidas das aspirações de limpeza (cerca de duas) mostraram que na realidade os níveis determinados no primeiro caso eram substancialmente mais baixos (ver Anexo 3).[5]

No presente trabalho, e apesar da máquina ser descontaminada após cada utilização tendo mesmo sido desmontada para limpar o seu interior, verificou-se que perdas e falta de reprodutibilidade começaram a acontecer de uma forma cada vez mais pronunciada, acabando por inviabilizar o prosseguimento do trabalho. Na realidade, existem peças da máquina não desmontáveis cuja descontaminação não é possível, e onde se deverá acumular partículas do fumo. Verificou-se também que essas perdas são inferiores para os compostos mais voláteis, o que deverá estar relacionada com sua maior capacidade de "fuga".

O uso deste tipo de máquinas de fumar no futuro poderá ter de passar pela recolha não só das aspirações necessárias para a queima de todo o cigarro, mas também das aspirações de limpeza da própria máquina. Mesmo assim, a exactidão será sempre questionável.

No presente estudo a parte experimental deu-se por terminada quando se constatou o problema e não se conseguiu descontaminar eficientemente a máquina de fumar.

2.2. Padrões e cigarros utilizados

Os cigarros usados na quantificação foram adquiridos nos anos de 2005 e 2006. Foram utilizados cigarros com filtro, de uma marca americana muito conhecida na Europa, que será designada por marca *A*. Os produtos de combustão/pirólise dos cigarros da marca *A* são constituídos por 10 mg/cigarro de alcatrão, 0,8 mg/cigarro de nicotina e 10 mg/cigarro de monóxido de carbono. Foram também utilizados cigarros de referência 2R4F da Universidade de Kentucky (Kentucky Tobacco Research & Development Center). Estes cigarros vêm acompanhados das seguintes informações sobre a sua composição: 9,7 mg/cigarro de alcatrão 0,85 mg/cigarro de nicotina e 13,0 mg/cigarro monóxido de carbono.

Os compostos químicos utilizados na preparação das diversas misturas de calibração para cromatografia gasosa constam da Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Padrões utilizados, qualidade e marca.

Composto	Qualidade / Marca
acetona	p.a., Merck
2-butanona	p.a., Merck
benzeno	p.a., 99.5 %, Merck
tolueno	p.a., 99.5 %, Merck
m/p-xileno	p.a. 98%, Merck
metanol	Chromasolv, 99,9% Sigma-aldrich

2.3. Amostragem

2.3.1. Recolha da fase de vapor do fumo inalável de cigarro

As amostras da fase de vapor do fumo inalável foram recolhidas à saída da máquina para sacos de gases Tedlar, construídos em filme de fluoreto de polivinilo transparente e adequados para armazenar compostos na forma gasosa. Os sacos de gases Tedlar têm sido usados em recolha e análise de emissões de poluentes para a atmosfera. Na realidade, níveis de COVs foram determinados em atmosferas interiores e atmosferas ocupacionais usando o sistema SPME/GC-MS após recolha em sacos de gases.[7]

O material dos sacos é inerte à maioria dos gases. Os sacos possuem uma válvula e um septo que permitem admitir ou remover gás do saco. Ao longo do estudo usaram-se sacos de 0,6 L, 1 L, 2 L, 3 L e 5 L de capacidade. O saco Tedlar foi adaptado à saída do fumo da máquina, usando um tubo de teflon, como mostra a Figura 2.6.



Figura 2.6. Saco na posição de recolha de fumo a partir da máquina de fumar.

Após a recolha do fumo de um cigarro, fechava-se a válvula do saco que era de seguida separado da máquina e registava-se o volume de fumo contido no saco. O saco era colocado numa sala com ar condicionado a 22°C e à pressão atmosférica. Em alguns casos a amostra foi diluída com diazoto (N45, Air Liquide). Para isso, deixava-se passar o diazoto para dentro do saco durante um determinado tempo (cronómetro analógico, Sportex) com um fluxo conhecido medido num rotâmetro (Cole Parmer).

Obedecendo ao método n°55 do *Centre de Cooperation pour les Recherches Cientifiques Relative au Tabac*[8] (CORESTA - organização francesa, fundada em 1956, que tem como objectivo promover a cooperação internacional da investigação cientifica na área do tabaco) o saco utilizado em cada situação foi sempre grande o suficiente para que a pressão final no interior não excedesse a pressão atmosférica.

2.3.2. Adsorção / Absorção para fase sólida dos compostos recolhidos

Os compostos a analisar foram adsorvidos/absorvidos, ou seja pré-concentrados, em fase sólida. Para este fim, usaram-se dois métodos diferentes para comparação.

2.3.2.1. Microextracção para fase sólida (SPME)

A recolha das amostras gasosas para análise foi feita através de uma unidade de SPME (Supelco), provida de uma fibra adsorvente/absorvente apropriada. Ao longo do trabalho foram usadas fibras com revestimentos diferentes: um de polidimetilsiloxano (PDMS), com 100 µm de espessura do filme de revestimento e outra de polidimetilsiloxano (PDMS), revestida de divinilbenzeno (DVB), com 65 µm de espessura do filme.

A fibra foi exposta à amostra no saco de gases, através do respectivo septo.

2.3.2.2. Tubos com adsorvente

Os vapores foram adsorvidos em tubos de aço, marca DANI, com enchimento de Tenax TA 60/80 mesh (Supelco). No empacotamento dos tubos o adsorvente foi introduzido por aspiração. Cada tubo comportava 160 ± 2 mg de adsorvente. Nas duas extremidades colocou-se lã de vidro silanizada, para evitar perdas. [9]

As amostras de fumo de cigarro contidas no saco de gases, e antes de se iniciar a amostragem, foram diluídas fazendo entrar azoto durante 15 minutos, com um fluxo de 234

mL/min para o interior do saco. A recolha de amostra gasosas a partir do saco para os tubos com enchimento foi efectuada por meio de uma bomba de sucção de baixo caudal de ar (Casella, modelo Vortex). Acoplado à bomba existia um rotâmetro, Cole-Parmer, com escala apropriada ao fluxo de 0 a 250 mL/min. O fluxo de amostragem situou-se no intervalo de 35 a 60 ml/min e os volumes recolhidos foram sempre aproximadamente de 1 L. O sentido da entrada de ar no tubo foi seleccionado, referenciado e mantido em todas as amostragens. Após amostragem os tubos foram de imediato fechados, sendo analisados no espaço de tempo máximo de uma semana. Até à análise, os tubos eram conservados no frigorífico.

2.4. Descontaminação do material utilizado

2.4.1. Máquina de fumar

Antes de iniciar a queima de cada cigarro, a máquina de fumar era limpa para eliminar resíduos de fumo do cigarro queimado anteriormente, que contaminaria a amostra. Para isso, a máquina era desmontada, os suportes dos filtros, as tubagens e o suporte do cigarro eram removidos peça a peça e limpos primeiramente com água e detergente, seguidamente com etanol e por fim apenas com água. Enquanto isso, colocava-se a máquina a trabalhar de forma a serem efectuadas cerca de 20 bombadas de ar para limpar o "pulmão" da máquina (ou seringa). O sistema era depois remontado, colocando-se sempre filtros novos. Ao fim de cada dia de trabalho limpava-se também o detector de infra-vermelho (controlador da extensão de cigarro fumado) e o canal de fluxo de ar.

2.4.2. Sacos de gases

Os sacos de gases foram descontaminados antes de ser usados pela primeira vez e entre utilizações. Para tal, enchia-se o saco com diazoto, e esvaziava-se o saco, 10 vezes sucessivas.

Foi verificada a existência de sinais correspondentes a possíveis compostos que estão presentes no fumo de cigarro e que não são completamente eliminados durante a descontaminação do saco de gases e máquina de fumar, tendo-se verificado que os valores residuais eram insignificantes.

2.4.3. Fibras de SPME

As fibras de SPME foram acondicionadas (descontaminadas) no início do dia de trabalho, sendo mantidas à temperatura de 250ºC durante 30 minutos. Antes de usar uma fibra pela primeira vez, esta era colocada a 250ºC durante 1 hora (tal como é indicado no folheto informativo). Estas operações foram realizadas no injector do GC.

2.4.4. Tubos com enchimentos

Os tubos contendo enchimento adsorvente após empacotamento eram colocados a 300ºC durante 16 h, com um fluxo de diazoto constante de cerca de 15-20 mL/min. Para esta operação usava-se um forno, construído no Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Engenharia do Porto, que permitia a limpeza de 5 tubos em simultâneo. Entre utilizações os tubos eram descontaminados durante 20 minutos a 300ºC. Após vinte utilizações, o enchimento era removido e rejeitado, procedendo-se a novo empacotamento.

2.4.5. Coluna do cromatógrafo gasoso

Para limpeza da coluna do GC, o forno era, diariamente, colocado à temperatura máxima do programa a utilizar (adiante indicado) durante 30 minutos (o mesmo período de tempo de limpeza da fibra). Após este tempo, era traçado um cromatograma na presença da fibra para confirmar a ausência de contaminantes no sistema.

2.5. Calibração

2.5.1. Obtenção de padrões gasosos para calibração

Um passo difícil de ultrapassar quando se estudam compostos em fase gasosa é a preparação de padrões para calibração. As soluções gasosas de concentração conhecida obtidas a partir de compostos líquidos à temperatura e pressão ambiente são necessariamente muito diluídas em relação aos compostos na fase líquida de partida, o que acarreta erros de diluição elevados. Por outro lado, o volume dos gases e vapores varia acentuadamente com a pressão e com a temperatura, ao contrário do que acontece nas fases condensadas.

Cada um dos padrões foi preparado colocando 4,0 mL (micropipeta Gilson de 5000 µL) num frasco de vidro de 22 mL, (SUPELCO, Ref. 27173), fechado de seguida hermeticamente com um septo de politetrafluoretileno (PTFE)/silicone também da Supelco. Em seguida o frasco foi colocado num banho termostático a 30ºC, ficando a estabilizar durante pelo menos 30 minutos, para estabelecimento do equilíbrio entre a fase líquida e a fase de vapor.

Depois de estabelecido o equilíbrio líquido/vapor no frasco que continha cada um dos padrões, recolhia-se do *headspace* do frasco um volume de gás previamente seleccionado, com a seringa de gases (Supelco - 22268, de 25µL ou 250 µL de capacidade) por meio da tampa provida de septo. Para tal, a seringa era deixada no frasco, durante 2 minutos com o êmbolo na posição desejada. Seguidamente, colocava-se (através do septo) esse volume de gás no interior do saco de gases que já continha o fumo de cigarro, sendo o saco deixado numa sala a 22ºC. Após estabilização de cerca de 3 minutos, iniciava-se a exposição da fibra à mistura gasosa existente no interior do saco.

O cálculo da concentração adicionada foi feito como descrito mais à frente, na secção 2.7.1.

2.5.2. Calibração usando fibras de SPME

O fumo de cigarro é uma matriz muito complexa, pelo que inicialmente se optou pelo método de calibração por adição de padrão. Contudo, após vários ajustes de método utilizado, impunha-se averiguar se o efeito de matriz era de facto sentido. Desta forma, foi também realizada calibração externa para comparar os declives obtidos por este método e por adição de padrão. Em qualquer um dos casos os padrões foram preparados e injectados com descrito em 2.5.1.

2.5.2.1. Adição de padrão

Na calibração por adição de padrão começou-se por recolher a fase gasosa do fumo inalável de um cigarro no saco de gases e em alguns casos foi também adicionado diazoto para diluição, seguindo-se as sucessivas adições de padrão. Antes de iniciar a adição de padrão e entre cada adição de padrão a fibra era exposta no interior do saco durante 5 minutos, procedendo-se de seguida a desadsorção e análise por GC-MS. Para cada amostra de fumo de cigarro, assim como para cada adição de padrão efectuada, realizavam-se duas

medições independentes, a partir de uma mesma mistura gasosa presente no interior do saco de gases.

2.5.2.2. Calibração externa

Para efectuar uma calibração externa, foram injectados diferentes volumes (25 µL, 50 µL, 75 µL, 100 µL) de cada um dos padrões, na forma de vapor, num saco de gases de 5 L contendo 1,9 L de diazoto. O diazoto era deixado a passar para dentro do saco durante rigorosamente 8 minutos, com um fluxo de 234 mL/min. A fibra era exposta no interior do saco durante 5 minutos, procedendo-se de seguida a desadsorção e análise por GC/MS. Antes de se injectar um novo volume de padrão, procedia-se à descontaminação do saco (descrito em 2.4.2) seguindo-se o procedimento de recolha de diazoto e nova injecção de padrão. Para cada adição de padrão efectuada ao diazoto, realizavam-se duas medições independentes, a partir de uma mesma mistura gasosa presente no interior do saco de gases.

2.5.3. Calibração usando tubos com adsorvente

Este é um método desenvolvido e optimizado durante um trabalho de doutoramente,[9] diariamente utilizado no laboratório onde foi realizado este estudo e sujeito regularmente a programas de intercalibração. Como tal, seguiu-se o procedimento habitual associado ao método.

Inicialmente, uma solução líquida de mistura de padrões foi previamente preparada por pesagem rigorosa (balança Mettler Toledo, modelo AG245, sensível aos 0,01 mg) dos compostos, em balão volumétrico, e com diluição em metanol. A concentração da solução foi de 2000 µg/mL (concentração individual de cada um dos compostos na mistura).

Um volume de 1 µL de mistura de calibração era injectado num tubo de adsorção, usando uma seringa Hamilton de 10 µL. Seguidamente os tubos eram purgados com diazoto, durante 2 ou 3 minutos. O sentido da passagem de gás no tubo era o mesmo da amostragem. Os tubos com a mistura de calibração eram depois processados como os que continham as amostras.

2.6. Análise química

2.6.1. SPME – GC/MS

As amostras recolhidas por SPME foram analisadas num cromatógrafo gasoso (Varian, modelo 3900) acoplado com um espectrómetro de massa (Varian, modelo 2100 T). O cromatógrafo estava equipado com um injector para SPME e uma coluna de separação (Varian, CP-SIL 8 CB low bleed/MS), com 60 m de comprimento, 0,250 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme. O gás de arraste foi o hélio (99,9999%), a uma pressão interna de 1 bar. A temperatura da *trap* foi de 180ºC e a da linha de transferência foi de 200ºC. Na Tabela 2.2 são apresentadas as características do método usado.

Tabela 2.2. Características do método usado no GC/MS.

Fluxo do gás de arraste	1,0 mL/min
Temperaturas da coluna	40ºC durante 3,75 min
	40ºC até 160ºC, 20ºC/min
Temperatura do injector	240ºC (*split* com uma razão de repartição de
	5 desde o inicio da desasorção)
Tempo total de corrida	12,75 min
Intervalo de aquisição de massas	40 – 120 m/z

O equipamento GC/MS era, antes de cada dia de trabalho, verificado e ajustado. Para se verificar e ajustar o detector era realizado um *auto-tune*. Durante este procedimento o aparelho verificava a razão ar/água, calibrava a armadilha de iões, ajustava o multiplicador de electrões e calibrava o sistema de determinação de massas através de um gás de calibração.

No processo de cálculo das áreas dos picos contemplou-se todos os iões adquiridos (entre 40 e 120 m/z) no respectivo tempo de retenção, sendo a única excepção o cálculo da área do pico cromatográfico correspondente ao m/p-xileno. No caso do m/p-xileno, observou-se desdobramento do pico cromatográfico o que levou à necessidade da eliminação de interferentes. Para tal, forneceu-se ao computador a razão massa/carga que deveria ser usada nos cálculos, tendo o programa usado, dos dados armazenados, apenas aqueles que interessava considerar (neste caso a intensidade dos sinais para 91 u.m.a, por corresponder ao sinal mais intenso no respectivo espectro de massa) e desprezando os restantes. O cromatograma era então refeito, bem como o cálculo das áreas dos picos.

2.6.2. Tubos com adsorvente – GC/MSD

Quando as espécies a determinar foram amostradas em tubos adsorventes usou-se um sistema de desadsorção térmica / pré-concentração, da marca DANI, modelo SDT 33.50, acoplado a montante de um cromatógrafo gasoso de marca Agilent Technologies, modelo 6890N, com um detector selectivo de massa (MSD 5973).

No processo de desadsorção térmica da amostra, durante o período de aquecimento (10 min) o tubo onde os analitos estavam adsorvidos era atravessado por um fluxo de hélio que arrastava os analitos para um pré-concentrador que se encontrava à temperatura de -35ºC, onde eram concentrados. A amostra era depois aquecida a 300ºC e arrastada por um fluxo de hélio, através de uma linha de transferência aquecida a 250ºC, para o injector do cromatógrafo. Após cada injecção, todo o sistema era descontaminado por um fluxo de hélio em contracorrente (*backflush*) a uma temperatura 20ºC superior à temperatura de injecção, de modo a minimizar riscos de contaminação entre amostras. Os valores dos parâmetros ajustáveis no sistema constam na Tabela 2.3.

O cromatógrafo gasoso utilizado estava equipado com um injector do tipo *split/splitless*, regulado para um razão de *split* de 1:50 (de 50 mL de fluxo total da amostra injectada, 1 mL é introduzido na coluna, uma parte alimenta o *backflush,* e os restantes 40 mL dividem-se entre o fluxo de *split* e o fluxo de purga do injector.

A coluna usada era capilar e apolar, com fase sólida de 100% polissiloxano, referência PONA, diâmetro interno 0,2 mm, espessura do filme de 0,50 μm e comprimento de 50 m.

A informação obtida com o detector selectivo de massa (MSD) foi utilizada na identificação dos compostos estudados. O MSD corria em varrimento contínuo (modo SCAN). A identificação dos compostos baseava-se na comparação com espectros de massa da biblioteca do MSD (ca. 75000 espectros).

Tabela 2.3. Parâmetros usados no sistema analítico, para amostras recolhidas em tubos com adsorvente.

		Temperatura (ºC)	Tempo (minutos)	Fluxo (mL/minuto)
SDT				
	Desadsorção	260	10	10
	Pré-concentração	-35	10	10
	Injecção	300	5	10
	Backflush	320	25	2
GC				
Injector		250		
Forno				
	Valor inicial	40	5	
	Rampa	6ºC/min	40	
	Valor final	280	5	
MSD		280		

2.7. Cálculos

2.7.1. Concentrações de padrão adicionadas

Para calcular as concentrações dos padrões gasosos adicionados de cada uma das vezes à amostra, começou-se por estimar a pressão vapor de cada padrão à temperatura em que se encontravam os padrões (banho termostático) por interpolação na curva: $P_{vaporA}=f(temperatura)$, a partir de dados da literatura[10] (Figura 2.7).

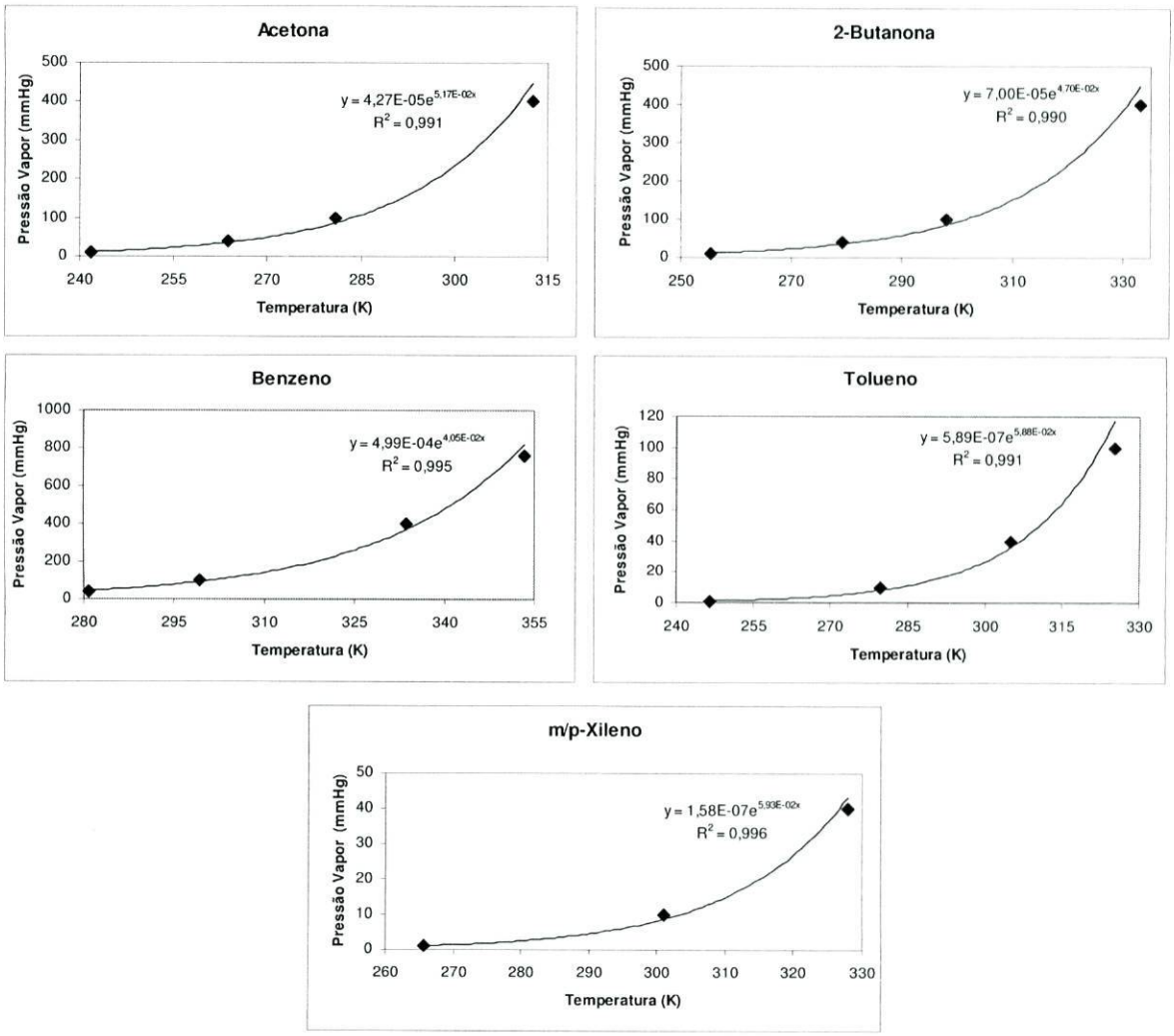


Figura 2.7. Representação gráfica da pressão vapor em função da temperatura para cada um dos compostos utilizados.[10]

Através da equação dos gases perfeitos, estimou-se o número de moles, de cada composto (A) injectado no saco (equação 2.1).

$$n_A = \frac{P_{vaporA} \times V_{seringa}}{RT} \qquad 2.1$$

Sendo que n_A é o número de moles do composto A, P_{vaporA} é a pressão vapor do composto A (atm), $V_{seringa}$ é o volume medido na seringa (dm^3), R é a constante dos gases perfeitos (0,082057 atm dm^3 mol^{-1} K^{-1}) e T é a temperatura em K.

A partir do número de moles e massa molecular de cada padrão calculou-se a massa adicionada.

2.7.2. Parâmetros das rectas de calibração[11,12]

O declive (m) e a ordenada na origem (b) foram calculados para cada uma das rectas de regressão de y em x, y = mx + b, aplicando o método dos mínimos quadrados:

$$m = \frac{\sum_i \left[\left(x_i - \bar{x}\right) \cdot \left(y_i - \bar{y}\right)\right]}{\sum_i \left(x_i - \bar{x}\right)^2} \qquad 2.2$$

$$b = \bar{y} - m \cdot \bar{x} \qquad 2.3$$

Sendo x_i os valores individuais de concentração, y_i valores individuais de sinal instrumental, $\bar{x}$ a média de valores de x (concentração dos padrões utilizados), e $\bar{y}$ a média dos valores de y (sinal instrumental).

Os coeficientes m e b são uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual da recta ($S_{y/x}$) da regressão:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i \left[y_i - \left(mx_i + b\right)\right]^2}{n-2}} \qquad 2.4$$

Sendo que n corresponde ao número de pontos marcados na recta. Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração.

Os desvios padrão do declive m e da ordenada na origem b são dados por:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i \left(x_i - \bar{x}\right)^2}} \qquad 2.5$$

$$S_b = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_i x_i^{\,2}}{n \cdot \sum_i \left(x_i - \bar{x}\right)^2}} \qquad 2.6$$

O limite de detecção (L.D.) do método, definido[12] como teor mínimo medido a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável, foi calculado tal como se apresenta na equação 2.7.

$$L.D. = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{m} \qquad 2.7$$

Sendo que $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e m é o declive da mesma recta (atrás definido).

O limite de quantificação (L.Q.) corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão e precisão.[12] O seu cálculo foi efectuado como se apresenta na equação 2.8.

$$L.Q. = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{m} \qquad 2.8$$

Os níveis dos diferentes compostos presentes no fumo de cigarro foram determinados por adição padrão, sendo que a concentração na amostra corresponde ao valor de intercepção da recta com o eixo dos xx. O desvio padrão estimado para uma concentração qualquer x_e é dado por:

$$S_{xe} = \frac{S_{y/x}}{m} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{m^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \qquad 2.9$$

2.7.3. Tratamento dos resultados[11,12]

Os níveis dos diferentes compostos foram apresentados como uma média, $\bar{x}$, resultante de várias repetições (equação 2.10).

$$\bar{x} = \sum_i \frac{x_i}{n} \qquad 2.10$$

Associado a essa média está um desvio padrão, s, (equação 2.11) assim como um intervalo de confiança, μ (equação 2.12).

$$s = \sqrt{\sum_i \frac{\left(x_i - \bar{x}\right)^2}{(n-1)}} \qquad 2.11$$

$$\mu = \bar{x} \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right) \qquad 2.12$$

O valor de t depende dos graus de liberdade (n-1) e do nível de significância pretendido. Nas determinações realizadas utilizou-se um nível de confiança de 95%.

2.7.4. Comparação de médias através da aplicação do teste t [11,12]

Durante o trabalho foram, feitas comparações estatísticas de médias obtidas usando métodos diferentes sendo, para isso, aplicado o teste t. Este teste pressupõe a comparação entre dois valores de t, o t experimental designado por t_{exp} (em valor absoluto), e o t tabelado designado por t_{tab}, sendo tomado como critério de aceitação: $t_{exp} \leq t_{tab.}$ Ou seja, conclui-se estatisticamente que os resultados provenientes dos dois métodos não apresentam desvios significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab}.

Na prática, calculam-se as médias dos resultados das réplicas ($\bar{x}_{m1}$ e $\bar{x}_{m2}$) e respectivos desvios padrão associados (s_{m1} e s_{m2}) para cada método. De seguida, faz-se uma análise de variâncias afim de verificar se existem ou não diferenças significativas entre as variâncias obtidas pelos dois métodos (s^2_{m1} e s^2_{m2}). Para isso comparam-se os valores de F_{exp} com os valores tabelados da distribuição F de Snedecor/Fisher para (n-1) graus de liberdade, sendo que:

$$F_{\exp} = \frac{s^2_{m1}}{s^2_{m2}}, \text{ sendo } s^2_{m1} > s^2_{m2} \qquad 2.13$$

Quando $F_{exp} < F$ de Snedecor/Fisher, calcula-se o t_{exp} do seguinte modo:

$$t_{\exp} = \frac{\bar{x}_{m1} - \bar{x}_{m2}}{s \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n_{m1}} + \frac{1}{n_{m2}}\right)}} \qquad 2.14$$

Sendo,

$$s^2 = \frac{(n_{m1} - 1) \cdot s^2_{m1} + (n_{m2} - 1) \cdot s^2_{m2}}{n_{m1} + n_{m2} - 2} \qquad 2.15$$

Compara-se o t_{exp} (em valor absoluto) com o t_{tab}, para um determinado grau de confiança e $n_{m1} + n_{m2} - 2$ graus de liberdade.

Por outro lado, quando $F_{exp} > F$ de Snedecor/Fisher, calcula-se o t_{exp} do seguinte modo:

$$t_{exp} = \frac{\bar{x}_{m1} - \bar{x}_{m2}}{\sqrt{\left(\frac{s^2_{m1}}{n_{m1}} + \frac{s^2_{m2}}{n_{m2}}\right)}} \qquad 2.16$$

Neste caso, a comparação entre o t_{exp} (em valor absoluto) com o t_{tab}, para um determinado grau de confiança, é feita com um número de graus de liberdade (GL) dado por:

$$GL = \left\{ \frac{\left[\left(s^2_{m1}/n_{m1}\right) + \left(s^2_{m2}/n_{m2}\right)\right]^2}{\left[\left[\frac{\left(s^2_{m1}/n_{m1}\right)^2}{n_{m1}+1} + \frac{\left(s^2_{m2}/n_{m2}\right)^2}{n_{m2}+1}\right]\right]} \right\} - 2 \qquad 2.17$$

Os resultados provenientes dos dois métodos não apresentam desvios estatisticamente significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab}.

Este teste foi também usado para comparar os declives obtidos por calibração externa e por adição padrão, para averiguar se existia efeito de matriz (declives estatisticamente diferentes confirmam o efeito de matriz). Para este fim foram usadas as mesmas equações apresentadas, sendo que os valores de $\bar{x}_{m1}$ e $\bar{x}_{m2}$ foram substituídos pelos valores do declive das rectas (b_1 *e* b_2) e os desvios padrão associados às médias (s^2_{m1} e s^2_{m2}) foram substituídos pelos desvios padrão associados a cada um dos declives (s_{b1} e s_{b2}).

Bibliografia

1. Borgwaldt KC Produkte. http://www.borgwaldt.de/cms/front_content.php?idart=37&idcat=35&lang=1 (08/03/2007)

2. Borgwaldt Technik GmbH. *Smoking Machine RM1/Plus - Operating Instructions*

3. Li, S.; Olegario, R. M.; Banyasz, J. L.; Shafer, K. H., Gas chromatography-mass spectrometry analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in single puff of cigarette smoke. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2003,** 66, (9), 155-163.

4. Darrall, K. G.; Figgins, J. A.; Brown, R. D.; Phillips, G. F., Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. *Analyst* **1998,** 123, (5), 1095-1101.

5. Adam, T.; Mitschke, S.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R., Quantitative puff-by-puff-resolved characterization of selected toxic compounds in cigarette mainstream smoke. *Chemical Research Toxicology* **2006,** 19, (4), 511-520.

6. Mitschke, S.; Adam, T.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R., Application of time-of-flight mass spectrometry with laser-based photoionization methods for time-resolved on-line analysis of mainstream cigarette smoke. *Analytical Chemistry* **2005,** 77, (8), 2288-2296.

7. Lee, J. H.; Hwang, S. M.; Lee, D. H.; Heo, G. S., Determination of volatile organic compounds (VOCs) using tedlar bag/solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry (SPME/GC/MS) in ambient and workplace air. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2002,** 23, 488-496.

8. CORESTA *Determinations of carbon monoxide in the vapour phase of cigarette sidestream smoke using a fishtail chimney and a routine analytical/linear smoking Machine.*; Método Padrão n.º 55; Centre de Cooperation pour les Recherches Scientifiques Relative au Tabac: 2002.

9. Silva, G. V. A. Estudo de emissões de COVs por materiais usados em interiores de edifícios. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2000.

10. Lide D, E., *Handbook of Chemistry and Physics*. 55 ed.; CRC Press, Inc.: Eleveland, 1974; p D-198 - D213.

11. Miller, J. C.; Miller, J. N., *Statistics for Analytical Chemistry*. 3 ed.; 1993.

12. Castro, A., *Guia Relacre 13, Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. Relacre: Porto, 2000.

3. Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Implementação do método analítico

3.2. Comparação de fibras de SPME com revestimentos de PDMS-DVB e de PDMS

3.3. Determinação dos níveis de alguns compostos no fumo inalável de cigarro por SPME/GC-MS

3.4. Utilização de um método de amostragem alternativo

3.5. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com outros da literatura

Bibliografia

3.1. Implementação do método analítico

Este trabalho incidiu fundamentalmente na determinação de benzeno e alguns dos seus derivados alquilados, designadamente tolueno e m/p-xileno, por serem muito nocivos para o Homem e por se dispor de meios para determinação de COVs em amostras gasosas. Inicialmente tentou-se determinar também níveis de etilbenzeno. No entanto, este composto apresentava um sinal de intensidade muito baixa quando comparado com os restantes compostos estudados, o que impedia a determinação dos quatro analitos numa mesma análise, por exigir graus de diluição diferentes. Deste modo, optou-se por não determinar etilbenzeno. O método foi posteriormente alargado à determinação de acetona e 2-butanona. Embora a fibra de SPME usada não fosse a mais adequada para cetonas por não ter grande afinidade para estes compostos, como os níveis eram relativamente elevados, não impediu a respectiva quantificação.

Quando se iniciou este estudo não havia experiência prévia sobre caracterização de fumo de tabaco e as informações na literatura sobre o tema eram escassas e referentes a equipamentos e outros meios analíticos diferentes dos disponíveis no laboratório onde este trabalho foi desenvolvido. Assim sendo, na primeira parte do trabalho foi necessário encontrar um método de amostragem de fumo de cigarro eficaz e compatível com o processo de SPME/GC-MS que se pretendia utilizar na análise.

Nas secções que se seguem descrevem-se os procedimentos adoptados e os resultados a que eles conduziram.

3.1.1. Estabelecimento da quantidade de fumo a recolher

Começou-se por recolher o fumo de 6 cigarros (de marca *A*) para um saco de gases de 2 L. A fibra de SPME (com revestimento de PDMS-DVB) foi exposta ao fumo no interior do saco, durante 15 minutos, e os compostos adsorvidos analisados por GC-MS. O tempo de desadsorção térmica dos COVs a partir da fibra foi fixado em 8 minutos, depois de se ter verificado que este tempo era suficiente para garantir a desadsroção quantitativa dos compostos previamente adsorvidos (não detecção cromatográfica de analitos adsorvidos nos ensaios a branco da fibra). Usou-se um *split* com uma razão de repartição de 15 só a partir dos 6 minutos. Até esse instante a válvula de *split* foi mantida fechada (*split* 0). Constatou-se que, com este procedimento, o espectro de massa da zona correspondente ao tempo de

retenção do tolueno não correspondia ao espectro característico desse composto (no espectro de massa na Figura 3.1 estão assinalados com uma seta os picos não característicos), o que terá resultado da presença de substâncias interferentes e muito provavelmente da saturação do detector de massa, devido à elevada quantidade de tolueno presente na amostra.

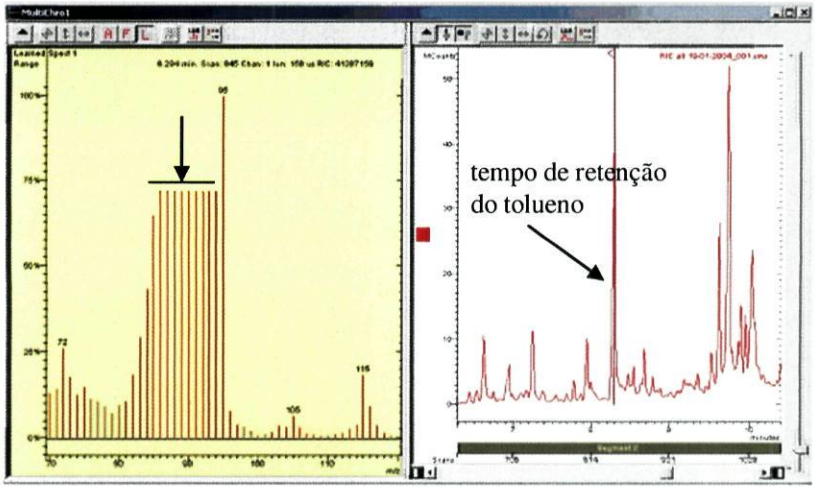


Figura 3.1. Cromatograma referente ao fumo de 6 cigarros recolhido num saco de gases de 2 L onde uma fibra de SPME foi exposta durante 15 minutos e espectro de massa da zona correspondente ao tempo de retenção do tolueno.

Para tentar identificar a origem do problema, preparou-se uma amostra menos concentrada recolhendo apenas o fumo de um cigarro para um saco de gases de 0,6 L, e expondo a fibra de SPME ao fumo apenas 10 minutos. Apesar da concentração do fumo e do tempo de exposição da fibra serem inferiores às anteriores, no espectro de massa da zona correspondente ao tempo de retenção do tolueno continuaram a surgir picos não característicos desse composto (Figura 3.2).

Procedeu-se, então, à diluição em diazoto até 2 L (capacidade do saco de gases) do fumo de um cigarro e expôs-se a fibra de SPME à mistura durante 10 minutos. O problema permaneceu (Figura 3.3).

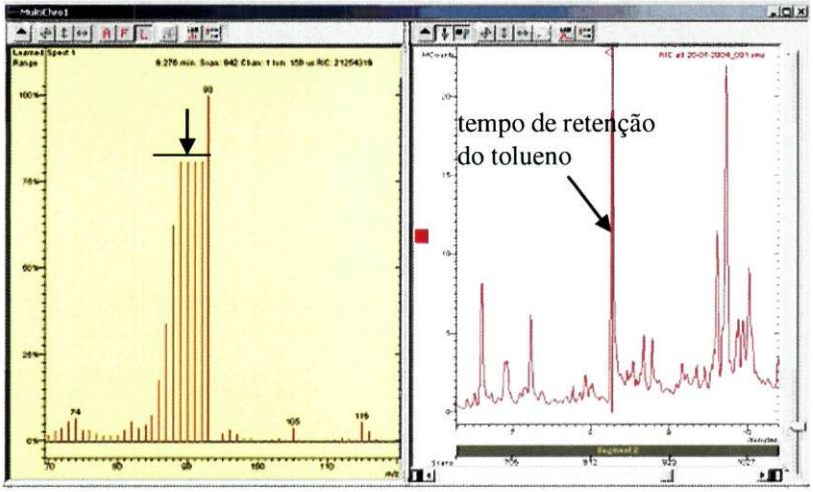


Figura 3.2. Cromatograma referente ao fumo de 1 cigarro recolhido num saco de gases de 0,6 L onde uma fibra de SPME foi exposta durante 10 minutos, e o espectro de massa da zona correspondente ao tempo de retenção do tolueno.

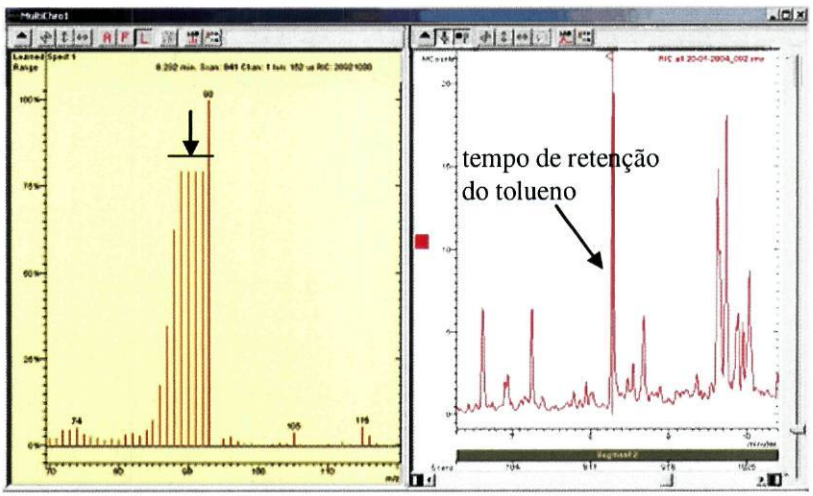


Figura 3.3. Cromatograma referente ao fumo de 1 cigarro recolhido num saco de gases de 2 L, que foi de seguida enchido com diazoto e onde a fibra de SPME foi exposta 10 minutos e espectro de massa da zona correspondente ao tempo de retenção do tolueno.

Realizou-se uma nova experiência usando o *split* do cromatógrafo com uma razão de repartição de 5 desde o início da desorção térmica dos analitos a partir das fibras de SPME, de modo a diluir a amostra que era sujeita a análise. A amostra de fumo de cigarro foi recolhida num saco de 1 L e não foi adicionado azoto. Desta forma, os picos não característicos deixaram de se evidenciar, tal como mostra a Figura 3.4.

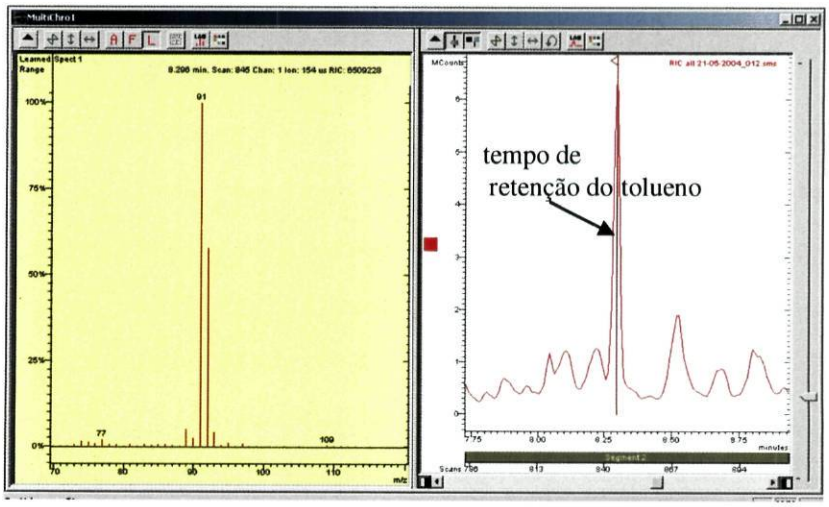


Figura 3.4. Cromatograma referente ao fumo de 1 cigarro recolhido num saco de gases de 1 L, onde foi exposta uma fibra de SPME durante 10 minutos. Na análise cromatográfica, foi usado *split* com uma razão de repartição de 5.

Considerou-se então que o tolueno (e possivelmente os outros analitos) do fumo inalável de cigarro podiam ser eficazmente detectados fazendo a recolha do fumo de um cigarro para um saco de 1 L, seguindo-se extracção por SPME e análise por GC-MS (usando *split* com uma razão de repartição de 5). Porém, posteriormente verificou-se que para poder quantificar os compostos pretendidos seria necessário proceder a uma diluição da amostra com diazoto, uma vez que só desta forma se obtinha uma resposta linear no intervalo pretendido, usando o método de adição de padrão.

3.1.2. Estabilidade do fumo no interior do saco de gases

Os sacos de gases não são absolutamente estanques, tendo lugar fenómenos de efusão. Como a velocidade de efusão é inversamente proporcional à raiz quadrada da respectiva massa molar, a composição de uma mistura gasosa contida num saco de gases altera-se ao longo do tempo, enriquecendo-se nos compostos de massa molar mais elevada. Uma zona particularmente crítica em termos de efusão será o septo, se este já tiver sido perfurado em anteriores utilizações do saco. Impunha-se, por isso, averiguar a extensão das perdas por efusão a partir dos sacos usados neste trabalho, para avaliar se os sacos poderiam ser usados mais de uma vez. Para isso, utilizou-se um saco de gases já anteriormente usado (o septo tinha sido perfurado cerca de 30 vezes). Fez-se a recolha do fumo de um cigarro para o saco (seguindo-se adição de diazoto para diluição) e foi-se registando as áreas dos picos cromatográficos obtidos, ao longo do tempo, para os vários compostos, após sucessivas exposições de 10 minutos da fibra de SPME ao fumo. Usando uma fibra de

PDMS foram estudados os comportamentos do benzeno, do tolueno, do m/p-xileno, da acetona e da 2-butanona. O intervalo de tempo entre cada amostragem/análise foi de 20 minutos, tendo sido feita a última análise 420 minutos depois da recolha. De salientar que o ponto 0 minutos correspondeu ao tempo mínimo desde que se faz a recolha do fumo de cigarro até à remoção da fibra do interior do saco para a primeira análise.

Este teste mostrou que a mistura gasosa homogeneizou rapidamente, permitindo a extracção para a fibra poucos minutos após a recolha de fumo no saco de gases, uma vez que o sinal já estava praticamente estabilizado (Figura 3.5). A composição da mistura nos compostos em estudo manteve-se relativamente estável durante o dia de trabalho, mostrando que os sacos de gases usados são praticamente estanques nas condições usados neste estudo. As oscilações de intensidade de sinal, relativamente à média, não foram superiores a 16%. O desvio padrão relativo associado ao conjunto de medições (n = 22) foi superior para o benzeno (10%) e mínimo para a acetona e para o tolueno (5%), sendo que para a 2-butanona e para o m/p-xileno foi de 8%.

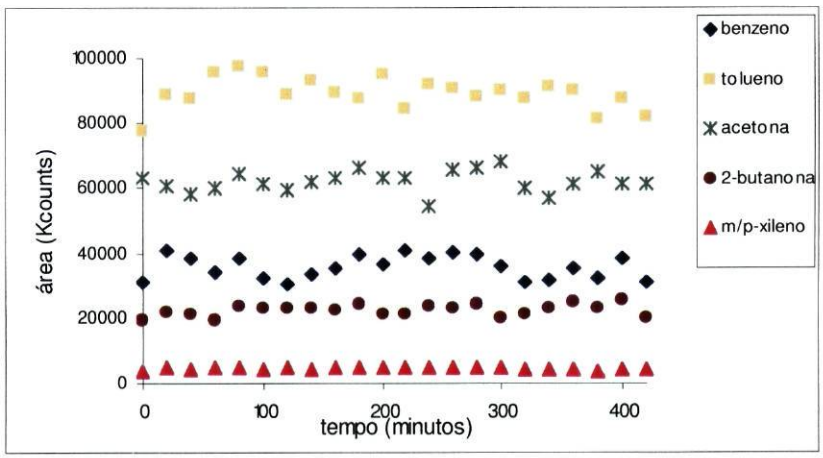


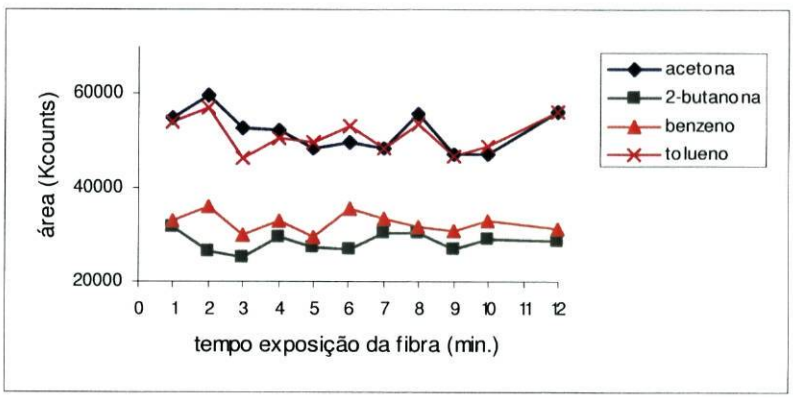
Figura 3.5. Variação das áreas dos picos obtidos por GC/MS em função do tempo, partir de fumo de cigarro armazenado um saco de gases (usando a fibra PDMS).

Estes resultados estão de acordo com um estudo realizado anteriormente numa atmosfera interior[1] que mostrou que os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) não apresentavam perdas importantes a partir de um saco de gases.

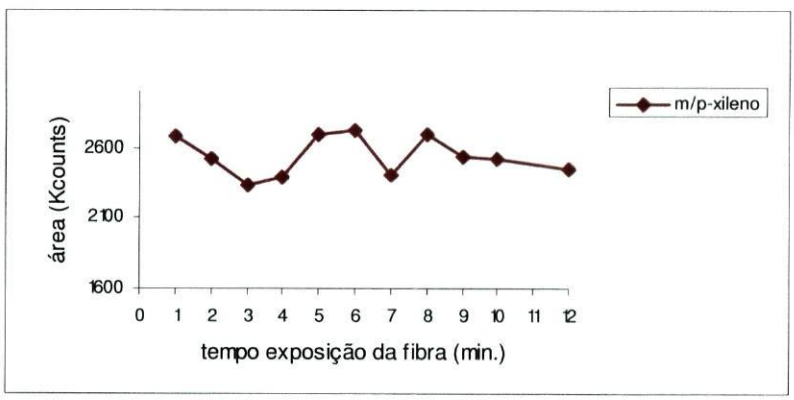
Com este estudo verificou-se também que o decaimento por absorção/adsorção sucessivas (de cada vez que a fibra de SPME era exposta) não teve influência na intensidade do sinal.

3.1.3. Tempo de exposição necessário para extracção por SPME

Com o objectivo de verificar qual o tempo mais adequado para extracção dos analitos do fumo para a fibra, expôs-se uma fibra quer de PDMS quer de PDMS-DVB por períodos de tempo diferentes ao fumo de um mesmo cigarro (diluído em diazoto). A Figura 3.6 ilustra para PDMS que, aparentemente, o equilíbrio era atingido logo ao fim de 2 a 3 min de exposição, uma vez que para tempos mais longos não se verificava aumento significativo de sinal analítico. Resultados semelhantes foram obtidos para a fibra de PDMS-DVB. O facto do equilíbrio ser atingido rapidamente é compreensível por se tratar de uma amostra gasosa e, como tal, ocorrerem correntes de convecção que facilitam o estabelecimento do equilíbrio. Um outro estudo[2] em que foi usada também uma fibra de PDMS (100 μm de espessura de filme) exposta a uma mistura gasosa (benzeno, tolueno, etilbenzeno, p-xileno, o-xileno, α-pineno e 1,3,5-trimetilbenzeno) de 34 μg/L de cada composto a 298K, o tempo de equilíbrio foi de 60 segundos para benzeno e para tolueno e de 90 segundos para p-xileno, o que é compatível com os presentes resultados.



(A)



(B)

Figura 3.6. Variação das áreas dos picos obtidos por GC/MS em função do tempo de exposição de uma fibra de PDMS ao fumo de um cigarro (diluído em azoto) armazenado um saco de gases, para (A) acetona, 2-butanona, benzeno e tolueno e (B) numa escala diferente para m/p-xileno.

As oscilações de intensidade de sinal, relativamente à média não foram superiores a 15%, sendo o desvio padrão relativo associado ao conjunto de medições (n = 11), máximo para acetona (8%) e mínimo para m/p-xileno (5%), sendo que para 2-butanona e para tolueno foi de 7% e para benzeno de 6%.

3.2. Comparação de fibras de SPME com revestimentos de PDMS-DVB e de PDMS

Antes de proseguir com os estudos decidiu-se averiguar qual das fibras PDMS ou PDMS-DVB seria mais adequada para o fim em vista. Para tal, começou-se por comparar os sinais obtidos com as duas fibras a partir de uma mesma amostra e nas mesmas condições. Constatou-se (Figura 3.7) que os sinais obtidos usando a fibra de PDMS eram muito menos intensos do que os obtidos usando uma fibra de PDMS-DVB.

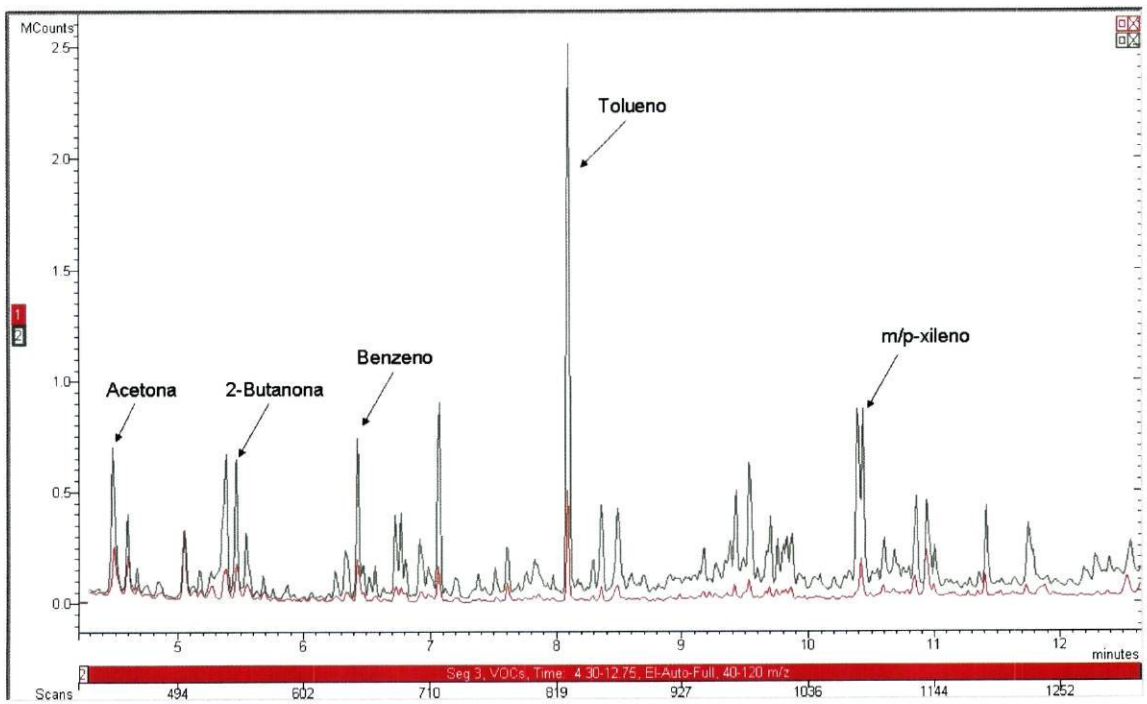


Figura 3.7. Comparação dos sinais obtidos na análise do fumo de um cigarro usando duas fibras de SPME diferentes: PDMS-DVB (a verde) e PDMS (a vermelho).

Estes resultados estão de acordo com uma observação anterior[3] em que a quantidade de COVs extraída por uma fibra de PDMS-DVB após 10 segundos de exposição era muito maior que a quantidade extraída por uma de PDMS após 10 minutos de exposição. Portanto, a fibra de PDMS-DVB permite maior sensibilidade. Pôs-se então a hipótese de passar a usar a fibra de PDMS-DVB e foi-se estudar a resposta quanto ao intervalo de resposta linear.

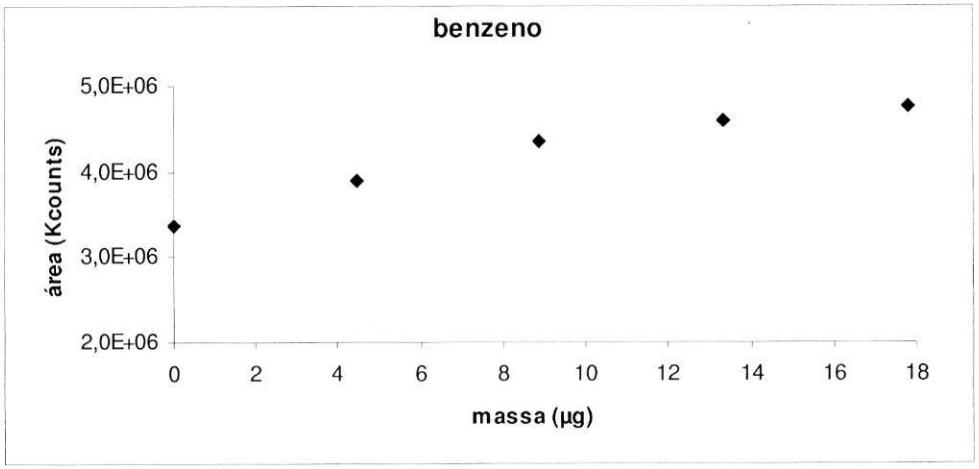
3.2.1. Avaliação das características de resposta do método SPME/GC-MS

Uma vez que o fumo de cigarro é uma amostra complexa susceptível de introduzir efeitos de matriz, optou-se por utilizar o método de adição de padrão para avaliar as características do método (calibração).

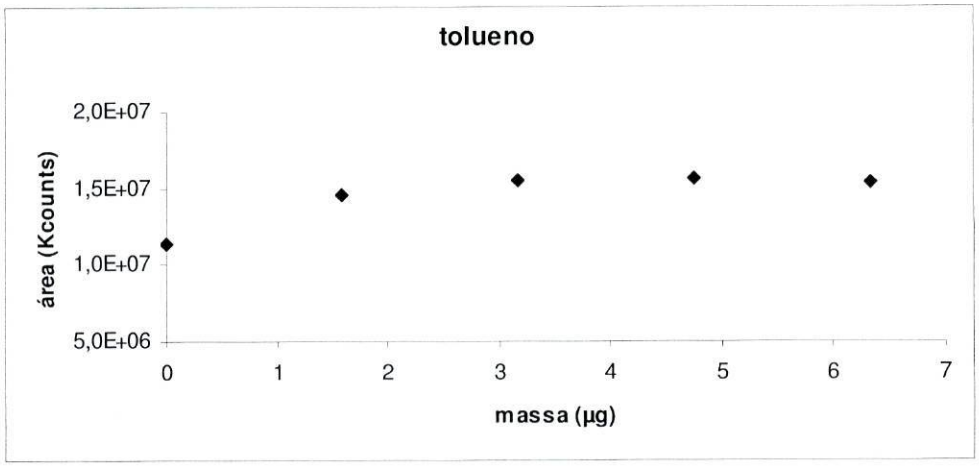
3.2.1.1. Fibra com revestimento de PDMS-DVB

Começou-se por estudar o método apenas para benzeno e tolueno. Para tal, usou-se fumo de um cigarro colocado num saco de gases de 1 L a que se adicionou sucessivos volumes de 10 µL de cada um dos padrões gasosos (equilíbrio gás/líquido existente no frasco, tal como descrito em 2.5.1). No final, o volume total adicionado de cada um dos padrões foi de 40 µL, correspondendo a uma massa de padrão adicionada de cerca de 18 µg para o benzeno cerca 6 µg para o tolueno. Os ensaios foram realizados em duplicado.

Como mostra a Figura 3.8 ocorreu saturação a partir da segunda adição para o benzeno e logo a partir da primeira adição para o tolueno. Para contornar este problema, repetiu-se o procedimento após diluição da amostra. Para tal, ao fumo de um cigarro diluído em 1 L de diazoto num saco de gases de 2 L adicionou-se, sucessivamente, volumes de 20 µL de padrão de cada um dos compostos em estudo na forma de vapor. Continuou a observar-se saturação da fibra logo após as primeiras adições (Figura 3.9).



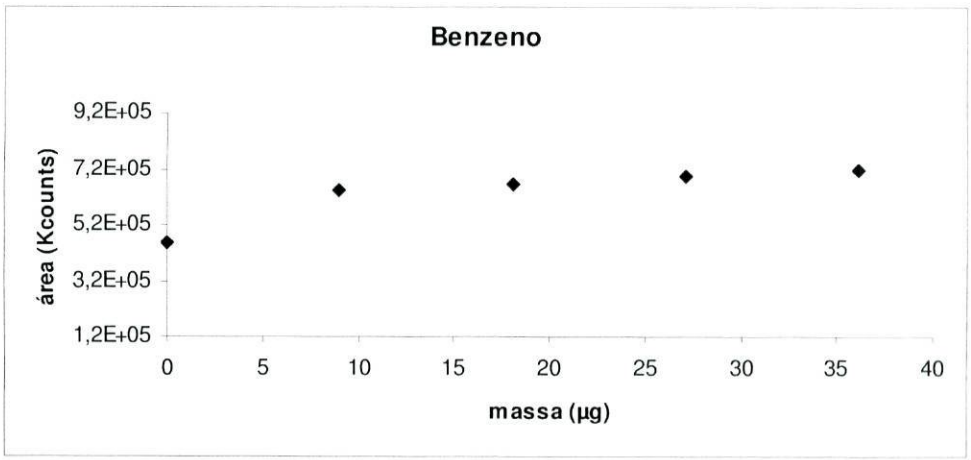
(A)



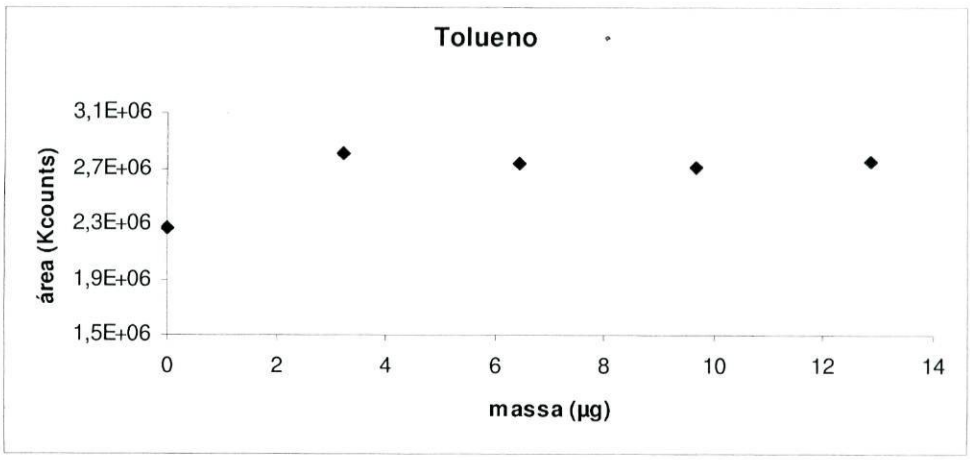
(B)

Figura 3.8. Curvas obtidas para (A) benzeno e (B) tolueno, usando uma fibra de PDMS-DVB, por adição de padrão à mistura contida num saco de gases de 1 L constituída pelo fumo de um cigarro.

Passou-se, então, a usar um saco de gases de 5 L enchido previamente com 3 L de diazoto. Foram feitas quatro adições de padrão de 20 µL de cada um dos padrões, na forma de vapor, os resultados obtidos são mostrados na Figura 3.10. Porém, continuou a ocorrer saturação da fibra, o que inviabilizava a aplicação do método.



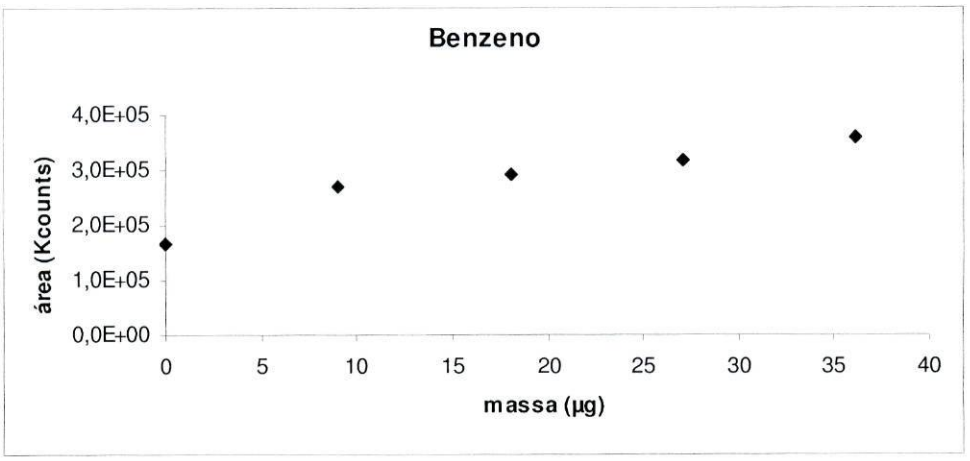
(A)



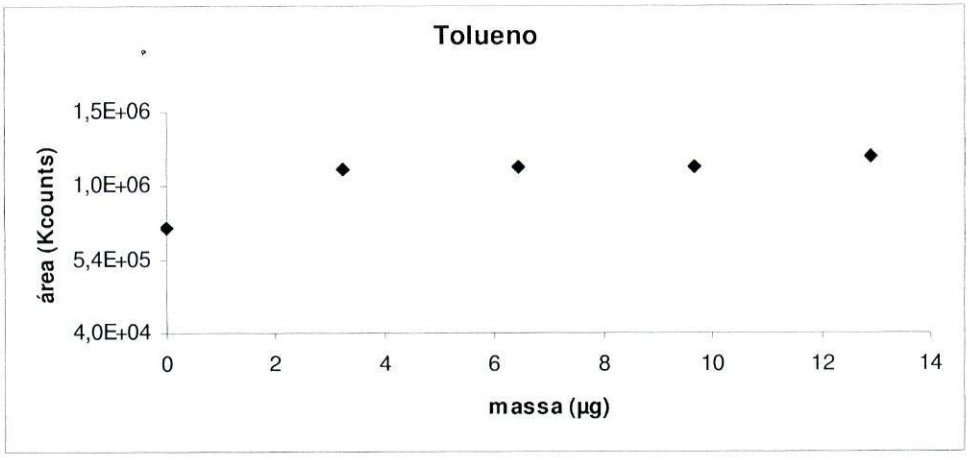
(B)

Figura 3.9. Curvas obtidas para (A) benzeno e (B) tolueno, usando uma fibra de PDMS-DVB, por adição de padrão à mistura gasosa, contida num saco de gases 2 L, constituída pelo fumo de um cigarro diluído em 1 L de diazoto.

Concluiu-se que a fibra com revestimento sólido de PDMS-DVB, que extrai compostos por adsorção à superfície da mesma, não seria adequada para este estudo e prosseguiu-se com uma fibra de PDMS.



(A)



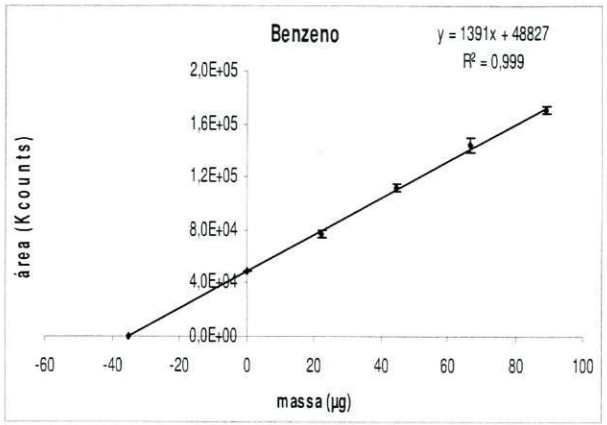
(B)

Figura 3.10. Curvas obtidas para (A) benzeno e (B) tolueno, usando uma fibra de PDMS-DVB, por adição de padrão à mistura gasosa contida num saco de gases de 5 L, constituída pelo fumo de um cigarro e diluído em 3 L de diazoto.

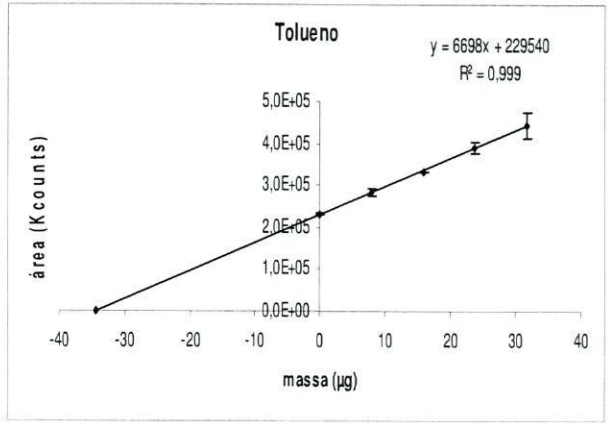
3.2.1.2. Fibra com revestimento de PDMS

Na fibra de PDMS o processo de extracção predominante é via absorção que é, geralmente, um processo não-competitivo. Isto significa que, teoricamente, a presença de outras moléculas orgânicas na matriz não deverá afectar a extracção dos compostos de interesse. No entanto, o processo de absorção não obedecerá a esta regra quando se estiver na presença de concentrações muito elevadas de interferentes.[4]

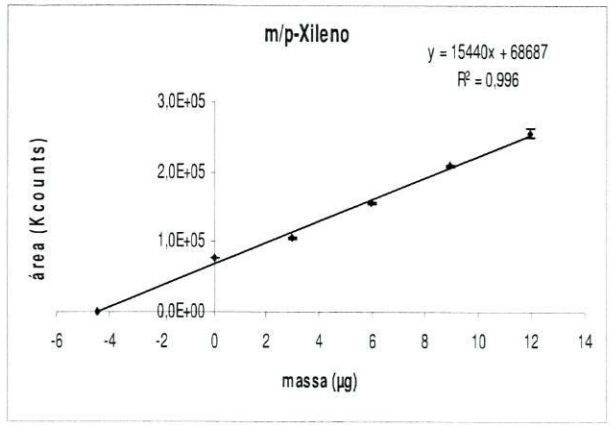
Para estudar a resposta da fibra de PDMS, a um saco de gases de 5 L contendo o fumo de um único cigarro diluído em 1,9 L de diazoto adicionou-se sucessivos volumes de 50 µL de padrão (como descrito em 2.5.2.1). Apesar de inicialmente a gama ser menos alargada, o método foi sendo optimizado sendo apresentadas na Figura 3.11 as rectas obtidas após quatro adições de 50 µL (gama usada para quantificação).



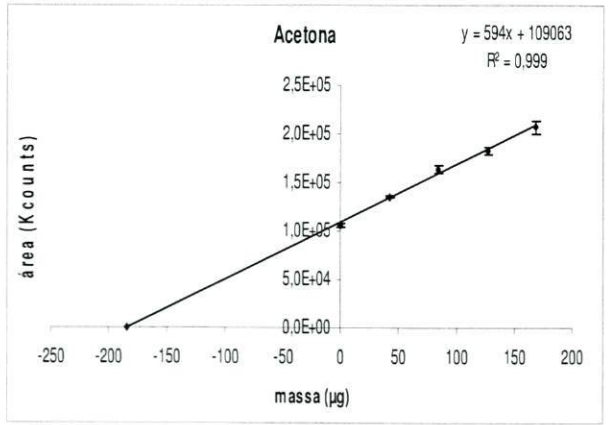
(A)



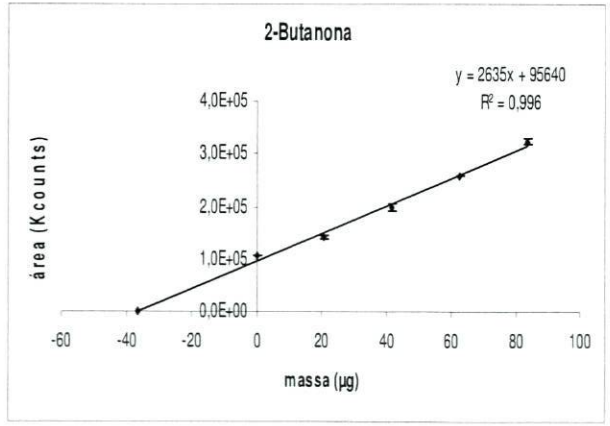
(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 3.11. Rectas obtidas, usando uma fibra de PDMS, por adição de padrão à mistura gasosa contida num saco de gases de 5 L, constituída pelo fumo de um cigarro, diluído em 3 L de diazoto, para (A) benzeno, (B) tolueno, (C) m/p-xileno, (D) acetona e (E) 2-butanona.
Apresentam-se também os desvios médios associados a cada medição.

O volume final de padrão adicionado foi de 200 µL o que corresponde a 89 µg para benzeno, 32 µg para tolueno, 12 µg para m/p-xileno, 168 µg para acetona e 83 µg para 2-butanona. A Figura 3.11 mostra que a resposta foi linear em todo o intervalo de concentrações usado, constando na Tabela 3.1 os parâmetros respectivos.

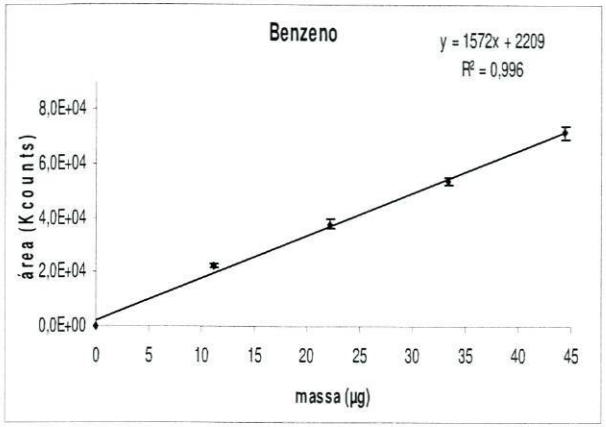
Tabela 3.1. Parâmetros das rectas de calibração obtidas por adição de padrão ao fumo de um cigarro para os diferentes compostos.

Analito	**declive ± desvio padrão ($\times 10^2$)**	**ordenada na origem ± desvio padrão ($\times 10^3$)**	**coef. de correlação (r)**	**Concentração ± intervalo de confiança (µg)**
Benzeno	13,9 ± 0,4	49 ± 1	0,999	35 ± 1
Tolueno	67 ± 1	230 ± 2	1,000	34,3 ± 0,2
m/p-Xileno	154 ± 8	69 ± 6	0,996	4,4 ± 0,3
Acetona	5,9 ± 0,2	109 ± 2	0,997	184 ± 2
2-Butanona	26 ± 1	96 ± 8	0,995	36 ± 2

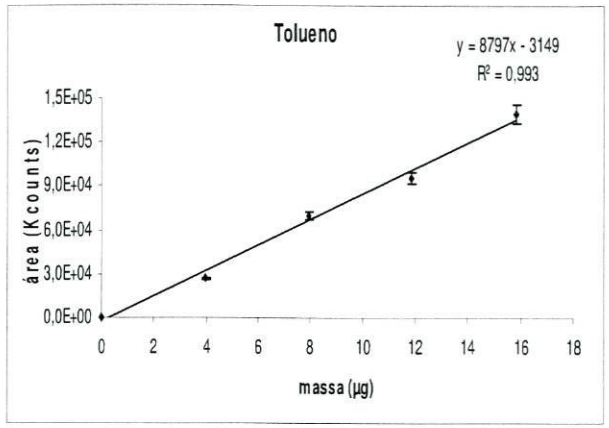
3.2.1.3. Calibração externa *vs.* adição de padrão

Para verificar se se estava na presença de efeitos de matriz que afectassem o declive realizaram-se também calibrações externas (com a fibra de PDMS) para comparar os declives das rectas obtidas por este método e por adição de padrão.

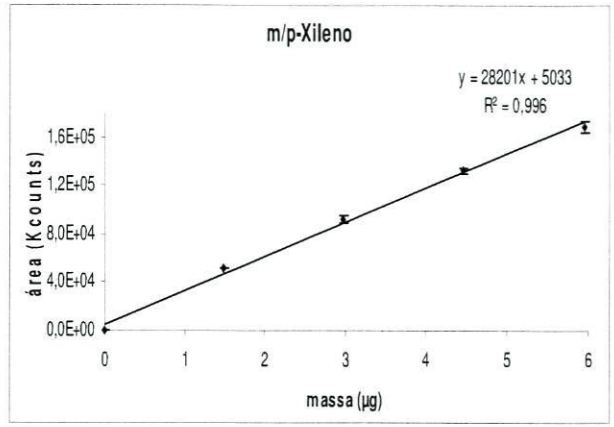
Para tal usaram-se soluções padrão na forma de vapor, sendo injectados volumes de 25 µL, 50 µL, 75 µL e 100 µL de cada um dos padrões num saco de gases de 5 L de capacidade, contendo 1,9 L de diazoto, tal como descrito em 2.5.2.2. A Figura 3.12 mostra os resultados obtidos.



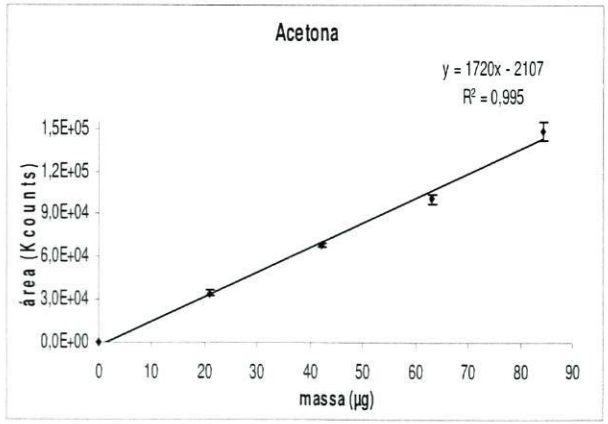
(A)



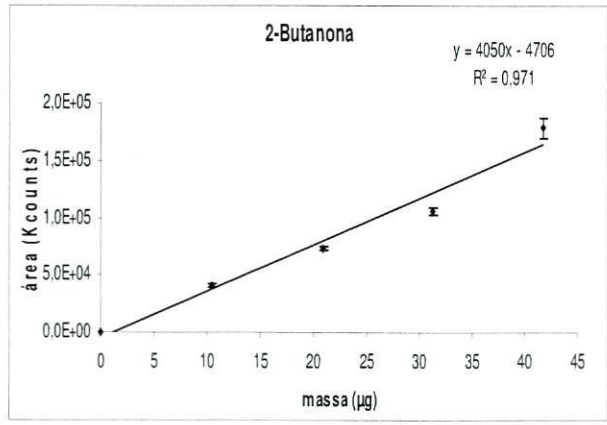
(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 3.12. Rectas obtidas com a fibra de PDMS por calibração externa, usando um saco de gases de 5 L com 1,8 L de diazoto, para (A) benzeno, (B) tolueno, (C) m/p-xileno, (D) acetona e (E) 2-butanona. Apresentam-se também os desvios médios associados a cada medição.

Para todos os compostos estudados a resposta foi linear no intervalo de concentrações testado, como seria de esperar com base nos resultados obtidos na presença do fumo de tabaco. Os parâmetros das rectas de calibração obtidas estão resumidos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Parâmetros das rectas de calibração externa obtidos para os diferentes compostos.

Analito	declive ± desvio padrão ($\times 10^2$)	ordenada na origem ± desvio padrão ($\times 10^2$)	coef. de correlação (r)	L.D. (µg)	L.Q. (µg)
Benzeno	15,7 ± 0,6	22 ± 17	0,998	4,1	13,5
Tolueno	88 ± 4	-32 ± 42	0,996	1,9	6,2
m/p-Xileno	282 ± 10	50 ± 37	0,998	0,51	1,7
Acetona	17,2 ± 0,7	-21 ± 38	0,997	8,5	28,3
2-Butanona	41 ± 4	-47 ± 104	0,985	9,9	33,1

Os declives das rectas obtidas por calibração externa foram comparados com os declives das rectas obtidas por adição de padrão. O teste F foi aplicado para comparar variâncias,[5] tendo-se verificado que as variâncias associadas aos declives, para um mesmo composto, não diferiam estatisticamente.

Aplicando o teste *t*,[5] verificou-se para todos os compostos que os declives das rectas obtidas por calibração externa e por adição padrão eram estatisticamente diferentes. Concluiu-se então, que existia efeito de matriz e, por esse motivo, adoptou-se a adição de padrão para método de calibração para caracterização do fumo de cigarro.

3.2.1.4. Repetibilidade dos resultados

No traçado de cada recta de calibração, realizavam-se duas medições independentes por ponto, a partir de uma mesma mistura gasosa presente no interior do saco de gases. No caso das soluções sintéticas (calibração externa) o desvio médio relativo observado para as diferentes concentrações de padrão foi sempre inferior a 6%. Na presença do fumo de cigarro, o desvio médio relativo observado para os diferentes compostos nunca excedeu os 7%.

As características de reprodutibilidade dos resultados serão apresentados e discutidos a seguir nas secções 3.3.1 e 3.3.2.

3.3. Determinação dos níveis de alguns compostos no fumo inalável de cigarro por SPME/GC-MS

Uma vez estabelecido o método para extracção e análise de alguns COVs (benzeno, tolueno e m/p-xileno) e COMVs (acetona e 2-butanona), passou-se à determinação dos níveis destes compostos em cigarros comerciais e de referência.

No que respeita a cigarros comerciais, o estudo incidiu sobre uma marca de cigarros americana, com filtro, muito conhecida na Europa, que será aqui designada por marca *A*.

Estudou-se também os cigarros de referência 2R4F produzidos pelo *Kentucky Tobacco Research & Development Center* da Universidade de Kentucky, para fins de investigação.

3.3.1. Cigarros comerciais

Foram realizados, em dias diferentes, ensaios independentes sendo cada amostra constituída pelo fumo de um único cigarro, diluído em 1,9 L de diazoto, num saco de gases de 5 L. Os diferentes compostos foram quantificados adicionando quatro alíquotas sucessivas de 50 µL de cada um dos padrões gasosos referentes aos compostos em estudo. Os resultados são apresentados na Tabela 3.3. Observaram-se concentrações da ordem das dezenas de µg/cigarro para benzeno, tolueno e 2-butanona e da ordem das centenas de µg/cigarro para a acetona. Os níveis mais baixos foram observados para m/p-xileno (9 µg/cigarro).

Tabela 3.3. Resultados (média e intervalo de confiança) observados em fumo inalável de cigarros de marca A, após extracção por SPME. Apresentam-se também os valores do desvio padrão (DP) e do desvio padrão relativo (DPR).

Composto (número de determinações independentes)	µg / cigarro		
	Média ± Int. conf.	D.P.	D.P.R. (%)
Benzeno (n=9)	44 ± 9	8	18
Tolueno (n=9)	26 ± 9	8	29
m/p-Xileno (n=5)	9 ± 4	2	27
Acetona (n=3)	155 ± 91	36	24
2-Butanona (n=5)	47 ± 26	19	41

Em termos de reprodutibilidade, os erros relativos foram relativamente elevados, principalmente para a 2-butanona, que é uma cetona para a qual a fibra de PDMS não é particularmente adequada. No entanto, deve-se notar que estes erros incluem a heterogeneidade natural da composição dos cigarros, que é relativamente grande, como tem sido amplamente discutido na literatura,[6] incluindo também o problema associado à máquina de fumar. De notar que os níveis apresentados foram determinados ao longo de 12 meses, implicando cigarros adquiridos em alturas diferentes, o que poderá também contribuir para uma maior variabilidade.

3.3.2. Cigarros de referência

A Tabela 3.4 mostra que, de um forma semelhante ao observado no fumo de cigarros de marca *A*, os níveis de concentração nos cigarros de referência 2R4F foram da ordem das dezenas de µg/cigarro para benzeno, tolueno e 2-butanona e das centenas de µg/cigarro para a acetona, sendo os níveis mais baixos associados ao m/p-xileno (8 µg/cigarro). Portanto, a composição dos dois tipos de cigarros estudados foi muito semelhante no que se refere aos compostos em estudo.

Quanto à reprodutibilidade, neste caso o número de ensaios efectuados não foi exactamente igual ao conseguido para os cigarros comerciais, pelo que os valores não são directamente comparáveis. Porém, os valores de DPR foram semelhantes para alguns compostos e mais baixos para a 2-butanona e tolueno. Mais uma vez, faz-se notar que a

heterogeneidade natural da composição dos cigarros deve ser tida em conta, sendo que neste caso os cigarros foram adquiridos numa mesma altura mas pertenciam a diferentes volumes.

Tabela 3.4. Resultados (média e intervalo de confiança) observados em fumo inalável de cigarros 2R4F, após extracção por SPME. Apresentam-se também os valores do desvio padrão (DP) e do desvio padrão relativo (DPR).

Composto (número de determinações independentes)	µg / cigarro		
	Média ± Int. conf.	D.P.	D.P.R. (%)
Benzeno (n=5)	41 ± 10	8	20
Tolueno (n=5)	40 ± 5	4	10
m/p-Xileno (n=6)	8 ± 2	2	28
Acetona (n=5)	172 ± 56	45	26
2-Butanona (n=4)	41 ± 6	4	10

3.4. Utilização de um método de amostragem alternativo

O método de adição de padrão corrige/elimina interferências de matriz que afectam o declive da recta de calibração, mas não garante a exactidão dos resultados. Efectivamente, se houver interferentes que em GC/MS apresentem um sinal sobreposto ao sinal do analito (o que implica idêntico tempo de retenção e fragmentações nos mesmos iões que são usados para a quantificação em MS) o resultado pode estar errado por excesso. Para detectar este tipo de erros é necessário dispor de amostras de referência do material em estudo, com concentração do analito certificada e/ou participação em programas de intercalibração em que diversos participantes usam métodos independentes. Nenhuma destas possibilidades existia para a análise de COV's e COMV's no fumo de cigarro. Assim sendo, procurou-se pelo menos efectuar também análises por um método alternativo que, usa um processo de extracção dos analitos bastante distinto: adsorção em Tenax TA contido num tubo de aço, que é depois sujeito a desadsorção térmica para análise por GC-MSD.

3.4.1. Resultados obtidos usando Tenax TA / GC-MSD

A recolha de COVs em Tenax TA é utilizada há bastante tempo no laboratório onde foi realizado este estudo e o método foi desenvolvido e optimizado durante um trabalho para doutoramento[7] com vista à determinação de COVs no ar interior, sendo sujeito regularmente a programas de intercalibração.

O Tenax TA é o adsorvente mais aconselhado para recolher compostos orgânicos não polares com pontos de ebulição entre 60 - 250ºC que correspondem aos compostos eluídos em cromatografia gasosa, usando uma coluna capilar apolar e um programa de temperaturas adequado, entre o hexano e o hexadecano[8] e que se designam por COV's. Quer a acetona quer a 2-butanona são eluidos (na coluna usada) antes do hexano, sendo por isso considerados compostos orgânicos muito voláteis (COMV's). No caso da acetona não se pode garantir a recolha efectiva em Tenax TA e por isso não foi quantificada. No caso da 2-butanona, que tem ponto de ebulição de 80ºC, optou-se por fazer a sua quantificação, uma vez que experiências anteriores evidenciaram resultados de qualidade aceitável.

As determinações, foram realizadas com base no factor de resposta do próprio composto. Nas tabelas 3.5 e 3.6 apresentam-se os níveis de cada um dos compostos determinados em diferentes amostras de cigarros da marca *A* e de cigarros 2R4F, respectivamente.

Tabela 3.5. Resultados (média e intervalo de confiança) observados em fumo inalável de cigarros de marca *A*, após adsorção em tubos com Tenax TA. Apresentam-se também os valores do desvio padrão (DP) e do desvio padrão relativo (DPR).

	µg / cigarro		
Composto (número de determinações independentes)	**Média ± int. conf.**	**D.P.**	**D.P.R. (%)**
Benzeno (n=6)	27 ± 8	6	21
Tolueno (n=6)	30 ± 7	7	24
m/p-Xileno (n=6)	5 ± 2	2	29
2-Butanona (n=7)	44 ± 7	8	18

Tabela 3.6. Resultados (média e intervalo de confiança) observados em fumo inalável de cigarros 2R4F, após adsorção em tubos com Tenax TA. Apresentam-se também os valores do desvio padrão (DP), do desvio padrão relativo (DPR).

Composto (número de determinações independentes)	µg / cigarro		
	Média ± int. conf.	D.P.	D.P.R. (%)
Benzeno (n=5)	35 ± 11	9	25
Tolueno (n=5)	32 ± 7	5	16
m/p-Xileno (n=6)	7 ± 3	3	46
2-Butanona (n=6)	47 ± 11	10	21

Da análise das Tabelas 3.5 e 3.6 pode-se concluir que a reprodutibilidade obtida com Tenax TA foi semelhante à obtida com SPME.

Mais uma vez se faz notar que os desvios padrão associados aos níveis dos diferentes compostos determinados no presente trabalho deverão contemplar não só os erros associados à calibração, amostragem e análises, mas também a variabilidade entre amostras de fumo de cigarro.

3.4.2. Comparação dos níveis determinados usando dois métodos de amostragem diferentes

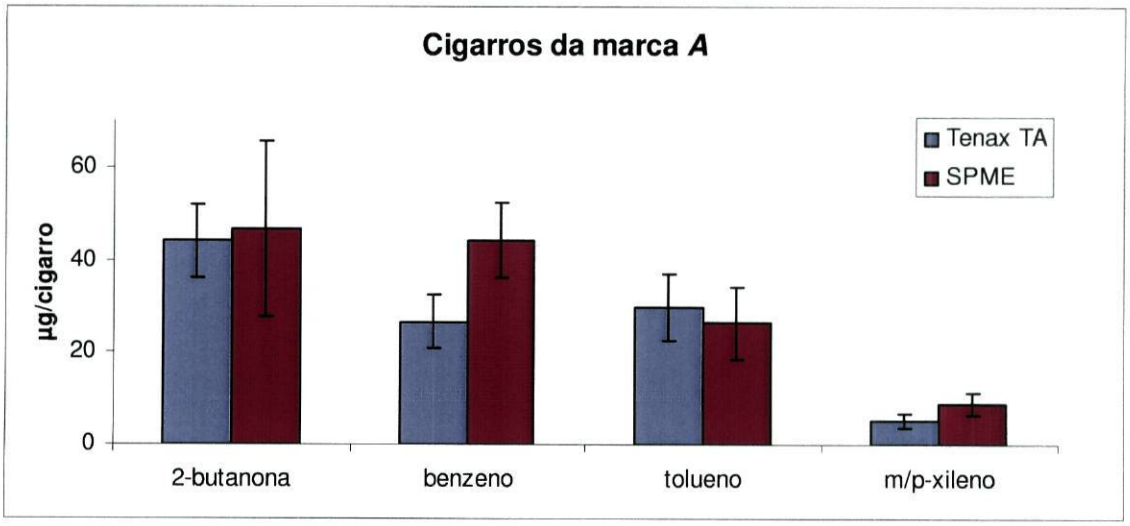
Na Tabela 3.7 comparam-se os níveis médios e respectivo desvio padrão de cada um dos compostos determinados no fumo inalável de cigarros comerciais e de referência usando os métodos de amostragem SPME e Tenax TA. Esta tabela e a Figura 3.13 mostram que as duas técnicas de extracção conduziram a níveis da mesma ordem de grandeza para cada um dos compostos estudados.

Tabela 3.7. Comparação dos resultados obtidos por dois métodos de extracção diferentes.

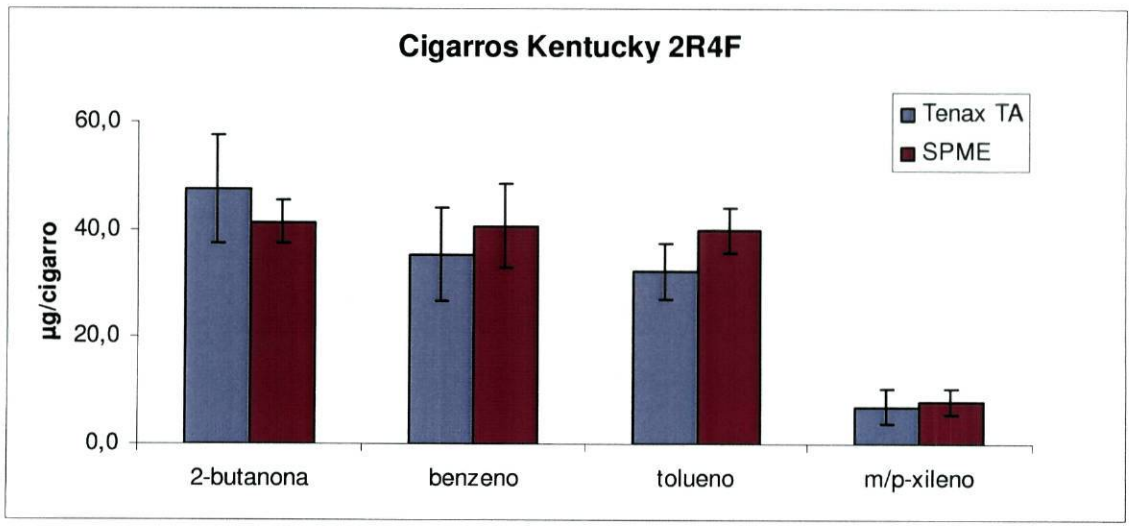
Composto	Média ± desvio padrão (µg/cigarro)							
	Marca *A*				2R4F			
	SPME	*Tenax*	t_{exp}	t_{tab}	*SPME*	*Tenax*	t_{exp}	t_{tab}
Benzeno	44 ± 8	27 ± 6	*4,65*	*2,16* (P=0,05) *3,01* (P=0,01)	41 ± 8	35 ± 9	*1,0*	*2,31* (P=0,05)
Tolueno	26 ± 8	30 ± 7	*0,87*	*2,20* (P=0,05)	40 ± 4*	32 ± 5*	*2,55*	*2,31* (P=0,05) *3,36* (P=0,01)
m/p-Xileno	9 ± 2	5 ± 2	*1,02*	*2,20* (P=0,05)	8 ± 2	7 ± 3	*0,56*	*2,23* (P=0,05)
2-Butanona	47 ± 19	44 ± 8	*0,11*	*2,23* (P=0,05)	41 ± 4	47 ± 10	*0,68*	*2,31* (P=0,05)

Nota: Os resultados estatisticamente diferentes encontram-se sombreados na tabela. Todos os restantes resultados foram estatisticamente iguais assumindo um nível de significância de 5%, excepto os marcados com * que só foram estatisticamente iguais assumindo um nível de significância de 1%.

Compararam-se estatisticamente as médias obtidas para as duas marcas de cigarros usando métodos diferentes. Segundo o teste t[5] apenas os níveis de benzeno em cigarros comerciais de marca *A* foram estatisticamente diferentes. Os resultados foram estatisticamente iguais a um nível de significância de 5%, para todos os outros compostos com excepção de tolueno em cigarros de referência que só foram considerados estatisticamente iguais a um nível de significância de 1%. De referir ainda que as variâncias associadas às médias foram estatisticamente iguais em todos os casos. Estes resultados sugerem que o método de extracção não introduzirá erros sistemáticos nos resultados.



(A)



(B)

Figura 3.13. Comparação dos níveis observados no fumo inalável de (A) cigarros da marca *A* e (B) cigarros de referência Kentucky 2R4F, usando as diferentes técnicas de extracção (Tenax TA e SPME). Incluíram-se os respectivos desvios padrão.

Apesar do método alternativo ter sido usado com o simples intuito de despistar possíveis erros sistemáticos, uma vez que os dois métodos de amostragem conduziram a resultados muito semelhantes, faz sentido avaliar as vantagens relativas de cada um deles. O uso de Tenax TA como adsorvente tem a vantagem de as amostras poderem ser armazenadas (no frigorífico) durante alguns dias, não tendo portanto de se efectuar a análise imediatamente a seguir à amostragem. Além disso, requer apenas calibração externa, o que permite a análise de um muito maior número de amostras por dia e é muito menos dispendioso do que SPME.

A SPME não implica a produção diária de resíduos de solvente, uma vez que a calibração pode ser feita retirando volumes de padrão gasoso (resultante do equilíbrio

gás/liquido) a partir de um mesmo padrão líquido. A SPME apresentou ainda a vantagem de permitir a análise simultânea dos COVs e dos COMVs estudados e não implicar a destruição da amostra. No caso do adsorvente em tubo, a amostragem de COMVs exigirá combinar vários adsorventes no enchimento.

3.5. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com outros da literatura

Existem vários estudos publicados onde constam resultados sobre a composição do fumo de cigarro no que se refere a alguns compostos orgânicos voláteis e muito voláteis. Na Tabela 3.8 compilaram-se alguns dos dados disponíveis para compostos que foram objecto de estudo neste trabalho.

Uma análise da tabela mostra que todos os resultados publicados para um mesmo composto foram da mesma ordem de grandeza, independentemente da marca e origem do cigarro e do método usado na sua determinação. Concretamente, os níveis médios de benzeno situaram-se entre 22 e 50 μg/cigarro, os de tolueno entre 34 e 88 μg/cigarro, os de 2-butanona entre 54 e 88 μg/cigarro e os de acetona entre 118 e 395 μg/cigarro. Quando comparados os resultados de diferentes estudos com os resultados obtidos no presente trabalho (para cigarros da mesma marca) observou-se que em alguns casos existiam diferenças estatisticamente significativas.

A dispersão de resultados para um mesmo composto em cigarros de uma mesma marca também foi relativamente elevada, não permitindo concluir que a composição do fumo inalável, no que respeita aos compostos estudados, seja distinta de marca para marca.

Sendo o tabaco um produto natural que cresce em diferentes locais do mundo, será de esperar uma variabilidade na sua composição dependente do local onde a planta é cultivada. Além disso, é também de esperar uma certa variabilidade sazonal na planta. O grau de empacotamento de cigarro para cigarro também poderá afectar os resultados independentemente da sua composição/origem. A diferença no grau de empacotamento de cigarro para cigarro também poderá afectar os resultados independentemente da sua composição/origem. Desta forma, é compreensível que em diferentes amostras de fumo de cigarro os níveis dos compostos que o constituem não sejam exactamente iguais, mesmo quando se trata de cigarros de uma mesma marca, sendo que as diferenças deverão ser

maiores para constituintes presentes em concentrações mais baixas[6] e nos mais voláteis, em que as perdas no processo analítico terão maior probabilidade de ocorrer.

Tabela 3.8. Níveis de benzeno, tolueno, m/p-xileno, acetona e 2-butanona medidos por diferentes autores no fumo inalável de cigarros de diferentes marcas.

µg/cigarro	Tipo de cigarro	Referência
	Benzeno	
41 ± 8	Cigarros de referência 2R4F	Presente trabalho
44 ± 8	Marca *A* (Portugal)	Presente trabalho
48 ± 2*	Cigarros de referência 2R4F	9
22 ± 2	Cigarros de referência 2R4F	10
50 ± 3*	Cigarros de referência 2R4F	11
44 ± 3*	Marca *A* (Europa)	12
42 ± 2	Marca *A* (Austrália)	12
27 ± 2	Marca *A* (Taiwan)	12
24 ± 1	Marca *A* (Japão)	12
44 ± 4	Cigarros comercializados no Reino Unido	13
	Tolueno	
40 ± 4	Cigarros de referência 2R4F	Presente trabalho
26 ± 8	Marca *A* (Portugal)	Presente trabalho
82 ± 4	Cigarros de referência 2R4F	9
37 ± 3**	Cigarros de referência 2R4F	10
88 ± 6	Cigarros de referência 2R4F	11
66 ± 6	Marca *A* (Europa)	12
63 ± 4	Marca *A* (Austrália)	12
37 ± 3	Marca *A* (Taiwan)	12
34 ± 3	Marca A (Japão)	12
61 ± 6	Cigarros comercializados no Reino Unido	13
	m/p-Xileno	
8 ± 2	Cigarros de referência 2R4F	Presente trabalho
9 ± 2	Marca *A* (Portugal)	Presente trabalho
10 ± 1	Cigarros comercializados no Reino Unido	13

Tabela 3.8. (Continuação) Níveis de benzeno, tolueno, m/p-xileno, acetona e 2-butanona medidos por diferentes autores no fumo inalável de cigarros de diferentes marcas.

µg/cigarro	Tipo de cigarro	Referência
	Acetona	
172 ± 45	Cigarros de referência 2R4F	Presente trabalho
155 ± 36	Marca *A* (Portugal)	Presente trabalho
206 ± 8*	Cigarros de referência 2R4F	14
262 ± 42	Cigarros de referência 2R4F	15
277 ± 20	Cigarros de referência 2R4F	11
148 ± 10*	Cigarros de referência 2R4F	10
291 ± 29	Marca *A* (Austrália)	12
203 ± 22	Marca *A* (Taiwan)	12
291 ± 18	Marca *A* (Europa)	12
257 ± 14	Marca *A* (Japão)	12
133[a] ± 24 – 395± 8[b]	Cigarros comercializados nos EUA	16
118[a] – 242[b]	Cigarros cedidos por "Technology Center of ChongQing Tobacco Industrial Company", China	17
	2-Butanona	
41 ± 4	Cigarros de referência 2R4F	Presente trabalho
47 ± 19	Marca *A* (Portugal)	Presente trabalho
73 ± 1#	Cigarros de referência 2R4F	14
54[a] – 88[b]	Cigarros cedidos por "Technology Center of ChongQing Tobacco Industrial Company", China	17

[a] Concentração determinada que apresentou um nível mais baixo. [b] Concentração determinada que apresentou um nível mais elevado.
#determinado em todo o fumo inalável e não apenas na fase gasosa do fumo inalável.
*médias são estatisticamente iguais às determinadas no presente trabalho para um nível de significância de 5%;** médias são estatisticamente iguais às determinadas no presente trabalho mas apenas para um nível de significância de 1%.

A falta de métodos analíticos standardizados para determinações dos constituintes do fumo de cigarro (com excepção do alcatrão, da nicotina e do monóxido de carbono) levou a grandes diferenças entre resultados obtidos por diferentes laboratórios, mesmo quando se tratam de cigarros de uma mesma marca.

Um estudo realizado em 2003[18] comparou os níveis de diferentes constituintes do fumo de cigarro determinados por sete diferentes laboratórios num mesmo período de tempo. Para cada composto, cada laboratório usou o método que achou mais conveniente, o que implicou o uso de diferentes máquinas de fumar, métodos de recolha e de detecção. Além disso, cada laboratório aplicou os seus processos internos de validação. Cigarros das mesmas três marcas foram entregues e analisados em cada laboratório. As determinações que apresentaram menor variabilidade entre laboratórios foram as de alcatrão, sendo que nos 70% dos restantes analitos a variabilidade em relação à média foi relativamente elevada entre laboratórios. A variação entre os níveis determinados mais elevados e os mais baixos (em relação à média) foi cerca de 80%. Considerando os dados disponíveis na literatura (

Tabela 3.8) constata-se que a variabilidade máxima dos níveis medidos foi de 78% para benzeno, 88% para tolueno, 48% para 2-butanona e 99% para acetona. Logo, não foi muito diferente da que ocorreu no referido trabalho[18] de intercalibração. Estes factos deverão ser tidos em conta quando se interpretam resultados, referentes a constituintes do fumo de cigarro.

Bibliografia

1. Lee, J. H.; Hwang, S. M.; Lee, D. H.; Heo, G. S., Determination of volatile organic compounds (VOCs) using tedlar bag/Solid-phase Microextraction/gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME/GC/MS) in Ambiente and Workplace Air. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2002,** 23, 488-496.

2. Martos, P. A.; Pawliszyn, J., Calibration of solid phase microextraction for air analyses based on physical chemical properties of the coating. *Analytical Chemistry* **1997,** 69, (2), 206-215.

3. Lord, H.; Pawliszyn, J., Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* **2000,** 885, (1-2), 153-193.

4. Góreki, T., Solid versus liquid coatings. In *Applications of Solid Phase Microextraction*, Pawliszyn, J., Ed. Cambridge, 1999; pp 92-108.

5. Miller, J. C.; Miller, J. N., *Statistics for Analytical Chemistry*. 3 ed.; 1993.

6. Gregg, E.; Hill, C.; Hollywood, M.; Kearney, M.; McLaughlin, D.; McAdam, K.; Williams, M.; Purkis, S., The UK smoke constituents testing study. Summary of results and comparison with other studies. *Beitrage zur Tabakforschung International* **2004,** 21, (2), 117-138.

7. Silva, G. V. A. Estudo de emissões de COVs por materiais usados em interiores de edifícios. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2000.

8. *Evaluation of VOC emmissions from building products - Solid flooring materials*; Report Nr.18; ECA (European Collaborative Action "Indoor Air Quality and Its Impact on Man"): Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1997.

9. *UK Smoke Constituents Study*; Arista Laboratories Europe: 2003.

10. Adam, T.; Mitschke, S.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R., Quantitative puff-by-puff-resolved characterization of selected toxic compounds in cigarette mainstream smoke. *Chemical Research Toxicology* **2006,** 19, (4), 511-520.

11. Counts, M. E.; Hsu, F. S.; Tewes, F. J., Development of a commercial cigarette "market map" comparison methodology for evaluating new or non-conventional cigarettes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2006,** 46, (3), 225-242.

12. Counts, M. E.; Morton, M. J.; Laffoon, S. W.; Cox, R. H.; Lipowicz, P. J., Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes

smoked with three machine-smoking conditions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2005,** 41, (3), 185-227.

13. Darrall, K. G.; Figgins, J. A.; Brown, R. D.; Phillips, G. F., Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. *Analyst* **1998,** 123, 1095-1101.

14. Chen, P. X.; Moldoveanu, S. C., Mainstream smoke chemical analyses for 2R4F kentucky reference cigarette. *Beitrage zur Tabakforschung International* **2003,** 20, (7), 448-458.

15. Dong, J.-Z.; Moldoveanu, S. C., Gas chromatography-mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A* **2004,** 1027, (1-2), 25-35.

16. Miyake, T.; Shibamoto, T., Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in cigarette smoke. *Journal of Chromatography A* **1995,** 693, (2), 376-381.

17. Wang, T. L.; Tong, H. W.; Yan, X. Y.; Sheng, L. Q.; Yang, J.; Liu, S. M., Determination of volatile carbonyl compounds in cigarette smoke by LC-DAD. *Chromatographia* **2005,** 62, 631-636.

18. Purkis, S. W.; Hill, C. A.; Bailey, I. A., Current measurement reliability of selected smoke analytes. *Beitrage zur Tabakforshung International* **2003,** 20, (5), 314-324.

Conclusões

Este trabalho permitiu implementar um método de análise directa de amostras gasosas de fumo de cigarro recolhidas em sacos de gases à saída de uma máquina que simula o acto de fumar, de um modo padronizado. Para recolha de analito e análise usou-se SPME/GC-MS.

A fibra de SPME que se mostrou mais adequada foi a que contém um revestimento de PDMS. A fibra com revestimento de PDMS-DVB, apesar de mais sensível para os compostos em estudo, saturava os locais de adsorção a níveis relativamente baixos de concentração dos compostos estudados, não permitindo o uso do método de adição de padrão para calibração.

A fibra de PDMS foi capaz de providenciar respostas lineares na gama de concentrações estudada (L.Q. – maior concentração medida em µg/cigarro) para benzeno (14 – 124), tolueno (6 – 64), m/p-xileno (2 – 16), acetona (28 – 353) e 2-butanona (33 – 119). Uma comparação de declives obtidos por calibração externa e por adição de padrão mostrou que o fumo de cigarro causava interferência de matriz, pelo que a quantificação dos diferentes compostos foi realizada sempre por adição de padrão.

A máquina de fumar, que era nova no início do estudo, começou, a partir de certa altura, a evidenciar irreprodutibilidade das emissões e níveis de emissão inferiores aos fornecidos anteriormente para o mesmo tipo de cigarros. Acabou-se por concluir que ocorreriam adsorções significativas no interior da máquina, em locais inacessíveis à limpeza para descontaminação. Uma pesquisa na literatura permitiu constatar que o mesmo problema já havia sido observado por outros investigadores e constituirá uma enorme limitação para o estudo da composição de fumo de cigarro.

Quer cigarros de referência 2R4F da Universidade de Kentucky quer cigarros de uma marca comercial *A*, apresentaram níveis de concentração no fumo inalável que obedeceram à seguinte ordem: m/p-xileno < tolueno < benzeno < 2-butanona < acetona. Os níveis (e respectivos desvios padrão) expressos em µg/cigarro, nos cigarros de marca *A* foram de 155 ± 36 para acetona, 47 ± 19 para 2-butanona, 44 ± 8 para benzeno, 26 ± 8 para tolueno e 9 ± 2 para m/p-xileno. No caso de cigarros de referência 2R4F, os níveis foram de 172 ± 46 para acetona, 41 ± 4 para 2-butanona, 41 ± 8 para benzeno, 40 ± 4 para tolueno e 8 ± 2 para m/p-xileno. Os erros associados às determinações reflectem não só os erros experimentais associados ao processo de amostragem e análise, mas também a heterogeneidade natural da composição dos cigarros (cada análise incide sobre um cigarro diferente) que é relativamente elevada.

Averiguou-se a existência de erros sistemáticos associados à fase de extracção de analitos para análise recorrendo à extracção por adsorção em Tenax TA, contido num tubo de aço. Compararam-se as médias obtidas para as duas marcas de cigarros usando SPME e Tenax TA. Apenas os níveis de benzeno determinados pelas duas técnicas em cigarros da marca *A* foram estatisticamente diferentes. Os restantes resultados foram estatisticamente iguais, para um nível de significância de 5% para todos os compostos, com excepção dos níveis de tolueno em cigarros de referência 2R4F, que foram estatisticamente iguais apenas para um nível de significância de 1%.

O método de análise por SPME/GC-MS implementado revelou-se uma alternativa aos anteriormente existentes, tendo como principal vantagem o facto de não envolver o uso de solventes para extrair os analitos do fumo, o mesmo acontecendo com os tubos com enchimento de Tenax TA/GC-MSD.

Anexos

Anexo 1. Principais constituintes da fase gasosa do fumo inalável de cigarros sem filtro.[§]

Composto[a]	Concentração/Cigarro
Azoto	280 - 320 mg
Oxigénio	50 - 70 mg
Dióxido de carbono	45 - 65 mg
Monóxido de carbono	14 - 23 mg
Água	7 - 12 mg
Argon	5 mg
Hidrogénio	0,5 - 1,0 mg
Amoniaco	10 - 130 µg
Óxidos de azoto (NOx)	100 - 600 µg
Cianeto de hidrogénio	400 - 500 µg
Sulfureto de hidrogénio	20 - 90 µg
Metano	1,0 - 2,0 mg
Outros alcanos aromáticos voláteis (20)	1,0 - 1,6 mg[b]
Alcenos voláteis (16)	0,4 - 0,5 mg
Isopreno	0,2 - 0,4 mg
Butadieno	25 - 40 µg
Acetileno	20 - 35 µg
Benzeno	12 - 50 µg
Tolueno	20 - 60 µg
Estireno	10 µg
Outros hidrocarbonetos voláteis (29)	15 - 30 µg
Ácido fórmico	200 - 600 µg
Ácido Acético	300 - 1700 µg
Ácido propionico	100 - 300 µg
Formato de metilo	20 - 30 µg
Outros ácidos voláteis (6)	5 - 10 µg[b]

[§]Hoffmann, D. *Analysis of toxic smoke constituints*; US consumer product safety commission and US department of health and human services, Toxicity Testing Plan: New York, 1993.

[a]Os números entre parêntesis representam o número de compostos individuais identificados no grupo
[b]Valores estimados

Anexo 1. (continuação) Principais constituintes da fase gasosa do fumo inalável de cigarros sem filtro.[§]

Composto[a]	Concentração/Cigarro
Formaldeído	20 - 100 µg
Acetaldeido	400 - 1400 µg
Acrolina	60 - 140 µg
Outros aldeidos voláteis (6)	80 - 140 µg
Acetona	100 - 650 µg
Outras cetonas voláteis (3)	50 - 100 µg
Metanol	80 - 180 µg
Outros alcoois voláteis (7)	10 - 30 µg[b]
Acetonitrilo	100 - 150 µg
Outros nitrilos voláteis (10)	50 - 80 µg[b]
Furano	20 - 40 µg
Outros furanos voláteis (4)	45 - 125 µg[b]
Pindina	20 - 200 µg
Piridina (3)	15 - 80 µg
3-Vinilpiridina	10 - 30 µg
Outras piridinas voláteis (25)	20 - 50 µg[b]
Pirrole	0,1 - 10 µg
Pirrolidina	10 - 18 µg
N-Metilpirrolidina	2,0 - 3,0 µg
Pirazinas voláteis (18)	3,0 - 8,0 µg
Metilamina	4 - 10 µg
Outras aminas alifáticas (32)	3 - 10 µg

[§]Hoffmann, D. *Analysis of toxic smoke constituints*; US consumer product safety commission and US department of health and human services, Toxicity Testing Plan: New York, 1993.

[a]Os números entre parêntesis representam o número de compostos individuais identificados no grupo
[b]Valores estimados

Anexo 2. Principais constituintes encontrados na fase particulada do fumo inalável de cigarros sem filtro.[§]

Composto[a]	µg/Cigarro
Nicotina	1000 - 3000
Norticotina	50 - 150
Anatabina	5 - 15
Anabasina	5 - 12
Outros alcalóides do tabaco (17)	N.D.
Bipiridilos (4)	10 - 30[b]
n-Hentriacontano (n-C_31H_{64})	100
Hidrocarbonetos não voláteis totais (45)[b]	300 - 400[b]
Naftaleno	2 – 4
Naftalenos (23)	3 - 6[b]
Fenantrenos (7)	0,2 - 0,4[b]
Antracenos (5)	0,05 - 0,1[b]
Fluorenos (7)	0,6 - 1,0[b]
Pirenos (6)	0,3 - 0,5[b]
Fluorantenos	0,3 - 0,45[b]
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos carcinogénicos (11)	0,1 - 0,25
Fenol	80 - 160
Outros Fenois (45)[b]	60 - 180[b]
Catecol	200 - 400
Outros catecois (4)	100 - 200[b]
Outros dihidroxibenzenos (10)	200 - 400[b]
Escopoletina	15 - 30
Outros polifenois (8)[b]	N.D.
Ciclotenos (10)[b]	40 - 70[b]
Quinonas (7)	0,50
Solanesol	600 - 1000

[§]Hoffmann, D. *Analysis of toxic smoke constituints*; US consumer product safety commission and US department of health and human services, Toxicity Testing Plan: New York, 1993.

[a]Os números entre parêntesis representam o número de compostos individuais identificados no grupo
[b]Valores estimados
N.D. Não disponível

Anexo 2. (continuação) Principais constituintes encontrados na fase particulada do fumo inalável de cigarros sem filtro.[§]

Composto[a]	µg/Cigarro
Neofitadienos (4)	200 - 350
Limoneno	30 - 60
Outros terpenos (200-250)	N.D.
Ácido palmítico	100 - 150
Ácido esteárico	50 - 75
Ácido oleico	40 - 110
Ácido linoleico	150 - 250
Ácido linolénico	150 - 250
Àcido Láctico	60 - 80
Indol	10 - 15
Escatol	12 - 16
Outros indois (13)	N.D.
Quinolinas (7)	2 - 4
Benzofuranos (4)	200 - 300
Outros compostos heterociclicos (42)	N.D.
Estigmasterol	40 - 70
Sitosterol	30 - 40
Campesterol	20 - 30
Colesterol	10 - 20
Anilina	0,36
Toluidinas	0,23
Outras aminas aromáticas (12)	0,25
N-nitrosaminas específicas do tabaco (6)	0,34 - 2,7
Glicerol	120

[§]Hoffmann, D. *Analysis of toxic smoke constituints*; US consumer product safety commission and US department of health and human services, Toxicity Testing Plan: New York, 1993.

[a]Os números entre parêntesis representam o número de compostos individuais identificados no grupo
[b]Valores estimados
N.D. Não disponível

Anexo 3. Evidencia do efeito de memória na máquina de fumar, que constitui uma limitação séria no uso deste equipamento para caracterização do fumo de cigarro – Resultados observados para fumo inalável de cigarros de referência Kentucky 2R4F.[§]

	Puffs da queima do cigarro + Puffs de Limpeza	**Puffs da queima do cigarro**
Acetona	(148,1 ± 9,6) µg/cigarro	(63,6 ± 4,5) µg/cigarro
Benzeno	(22,5 ± 1,7) µg/cigarro	(9,9 ± 0,8) µg/cigarro
Tolueno	(37,1 ± 3,1) µg/cigarro	(12,1 ± 1,1) µg/cigarro

[§]Adam, T.; Mitschke, S.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R., Quantitative puff-by-puff-resolved characterization of selected toxic compounds in cigarette mainstream smoke. *Chemical Research Toxicology* **2006,** 19, (4), 511-520.

U.PORTO

DECLARAÇÃO

NOME

Susana Daniela da Silva Martins

BI OU PASSAPORTE (SE ESTRANGEIRO) | TELEMÓVEL | E-MAIL

12105039 | 96 94 11 300 | susanadsmartins@gmail.com

NÚMERO DE ESTUDANTE U.PORTO

040370236

DOUTORAMENTO [ ] MESTRADO [X] DATA DE CONCLUSÃO 29/02/2008

RAMO/ ESPECIALIDADE

Química

TÍTULO

"Caracterização de Fumo Inalável do Cigarro Quanto a Alguns Compostos Orgânicos Voláteis e Muito Voláteis"

ORIENTADOR (ES)

Doutora Maria Teresa Vasconcelos (orientador)
Doutor Victor de Freitas (co-orientador)

Declaro, para os devidos efeitos, que concedo gratuitamente à Universidade do Porto, para além do título e resumo por mim disponibilizados, autorização para arquivar e tornar acessível aos interessados, nomeadamente através do seu repositório institucional, o trabalho supra-identificado, que disponibilizo no formato e nas condições abaixo indicadas.
A subscrição da presente declaração não implica a renúncia à titularidade dos direitos de autor a direito de usar a obra em trabalhos futuros, os quais são pertença do seu criador intelectual.

ASSINALAR AS OPÇÕES APLICÁVEIS EM 1, 2 E 3.

1. TIPO DE DIVULGAÇÃO

[X] TOTAL
[ ] PARCIAL

2. ÂMBITO DE DIVULGAÇÃO

[ ] NA UNIVERSIDADE DO PORTO
[X] GERAL

3. FORMATO DO FICHEIRO

[ ] PAPEL
[X] DIGITAL (CD/ DVD)

OBSERVAÇÕES (*)

DATA

16/06/2008

ASSINATURA

Susana Daniela da Silva Martins