

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CINTHIA ELOISE DOMINGUES

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE
NICOTINA E PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM TABACO DE CIGARRO
CONTRABANDEADO PARA O BRASIL

PONTA GROSSA
2022

CINTHIA ELOISE DOMINGUES

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE
NICOTINA E PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM TABACO DE CIGARRO
CONTRABANDEADO PARA O BRASIL

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutora em Química na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Área de
Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Xavier de
Campos

PONTA GROSSA
2022

D671 Domingues, Cinthia Eloise
Otimização de metodologias analíticas para determinação de nicotina e
pesticidas organoclorados em tabaco de cigarro contrabandeado para o Brasil /
Cinthia Eloise Domingues. Ponta Grossa, 2022.
117 f.

Tese (Doutorado em Química - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos.

1. Cigarro contrabandeado. 2. Pesticidas organoclorados. 3. Nicotina. 4.
Baixa temperatura. 5. Quechers. I. Campos, Sandro Xavier de. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Química. III.T.

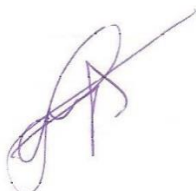
CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO

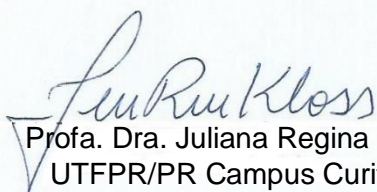
CINTHIA ELOISE DOMINGUES

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE NICOTINA E PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM TABACO DE CIGARRO CONTRABANDEADO PARA O BRASIL

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química (Associação UEL/UEPG/UNICENTRO) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.



Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos (Orientador)
UEPG/PR



Profa. Dra. Juliana Regina Kloss
UTFPR/PR Campus Curitiba



Profa. Dra. Grasielle Soares Cavallini
UFT/TO



Profa. Dra. Elaine Regina Lopes Tiburtius
UEPG/PR



Prof. Dr. Sergio Ricardo de Lázaro
UEPG/PR

Ponta Grossa, 05 de agosto de 2022.

Dedico,

Aos meus pais Edson e Leocádia, por todo esforço e dedicação em minha formação, mostrando sempre, que o estudo é o melhor caminho.

Ao Januário, meu amor, por todo entusiasmo, ajuda e companheirismo incondicional.

Ao meu irmão, Jonathan, por todo apoio e ajuda sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora Aparecida pelo dom da vida, por sua benevolência, luz em minhas aflições.

Ao Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos pelo aceite em me orientar nessa etapa da minha formação. Agradeço pela confiança em meu trabalho e pelos ensinamentos e oportunidades nesses anos que passaram.

Ao Prof. Dr. Carlos M. de Sousa Vidal, Profa. Dra. Jeanette Beber de Souza e ao Dr. Carlos Raphael Pedroso por confiarem em meu trabalho e me receberem no Laboratório de Engenharia Ambiental e Sanitária (UNICENTRO), por todo auxílio e disponibilidade no uso do cromatógrafo a gás.

Aos Professores que aceitaram o convite para compor a banca avaliadora.

Aos meus pais, Leocádia e Edson, que sempre dedicaram todos seus esforços para oportunizar uma formação sólida. Por sempre estarem ao meu lado sendo meu porto seguro em todos os momentos.

Ao meu namorado Januário, por ser calma em meio as minhas tempestades. Por me incentivar, ouvir, ajudar e compartilhar ao meu lado cada momento intensamente. Por todo entusiasmo a cada descoberta e por me fazer uma pessoa melhor. E também pelo cultivo e fornecimento das folhas de tomate e tabaco.

Ao meu irmão Jonathan, que sempre me socorreu e me socorre com seus conhecimentos de tecnologias presencialmente e remotamente, por todo apoio dedicado.

A amiga que ganhei nessa jornada, pela UNICENTRO, Ana Charnei, por toda atenção, confiança, disponibilidade e carinho.

Aos meus irmãos do coração, Elenice e Luis, por estarem sempre ao meu lado desde a graduação, em cada momento, seja nas alegrias, nas tristezas, na abertura das amostras e no inglês também.

A minha amiga Tatiana, por todo ensinamento, parceria, amizade e confiança, por me ouvir em todos os momentos, principalmente nos mais intensos e desesperadores. Por ser sempre presente em cada detalhe desde que nos conhecemos.

A minha amiga Karine, por ser sempre presente em minha vida e por cada oração em momentos de dificuldade.

Aos amigos e colegas do grupo QAAS por todo apoio. Em especial a amiga Rose pelas conversas e trocas de ideias.

Ao amigo Osni, pelo fornecimento de tabaco orgânico para o desenvolvimento da pesquisa.

A minha amiga Ana Paula, pela correção ortográfica do texto.

A todos amigos, amigas e familiares que compartilharam dos anseios e das alegrias durante esse período de formação.

E a todos e todas, que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda! ”

Mario Sergio Cortella

RESUMO

Uma vez que a concentração de nicotina e pesticidas organoclorados são parâmetros que refletem a qualidade do tabaco utilizado na produção de cigarros, se faz necessário métodos simples para esta determinação e que produzam quantidade reduzidas de resíduos, o que se torna ambientalmente e industrialmente interessantes. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi otimizar duas metodologias analíticas para extração de nicotina e pesticidas organoclorados de tabaco de cigarro contrabandeado para o Brasil, visto que esse estudo é de suma relevância devido ao aumento do consumo de cigarros contrabandeados. A concentração de nicotina no tabaco de cigarro contrabandeado foi determinada pelo método QuEChERS, necessitando de algumas modificações, tais como, a diminuição do volume do solvente extrator, alteração do pH e retirada da etapa de hidratação da amostra e a quantificação foi realizada por cromatografia a gás, usando um detector de ionização de chama. O planejamento de experimentos matriz de Doehlert foi usado para otimizar o método. As recuperações de extração variaram de 97,5% a 99,6%, com desvio padrão relativo (RSD) $\leq 2,5\%$ e limites de detecção e quantificação de $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. O método foi sensível e preciso para a detecção e quantificação da nicotina, sendo a concentração menor do que a observada nos cigarros legais. A quantificação de pesticidas organoclorados foi utilizada a combinação das metodologias de ultrassom e extração a baixa temperatura. A abordagem combinada dos métodos foi otimizada e validada para 20 pesticidas organoclorados, alcançando recuperações entre 73% e 116% e um desvio padrão relativo inferior a 20%. O método minimizou o efeito de matriz de 65% dos pesticidas organoclorados estudados. Os limites de detecção e quantificação variaram de 2 a 60 ng g^{-1} e 120 a 190 ng g^{-1} , respectivamente. O método foi aplicado à análise de 18 marcas de cigarros contrabandeados. Os pesticidas organoclorados encontrados nas amostras foram cis clordano em 89% das marcas, p,p-diclorodifenildicloroetileno (DDD) e metoxicloro em 78%, endosulfan sulfato em 67%, heptacloro epóxido e endosulfan II em 61%. As concentrações dos pesticidas organoclorados neste estudo foram maiores do que as encontradas em uma pesquisa semelhante sobre cigarros comercializados na China. A aplicação de ultrassom e extração em baixa temperatura pode ser uma alternativa eficiente para análise de amostras de tabaco, pois utiliza apenas um solvente de extração, requer equipamentos de baixo custo, não necessita de uma etapa adicional de limpeza, reduz o impacto ambiental por meio da geração mínima de resíduos e pode detectar baixas concentrações de analitos. Os métodos foram aplicados com sucesso em amostras reais de cigarros contrabandeados para o Brasil, fornecendo uma alternativa promissora para análises de rotina e demonstrando a necessidade de mais estudos sobre este assunto.

Palavras-chave: cigarro contrabandeado, pesticidas organoclorados, nicotina, extração a baixa temperatura, QuEChERS.

ABSTRACT

Since the concentration of nicotine and organochlorine pesticides are important parameter that reflects the quality of the tobacco used in the production of cigarettes, simple methods are necessary for this determination, which produce reduced amounts of waste, which becomes environmentally and industrially interesting. In view of the above, the objective of this work was to optimize two analytical methodologies for extracting nicotine and organochlorine pesticides in tobacco from cigarettes smuggled into Brazil were optimized since this study is of paramount relevance due to the increased consumption of smuggled cigarettes. In this work, the nicotine concentration of smuggled cigarette tobacco was determined by the QuEChERS method, requiring some modifications, such as decreasing the volume of the extractor solvent, changes in pH, and removal of the sample hydration step and the quantification was performed by gas chromatography using a flame ionization detector. The Doehlert matrix design was used to optimize the method. The extraction recoveries ranged from 97.5% to 99.6%, with relative standard deviation (RSD) $\leq 2.5\%$ and limits of detection and quantification of 0.6 mg L^{-1} and 2.5 mg L^{-1} , respectively. The method was sensitive and accurate for the detection and quantification of nicotine being the the nicotine concentration was lower than in legal cigarettes. To quantify organochlorine pesticides using ultrasound application and low-temperature extraction. The combined approach was validated for 20 organochlorine pesticides, achieving recoveries ranging from 73 % to 116 % and a relative standard deviation of less than 20 %. The method minimized the matrix effect in 65 % of the organochlorine pesticides. The limits of detection and quantification varied from 2 to 60 ng g^{-1} and 120 to 190 ng g^{-1} , respectively. The method was applied to the analysis of 18 brands of smuggled cigarettes. The organochlorine pesticides found in the samples were cis chlordane (89 %), p,p-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDD), methoxychlor (78 %), endosulfan sulfate (67 %), heptachlor epoxide, and endosulfan II (61 %). The concentrations of the organochlorine pesticides in this study were higher than those in a similar survey on cigarettes marketed in China. The ultrasound application and low-temperature extraction may be an efficient alternative to analyzing tobacco samples since it uses only one extraction solvent, requires low-cost equipment, does not require an additional clean-up step, reduce environmental impact through minimal waste generation, and can detect low analyte concentrations. The methods were successfully applied to real samples of smuggled cigarettes, demonstrating an alternative for routine analysis and proving the need for more studies on this subject.

Keywords: smuggled cigarettes, organochlorine pesticides, nicotine, low-temperature extraction, QuEChERS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resíduos gerados de cigarro contrabandeado de 2016 – 2021.....	21
Figura 2 - Fórmulas estruturais da nicotina	22
Figura 3 - Etapas processo analítico	25
Figura 4 - Representação da cavitação acústica.....	30
Figura 5 - Dispersão de resíduos de ajuste das respostas instrumentais em função da concentração.....	39
Figura 6 - Parâmetros analíticos utilizados para validação de metodologia analítica na extração de nicotina e OCPs	53
Figura 7 - Organograma das etapas para otimização de metodologia de extração de nicotina e OCPs.....	56
Figura 8 - Processo de otimização do método QuEChERS para nicotina.....	58
Figura 9 - Método QuEChERS modificado para extração de nicotina de matriz tabaco.....	60
Figura 10 - Cromatógrafo Shimadzu GC-2014, autosampler AOC-20i.....	62
Figura 11 - Amostra de tabaco orgânico	63
Figura 12 - Análise gravimétrica de resíduos não voláteis por comparação dos métodos de extração de OCPs em tabaco ULT/BT e QuEChERS	65
Figura 13 - Método ULT/PBT para extração de OCPs em amostras de cigarro contrabandeado	67
Figura 14 - Homogeneização da amostra por quarteamento	68
Figura 15 - Superfície de contorno pH x quantidade de solvente para a extração de nicotina.....	70
Figura 16 - Cromatograma de nicotina em matriz de tabaco (A) e solvente (B).....	72
Figura 17 - Curva analítica para a nicotina.....	73
Figura 18 - Gráfico de resíduos versus valores preditos	73

Figura 19 - Amostras de tabaco e solventes após exposição a baixa temperatura...	77
Figura 20 - Distribuição de carga na molécula de acetonitrila	78
Figura 21 - Recuperação do surrogate (%) em diferentes tempos de extração de baixa temperatura	80
Figura 22 - Coextrativos da matriz de tabaco utilizando o método QuEChERS com diferentes quantidades de sorventes.....	83
Figura 23 - Extrato de tabaco pelo método ULT/BT (A) e por QuEChERS (B)	84
Figura 24 - Cromatogramas de OCPs no solvente (A), OCPs no extrato de matriz (B) e apenas o extrato de matriz (C)	85
Figura 25 - Comparação das inclinações das curvas de calibração dos OCPs em solvente e combinado com a matriz	86
Figura 26 - Influência do EM (%) na extração dos OCPs	87
Figura 27 - Curva analítica representativa para o OCP endosulfan I	89
Figura 28 - Gráfico de resíduos para as curvas de calibração dos OCPs	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis de Resíduos de Orientação (GRLs) CORESTA	25
Tabela 2 - Matriz Doehlert do método QuEChERS de otimização	57
Tabela 3 - Parâmetros de desempenho analítico para validação do método QuEChERS modificado para extração de nicotina	59
Tabela 4 - Experimento de seleção de solvente extrator para OCPs em amostra de tabaco utilizando BT	63
Tabela 5 - Parâmetros de desempenho analítico para validação do método ULT/BT	66
Tabela 6 - Concentração de nicotina em cigarros contrabandeados (A-I) e legais (J e K) (n = 3)	75
Tabela 7 - Concentração de nicotina em cigarros legais em outros estudos	76
Tabela 8 - Propriedades dos OCPs.....	79
Tabela 9 - Recuperações (n = 3) para os ensaios de variação do tempo de ultrassom e de BT.....	81
Tabela 10 - p-valor e coeficiente de determinação (R^2) para avaliação de linearidade da curva analítica	90
Tabela 11 - Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), para a	
determinação dos OCPs utilizando o método ULT/BT	92
Tabela 12 - Recuperação (REC) e precisão (DPR) para a determinação dos OCPs utilizando o método ULT/BT	93
Tabela 13 - Comparação entre o método ULT/BT e outros métodos aplicados para extração de OCPs em tabaco	96
Tabela 14 - OCPs em amostras reais de tabaco de cigarros contrabandeados	97
Tabela 15 - Níveis de resíduos para pesticidas em tabaco (CORESTA)	98

LISTAS DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACE	Acetona
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
ASE	Extração acelerada por solvente (<i>Accelerated solvent extraction</i>)
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais (<i>American Society for Testing and Materials</i>)
BT	Baixa temperatura
C18	Octadecilsilano
CEN	Comitê de Padronização Europeu (<i>European Committee for Standardization</i>)
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro
GC-ECD	Cromatografia a gás acoplado a detector de captura de elétrons (<i>Gas chromatography with electron capture detector</i>)
GC-FID	Cromatografia a gás acoplado a detector de ionização em chama (<i>Gas chromatography with flame ionization detector</i>)
GC-MS	Cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas (<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>)
CORESTA	Centro de Cooperação para Pesquisa Científica Relativa ao Tabaco
CV	Coeficiente de variação
DDD	Diclorodifenildicloroetano
DDE	Diclodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DPR	Desvio padrão relativo
D-SPE	Extração em fase sólida dispersiva
EM	Efeito Matriz
EURACHEM	Química Analítica na Europa (<i>Analytical Chemistry in Europe</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
GBC	Negro de carbono grafitado (<i>graphitized carbon black</i>)

GRLs	Níveis de Resíduos de Orientação (<i>Agrochemical Guidance Residue Levels</i>)
HCH	Hexaclorociclohexano
HEX	Hexano
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (<i>High performance liquid chromatography with diode arrangement detector</i>)
HS-SPME-GC-FID	Micro extração em fase sólida em headspace com cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (<i>Headspace solid-phase micro-extraction coupled with gas-chromatography with flame ionized detector</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ICH	Conselho Internacional para Harmonização (<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRC	Material de referência certificado
NATA	Associação Nacional de Autoridades de Teste (<i>National Association of Testing Authorities</i>)
OCDE	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>)
OCPs	Pesticidas Organoclorados (<i>Organochlorines pesticides</i>)
PAH	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (<i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i>)
PBDE	Éteres difenílicos polibromados (<i>Polybrominated diphenyl ethers</i>)
PBT	Partição a baixa temperatura
PCB	Bifenilas policloradas (<i>Polychlorinated biphenyls</i>)

PDMS	Polidimetilsiloxano
PIB	Produto Interno Bruto
PLE	Extração líquida pressurizada (<i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
PSA	Etilenodiamino-n-propilsilano (<i>Primary Secondary Amine</i>)
QuEChERS	Rápido, Efetivo, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>)
REC	Recuperação
S/N	Razão sinal ruído (<i>signal/noise</i>)
SANTE	Direção Geral da Saúde e Segurança Alimentar
SFE	Extração por fluido supercrítico (<i>Supercritical fluid extraction</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid-phase extraction</i>)
ULT	Ultrassom
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>)
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (<i>United States Environmental Protection Agency</i>)
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos (<i>United States Pharmacopeia</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	TABAGISMO.....	20
2.1.1	Composição do Tabaco.....	22
2.1.2	Pesticidas Organoclorados (OCPs) em Tabaco	23
2.2	PROCESSO ANALÍTICO.....	25
2.3	TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRA	26
2.3.1	Técnicas para Limpeza do Extrato da Amostra	29
2.3.2	Método de Extração por Ultrassom	29
2.3.3	Modificações no Método de Ultrassom.....	31
2.3.4	Método de Extração por Partição em Baixa Temperatura (PBT).....	32
2.3.5	Aplicações da Precipitação a Baixa Temperatura	33
2.4	PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO.....	35
2.4.1	Efeito Matriz (EM).....	36
2.4.2	Linearidade.....	37
2.4.3	Limite de Detecção (LD).....	39
2.4.4	Limite de Quantificação (LQ).....	40
2.4.5	Recuperação	41
2.4.6	Precisão	42
2.4.7	Robustez	43
2.4.8	Estudos de Determinação de Nicotina e OCPs em Tabaco com Base em Métodos Validados.....	43
3	OBJETIVOS	54
3.1	OBJETIVO GERAL	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	PADRÕES ANALÍTICOS E SOLVENTES	55
4.2	ETAPAS REALIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE NICOTINA E OCPs EM TABACO DE CIGARRO.....	55
4.2.1	Planejamento Experimental Matriz de Doehlert para Otimização do Volume do Solvente Extrator e pH na Extração da Nicotina pelo Método QuEChERS.....	57
4.2.2	Validação do Método QuEChERS Otimizado para Extração de Nicotina em Tabaco de Cigarro.....	59
4.2.3	Método QuEChERS Validado para Extração de Nicotina de Tabaco de Cigarros.....	60

4.2.4	Determinação de Nicotina em Amostras de Tabaco de Cigarro por Cromatografia a Gás Acoplado a Detector de Ionização em Chama (GC-FID).....	61
4.2.5	Estudo da Precipitação de Compostos da Matriz em Diferentes Solventes Orgânicos para Extração de OCPS.....	62
4.2.6	Estudo da Recuperação de Surrogate pela Baixa Temperatura.....	63
4.2.7	Estudo da Influência do Uso de Ultrassom (ULT) para Melhorar a Recuperação de OCPs em Tabaco.....	64
4.2.8	Comparação Gravimétrica de Coextrativos Não Voláteis em Extrato de Tabaco pelos Métodos ULT/BT e QuEChERS.....	64
4.2.9	Validação do Método ULT/BT Otimizado para Extração de OCPs em Tabaco de Cigarro.....	66
4.2.10	Método Validado para Extração de OCPs em Tabaco de Cigarro.....	67
4.2.11	Determinação de OCPs em Amostras de Tabaco de Cigarro por Cromatografia a Gás Acoplado a Detector de Captura de Elétrons (GC-ECD).....	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
5.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MATRIZ DE DOEHLERT PARA OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR E PH NA EXTRAÇÃO DA NICOTINA PELO MÉTODO QUECHERS.....	70
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS OTIMIZADO PARA EXTRAÇÃO DE NICOTINA EM TABACO DE CIGARRO.....	72
5.3	DETERMINAÇÃO DE NICOTINA EM AMOSTRAS REAIS DE TABACO DE CIGARRO CONTRABANDEADO POR CROMATOLOGRAFIA A GÁS ACOPLADO A DETECTOR DE IONIZAÇÃO EM CHAMA (GC-FID).....	75
5.4	ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO DE COMPOSTOS DA MATRIZ DE TABACO EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS.....	77
5.5	ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE SURROGATE TETRACLORO-M-XILENO PELA BAIXA TEMPERATURA EM MATRIZ DE TABACO.....	79
5.6	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO USO DE ULTRASSOM PARA MELHORAR A RECUPERAÇÃO DE OCPS EM TABACO.....	81
5.7	COMPARAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE COEXTRATIVOS NÃO VOLÁTEIS EM EXTRATO DE TABACO PELOS MÉTODOS ULT/BT E QuEChERS.....	83
5.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ULT/BT OTIMIZADO PARA EXTRAÇÃO DE OCPS EM TABACO DE CIGARRO.....	85
5.8.1	Efeito Matriz (EM).....	85
5.8.2	Linearidade.....	89
5.8.3	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	92
5.8.4	Exatidão (Recuperação) e Precisão.....	93
5.9	MÉTODO VALIDADO PARA EXTRAÇÃO DE OCPS EM TABACO DE CIGARRO.....	95

5.10 DETERMINAÇÃO DE OCPS EM AMOSTRAS REAIS DE TABACO DE CIGARRO CONTRABANDEADO POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADO A DETECTOR DE CAPTURA DE ELÉTRONS (GC-ECD).....	97
6 CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo já é considerado como uma epidemia e uma das maiores causas de mortes evitáveis. No mundo, há mais de um bilhão de fumantes e no Brasil esse número chega a 22 milhões. O tabagismo está diretamente relacionado a vários tipos de câncer e problemas respiratórios. Estima-se que os custos com o tratamento de brasileiros que adoecem devido ao uso do tabaco são maiores do que os valores arrecadados na venda desse produto.

Além dos gastos em tratamento, o país ainda enfrenta a problemática do uso de cigarros provenientes de contrabando, isso corresponde, hoje, à metade do comércio deste produto, resultando ainda mais no impacto financeiro e preocupação sobre a qualidade do que se está consumindo, uma vez que esse produto não passa por critérios de qualidade. Além dos problemas em saúde pública e financeiros, o cigarro contrabandeado tem afetado também o meio ambiente, pois devido ao número crescente de apreensões, tornou-se um resíduo sólido preocupante, que atualmente é incinerado.

Nos últimos anos, as pesquisas sobre a determinação de pesticidas em tabaco têm destacado a presença residual de várias classes destas substâncias sendo alguns inclusive proibidas pela Convenção de Estocolmo. A maior parte dos estudos utilizam o tabaco em folha, já nos manufaturados ainda há poucos resultados. Para cigarros contrabandeados, os estudos são focados nos impactos do contrabando, não apresentando informações sobre pesticidas. Para a nicotina, os estudos são direcionados para cigarros comerciais, não trazendo informações sobre cigarros contrabandeados. Os estudos relacionam a quantidade de nicotina presente no tabaco com a qualidade e controle para o sistema de produção. Para o tabaco, não há um valor referência ou mínimo de nicotina na folha e, no Brasil, a ANVISA preconiza a concentração de 1 mg apenas para a fumaça primária.

Em todos os estudos para a determinação de nicotina e pesticidas, modificações de métodos para extração foram observados. O desenvolvimento ou a otimização de métodos para determinação de analitos é uma área de grande importância da química analítica, em razão de que a diminuição de custos e tempo são fatores determinantes para um método poder ser aplicado em várias amostras. Métodos analíticos de extração também devem visar o impacto gerado ao ambiente, visto que o uso de reagentes e solventes orgânicos são necessários.

Assim, estudos sobre cigarros contrabandeados, que visam a determinação de pesticidas e também nicotina, são de suma importância para contribuir com resultados que possam ser utilizados na determinação de valores residuais e/ou quantidades mínimas nesse produto, uma vez que estudos mostram que consumidores fazem uso de mais de um cigarro por dia. Além de fornecer dados às políticas públicas para o combate do uso proveniente de contrabando, uma vez que ele aumenta o risco à saúde de usuários e não usuários, em relação ao cigarro legalizado. Para isso, o desenvolvimento ou otimização de métodos de extração para o tabaco se faz necessário, pois métodos simples, eficientes, econômicos e ambientalmente favoráveis são interessantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TABAGISMO

O tabagismo se tornou líder de mortes evitáveis no mundo (CDC, 2021). A Organização mundial da saúde (WHO) estima que 80% dos usuários de tabaco no mundo vivem em países de baixa e média renda (LAMPREIA; COSTA; BIZ, 2015; WHO, 2021).

No Brasil, há 9,8% de fumantes o que equivale a 22 milhões de pessoas (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022). Mesmo com as práticas contra o tabagismo como campanhas, preço mínimo de venda, aumento em impostos, o impacto ainda é grande.

O tabagismo está diretamente relacionado ao desenvolvimento de câncer de bexiga, pâncreas, fígado, colo do útero, esôfago, rins, laringe, pulmão, boca, faringe e estômago, além de outras enfermidades nos sistemas respiratórios e cardiovasculares. Considerando o percentual de mortes ocorridas no Brasil, 13% são atribuíveis ao tabagismo, sendo considerado uma epidemia atualmente. Estima-se que o custo direto e indireto dos efeitos na saúde pública em decorrência do tabagismo foi de 1,8% do PIB em 2020, o que representa 23% do que o país gastou no enfrentamento da pandemia Covid-19, totalizando 8% de todos os gastos anuais em saúde (INCA, 2021a; PALACIOS A, et. al, 2020).

Uma matriz de importância mundial que merece atenção por afetar diversas áreas como meio ambiente, saúde pública e setor financeiro é o cigarro contrabandeado. O principal tipo de comércio ilegal é o contrabando de cigarro, a cada dez cigarros consumidos, um é proveniente do contrabando (JOOSSENS; RAW, 2012; WHO, 2021).

No Brasil, o cigarro contrabandeado corresponde a 37% das apreensões ilegais, o que representa praticamente a metade entre todos os produtos ilegais no país. De 2015 a 2019 o aumento na comercialização foi de 39 a 57%, respectivamente. Observou-se uma queda em 2020 para 49%, sendo justificada por fatores pontuais como a pandemia da covid-19 e a alta do dólar. Os impactos financeiros gerados pelo contrabando são de extrema significância, pois as perdas em arrecadação são da ordem de bilhões de reais (ETCO, 2021; BRASIL. Ministério da Economia. Receita Federal, 2021).

O impacto ambiental é dado pela geração de resíduos sólidos (Fig. 1), que em 2021 teve mais de 9 mil toneladas descartadas, tendo como destino final a incineração (ZITTEL et al., 2018).

Figura 1 – Resíduos gerados de cigarro contrabandeado de 2016 – 2021



Fonte: BRASIL. Ministério da Economia. Receita Federal. Balanço Aduaneiro 2020, mar. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/receitafederal/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/relatorios/aduana/balanco-aduaneiro-2018/view> Acesso em: 20 jun. 2021.

O impacto na saúde pública está relacionado com o aumento de usuários de tabaco atraídos pelo preço de venda, pois o cigarro contrabandeado é vendido com preço menor do que o mínimo estipulado para os cigarros legalizados. Além de ser acessível a toda faixa etária, incluindo menores de idade.

Consumidores, ou não, são expostos a mais de 4.700 substâncias encontradas na fumaça do tabaco (DANE; HAVEY; VOORHEES, 2006; INCA, 2021b; SILVA; PIRAS; MOREIRA, 2019) e outros contaminantes, como metais potencialmente tóxicos (Cd, Ni, Pb) (SILVA; VOIGT; CAMPOS, 2014).

No Brasil, foi realizado um estudo no Rio de Janeiro, São Paulo, Campo Grande, João Pessoa e Belo Horizonte que mostrou a relação entre o perfil dos consumidores de cigarros contrabandeados e a classe econômica média-baixa. As cidades com mais consumidores foram Campo Grande (70,1%), região de fronteira com o Paraguai, e João Pessoa, cidade localizada em região economicamente mais pobre do país (SZKLO et al., 2022; SZKLO; IGLESIAS, 2020).

Considerando o apresentado, novamente ressalta-se a importância de estudos em torno desta matriz, uma vez que a matriz tabaco é desafiadora devido a sua composição.

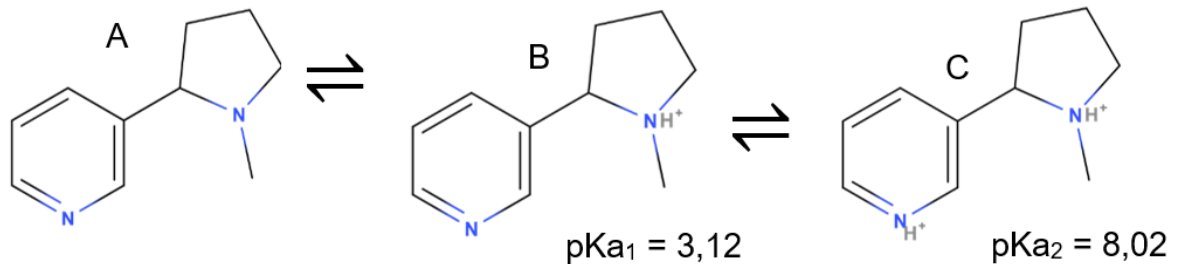
2.1.1 Composição do Tabaco

A folha de tabaco, utilizada na produção de cigarros, possui mais de 4700 substâncias químicas, sendo 0,3-5% correspondente à nicotina que compõe 95% de todos os alcaloides presentes no tabaco (RODGMAN; PERFETTI, 2013).

A nicotina é uma droga psicoativa, um alcaloide nitrogenado que atua diretamente no sistema nervoso central ligando-se aos receptores neurais nicotínicos de acetilcolina, favorecendo a liberação de neurotransmissores como dopamina, serotonina, noradrenalina e, portanto, responsável pelo vício do tabaco (KARBALAIIE et al., 2009).

A nicotina apresenta em sua molécula dois nitrogênios com caráter básico. Dependendo do pH do meio ela pode se apresentar de três formas como mostra a figura 2.

Figura 2 - Fórmulas estruturais da nicotina



Fonte: Adaptado de EL-HELLANI, A. et al. Free-Base and Protonated Nicotine in Electronic Cigarette Liquids and Aerosols. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 8, p. 1532–1537, 17 ago. 2015.

A forma em que a nicotina se apresenta (protonada ou base livre) influencia diretamente na sua absorção pelo organismo. Na forma protonada as moléculas de nicotina não são absorvidas facilmente pelas mucosas oral, nasal, pele e epitélio pulmonar, pois não passam pelas membranas lipoproteicas. Na forma de base livre, a passagem é mais rápida (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001; ROSEMBERG, 2003), devido as interações intermoleculares envolvidas.

Com base nisso, no processo de produção do tabaco, a amônia é adicionada à mistura para aumentar o pH e, conseqüentemente, a quantidade de nicotina biodisponível (EL-HELLANI et al., 2015; ROSEMBERG, 2003; STANFILL et al., 2021).

Os níveis de nicotina no tabaco dependem diretamente de fatores como práticas de produção, clima, fertilidade do solo e espécie da planta. Como a nicotina é sintetizada nas raízes e transportada para as folhas, sua concentração influencia o desenvolvimento da planta. Para cigarros com quantidades intencionalmente reduzidas de nicotina é necessário que as plantas sejam geneticamente modificadas; o que leva de 8 a 12 anos de pesquisa para que uma determinada variedade seja comercializada (LEWIS et al., 2020; TAUJENIS; OLŠAUSKAITĖ; PADARAUSKAS, 2015). Portanto, a determinação do teor de nicotina é um parâmetro importante para a avaliação do tabaco nos cigarros.

A matriz tabaco é composta de várias substâncias incluindo carboidratos, ácidos carboxílicos, ceras e resinas, compostos fenólicos, proteínas, aminoácidos, alcaloides, compostos de enxofre, compostos halogenados e metais, além de misturas líquidas aplicadas no processamento para melhorar o sensorial do produto final (RODGMAN; PERFETTI, 2013).

Estes compostos podem influenciar diretamente no sistema de análise comprometendo os resultados. Nesse sentido, precisam ser eliminados pelo processo de extração e limpeza. No entanto, ao considerar o tabaco a partir de cigarros, o número de compostos é ainda maior, pois outras substâncias são adicionadas durante a produção (ROSEMBERG, 2003).

2.1.2 Pesticidas Organoclorados (OCPs) em Tabaco

Outros compostos de grande importância para avaliação do cigarro contrabandeado são os pesticidas. Durante todo o processo de produção do tabaco, são utilizados diversos tipos de pesticidas como herbicidas, inseticidas, entre outros. Pesticidas organoclorados (OCPs) como aldrin, clordano, clordecone, dicofol, dieldrin, endrin, heptacloro e metabólito, HCHs, endosulfan e isômeros, diclorodifeniltricloroetano (DDT) e metabólitos são compostos proibidos pela Convenção de Estocolmo (UNEP, 2019).

No entanto, mesmo sendo proibidos, alguns estudos mostram a presença destes compostos em tabaco. No trabalho de Rahman, e colaboradores (2012), OCPs como hexaclorociclohexano (alfa-HCH, beta-HCH, gama-HCH e delta-HCH), aldrin,

dieldrin, endrin, endrin cetona, endrin aldeído, heptacloro, heptacloro epóxido, alfa-clordano, beta-clordano, alfa-endosulfan, beta-endosulfan, diclorodifeniltricloroetano (DDT), diclodifenildicloroetileno (DDE), diclorodifenildicloroetano (DDD) e metoxicloro foram encontrados em folhas de várias regiões como Bangladesh.

Na China, vários trabalhos demonstram também a presença de OCPs (CHEN et al., 2013, 2018; HAO; LI; LIN, 2017; LUO et al., 2015), assim como na Índia (GHOSH et al., 2014; KHAN et al., 2014). No Brasil, segundo maior produtor de tabaco (DERAL, 2020), esses estudos ainda são limitados.

A matriz tabaco é um bom indicador para contaminação por OCPs e, embora não seja considerado um produto alimentício, é a cultura agrícola mais difundida globalmente e segunda substância psicoativa mais consumida em todo o mundo (JEFFREY DROPE ED.; NEIL W SCHLUGER ED., 2018; LE FOLL et al., 2022; TASSEW; CHANDRAVANSI, 2015).

Os OCPs são compostos sintetizados e classificados como hidrocarbonetos clorados, onde sua estrutura química lhe confere caráter lipofílico implicando na permanência por muitos anos no ambiente (DE SOUZA et al., 2022; RIAZ; MALIK; DE WIT, 2021; ZHANG et al., 2011).

Muitos OCPs já tiveram seu uso cessado há 20 anos, mas devido a sua persistência e facilidade de transporte a longas distâncias, ainda podem ser detectados, geralmente em níveis traços.

Com base nisso, a preparação da amostra precisa minimizar a quantidade de substâncias que possam ser extraídas juntamente com os analitos, como pigmentos, compostos lipídicos, açúcares e outros compostos, pois podem causar danos ao sistema de identificação e/ou apresentar comportamento semelhante ao analito, produzindo resultados não confiáveis.

Os limites para resíduos de OCPs são estabelecidos para alimentos e rações. Entretanto, não há consenso para o tabaco, pois se trata de um produto alimentar (CORESTA, 2021). Por isso, o Centro de Cooperação para Pesquisa Científica Relativa ao Tabaco (CORESTA) desenvolveu orientações de níveis de resíduos (GRLs) para auxiliar no monitoramento dessa cultura. A tabela 1 apresenta os níveis propostos baseados nas boas práticas agrícolas.

Tabela 1 - Níveis de Resíduos de Orientação (GRLs) CORESTA

OCPS	GRL (ppb)
Aldrin+Dieldrin	20
Clordano (Σ cis e trans)	100
DDT (Σ metabólitos)	200
Endosulfan (Σ metabólitos)	1000
Endrin	50
Heptachlor (Σ metabólitos)	20
Metoxicloro	50

Fonte: CORESTA. **CORESTA GUIDE N° 1 The Concept and Implementation of CPA Guidance Residue Levels Cooperation.** Centre for Scientific Research Relative to Tobacco, out. 2021. Disponível em: https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/Guide-No01-GRLs7th-Issue-Oct21.pdf Acesso em: 22 dez. 2021.

2.2 PROCESSO ANALÍTICO

O sucesso de uma análise química é condicionado ao desenvolvimento adequado do processo analítico. A composição da matriz deve ser bem conhecida, assim como as propriedades físico-químicas dos analitos de interesse, pois influenciam diretamente nas etapas apresentadas na figura 3.

Figura 3 - Etapas processo analítico



Fonte: A Autora.

As duas primeiras etapas são cruciais para um bom desempenho do processo. A obtenção de amostras deve representar significativamente o problema em questão, uma vez que amostragem se não for realizada de acordo com um padrão uniforme resultará em erros de amostragem que inferirão nos resultados finais. Assim como a amostragem, a preservação deve garantir que os analitos de interesse não sofram variações entre o período de amostragem e preparo.

O preparo da amostra é a etapa mais desafiadora, pois consome maior parte do tempo e recursos dedicados ao processo analítico e onde grande parte dos erros estão vinculados (ARMENTA et al., 2019), desta forma deve ser suficientemente eficiente adequada para análise pelo sistema de determinação escolhido.

A última etapa do processo é a análise do extrato da amostra, quando poderão ser identificados e/ou quantificados os analitos de interesse. Apesar da variedade de técnicas analíticas disponíveis, deve-se levar em consideração a necessidade de modificação ou não do método escolhido, como também a segurança e os critérios da química verde.

2.3 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRA

O desenvolvimento de processos e ferramentas tem sido destaque no âmbito da química analítica nos últimos anos, principalmente no que diz respeito aos seguintes objetivos (GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIES'NIK, 2013):

- (1) eliminação ou redução do uso de substâncias químicas (solventes, reagentes, conservantes, aditivos para ajuste de pH e outros);
- (2) minimização do consumo de energia;
- (3) gestão adequada dos resíduos analíticos; e,
- (4) maior segurança para o operador.

A ciência das medições tem auxiliado diversas áreas no desenvolvimento e/ou otimização de processos para análise de substâncias químicas em diversas matrizes, pois o preparo de amostra é o gargalo dos procedimentos analíticos.

A remoção efetiva de interferentes é dependente da escolha do tipo de preparo de amostra, devendo ser compatível com as propriedades físico-químicas e ao sistema de determinação.

Equipamentos de análise que apresentam alta sensibilidade necessitam de amostras sem interferentes e o analito em uma faixa mensurável. Um exemplo específico é a análise cromatográfica, na qual a presença de interferentes da matriz podem afetar diretamente a separação e suprimir ou aumentar o sinal do composto dificultando o processo de quantificação.

A análise desses compostos torna-se um desafio, uma vez que são encontrados em níveis traços em matrizes como plantas, água, solo, sedimento, alimentos e fluidos biológicos. Órgãos como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), a Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) e o Comitê de Padronização Europeu (CEN) regulamentam metodologias para extração de OCPs em matrizes sólidas e líquidas.

Os métodos preconizados por esses órgãos são: extração por funil de separação, extração líquido-líquido, extração em fase sólida em cartucho ou disco,

soxhlet, extração por fluido pressurizado, extração por microndas, extração por ultrassom, extração por fluido supercrítico, permeação em gel, micro extração em fase sólida, e o mais recente QuEChERS.

O método de extração por soxhlet garante o contato da amostra com o solvente extrator, uma vez que utiliza o processo de refluxo por determinado tempo que pode chegar até 16h, utilizando volumes de solvente entre 100 e 300 mL por amostra, sendo utilizado apenas para sólidos (USEPA, 1996a; WIRNKOR et al., 2021). Essa metodologia apresenta certa simplicidade, porém demanda de quantidades de solventes relativamente altas, demasiado tempo e grandes quantidades de amostra.

A extração líquido-líquido tem como base o particionamento dos compostos da fase aquosa para a fase orgânica, utilizando agitação e repetição do procedimento, a fase orgânica, composta por 60 mL do solvente (USEPA, 1996b). Assim como o soxhlet, trata-se de uma metodologia simples, no entanto, as etapas de repetição com novas porções de solvente aumentam o custo e também a quantidade de resíduos gerados.

Extração em fase sólida (SPE), um método para matrizes aquosas, desenvolvido para substituir a extração líquido-líquido, pode ser encontrado na forma de discos ou cartuchos que contém material sorvente como sílica, florissil, alumina, C18. Os analitos são adsorvidos no material do disco ou da coluna e eluídos posteriormente usando um líquido ou fluido, ou por dessorção térmica. O processo ocorre pela filtração a vácuo da amostra (POOLE; POOLE, 2012; SCHENCK; LEHOTAY, 2000; USEPA, 2007b).

A extração líquida pressurizada (PLE), também conhecida por extração acelerada por solvente (ASE) ou ainda, extração por fluido pressurizado, utiliza solvente orgânico em temperatura elevada (100 a 180°C) e sob pressão de 1500-2000 psi, fornecido por um dispositivo. A solubilidade dos analitos é facilitada pela alta temperatura e a pressão é necessária para manter o solvente líquido (KIM et al., 2020; SANDER et al., 2017; USEPA, 2007c).

Extração por fluido supercrítico (SFE) semelhante ao PLE, mas ao invés de utilizar um solvente, se utiliza um fluido (por exemplo, CO₂, devido a seu ponto crítico baixo: 73 atm e 31°C) para fazer a extração. Contudo, em ambas as técnicas, os analitos precisam ser termicamente estáveis (KIM et al., 2020; SCHENCK; LEHOTAY, 2000; USEPA, 1996c).

Extração por microndas é um procedimento para compostos insolúveis ou ligeiramente solúveis em água. A energia das microndas produz temperatura em torno de 100 a 115°C e pressão entre 50 – 175 psi, em frasco fechado contendo a amostra e o solvente. O aumento de pressão e temperatura faz com que os analitos sejam separados dos sítios ativos da matriz da amostra, particionados para o solvente. A eficiência do método se dá pelas propriedades do solvente e a estrutura da matriz, podendo ser realizadas várias extrações ao mesmo tempo (LLOMPART et al., 2018; REHMAN et al., 2020; USEPA, 2007d).

Sonicação também pode ser utilizada como técnica de extração. A radiação ultrassônica produz cavitação no solvente, pequenas bolhas de vácuo que sofrem implosão resultando em alta temperatura e pressão. A radiação ultrassom é fornecida por sonda, banho ou microplacas (ALBERO; TADEO; PÉREZ, 2019a; KIM et al., 2020; USEPA, 2007e).

Método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) acontece em sistema fechado, onde o analista não fica exposto durante o procedimento de extração. O método requer pouca quantidade de amostra, quando comparado a outras metodologias. Tem como princípio de extração, a partição via *salting-out* que promove um equilíbrio entre a fase orgânica e a fase aquosa da amostra hidratada na presença de cloreto de sódio. São necessárias etapas de agitação em vortex para promover o contato entre os reagentes e a amostra, seguido de centrifugação. O solvente orgânico utilizado requer volume menores (10 mL). Variações no pH de extração foram aplicados por meio da adição de sais citrato, para extração de pesticidas. A simplicidade e dinamicidade, atraiu a atenção da comunidade científica para seu uso em diferentes matrizes. Contudo, a efetividade desse método depende das propriedades do analito e composição da matriz, necessitando de modificações.

Extração por partição a baixa temperatura (PBT), essa técnica vem ganhando espaço dentre os processos de preparo de amostras na extração de compostos orgânicos. Primeiros relatos de seu uso foram para remoção de compostos gordurosos do extrato da amostra (JUHLER, 1997). Outros trabalhos utilizaram a precipitação a baixa temperatura (PBT) para separação entre a fase aquosa e fase orgânica de uma extração líquido-líquido (GOULART et al., 2010a; MAGALHÃES et al., 2012; VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007).

2.3.1 Técnicas para Limpeza do Extrato da Amostra

O objetivo do processo de extração é a obtenção dos analitos em uma fase compatível com o sistema de quantificação, chamado de extrato da amostra. Em todos os métodos apresentados, analitos de interesse e interferentes da matriz estão presentes no extrato final, o que dificulta a análise dos compostos alvos diretamente ocasionando erros na quantificação, além de possíveis problemas instrumentais. Nesse caso, uma etapa de limpeza se faz necessária.

A técnica SPE, além de ser utilizada para extração, também é comumente aplicada nas etapas de limpeza dos extratos. Uma variação dessa técnica é a extração em fase sólida dispersiva (d-spe). Ambas utilizam sorventes como, alumina, sílica nua (sem ligantes), silicato de magnésio ativado (florisil®), etilenodiamino-n-propilsilano (PSA), negro de carbono grafitado (GBC), sílica octadecilsilano (C18), zircônia ligada à sílica (Z-Sep®) e sorventes polares poliméricos (FONTANALS et al., 2021; SCHENCK; LEHOTAY, 2000; SCHENCK; LEHOTAY; VEGA, 2002).

Na d-spe, os sorventes são adicionados no extrato da amostra, a dispersão favorece seu contato com os interferentes, não sendo necessário o uso de cartuchos ou discos como na SPE.

A centrifugação em baixa temperatura, particionamento líquido-líquido e cromatografia de permeação em gel são também procedimentos para limpeza de extrato, aplicadas principalmente para amostras com teor de lipídeos elevado (MARTINS et al., 2013).

Contudo, devido a especificidade, complexidade das matrizes e o impacto ambiental, os métodos originais necessitam de modificação ou otimização. Além disso, fatores como quantidade de reagentes, geração de resíduos, custo e esforço do operador têm sido levados em consideração nesse processo, pois impactam diretamente no custo da análise, bem como no potencial verde.

2.3.2 Método de Extração por Ultrassom

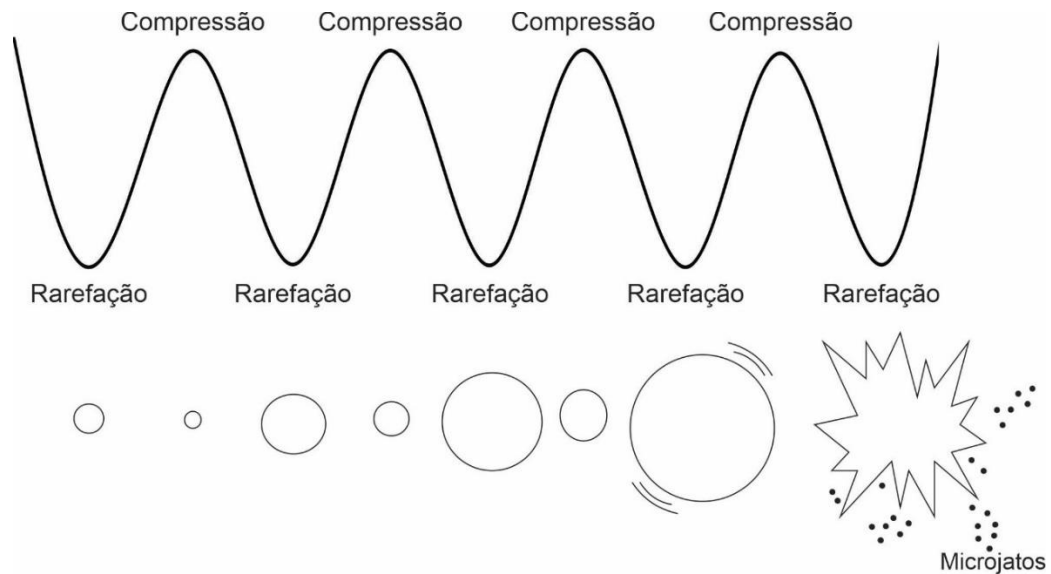
Uma técnica em destaque, do ponto de vista da química analítica verde, é a extração por ultrassom. Essa técnica apresenta simplicidade e baixo custo, não necessita de vários reagentes para o processo de extração, pois o contato entre o solvente e a matriz é intensificado pela cavitação gerada pelas ondas sonoras (ARMENTA et al., 2019).

As ondas sonoras são divididas em três faixas de frequência: as ondas audíveis (10 Hz–20 kHz), ondas infrassônicas (<16 Hz) e ultrassônicas (>20 kHz até 10 MHz), sendo que os efeitos físicos e químicos dependem da frequência. De 20-100 kHz, a frequência é considerada baixa, resultando em efeitos físicos. De 200-500 kHz, as frequências são consideradas altas e geram efeitos químicos (PICÓ, 2013; TIWARI, 2015).

A sonicação é eficiente para aumentar o contato entre o sólido e o solvente extrator devido aos fenômenos físicos decorrentes como a agitação, vibração, pressão, ondas de choque, forças de cisalhamento, micro jatos, compressão e rarefação, transmissão acústica, cavitação e formação de radicais, o que resulta em recuperação aceitável do analito (TIWARI, 2015).

Ondas longitudinais são geradas por um transdutor, resultando em ciclos nos quais há momentos de pressão máxima e mínima formando bolhas que sofrem expansão e compressão durante o ciclo da onda, como representado na figura 4.

Figura 4 - Representação da cavitação acústica



Fonte: adaptado de PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84–99, fev. 2013.

Um ponto crítico na compressão da bolha gera a colisão das moléculas, aumentando a temperatura (em torno de 5500 °C) e pressão (493,5 atm), o que faz com que a bolha sofra um colapso, resultando em uma implosão. Esse processo de expansão, compressão e implosão é chamado de cavitação acústica (ALBERO; TADEO; PÉREZ, 2019b; PICÓ, 2013; SORIA; VILLAMIEL, 2010; TIWARI, 2015).

A intensidade alta do colapso gera micro jatos na superfície da amostra fazendo com que aconteça um rompimento na parede celular, aumentando o contato do solvente com a matriz da amostra e conseqüentemente, a transferência de massa dos constituintes solúveis ao solvente, como observado em amostras de tecidos vegetais (PICÓ, 2013; TOMA et al., 2001).

O uso do ultrassom na extração requer tempo longo ou repetição de ciclos, como mostram estudos em que os tempos de extração de 10 minutos, 15 min. e 20 min., foram utilizados em dois ciclos, ou um ciclo, mas por 30 minutos. Esses trabalhos relataram que o aumento do número de ciclos também levou a um aumento no consumo do solvente extrator, uma vez que cada ciclo requer uma nova quantidade (JUMEPANG et al., 2020; KUNENE; MAHLAMBI, 2020; LEE et al., 2020; MARTÍNEZ-PARREÑO; LLORCA-PÓRCEL; VALOR, 2008; VAGI et al., 2007).

2.3.3 Modificações no Método de Ultrassom

Alguns estudos utilizaram a extração por ultrassom adaptada para análise de OCPs em matrizes sólidas, tais como, sedimentos marinhos (VAGI et al., 2007), solo (CUI et al., 2011; JUMEPANG et al., 2020; MARTÍNEZ-PARREÑO; LLORCA-PÓRCEL; VALOR, 2008; TOMAZINI et al., 2020), tabaco (QI et al., 2014), mexilhão (LEE et al., 2020) e chá (SAJID; ALHOOSHANI, 2020).

Nos trabalhos de Cui et al. (2011) e Tomazini et al. (2020), para amostras de solo, a etapa de sonicação foi de 2 ciclos de 10 min e 2 ciclos de 15 min respectivamente. Seguidos de centrifugação e limpeza do extrato por SPE florisil. As recuperações alcançadas nesses estudos foram respectivamente de 70 a 117% para HCHs e DDTs, 81 a 108% para fipronil e seus metabolitos.

Outros trabalhos apresentaram modificações na etapa de limpeza do extrato após sonicação.

Martínez-Parreño; Llorca-Pórcel; Valor (2008) propuseram um método de extração para 51 poluentes orgânicos persistentes, dentre eles OCPs, bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e difeniléteres polibromados (PBDEs) em amostras de materiais de referência certificados de solo. Os autores relatam a extração multiresíduo utilizando 15 mL de metanol e sonicação por 30 min. Após o processo de sonicação, foi adicionado água ao extrato, seguido de agitação utilizando barra magnética coberta com polidimetilsiloxano (PDMS) por 14h a 900 rpm em temperatura ambiente. As barras de agitação foram analisadas por

espectrometria de massa de dessorção térmica em 280°C por 6 min. Os analitos foram transferidos para uma coluna cromatográfica para análise, obtendo recuperações de 62 a 87% para OCPs.

Sajid; Alhooshani (2020) realizaram extração de OCPs em amostras de chá utilizando ultrassom. A amostra foi acondicionada em uma membrana de polipropileno, imerso em 1,25 mL de hexano dentro de um frasco de vidro, sonificado por 60 min. Após a sonicação, o extrato foi seco e reconstituído em 0,1 mL de hexano, seguido de análise cromatográfica. O método obteve recuperações de 86 a 100%.

Apesar do ultrassom ser uma tecnologia verde para extração de OCPs, e já existirem algumas modificações, verifica-se que um ponto importante a ser considerado é o tempo de extração, pois dependendo da matriz pode chegar até a uma hora (TIWARI, 2015).

Outro ponto que precisa de atenção é a etapa de limpeza após a extração por ultrassom. Além dos compostos de interesse, há também a extração de compostos da matriz que interferirão na análise e precisam ser removidos antes da análise do extrato.

2.3.4 Método de Extração por Partição em Baixa Temperatura (PBT)

A PBT, quando utilizada em matrizes aquosas, consiste da adição de um solvente orgânico miscível e posterior repouso em temperatura de aproximadamente -20°C.

É comum a adição de água além de um solvente extrator miscível e menos denso que a água no caso de matrizes sólidas. Estudos mostram que a proporção volume de água adicionada e volume do solvente extrator para uma boa eficiência na separação de fases é relatada na literatura como sendo de 1:2 para diferentes analitos e matrizes e que a ACN é o solvente mais utilizado (DE SOUZA SANTOS CHEIBUB; SILVA BAHIENSE DE LYRA; PEREIRA NETTO, 2019; FREITAS et al., 2014; GOULART et al., 2010b). O contato entre a fase líquida e a fase sólida é favorecida por meio de agitação sendo por vortex, mesa agitadora, centrifugação e/ou ultrassom e, posteriormente, submetida a baixa temperatura (-20°C) por aproximadamente 12h. Nesta etapa, há congelamento da fase aquosa com a amostra e a migração dos analitos para a fase orgânica, a qual será retirada e posteriormente analisada (FREITAS et al., 2014).

Há também estudos que apresentam boas recuperações sem a adição de água na amostra, como, por exemplo, na extração de herbicidas em amostras de cenoura alcançando recuperações de 90 a 110% (ARAÚJO et al., 2016), pesticidas em óleo de algodão e amendoim com 53 a 89% de recuperação (CHAWLA et al., 2016), fungicidas em pimentão com 97 a 108 % de recuperações para azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol (HELENO et al., 2019), drogas veterinárias com 67,3% a 106,9% de recuperação (XIE et al., 2015) e disruptores endócrinos com 73,5–119,2 % de recuperação em laticínios (SHI et al., 2017). Nesses casos, na amostra foi adicionado o solvente extrator, submetido a agitação e seguido de repouso a baixa temperatura.

2.3.5 Aplicações da Precipitação a Baixa Temperatura

Devido a sua simplicidade, muitos estudos têm utilizado essa técnica como etapa de limpeza ou como extração em diversas matrizes e diferentes analitos. Por exemplo, na determinação de piretroides em amostras de leite, Goulart et al. (2008) utilizaram 8 mL de acetonitrila seguidos de 20 minutos de agitação a 175 rpm seguido de 12h a -20 °C e, posteriormente, filtração com sulfato de sódio. As recuperações foram de 93 % para cipermetrina e 84 % para deltametrina.

Inseticidas (clorpirifós, cialotrina, cipermetrina e deltametrina) em amostras de tomate foram extraídas utilizando 8 mL de ACN e 1,5 mL de acetato de etila, 1 min de ultrassom e 6 h a -20 °C, por fim filtrado com sulfato de sódio anidro. As recuperações foram de 79 a 97 % (PINHO et al., 2010).

Rigueira et al. (2013) extraíram clorpirifós e tiametoxam de amostras de batata, com 4 mL de água, 6,5 mL de ACN e 1,5 mL de acetato de etila, por 45 min de agitação e 12 h em -20 °C filtrado com sulfato de sódio anidro. As recuperações foram de 93 % e 105 %.

Amostras de milho foram submetidas por 3 h a -20 °C, após agitação em vortex durante 1 min com 4,0 mL de água e 8,0 mL de ACN seguido de filtração com sulfato de sódio anidro. As recuperações foram de 104 % para bifentrina (FREITAS et al., 2014).

Morais et al. (2014) determinaram tiametoxam, triadimenol e deltametrina em abacaxi. A amostra com 7 mL de ACN, 1,5 mL de acetato de etila e 1,5 mL de água foi agitado por 10 min seguido de 12 h em -20 °C, filtrado com sulfato de sódio anidro e florisil. As recuperações foram de 92,3 a 105,5 %.

Inseticidas fosforados e endosulfan foram extraídos de amostras de alface com ACN: acetato de etila: água (6,5:1,5:1,0), agitado por 10 min a 200 rpm, 3 min de centrifugação, 3h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e filtrado com sulfato de sódio anidro. Obtiveram recuperações de 72,3 – 103,2 % (COSTA et al., 2015).

Santana et al. (2018) determinaram chlorpyrifos, thiabendazole, carboxin, and difenoconazole em amostras de manga, utilizando água:ACN (4:6), agitação de 1 min em vortex, 5 min em temperatura ambiente e 1h30 a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A etapa de limpeza foi realizada com Si(PDAS), C18 e PSA. As recuperações alcançaram faixas de 75,3–129,3 %.

Ambrosio et al. (2022) determinaram fipronil em cascas de ovo de tartaruga, com 0,5 mL de água e 2,15 mL de ACN, 1 min em vortex, mantido por 4,5 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As recuperações foram de 71.4 –104.2 %.

Guedes et al. (2014) utilizaram PBT em amostras de morango, com 4 mL de ACN, 15 min de agitação em 200 rpm, 4 min de centrifugação e 9h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As recuperações foram de 79-111 % para os 11 pesticidas (azoxistrobina, bifentrina, cipermetrina, clorotalonil, clorpirifos, difenoconazol, endosulfan, iprodiona, λ -cialotrina e permetrina).

Ovos de jacaré foram utilizados na determinação de PCB e OCPs (DDT, DDE, DDD, endosulfan e seus metabólitos). Os autores utilizaram 4 mL de água e 12 mL de ACN, 5 min de vortex, 5 min de centrifugação e 12 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Obtendo 61 % de recuperação para os analitos (SOUSA et al., 2014).

Araujo et al. (2016) determinaram em cenoura, Haloxyfop-Metil, Linuron e Procimidona, com 4 mL de ACN, 10 min em vortex, 10 min de centrifugação e 4 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Obtendo 90 a 110 % de recuperação.

Bernardi et al. (2016), validaram um método para 55 pesticidas sendo o OCP heptachloro endo/exo e endrin cetona, utilizando o método QuEChERS com 3 h a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e limpeza por d-spe (PSA/C18/MgSO₄/GBC), com recuperações de 63 a 161 %.

Óleo de algodão e amendoim foram tratados com 10 mL de ACN, agitados por 1 min e centrifugadas por 5 min, 1h30 a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. A limpeza foi realizada com d-spe e concentrada em fluxo de nitrogênio. As recuperações foram de 77 a 89 % para 87 pesticidas (CHAWLA et al., 2016).

Outros analitos como os fármacos benzodiazepínicos e antibióticos também foram extraídos utilizando PBT em amostras de urina, com a proporção urina:ACN (1:1) com NaCl e 1 h a -20°C , com recuperações de 72,3 % a 117 % (MAGALHÃES

et al., 2012). Em amostras de água, Barros et al. (2018) determinaram ativos farmacêuticos utilizando 4 mL de amostra com 3 mL de ACN, 30 s de vortex e 3 h a -20 °C, o processo foi repetido por 3 vezes. O extrato final foi evaporado e ressuspendido. As recuperações foram de 46 a 135 %.

Cunha et al. (2021) também utilizaram PBT para extração de antibióticos em efluente, usando 7 mL de amostra e 3 mL de ACN, 30 s de vortex, 30 min de centrifugação e 5 h a -20 °C. O sobrenadante foi seco e resuspenso em metanol. As recuperações foram de 13,9 % (sulfadiazina), 48,9 % (eritromicina), 19,1 % (sulfadiazina) e 57,2 % (ciprofloxacina).

A versatilidade da técnica de PBT permite modificações, como, por exemplo, o tempo de exposição da amostra à baixa temperatura, a variação de temperatura, tipo de agitação e também, da possibilidade de exclusão da etapa de limpeza.

2.4 PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO

Toda metodologia analítica, para ser considerada confiável, precisa passar pelo processo de validação analítica para o propósito a que se destina. Sabe-se que toda análise é acompanhada de incertezas advindas de erros aleatórios que precisam ser determinadas e explicadas.

A validação de uma metodologia é a demonstração experimental da adequação de um método analítico, o que garante que as medições em análises de rotina sejam próximas o suficiente do valor verdadeiro, porém desconhecido, de um analito em determinada amostra, a validação é indispensável para obtenção de resultados confiáveis (KRUVE et al., 2015a, 2015b; RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020).

No Brasil, os órgãos reguladores que apresentam guias para validação de métodos analíticos com base em documentos internacionais, são:

- (1) Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro (CGCRE)
- (2) Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA)
- (3) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

No âmbito internacional, os guias em destaque são:

- (1) Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC)
- (2) Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM)
- (3) Comitê Europeu de Normalização (CEN)

- (4) Química Analítica na Europa (EURACHEM).
- (5) Conselho Internacional para Harmonização (ICH)
- (6) União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC)
- (7) Associação Nacional de Autoridades de Teste – Austrália (NATA)
- (8) Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE)
- (9) Direção Geral da Saúde e Segurança Alimentar (SANTE)
- (10) Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA)
- (11) Farmacopeia dos Estados Unidos (USP)
- (12) Organização mundial da saúde (OMS).

Como não há um guia universal, a escolha dependerá de requisitos analíticos, como, por exemplo, a matriz e a área em que o método será aplicado (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020; TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

Os métodos que devem passar pelo processo de validação são: métodos não normalizados, métodos desenvolvidos, métodos normalizados usados fora do escopo e modificações/otimizações de métodos normalizados (INMETRO, 2020).

Para validação de metodologia, alguns parâmetros de desempenho são avaliados, como efeito matriz, precisão, exatidão, linearidade, faixa de operação, recuperação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), sensibilidade e robustez.

2.4.1 Efeito Matriz (EM)

No processo de extração do analito da amostra, outros compostos também são extraídos da matriz, fazendo parte do extrato final. A etapa de limpeza do extrato é de extrema importância na remoção desses compostos que podem atuar como o analito no sistema de determinação, fazendo com que o sinal do analito possa ser intensificado ou reduzido, esse processo é chamado de efeito matriz e pode comprometer o resultado final, se não for levado em consideração (DE SOUSA et al., 2012; ERNEY et al., 1993; RAPOSO; BARCELÓ, 2021).

Por mais eficiente que a etapa de limpeza seja, ainda não há relatos de eliminação total do EM, no entanto é preciso estratégias para minimizar esse efeito (RAHMAN; ABD EL-ATY; SHIM, 2013; RAPOSO; BARCELÓ, 2021). As estratégias usadas para minimização do EM são: procedimento de extração seletivo, etapa de limpeza da amostra mais extenso, evitar concentração dos componentes pois

aumenta o EM e diluição da amostra (DE SOUSA et al., 2012; FERRER et al., 2011; KRUIVE et al., 2015a, 2015b).

A tática para minimização do EM mais utilizada é o processo de elaboração da curva analítica de analito combinado com a matriz da amostra. Esse processo faz com que sítios ativos do sistema de cromatografia sejam ocupados por compostos da matriz, fazendo que não estejam disponíveis para os analitos em foco (KRUIVE; LEITO, 2013; RAHMAN; ABD EL-ATY; SHIM, 2013; SCHENCK; LEHOTAY, 2000).

A determinação do efeito matriz em um método é realizada comparando a inclinação da curva analítica de pelo menos um analito em solução de solvente puro com a inclinação do mesmo analito da curva analítica em solução do extrato da matriz. O efeito da matriz é expresso em porcentagem que pode ser obtido pela equação 1 (SANTE, 2021).

$$\text{EM (\%)} = \left(\frac{\text{inclinação na matriz}}{\text{inclinação no solvente}} * 100 \right) - 100 \quad (1)$$

O efeito matriz é considerado significativo se o valor obtido pela eq. 1 exceder $\pm 20\%$, pois se considera que essa variação é próxima dos valores de repetibilidade. Nesse caso, o EM pode apresentar um valor negativo, o que indica que houve supressão do sinal, se um efeito positivo seja apresentado, uma intensificação no sinal do analito é presenciada. (FERRER et al., 2011; RAPOSO; BARCELÓ, 2021; SANTE, 2021).

2.4.2 Linearidade

Curvas de calibração, linearidade, sensibilidade e faixa de trabalho, são termos utilizados para se referir a faixa de concentração e resposta do analito produzido pelo instrumento de análise.

A faixa de trabalho deve ser escolhida de acordo com as concentrações alvo, cobrindo uma faixa de interesse (IUPAC, 2002).

É gerada por meio de soluções do analito padrão em solvente ou no extrato da matriz, se confirmado a interferência dos componentes da matriz no sinal gerado pelo analito. A resposta do analito deve ser proporcional a sua concentração onde gerará uma curva analítica que pode ser ajustada pela equação da reta, sendo a

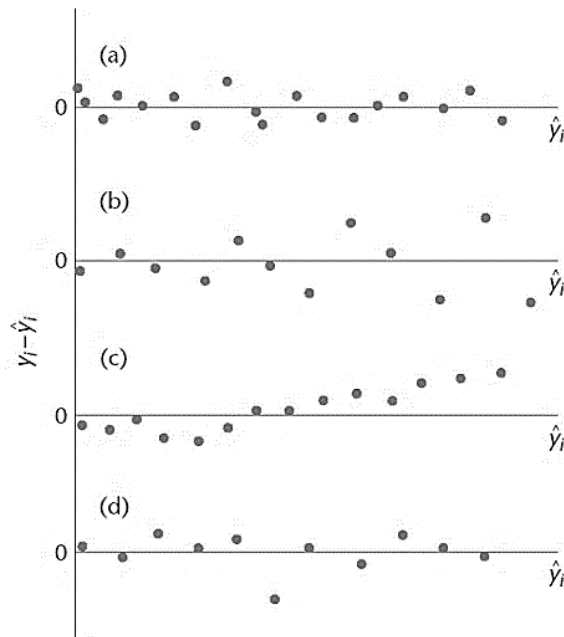
concentração do analito representada no eixo x e a resposta do sinal do analito no eixo y. A sensibilidade do método pode ser definida pela inclinação da reta gerada.

Os guias orientam que a faixa de trabalho seja composta de no mínimo 6 concentrações igualmente espaçadas, analisadas de maneira aleatória em no mínimo em duplicata ou triplicata, sendo preparadas independentemente, não apenas subalíquotas (EURACHEM, 2014; IUPAC, 2002; MAPA, 2011).

A avaliação da linearidade de um método, pode ser realizada visualmente pela observação da faixa gerada, contudo se não houver certeza, a análise deve ser continuada via testes estatísticos, como a homocedasticidade e a análise da aleatoriedade dos resíduos. Os desvios-padrão obtidos nas réplicas da curva analítica para cada concentração, devem ser estatisticamente iguais, sendo considerados homocedásticos. A igualdade desses valores se dá pelos testes de Cochran, Levene ou Brown-Forsythe (INMETRO, 2020; KRUIVE et al., 2015a, 2015b; MAPA, 2011; SANTE, 2021).

Se a curva analítica apresentar homocedasticidade, a equação da regressão linear pode ser calculada pelo método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados. Os resíduos obtidos devem ser representados graficamente, se apresentarem aleatoriedade confirma-se a linearidade da curva analítica. Contudo, se os resíduos apresentarem tendências sistemáticas, a linearidade não pode ser confirmada apenas pelos resíduos. A figura 5 esboça formas da dispersão de resíduos.

Figura 5 - Dispersão de resíduos de ajuste das respostas instrumentais em função da concentração.



Fonte: MAPA. **Manual de Garantia Analítica**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2018.

Na representação (a), são apresentados resíduos aleatórios indicando ajuste satisfatório e homocedasticidade. Na representação (b), os resíduos são dispersos de maneira crescente com a concentração, indicando heterocedasticidade. Na representação (c), observa-se uma tendência decrescente e em seguida crescente, indicando falta de linearidade. Na representação (d), há uma dispersão aleatória satisfatória, contudo, percebe-se a presença de um valor duvidoso (outlier) (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020; MAPA, 2011).

Os coeficientes de determinação (R^2) e correlação (r) do modelo da regressão linear, geralmente são utilizados como parâmetros para avaliar a linearidade, contudo, podem não ser conclusivos quando utilizados sozinhos (INMETRO, 2020; KRUBE et al., 2015a, 2015b; SANTE, 2021).

2.4.3 Limite de Detecção (LD)

É a menor quantidade do analito que pode ser distinguida de forma confiável do ruído da técnica instrumental, mas não necessariamente quantificada (AOAC, 2016; INMETRO, 2020; IUPAC, 2002; SANTE, 2021).

A obtenção do LD pode ser realizada de três formas, método visual, razão sinal/ruído (s/n) e pelo coeficiente angular da curva analítica (INMETRO, 2020; RIBEIRO et al., 2008).

O método visual consiste em sucessivas diluições de uma solução até se encontrar uma concentração que pode ser diferenciado do branco ou do ruído. Pela razão s/n, pode ser utilizado em técnicas analíticas que apresentem ruído na linha base, nesse caso a relação 3:1 ou 2:1 é utilizada. Quando utilizado os parâmetros da curva analítica, leva-se em consideração o intervalo de confiança da regressão, como mostra a equação 2.

$$LD = 3,3 s / b \quad (2)$$

O multiplicador 3,3 surge do valor de t de Student para infinitos graus de liberdade. O “s” significa o desvio padrão da resposta de repetições do branco ou do menor nível da curva analítica quando não há sinal no branco. O “b” é coeficiente angular obtido pela equação da reta na linearidade (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020; RIBEIRO et al., 2008).

2.4.4 Limite de Quantificação (LQ)

É a menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Para valores abaixo do LQ significa que o método analítico não opera com precisão. A obtenção do LQ pode ser realizada de três formas, método visual, razão sinal/ruído (s/n) e pelos parâmetros da curva analítica (AOAC, 2016; INMETRO, 2020; IUPAC, 2002; RIBEIRO et al., 2008; SANTE, 2021).

O método visual consiste em sucessivas diluições de uma solução até se encontrar uma concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de exatidão e precisão do método. Pela razão s/n, pode ser utilizado para procedimentos analíticos que apresentem ruído na linha base, nesse caso a relação 10:1 é considerada aceitável. Quando utilizado os parâmetros da curva analítica leva-se em consideração o intervalo de confiança da regressão de acordo com a equação 3.

$$LQ = 10 s / b \quad (3)$$

Assim como para o LD, o “s” significa o desvio padrão da resposta de repetições do branco ou do menor nível da curva analítica quando não sinal no branco. O “b” é coeficiente angular obtido pela equação da reta na linearidade. Utiliza-se um multiplicador de 10, contudo os valores 5 ou 6 também podem ser utilizados, mas são condicionados ao rigor analítico exigido. O valor de 10 definido arbitrariamente, segundo a IUPAC, corresponde a uma precisão de 10% no sinal, ou ainda, três vezes o valor do LD (EURACHEM, 2014; GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007; INMETRO, 2020; IUPAC, 2002; RIBEIRO et al., 2008).

2.4.5 Recuperação

O resultado da razão entre valores médios obtidos e valor verdadeiro em uma análise é considerado a recuperação do método em questão, representado na equação 4.

$$\text{Recuperação \%} = \left(\frac{\text{valor médio obtido}}{\text{valor médio de referência}} \right) * 100 \quad (4)$$

O valor verdadeiro ou valor de referência é decorrente de um material de referência certificado ou, na sua ausência, se utiliza matriz branca fortificada com concentração conhecida do analito em questão. Nesse caso, o MRC ou a matriz fortificada são tratadas com o método em questão e posteriormente analisadas pelo sistema de determinação (AOAC, 2016; IUPAC, 2002).

Se a matriz branca não estiver disponível devido a níveis naturais de fundo ou contaminações ambientais, as recuperações devem ser corrigidas e relatadas junto com as recuperações não corrigidas (SANTE, 2021). Nessa situação, utiliza-se a equação 5 para a obtenção da recuperação. Recomenda-se a análise em sextuplicata de três níveis, alta, média e baixa concentração da faixa de uso do método (INMETRO, 2020; MAPA, 2011).

$$\text{Recuperação \%} = \left(\frac{C1 - C2}{\text{valor médio } C3 \text{ de referência}} \right) * 100 \quad (5)$$

Onde:

C1: concentração do analito na amostra fortificada.

C2: concentração do analito na amostra não fortificada.

C3: concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

Quando se estima a recuperação por meio de amostras fortificadas, o uso de um composto substituto é recomendado para avaliar o desempenho do método. “Surrogate”, trata-se de uma substância que possua propriedades e estrutura semelhante ao analito em questão. Assim, ao invés de utilizar o padrão do analito, utiliza-se o padrão surrogate com concentração conhecida para a fortificação, determinando a recuperação do surrogate e não a do analito (RIBANI et al., 2004; USEPA, 2007a).

Faixas de recuperações aceitáveis são utilizadas para avaliar a efetividade da recuperação de determinado método, essas faixas dependem da concentração de trabalho. A faixa de recuperação se expande ao passo que a concentração do analito na amostra diminuiu (AOAC, 2016). Por exemplo, se o analito estiver em uma faixa de concentração em torno de 1 ppb, a faixa de recuperação aceitável será de 40 a 120% de recuperação, no entanto, se a concentração do analito estiver em torno de 100 ppb, a faixa de recuperação será de 80 a 110% de recuperação (AOAC, 2016; SANTE, 2021). Geralmente se almejam recuperações próximas a 100%, contudo deve ser levada em consideração a estrutura da matriz em que o analito se encontra e também a sensibilidade do método, com base nisso se utiliza faixa de recuperações aceitáveis.

2.4.6 Precisão

A precisão de um método, geralmente é expressa em termo de desvio padrão relativo (DPR) ou também chamado coeficiente de variação (CV), uma vez que a precisão é definida como a proximidade entre os resultados de testes utilizando o método que está sendo validado (AOAC, 2016; IUPAC, 2002).

Na avaliação da precisão aceitável de um método, há valores considerados como aceitáveis, os quais também são condicionados à concentração de analito na amostra, conforme essa concentração diminui a imprecisão, ou seja, o DPR aceitável aumenta. Como por exemplo, se o analito estiver em uma faixa de concentração em torno de 1 ppb, a precisão aceitável o DPR deverá ser menor ou igual a 30%, no entanto, se a concentração do analito estiver em torno de 100 ppb, a precisão aceitável o DPR deverá ser menor ou igual a 15% (AOAC, 2016; SANTE, 2021).

Orienta-se que a precisão seja calculada em uma faixa de 6 a 15 repetições, sendo o mínimo recomendado de 6, pois poucas repetições geram erros maiores, comprometendo a avaliação da precisão do método. Assim como a recuperação, a

precisão deve ser obtida em três níveis de concentração, alto, médio e baixo (EURACHEM, 2014). A precisão pode ser determinada pela equação 6.

$$\text{DPR} = \left(\frac{\text{Desvio padrão}}{\text{média}} \right) * 100 \quad (6)$$

A precisão pode ser expressa de três maneiras: repetitividade, obtida pela precisão intracorrída; precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial, obtida pela análise da mesma amostra, método e laboratório, mas com alteração em algumas condições, como, por exemplo, o dia de análise, analistas, condições ambientais; e reprodutibilidade interlaboratorial (INMETRO, 2020; MAPA, 2011; RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020).

2.4.7 Robustez

É definida como a capacidade do método em resistir a variações, como, por exemplo, mudanças de temperatura, composição da fase móvel (quando utiliza-se cromatografia), comprimento de onda de detecção, pH, outro laboratório, novo reagente (GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007; KRUIVE et al., 2015a, 2015b; RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020). Se o método resistir às alterações a que foi exposto, este é considerado robusto e as alterações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI et al., 2004).

2.4.8 Estudos de Determinação de Nicotina e OCPs em Tabaco com Base em Métodos Validados

Vários métodos de extração são utilizados na determinação de nicotina e OCPs em tabaco, no entanto não há relatos sobre uma quantidade mínima preconizada, assim, estudos sobre esses compostos podem fornecer informações úteis para órgãos de interesse.

Salimikia et al. (2018) determinaram a concentração de nicotina em três marcas de cigarros comerciais utilizando o procedimento de micro extração em fase sólida em *headspace* usando fibra nanocomposito de polianilina/óxido de grafeno. A detecção foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (HS-SPME-GC-FID). A validação foi realizada pelos autores com base na recuperação relativa de amostras de tabaco fortificadas com nicotina (70 ug g⁻¹),

obtendo 91,4 a 108,7%. A precisão foi baseada no DPR sendo intra-dia (n=6) e inter-dia (n = 5) 6,9 e 8,1%, respectivamente. A curva de calibração foi estabelecida combinada com a matriz livre de nicotina, na faixa de 0,05–700 $\mu\text{g g}^{-1}$ com coeficiente de determinação de 0,996 indicando boa linearidade. Os valores para LD e LQ foram de 0,01 e 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Rahman e col. (2012) determinaram a presença de resíduos de cipermetrina, diazinon, heptacloro, metoxicloro, difeniltricloroetano (DDT), diclorodifenildicloroetano (DDD) e diclorodifenildicloroetileno (DDE) em folhas de tabaco seco, utilizando HPLC-DAD. 5g de tabaco foram agitados por 12h em 150 rpm, com 100 mL de acetona, o extrato foi concentrado e dissolvido em ACN. A limpeza foi realizada em coluna de florisil. Nesse estudo, foram relatados apenas os parâmetros de recuperação que variaram entre 84,2 e 91% e os valores para LD e LQ para os OCPs na faixa de 0,01 a 0,30 ppm e 0,03 a 0,10 ppm, respectivamente. Os autores concluem que o método é adequado para análise de acordo com a diretriz da FDA (Guidance for industry: bioanalytical method validation, 2001). DDT foi encontrado na concentração de 4,0 ppm em uma amostra, os demais ocps não foram detectados.

Badr et al. (2012) determinaram nicotina em tabaco de cigarro utilizando solução de amônia com diclorometano, sonicados por 4 min e agitados por 2 min, deixado em repouso por 10 min para separação de fase. O procedimento foi repetido duas vezes, os extratos foram unidos e evaporados e, posteriormente, redissolvidos em metanol, os extratos foram analisados por um densitômetro de varredura (TLC Scanner 4 Camag). A validação do método foi baseada nos estudos de linearidade por meio da curva de calibração com nove pontos em triplicata na faixa de 0,1 a 1 mg mL⁻¹, obtendo um R² igual a 0,9982. A seletividade foi avaliada pelo densitograma de varredura obtido de uma amostra representativa. A precisão do método foi avaliada em termo de DPR da determinação de seis concentrações diferentes em triplicata, obtendo o valor de 2,02%. A recuperação foi validada utilizando amostras fortificadas em duplicata, os valores obtidos foram de 97 – 98%. LD e LQ foram baseados na razão S/N de 3 e 10, tendo como valores 0,008 mg mL⁻¹ e 0,02 mg mL⁻¹, respectivamente. A robustez foi determinada por variações em parâmetros do sistema de análise obtendo DPR de < 2% entre as variações.

Hossain; Salehuddin (2013) determinaram a concentração de nicotina em três tipos diferentes de tabaco, utilizando 5 mL de metanol e 30 min de sonicação, repetindo esse processo 3 x. A quantidade total de extrato foi evaporada e

ressuspendida. A limpeza foi realizada em uma coluna com algodão sílica gel ativada e sulfato de sódio anidro. A eluição foi realizada com 6 mL de solvente evaporado e reconcentrado com 2 mL. Os autores relatam boa linearidade na faixa de 5 – 1000 ng, porém não apresentam o valor para R^2 ou outros parâmetros além da faixa de concentração utilizada. A precisão foi estudada com soluções de nicotina determinadas seis vezes no mesmo dia e, depois de um período de seis dias, os resultados apontaram boa precisão na faixa de 5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as porcentagens referentes ao DPR também não foram apresentadas. A recuperação foi determinada em três concentrações (5, 50 e 100 ng), os autores apresentam a faixa de recuperação de 83 a 96%. O LD foi obtido pela razão S/N igual a 3, sendo o valor de 2,5 ng. O valor para LQ não foi apresentado. A análise aconteceu em CG-MS detectando de 0,9 a 3,6% de nicotina em folha de tabaco.

Chen et al. (2013) utilizaram o método QuEChERS para determinar 159 pesticidas em 118 amostras de tabaco, dentre eles os OCPs: alfa-HCH, beta- HCH, gama- HCH (Lindano), delta- HCH, heptacloro, aldrin, isômero heptacloro epoxido, endosulfan I (alfa), DDE, dieldrin, endrin, endosulfan II (beta), DDD, endosulfan sulfato, DDT, Cis/trans clordano, e metoxicloro. 2g de tabaco pulverizado com 10 mL de água agitado por 30s em vortex e 10 min de repouso para hidratação, seguido da adição de 10 mL de acetonitrila e 2 min em vortex, 10 min a -20°C . 4 g de MgSO_4 , 1 g de NaCl, 1 g de $\text{Na}_3\text{Cit}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g de $\text{Na}_2\text{HCit}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados e agitados por 30 s. Adicionou-se mais 5 mL de tolueno e o tubo foi agitado em vórtex por 2 min, a etapa de centrifugação foi omitida, pois os autores relataram quantidade de sobrenadante suficiente após a agitação em vórtex. 1 mL do extrato com 150 mg de MgSO_4 , 50 mg de PSA e 50 mg de C18 foi agitada em vórtex por 2 min e centrifugada por 5 min. Após a centrifugação, o extrato foi analisado em GC-MS. A validação foi definida pelos parâmetros de linearidade por meio da curva de calibração com sete pontos em uma faixa de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, com coeficiente de determinação $> 0,999$. A recuperação foi determinada por seis réplicas de amostra fortificadas em três níveis de concentração (50, 250 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$) alcançando valores de 73 a 111%. O DPR também foi determinado nos três níveis em seis réplicas obtendo valores de 3 a 15%. LD foi avaliado pela injeção de solução padrão de 0,5; 1;2 e 5 ng mL^{-1} , sendo a concentração que alcançou a razão S/N igual a 3, os valores ficaram definidos em 5 – 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O LQ foi definido como a concentração mínima de analito quantificado em recuperação e precisão aceitável, os valores nesse estudo foram de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$

para todos os OCPs. Os autores relatam o uso da diretriz SANCO/12495/2011 no processo de validação. Endosulfan I foi detectado em uma amostra ($0,19 \text{ mg kg}^{-1}$), Endosulfan II ($0,005$ a $3,40 \text{ mg kg}^{-1}$) e endosulfan sulfato ($0,05$ a $0,65 \text{ mg kg}^{-1}$) foram detectados em 12 amostras.

Ghosh e col. (2014) avaliaram resíduos de OCPs (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, 2,4-DDT, 4,4-DDT, endrin, α -endosulfan, β -endosulfan e endosulfan sulfato) em 152 amostras de folhas de tabaco seco por combustão utilizando CG-MS. As folhas de tabaco foram pulverizadas e 1g foi utilizado com 20 mL de ACN:água (1:1) agitado por 45 min em shaker a 150 rpm e filtrado. O filtrado foi particionado com 40 mL de hexano e a fração colorida foi coletada para limpeza em coluna de florisil e Na_2SO_4 , os analitos foram eluídos com hexano, evaporado e dissolvidos em Hexano, analisados por CG-MS. Para validação do método proposto, os autores utilizaram curva de calibração em solvente e combinada com a matriz em seis níveis na faixa de $0,005$ a $0,25 \text{ mg L}^{-1}$, obtendo o $R^2 > 0,99$, usando esse parâmetro para a conclusão de boa linearidade para o método. A sensibilidade foi avaliada em termos de limite de quantificação. O LQ é a concentração na qual o S/N é ≥ 10 no extrato da matriz, os valores obtidos foram de $0,006$ a $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$. A recuperação foi estudada a $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ de nível de fortificação com seis repetições, obtendo porcentagens de 72 a 108 com DPR menor que 15%. O efeito matriz foi avaliado a um nível de fortificação de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$. A área do pico dos OCPs em solvente foi comparada com a área no extrato da matriz no mesmo nível de concentração. Um valor negativo de ME (%) indica supressões de sinal induzidas pela matriz, enquanto um valor indica aprimoramento no sinal. O EM apresentou valores positivos variando de 14,4 a 39,6%. Os autores relatam o uso dos referenciais como EURACHEM/CITAC Guide CG4 (2000) para a etapa de validação. As concentrações encontradas nesse estudo foram, DDT $0,05$ a $0,12 \text{ mg kg}^{-1}$, HCH $0,02$ a $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$, $0,06$ a $0,16 \text{ mg kg}^{-1}$, endrin foi detectado abaixo de limite de quantificação.

Khan et al. (2014) modificaram o método QuEChERS para determinar 47 pesticidas em tabaco, dentre eles os OCPs alfa- HCH, beta- HCH, gama- HCH (Lindano), delta- HCH, heptacloro, aldrin, isômero heptacloro epoxido, endosulfan I (alfa), DDE, dieldrin, endrin, endosulfan II (beta), DDD, endosulfan sulfato, DDT, Cis clordano por CG-MS/MS. 2 g de tabaco foi homogeneizado com 18 mL de água, extraído com 10 mL acetato de etila e 10g de Na_2SO_4 . A mistura foi homogeneizada em 15000 rpm por 2 min, seguido de 5 min de centrifugação a 5000 rpm. 1 mL de

tolueno foi adicionado a 3 mL do extrato, a limpeza seguiu com d-SPE (150 mg PSA + 150 mgC18 + 75 mg GCB + 300 mg MgSO₄) e filtração em membrana PTFE. Os autores validaram o método com base nas diretrizes da DG-SANCO. As curvas de calibração combinadas com solvente e matriz dentro de 5–250 ng/mL, obtendo o valor para $R^2 > 0,99$. LOD e LOQs foram determinados considerando uma relação sinal-ruído (S/N) de 3 e 10, sendo os valores de 3 e 4 ng g⁻¹ e 7,5 a 10 ng g⁻¹, respectivamente. A precisão intra-dia (n = 6) e precisão inter-dia (n = 6) foi determinada em 100 ng/g sendo obtidos valores de DPR 2 a 13%. Os experimentos de recuperação foram realizados fortificando a matriz em branco (n = 6) com a mistura de pesticidas separadamente a 50, 70 e 100 ng/g, obtendo recuperações na faixa de 71 a 113%. EM foi calculado considerando a área do pico em solvente e no extrato da matriz, variando de 25 a 90% para a maioria dos pesticidas estudados, incluindo aumentos de sinal induzidos pela matriz (>50% para 4% de pesticidas) e supressões (>50% para 34% de pesticidas). OCPs não foram detectados nas amostras analisadas, apenas os pesticidas captan e fluvalinato.

Luo et al. (2015) analisaram 26 pesticidas em três amostras de tabaco utilizando método QuEChERS modificado com grafeno magnético por cromatografia de permeação em gel on-line-cromatografia gasosa/espectrometria de massa em tandem (on-line GPC–GC–MS²). 10 mL de água foi adicionado a 2g de tabaco agitado por 30 s e repouso de 10 min. Sequencialmente, 10 mL de ACN foram adicionados agitado por 2 min e levado ao freezer por 10 min a -20 °C. Foram adicionados à mistura 5 mL de tolueno e agitado por 2 min, centrifugado a 4000 rpm por 5 min. A limpeza de 0,5 mL de extrato foi realizada com 0,08 g de grafeno magnético, a mistura foi agitada por 1 min. O sobrenadante foi fornecido ao GPC–GC–MS² on-line para análise. A validação foi realizada pelos autores de acordo com os parâmetros, linearidade foi realizada por meio da análise de regressão linear obtendo um valor de R^2 igual 0,9999, as faixas de concentrações variaram para cada analito sendo a menor concentração de 5,1 e a maior 1950 ng g⁻¹. Os LDs e LQs foram calculados como a concentração correspondente aos sinais de 3 e 10 vezes o desvio padrão do ruído de linha de base, respectivamente, os valores obtidos foram de 0,057 a 3,150 ng g⁻¹ para o LD e 0,19 a 10,5 ng g⁻¹ para o LQ. As recuperações absolutas de analitos alvo foram calculados comparando as áreas do extrato fortificado para as obtidas da solução padrão na mesma concentração (10 vezes a menor ponto de concentração da faixa linear individual), as porcentagens variaram de 43 a 85. A reprodutibilidade do método foi

determinada por precisões com base no DPR, sendo avaliado em intra (n=4) e inter-dias (n = 3), foram calculados com os OCPs em três diferentes níveis de concentração (2, 10 e 100 vezes do ponto de concentração mais baixo da faixa linear individual), os DPR variaram de 0,1 a 11,1% no estudo intra-dia e 0,6 a 15 % inter-dia. Os autores relatam que a curva de calibração foi combinada com a matriz, pois a determinação dos OCPs foi influenciada por coextrativos da matriz, contudo não citam efeito matriz no estudo diretamente. Nas amostras analisadas, foram encontrados: DDE < LQ; DDD = 24,00 ng g⁻¹; DDT = 315,8 ng g⁻¹; heptacloro = 50,25 ng g⁻¹; endosulfan sulfato = 1006 ng g⁻¹.

Hao, Li e Lin (2017) utilizaram extração assistida por microndas para determinação de pesticidas organoclorados (α - HCH, β - HCH, γ - HCH, δ - HCH, p,p-DDE, endrin, p,p-DDD, p,p-DDT) e organofosforados em tabaco (folhas e cigarros) por CG-MS. 10 mL de acetonitrila com 0,5 g NaCl foram adicionados a 1g de tabaco seco. A extração em microndas foi realizada a 30°C por 10 min em 800 W. A limpeza do extrato foi realizada em SPE cartucho NH₂. A linearidade foi avaliada pelo valor de R² que apresentou valores de 0,999 na faixa de 0,02 a 2 ug mL⁻¹. A recuperação e precisão foram realizadas em três níveis de concentração (0,5; 1 e 2 mg kg⁻¹) obtendo recuperações de 70,7 a 106,1 % e DPR de 2,63 a 9,10%. O LD foi avaliado pela razão S/N igual a 3, obtendo valores de 0,001 a 0,020 ug mL⁻¹. Valores de LQ não foram descritos no trabalho. As concentrações encontradas nas amostras foram de β - HCH = 0,49 mg kg⁻¹ para folhas de tabaco, δ - HCH = 0,03 mg kg⁻¹ para uma marca de cigarro, DDE = 0,002 mg kg⁻¹ para folhas de tabaco e 0,0004 mg kg⁻¹ para cigarro, endrin = 0,05 mg kg⁻¹ para folhas e 0,001 mg kg⁻¹ para cigarro, DDT = 0,002 mg kg⁻¹ em cigarro.

Dávila e col. (2020) realizaram uma avaliação de risco sobre a presença de pesticidas na fumaça de tabaco. Os autores determinaram a concentração de pesticidas em 14 tipos de folhas de tabaco seco, 3 marcas de cigarros e 1 marca de charuto utilizando o método QuEChERS. 2 g de amostra foram acrescidos de 8 mL de água, a mistura foi agitada. 15 mL de ACN foi adicionado e agitado novamente. Seguido da adição de 1,5 g NaCl, 1,5 g C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, 0,750 g C₆H₆Na₂O₇·1/2H₂O, e 6,0 g de MgSO₄. As amostras foram agitadas por 5 min a 300 rpm e centrifugadas por 5 min em 10.000 rpm. A limpeza foi realizada com 10 mL do sobrenadante e d-spe (PSA, C18, GBC e MgSO₄). 5 mL do extrato foi seco e redissolvido em hexano para análise em CG-ECD. O OCP endosulfan foi detectado mas ficou abaixo do LQ

nas amostras de charuto, dos dois cigarros não foi detectado em uma marca; para as folhas de tabaco em oito amostras foi detectado abaixo do LQ, em três amostras não foi detectado e em outras três amostras apresentou concentração de 0,32 a 0,35 mg kg⁻¹.

Dos métodos utilizados para extração, tem-se como destaque o método QuEChERS com modificações para a matriz tabaco, no entanto, estudos utilizando ultrassom e BT ainda são poucos e, considerando tabaco em cigarros, a quantidade de trabalhos é ainda mais reduzida.

Sheng e col. (2005) determinaram a quantidade de nicotina em tabaco e cigarros utilizando 20 mL de solvente extrator (metanol:diclorometano 1:3) e 1 mL de solução de amônia, e 15 minutos de sonicação, o extrato foi filtrado. Os autores não trazem maiores informações sobre a etapa de limpeza. As determinações foram realizadas em CG-FID. Nesse estudo, os autores utilizaram os seguintes parâmetros: a linearidade foi avaliada com cinco diferentes concentrações (0,0042 – 0,042 g L⁻¹) de nicotina analisadas 6 vezes, as curvas foram criadas pelo método dos mínimos quadrados, obtendo a inclinação e o coeficiente de correlação com valor de 0,9999. O limite de detecção foi de 0,01 ug de nicotina, sendo obtido por 3 x o desvio padrão. As recuperações foram de 95,7% de nicotina em tabaco. A repetibilidade foi avaliada em termos de DPR alcançando um valor de 1,5%, não indicando o número de repetições realizado e para quais concentrações. A concentração total de nicotina em porcentagem foi comparada com outro método automatizado, foram encontrados 1,51% para o estudo em questão e 1,43% para o método automatizado.

Taujenis, Olšauskaitė e Padarauskas (2015) determinaram a concentração de nicotina em seis marcas de cigarros, por cromatografia líquida de alta eficiência no modo de cromatografia de interação hidrofílica acoplada com espectrometria de massa. A extração foi realizada em banho de ultrassom por 10 min com a mistura de ACN: água e acetato de amônio. Os autores não relatam etapa de limpeza. Para a validação, a linearidade foi estudada pela análise de soluções de padrão em solvente em triplicata e sete concentrações (1 – 100 mg L⁻¹) considerando o coeficiente de determinação (R²) para avaliação, o valor obtido foi de 0,9995. Os limites de quantificação e detecção foram determinados pela razão S/N de 10 e 3 respectivamente, obtendo os valores de 30 ug g⁻¹ e 8,5 ug g⁻¹. A recuperação e a precisão foram determinadas pela fortificação de cinco amostras de tabaco fortificadas nas concentrações de 2,5 a 25 mg g⁻¹, sendo realizadas de duas formas, intra-dias (n

= 5) e entre-dias ($n = 15$), os valores alcançados foram de 94,8 a 98,5% de recuperação e a precisão em termo de DPR igual a 1,6 a 2,2% para a avaliação intra-dia. Para a avaliação inter-dia, as recuperações foram de 97,3 a 103,2 % e a precisão de 2,4-2,5%. O EM foi estudado pela supressão de sinal observada com cada analito foi calculada como a diminuição percentual na intensidade do sinal em um extrato de tabaco versus em solvente puro, para minimizar o EM os autores optaram pelo método de diluição do extrato da amostra, encontrando o fator que 1:10 para eliminação do EM (2,8%). Nesse estudo, não há detalhes sobre o processo de fortificação da amostra. As concentrações de nicotina encontradas foram de 14,5 a 21,1 mg g⁻¹.

Shen et al. (2021) determinaram a concentração de nicotina em tabaco que foi tratado com 1 mL de formiato de amônio em 2 mL ACN: água (1:1), a amostra foi agitada em vortex por 2 min e sonicado por 5 min, processo repetido por 2 x. O extrato foi diluído para 10 mL e diluído novamente 10 x antes da análise. A determinação aconteceu em HPLC-MS/MS. Foram determinados em três tipos de folhas de tabaco curadas frescas, incluindo uma regular e duas folhas de tabaco geneticamente modificadas. Os autores utilizaram o guia da FDA (Docket Number: FDA-2013-D-1020) para a validação do método em estudo. A linearidade da curva de calibração foi composta de sete pontos na faixa de 0,3 – 2000 ng mL⁻¹, com coeficiente de determinação igual a 0,9986, sendo utilizado o valor do R² para validação da linearidade. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,1 e 0,3 ng mL⁻¹. A recuperação e precisão (DPR) foram estudadas em intra-dia ($n=3$) e inter dias, sendo de 92 a 102,5% com DPR de 2,0 a 6,9% para intra-dias. Inter-dia foram alcançadas recuperações de 95,8 a 106,2% com DPR de 5,4 a 5,8%. A concentração de nicotina nas folhas de tabaco regulares foi de 42,9 mg/g, enquanto as folhas de tabaco geneticamente modificadas apresentaram um nível de 6,1 e 15,2 mg/g.

Qi e col. (2014) em seu estudo para determinação de OCPs (alfa- HCH, beta- HCH, delta- HCH, aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, isômero heptacloro epoxido, Cis/trans clordano, endosulfan I (alfa), endosulfan II (beta), DDE, DDD, DDT em folhas de tabaco e cigarros, utilizaram 1g de amostra em 30 min de sonicação com 10 mL de hexano:acetato de etila como solvente extrator, seguido de 5 min de centrifugação a 4500 rpm. Para a limpeza, foi utilizado SPE com florisil eluídos com hexano e GPC para análise em cromatografia líquida acoplada on-line totalmente automatizada-cromatografia gasosa (LC-UV-GC-ECD). A validação do método foi baseada nos parâmetros de linearidade com base no valor de R² obtido variando de 0,9991 a

0,9999. Os limites de detecção e quantificação foram baseados pelo método USEPA (2000), alcançando para LD entre 1,5 a 3,2 ug kg⁻¹ e para LQ valores entre 4,5 a 10 ug kg⁻¹. A recuperação foi estudada em três níveis (10; 30 e 100 ug kg⁻¹) obtendo valores de 73 a 111%. A precisão representada em termo de DPR 1,9 a 5,4%. Para as folhas de tabaco em uma amostra, o OCP delta- HCH foi encontrado na concentração de 11,2 ug kg⁻¹ e beta-endosulfan foi encontrado com 94,6 mg kg⁻¹. Heptacloro e alfa-endosulfan foram detectados abaixo do limite de quantificação (3,3 e 1,9 ug kg⁻¹ respectivamente). Para os cigarros delta- HCH foi detectado abaixo do limite de quantificação (3,4 ug kg⁻¹).

Bernardi e col. (2016), para amostras de folhas de tabaco, modificaram o método QuEChERS acrescentando PBT e GBC no d-spe para extração de 55 pesticidas, dentre eles os OCPs heptacloro, heptacloro epoxido e endrin cetona. 2g de tabaco seco e pulverizado foram misturados com 10 mL de água agitados por 1 min e deixado por 10 min em repouso para hidratação. 10 mL de ACN foram adicionados e a mistura foi agitada em vortex por 1 min e acrescida de 4g de MgSO₄, 1g de NaCl, 1g de C₆H₃Na₃O₇.2H₂O e 1g de C₆H₆Na₂O₇.5H₂O, agitado por 1 min e centrifugado por 8 min em 3500 rpm. Após isso, 3 mL de sobrenadante foi submetido a -18°C por 3h. A limpeza foi feita em 2 mL por d-spe (300 mg de MgSO₄, 100 mg de PSA, 100 mg de GCB e 100 mg de C18) 1 min de agitação em vortex e 8 min de centrifugação em 3500 rpm. O sobrenadante foi submetido à análise em UHPLC-MS/MS e GC-MS/MS. Para a validação do método modificado, os autores utilizaram os parâmetros, linearidade pela análise de curvas analíticas preparadas em solvente e no extrato da matriz sendo na faixa de 15–500 mg L⁻¹ para GC-MS/MS, obtendo valores para o coeficiente de determinação de 0,995 para o endrin cetona, 0,997 e 0,999 para heptacloro endo e exo, considerando a linearidade por meio dos valores de R². O LD e LQ foram determinados pela injeção de 4x do branco da amostra fortificados, obtendo valores de 23 ug kg⁻¹ e 75 ug kg⁻¹, respectivamente. Os testes de recuperação foram conduzidos em 4 níveis de concentrações (75,125 e 250 mg kg⁻¹) obtendo valores de 70 a 115% e a precisão foi estudada com base no DPR sendo de 2 a 15%, recuperação e precisão foram realizadas em 4 réplicas. O EM foi avaliado pela diferença na inclinação das curvas analíticas e apresentado em porcentagem de 22% para endrin cetona, 15% para heptacloro endo e 4% para heptacloro exo, os valores positivos indicam aumento no sinal cromatográfico, considerado significativo apenas para o OCP endrin cetona, para minimização do EM os autores optaram pelo

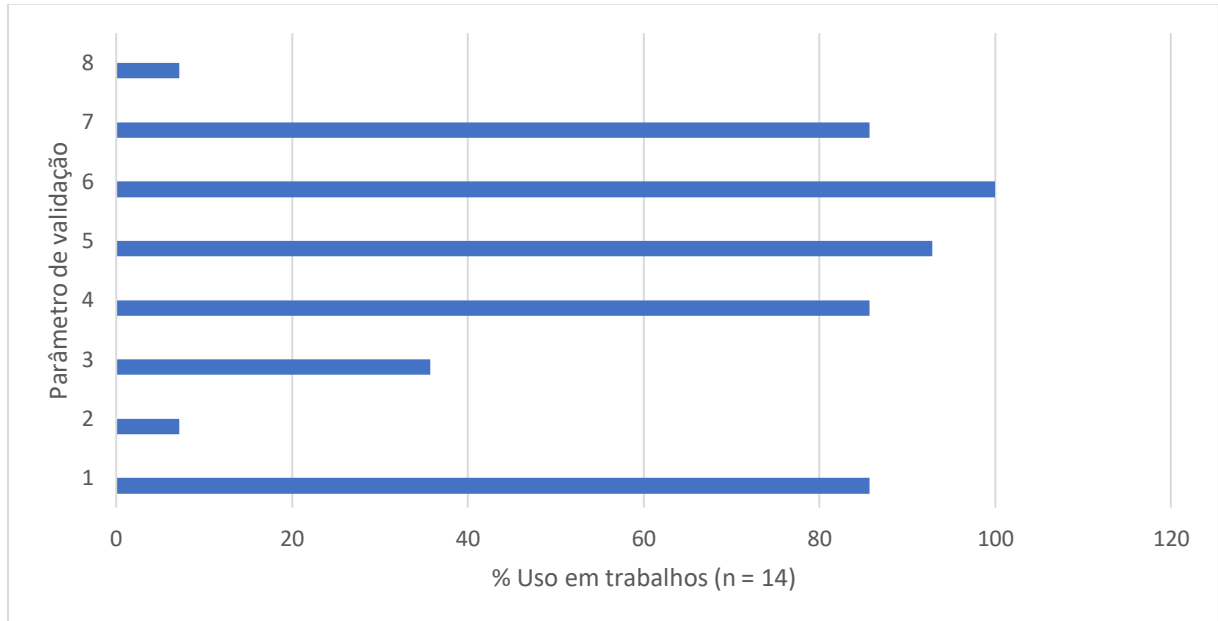
método da curva de calibração combinada com a matriz. A avaliação dos parâmetros seguiu o guia SANTE/11945/2015. Os OCPs em questão não foram detectados nas amostras estudadas.

Li e col. (2019) determinaram nicotina em amostras de folhas, cigarros e charuto. Para isso, modificaram o método QuEChERS utilizando 0,5g de tabaco em pó e 5 mL de solução de amônia 6% deixado em 10 min de repouso. Sendo adicionado 10 mL da mistura de metanol:diclorometano (1:4), a mistura foi agitada por 20 min em ultrassom. O extrato foi eluído com 0,5 g de MgSO₄, 0,125 g de PSA e 0,25g de carbono agitado 60s manualmente e submetido à centrifugação em 5000 rpm por 5 min, filtrado em membrana de 0,22 µm e analisado em CG-MS. Para a validação do método, foram utilizados os parâmetros de efeito matriz, obtendo porcentagens de 88 – 105%. LD foi de 0,0065 – 0,1509 µg g⁻¹ e LQ de 0,0217 – 0,5031 µg g⁻¹, a recuperação alcançou a porcentagem de 89%. Os autores apresentam o coeficiente de determinação de 0,9983. Para os cigarros de origem chinesa, as concentrações foram de 21,06 a 22,11 mg g⁻¹; para os cigarros americanos, as concentrações foram de 1710 a 18,07 mg g⁻¹; para charuto, 26,71 a 27,07 mg g⁻¹ e para as folhas de tabaco 9,92 a 10,62 mg g⁻¹ foram encontrados.

O processo de validação de um método está diretamente relacionado com a sua capacidade em produzir resultados confiáveis para a finalidade a que se destina, isto é, que o valor encontrado para determinado analito em sua amostra correspondente seja próximo suficiente do valor real (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020).

De todos os trabalhos encontrados para a determinação de nicotina e OCPs em tabaco, considerando os que apresentaram validação da metodologia usada para extração dos compostos alvos, verificou-se que cinco parâmetros são usados em mais de 80% dos trabalhos, sendo eles, linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e precisão. A figura 6 apresenta as porcentagens de trabalhos que utilizaram os parâmetros de desempenho analítico.

Figura 6 - Parâmetros analíticos utilizados para validação de metodologia analítica na extração de nicotina e OCPs



Notas: *1 – Linearidade; 2 – Sensibilidade; 3 – EM; 4 – LQ; 5 – LD; 6 – Recuperação; 7 – Precisão; 8 – Robustez.

A recuperação foi o único parâmetro utilizado em todos os trabalhos. Em relação ao EM apenas 36% dos trabalhos fizeram o estudo da relação entre os compostos da matriz e o sinal analítico. A heterogeneidade no uso dos parâmetros está relacionada ao fato de não haver um documento único e universal de orientação sobre validação analítica de métodos (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020). Em 29% dos trabalhos em questão, há a indicação do guia seguido para a validação da metodologia.

A otimização de metodologia busca rapidez e redução de custos em métodos de extração. Metodologias otimizadas além de diminuir o impacto no ambiente pela geração de resíduos, favorecem também o montante de informações de dados que podem ser coletados em diferentes estudos, uma vez que permite o estudo de mais amostras e/ou analitos, pois demandam menor tempo de trabalho e custo de análise.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a otimização e validação de metodologia para determinação de nicotina e pesticidas organoclorados em amostras de tabaco de cigarro contrabandeado para o Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver a otimização do método QuEChERS para extração de nicotina de tabaco de cigarro contrabandeado para o Brasil, utilizando o planejamento de experimentos matriz de Doehlert.

Realizar a validação do método QuEChERS modificado para determinação de nicotina em cigarro contrabandeado de acordo com os parâmetros de desempenho para validação analítica

Aplicar o método validado para determinar a concentração de nicotina em amostras de tabaco de cigarro contrabandeado.

Desenvolver a otimização combinando o método de ultrassom (ULT) e a precipitação de baixa temperatura (PBT) para determinação de pesticidas organoclorados (OCPs) em amostras de cigarro contrabandeado.

Realizar a validação do método ULT/PBT para determinação de OCPs em cigarros contrabandeados de acordo com os parâmetros de desempenho para validação analítica.

Aplicar o método validado para determinar a concentração de OCPs em amostras de tabaco de cigarro contrabandeado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

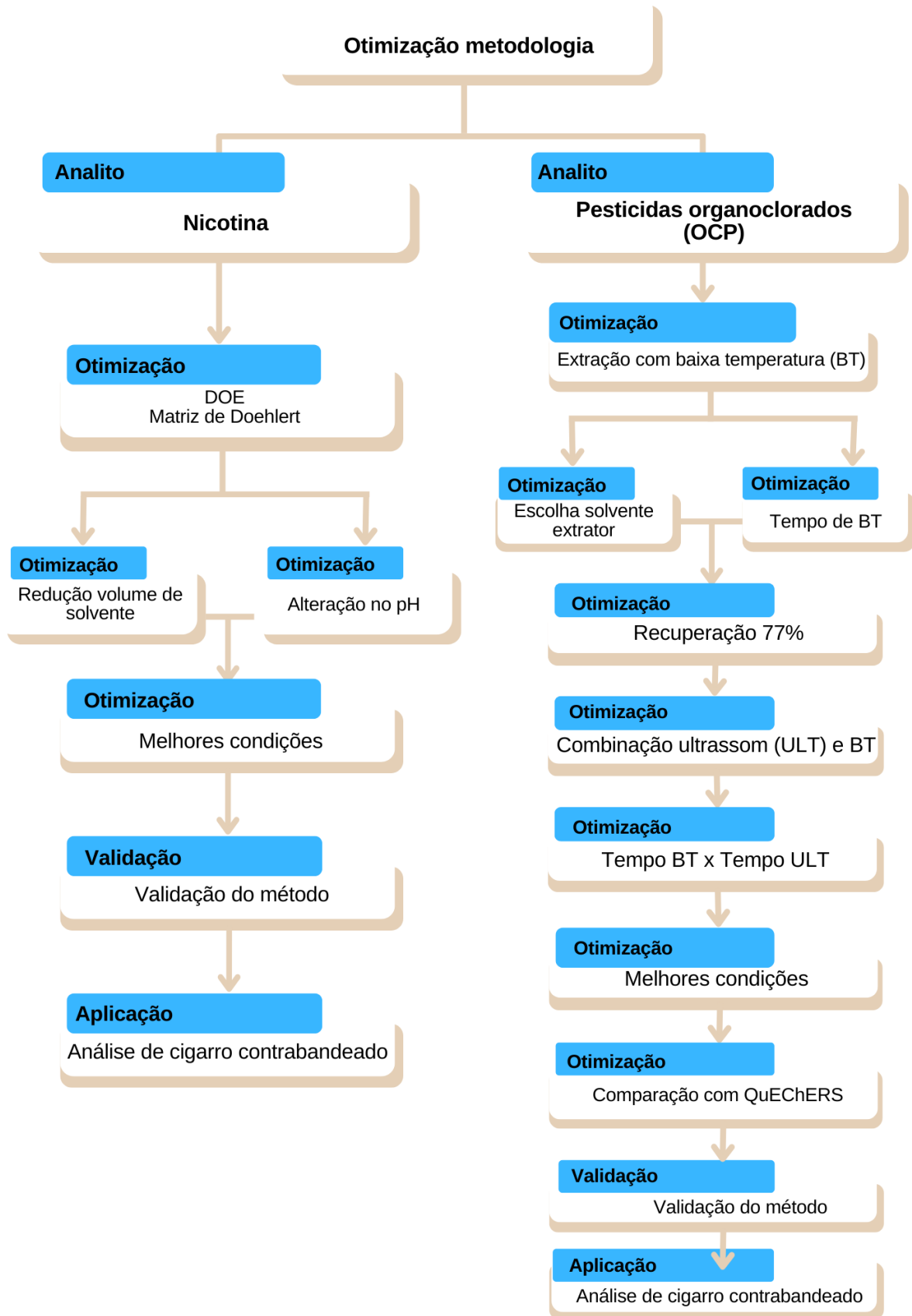
4.1 PADRÕES ANALÍTICOS E SOLVENTES

Todos os solventes empregados, acetonitrila (ACN), acetona (ACE) e n-hexano (HEX) foram de grau HPLC (Lichrosolv). Os padrões de pesticidas alfa- HCH, beta- HCH, gama- HCH (Lindano), delta- HCH, heptacloro, aldrin, isômero heptacloro epoxido, γ -clordano, α -clordano, endosulfan I (alfa), DDE, dieldrin, endrin, endosulfan II (beta), DDD, endrin aldeído, endosulfan sulfato, DDT, endrin cetona, metoxicloro, surrogate tetracloro-m-xileno e padrão de nicotina (Pestanal®), foram obtidos da Merck (EUA).

4.2 ETAPAS REALIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE NICOTINA E OCPs EM TABACO DE CIGARRO

A figura 7 apresenta um organograma com todas as etapas envolvidas na otimização dos métodos de extração para nicotina e OCPs.

Figura 7 - Organograma das etapas para otimização de metodologia de extração de nicotina e OCPs.



Fonte: A Autora.

4.2.1 Planejamento Experimental Matriz de Doehlert para Otimização do Volume do Solvente Extrator e pH na Extração da Nicotina pelo Método QuEChERS

Planejamentos de experimentos são ferramentas úteis para a otimização de métodos, uma vez que fornece uma estruturação para o estudo das variáveis a serem otimizadas e a possível interação que exista entre elas.

Nesse estudo para verificar a influência do volume de solvente e do pH na extração da nicotina por meio do método Quechers foi realizado o planejamento experimental matriz de Doehlert. Esse planejamento tem se mostrado mais vantajoso em relação a outros planejamentos, pois oferece flexibilidade na escolha dos níveis das variáveis em estudo. Para duas variáveis, por exemplo, pode-se estudar em 3 e 5 níveis. Essa propriedade é bastante conveniente, já que a variável de maior importância para o método pode ser estudada em mais níveis, não necessitando que a outra variável tenha a mesma quantidade de níveis (CERQUEIRA et al., 2021; NARENDERAN; MEYYANATHAN; KARRI, 2019).

Portanto, foram estudados em cinco níveis o pH do meio e em três níveis o volume de acetonitrila, como mostrado na Tabela 2, incluindo níveis codificados e valores reais utilizados. Para ajuste dos valores de pH propostos, foram utilizados volumes correspondentes de solução de K_2CO_3 1 mol L⁻¹.

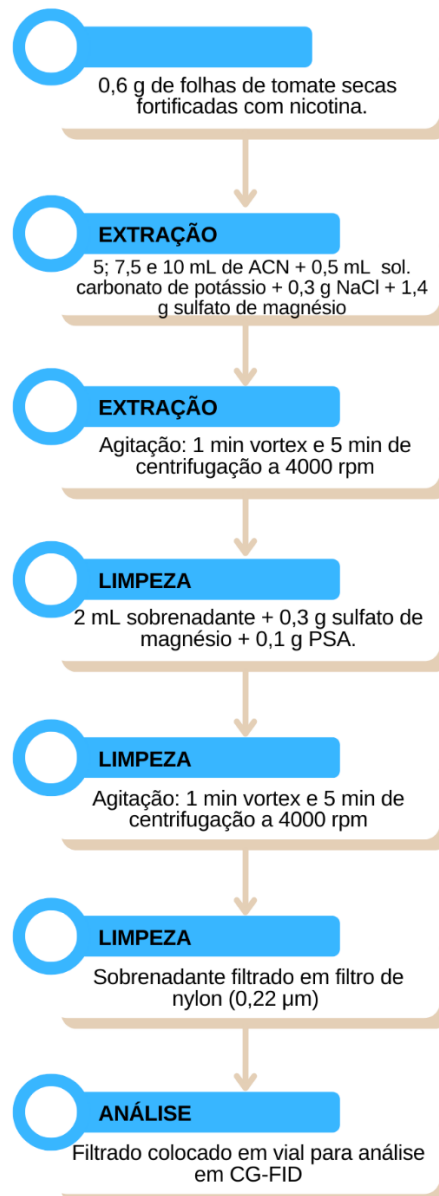
Tabela 2 - Matriz Doehlert do método QuEChERS de otimização

VARIÁVEIS	NÍVEIS	
	Codificado	Real (mL)
VOLUME DE SOLVENTE	-0,866	5
	0	7,5
	+0,866	10
pH	-1,0	5
	-0,5	7,2
	0	9,5
	+0,5	11,7
	+1,0	14
EXPERIMENTO	SOLVENTE	pH
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	+1
5	+0,866	+0,5
6	0	-1
7	-0,866	-0,5
8	-0,866	+0,5
9	+0,866	-0,5

Fonte: A Autora

Pela ausência de matriz branco para otimização da extração de nicotina, foram utilizadas folhas de tomate como matriz representativa de acordo com o guia de orientação da (AOAC, 2016), para todas as etapas de otimização. Folhas de tomate foram escolhidas, pois tomate e tabaco fazem parte da família *Solanacea* (HUGO JOSÉ DE OLIVEIRA ZOFFOLI, 2013; MASSON, 2014; SWAMI; JUDD; ORSINI, 2009), as folhas foram coletadas de uma cultura orgânica. Foram utilizados 0,6 g de folhas de tomate secas a 80 °C, trituradas e posteriormente, fortificadas com solução padrão de nicotina para alcançar uma concentração de 1,7 mg g⁻¹. O fluxograma da figura 8 ilustra todo o processo para otimização de extração da nicotina, utilizando o método QuEChERS original (ANASTASSIADES et al., 2003).

Figura 8 - Processo de otimização do método QuEChERS para nicotina



4.2.2 Validação do Método QuEChERS Otimizado para Extração de Nicotina em Tabaco de Cigarro

Para validação do método otimizado de extração da nicotina em tabaco, utilizou-se as diretrizes preconizadas por AOAC, IUPAC e INMETRO. Foram avaliados os parâmetros de desempenho: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão, como descritos na tabela 3. Todas as análises foram realizadas em nível de confiança de 95% utilizando o software Action Stat (versão 3.0.0) acoplado ao Excel 2019, para avaliação da linearidade do método.

Tabela 3 - Parâmetros de desempenho analítico para validação do método QuEChERS modificado para extração de nicotina

Parâmetro	Especificação	Avaliação
Linearidade	Faixa de trabalho: 2,5 a 150 mg L ⁻¹	Homocedasticidade Teste Brown-Forsythe Gráfico de resíduos R ²
Limite de detecção (LD)	3 x S/N	
Limite de quantificação (LQ)	10 x S/N	
Recuperação	$\text{Rec (\%)} = \left(\frac{\text{valor médio obtido}}{\text{valor médio de referência}} \right) * 100$ <p>Nas concentrações: 0,06; 7,5 e 15 mg g⁻¹ em 6x.</p>	Faixa aceitável: 97 – 103%
Precisão	$\text{DPR} = \left(\frac{\text{Desvio padrão}}{\text{média}} \right) * 100$ <p>Nas concentrações: 0,06; 7,5 e 15 mg g⁻¹ em 6x.</p>	< 2,7%

Fonte: AOAC. **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements**, 2016.

Disponível em: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf Acesso em: 31 ago. 2018.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**, jun. 2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf> Acesso em: 12 jul. 2021.

IUPAC. **Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis: (IUPAC Technical Report)**IUPAC, , 2002. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/doi/10.1515/iupac.74.0084>>. Acesso em: 8 jul. 2022

As curvas analíticas combinadas com a matriz e em solvente foram preparadas em sete níveis de concentração variando de 5 a 160 µg L⁻¹. As soluções padrão de calibração foram preparadas diluindo o material de referência certificado 200 µg mL⁻¹ com acetonitrila em diferentes concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 120 e 160 µg L⁻¹. As soluções padrão combinadas com a matriz foram preparadas diluindo o material de referência certificado 200 µg mL⁻¹ em extrato de tabaco branco para diferentes concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 120 e 160 µg L⁻¹. O extrato da amostra

branco foi preparado em banho ultrassônico seguido da exposição em baixa temperatura. A curva analítica combinada com a matriz foi usada para quantificação.

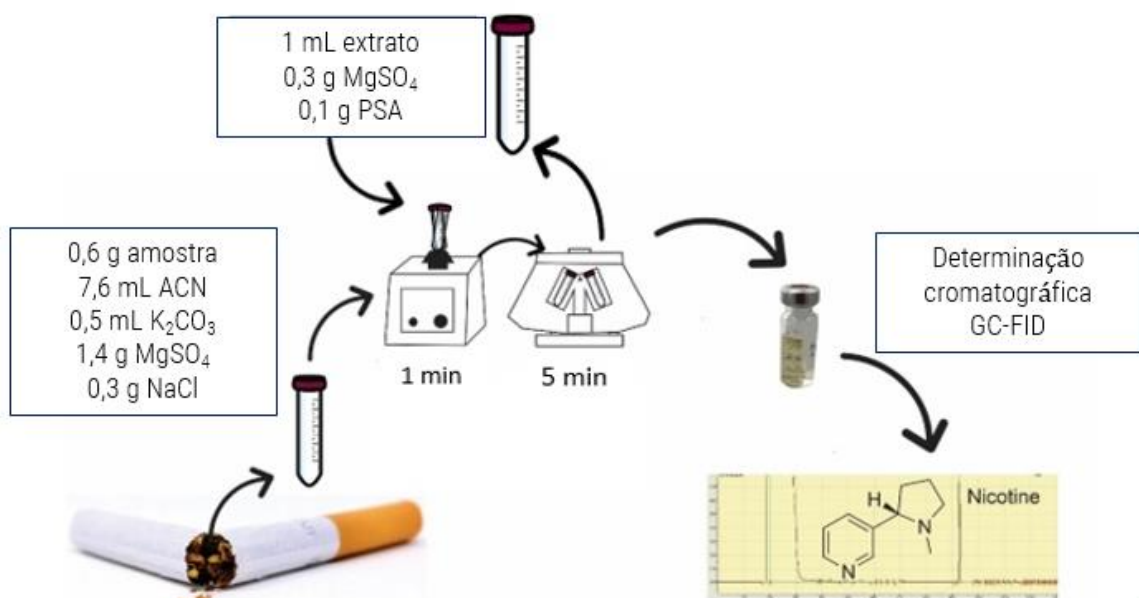
4.2.3 Método QuEChERS Validado para Extração de Nicotina de Tabaco de Cigarros

Após encontrar os melhores valores para o volume de acetonitrila e o valor de pH, o método foi empregado para a extração de nicotina em amostras reais de cigarros contrabandeados.

Para isso, foi acrescentada a massa de 0,6 g de tabaco de cigarro em um tubo de polipropileno de 15 mL. Após, o volume de 7,6 mL de acetonitrila foi adicionado, e a mistura agitada manualmente por 10 s. O pH foi ajustado para 12,4 com 500 μL de solução de carbonato de potássio (K_2CO_3) 1 mol L^{-1} . Em seguida, 1,4 g de sulfato de magnésio (MgSO_4) e 0,3 g de cloreto de sódio (NaCl) foram adicionados ao mesmo tubo, que foi agitado vigorosamente em vortex por 1 min seguido de centrifugação (4000 rpm) por 5 min.

Em seguida, 2 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 0,3 g de MgSO_4 e 0,1 g de PSA. O extrato foi agitado em vortex por 1 min e novamente centrifugado a 4000 rpm por 5 min. Depois disso, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de nylon de 0,22 μm , e 1 mL do extrato foi transferido em um vial para determinação cromatográfica. As etapas do método otimizado e validado são mostradas na figura 9.

Figura 9 - Método QuEChERS modificado para extração de nicotina de matriz tabaco



Fonte: A Autora.

4.2.4 Determinação de Nicotina em Amostras de Tabaco de Cigarro por Cromatografia a Gás Acoplado a Detector de Ionização em Chama (GC-FID)

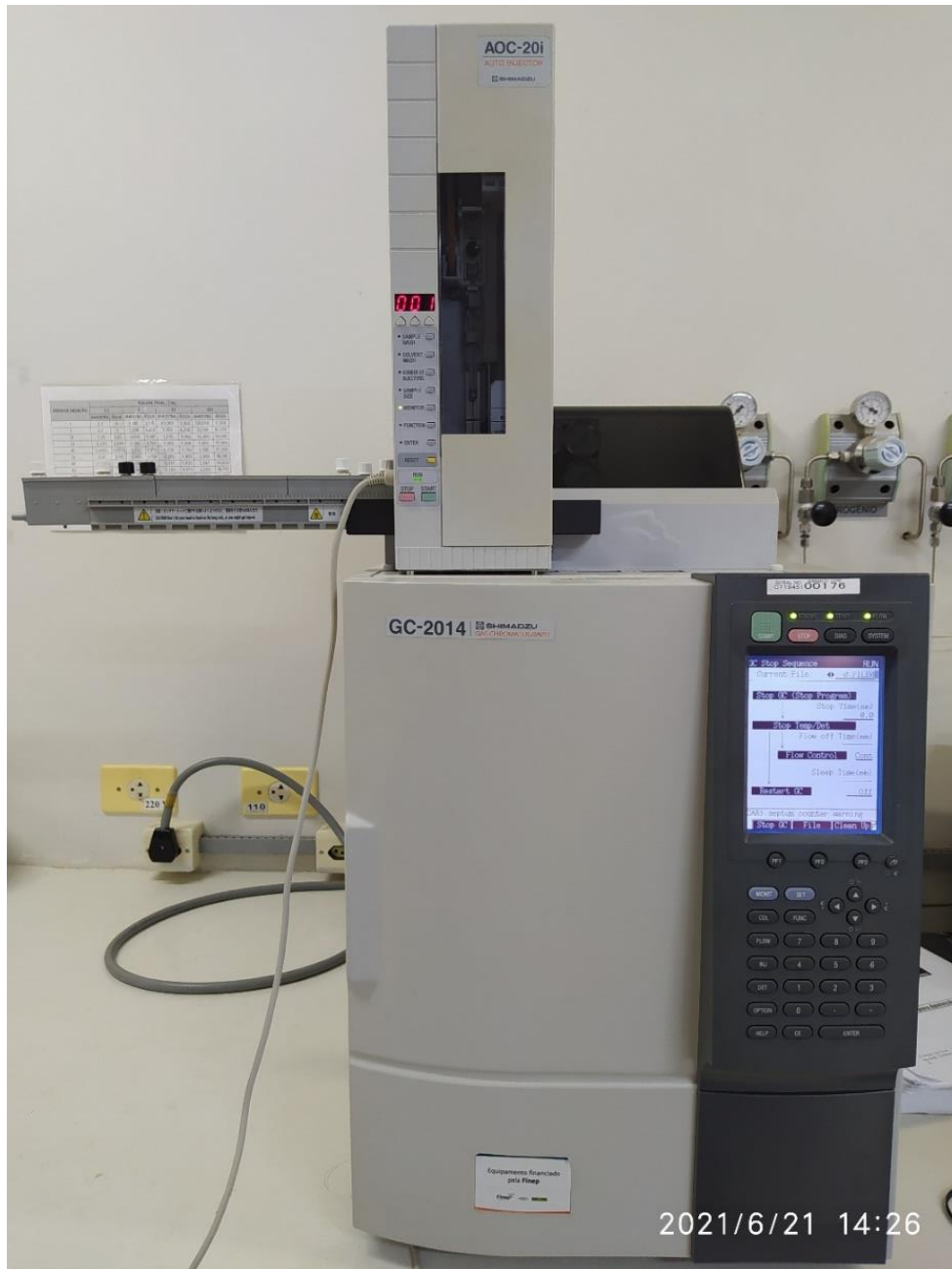
Para determinação da nicotina foram escolhidas nove marcas de cigarros contrabandeados apreendidas pela Receita Federal da 9ª região do Estado do Paraná. Além disso, foram analisadas duas marcas legais vendidas no comércio local.

Uma amostragem arbitrária foi realizada de acordo com o United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) considerada uma abordagem amplamente aceita, de acordo com a fórmula $n = \sqrt{N}$, onde n é o tamanho da amostra e N é o tamanho da população (UNODC, 2009).

O tabaco foi separado do invólucro e do filtro. Foram utilizados 22 pacotes de cada marca, com quatro cigarros de cada embalagem. O tabaco de cada marca foi misturado e a amostra foi quarteada, para obtenção de uma alíquota homogênea (USEPA, 2014).

Após a extração utilizando o método validado, foram obtidos os extratos das amostras e quantificados por um cromatógrafo a gás (CG) (modelo Shimadzu GC-2014, autosampler AOC-20i) acoplado a um detector de ionização em chama (FID) (figura 10). Para separação, foi utilizada uma coluna capilar RTX-5 (5% fenil - 95% de metilpolisiloxano), com dimensões de 30 m × 0,25 mm e 0,25 µm de espessura da película. A temperatura do forno iniciou em 60 °C mantido por 1 min. Em seguida, 180 °C a 15 °C min⁻¹ por 1 min, seguindo para 280 °C a 40 °C min⁻¹ mantido por 2 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 230 °C e 300 °C, respectivamente. Hélio foi usado como gás transportador a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 1 µL no modo splitless (SHENG et al., 2005).

Figura 10 - Cromatógrafo Shimadzu GC-2014, autosampler AOC-20i



Fonte: A Autora.

4.2.5 Estudo da Precipitação de Compostos da Matriz em Diferentes Solventes Orgânicos para Extração de OCPS

Com a finalidade de escolher o melhor solvente para a extração dos OCPs em tabaco, foi avaliada a influência da baixa temperatura (BT) nos solventes extratores em relação a precipitação de compostos da matriz de tabaco. Para isso, foram estudados quatro solventes orgânicos selecionados com base no método

3550C (USEPA, 2007e) em tubos de borosilicato. As condições são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Experimento de seleção de solvente extrator para OCPs em amostra de tabaco utilizando BT

Experimento	Massa de tabaco	Solvente	Volume de solvente
1	1 g	Acetonitrila	5 mL
2	1 g	Acetona	5 mL
3	1 g	Hexano	5 mL
4	1 g	Hexano:Acetona (1:1)	10 mL

Fonte: A Autora

Os tubos com a mistura de tabaco e solvente, foram imediatamente colocados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um congelador convencional por 24 h. Amostras foram observadas a cada 30 min por 5h quanto a formação de precipitados.

4.2.6 Estudo da Recuperação de Surrogate pela Baixa Temperatura

Para verificar a capacidade de extração dos OCPs em tabaco pela baixa temperatura, foi utilizado o *surrogate* tetracloro-m-xileno. Para isso, foram fortificadas folhas de tabaco orgânico (produzidas na região de Prudentópolis-Paraná).

As amostras de tabaco foram secas em estufa por 10 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, maceradas e fortificadas com tetracloro-m-xileno para alcançar uma concentração de 500 ng g^{-1} (figura 11). Posteriormente, o solvente acetonitrila foi adicionado e a mistura foi imediatamente submetida a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um congelador convencional.

A recuperação foi monitorada retirando alíquotas de 1 mL do sobrenadante e transferindo para um vial para posterior análise cromatográfica. As alíquotas eram retiradas a cada 1h por um período de 5h. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Figura 11 - Amostra de tabaco orgânico



Fonte: A Autora

4.2.7 Estudo da Influência do Uso de Ultrassom (ULT) para Melhorar a Recuperação de OCPs em Tabaco

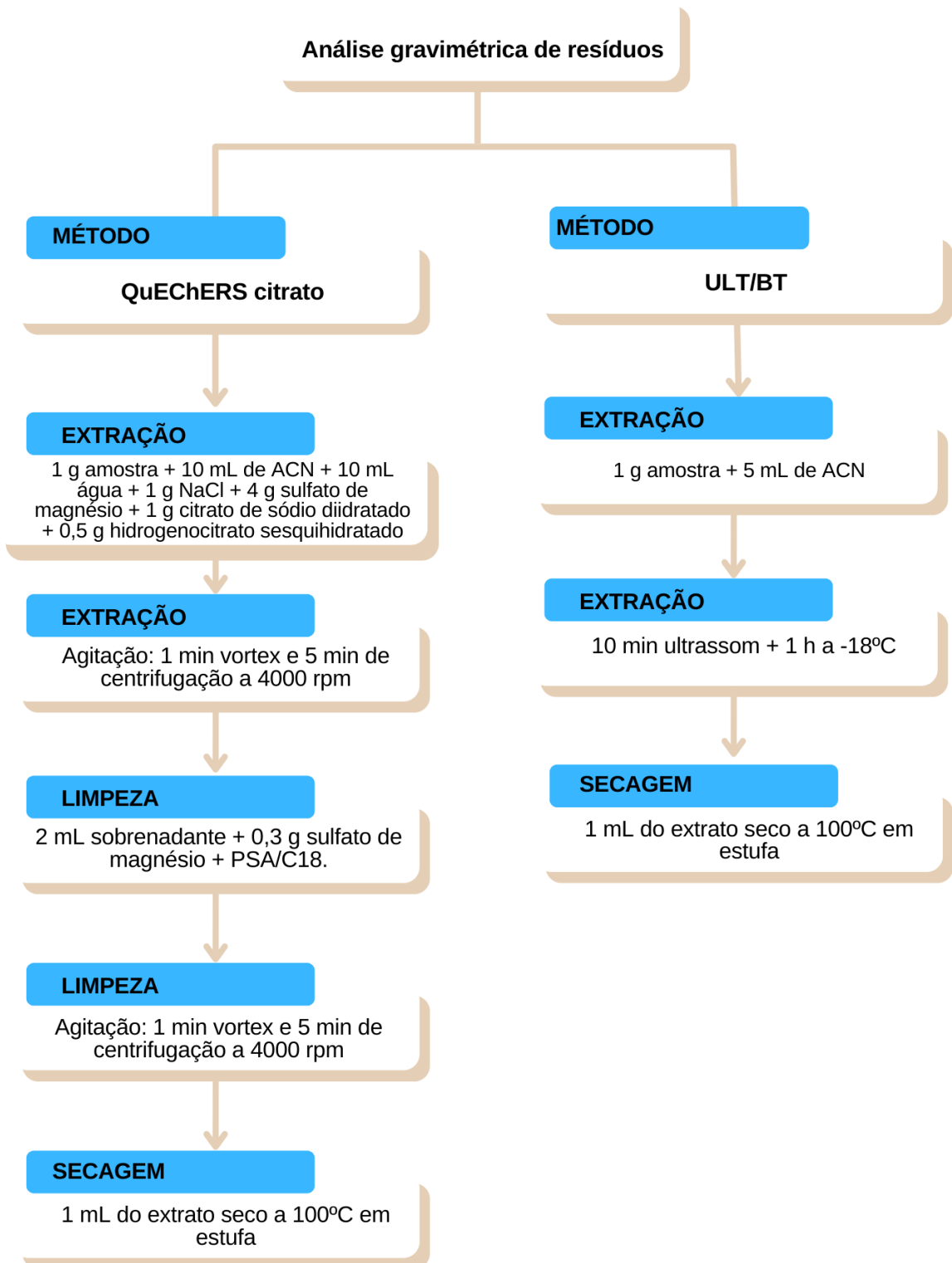
Com o intuito de verificar a influência do ULT combinado a BT na extração de OCPs em tabaco, foi verificada a recuperação do surrogate tetracloro-m-xileno em relação à variação de tempo de exposição da amostra.

Para isso, em tubo de borossilicato, foi adicionado 1 g de tabaco orgânico fortificado com surrogate tetracloro-m-xileno e 5 mL de ACN, os tubos foram inseridos em um banho ultrassônico (40 kHz, 300 W) (USEPA, 2007e). Foram testados os tempos de ultrassom de 5, 10 e 15 min. Em seguida, as amostras foram expostas a -18 °C nos seguintes tempos: 1, 2, 3, 4 e 5 h. Após cada tempo de BT, 1 mL do extrato foi transferido para um vial para posterior análise cromatográfica. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.2.8 Comparação Gravimétrica de Coextrativos Não Voláteis em Extrato de Tabaco pelos Métodos ULT/BT e QuEChERS

Com o objetivo de verificar a quantidade em massa de resíduos não voláteis presente no extrato final, comparou-se o método em estudo (ULT/BT) com o método QuEChERS e d-spe para limpeza com as seguintes quantidades de sorventes: 25 mg PSA; 150 mg PSA e C18; 300 mg PSA e C18; 450 mg PSA e C18 e 1g PSA e C18. Assim, 1 g de tabaco foi submetido aos métodos como ilustrado na figura 12.

Figura 12 - Análise gravimétrica de resíduos não voláteis por comparação dos métodos de extração de OCPs em tabaco ULT/BT e QuEChERS



Fonte: A Autora

4.2.9 Validação do Método ULT/BT Otimizado para Extração de OCPs em Tabaco de Cigarro

O método otimizado para OCPs foi validado com base nas diretrizes preconizadas por SANTE/2020/12830, AOAC, IUPAC e INMETRO. Foi utilizado o software Action Stat (versão 3.0.0) acoplado ao Excel 2019, todas as análises foram realizadas em nível de confiança de 95 %.

Foram avaliados os parâmetros de desempenho: efeito matriz, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão, como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de desempenho analítico para validação do método ULT/BT

Parâmetro	Especificação	Avaliação
Efeito matriz	EM (%) = $\left(\frac{\text{inclinação na matriz}}{\text{inclinação no solvente}} * 100 \right) - 100$ Curvas analíticas preparadas em solvente e no extrato da matriz.	Efeito significativo se $\pm 20\%$
Linearidade	Faixa de trabalho: 5 a 160 $\mu\text{g L}^{-1}$	Homocedasticidade Teste Brown-Forsythe Gráfico de resíduos R^2
Limite de detecção (LD)	LD = 3,3 s / b	s = DP menor ponto da curva b = coef. Angular da reta
Limite de quantificação (LQ)	LQ = 10 s / b	s = DP menor ponto da curva b = coef. Angular da reta
Recuperação	Rec (%) = $\left(\frac{\text{valor médio obtido}}{\text{valor médio de referência}} \right) * 100$ Concentrações: 150; 500; 800 n g-1 – 6 repetições.	Faixa aceitável: 70 – 120%
Precisão	DPR = $\left(\frac{\text{Desvio padrão}}{\text{média}} \right) * 100$ Concentrações: 150; 500; 800 n g-1 – 6 repetições.	< 20%

Fonte: AOAC. **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements**, 2016.

Disponível em: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf. Acesso em: 31 ago. 2018.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**, jun. 2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf> Acesso em: 12 jul. 2022.

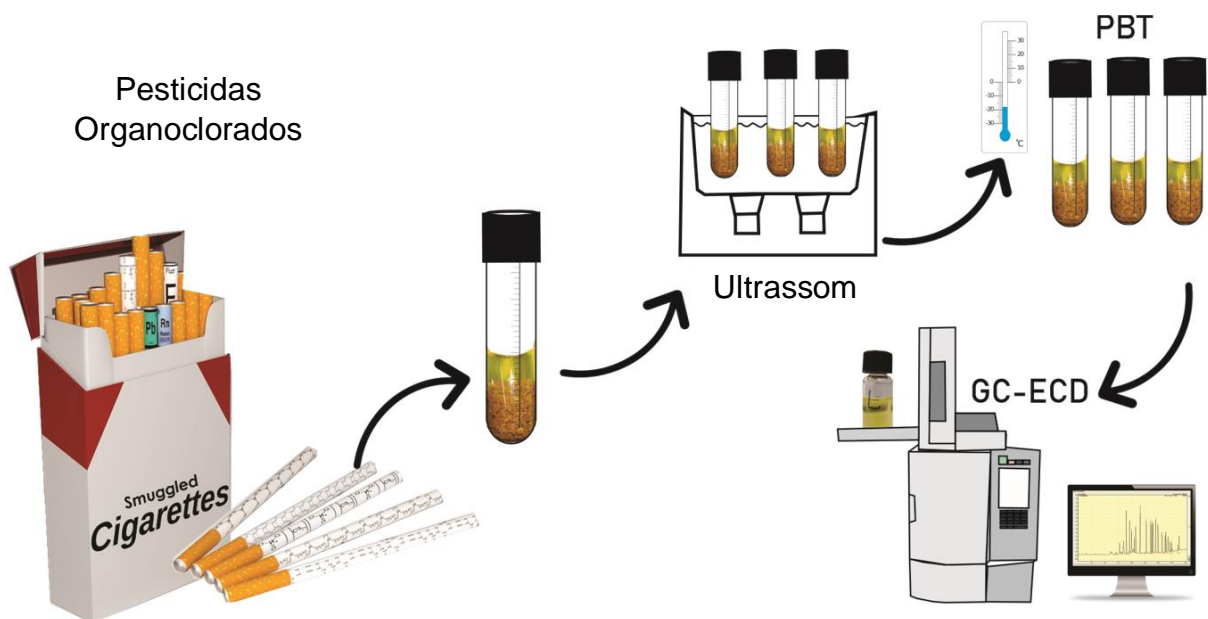
IUPAC. **Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis: (IUPAC Technical Report)**. IUPAC, 2002. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/doi/10.1515/iupac.74.0084>>. Acesso em: 08 jul. 2022.

SANTE. **Guidance Document on Pesticide Analytical Methods for Risk Assessment and Post-approval Control and Monitoring Purposes**, 24 fev. 2021. Disponível em: https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-02/pesticides_mrl_guidelines_2020-12830.pdf Acesso em: 06 nov. 2021.

4.2.10 Método Validado para Extração de OCPs em Tabaco de Cigarro

Para a determinação de OCPs em tabaco de cigarro contrabandeado utilizado o método ULT/BT foi necessário a massa de 1g de tabaco de cigarro, adicionado a um tubo de borosilicato com 5 mL de acetonitrila. A mistura foi submetida a 10 min em banho de ultrassom e acondicionada em congelador convencional por 1h. Após esse período, 1 mL de sobrenadante foi colocado em um vial para análise cromatográfica. A figura 13 ilustra o método ULT/BT.

Figura 13 - Método ULT/PBT para extração de OCPs em amostras de cigarro contrabandeado



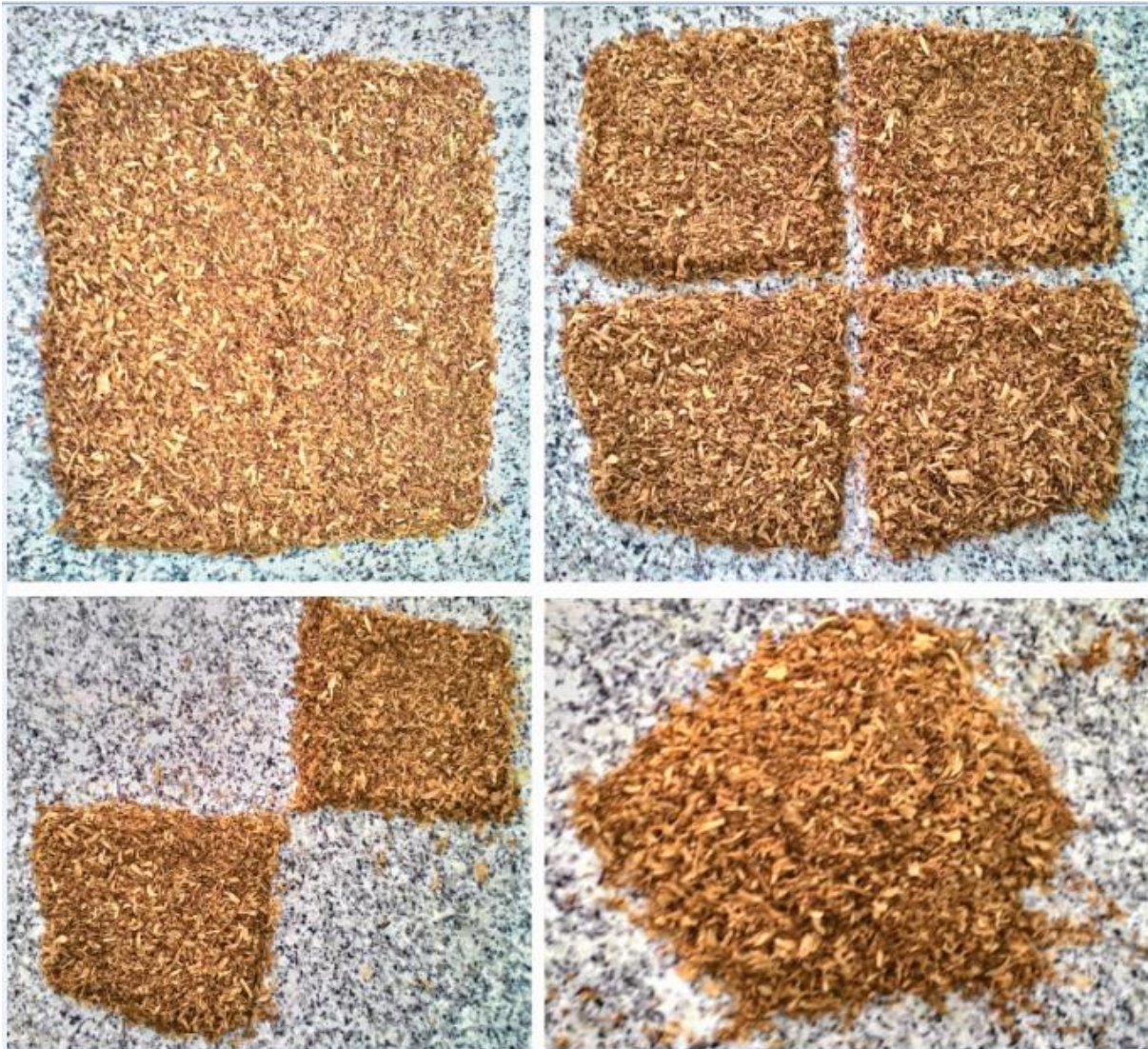
Fonte: A Autora

4.2.11 Determinação de OCPs em Amostras de Tabaco de Cigarro por Cromatografia a Gás Acoplado a Detector de Captura de Elétrons (GC-ECD)

Foram utilizadas 18 marcas de cigarros apreendidas pela Receita Federal da 9ª região do Estado do Paraná para determinação de OCPs em amostras de tabaco de cigarros contrabandeados. Uma amostragem arbitrária foi realizada de acordo com o *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) considerada uma abordagem amplamente aceita, de acordo com a fórmula $n = \sqrt{N}$, onde n é o tamanho da amostra e N é o tamanho da população (UNODC, 2009).

O tabaco foi separado do invólucro e do filtro. Foram utilizados 22 pacotes de cada marca, com quatro cigarros de cada embalagem. O tabaco de cada marca foi misturado e a amostra foi quarteada (figura 14), para obtenção de uma alíquota homogênea (USEPA, 2014).

Figura 14 - Homogeneização da amostra por quarteamento



Fonte: A Autora

Os extratos foram então preparados a partir do método ULT/BT validado neste estudo. Os OCPs foram detectados e quantificados por um cromatógrafo a gás (CG) (modelo Shimadzu GC-2014, autosampler AOC-20i) acoplado a um detector de captura de elétrons (ECD), apresentado na figura 12.

Para separação, foi utilizada uma coluna ZB-multi-resíduo-1 (Proprietary pesticides fase; 30 m x 0,32 mm x 0,5 µm de filme).

As condições foram baseadas no método 8081 (USEPA, 2007f). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 100 °C (0,5 min); em 35 °C min⁻¹ até 220 °C; em 10 °C min⁻¹ até 240 °C; em 2 °C min⁻¹ até 250 °C e, por fim, em 10 °C min⁻¹ até 290 °C (2 min).

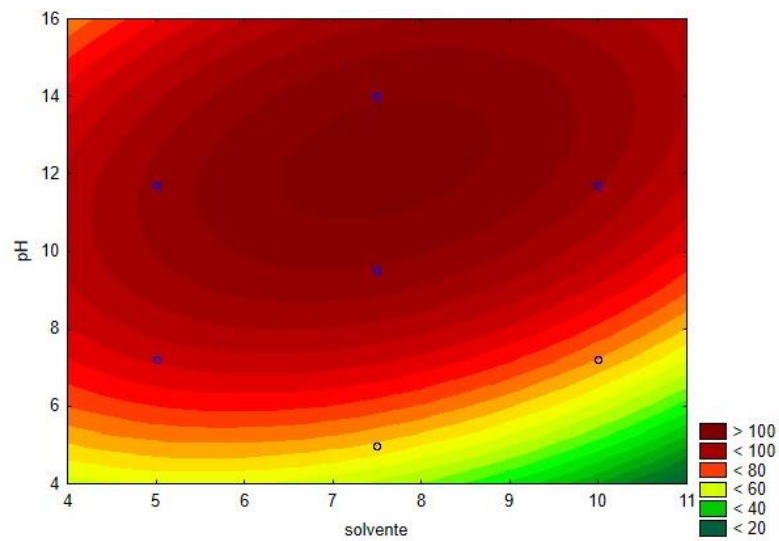
As injeções foram realizadas sem divisão de fluxo (splitless), com volume de 1 µL da amostra, a temperatura do injetor foi de 225 °C. A temperatura do detector foi definida em 310 °C. Hélio (99,999 %) foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 2,0 mL min⁻¹. O software GC solution foi utilizado para controle instrumental e análise de dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MATRIZ DE DOEHLERT PARA OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR E PH NA EXTRAÇÃO DA NICOTINA PELO MÉTODO QUECHERS

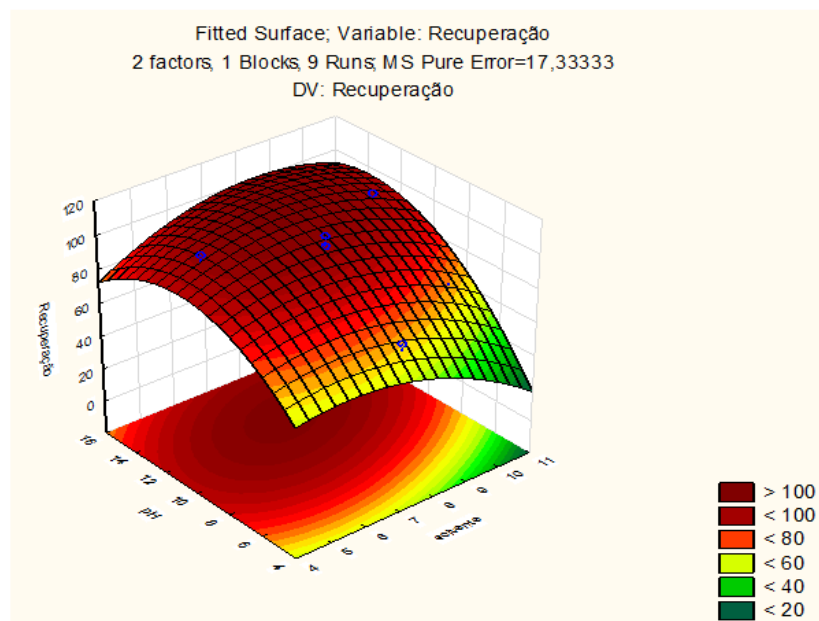
As figuras 15 e 16 apresentam os resultados para as melhores condições de pH e volume de solvente para a extração de nicotina em tabaco por meio da superfície de contorno e da superfície de resposta, obtidos pela matriz de Doehlert.

Figura 15 - Superfície de contorno pH x quantidade de solvente para a extração de nicotina



Fonte: A Autora

Figura 16 - Superfície de resposta Matriz de Doehlert otimização QuEChERS para nicotina



Fonte: A Autora

Pode-se observar figuras 15 e 16, pelas cores amarela e verde, que o pH menor que 6 não foi eficiente para a extração da nicotina, uma vez que apresentou recuperações menores que 80%.

As áreas vermelhas intensas apresentam as melhores recuperações para as variáveis estudadas. O modelo sugere valores ótimos em nível de confiança de 95%, para o volume de acetonitrila igual a 7,6 mL e pH igual 12,4. Assim, utilizaram-se essas condições para a recuperação de tabaco no método QuEChERS adaptado, obtendo recuperações de 97,5% a 99,6%.

Considerando uma análise com muitas amostras, o volume de 7,6 mL é suficiente para envolver todo o material amostral, permitindo a extração adequada, e contribuindo para a redução de resíduos e economia de reagentes.

Comparando o método em estudo com a metodologia recomendada pela WHO, 2014 que orienta a extração de nicotina de tabaco de cigarros utilizando hexano, verifica-se uma redução bastante significativa no volume de solvente orgânico, de 40 mL (WHO, 2014) para 7,6 mL (nesse estudo).

Li e col. (2019) utilizaram o volume de 10 mL da mistura de metanol:diclorometano (1:4) com método QuEChERS e ultrassom para determinar alcaloides em tabaco, os autores obtiveram recuperações de 96 a 98%.

Além disso, em estudos anteriores para extração de nicotina em outras matrizes utilizando a metodologia QuEChERS, os volumes e solventes orgânicos utilizados foram 10 mL e 15 mL de acetonitrila (CHANG et al., 2015; THRÄNE; ISEMER; ENGELHARDT, 2015), 9,5 mL e 10 mL de acetato de etila (LOZANO et al., 2012; MÜLLER; BRACHER; PLÖSSL, 2011).

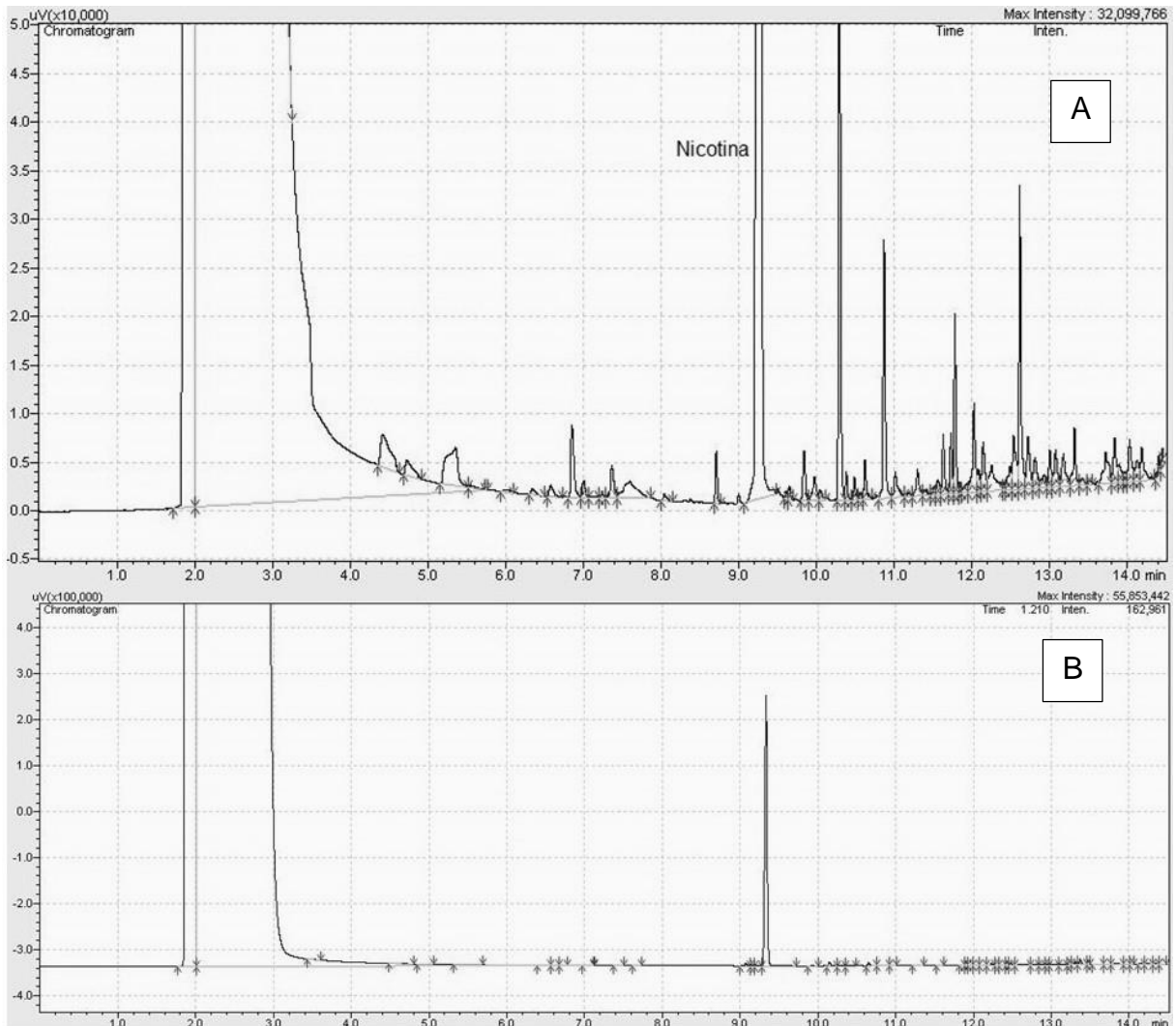
Assim, os resultados apresentados nas figuras 15 e 16 e os valores propostos pelo planejamento experimental nesse estudo, mostraram que foi possível obter uma ótima recuperação de nicotina utilizando um solvente menos tóxico quando comparando com a mistura de diclorometano:hexano e em menor quantidade quando comparado aos métodos que utilizaram hexano, acetonitrila e acetato de etila.

A otimização do método QuEChERS é importante para garantir a extração satisfatória de diferentes analitos (STREMEL et al., 2018). A redução de solvente extrator reduz o custo do método e também a geração de resíduos após o processo de análise das amostras, alguns objetivos da química analítica verde (ARMENTA et al., 2019).

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS OTIMIZADO PARA EXTRAÇÃO DE NICOTINA EM TABACO DE CIGARRO

A figura 17 apresenta os cromatogramas da nicotina na matriz de tabaco e em solvente acetonitrila. O método se mostrou específico à nicotina em relação aos componentes da matriz.

Figura 17 - Cromatograma de nicotina em matriz de tabaco (A) e solvente (B)



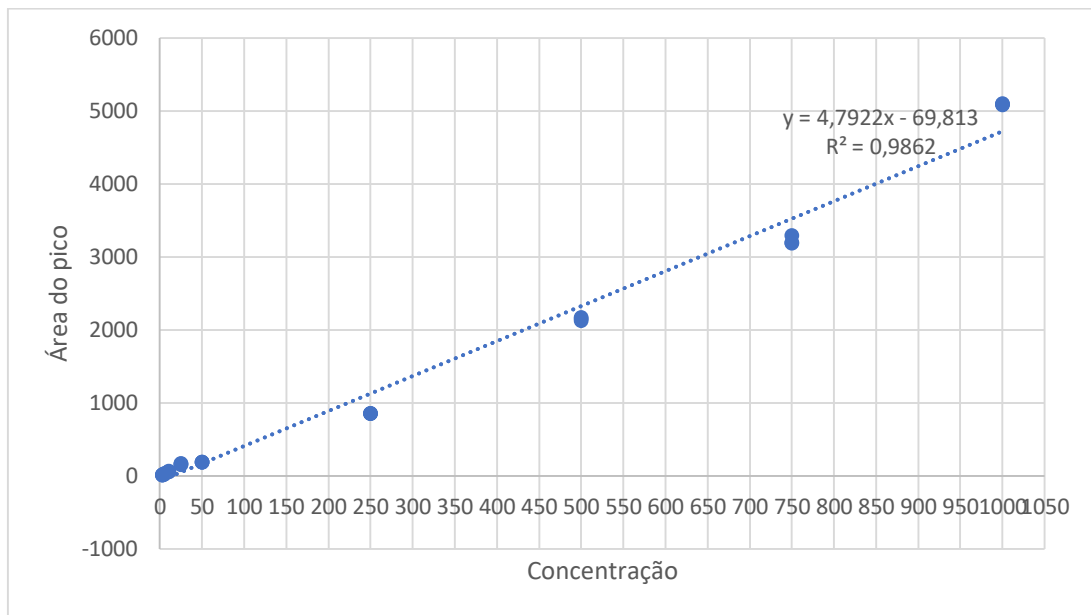
Fonte: A Autora

A figura 18 apresenta a curva analítica obtida para a nicotina realizada em triplicata na faixa de 2,5 e 1000 mg L⁻¹. A curva analítica foi submetida à análise estatística de parâmetros numéricos como média, mediana, moda, assimetria, curtose e coeficiente de variação, sendo observada a proximidade entre os valores de média e mediana. O coeficiente de variação apresentado foi menor que 30%, os valores para a assimetria ficaram compreendidos entre +1 e -1, e a ausência de outliers foi

confirmada pela curtose com valores negativos, esses resultados indicam tendência a normalidade.

Os testes estatísticos demonstraram que a curva analítica para nicotina não apresenta falta de ajuste (p-valor = 0,993), tendo como coeficiente de determinação (R^2) o valor de 0,986 e os valores são homocedásticos de acordo com o teste de Brown-Forsythe (p-valor = 0,349) ao nível de 95% de confiança.

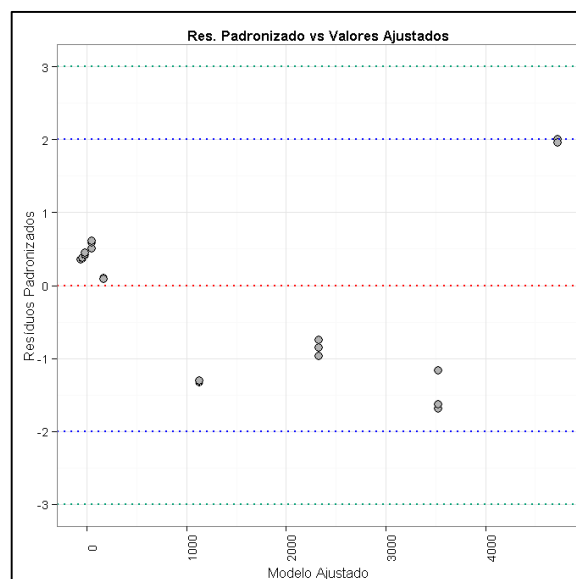
Figura 18 - Curva analítica para a nicotina



Fonte: A Autora

A figura 19 apresenta a relação dos valores de resíduos e os valores preditos.

Figura 19 - Gráfico de resíduos versus valores preditos



A análise de resíduos demonstrou aleatoriedade, pois os resíduos apresentam-se dispersos aleatoriamente em torno de zero, concentrados entre -2 e 2 apenas um ponto acima de 3 e nenhum abaixo de -3 (figura 18). Portanto, o modelo é adequado e a linearidade está validada.

O uso de outros parâmetros matemáticos como a análise de resíduos, teste de homocedasticidade e falta de ajuste, além do coeficiente de determinação é destacada por autores como sendo a maneira mais adequada para a avaliação da linearidade. Visto que a avaliação apenas pelo coeficiente de determinação não é suficiente, uma vez que o valor de R^2 projeta a proporção de variação explicada pelo modelo, não garantindo a adequação do ajuste linear à curva analítica (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020; RIBEIRO et al., 2008).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos pela relação S/N foram de $0,008 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,03 \text{ mg g}^{-1}$ respectivamente. Não há legislação que indique a concentração aceitável de nicotina em tabaco de cigarro, há apenas para a fumaça primária de cigarro sendo de 1 mg/cigarro (BRASIL. Ministério da Saúde, 2012).

A recuperação foi avaliada em três concentrações nas folhas de tomate fortificadas, sendo $0,06 \text{ mg g}^{-1}$, $7,5 \text{ mg g}^{-1}$ e 15 mg g^{-1} . Os resultados das recuperações foram de 97,5%, 99,6% e 98,9% respectivamente. A precisão foi avaliada em termos de DPR para as mesmas concentrações, foram obtidos os valores de 2,5%, 2,3% e 1,7%.

A recuperação e a precisão são consideradas aceitáveis de acordo com a AOAC (2016), que preconiza o intervalo de recuperação para analitos não classificados em níveis traços de 97 a 103 % e para $\text{DPR} \leq 2,7 \%$ e ainda corrobora com a recuperação obtida por Sha e col. (2022) que desenvolveram um método baseado em tecnologia de impressão digital eletroquímica para análise *in loco* de nicotina usando um kit portátil (A-SPE). Os autores realizaram testes em GC-FID para fins de comparação e as recuperações obtidas foram de 106,4 a 113,2 com DPR variando de 1,78 a 3,8 %.

Outro estudo que determinou nicotina em folhas de tabaco por headspace e micro extração em fase sólida combinado com GC-MS, obteve recuperações entre 99,56 e 99,80 % com DPR de 0,4 % corroborando com o presente estudo (TANG et al., 2019).

Assim, por meio do método proposto, utilizando QuEChERS modificado, foram alcançados resultados similares com outros estudos, mas com a vantagem de ser um método que demanda de menor volume de solvente extrator. Além disso, foi utilizado menor quantidade de sorventes para limpeza (0,3 g de $MgSO_4$ e 0,1 g de PSA) em relação ao estudo de Li e col. (2019) que utilizou 0,5 g de $MgSO_4$ + 0,125 g de PSA e 0,25 g de carbono. Essa diferença na etapa de limpeza para a mesma amostra e analito, pode ser decorrente da solução usada para alterar o pH do meio. Nesse estudo, foi utilizado 0,5 mL, volume menor de água, comparado a 5 mL de solução de amônia 6% utilizado no trabalho de Li e col. (2019). Dessa forma, menor quantidade de coextrativos foi observada, necessitando, também, de menor quantidade de sorventes na limpeza do extrato.

5.3 DETERMINAÇÃO DE NICOTINA EM AMOSTRAS REAIS DE TABACO DE CIGARRO CONTRABANDEADO POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADO A DETECTOR DE IONIZAÇÃO EM CHAMA (GC-FID)

A Tabela 6 apresenta as concentrações de nicotina total de nove marcas de cigarros contrabandeados e duas marcas de cigarros legais vendidos no Brasil.

Tabela 6 - Concentração de nicotina em cigarros contrabandeados (A-I) e legais (J e K) (n = 3)

Marca	Concentração (mg/cigarro)
A	6,7 ± 0,1
B	5,5 ± 0,2
C	6,7 ± 0,4
D	6,0 ± 0,7
E	6,2 ± 0,0
F	5,8 ± 0,1
G	6,3 ± 0,2
H	6,1 ± 0,7
I	6,7 ± 0,2
J	10,7 ± 0,7
K	9,0 ± 0,8

Fonte: A Autora

Conforme a tabela 6, verifica-se que as amostras de tabaco de cigarros contrabandeados, das marcas analisadas pelo método otimizado, apresentaram concentração de nicotina menor em relação aos cigarros comercializados legalmente no Brasil e também, em relação a outros estudos encontrados na literatura (Tabela 7).

Tabela 7 - Concentração de nicotina em cigarros legais em outros estudos

Referência	Concentração de nicotina mg g ⁻¹	Local	Procedência
Este estudo	9,5 a 14	Brasil	Contrabandeados
Este estudo	15 a 17,8	Brasil	Comercial Legal
INABA et al., 2014	13,7 a 17,0.	Japão	Comercial Legal
TAUJENIS; OLŠAUSKAITĖ; PADARAUSKAS, 2015	14,3 a 16,1	Lituânia	Comercial Legal
LI et. al (2019)	21,1	China	Não indica
LI et. al (2019)	22,1	América	Não indica

Fonte: A Autora

Essa diferença de concentração pode ser relacionada com a mistura do tabaco na produção do cigarro. Em algumas marcas de cigarro contrabandeado há informações em suas embalagens indicando adição de extratos vegetais à mistura, contudo não é especificado quais os tipos de extratos utilizados. Isso faz com que o cigarro contrabandeado tenha o mesmo volume que o cigarro legalizado, no entanto menos tabaco disponível, diminuindo assim a concentração. Isso corrobora com o estudo realizado por Pinto da Silva e col. (2016), no qual encontraram gramíneas em amostras de cigarros contrabandeados. Nesse caso, a concentração de nicotina pode estar diretamente ligada à mistura do processo de produção dos cigarros contrabandeados.

A falta de controle na qualidade da produção do cigarro contrabandeado tem aumentado o nível de alerta em relação à saúde pública, uma vez que houve um aumento da migração do mercado consumidor legal para o ilegal nos últimos anos (BYRON et al., 2019; WILLIAMS et al., 2010).

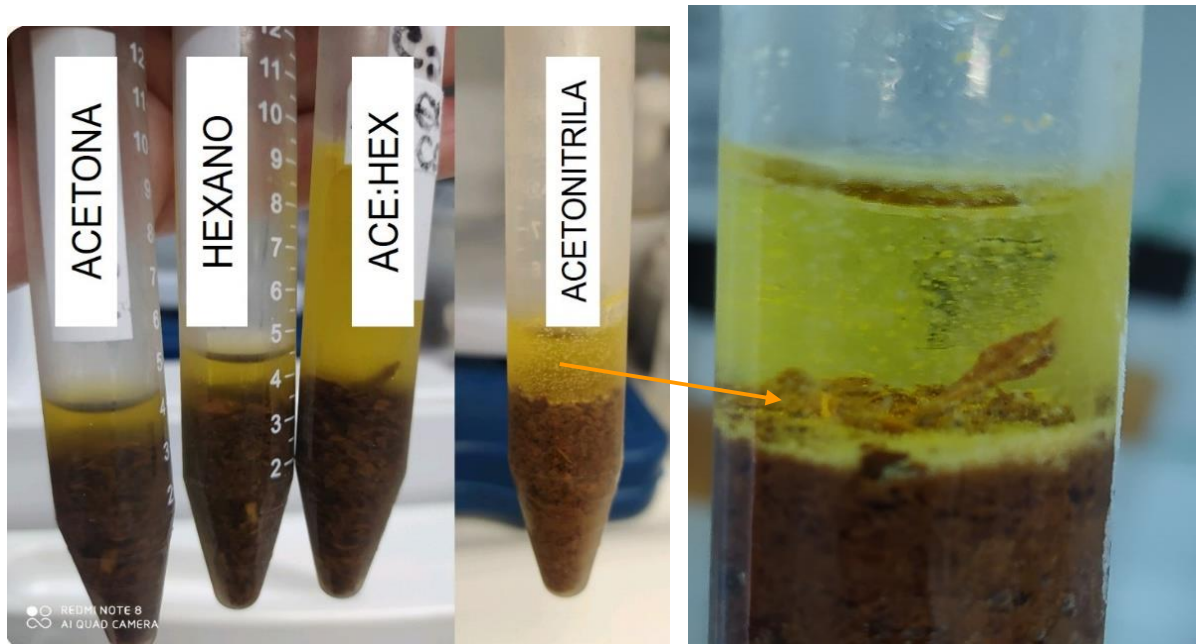
Esses consumidores tendem a consumir a mesma quantidade de nicotina diariamente para alcançar os efeitos desejados, ajustando o consumo para compensar a diferença na disponibilidade de nicotina ao usar cigarros contrabandeados. Esses dados estão consolidados com a pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Ética em Concorrência, que aponta que os consumidores de cigarros contrabandeados consomem duas unidades a mais por dia em relação aos consumidores de cigarros legais (BRANSTETTER et al., 2019; ETCO, 2019; WILLIAMS et al., 2010). Sendo inclusive exposto a outros contaminantes físicos e químicos, como metais potencialmente tóxicos (Pb, Ni, Cd) e níveis mais elevados de monóxido de carbono e alcatrão, pois a quantidade dessas substâncias geradas não varia com a quantidade de nicotina no cigarro (BENOWITZ et al., 1983; INCA, 2022).

Embora os cigarros contrabandeados tenham menor concentração de nicotina do que os cigarros legais, a quantidade encontrada é considerada suficiente para causar dependência, pois estudos mostram que a biodisponibilidade absoluta da nicotina pode chegar a 40% (OLSSON GISLESKOG et al., 2021).

5.4 ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO DE COMPOSTOS DA MATRIZ DE TABACO EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS

A figura 20 apresenta os resultados da precipitação dos componentes extraídos por diferentes solventes orgânicos, quando submetidos à baixa temperatura.

Figura 20 - Amostras de tabaco e solventes após exposição a baixa temperatura



Fonte: A Autora

Na figura 20 é possível visualizar precipitados branco formados na amostra com o solvente acetonitrila. Nos solventes acetona, hexano e a mistura hex:ace, não houve a formação de precipitados na temperatura de -18°C .

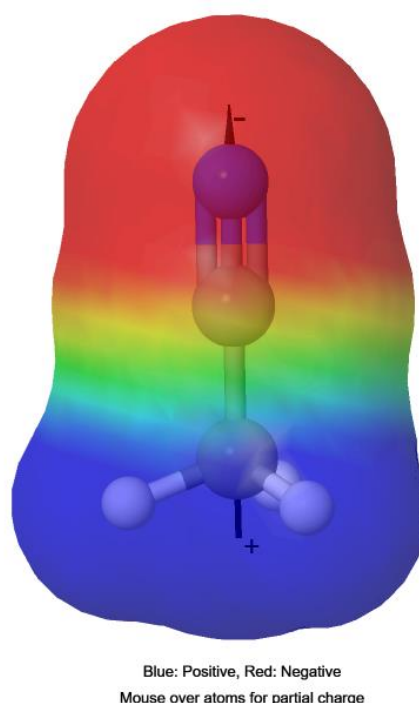
A formação de precipitado apenas em acetonitrila pode ser explicada pelo aumento da constante dielétrica desse solvente devido à diminuição da temperatura, em relação a constante dielétrica dos demais (GAGLIARDI et al., 2007).

A constante dielétrica é diretamente proporcional à polaridade do solvente orgânico. Quando a temperatura diminui de 25 para 5°C , a constante dielétrica de hexano aumenta de $1,88$ para $1,92$, enquanto que a constante para a acetona

aumenta de 21 para 22,4. Para acetonitrila, a constante dielétrica tem um aumento de 35,8 para 39,7 nas mesmas condições (DORTMUND DATA BANK, [s.d.], [s.d.], [s.d.]). Assim, a mudança na polaridade do hexano e acetona não foi suficiente para separar os compostos solubilizados quando comparada à da acetonitrila.

A molécula da acetonitrila, além da constante dielétrica igual a 35,8 em 25°C, possui momento de dipolo de 3,92 D (debye). Essas propriedades contribuem para a característica do solvente em solubilizar moléculas polares e não polares (HOFF, 2018). A figura 21 apresenta a distribuição de carga na molécula da acetonitrila.

Figura 21 - Distribuição de carga na molécula de acetonitrila



Fonte: UNIVERSITY OF COPENHAGEN. **MolCalc**. Disponível em: <<https://molcalc.org/calculations/c0a6c61b0f31b5553e7a81fc53c7843e#/solvation>>. Acesso em: 08 jul. 2022.

Como apresentado na figura 20, a separação de cargas na molécula contribui para que a acetonitrila atue como um ótimo solvente extrator para OCPs, uma vez que esses compostos apresentam diferentes momentos de dipolo, como mostrado na tabela 8.

Tabela 8 - Propriedades dos OCPs

OCP	Fórmula molecular	Massa molar	Momento de dipolo (D)
Hexaclorociclohexano (HCH ou HCH) – Isômeros: Alfa, Beta, Delta e Gama (Lindano)	C ₆ H ₆ Cl ₆	290,8	Alfa – 2,2 Beta – Gama – 2,8 – 3,6 Delta – 2,2 – 2,3
Heptacloro Aldrin	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	373,3	1,8
Heptacloro epóxido Clordano	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	364,9	2,8
	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	389,3	1,8
Isômeros: Cis e trans Endosulfan	C ₁₀ H ₆ Cl ₈	409,8	1,4
Isômeros: alfa e beta ou I e II	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	406,9	2,9
DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,0	-
Dieldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,9	1,3
Endrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,9	1,7
DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320,0	-
Endrin Aldeído	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,9	-
DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354,5	1,2
Endosulfan sulfato	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S	422,9	2,6
Metoxicloro	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂	345,6	0,8
Endrin cetona	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,9	4,4

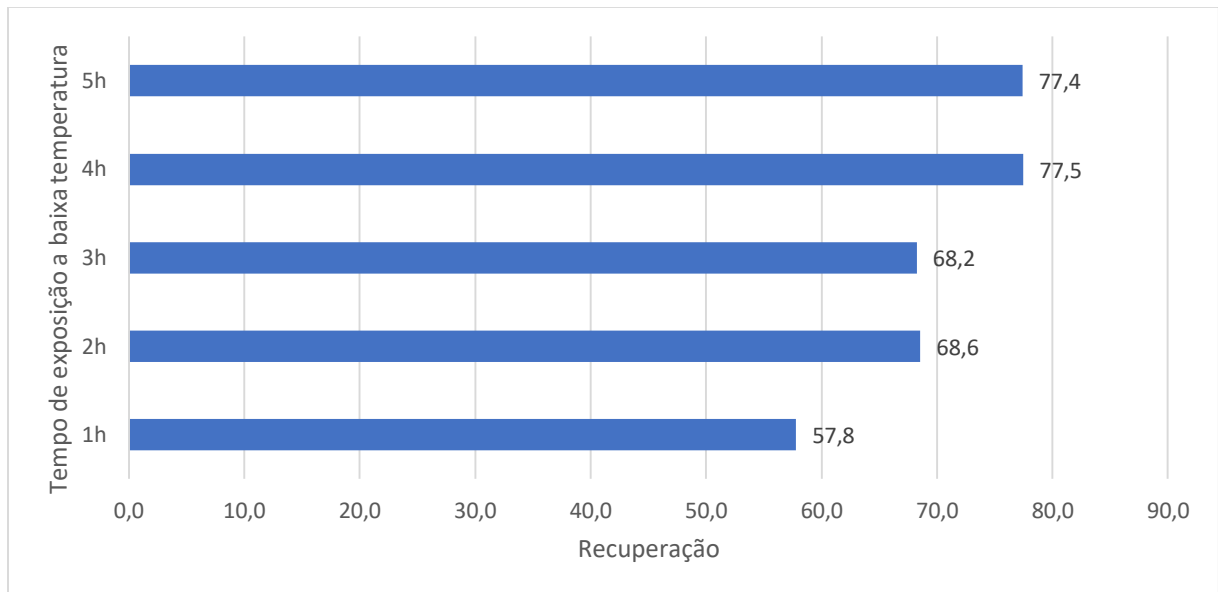
Fonte: PUBCHEM. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

A capacidade de extração de vários OCPs simultaneamente pela acetoneitrila, também foi descrita no estudo de Hao et al. (2017) para matriz tabaco utilizando extração por microndas. Os autores verificaram que quando a acetoneitrila foi utilizada, as recuperações ficaram entre 70 a 110%, no entanto, quando utilizaram a mistura hexano:acetato de etila ou hexano:acetona, alguns pesticidas tiveram suas recuperações abaixo de 40%. Os autores também relacionam ao momento de dipolo da acetoneitrila a capacidade para extrações eficientes de OCPs. Assim, a acetoneitrila foi escolhida como solvente extrator no presente estudo.

5.5 ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE SURROGATE TETRACLORO-M-XILENO PELA BAIXA TEMPERATURA EM MATRIZ DE TABACO

A Figura 22 apresenta as recuperações em relação a diferentes tempos de exposição a BT de amostra de tabaco fortificadas com surrogate tetracloro-m-xileno, na presença do solvente extrator acetoneitrila.

Figura 22 - Recuperação do surrogate (%) em diferentes tempos de extração de baixa temperatura



Fonte: A Autora

Observa-se na Figura 22 que a baixa temperatura favoreceu a extração de OCPs com o aumento do tempo de exposição, sendo 77% a recuperação máxima obtida em 4 e 5 h.

Bernardi e col. (2016) utilizaram o método QuEChERS para extração de pesticidas não organoclorados e dos OCPs endrin cetona e heptacloro em folhas de tabaco. Nesse estudo, 3h de BT (-18°C) foi utilizado para a limpeza do extrato anteriormente a etapa de extração em fase sólida dispersiva (d-spe). Os autores conseguiram recuperações de 71 a 115% para OCPs endrin cetona e heptacloro em GC-MS.

Além disso, em estudos anteriores para extração de OCPs em outras matrizes, observou-se diferentes tempos de exposição a BT. Sousa e col. (2014) determinaram pesticidas não organoclorados e OCPs como DDT/endosulfan e seus metabólitos em ovos de jacaré utilizando a BT após agitação das amostras (5 min de vortex e 5 min de centrifugação) com 12 mL de solvente extrator. Nesse estudo, o tempo necessário foi de 12h em -20°C. As recuperações alcançadas para alfa endosulfan, beta endosulfan, endosulfan sulfato, DDE e DDD variaram de 40 a 102%, as análises foram realizadas em GC-ECD.

Guedes et al. (2014) determinaram alfa endosulfan, beta endosulfan e outros pesticidas não clorados em amostras de morango, utilizando a BT por 9h (-20°C) após 15 min de agitação em shaker (200 rpm) com 4 mL de acetonitrila e 4 min de

centrifugação. As recuperações para alfa endosulfan e beta endosulfan variaram de 84 a 110%, as análises foram realizadas em GC-ECD.

Costa et al. (2015) também determinaram alfa endosulfan e beta endosulfan em amostras de alface, utilizando 10 min de agitação em shaker (200 rpm) com 1 mL de água e 8 mL da combinação de acetonitrila/acetato de etila, 3 min de centrifugação e 3h a -20°C , seguido de filtração em MgSO_4 . As recuperações para alfa endosulfan e beta endosulfan variaram de 84,4 a 86,5%, as análises foram realizadas em GC-ECD.

Com base nesses estudos percebe-se a potencialidade da BT para extração de OCPs, uma vez que as recuperações obtidas para amostras de tabaco, somente com acetonitrila, foram próximas ao estudo de Costa et al. (2015) que utilizou água/acetonitrila/acetato de etila e agitação. Além de que a temperatura de -18°C utilizada no presente estudo corrobora com os trabalhos que também utilizaram BT para extração de endrin cetona, heptacloro, alfa endosulfan, beta endosulfan, endosulfan sulfato, DDE e DDD. Contudo, buscou-se alcançar recuperações próximas a 100% com a combinação da BT com ultrassom.

5.6 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO USO DE ULTRASSOM PARA MELHORAR A RECUPERAÇÃO DE OCPS EM TABACO

A Tabela 9 apresenta as recuperações do surrogate tetracloro-m-xileno para o estudo da combinação de ultrassom com BT a partir da variação do tempo de ultrassom com a variação do tempo de exposição a -18°C .

Tabela 9 - Recuperações (n = 3) para os ensaios de variação do tempo de ultrassom e de BT

Tempo de exposição	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Tempo de ultrassom	5 min.				
Recuperação(\pm)DP	82,5 \pm 7,3	88,9 \pm 3,8	100,3 \pm 7,6	89,6 \pm 4,7	91,3 \pm 10,6
Tempo de ultrassom	10 min.				
Recuperação(\pm)DP	98,1 \pm 5,3	88,2 \pm 5,2	100,8 \pm 6,2	85,4 \pm 7,2	93,8 \pm 10,0
Tempo de ultrassom	15 min.				
Recuperação(\pm)DP	101,3 \pm 7,6	84,9 \pm 7,3	89,0 \pm 4,4	90,5 \pm 7,6	93,0 \pm 9,6

Fonte: A Autora

Nota: Faixa de aceitabilidade REC: 70 – 120% (AOAC, 2016). DP = desvio padrão.

Observa-se na tabela 9 que a combinação do ultrassom com a BT obteve melhores recuperações (entre 82,5 e 101%) em comparação com as recuperações obtidas apenas com BT (57 a 77%).

Para um tempo de sonicação de 5 min, a melhor recuperação (100%) foi alcançada em 3h de BT. Após 10 min de sonicação, foram obtidas duas recuperações próximas a 100%, correspondendo a 1 h (98%) e 3h (100,8%) de BT. E para 15 min de sonicação, a melhor recuperação (101%) foi alcançada após 1h de BT. Além de melhorar a recuperação, o uso do método combinado possibilitou a obtenção de um extrato limpo.

Qi e col. (2014), em seu estudo para determinação de OCPs (alfa- HCH, beta-HCH, delta- HCH, aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, isômero heptacloro epóxido, Cis/trans clordano, endosulfan I (alfa), endosulfan II (beta), DDE, DDD, DDT em folhas de tabaco e cigarros legalizados, utilizaram o método de ultrassom por 30 min com hexano:acetato de etila como solvente extrator, seguido de 5 min de centrifugação, limpeza por SPE florisil, obtendo recuperações de 73 a 111%.

Bernardi e col. (2016) para amostras de folhas de tabaco utilizaram o método QuEChERS modificado e limpeza com d-spe (C18, PSA e GBC) e PBT por 3h para extração de 55 pesticidas, dentre eles os OCPs heptacloro, heptacloro epóxido e endrin cetona determinação em UHPLC-MS/MS e GC-MS/MS, obtendo recuperações de 70 a 115%.

Observa-se que as recuperações obtidas nesse estudo corroboram com as recuperações alcançadas pelos estudos de Qi et al. (2014) e Bernardi et al. (2016). No entanto, o método ULT/BT apresenta redução de tempo de análise e consumo de energia e eliminação do uso de solventes, uma vez que 10 min de ultrassom e 1h de BT foram suficientes para a extração e limpeza do extrato.

O método de ultrassom foi escolhido devido as suas potencialidades e características de análise segundo os objetivos da química analítica verde e por oferecer uma extração limpa. Além disso, o ultrassom é relativamente fácil de usar, versátil, flexível e requer baixo investimento em comparação com outras técnicas de extração (TIWARI, 2015), e ainda é uma opção favorável, uma vez que permite a extração de mais de uma amostra simultaneamente.

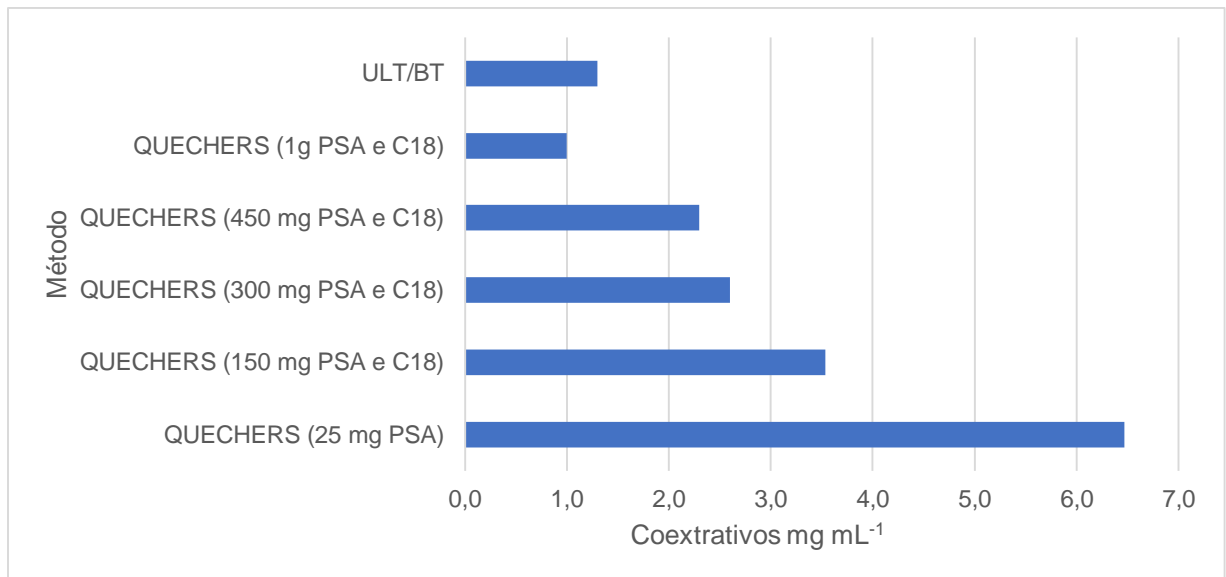
Na temperatura de -18°C, os coextrativos são solidificados e precipitados, não interferindo no extrato final e não sendo necessárias etapas adicionais de limpeza, como em outros estudos que utilizaram apenas ultrassom (ALBERO; TADEO; PÉREZ, 2019a; CUI et al., 2011; KUNENE; MAHLAMBI, 2020; LIU et al., 2020). Assim como o banho de ultrassom permite a extração de mais amostras, a BT, utilizando congelador convencional, também permite múltiplas amostras ao mesmo tempo.

Sendo assim, a combinação ULT/BT pode ser considerada um método econômico e ambientalmente favorável.

5.7 COMPARAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE COEXTRATIVOS NÃO VOLÁTEIS EM EXTRATO DE TABACO PELOS MÉTODOS ULT/BT E QuEChERS

A figura 23 apresenta a quantidade de coextrativos não voláteis do extrato de tabaco obtido pelo método ULT/BT em comparação com a quantidade de coextrativos no extrato obtido pelo método QuEChERS com diferentes quantidades de sorventes para a etapa de limpeza.

Figura 23 - Coextrativos da matriz de tabaco utilizando o método QuEChERS com diferentes quantidades de sorventes

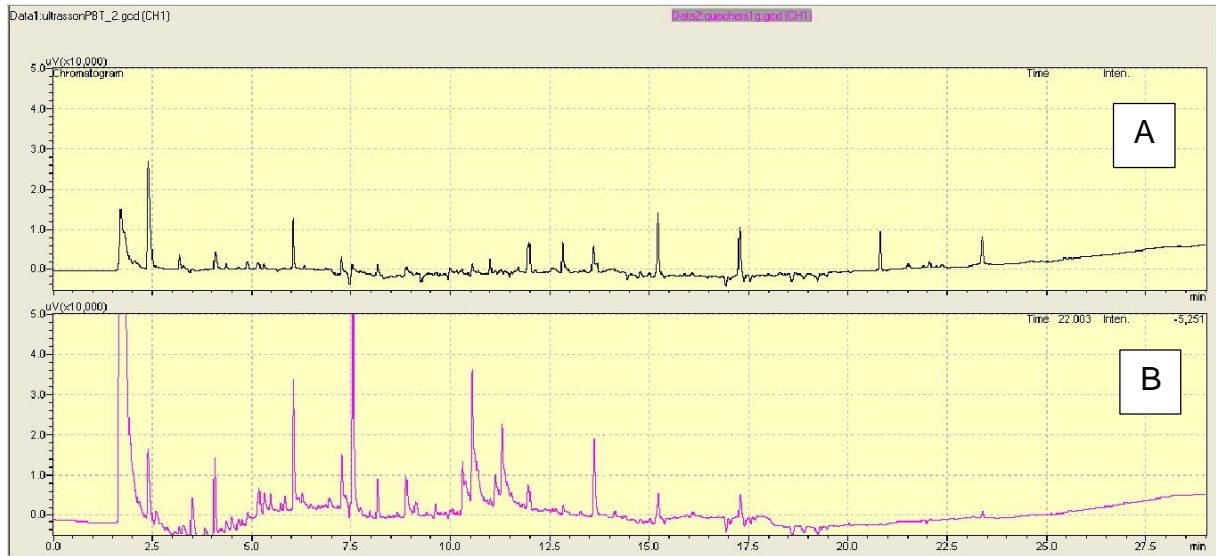


Fonte: A Autora

Comparando-se a quantidade de coextrativos entre o método ULT/BT e o método QuEChERS, verifica-se que a BT reduziu em cinco vezes a quantidade de resíduos não voláteis do extrato de tabaco, quando comparado ao método QuEChERS utilizando 25 mg de etilenodiamino-n-propilsilano (PSA). Na figura 22 se observa que a quantidade de coextrativos entre os métodos é próxima quando se utilizou 1 g de PSA e C18 para a limpeza do extrato.

A figura 24 apresenta a comparação entre os cromatogramas do extrato de tabaco preparado pela extração de ULT/BT e pelo método QuEChERS.

Figura 24 - Extrato de tabaco pelo método ULT/BT (A) e por QuEChERS (B)



Fonte: A Autora

Pela comparação dos cromatogramas, considerando a mesma intensidade da resposta do equipamento, também é possível visualizar a diminuição da extração dos compostos da matriz entre os dois métodos.

Esses resultados corroboram com o estudo de Khan et al. (2014) que utilizaram o método QuEChERS modificado para determinação de 47 pesticidas em amostras de tabaco. Para limpeza do extrato, os autores relataram a necessidade do uso de 150 mg de PSA, 150 mg de C18 e 75 mg de negro de carbono grafitado (GBC). Em outro estudo, Bernardi et al. (2016) determinou 55 pesticidas em tabaco utilizando o método QuEChERS modificado. Para a limpeza do extrato, os autores utilizaram 100 mg PSA, 100 mg C18, 100 mg GBC e 3h de precipitação a baixa temperatura (PBT). Nesses estudos, foi possível observar que além dos sorventes PSA e C18, também foram utilizados o GBC e a PBT.

O método ULT/BT apresenta a vantagem de utilizar apenas 1h de baixa temperatura para obtenção de quantidade reduzida de coextrativos no extrato, o que pode ser relacionada com a presença de água na etapa de extração. Nos estudos de Khan et al. (2014) e Bernardi et al. (2016) ambos utilizaram 10 mL de água e um tempo de 30 a 10 min, respectivamente, para hidratação da amostra. Como o ultrassom favorece o contato entre o solvente e a matriz da amostra devido à cavitação promovida, não se faz necessária a presença de água como no caso do método QuEChERS.

O método ULT/BT une processos simples de extração, o que gera um extrato com menores quantidades de coextrativos, pois estes são precipitados pela BT não ficando disponíveis no extrato para análise cromatográfica, favorecendo a análise dos analitos alvo.

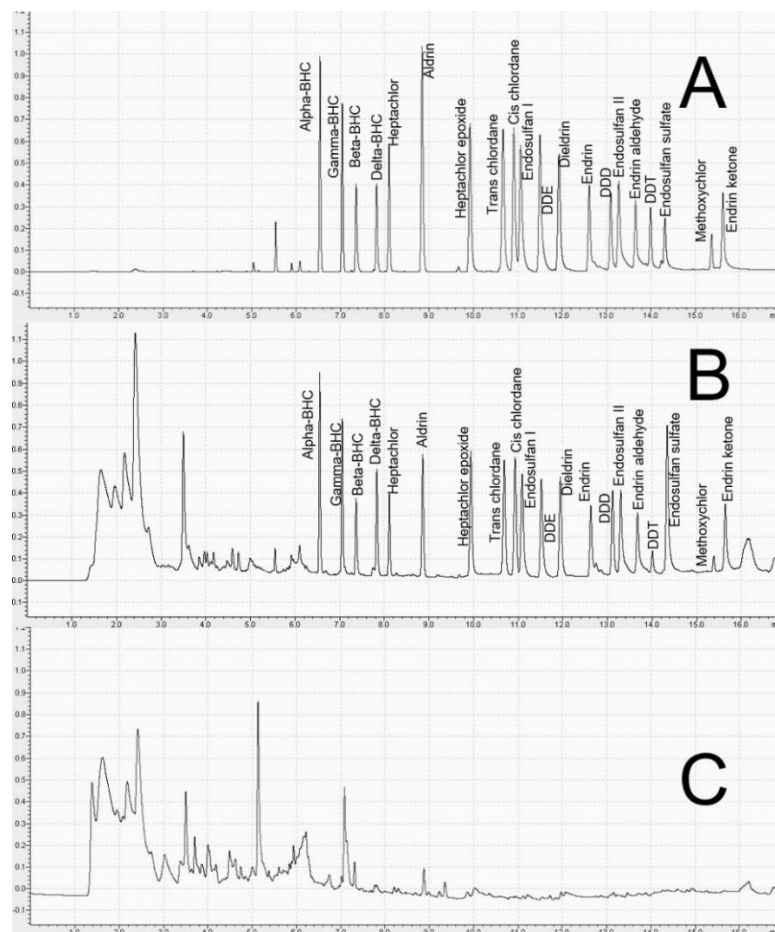
5.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ULT/BT OTIMIZADO PARA EXTRAÇÃO DE OCPS EM TABACO DE CIGARRO

Para a validação do método ULT/BT, foram investigados os seguintes parâmetros de desempenho analítico: efeito matriz, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão (recuperação) e precisão.

5.8.1 Efeito Matriz (EM)

A figura 25 apresenta a comparação entre cromatogramas.

Figura 25 - Cromatogramas de OCPs no solvente (A), OCPs no extrato de matriz (B) e apenas o extrato de matriz (C)

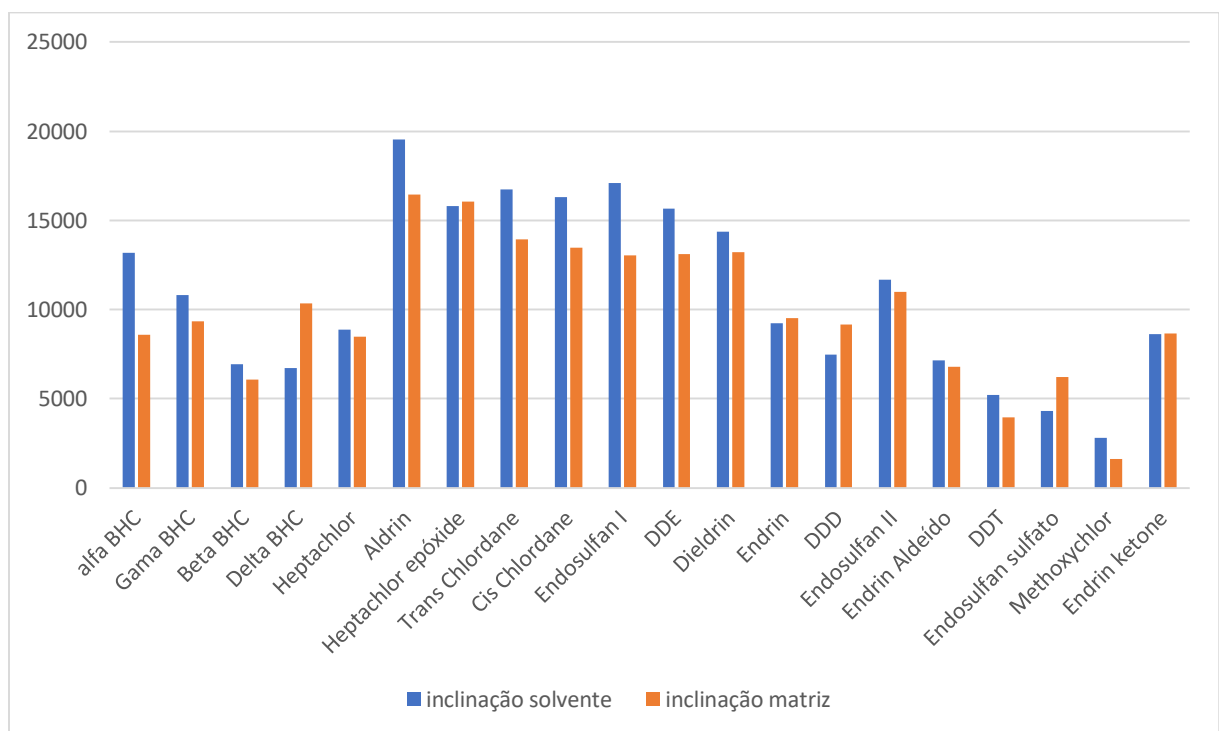


Fonte: A Autora

Na figura 16 é possível observar que alguns picos, quando combinados com a matriz, sofreram modificações de intensidade, considerando a mesma concentração para ambos (160 mg L^{-1}), ou seja, há interferência da matriz no sistema. É possível visualizar picos bem definidos para todos os OCPs e, mesmo combinados com a matriz, não há interferência nos tempos de retenção.

A influência do EM foi determinada pela avaliação da supressão ou aprimoramento do sinal dos analitos em relação à presença dos componentes da matriz, que podem influenciar devido ao comportamento no injetor ou na coluna cromatográfica. O EM pode ser avaliado com base na inclinação da curva analítica obtida em solvente e combinada com a matriz. A figura 26 compara as inclinações das curvas em solvente e combinada com a matriz.

Figura 26 - Comparação das inclinações das curvas de calibração dos OCPs em solvente e combinado com a matriz

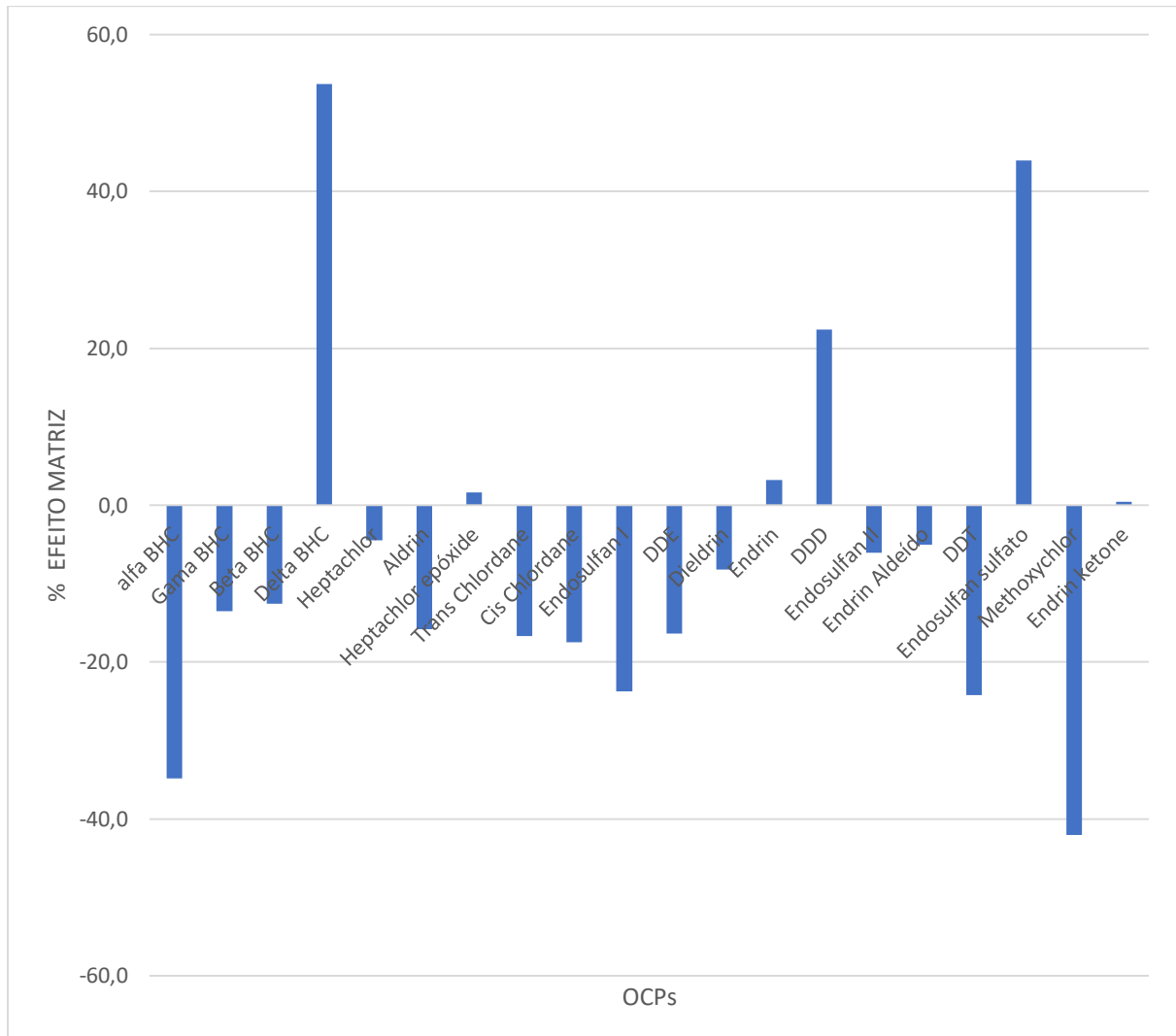


Fonte: A Autora

Foi possível observar que o comportamento dos componentes da matriz em relação aos analitos não segue a mesma tendência para todos os OCPs. Observa-se um aumento na inclinação para os OCPs, delta HCH, heptachloro epóxido, endrin, DDD, endosulfan sulfato e endrin cetona. Para os demais OCPs, a inclinação teve uma redução.

Na Figura 27, é possível observar a porcentagem do efeito da matriz em cada um dos OCPs estudados.

Figura 27 - Influência do EM (%) na extração dos OCPs



Fonte: A Autora

Como mostra a Figura 27, entre os 20 OCPs avaliados, para 13 o EM foi inferior a 20%, e para 7 o EM foi superior a 20%.

O EM no sinal do analito é insignificante quando os valores forem iguais a 0%, nesse caso as inclinações das curvas de calibração em solvente e combinadas com a matriz são idênticas (KRUIVE et al., 2015a, 2015b).

Os OCPs gama- HCH, beta- HCH, heptacloro, aldrin, heptacloro epóxido, trans clordano, cis clordano, DDE, dieldrin, endrin, endosulfan II endrin aldeído e endrin cetona não apresentaram EM significativo, ficando abaixo de $\pm 20\%$.

Apresentaram EM significativo os OCPs: alfa- HCH (-34%), endosulfan I (-23,0%), DDT (-24,3%) e metoxicloro (-42,1%), os quais apresentaram EM negativo,

indicando que ocorreu um efeito de supressão. Os OCPs Delta- HCH (53,7%), DDD (22,4%) e endosulfan sulfato (43,9%) mostraram EM positivo, indicando aumento no sinal.

Com exceção do Delta- HCH, o EM para os demais OCPs que apresentaram EM significativo foi considerado de intensidade média, pois ficou compreendido na faixa de 20 – 50%. Apenas o Delta- HCH apresentou EM forte maior que 50% (YANG et al., 2022).

O efeito matriz para os OCPs heptacloro epóxido e endrin cetona foram relatados no estudo de Bernardi e col. (2016), quando utilizaram o método QuEChERS com d-spe para limpeza acrescentando BT e GBC no processo para determinação de pesticidas em amostras de tabaco. Estes OCPs apresentam EM de 15 e 22% respectivamente.

Ghosh e col. (2014), utilizando agitação com ACN:água por 45 min e particionamento com hexano (40 mL), seguido de limpeza do extrato com coluna de florisil e sulfato de sódio anidro, obtiveram EM para os OCPs alfa (14,4%), gama (14,4%), beta (16,8%) e delta (21,8%) HCH, endosulfan I (15,8%), II (18,4%) e sulfato (39,6%), endrin (38,8%) e DDT (26,1%) em amostras de tabaco analisadas em GC - MS. Bernardi et al. (2016) obteve porcentagens de EM para endrin cetona (22%), heptacloro epóxido (15%) para amostras de tabaco analisadas em GC-MS.

Comparando os resultados dos estudos de Ghosh (2014) e Bernardi (2016) com o EM do presente estudo (alfa (-34,8%), gama (-13,6%), beta (-12,6%) e delta (53,7%) HCH, endosulfan I (-23,8%), II (- 6 %) e sulfato (-24,3%), endrin (3,2%), DDT (-24,3%), endrin cetona (0,4%) e heptacloro epóxido (1,6%)) observa-se que apenas 3 OCPs tiveram EM maior (alfa HCH, delta HCH e endosulfan I), os outros OCPs apresentaram valores menores ao estudo comparado, sendo cinco não considerado significativo.

Com base nisso, o método ULT/BT mostrou-se eficiente para minimizar o EM na análise de OCPs em tabaco quando comparado com outros métodos de extração utilizados para a mesma matriz e análise em cromatografia a gás. Isso mostra que o método fornece uma ótima limpeza do extrato, o que minimiza o EM, pois diminui os componentes da matriz no extrato.

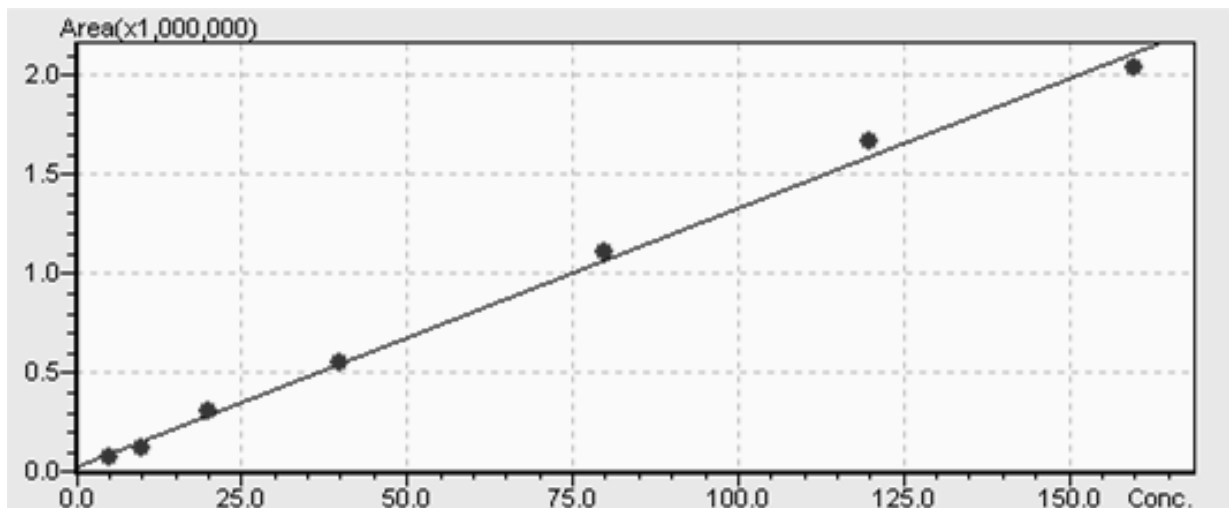
A vantagem do método ULT/BT é a não adição de adsorventes necessários para a diminuição do EM, reduzindo custos e resíduos. Uma vez se tratando de analitos em níveis traços, o processo de diluição não se torna viável.

5.8.2 Linearidade

A curva analítica para cada OCP foi submetida a análise estatística de parâmetros numéricos como média, mediana, moda, assimetria, curtose e coeficiente de variação, sendo observada a proximidade entre os valores de média e mediana. O coeficiente de variação apresentado foi menor que 30%, os valores para a assimetria ficaram compreendidos entre +1 e -1, e a ausência de outliers foi confirmada pela curtose com valores negativos, esses resultados indicam tendência à normalidade. As soluções para a calibração foram preparadas combinadas com a matriz, uma vez que o EM foi significativo para alguns OCPs em estudo (KRUIVE, 2013). A curva analítica para todos os OCPs apresentou linearidade na faixa de 5 a 160 $\mu\text{g L}^{-1}$, distribuídas em 7 pontos.

A figura 28 apresenta a curva analítica para o OCP endosulfan I.

Figura 28 - Curva analítica representativa para o OCP endosulfan I



Fonte: A Autora

Não foi observada falta de ajuste na regressão linear ($p\text{-valor} > 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi igual ou maior a 0,90 (INMETRO) para todos os OCPs. Os valores foram considerados homocedásticos de acordo com o teste de Brown-Forsythe ($p\text{-valor} > 0,05$). A tabela 10 apresenta os dados da avaliação da linearidade do método para cada OCP.

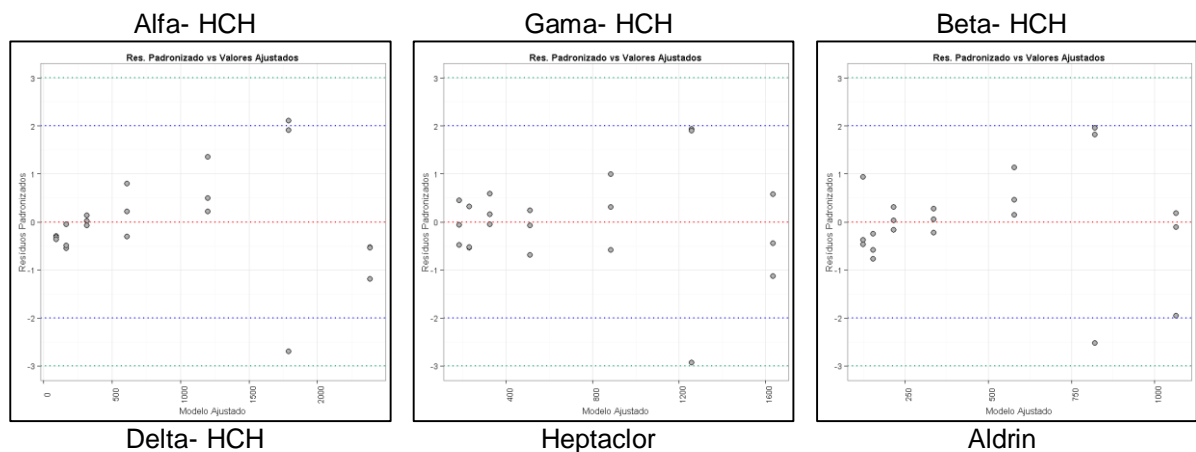
Tabela 10 - p-valor e coeficiente de determinação (R^2) para avaliação de linearidade da curva analítica

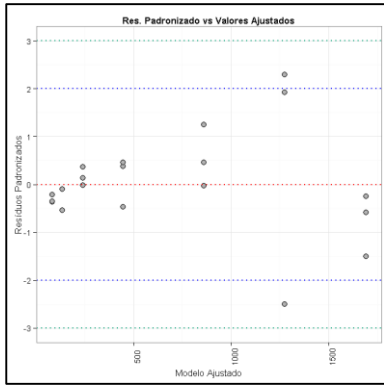
	Falta de ajuste	Homocedasticidade: Teste de Brown-Forsythe	R^2
Alfa- HCH	0,59	0,55	0,996
Gama- HCH	0,97	0,74	0,998
Beta- HCH	0,73	0,71	0,993
Delta- HCH	0,60	0,53	0,992
Heptacloro	0,35	0,59	0,991
Aldrin	0,55	0,49	0,991
Heptacloro epóxido	0,20	0,53	0,984
Trans Clordano	0,74	0,44	0,995
Cis clordano	0,76	0,85	0,994
Endosulfan I	0,87	0,46	0,996
DDE	0,88	0,66	0,994
Dieldrin	0,69	0,59	0,993
Endrin	0,96	0,65	0,996
DDD	0,57	0,35	0,991
Endosulfan II	0,84	0,48	0,995
Endrin Aldeído	0,09	0,28	0,977
DDT	0,50	0,45	0,983
Endosulfan sulfato	0,56	0,60	0,989
Metoxicloro	0,65	0,52	0,982
Endrin Cetona	0,27	0,29	0,979

Fonte: A Autora

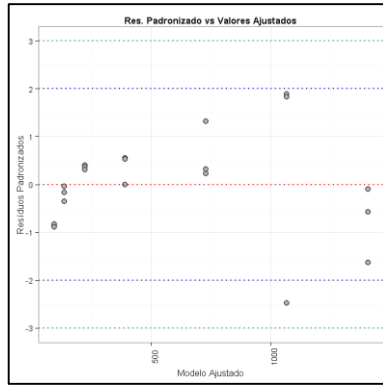
A análise de resíduos é apresentada na figura 29.

Figura 29 - Gráfico de resíduos para as curvas de calibração dos OCPs

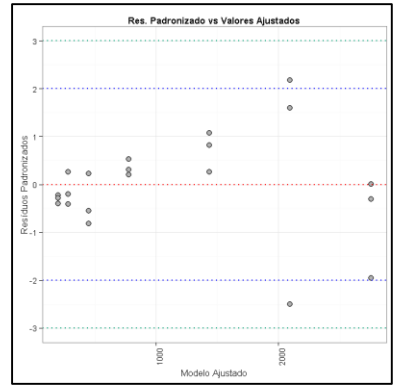




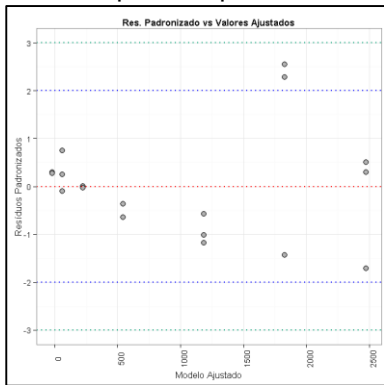
Heptaclor epóxido



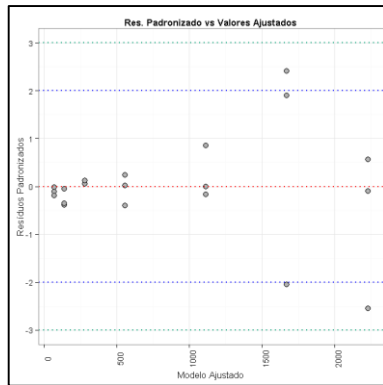
Trans Clordano



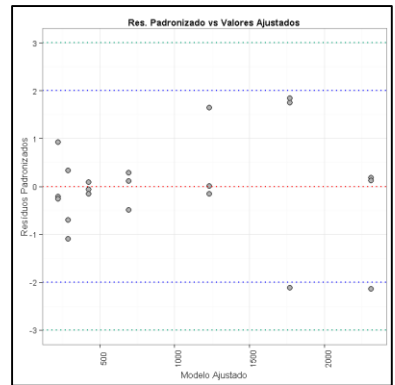
Cis Clordano



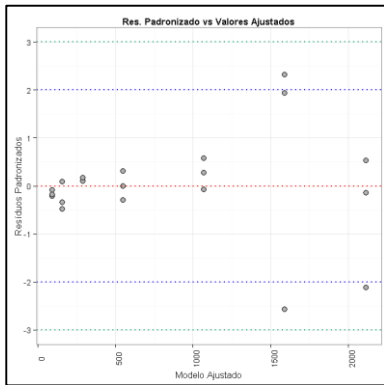
Endosulfan I



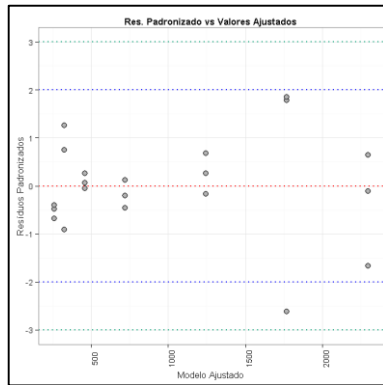
DDE



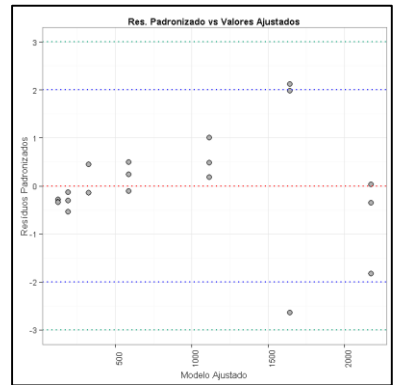
Dieldrin



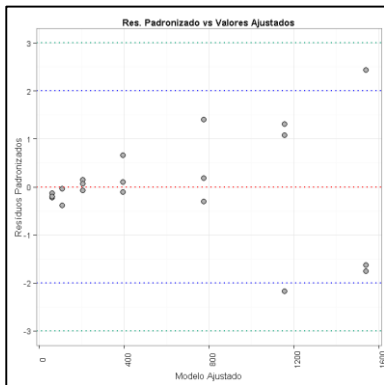
Endrin



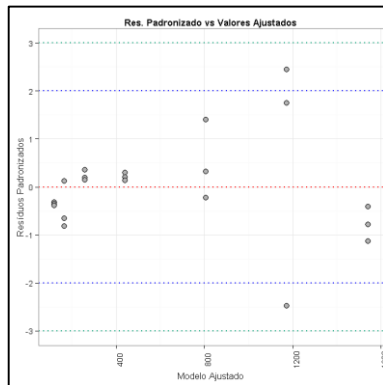
DDD



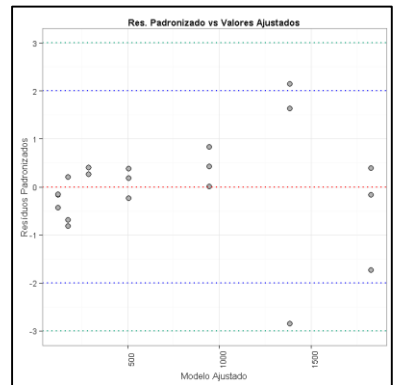
Endosulfan II



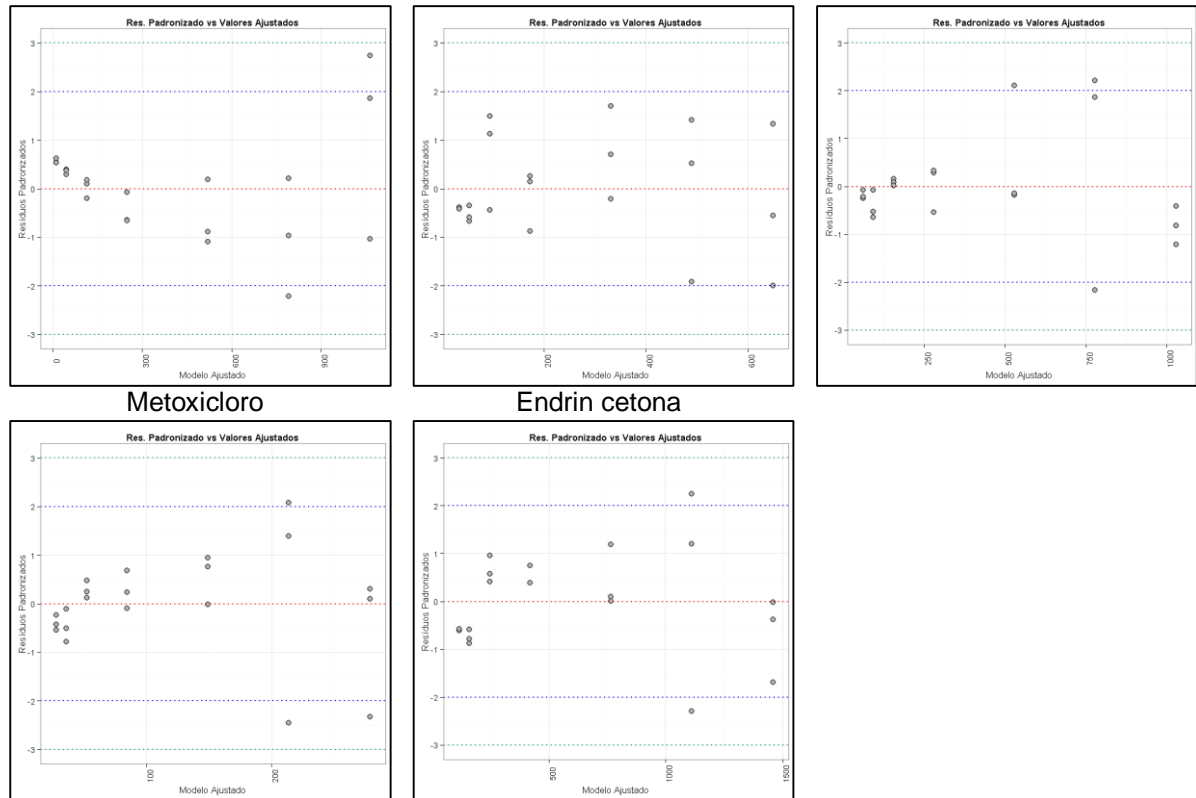
Endrin aldeído



DDT



Endosulfan sulfato



Fonte: A Autora

Na figura 29 tem-se a aleatoriedade dos resíduos da curva analítica para cada OCP estudado. Os resíduos apresentam-se dispersos aleatoriamente em torno de zero, concentrados entre -2 e 2 com poucos pontos acima de 3 e abaixo de -3, como apresentado pela figura 28. Portanto, o modelo é adequado e a linearidade é considerada validada.

5.8.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores para o LD e LQ para os OCPs estão listados na Tabela 11.

Tabela 11 - Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), para a determinação dos OCPs utilizando o método ULT/BT

(Continua)

OCPs	Tempo de retenção (min)	LD (ng g ⁻¹)	LQ (ng g ⁻¹)
Alfa- HCH	6,54	4,00	11,50
Gama- HCH	7,04	65,50	198,00
Beta- HCH	7,36	12,00	36,50
Delta- HCH	7,82	14,50	44,00
Heptacloro	8,10	7,00	21,00
Aldrin	8,85	15,50	47,00
Heptacloro epóxido	9,92	2,00	6,50

Tabela 11 - Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), para a determinação dos OCPs método ULT/BT

			(Conclusão)
Trans Clordano	10,67	13,00	40,00
Cis clordano	10,92	5,50	16,00
Endosulfan I	11,07	11,50	34,50
DDE	11,50	28,50	86,50
Dieldrin	11,93	6,00	18,00
Endrin	12,61	9,00	27,00
DDD	13,10	8,00	24,00
Endosulfan II	13,28	28,00	85,50
Endrin Aldeído	13,66	10,00	30,00
DDT	13,99	5,00	15,50
Endosulfan sulfato	14,32	19,00	57,50
Metoxicloro	15,37	44,00	134,00
Endrin Cetona	15,63	5,00	15,00

Fonte: A Autora

O LD e o LQ foram obtidos pelos parâmetros da curva analítica utilizando as equações 2 e 3, respectivamente. Optou-se por esse método pois, de acordo com a literatura, apresenta maior confiabilidade estatística, uma vez que considera o intervalo de confiança da regressão linear (RIBEIRO et al., 2008). Como mostrado na Tabela 11, os valores de LD variaram de 2 a 65,5 ng g⁻¹ e os valores de LQ variaram de 6,5 a 198 ng g⁻¹, o que pode ser considerado satisfatório por serem inferiores aos GRLs do CORESTA.

5.8.4 Exatidão (Recuperação) e Precisão

A Tabela 12 apresenta os resultados para exatidão e precisão das amostras fortificadas para alcançar as concentrações de 150, 500 e 800 ng g⁻¹. A exatidão do método foi avaliada com base no percentual de recuperação das amostras fortificadas e tratadas com a metodologia desenvolvida neste estudo.

Tabela 12 - Recuperação (REC) e precisão (DPR) para a determinação dos OCPs utilizando o método ULT/BT

(Continua)

OCPS	Recuperação e Precisão (%)					
	150 ng g ⁻¹		500 ng g ⁻¹		800 ng g ⁻¹	
	REC	DPR	REC	DPR	REC	DPR
Alfa- HCH	93,1	12,6	96,8	7,7	81,8	6,5
Gama- HCH	105,7	12,4	98,4	9,5	92,4	12,2
Beta- HCH	98,2	9,6	99,6	8,0	88,0	11,0
Delta- HCH	64,4	15,4	88,0	11,5	88,8	15,1
Heptacloro	100,9	9,6	109,1	8,0	94,2	11,9
Aldrin	108,1	14,6	86,3	8,1	84,6	9,4

Tabela 13 - Recuperação (REC) e precisão (DPR) para a determinação dos OCPs utilizando o método ULT/BT

	(Conclusão)					
Heptacloro epóxido	86,1	8,8	104,4	12,0	88,8	12,7
Trans Clordano	94,3	14,1	76,5	9,2	82,8	11,9
Cis clordano	103,2	14,5	81,0	6,0	92,0	11,9
Endosulfan I	93,7	12,2	91,6	9,0	83,4	13,1
DDE	73,1	14,2	83,8	8,6	79,1	10,9
Dieldrin	82,2	6,5	90,3	8,5	90,5	10,6
Endrin	92,0	9,2	105,0	11,1	98,4	12,7
DDD	98,7	2,9	112,7	8,6	85,8	12,4
Endosulfan II	116,1	8,2	99,4	9,1	82,0	12,0
Endrin Aldeído	60,7	11,4	63,3	4,8	53,2	14,6
DDT	35,3	64,8	39,6	16,6	30,8	15,4
Endosulfan Sulfato	48,7	15,7	102,1	14,4	73,5	13,9
Metoxicloro	103,2	8,7	78,2	10,9	83,1	10,7
Endrin Cetona	105,6	9,5	101,5	8,0	86,0	8,6

Fonte: A Autora

De acordo com os guias para validação analítica, o intervalo aceitável para a recuperação de um método é de 70 a 120 % e, para precisão, o DPR não deve exceder 20% (AOAC, 2016).

Os OCPs endrin aldeído e DDT não alcançaram recuperações nesta faixa. Recuperação de 53-63% foi observada para endrin aldeído e 30-39% para DDT. Além disso, o endosulfan sulfato não obteve recuperação aceitável na menor concentração analisada.

Os outros OCPs obtiveram recuperações adequadas nas três concentrações propostas. A precisão do método foi considerada suficiente, uma vez que os valores de DPR não excederam 20%.

As recuperações encontradas nesse estudo corroboram com recuperações encontradas por outros autores para OCPs em amostras de tabaco. Os autores Ghosh e colaboradores (2014) obtiveram recuperações de 72 a 108% para os OCPs α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, 4,4- DDT, endrin, α -endosulfan, β -endosulfan e endosulfan sulfato e DPR de 8 a 15%. Khan et al. (2014) em seu estudo alcançaram recuperações de 71 a 113% com DPR de 2 a 13%, para os OCPs α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, heptacloro, Aldrin, heptacloro epóxido cis clordano, DDE, DDT, DDD, endrin, dieldrin, α -endosulfan, β -endosulfan e endosulfan sulfato.

Qi e col. (2014) obtiveram recuperações de 78,8 a 111,1 % com DPR de 1,9 a 5,4% para os OCPs α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, heptacloro, aldrin, heptacloro epóxido cis clordano, trans clordano, DDE, DDT, DDD, endrin, dieldrin, metoxicloro, α -endosulfan, β -endosulfan e endosulfan sulfato em amostras de tabaco.

Após a avaliação dos parâmetros de validação, o método foi considerado validado e, portanto, pode ser aplicado às amostras de tabaco, com exceção dos OCPs endrin aldeído e DDT, que não alcançaram recuperações aceitáveis.

5.9 MÉTODO VALIDADO PARA EXTRAÇÃO DE OCPs EM TABACO DE CIGARRO

A tabela 13 mostra uma comparação do presente método ULT/BT em relação a outros métodos utilizados para extração de OCPs em matriz de tabaco.

Tabela 14 - Comparação entre o método ULT/BT e outros métodos aplicados para extração de OCPs em tabaco

Refer.	Massa amostra	Volume de solvente extrator	Reagentes para extração	Tempo de extração aprox.	Limpeza	Evaporação do extrato	Método
Rahman et al. (2012)	5g	100 mL acetona	-	12 h	Coluna de florisil	Sim	Agitação com solvente
Chen et al. (2013)	2 g	10 mL água e 10 mL ACN	4 g de MgSO ₄ , 1 g de NaCl, 1 g de Na ₃ Cit·2H ₂ O e 0,5 g de Na ₂ HCit·1,5H ₂ O 5 mL tolueno 40 mL Hexano	22 min por amostra.	150 mg de MgSO ₄ , 50 mg de PSA e 50 mg de C18	Não	QuEChERS
Ghosh et al. (2014)	1 g	20 mL de ACN:água (1:1)	10 g de Na ₂ SO ₄ 1 mL de tolueno	1 h	coluna de florisil e Na ₂ SO ₄	Sim	Agitação com solvente
Khan et al. (2014)	2 g	18 mL de água e 10 mL de acetato de etila	10 g de Na ₂ SO ₄ 1 mL de tolueno	15 min por amostra	150 mg PSA + 150 mg C18 + 75 mg GCB + 300 mg MgSO ₄ e filtração em membrana PTFE	Não	QuEChERS
Luo et al. (2015)	2 g	10 mL água e 10 mL ACN	5 mL tolueno	30 min por amostra	0,08 g de grafeno magnético	Não	QuEChERS
Hao, Li e Lin (2017)	1 g	10 mL ACN	0,5 g NaCl	20 min	SPE cartucho NH ₂	Não	Microndas
Qi et al. (2014)	1 g	10 mL de hexano:acetato de etila	-	45 min	SPE com florisil eluídos com hexano e GPC	Não	Ultrassom
Bernardi et al. (2016)	2 g	10 mL água e 10 mL ACN	4g de MgSO ₄ , 1g de NaCl, 1g de C ₆ H ₃ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O e 1g de C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·5H ₂ O	3h32 min	300 mg de MgSO ₄ , 100 mg de PSA, 100 mg de GCB, 100 mg de C18 e 3 h PBT	Não	QuEChERS
Este estudo	1g	5 mL ACN	-	1h10	-	Não	ULT/BT

Fonte: A Autora

Embora trabalhos anteriores tenham demonstrado excelente desempenho para extração de OCPs em amostra de tabaco, o presente método possui destaque no menor volume e uso de um só solvente, retirada da etapa de evaporação e reconstituição do extrato final.

Além de que é possível a extração de mais de uma amostra por vez otimizando o tempo de análise e não é necessária etapa para limpeza do extrato, reduzindo o consumo de solventes e resíduos.

5.10 DETERMINAÇÃO DE OCPs EM AMOSTRAS REAIS DE TABACO DE CIGARRO CONTRABANDEADO POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADO A DETECTOR DE CAPTURA DE ELÉTRONS (GC-ECD)

A tabela 14 apresenta a lista de marcas codificadas e OCPs encontrados em cada marca. O método ULT/BT foi aplicado na análise de 18 marcas de cigarros contrabandeados para o Brasil, 17 das quais fabricadas no Paraguai e uma na Indonésia conforme indicado nas embalagens.

Tabela 15 - OCPs em amostras reais de tabaco de cigarros contrabandeados

OCPs	Marcas																	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
Alfa HCH																		
Gama HCH	X													X				
Beta HCH																	X	
Delta HCH		X	X					X							X			
Heptacloro														X				
Aldrin		X												X				
Heptacloro epóxido	X	X	X	X	X	X	X			X		X		X		X	X	
Trans Clordano					X					X		X		X				
Cis Clordano	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
Endosulfan I					X													
DDE		X		X								X				X		
Dieldrin			X	X	X	X								X				
Endrin				X	X							X		X				
DDD			X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Endosulfan II	X	X	X	X	X			X	X	X				X			X	
Endosulfan sulfato		X	X	X	X	X	X		X	X	X				X		X	X
Metoxicloro			X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X
Endrin cetona	X				X	X			X	X			X		X	X		X

Fonte: A Autora

Considerando os resultados apresentados, os OCPs mais encontrados no tabaco contrabandeado foram clordano em 89% das marcas, DDD e metoxicloro em 78%, endosulfan sulfato em 67%, heptacloro epóxido e endosulfan II em 61 %.

Como não há documentos oficiais preconizando limite de resíduos de pesticidas em tabaco por não se tratar de um produto alimentício, a CORESTA elaborou um guia de orientação baseado nos níveis de resíduos que podem estar presentes após aplicações de pesticidas usando das boas práticas agrícolas (CORESTA, 2021). A tabela 15 apresenta as concentrações disponíveis pelo Níveis de Resíduos de Orientação (GRLs) do CORESTA.

Tabela 16 - Níveis de resíduos para pesticidas em tabaco (CORESTA)

OCP	Concentração (ng g ⁻¹)
Clordano	100
Isômeros- HCH	50
Endrin	50
Metoxicloro	50
Heptacloro e metabólitos	20
Aldrin+ Dieldrin	20
DDT e metabólitos	200
Isômeros endosulfan (soma)	1000

Fonte: CORESTA, C. C. FOR S. R. R. TO T. **CORESTA GUIDE N° 1 The Concept and Implementation of CPA Guidance Residue Levels** Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco, out. 2021. Disponível em: https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/Guide-No01-GRLs7th-Issue-Oct21.pdf Acesso em: 22 dez. 2021.

Endosulfan I, II e sulfato foram detectados em oito marcas, DDE e DDD foram detectados em 7 marcas, apresentando concentrações abaixo do GRLs. Os demais OCPs foram encontrados com concentrações acima dos valores apresentados na tabela 15.

O Clordano foi encontrado em 16 marcas, em concentrações que variaram de 240 a 660 ng g⁻¹. O clordano foi usado em todo o mundo como pesticida para fazendas, gramados e jardins e como cupimicida para fundações de moradias (LI et al., 2007). O clordano pode permanecer nos solos por 20 anos e percorrer longas distâncias para latitudes mais altas por meio de deposição e evaporação repetidas (CETESB, 2022a; SINGH et al., 2019). Se decompõe por aquecimento e/ou queima e em contato com bases produtoras de fumos tóxicos, incluindo cloro, cloreto de hidrogênio e fosgênio (INCHEM, [s.d.]). É tóxico e cancerígeno para a saúde humana (grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), pois pode alterar a atividade enzimática, atacando os pulmões, o sistema nervoso e a pele. Devido a sua toxicidade foi eliminado em 1997 na Europa e Estados Unidos, na China permaneceu até 2008 (CETESB, 2022a), no Brasil foi proibido em 2005 pela ANVISA (CETESB, [s.d.]).

O heptacloro apresentou a menor concentração (50 ng g^{-1}) e foi detectado em uma marca apenas, em contrapartida o heptacloro epóxido foi encontrado em 12 marcas com concentrações na faixa de 50 a 80 ng g^{-1} . O heptacloro epóxido é um produto da oxidação do pesticida heptacloro (e também do clordano), que foi utilizado para matar cupim e insetos em plantações de alimentos, especialmente milho. Atualmente só pode ser usado para controle de formigas em transformadores de potência (PUBCHEM, 2022; USEPA, [s.d.]). O heptacloro epóxido se degrada mais lentamente e, como resultado, é mais persistente que o heptacloro. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e A IARC classificaram o heptacloro como um possível carcinógeno humano. A EPA também considera o heptacloro epóxido como um possível cancerígeno humano (ATSDR, 2007). No Brasil, o uso de heptacloro foi proibido em 1985 pelo Ministério de Agricultura e Pecuária (MAPA) (CETESB, [s.d.]).

O metoxicloro apresentou concentrações na faixa de $1.300\text{-}2.900 \text{ ng g}^{-1}$, com a maior concentração detectada em 14 marcas.

A Convenção de Estocolmo não lista oficialmente o metoxicloro; no entanto, está sob análise do Comitê de Revisão referente aos OCPs. O metoxicloro foi introduzido como um substituto para o DDT na indústria por ser um análogo estrutural; no entanto, muitos países proibiram seu uso devido à sua toxicidade (UNEP, 2019; UNEP/POPS/POPRC, 2021, 2021).

Endrin cetona foi encontrado em 9 marcas na faixa de concentração de 460 a 750 ng g^{-1} . Trata-se de um produto de degradação do pesticida endrin quando exposto a luz e pode ser detectado em plantas cultivadas em solos tratados com o endrin há pelo menos 16 anos antes do plantio (CETESB, 2022b). O IARC classifica o endrin no Grupo 3 – não classificável quanto à carcinogenicidade para o ser humano. No entanto, para o endrin cetona não foram encontrados estudos que descrevam sua toxicocinética (ATSDR, 2021).

Estudos semelhantes sobre cigarros do mercado local na China demonstraram concentrações de $4,5$ a 10 ng g^{-1} (QI et al., 2014) e 30 ng g^{-1} para gama-HCH, e $2,0$ e $0,9 \text{ ng g}^{-1}$ para endrin (LUO et al., 2015). No presente estudo, as concentrações de OCPs encontradas em cigarros contrabandeados foram maiores do que os cigarros legais chineses.

A presença de pesticidas no tabaco de cigarro é preocupante porque leva à inalação direta e indireta desses compostos. Quando um cigarro queima, a

temperatura atingida é suficiente para a volatilização e/ou pirólise de pesticidas presentes no tabaco, podendo produzir outras substâncias de toxicidade desconhecida.

Essa conclusão corrobora com estudos que analisaram a fumaça, o filtro e as cinzas de cigarros. Os OCPs como DDT, DDE, aldrin, dieldrin, endrin, endosulfan e HCHs foram detectados na fumaça e nos filtros, mas não foram detectados nas cinzas (GUTHRIE, 1968). Os autores compararam as concentrações em tabaco e fumaça e concluíram que aproximadamente 10% dos compostos foram volatilizados (DANE; HAVEY; VOORHEES, 2006; GUTHRIE, 1968; LÓPEZ DÁVILA et al., 2020; RODGMAN; PERFETTI, 2009).

Considerando a volatilização e a formação de subprodutos de OCPs, bem como o fato desses compostos possuírem caráter lipofílico favorecendo o acúmulo no organismo mesmo que por inalação, o consumo de cigarros contrabandeados apresenta risco tanto para usuários ativos quanto passivos, já que praticamente metade do mercado brasileiro de cigarros é composto por produtos contrabandeados, o que aumenta o número de usuários, aumentando conseqüentemente ainda mais os gastos do sistema de saúde com o tratamento para tais pacientes.

O Brasil, quando comparado a outros países da América Latina (Chile, Colômbia, Uruguai e México), possui maior consumo de cigarros ilegais, concentrado nas populações de baixa renda e escolaridade (SZKLO; IGLESIAS, 2020).

Em um estudo realizado sobre o consumo de cigarros contrabandeados nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro, com em média 600 pessoas, em São Paulo 42,9% indicou o uso de mais de 11 cigarros por dia e no Rio de Janeiro 29,9% (SZKLO; IGLESIAS, 2020). O alto consumo de cigarro expõe o usuário a níveis de contaminantes preocupantes, uma vez que muito compostos, como os OCPs, se bioacumulam no organismo, trazendo riscos à saúde.

No Brasil, os valores gastos em tratamento de doenças prevalentes ao tabagismo ultrapassam os valores arrecadados de venda desse produto (INCA, 2020). O cigarro contrabandeado tende a piorar esse cenário, uma vez que impostos não são arrecadados, o que facilita o aumento de usuários desse produto. O montante de mortes atribuíveis ao tabaco no Brasil por ano representa em média 160 mil mortes, ou seja, 443 mortes por dia (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022).

6 CONCLUSÃO

O método QuEChERS modificado para extração de nicotina utilizando menor volume de solvente de extração, em pH 12, e sem hidratação, mostrou-se eficaz para análise de amostras de tabaco de cigarro. O método otimizado teve redução no tempo de extração, geração menos resíduos e recuperações entre 97,5 a 99,6%.

Os cigarros contrabandeados apresentaram concentrações de nicotina entre 5,5 a 6,7 mg g⁻¹, sendo inferior à de outros estudos. Com base nos resultados, conclui-se que o método proposto é uma ferramenta útil para a determinação da concentração de nicotina em tabaco de cigarro, teve sua linearidade, sensibilidade, LQ e LD, recuperação e precisão adequados e validados conforme guias de desempenho analítico e conforme, demonstrado pela aplicação em amostras reais. Assim, pode ser utilizado em laboratórios como método de rotina.

A extração a baixa temperatura combinada com a aplicação de ultrassom foi adequada para a extração de 18 resíduos de OCPs de amostras de tabaco provenientes de cigarros contrabandeados para o Brasil, uma vez que apresentou recuperações de 73 a 116% para 18 OCPs estudados. O método proposto é ecologicamente correto e econômico, pois foi necessário um volume reduzido de solvente (acetonitrila) para extração e a etapa de limpeza adicional não é necessária.

O método ULT/BT apresentou especificidade e sensibilidade, permitindo a identificação e quantificação dos OCPs estudados e a minimização do efeito matriz foi alcançada para 65% dos compostos estudados. Os resultados mostraram que o método é eficiente para extrair OCPs de amostras de tabaco.

O método ULT/BT segue os objetivos da química analítica verde, devido a redução da quantidade de solvente de extração, sendo necessários 5 mL de solvente extrator. Ainda minimiza o consumo de energia, pois pode ser realizado com amostras simultaneamente e a baixa temperatura é realizada em congelador convencional. A geração de resíduos é baixa, pois foi utilizado a quantidade mínima de solvente sem outros reagentes/adsorventes. O método se mostra seguro para o operador, uma vez que a extração acontece em tubo fechado. Nesse sentido o método otimizado atende sete dos doze princípios da química analítica verde.

A análise de amostras de tabaco contrabandeadas para o Brasil indicou a presença de resíduos OCPs em todas as amostras. Os OCPs clordano, DDD, metoxicloro, endosulfan sulfato, heptacloro epóxido e endosulfan II foram encontrados

em mais de 60% das amostras avaliadas. Sendo metoxicloro o OCP com maior concentração, 1.300-2.900 ng g⁻¹, em 14 das 18 marcas avaliadas.

A presença de OCPs representa um risco para a saúde pública, uma vez que esses compostos são volatilizados e termicamente degradados e podem se acumular no corpo de usuários e não usuários deste produto, gerando grandes impactos à saúde pública.

Com base nos resultados, conclui-se que a proposta é inovadora na determinação da concentração de nicotina e OCPs em tabaco de cigarro e podem ser utilizados em laboratórios como método de análise de rotina, além de que, métodos de fácil execução trazem um ganho na obtenção de resultados, pois uma análise acessível facilita a obtenção de maior número de resultados, que podem fornecer informações úteis para órgãos reguladores, impacto ambiental e/ou de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ALBERO, B.; TADEO, J. L.; PÉREZ, R. A. Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 739–750, set. 2019a.
- ALBERO, B.; TADEO, J. L.; PÉREZ, R. A. Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 739–750, set. 2019b.
- AMBROSIO, I. S. et al. Development and validation of a solid–liquid extraction with low-temperature partitioning method for the determination of fipronil in turtle eggshell. **Microchemical Journal**, v. 178, p. 107393, jul. 2022.
- ANASTASSIADES, M. et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 1 mar. 2003.
- AOAC. **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements**, 2016. Disponível em: <http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf> Acesso em: 31 ago. 2018.
- ARAÚJO, E. A. et al. Determination of Haloxyfop-Methyl, Linuron, and Procymidone Pesticides in Carrot Using SLE-LTP Extraction and GC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 5, p. 1344–1352, maio 2016.
- ARMENTA, S. et al. Green extraction techniques in green analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 248–253, jul. 2019.
- ATSDR, A. FOR T. S. AND D. R. **Toxicological profile for heptachlor and heptachlor epoxide**, nov. 2007. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp12.pdf>> Acesso em: 28 jun. 2022.
- ATSDR, A. FOR T. S. AND D. R. **Toxicological Profile for Endrin**, mar. 2021. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp89.pdf>> Acesso em: 28 jun. 2022.
- BADR, J. M.; BAMANE, F. H.; EL-SHAER, N. S. Application of high performance thin layer chromatography for determination of nicotine in different brands of cigarettes. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 35, n. 9, p. 1213–1221, 15 maio 2012.
- BENOWITZ, N. L. et al. Smokers of low-yield cigarettes do not consume less nicotine. v. 309, p. 139–142, 21 jul. 1983.
- BERNARDI, G. et al. An effective method for pesticide residues determination in tobacco by GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS employing acetonitrile extraction with low-temperature precipitation and d-SPE clean-up. **Talanta**, v. 161, p. 40–47, dez. 2016.

BRANSTETTER, S. A. et al. The Effect of Price on the Consumption of Reduced Nicotine Cigarettes. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 21, n. 7, p. 955–961, 21 jun. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA ECONOMIA. RECEITA FEDERAL. **Balço Aduaneiro 2020**, mar. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/receitafederal/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/relatorios/aduana/balanco-aduaneiro-2018/view>> Acesso em: 20 jun. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução - RDC Nº 14, de 15 de março de 2012**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 15 mar. 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0014_15_03_2012.html>. Acesso em: 7 out. 2018

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2021**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2021. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <<https://observatoriodeoncologia.com.br/wp-content/uploads/2022/04/vigitel-brasil-2021.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2022.

BYRON, M. J. et al. Reducing Nicotine Without Misleading the Public: Descriptions of Cigarette Nicotine Level and Accuracy of Perceptions About Nicotine Content, Addictiveness, and Risk. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 21, n. Supplement_1, p. S101–S107, 23 dez. 2019.

CDC, C. for Disease Control And Prevention. **Fast Facts _ Fact Sheets - Smoking & Tobacco Use**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/fast_facts/index.htm>. Acesso em: 4 jul. 2022.

CERQUEIRA, U. M. F. M. et al. Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis – A review. **Food Chemistry**, v. 364, p. 130429, dez. 2021.

CETESB. **Clordano - Ficha de informação toxicológica**, fev. 2022a. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/servicos/informacoes-toxicologicas/>> Acesso em: 28 jun. 2022.

CETESB. **Endrin - Ficha de informação toxicológica**, fev. 2022b. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/servicos/informacoes-toxicologicas/>> Acesso em: 28 jun. 2022.

CETESB. **Histórico e Legislação de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) no Brasil**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/pops/wp-content/uploads/sites/19/2018/06/Hist%C3%B3rico-e-legisla%C3%A7%C3%A3o-de-poluentes-org%C3%A2nicos-persistentes-POPs-no-Brasil.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2022.

CHANG, Y.-W. et al. Determination of nicotine and its metabolites accumulated in fish tissue using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem

mass spectrometry: Liquid Chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 14, p. 2414–2422, jul. 2015.

CHAWLA, S. et al. Development and validation of multiresidue analytical method in cotton and groundnut oil for 87 pesticides using low temperature and dispersive cleanup on gas chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 3, p. 983–997, jan. 2016.

CHEN, X. et al. Development and Validation of a Method for the Determination of 159 Pesticide Residues in Tobacco by Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 5746–5757, 19 jun. 2013.

CHEN, X. et al. Analyzing multiple pesticides in tobacco leaf using gas chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 9, p. 1983–1989, maio 2018.

CORESTA, C. C. FOR S. R. R. TO T. **CORESTA Guide N° 1 The Concept and Implementation of CPA Guidance Residue Levels**. Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco, out. 2021. Disponível em: <https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/Guide-No01-GRLs7th-Issue-Oct21.pdf> Acesso em: 22 dez. 2021.

COSTA, A. I. G. et al. Determination of pesticides in lettuce using solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v. 181, p. 64–71, ago. 2015.

CUI, W. et al. Determination of HCH and DDT in soils following Wenchuan 5.12 Violent Earthquake in China. **Chinese Journal of Geochemistry**, v. 30, n. 1, p. 125–131, mar. 2011.

DA CUNHA, C. C. R. F. et al. Low-temperature partitioning extraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of multiclass antibiotics in solid and soluble wastewater fractions. **Journal of Chromatography A**, v. 1650, p. 462256, ago. 2021.

DANE, A. J.; HAVEY, C. D.; VOORHEES, K. J. The Detection of Nitro Pesticides in Mainstream and Sidestream Cigarette Smoke Using Electron Monochromator-Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 10, p. 3227–3233, 1 maio 2006.

DE BARROS, A. L. C. et al. Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 20, p. 19962–19974, jul. 2018.

DE SOUSA, F. A. et al. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 179–185, nov. 2012.

DE SOUZA, A. C. et al. Low levels of persistent organic pollutants in sediments of the Doce River mouth, South Atlantic, before the Fundão dam failure. **Science of The Total Environment**, v. 802, p. 149882, jan. 2022.

DE SOUZA SANTOS CHEIBUB, A. M.; SILVA BAHIENSE DE LYRA, E.; PEREIRA NETTO, A. D. Development and validation of a method for simultaneous determination of trace levels of five macrocyclic lactones in cheese by HPLC-fluorescence after solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v. 272, p. 148–156, jan. 2019.

DERAL, D. DE E. R. **Prognóstico Cultura FUMO - Novembro de 2020**. Divisão de Conjuntura Agropecuária, 31 dez. 2020. Disponível em: <https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-12/Prog%C3%B3stico%20Fumo%20-%202020_21.pdf> Acesso em: 28 dez. 2022.

DORTMUND DATA BANK. **Dielectric Constant of Acetonitrile**. Disponível em: <http://www.ddbst.com/en/EED/PCP/DEC_C3.php>. Acesso em: 31 dez. 2021.

DORTMUND DATA BANK. **Dielectric Constant of Acetone**. Disponível em: <http://www.ddbst.com/en/EED/PCP/DEC_C4.php>. Acesso em: 31 dez. 2021.

DORTMUND DATA BANK. **Dielectric Constant of Hexane**. Disponível em: <http://www.ddbst.com/en/EED/PCP/DEC_C89.php>. Acesso em: 31 dez. 2021.

EL-HELLANI, A. et al. Free-Base and Protonated Nicotine in Electronic Cigarette Liquids and Aerosols. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 8, p. 1532–1537, 17 ago. 2015.

ERNEY, D. R. et al. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 638, n. 1, p. 57–63, maio 1993.

ETCO. Pesquisa Ibope mostra novo avanço do cigarro ilegal, que passa a dominar 57% do mercado brasileiro. **Instituto Brasileiro De Ética Concorrencial**, n. 24, p. 6–56, out. 2019.

ETCO. Pesquisa mostra que cigarro ilegal domina a metade do mercado brasileiro. **Instituto Brasileiro De Ética Concorrencial (ETCO)**, n. 27, p. 6–56, dez. 2021.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**, 2014. Disponível em: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf>. Acesso em: 8 jul. 2022

FERRER, C. et al. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7634–7639, out. 2011.

FONTANALS, N. et al. Clean-up techniques in the pressurized liquid extraction of abiotic environmental solid samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 29, p. e00111, mar. 2021.

FREITAS, R. DA S. DE et al. Development of a solid-liquid extraction method with low-temperature partitioning for the determination of insecticides in ozonized maize grain. **Química Nova**, v. 37, n. 2, 2014.

GAGLIARDI, L. G. et al. Static Dielectric Constants of Acetonitrile/Water Mixtures at Different Temperatures and Debye–Hückel A and $a_0 B$ Parameters for Activity Coefficients. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, n. 3, p. 1103–1107, 1 maio 2007.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIES´NIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GHOSH, R. K. et al. Assessment of organochlorine pesticide residues in Indian flue-cured tobacco with gas chromatography-single quadrupole mass spectrometer. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 8, p. 5069–5075, ago. 2014.

GOULART, S. et al. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 15 jun. 2008.

GOULART, S. M. et al. Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1–2, p. 41–47, jun. 2010a.

GOULART, S. M. et al. Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1–2, p. 41–47, jun. 2010b.

GUEDES, T. DE J. et al. A Simple and Efficient Method Employing Solid-Liquid Extraction with Low-Temperature Partitioning for the Determination/Monitoring of Pesticide Residues in Strawberries by GC/ECD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2014.

GUSTAVO GONZÁLEZ, A.; ÁNGELES HERRADOR, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227–238, mar. 2007.

GUTHRIE, F. E. The Nature and Significance of Pesticide Residues on Tobacco and in Tobacco Smoke. **Contributions to Tobacco Research**, v. 4, n. 6, 1 jan. 1968.

HAO, L.; LI, H.; LIN, J.-M. Fractional factorial design based microwave-assisted extraction for the determination of organophosphorus and organochlorine residues in tobacco by using gas chromatography-mass spectrometry: Hao et al. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 2, p. 542–549, jan. 2017.

HELENO, F. F. et al. Determination of fungicides in bell pepper using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Microchemical Journal**, v. 148, p. 79–84, jul. 2019.

HOFF, B. Acetonitrile as a Building Block and Reactant. **Synthesis**, v. 50, n. 15, p. 2824–2852, ago. 2018.

HOSSAIN, A. M.; SALEHUDDIN, S. M. Analytical determination of nicotine in tobacco leaves by gas chromatography–mass spectrometry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 275–278, jul. 2013.

HUGO JOSÉ DE OLIVEIRA ZOFFOLI. **Metais Pesados em Lavouras de Tabaco (Nicotiana tabacum) Tipo Virgínia da Região Sul do Brasil**. Seropédica, RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, fev. 2013.

INABA Y. et al. Determination of Amounts of Tar, Nicotine, Carbon Monoxide, and Tobacco-Specific Nitrosamines in the Fillers of and Mainstream Smoke from Privately Imported Cigarettes. **Nippon Eiseigaku Zasshi (Japanese Journal of Hygiene)**, v. 69, n. 3, p. 205–210, 2014.

INCA. **Consumo de cigarros per capita**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/consumo-cigarros-capita>>. Acesso em: 27 abr. 2022.

INCA. **Doenças relacionadas ao tabagismo**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/doencas-relacionadas-ao-tabagismo>>. Acesso em: 16 maio. 2022a.

INCA. **Mercado ilegal de produtos de tabaco**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/mercado-ilegal>>. Acesso em: 16 maio. 2022b.

INCA, I. N. DE C. **Tabagismo passivo**. Disponível em: <[https://www.inca.gov.br/tabagismo/tabagismo-passivo#:~:text=Tabagismo%20passivo%20\(abre%20em%20nova,t%C3%B3xicas%20que%20o%20fumante%20inala.](https://www.inca.gov.br/tabagismo/tabagismo-passivo#:~:text=Tabagismo%20passivo%20(abre%20em%20nova,t%C3%B3xicas%20que%20o%20fumante%20inala.)>. Acesso em: 2 jun. 2022.

INCHEM. **Clordano (PIM 574)**. Internationally Peer Reviewed Chemical Safety Information. [s.d.]. Disponível em: <<https://incem.org/documents/pims/chemical/pim574.htm#PartTitle:4.USES>>. Acesso em: 28 jun. 2022

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos**, jun. 2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf> Acesso em: 12 jul. 2021.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Clearing the Smoke: Assessing the Science Base for Tobacco Harm Reduction**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2001. p. 10029

IUPAC. **Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis: (IUPAC Technical Report)**. IUPAC, , 2002. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/doi/10.1515/iupac.74.0084>>. Acesso em: 8 jul. 2022

JEFFREY DROPE ED.; NEIL W SCHLUGER ED. **Tobacco Atlas**. 6. ed. Place of publication not identified: MCGRAW-HILL EDUCATION, 2018.

JOOSSENS, L.; RAW, M. From cigarette smuggling to illicit tobacco trade: Table 1. **Tobacco Control**, v. 21, n. 2, p. 230–234, mar. 2012.

JUHLER, RENÉK. Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 786, n. 1, p. 145–153, out. 1997.

JUMPAENG, T. et al. Development of sample preparation method for organochlorine pesticides analysis in soil samples. **AIMS Environmental Science**, v. 7, n. 5, p. 380–386, 2020.

KARBALAIE, N. S. et al. Experimental Study and Modeling of Supercritical Extraction of Nicotine from Tobacco Leaves. **Iran. J. Chem. Chem. Eng.**, v. 28, n. 4, p. 9, 2009.

KHAN, Z. S. et al. Optimization of a sample preparation method for multiresidue analysis of pesticides in tobacco by single and multi-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1343, p. 200–206, maio 2014.

KIM, L. et al. Optimization of a Simplified and Effective Analytical Method of Pesticide Residues in Mealworms (*Tenebrio molitor* Larvae) Combined with GC–MS/MS and LC–MS/MS. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3518, 31 jul. 2020.

KRUBE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29–44, abr. 2015a.

KRUBE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8–28, abr. 2015b.

KRUBE, A.; LEITO, I. Comparison of different methods aiming to account for/overcome matrix effects in LC/ESI/MS on the example of pesticide analyses. **Analytical Methods**, v. 5, n. 12, p. 3035, 2013.

KUNENE, P. N.; MAHLAMBI, P. N. Optimization and application of ultrasonic extraction and Soxhlet extraction followed by solid phase extraction for the determination of triazine pesticides in soil and sediment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 2, p. 103665, abr. 2020.

LAMPREIA, S.; COSTA, R.; BIZ, A. Tabagismo no Brasil: estimação das elasticidades preço e renda na participação e na demanda por cigarros industrializados. **Pesquisa e planejamento econômico**, v. 45, n. 2, p. 26, 2015.

LE FOLL, B. et al. Tobacco and nicotine use. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 8, n. 1, p. 19, dez. 2022.

LEE, J. et al. Simultaneous determination of PCBs, OCPs and PAHs in mussel by ultrasound-assisted cloudy extraction and gas chromatography–tandem mass

spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 10, p. 1730–1743, 2 out. 2020.

LEWIS, R. S. et al. Genetic and Agronomic Analysis of Tobacco Genotypes Exhibiting Reduced Nicotine Accumulation Due to Induced Mutations in Berberine Bridge Like (BBL) Genes. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 368, 3 abr. 2020.

LI, X. et al. Lack of Enantioselective Microbial Degradation of Chlordane in Long Island Sound Sediment. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 5, p. 1635–1640, 1 mar. 2007.

LI, X. et al. Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for Simultaneous Detection of Nine Alkaloids in Tobacco and Tobacco Products by QuEChERS Sample Preparation. **Analytical Sciences**, v. 35, n. 8, p. 849–854, 10 ago. 2019.

LIU, T. et al. Determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) using modified QuEChERS followed by GC-MS. **Analytical Methods**, v. 12, n. 18, p. 2398–2406, 2020.

LLOMPART, M. et al. Microwave-Assisted Extraction ☆. Em: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. B9780124095472144000.

LÓPEZ DÁVILA, E. et al. Pesticides residues in tobacco smoke: risk assessment study. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 9, p. 615, set. 2020.

LOZANO, A. et al. Determination of nicotine in mushrooms by various GC/MS- and LC/MS-based methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 2, p. 935–943, jan. 2012.

LUO, Y.-B. et al. Magnetic graphene as modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe adsorbent for the determination of organochlorine pesticide residues in tobacco. **Journal of Chromatography A**, v. 1406, p. 1–9, ago. 2015.

MAGALHÃES, E. J. et al. Fast Determination of Benzodiazepines in Human Urine via Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and LC-HRMS. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, n. 02, p. 118–124, 2012.

MAPA, M. DA A., Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia Analítica** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf/>> Acesso em: 24 jan. 2018.

MARTÍNEZ-PARREÑO, M.; LLORCA-PÓRCEL, J.; VALOR, I. Analysis of 51 persistent organic pollutants in soil by means of ultrasonic solvent extraction and stir bar sorptive extraction GC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 20, p. 3620–3629, out. 2008.

MARTINS, J. G. et al. Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk. **Chemosphere**, v. 92, n. 3, p. 233–246, jul. 2013.

MASSON, P. Imaging of elements in leaves of tobacco by solid sampling–electrothermal vaporization–inductively coupled plasma–optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 102, p. 24–27, dez. 2014.

MORAIS, E. H. DA C. et al. Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography. **Food Control**, v. 42, p. 9–17, ago. 2014.

MÜLLER, C.; BRACHER, F.; PLÖSSL, F. Determination of Nicotine in Dried Mushrooms by Using a Modified QuEChERS Approach and GC–MS–MS. **Chromatographia**, v. 73, n. 7–8, p. 807–811, abr. 2011.

NARENDERAN, S. T.; MEYYANATHAN, S. N.; KARRI, V. V. S. R. Experimental design in pesticide extraction methods: A review. **Food Chemistry**, v. 289, p. 384–395, ago. 2019.

OLSSON GISLESKOG, P. O. et al. Nicotine Population Pharmacokinetics in Healthy Smokers After Intravenous, Oral, Buccal and Transdermal Administration. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 60, n. 4, p. 541–561, abr. 2021.

PALACIOS A, PINTO M, BARROS L, BARDACH A, CASARINI A, RODRÍGUEZ CAIROLI F, ESPINOLA N, BALAN D, PERELLI L, COMOLLI M, AUGUSTOVSKI F, ALCARAZ A, PICHON-RIVIERE A. **Benefícios de aumentar preço de cigarro em 50% através de impostos**. Buenos Aires: Instituto de Efetividade Clínica e Sanitária, 2020. Disponível em: <www.iecs.org.ar/tabaco>.

PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84–99, fev. 2013.

PINHO, G. P. DE et al. Pesticide determination in tomatoes by solid–liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 251–256, jul. 2010.

PINTO DA SILVA, C. et al. Determination of Smuggled Cigarette Characteristics in Brazil and Their Potential Risk to the Human Health. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 127–137, 11 jul. 2016.

POOLE, C. F.; POOLE, S. K. Principles and Practice of Solid-Phase Extraction. Em: **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 273–297.

PUBCHEM. **Heptachlor epoxide**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Heptachlor-epoxide>>. Acesso em: 28 jun. 2022.

QI, D. et al. A novel fully automated on-line coupled liquid chromatography–gas chromatography technique used for the determination of organochlorine pesticide residues in tobacco and tobacco products. **Journal of Chromatography A**, v. 1374, p. 273–277, dez. 2014.

RAHMAN, M. A. et al. Pesticide Residues in Tobacco Leaves from the Kushtia District in Bangladesh. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 658–663, set. 2012.

RAHMAN, MD. M.; ABD EL-ATY, A. M.; SHIM, J.-H. Matrix enhancement effect: A blessing or a curse for gas chromatography?—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 801, p. 14–21, nov. 2013.

RAPOSO, F.; BARCELÓ, D. Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 134, p. 116068, jan. 2021.

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, p. 115913, ago. 2020.

REHMAN, M. U. et al. Introduction to natural products analysis. Em: **Recent Advances in Natural Products Analysis**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 3–15.

RIAZ, R.; MALIK, R. N.; DE WIT, C. A. Soil-air partitioning of semivolatile organic compounds in the Lesser Himalaya region: Influence of soil organic matter, atmospheric transport processes and secondary emissions. **Environmental Pollution**, v. 291, p. 118006, dez. 2021.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.

RIBEIRO, F. A. DE L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

RIGUEIRA, L. M. B. et al. Determination of Chlorpyrifos and Thiamethoxam in Potato Tuber (*Solanum tuberosum* L.) and Soil of Brazil Using Solid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning (SLE/LTP). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2013.

RODGMAN, A.; PERFETTI, T. The Chemical Components Identified in Tobacco and Tobacco Smoke Prior to 1954: A Chronology of Classical Chemistry. **Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research**, v. 23, n. 5, p. 277–333, 1 set. 2009.

RODGMAN, A.; PERFETTI, T. A. **The Chemical components of tobacco and tobacco smoke**. 2. ed. New York: [s.n.].

ROSEMBERG, J. **Nicotina Droga Universal**. São Paulo: SES/CVE: Centro De Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, 2003.

SAJID, M.; ALHOOSHANI, K. Ultrasound-assisted solvent extraction of organochlorine pesticides from porous membrane packed tea samples followed by GC–MS analysis. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 104464, jan. 2020.

SALIMIKIA, I.; HEYDARI, R.; YAZDANKHAH, F. Polyaniline/graphene oxide nanocomposite as a sorbent for extraction and determination of nicotine using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–flame ionization detector. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 15, n. 7, p. 1593–1601, jul. 2018.

SANDER, L. C. et al. Development of a Cigarette Tobacco Filler Standard Reference Material. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 19, p. 10461–10467, 3 out. 2017.

SANTANA, E. T. D.; SOARES, D. F.; FARIA, A. M. Development of a Methodology for the Determination of Pesticide Residues in Cajá-Manga Pulp (*Spondias dulcis* L.) Using Solid-Liquid Extraction with Low-Temperature Partitioning. **Journal of Chemistry**, v. 2018, p. 1–10, 1 nov. 2018.

SANTE. **Guidance Document on Pesticide Analytical Methods for Risk Assessment and Post-approval Control and Monitoring Purposes**, 24 fev. 2021. Disponível em: <https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-02/pesticides_mrl_guidelines_2020-12830.pdf> Acesso em: 06 nov. 2021.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? **Journal of Chromatography A**, v. 868, n. 1, p. 51–61, jan. 2000.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J.; VEGA, V. Comparison of solid-phase extraction sorbents for cleanup in pesticide residue analysis of fresh fruits and vegetables. **Journal of Separation Science**, v. 25, n. 14, p. 883–890, 1 out. 2002.

SHA, Y. et al. A simple and rapid approach for on-site analysis of nicotine in tobacco based on a screen-printed electrode as an electrochemical sensor. **Analytical Methods**, v. 14, n. 16, p. 1579–1584, 2022.

SHEN, Y. et al. A rapid LC-MS/MS method for simultaneous determination of nicotine and its key derivatives including hydroxylation isomers. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 468, p. 116642, out. 2021.

SHENG, L. Q. et al. Determination of Nicotine-Related Alkaloids in Tobacco and Cigarette Smoke by GC-FID. **Chromatographia**, v. 62, n. 1–2, p. 63–68, jul. 2005.

SHI, Z. et al. Salting-Out Assisted Liquid/Liquid Extraction Coupled with Low-Temperature Purification for Analysis of Endocrine-Disrupting Chemicals in Milk and Infant Formula by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 5, p. 1523–1534, maio 2017.

SILVA, A. L. O. DA; PIRAS, S. S.; MOREIRA, J. C. Considerações acerca do impacto da política de impostos sobre o comércio e o consumo dos cigarros no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, n. 11, p. e00077419, 2019.

SILVA, C. P. DA; VOIGT, C. L.; CAMPOS, S. X. DE. Determination of Metal Ions in Contraband Cigarettes in Brazil. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, 2014.

SINGH, K. et al. Development of Biomonitoring Equivalents for chlordane and toxaphene with application to the general Canadian population. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 106, p. 262–269, ago. 2019.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 7, p. 323–331, jul. 2010.

SOUSA, D. A. et al. Chemometric optimization of solid–liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 266–272, maio 2014.

STANFILL, S. et al. Characterization of Total and Unprotonated (Free) Nicotine Content of Nicotine Pouch Products. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 23, n. 9, p. 1590–1596, 18 ago. 2021.

STREMEL, T. R. D. O. et al. Development, validation and matrix effect of a QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in fish tissue. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 4, p. 246–254, 3 abr. 2018.

SWAMI, K.; JUDD, C. D.; ORSINI, J. Trace Metals Analysis of Legal and Counterfeit Cigarette Tobacco Samples Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. **Spectroscopy Letters**, v. 42, n. 8, p. 479–490, 24 nov. 2009.

SZKLO, A. S. et al. Cross-validation of four different survey methods used to estimate illicit cigarette consumption in Brazil. **Tobacco Control**, v. 31, n. 1, p. 73–80, jan. 2022.

SZKLO, A. S.; IGLESIAS, R. M. Interferência da indústria do tabaco sobre os dados do consumo de cigarro no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 12, p. e00175420, 2020.

TANG, L. et al. Direct analysis of free-base nicotine in tobacco leaf by headspace solid-phase micro-extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 24, n. 5, p. 341–349, out. 2019.

TASSEW, Z.; CHANDRAVANSI, B. S. Levels of nicotine in Ethiopian tobacco leaves. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 649, dez. 2015.

TAUJENIS, L.; OLŠAUSKAITĖ, V.; PADARAUSKAS, A. Determination of nicotine and three minor alkaloids in tobacco by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. **Acta Chromatographica**, v. 27, n. 2, p. 373–385, jun. 2015.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535–552, set. 2004.

THRÄNE, C.; ISEMER, C.; ENGELHARDT, U. H. Determination of nicotine in tea (*Camellia sinensis*) by LC–ESI–MS/MS using a modified QuEChERS method. **European Food Research and Technology**, v. 241, n. 2, p. 227–232, ago. 2015.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, set. 2015.

TOMA, M. et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 6, 2001.

TOMAZINI, R. et al. Development of a simple method to quantify fipronil and its intermediates in soil. **Analytical Methods**, v. 12, n. 25, p. 3242–3249, 2020.

UNEP, U. E. P. **Listing of POPs in the Stockholm Convention**. Disponível em: <<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/AllPOPs/tabid/2509/Default.aspx>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

UNEP/POPS/POPRC. **Methoxychlor draft risk management evaluation**, 9 abr. 2021. Disponível em: <https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/979984/methoxychlor-draft-risk-management-evaluation.pdf> Acesso em: 10 dez. 2021.

UNODC. **Guidelines on representative drug sampling**. United Nations Office on Drugs and Crime, 2009. Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/scientific/Drug_Sampling.pdf> Acesso em: 27 mar. 2018.

USEPA. **Method 3500c Organic Extraction and Sample Preparation**, 2007a. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3500c.pdf>> Acesso em: 22 jun. 2016.

USEPA. **SESDPROC-300-R3, Soil Sampling, replaces SESDPROC300-R2.**, 21 ago. 2014. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-03/documents/appendix_n_soil_sampling.pdf> Acesso em: 10 dez. 2021.

USEPA. **heptacloro epoxido**, [s.d.]. Disponível em: <<https://archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/hepchlep.pdf>> Acesso em: 28 jun. 2022.

USEPA, U. S. E. P. A. **Method 3540c Soxhlet Extraction**. United States Environmental Protection Agency, , 1996a. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3540c.pdf>> Acesso em: 22 jun. 2016.

USEPA, U. S. E. P. A. **Method 3510c Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction**. United States Environmental Protection Agency, , 1996b. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3510c.pdf>> Acesso em: 22 jun. 2016.

USEPA, U. S. E. P. A. **Method 3560 supercritical fluid extraction of total recoverable petroleum hydrocarbons**. United States Environmental Protection

Agency, , 1996c. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3560.pdf>> Acesso em: 06 jul. 2022.

USEPA, U. S. E. P. A. **Method 3535a Solid-Phase Extraction (SPE)**. United States Environmental Protection Agency, 2007b. Disponível em: <<https://www.epa.gov/esam/epa-method-3535a-sw-846-solid-phase-extraction-spe>> Acesso em: 06 jul. 2022.

USEPA, U. S. E. P. A. **Method 3545a Pressurized Fluid Extraction (PFE)**. United States Environmental Protection Agency, 2007c. Disponível em: <<https://www.epa.gov/esam/method-3545a-sw-846-pressurized-fluid-extraction-pfe>> Acesso em: 06 jul. 2022.

USEPA, U. S. E. P. A. **Method 3051a Microwave Assisted Acid Digestion Of Sediments, Sludges, Soils, And Oils**. United States Environmental Protection Agency, 2007d. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3051a.pdf>> Acesso em: 09 mai. 2017.

USEPA, U. S. E. P. A. **Method 3550c Ultrasonic Extraction**. United States Environmental Protection Agency, 2007e. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3550c.pdf>> Acesso em: 22 jun. 2016.

USEPA, U. S. E. P. A. **Method 8081b Organochlorine Pesticides By Gas Chromatography**. United States Environmental Protection Agency, , 2007f. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/8081b.pdf>> Acesso em: 22 jun. 2016.

VAGI, M. C. et al. Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD. **Desalination**, v. 210, n. 1–3, p. 146–156, jun. 2007.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. DE. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, jun. 2007.

WHO. **Standard operating procedure for determination of nicotine in cigarette tobacco filler**. New Delhi: World Health Organization. Regional Office for South-East Asia, 2014.

WHO. **Tabaco**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>>. Acesso em: 16 maio. 2022.

WILLIAMS, J. M. et al. Higher nicotine levels in schizophrenia compared with controls after smoking a single cigarette. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 12, n. 8, p. 855–859, 1 ago. 2010.

WIRNKOR, V. A. et al. Potential health risk index of polyaromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in fish species from Oguta Lake, Nigeria. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, p. 1–15, 1 jul. 2021.

XIE, J. et al. Multi-residue analysis of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in dairy products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using low-temperature cleanup and solid phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 1002, p. 19–29, out. 2015.

YANG, F. et al. Evaluation of matrix effect in determination of mevinphos stereoisomers in tobacco by supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 175, p. 107174, abr. 2022.

ZHANG, J. et al. Organochlorine pesticides (OCPs) in soils and sediments, southeast China: A case study in Xinghua Bay. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 6, p. 1270–1275, jun. 2011.

ZITTEL, R. et al. Treatment of smuggled cigarette tobacco by composting process in facultative reactors. **Waste Management**, v. 71, p. 115–121, jan. 2018.