



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Caracterização e quantificação por espectroscopia de nicotina em
misturas líquidas para cigarros eletrónicos**

Soraia Daniela Alves Simões

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Ana Rosa Galego Garcia

Professora Doutora Isabel Maria Palma Antunes Cavaco

2021



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Caracterização e quantificação por espectroscopia de nicotina em
misturas líquidas para cigarros eletrónicos**

Soraia Daniela Alves Simões

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Ana Rosa Galego Garcia

Professora Doutora Isabel Maria Palma Antunes Cavaco

2021

Caracterização e quantificação por espectroscopia de nicotina em misturas líquidas para cigarros eletrónicos

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o(a) autor(a) deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright®

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Às Professoras Ana Rosa Garcia e Isabel Cavaco por me terem orientado nesta etapa final do meu percurso académico, por toda a ajuda ao longo do processo e, acima de tudo, por terem tornado esta dissertação possível.

Aos meus pais, padrinhos e prima pelo apoio mesmo estando longe, pelos valores que me inculcaram e por tudo o que me foram ensinando ao longo deste quase quarto de século. Em especial, quero agradecer aos meus pais que sempre me incentivaram a seguir o que queria, que com o seu esforço me permitiram chegar até aqui e que, mesmo em tempos mais difíceis, nunca deixaram que me faltasse nada.

Ao Não Sei que se tornou a minha família em Faro, amigos que me ajudaram sempre que precisei e me fizeram perseverar todas as vezes em que pensei em desistir. À Catarina Correia por todas as voltas da desgraça e desabafos e amizade incondicional. À Inês Diogo que para além de amiga, foi também colega de laboratório e nunca se recusou a ouvir os meus dilemas.

À minha madrinha e afilhadas de praxe por toda a motivação que me deram durante o curso e que ao longo dos anos se tornaram mais uma das razões para eu sentir saudades do Algarve sempre que regressava a casa.

Aos amigos de Faro: por vocês aprendi a adorar esta cidade, com vocês levo memórias de cinco anos fantásticos.

A todos,
Muito Obrigada.

**Aos meus Pais,
Padrinhos e Prima.**

Resumo

O tabagismo é um fator de risco associado a um grande número de doenças crônicas e a alta mortalidade, tendo impacto não só na qualidade de vida do indivíduo como também impacto económico e ambiental. No entanto, desde o final do século XX têm surgido dispositivos como, por exemplo, os dispositivos de tabaco aquecido e os cigarros eletrônicos, que são publicitados como oferecendo uma transição mais suave durante o processo de cessação tabágica em relação às terapêuticas farmacológicas e apresentando menos perigos à saúde do utilizador em comparação com os cigarros convencionais.

Na literatura consultada, verificou-se a inexistência de métodos espectroscópicos validados para a quantificação de nicotina em e-líquidos utilizados em cigarros eletrônicos. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método para quantificação de nicotina em misturas para cigarros eletrônicos utilizando espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível e os métodos analíticos do padrão externo e de adição de padrão.

A metodologia aplicada envolveu a caracterização espectral de nicotina pura e amostras de e-líquidos comerciais e o desenvolvimento de métodos variando o solvente e condições espectrais para os dois métodos analíticos e estudando os respetivos parâmetros de desempenho.

Os resultados obtidos mostraram que o comprimento de onda mais adequado para a análise seria a 262,0 nm, máximo de absorção da segunda banda da nicotina, para o qual a sensibilidade é maior.

O solvente que mostrou melhor desempenho, tendo em conta todos os parâmetros do método analisados, foi uma mistura de propilenoglicol e glicerina vegetal (8 %) em metanol. O método de adição de padrão apresentou resultados ligeiramente melhores, apontando para que haja interferência da matriz do e-líquidos na análise. Contudo, este método analítico não será o mais adequado quando se pretende realizar análises de rotina dada a necessidade de obtenção de uma curva de calibração para cada amostra. O método de padrão externo não apresenta diferenças significativas, portanto pode ser sugerido para análises de rotina.

Os resultados das amostras fortificadas permitiram concluir que não há perdas significativas de analito nas análises, com percentagens de recuperação entre 97 e 108 %. Na quantificação de nicotina em misturas para cigarros eletrônicos, a concentração obtida na análise apresentou um valor entre 16 e 24 % inferior à indicada no rótulo. Esta discrepância entre o valor rotulado e o resultado das análises é consistente com o observado na literatura.

Palavras-chave: nicotina, cigarros eletrônicos, e-líquidos, quantificação, espectroscopia

Abstract

Smoking is a risk factor linked to many chronic diseases and a high mortality rate, affecting the life quality of the individual and having an economic and environmental impact as well. Since the late 20th century devices such as heated tobacco and electronic cigarettes have been presented as a smoother transition during the smoking cessation process than pharmacological therapeutics and as having less harmful effects on the user's health compared with traditional cigarettes.

In the bibliographic research, no article nor validated methods were found to quantify nicotine in e-liquids. Therefore, the main objective of the present experimental work is to develop and validate a method to quantify nicotine in e-liquids using ultraviolet-visible absorption spectroscopy and the external standard and standard addition methods.

The methodology comprised spectral characterization of pure nicotine and samples of commercial e-liquids and development of methods varying solvents and spectral conditions, for both analytical methods, studying the analytical parameters.

The observed results showed that the most suitable wavelength for the analysis would be 262,0 nm, an absorption peak on the second absorption band on the nicotine spectrum in which there is greater sensibility.

After analyzing the various methods parameters, the solvent that showed the best performance was a mixture of propylene glycol and glycerin (8 %) in methanol. In the standard addition method were observed slightly better results and it indicated that the analysis was affected by matrix effects. However, this analytical method would not be the most fitting for routine analysis since it requires a calibration curve for each sample. Since the external standard method does not show significative differences, it can be suggested for routine analysis.

Spiked samples results demonstrated that there were no significant losses of analyte during the analysis, with recoveries between 97 and 108 %. In the quantification of nicotine in e-liquids, the nicotine content was between 16 and 24 % less than what was shown on the label. This disparity between the labeled nicotine content and the content obtained in the analysis is also described in the consulted bibliography.

Keywords: nicotine, electronic cigarettes, e-liquids, quantification, spectroscopy

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Abstract	VI
Índice de figuras	IX
Índice de tabelas.....	XI
Lista de abreviaturas.....	XIII
1. Introdução.....	1
1.1. Consumo de tabaco e cessação tabágica.....	1
1.1.1. Terapêutica farmacológica na cessação tabágica	3
1.2. Cigarros eletrônicos	5
1.2.1. Constituição e funcionamento.....	6
1.2.2. Efeitos negativos	7
1.3. Estrutura e metabolismo da nicotina	9
1.3.1. Efeitos fisiológicos	11
1.3.2. Absorção de nicotina.....	12
1.3.3. Métodos de análise de nicotina	13
2. Parte Experimental	16
2.1. Material e Equipamento.....	16
2.2. Reagentes e Amostras.....	16
2.2.1. Segurança	17
2.3. Procedimento	18
2.4. Tratamento de dados experimentais	21
3. Resultados e Discussão	25
3.1. Caracterização espectral da nicotina e das amostras	25
3.1.1. Efeito do pH nos espectros da amostra	29
3.1.2. Soluções de nicotina pura em diferentes soluções tampão	32

3.1.3. Comparação entre espectros de e-líquidos comerciais	34
3.2. Quantificação de nicotina em e-líquidos	36
3.2.1. Escolha das condições experimentais	36
3.2.2. Análise pelo método de padrão externo em metanol	39
3.2.3. Análise pelo método de padrão externo com PGVG a 8 % em metanol	45
3.2.4. Análise pelo método de adição de padrão	50
3.3. Comparação entre o desempenho dos métodos	57
3.4. Estabilidade de soluções de nicotina	60
4. Conclusão e trabalho futuro	62
5. Referências	65
Anexos.....	73
I. Introdução.....	73
II. Parte Experimental	74
III. Resultados e Discussão.....	80

Índice de figuras

Figura 1.1 – Consumo de tabaco da população portuguesa com 15 ou mais anos. Adaptado do INS de 2014. ⁵	2
Figura 1.2 – Número médio de cigarros consumidos diariamente por fumadores portugueses com 15 ou mais anos. Adaptado do INS de 2014. ⁵	2
Figura 1.3 – Esquema geral de um cigarro eletrónico (adaptado). ¹⁷	7
Figura 1.4 – Estrutura molecular dos enantiómeros da nicotina obtidos por minimização de energia com o programa Avogadro. ³²	9
Figura 1.5 – Equilíbrio ácido-base da (S)-nicotina em meio aquoso (adaptada). ³³	10
Figura 1.6 – Reação de metabolização da nicotina em cotinina (adaptada). ³¹	11
Figura 2.1 – Símbolos de advertência de perigo. A – Mortal por ingestão/ em contacto com a pele/ por inalação. B – Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. ⁸⁰	17
Figura 2.2 – Variação de pH em função do volume de ácido clorídrico 2 M adicionado numa solução de 90 ppm de nicotina preparada a partir de NicShot à qual foi adicionada KOH.	19
Figura 3.1 – Espetros de absorção de soluções de NicShot em metanol. Linha de base traçada com metanol.	25
Figura 3.2 – Espetros de absorção: (A) base (mistura de propilenoglicol e glicerina vegetal) e (B) modificador de sabor, diluições 2:25 em metanol. Linha de base traçada com metanol... 26	26
Figura 3.3 – Espetros de absorção de soluções de NicShot com diluições semelhantes (0,064:25) em metanol e em propilenoglicol.	27
Figura 3.4 – Espetros de absorção de soluções preparadas com nicotina de pureza 99%. Solvente: metanol. Linha de base traçada com metanol.	28
Figura 3.5 – Espectro de absorção da nicotina em solução aquosa, com variação do pH. Linha de base traçada com água miliQ.....	30
Figura 3.6 – Espetros das soluções preparadas com: (A) tampão carbonato 0,01 M (pH 11,0); (B) tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0); (C) tampão acetato 0,01 M (pH 5,0); (D) tampão malato 0,01 M (pH 3,0); (E) HCl 0,1 M. Linha de base traçada com água miliQ.....	32
Figura 3.7 – Comparação entre espectros de nicotina a diferentes valores de pH, após correção do espectro do solvente.	33
Figura 3.8 – Espetros de soluções metanólicas de NicoDIY e NicShot com as diluições indicadas. Linha de base traçada com metanol.	35
Figura 3.9 – Espetros normalizados a 262,0 nm de NicShot e NicoDIY em metanol com as diluições indicadas. Linha de base traçada com metanol.	35

Figura 3.10 – Dados para calibração de nicotina em metanol aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm pelo método de padrão externo. Gama de concentrações entre 1,16 e 145 ppm.....	39
Figura 3.11 – Retas de calibração para a quantificação de nicotina em metanol pelo método de padrão externo a 256,5, 262,0 e 267,5 nm e respectivos gráficos dos residuais. Gama de concentrações entre 1,16 e 72 ppm.	42
Figura 3.12 – Dados de calibração de nicotina na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm. Gama de concentrações entre 10,1 e 805 ppm.	46
Figura 3.13 – Retas de calibração para a quantificação de nicotina na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm e respectivos gráficos dos residuais. Gama de concentrações entre 5,0 e 80,5 ppm.	47
Figura 3.14 – Dados de calibração de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm. Gama de concentrações 10,1 e 805 ppm.	51
Figura 3.15 – Retas de calibração utilizadas para a quantificação de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicoDIY a 256,5, 262,0 e 267,5 nm. Gama de concentrações entre 5,0 e 80,5 ppm.	52
Figura 3.16 – Retas de calibração utilizadas para a quantificação de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicShot a 256,5, 262,0 e 267,5 nm. Gama de concentrações entre 5,0 e 80,5 ppm.	55
Figura 3.17 – Estudo de estabilidade. Espectros de base PGVG e de soluções de 10,1 e 40,3 ppm de nicotina. Linha de base traçada com metanol.....	61

Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Medicamentos utilizados na terapêutica de substituição da nicotina. Adaptada do Prontuário Terapêutico. ¹¹	4
Tabela 1.2 – Medicamentos contendo nicotina colocados nas farmácias pelos grossistas/armazenistas entre 1 de janeiro de 2019 e 31 de dezembro de 2019, em Portugal Continental. (Fonte: CIMI)	5
Tabela 2.1 – Advertências e precauções a tomar durante a manipulação dos solventes utilizados (adaptada). ⁸¹⁻⁸⁴	18
Tabela 3.1 – Valores dos máximos de absorção observados nos espectros de diluição 0,8:25 em metanol e em propilenoglicol respetivo coeficiente de absorvidade (ϵ) para cada comprimento de onda (λ).	28
Tabela 3.2 – Valores dos máximos de absorção das soluções de NicShot e de nicotina pura e o coeficiente de absorvidade (ϵ) para cada comprimento de onda (λ).	29
Tabela 3.3 – Efeito de pH nos comprimentos de onda (λ) dos máximos absoluto e relativos e respetivo coeficiente de absorvidade (ϵ) da nicotina.	31
Tabela 3.4 – Efeito das soluções tampão usadas como solvente nos máximos de absorção dos espectros de nicotina e respetivos coeficientes de absorvidade (ϵ) das soluções.	34
Tabela 3.5 – Coeficientes de absorvidade da nicotina a 262,0 nm nos vários solventes utilizados.	37
Tabela 3.6 – Parâmetros das curvas de calibração de nicotina em metanol pelo método de padrão externo.	40
Tabela 3.7 – Valores do intervalo de prognóstico das curvas de calibração de nicotina em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.	40
Tabela 3.8 – Parâmetros da reta de calibração de nicotina em metanol pelo método de padrão externo.	42
Tabela 3.9 – Valores do intervalo de prognóstico das retas de calibração de nicotina em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.	43
Tabela 3.10 – Concentração de nicotina para o e-líquido comercial NicShot em metanol pelo método de padrão externo. Incerteza calculada para 95% com fator de expansão $K=2$	44
Tabela 3.11 – Ensaios de recuperação para o e-líquido comercial NicShot em metanol pelo método de padrão externo.	44

Tabela 3.12 – Parâmetros da reta de calibração de nicotina na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo.	48
Tabela 3.13 – Valores do intervalo de prognóstico das retas de quantificação de nicotina na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.	48
Tabela 3.14 – Concentração de nicotina para os e-líquidos comerciais NicoDIY e NicShot na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo. Incerteza calculada para 95% com fator de expansão K=2.	49
Tabela 3.15 – Ensaio de recuperação para os e-líquidos comerciais NicoDIY e NicShot pelo método de padrão externo na com mistura de PGVG a 8 % em metanol.	50
Tabela 3.16 – Parâmetros da reta de calibração de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicoDIY.	52
Tabela 3.17 – Valores do intervalo de prognóstico das retas de quantificação de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicoDIY aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.	53
Tabela 3.18 – Concentração de nicotina em metanol para o e-líquido comercial NicoDIY (ND) pelo método de adição de padrão. Incerteza calculada para 95% com fator de expansão K=2.	54
Tabela 3.19 – Parâmetros da reta de calibração de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicShot.	56
Tabela 3.20 – Valores do intervalo de prognóstico das retas de quantificação de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicShot aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.	56
Tabela 3.21 – Concentração de nicotina em metanol para o e-líquido comercial NicShot (NS) pelo método de adição de padrão. Incerteza calculada para 95% com fator de expansão K=2.	57
Tabela 3.22 – Comparação entre os parâmetros analíticos dos métodos desenvolvidos.	58
Tabela 3.23 – Concentrações de nicotina calculadas a 256,5, 262,0 e 267,5 nm pelos diferentes métodos analíticos. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.	59

Lista de abreviaturas

Abs	Absorvância
Am	Amostra
DGS	Direção-Geral da Saúde
CIMI	Centro de Informação do Medicamento e Produtos de Saúde
C _{nic}	Concentração de nicotina
CYP2A6	Citocromo P450 2A6
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
DQF	Departamento de Química e Farmácia
E-líquido	Solução utilizada em cigarros eletrónicos
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EUA	Estados Unidos da América
FDS	Fichas de Dados de Segurança
FMO3	Flavina Monooxigenase 3
GD	Gama Dinâmica
HCl	Ácido clorídrico
INS	Inquérito Nacional de Saúde
IP	Intervalo de Prognóstico
K _a	Constante de acidez
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LD	Limite de Detecção
LL	Limite de Linearidade
LQ	Limite de Quantificação
ND	E-líquido comercial NicoDIY
Nic	Nicotina
NS	E-líquido comercial NicShot
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGVG	Mistura de Propilenoglicol e Glicerina Vegetal
PNPCT	Programa Nacional para Prevenção e Controlo do Tabagismo
TSN	Terapêutica de Substituição de Nicotina
UGT	Glucuronosiltransferase
UV-Vis	Ultravioleta e Visível (região do espectro eletromagnético)
λ	Comprimento de onda

1. Introdução

O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar um método para quantificação de nicotina em misturas para cigarros eletrónicos (ou e-líquidos) utilizando espectroscopia de absorção na região espectral do ultravioleta-visível (UV-Vis) e os métodos analíticos do padrão externo e de adição de padrão.

A importância do tema está justificada na introdução onde se aborda o consumo de tabaco e terapêuticas de cessação tabágica e o surgimento dos cigarros eletrónicos como alternativa menos prejudicial em relação aos cigarros convencionais. Abordam-se também os efeitos da nicotina a nível sistémico e o resultado da pesquisa bibliográfica realizada sobre métodos analíticos publicados para a quantificação da nicotina.

A metodologia desenvolvida no trabalho envolveu a caracterização espectral de nicotina pura e amostras de e-líquidos comerciais, desenvolvimento de protocolos com variação do solvente, para os dois métodos analíticos (padrão externo e adição de padrão) e o estudo dos parâmetros de desempenho dos métodos.

1.1. Consumo de tabaco e cessação tabágica

O tabagismo é considerado um fator de risco que pode resultar ou afetar negativamente um grande número de doenças, como por exemplo, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), cancro, úlcera péptica e doenças cardiovasculares, podendo também afetar o feto durante a gravidez.¹

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo de tabaco resultou em sete milhões de mortes mundialmente em 2016. A Comissão Europeia afirma que tabagismo é o fator de risco mais evitável para várias patologias, que está associado a seis das oito primeiras causas de morte a nível mundial e resulta em 700000 mortes anualmente na União Europeia. Cerca de 50% dos fumadores morrem prematuramente, com uma perda média de 14 anos de vida.^{2,3} Na Europa, tem-se verificado diminuição do consumo dos produtos de tabaco nas últimas décadas, no entanto mais de 29% da população europeia é fumadora.^{2,4}

Em Portugal, cerca de 1,8 milhões de pessoas com 15 ou mais anos fumam e, segundo o Inquérito Nacional de Saúde (INS) de 2014, perto de 84% dos fumadores consomem tabaco diariamente e 45,9% dos fumadores de cigarros fumam entre 11 e 20 cigarros por dia. Em comparação com inquéritos anteriores o número de ex-fumadores aumentou e a percentagem de população que nunca fumou e de fumadores regulares diminuiu. Na Figura 1.1 e 1.2 apresentam-se dados de 2014 referentes ao consumo de tabaco da população em estudo no INS.⁵

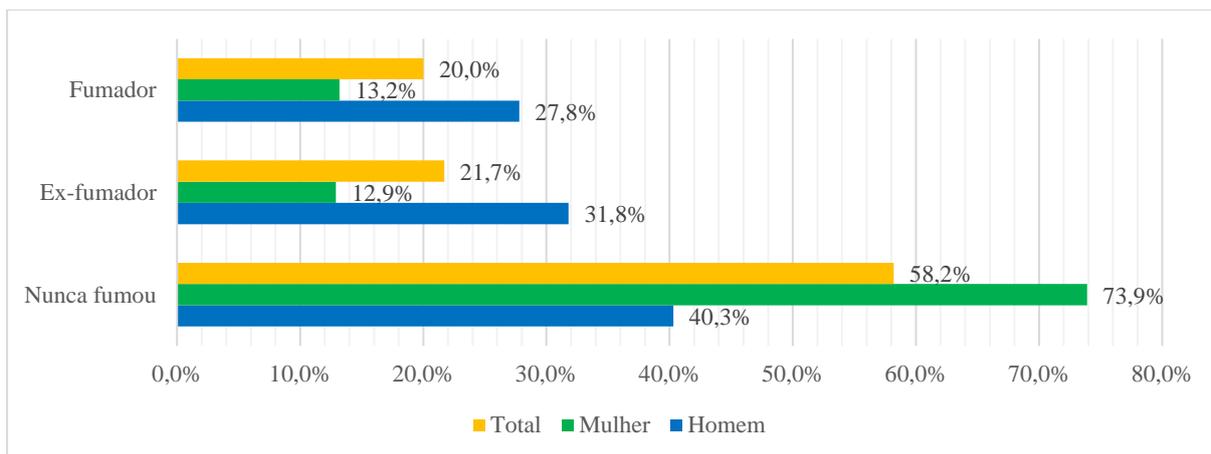


Figura 1.1 – Consumo de tabaco da população portuguesa com 15 ou mais anos. Adaptado do INS de 2014.⁵

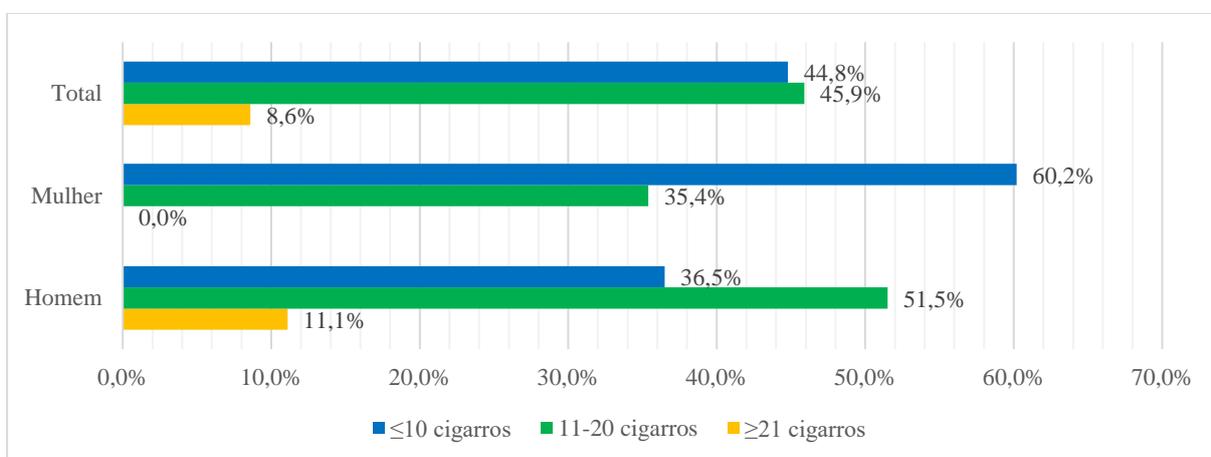


Figura 1.2 – Número médio de cigarros consumidos diariamente por fumadores portugueses com 15 ou mais anos. Adaptado do INS de 2014.⁵

Em 2007 foi aprovado um programa-tipo de atuação na cessação tabágica em Portugal e, posteriormente, no Plano Nacional de Saúde 2012-2016 o tabagismo foi considerado um problema de saúde prioritário resultando na criação do Programa Nacional para Prevenção e Controlo do Tabagismo (PNPCT) em 2012. Os principais focos deste programa são: a prevenção da iniciação do consumo na adolescência, proteção contra a exposição do fumo de tabaco e promoção da cessação tabágica, principalmente nas pessoas com menos de 40 anos e nas mulheres durante a gravidez.^{6,7}

No PNPCT definiram-se medidas que favorecessem a prevenção e controlo do tabagismo tais como, proibição total da publicidade, promoção e patrocínio dos produtos do tabaco e aumento dos impostos sobre os mesmos. Pretendia-se também a promoção da literacia da população relativamente à prevenção e cessação do consumo de tabaco e uniformização do

modo de atuação dos profissionais de saúde nos centros de saúde e nos hospitais públicos portugueses.^{6,8}

Segundo um relatório publicado pela Comissão Europeia referente a 2020, 15 % dos inquiridos fumadores tentaram cessar o uso de tabaco nos 12 meses anteriores ao questionário aumentando esta proporção em 18 países da União Europeia em relação aos mesmos questionários realizados em 2017.^{3,9}

Em Portugal estes questionários foram aplicados a 1061 indivíduos, dos quais 34 % afirmaram já terem tentado parar de fumar pelo menos uma vez. Dentre estes indivíduos 86 % cessaram ou tentaram cessar sem recorrer a nenhum tipo de assistência, 8 % recorreram a terapêutica farmacológica e 5 % recorreram a assistência médica e programas de cessação tabágica. Entre 1 e 2 % dos questionados tentaram cessar o consumo de tabaco recorrendo a produtos de tabaco aquecido e a cigarros eletrónicos.⁹

A intervenção clínica para auxílio da cessação tabágica tem por base a avaliação do consumo e a motivação do indivíduo para parar de fumar. Uma intervenção de curta duração pode ser realizada por todos os profissionais de saúde, nomeadamente por farmacêuticos, uma vez que muitas vezes é nas farmácias comunitárias onde há o primeiro contacto com o indivíduo que pretende parar de fumar. Pode também ser realizada uma intervenção mais intensiva, praticada em consulta médica, ao longo de vários meses, em que o utente é principalmente seguido por médicos e enfermeiros.⁷

1.1.1. Terapêutica farmacológica na cessação tabágica

Os indivíduos que pretendam deixar de fumar podem ser encorajados a recorrer à terapêutica farmacológica, uma vez que a taxa de sucesso aumenta significativamente em comparação com os fumadores que param de fumar sem recorrer a terapêutica. Segundo a Direção-Geral da Saúde (DGS), a terapêutica farmacológica deve ser indicada caso o utente fume nos primeiros 30 minutos após acordar, fume mais de 10 cigarros por dia ou se tiver histórico de sintomas de abstinência em tentativas anteriores.^{7,10}

O Algoritmo do Tratamento Farmacológico do Tabagismo da DGS apresenta como sendo uma das opções a terapêutica de substituição da nicotina (TSN). A TSN consiste em substituir a dose diária de nicotina habitualmente consumida pelo utente no ato de fumar (num cigarro são consumidos cerca de 1 a 1,5 mg de nicotina) por medicamentos contendo nicotina. A posologia e duração do tratamento deve ser estabelecida de acordo com o consumo de tabaco e grau de dependência. Existem fórmulas de administração por via oral (pastilhas e comprimidos

de chupar, gomas de mascar) e por via transdérmica (adesivos) disponíveis em diferentes dosagens.^{7,10,11}

Na Tabela 1.1 apresentam-se os medicamentos desta categoria atualmente disponíveis no mercado português, respetiva forma farmacêutica e dosagem segundo o Prontuário Terapêutico do Infarmed. Os efeitos adversos são raros ou inexistentes, mas foram reportados cefaleias, vertigens, náuseas, vômitos, taquicardia e insónia, podendo ainda verificar-se irritação da mucosa bucal e na garganta ou irritação cutânea.¹¹

Nome do medicamento	Forma farmacêutica	Dosagem
Nicopass	Pastilha	1,5mg 2,5mg
Nicopatch	Sistema transdérmico	7mg/24h 14mg/24h 21mg/24h
Nicorette	Goma para mascar	2mg 4mg
	Solução para pulverização bucal	1mg/dose
	Sistema transdérmico	10mg/16h 15mg/16h 25mg/16h
Nicotinell	Sistema transdérmico	7mg/24h 14mg/24h 21mg/24h
	Goma para mascar	2mg 4mg
	Pastilha	1mg 2mg
Niquitin	Goma para mascar	2mg 4mg
	Sistema transdérmico	7mg/24h 14mg/24h 21mg/24h

Tabela 1.1 – Medicamentos utilizados na terapêutica de substituição da nicotina. Adaptada do Prontuário Terapêutico.¹¹

Segundo dados do Centro de Informação do Medicamento e Produtos de Saúde (CIMI) apresentados na Tabela 1.2, entre 1 de janeiro de 2015 e 31 de dezembro de 2019 verificou-se um aumento da procura das formulações da TSN por parte dos utentes nas farmácias portuguesas. Os dados obtidos junto do CIMI indicam ainda que foram adquiridas 38 871 unidades destes medicamentos entre 1 de janeiro e 31 de março de 2020.

Substância ativa	2015	2016	2017	2018	2019
Nicotina	68 956	105 376	116 407	116 855	117 784

Tabela 1.2 – Medicamentos contendo nicotina colocados nas farmácias pelos grossistas/armazenistas entre 1 de janeiro de 2019 e 31 de dezembro de 2019, em Portugal Continental. (Fonte: CIMI)

Para além da TSN, no Algoritmo do Tratamento Farmacológico do Tabagismo apresentam-se outros fármacos que mimetizam a ação da nicotina como, por exemplo, a vareniclina e o bupropiom. No entanto, ao contrário das formulações de substituição de nicotina, estes fármacos são sujeitos a receita médica.^{7,10}

A vareniclina apresenta uma elevada afinidade e seletividade para os recetores nicotínicos e mimetiza em menor dimensão o efeito na nicotina nestes recetores, atuando como um agonista parcial. A dose recomendada é de 1 mg duas vezes por dia, após uma semana de titulação e, para isso, o utente deve estabelecer uma data para parar de fumar.^{12,13}

O bupropiom é um inibidor seletivo da recaptção neuronal das catecolaminas e antagonista dos recetores nicotínicos. No caso deste fármaco, é recomendado começar o tratamento enquanto o utente ainda fuma e que se estabeleça uma data para a interrupção nas duas primeiras semanas do tratamento. A dose máxima diária não deve exceder os 300 mg e as administrações devem ter intervalos mínimos de 8 horas entre cada uma. Preferencialmente, deve evitar-se a toma ao deitar uma vez que insónia é um efeito adverso muito frequente.^{13,14}

A associação dos vários medicamentos disponíveis é também possível para auxiliar na cessação tabágica e aumentar a taxa de sucesso deste processo. Os sistemas transdérmicos podem ser utilizados em associação com os substitutos de nicotina de libertação rápida (gomas e pastilhas), no que se denomina de terapêutica conjugada, resultando em taxas de sucesso muito semelhantes às obtidas com a vareniclina. As formulações da TSN também podem ser utilizadas em associação com o bupropiom.^{7,14}

A duração habitual do tratamento com os diferentes medicamentos disponíveis é entre oito e doze semanas, sendo que este período pode ser ajustado tendo em conta a evolução da condição do utente.⁷

1.2. Cigarros eletrónicos

Em 1991, Michael Russell afirmou que os novos sistemas de consumo de tabaco que começavam a surgir apresentavam um grande potencial na cessação tabágica a longo prazo, fazendo com que a eliminação hipotética do consumo de tabaco fosse um objetivo realista.

Recomendou também que o tabaco deveria ser substituído o mais rapidamente possível por fontes de nicotina mais sustentáveis e menos prejudiciais.¹⁵

Na atualidade, os novos sistemas de consumo de tabaco mais utilizados são dispositivos de tabaco aquecido e cigarros eletrônicos (também conhecidos como vaporizadores). Os cigarros eletrônicos são dispositivos de dispensa de nicotina em que a combustão das folhas de tabaco que ocorre nos cigarros tradicionais é substituída pelo aquecimento de soluções (e-líquidos) com ou sem nicotina. Os dispositivos de tabaco aquecido, tal como indica o nome, aquecem folhas de tabaco produzindo um aerossol que é posteriormente inalado.¹⁶

Desde a sua introdução nos mercados europeus e americanos em 2006 e 2007, respetivamente, os cigarros eletrônicos têm vindo a ganhar bastante atenção e aumento do número de utilizadores, principalmente junto da população mais jovem. Este aumento verificou-se tanto em indivíduos que eram previamente fumadores como em indivíduos que eram não fumadores. Se a tendência de uso se mantiver, prevê-se que em 2023 a venda de cigarros eletrônicos ultrapasse a venda de cigarros convencionais.¹⁷

O aumento acelerado do uso destes dispositivos deve-se à crença de que estes facilitam o processo de cessação tabágica e oferecem uma opção mais segura de consumo de nicotina em relação aos produtos de tabaco tradicionais, uma vez que os e-líquidos têm na sua composição nicotina obtida a partir da purificação de folhas de tabaco. Então, teoricamente, o consumidor deste tipo de dispositivos não sofrerá dos efeitos nocivos associados ao consumo de tabaco.^{16,18}

Um relatório de 2020 da Comissão Europeia indica que, quando questionados sobre as razões pelas quais utilizavam cigarros eletrônicos, cerca de 57% da população do estudo que utiliza regularmente este tipo de dispositivos o faz com o objetivo de diminuir a utilização de cigarros convencionais, 37% afirmam ter iniciado o consumo porque acreditam que apresenta efeitos menos nocivos que o tabaco e 23% apresentam o baixo custo dos cigarros eletrônicos e dos e-líquidos como um fator apelativo à sua utilização.⁹

1.2.1. Constituição e funcionamento

Cigarros eletrônicos são dispositivos desenhados para aquecer e-líquidos originando um aerossol que é inalado num processo que pode ser denominado por *vaping*. Na composição dos e-líquidos são encontrados aditivos como, por exemplo, o propilenoglicol, a glicerina vegetal e modificadores de sabor. Os cigarros eletrônicos podem ser de uso único (com uma dose pré-carregada ou com uma parte onde se insere um tanque com uma dose) ou desenhados para várias utilizações.¹⁷

Apesar de terem surgido ao longo do tempo vários modelos deste tipo de dispositivo, os cigarros eletrônicos têm três partes básicas (Figura 1.3): o bocal, o atomizador* e uma bateria recarregável que permite o seu funcionamento sem fios.¹⁷



Figura 1.3 – Esquema geral de um cigarro eletrônico (adaptado).¹⁷

O e-líquido é inserido num tanque onde se encontra o atomizador e vai passar por uma resistência que o vai aquecer (podendo chegar aos 350 °C) até o utilizador realizar as inalações de vapor através do bocal. Alguns modelos mais recentes apresentam um sensor de fluxo de ar que ativa o atomizador quando o utilizador inicia a inalação, no entanto a maioria dos modelos ainda necessita que a ativação do atomizador seja feita manualmente recorrendo a um botão de *On/Off*.¹⁷

Em Portugal, a lei determina que a concentração de nicotina nos e-líquidos deve ser igual ou inferior a 20 mg/mL. Nos cigarros eletrônicos de uso único a dose pré-carregada ou os tanques não podem ter um volume de e-líquido que exceda os 2 mL e os frascos de e-líquido vendidos para recarregar cigarros eletrônicos destinados a vários usos não podem ter um volume superior a 10 mL.¹⁹

1.2.2. Efeitos negativos

Desde o surgimento destes dispositivos foram realizados estudos de quantificação de nicotina nos vários e-líquidos disponíveis nos mercados que mostravam que existiam discrepâncias entre a concentração de nicotina anunciada pelo fabricante e a concentração nas amostras que era calculada no âmbito desses estudos.^{17,18}

Alguns estudos reportaram a presença de nicotina em e-líquidos que eram rotulados como não contendo nicotina bem como diferenças no teor de nicotina em e-líquidos do mesmo lote.

* Designação mais utilizada, contudo esta não é a mais adequada uma vez que não existe atomização de nenhum dos componentes. A parte conhecida como atomizador é, na realidade, um vaporizador.

Embora a tendência para a utilização de cigarros eletrônicos esteja a aumentar, não existe controlo de qualidade uniformizado e a caracterização química dos e-líquidos (processo de manufatura, composição química dos solventes e dos modificadores de sabor e concentração de nicotina no aerossol) raramente é disponibilizada pelos fabricantes.^{17,18}

Apesar das vantagens e benefícios que as empresas deste tipo de produtos afirmam existir, as evidências científicas e clínicas são ainda insuficientes. Desde a sua introdução no mercado, têm sido publicados vários artigos científicos que estudam os efeitos sistémicos da utilização de cigarros eletrônicos em populações de etnias e faixas etárias variadas.

Questionários aplicados a adolescentes provenientes dos EUA e sudeste asiático (Hong Kong e Coreia do Sul) concluem que o uso regular de cigarros eletrônicos aumenta a probabilidade da ocorrência de sintomas de bronquite crónica (tosse crónica, catarro ou bronquite) e que o diagnóstico médico de asma é superior nos utilizadores regulares em comparação com indivíduos que nunca utilizaram este tipo de dispositivos. Dados obtidos em questionários aplicados a jovens adultos e adultos de várias nacionalidades mostram que há relação entre o uso de cigarros eletrônicos e histórico de asma, DPOC, registando-se também exacerbações destas condições, e dispneia.²⁰⁻²³

Nos estados norte-americanos de Illinois e Wisconsin foram reportados vários casos de síndrome respiratória aguda associados com a utilização de cigarros eletrônicos. A maioria dos pacientes reportou sintomas respiratórios incluindo dispneia e tosse. Testes laboratoriais revelaram que alguns pacientes apresentavam hipoxemia, elevada contagem de neutrófilos e transaminases em concentração superior aos valores de referência e nos pacientes que realizaram tomografia foi observado parênquima pulmonar anormal. Situações semelhantes foram reportadas noutros estados norte-americanos, no Reino Unido e no Japão.²⁴

Até à data ficou por determinar qual ou quais os compostos dos cigarros eletrônicos responsáveis por estes sintomas. Especula-se que poderá ser devido à mistura de nicotina e propilenoglicol e glicerina vegetal (PGVG) ou a outros aditivos e solventes presentes nas soluções utilizadas nestes dispositivos.²⁵

Em estudos que utilizaram cromatografia gasosa para estudar a composição dos e-líquidos, concluiu-se que os principais compostos presentes são a nicotina, o propilenoglicol e a glicerina. No entanto, foram também identificados produtos resultantes da pirólise da glicerina, dietilenoglicol, nitrosaminas específicas do tabaco, formaldeído, acroleína e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. As nitrosaminas específicas do tabaco, produzidas durante a combustão de folhas de tabaco e durante o processo de extração de nicotina, são compostos carcinogénicos

conhecidos dos cigarros tradicionais e foram encontrados em baixas concentrações em e-líquidos.¹⁸

Existem ainda estudos que afirmam que os cigarros eletrônicos emitem compostos carbonilo tóxicos resultantes da decomposição térmica de substâncias presentes nos e-líquidos.²⁶ Nos aerossóis resultantes do aquecimento dos e-líquidos foram identificadas cerca de 250 substâncias químicas, incluindo nicotina, alcaloides, compostos orgânicos voláteis, piridina e compostos carbonilo.²⁷

Embora existam em menor quantidade que no fumo resultante da combustão de folhas de tabaco, estes compostos podem continuar a provocar efeitos adversos na saúde dos seus utilizadores e, por isso, é importante aumentar a investigação neste campo de modo a tentar perceber qual a fonte de emissão de carbonilos nos cigarros eletrônicos e para se encontrar uma maneira de as reduzir.^{18,26}

1.3. Estrutura e metabolismo da nicotina

A nicotina ($C_{10}H_{14}N_2$) é um alcaloide composto por um anel piridina e pirrolidina (Figura 1.4) que pode ser encontrada numa variedade de plantas principalmente nas pertencentes ao género *Nicotiana*. Foi identificada e isolada como composto maioritário presente nas folhas de tabaco em 1828 e sintetizada pela primeira vez em 1893.^{28,29}

A molécula de nicotina apresenta dois isómeros óticos, a (S)-nicotina e a (R)-nicotina, resultantes da diferente organização espacial dos grupos ligados ao carbono do anel piridina que se liga ao anel pirrolidina. Nas folhas de tabaco encontra-se primariamente a (S)-nicotina, sendo que apenas 0,1-0,6 % do conteúdo total de nicotina é (R)-nicotina. Quantidades semelhantes de (R)-nicotina (entre 0,1 e 1,2 %) também são observadas em reagentes químicos e formas farmacêuticas que contenham a (S)-nicotina, uma vez que se extrai este composto a partir de plantas.^{30,31}

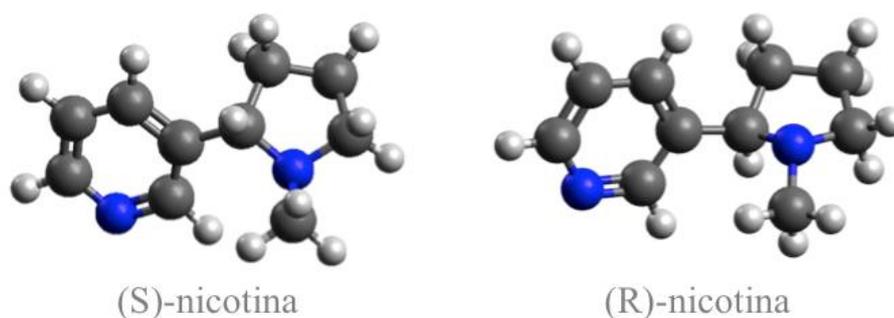


Figura 1.4 – Estrutura molecular dos enantiómeros da nicotina obtidos por minimização de energia com o programa Avogadro.³²

A nicotina pura é um líquido incolor ou com uma cor amarelo-clara e com um cheiro acre característico. Quando exposta ao ar e luz, ou mesmo quando armazenada no escuro, vai adquirindo uma cor acastanhada ao longo do tempo. O seu ponto de ebulição é 246-247 °C.²⁹

A absorção, excreção, farmacologia e toxicologia da nicotina são determinadas pela presença de formas ionizadas ou não ionizadas deste composto que, por sua vez, são fortemente dependentes do pH do meio. A nicotina, devido à presença de nitrogénio nos seus dois anéis, é uma amina e tem duas constantes de acidez cujos pKa a 15 °C são 7,84 e 3,04.^{29,33} Na Figura 1.5 está representado o equilíbrio ácido-base da (S)-nicotina em meio aquoso. Quando em circulação no sangue, a um pH de 7,4, a nicotina existe predominantemente em duas formas: protonada no anel pirrolidina e na forma neutra.^{29,34}

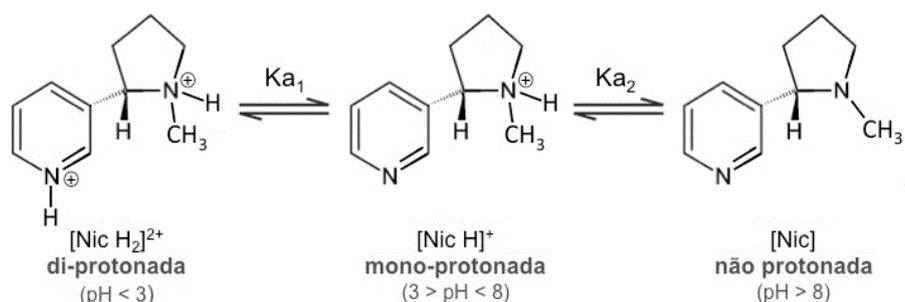


Figura 1.5 – Equilíbrio ácido-base da (S)-nicotina em meio aquoso (adaptada).³³

A nicotina é extensivamente metabolizada no fígado pelo citocromo P450 2A6 (CYP2A6) e, em proporções mais pequenas, pela glucuronosiltransferase (UGT) e pela flavina monooxigenase 3 (FMO3) em vários metabolitos (Figura A1 no Anexo I).^{31,35} Segundo alguns autores, polimorfismos no CYP2A6 afetam a metabolização da nicotina. Contudo, os estudos publicados sobre esta temática não apresentam consenso quanto à influência dos polimorfismos no consumo e dependência de tabaco nos indivíduos que os expressam.^{36,37}

O composto mais relevante que resulta da metabolização da nicotina pelo CYP2A6 é a cotinina, uma vez que, no ser humano, cerca de 70-80 % da nicotina é convertida neste metabolito (Figura 1.6). Este composto é frequentemente utilizado em estudos como marcador de consumo de nicotina ou exposição ao tabaco.^{1,29,31}

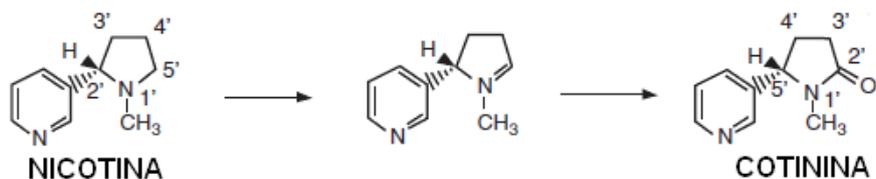


Figura 1.6 – Reação de metabolização da nicotina em cotinina (adaptada).³¹

1.3.1. Efeitos fisiológicos

A nicotina é responsável por efeitos no sistema nervoso central, pois apresenta grande afinidade para os recetores nicotínicos, um subtipo de recetores colinérgicos. Quando há apenas estímulos de compostos endógenos, nomeadamente da acetilcolina, a ligação aos recetores nicotínicos tem efeitos excitatórios.^{29,38}

Estudos indicam que a nicotina afeta, por exemplo, locomoção, nociceção, aprendizagem e memória. Dependendo da dose, a ligação da nicotina aos recetores nicotínicos pode provocar estimulação ou depressão do sistema nervoso, isto é, o utilizador pode ter sensação de alerta ou de relaxamento em situações de *stress* podendo também provocar náuseas e tremores em casos extremos. Exposição prolongada e repetida à nicotina provoca dessensibilização destes recetores e tolerância a esta substância o que, a longo prazo, pode levar a dependência e síndrome de abstinência.^{29,38,39}

Os efeitos mais comuns após a inalação do fumo de tabaco são o aumento do ritmo cardíaco e da pressão arterial, aumento do volume e débito cardíaco, bem como, aumento da circulação coronária, vasoconstrição cutânea (provocando diminuição na temperatura da pele), venoconstrição sistémica e aumento do fluxo sanguíneo para os músculos.^{1,40}

Vários autores afirmam que a caracterização da estrutura, regulação e função dos subtipos de recetores nicotínicos irá ajudar a uma melhor compreensão dos mecanismos que levam à dependência, aos efeitos humorais e controlo da dor o que, eventualmente, poderá resultar no desenvolvimento de medicamentos com base na nicotina para o tratamento de várias patologias.^{29,38,41}

No recente período pandémico da COVID-19 surgiram notícias com origem em França que alegavam que alguns estudos preliminares, com dados obtidos em Paris no hospital Pitié-Salpêtrière, mostraram que há menos fumadores entre os paciente com COVID-19 do que na população geral por, supostamente, a nicotina poder ter uma capacidade protetora específica contra o vírus.⁴²⁻⁴⁴

No entanto, a Organização Mundial de Saúde refere que tabagismo pode aumentar o risco de sofrer sintomas graves quando contraída a doença COVID-19, pois estudos efetuados no início da pandemia indicaram que, em comparação aos não fumadores, um histórico de tabagismo pode aumentar substancialmente a gravidade dos casos, o que se justifica por esta doença afetar principalmente o trato respiratório.^{45,46} Vários artigos publicados em 2020 indicam que a percentagem de infetados que apresentaram sintomas moderados, severos e/ou que necessitaram de internamento em cuidados intensivos era superior em indivíduos fumadores e ex-fumadores em relação a doentes sem histórico de tabagismo.⁴⁶⁻⁴⁸

1.3.2. Absorção de nicotina

Existem várias formas de consumo de nicotina. A forma mais comum e tradicional é pela inalação do fumo resultante da combustão de folhas de tabaco secas em fumeiros ou ao ar livre, utilizadas em cigarros ou charutos e cachimbos, respetivamente. Recentemente o consumo de nicotina tem vindo a aumentar através da inalação de vapores produzidos por dispositivos de tabaco aquecido e cigarros eletrónicos.^{16,31}

Para além destas, existem formas de consumo que não envolvem a inalação de fumo tais como, tabaco de mascar, rapé, pastilhas, adesivos transdérmicos, *sprays* nasais e orais, inaladores e comprimidos sublinguais. Algumas destas são utilizadas como formulações na terapia de substituição de nicotina.^{31,34,49}

A difusão da nicotina através das membranas biológicas depende bastante do pH do meio e, por isso, em meios ácidos a nicotina na sua forma ionizada, tem dificuldade em atravessar membranas lipofílicas e quando se encontra na sua forma não ionizada atravessa facilmente as membranas. Assim sendo, dependendo do modo de consumo da nicotina, a absorção deste composto também varia.^{29,31,49}

O pH do fumo resultante da combustão de folhas de tabaco secas em fumeiros apresenta um carácter mais ácido em relação ao pH de folhas secas ao ar livre e, então, a absorção pela mucosa bucal é inferior. Em ambos os casos, quando o fumo de tabaco chega aos alvéolos pulmonares a nicotina é rapidamente absorvida, devido à grande área de superfície de contacto, e a sua concentração no sangue aumenta, uma vez que o pH do sangue facilita a sua dissolução e, conseqüentemente, a passagem entre membranas.^{31,50,51}

A concentração de nicotina em circulação no sangue durante o ato de fumar depende do volume de fumo inalado e da intensidade e frequência da inspiração. Cerca de 10 a 20 segundos após uma inalação, altos níveis de nicotina atingem o cérebro e, por isso, os seus efeitos fazem-se sentir com bastante rapidez. Apesar de atingir rapidamente o cérebro, os níveis de

nicotina neste órgão também diminuem com bastante rápido, pois a nicotina começa a ser distribuída por outros órgãos. Este fator faz com que sejam necessárias inalações continuadas para manter os níveis de nicotina em circulação e, por isso, o consumo através do ato de fumar é o que resulta num comportamento de dependência maior e mais prolongado.^{1,31,52,53}

Tabaco de mascar e rapé, bem como as formas transdérmicas, são ajustadas a um pH tampão alcalino para que a nicotina possa ser absorvida mais facilmente pela mucosa bucal e através da pele. Embora a absorção seja mais rápida na mucosa bucal quando utilizado o tabaco de mascar e rapé, o aumento da concentração de nicotina no cérebro é mais lento em relação à inalação do fumo.^{31,49}

Na cessação tabágica, a absorção das várias formulações utilizadas é mais lenta e a concentração de nicotina no sangue e no cérebro aumenta de maneira mais gradual quando comparado com a inalação de fumo, fazendo com que haja menor probabilidade de a utilização destes dispositivos resultar em dependência.⁵⁴

No caso dos dispositivos transdérmicos, o nível de libertação sistémica de nicotina varia entre os diferentes tipos de dispositivos. Essa libertação vai ser influenciada pela permeabilidade da pele, pela difusão da nicotina através da matriz do dispositivo ou ainda pelo facto de o adesivo ter ou não várias membranas. A nicotina demora, em média, uma hora após aplicação do adesivo na pele para ser detetada na corrente sanguínea e, mesmo após remoção, pode continuar a observar-se absorção sistémica devido a resíduos do adesivo que ficam na pele.^{31,55}

No caso de pastilhas e comprimidos sublinguais, a dose absorvida sistemicamente é muito menor da que está presente inicialmente na formulação, uma vez que uma grande parte é deglutida (50-80 %) e vai sofrer efeito de primeira passagem. Apenas o *spray* nasal e inaladores permitem que a nicotina atinja o cérebro em períodos de tempo semelhantes aos da inalação de fumo.^{31,56-58}

1.3.3. Métodos de análise de nicotina

Na pesquisa bibliográfica realizada foram encontrados vários estudos com propostas para a quantificação de nicotina com técnicas e métodos distintos.⁵⁹⁻⁷⁷ Dentre estes, alguns focam-se na quantificação de nicotina em amostras de misturas para cigarros eletrónicos e, por isso, têm maior relevância em termos de comparação com o trabalho experimental a ser desenvolvido.^{60,62,71,76}

A maioria dos artigos encontrados têm datas de publicação bastante recentes e as técnicas utilizadas são maioritariamente de cromatografia.^{59-63,65-67,72,76,77} Em alguns destes trabalhos

além da quantificação de nicotina em amostras de e-líquidos também o fazem nos vapores e aerossóis resultantes desses e-líquidos, recorrendo a um aparelho que simula inalações e os produtos resultantes ficam retidos num filtro.^{60,62,74,76}

El-Hellani *et al.*⁷⁶ propuseram um novo método que permite quantificar as formas neutra e protonada de nicotina em e-líquidos de várias marcas e em aerossóis resultantes destes produtos, recorrendo a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e utilizando o método de padrão interno para tratamento de resultados. A reta de calibração utilizada para a quantificação de nicotina nas amostras foi realizada com padrões com concentrações entre 50 e 1500 ppm de nicotina aos quais se adicionou uma quantidade fixa de hexadecano, substância que funcionou como padrão interno neste estudo. Os autores do artigo obtiveram uma reta de calibração com um coeficiente de determinação de 0,999 e uma recuperação de $89 \pm 4,6$ %. Em termos de quantificação de nicotina nos e-líquidos os autores, após tratamento de dados, concluíram que as amostras analisadas tinham uma grande diferença entre as concentrações apresentadas pelas empresas e os valores obtidos após análise dos diferentes e-líquidos.

No estudo realizado por Dai *et al.*⁶² foi proposto um novo método que permitisse quantificar nicotina e as proporções de propilenoglicol e glicerina vegetal em vários e-líquidos com e sem nicotina e respetivos aerossóis resultantes disponíveis no mercado. Para isso recorreram à técnica de cromatografia gasosa acoplada a um detetor por ionização de chama. Os padrões de nicotina a serem injetado na coluna do cromatógrafo tinham entre 9,90 e 350 ng de nicotina diluída em PGVG. As amostras foram preparadas diluindo 100 mg do e-líquido em 10 mL de uma mistura de metanol com quinolina. O coeficiente de determinação do método tinha um valor superior a 0,99 e os limites de deteção calculados foram 0,36, 0,72 e 8,15 ng para a nicotina, propilenoglicol e glicerina vegetal, respetivamente. As recuperações calculadas pelos autores foram 101 % para a nicotina, 97,2 % para o propilenoglicol e 96,7 % para a glicerina vegetal. Os valores de nicotina nas amostras diferiam entre 1,1 e 24,7 % das concentrações apresentadas pelos fabricantes dos diferentes e-líquidos e não foi detetada nicotina em nenhuma das amostras dos e-líquidos que declaravam não ter nicotina.

Outro estudo por Ogunwale *et al.*⁶⁰ tem um objetivo muito semelhante ao estudo de El-Hellani *et al.*⁷⁶, pretendendo propor também um novo método para quantificar nicotina em e-líquidos e respetivos aerossóis. A técnica utilizada neste estudo foi a espectrometria de massa de ressonância ciclométrica de íão com transformação de Fourier. Os autores preparam seis padrões nicotina com concentrações entre 0,78 e 38,88 $\mu\text{mol/mL}$, adicionando a cada padrão um volume fixo de benzeno, que funcionou como padrão interno. As conclusões dos autores do

artigo após tratamento de dados indicam que o teor de nicotina anunciado pelos fabricantes dos diferentes e-líquidos difere do teor de nicotina calculado num intervalo de $-2,9$ a $25,2$ %.

Dentro das limitações da pesquisa bibliográfica realizada, não se encontraram trabalhos publicados em que a quantificação de nicotina em e-líquidos fosse feita através de técnicas espectroscópicas, pelo que o desenvolvimento do protocolo experimental terá de ser feito sem qualquer base anterior de trabalho.

2. Parte Experimental

2.1. Material e Equipamento

No trabalho, além de material corrente de laboratório, foram utilizados balões volumétricos de 25,00±0,04, 50,00±0,06, 100,00±0,10, 250,00±0,15 e 500,00±0,25 mL e pipetas volumétricas de 6,000±0,015, 7,00±0,02, 8,00±0,02, 10,00±0,02, 11,00±0,02, 15,00±0,03, 20,00±0,03 e 25,00±0,03 mL. Utilizaram-se várias micropipetas da Pipetman P20 ±0,20 µL, P100 ±0,80 µL, P200 ±1,60 µL, P1000 ±8,0 µL e P5000 ±30 µL. As micropipetas P200, P1000 e P5000 foram calibradas de acordo com o procedimento publicado pela RELACRE.⁷⁸ Obtiveram-se as precisões descritas na Tabela A1 no Anexo II, estando estas dentro dos limites indicados pelo fabricante.

Na análise espectrofotométrica foi utilizado um espectrofotômetro de absorção UV-Vis Scientific Evolution 300 da ThermoFisher e células de quartzo com percurso ótico de 1 cm. Utilizou-se um medidor de pH com eletrodo de membrana de vidro combinado, da Hanna e um agitador magnético, durante o estudo de variação do pH.

2.2. Reagentes e Amostras

No trabalho foi utilizada nicotina (C₁₀H₁₄N₂, PM=162,24 g/mol, densidade=1,017 g/mL) da Alfa Aesar com grau de pureza de 99%, metanol (CH₃OH, PM=32,04 g/mol), da Honeywell com grau de pureza de ≥99,8 % e propilenoglicol, da LabChem. As soluções padrão aquosas foram preparadas com água miliQ. Para ajustar o pH usaram-se soluções de ácido clorídrico (HCl) 0,05, 1 e 2 M, hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M, cloreto de potássico (KCl) 3 M, tampão carbonato 0,01 M (pH 11), tampão fosfato 0,01 M (pH 7), tampão acetato 0,01 M (pH 5) e tampão malato 0,01 M (pH 3), preparadas previamente nos laboratórios de aulas do DQF.

As amostras analisadas foram duas misturas de nicotina para cigarros produzidas por duas empresas distintas: NicShot (18 g/L), da Chemnovatic (Lotes EP190731/NS e EP190801/NS) e NicoDIY (20 g/L), da Savourea (Lote BA18-00120-059). O solvente de ambos os e-líquidos é, segundo os respectivos fabricantes, uma mistura 50/50 de propilenoglicol e glicerina vegetal. Analisou-se ainda a Brave Base: Pure Base, VG 50/ PG 50, da BMGC – Pharma, Lda (Lote 5402019). Para além destas três misturas analisaram-se espectros de um modificador de sabor “Blueberry Intensive Flavours”, da Chemnovatic (Lote 20180500/MB).

2.2.1. Segurança

A segurança do utilizador durante a manipulação dos diferentes produtos e reagentes é um aspeto importante a que se deve ter atenção em qualquer análise química. Neste âmbito, os fabricantes devem ter acessíveis Fichas de Dados de Segurança (FDS) sobre as diferentes substâncias que produzem. Para além de informação das propriedades físico-químicas, estas fichas devem fornecer dados sobre toxicidade, estabilidade e reatividade, efeitos na saúde e ambiente, forma de transporte, armazenamento, manipulação e eliminação da substância. Devem também fornecer informação sobre procedimento em caso de derrame, cuidados de primeiros socorros e identificação dos perigos.⁷⁹

Na FDS da (S)-nicotina utilizada neste trabalho, é aconselhado armazenar-se os recipientes bem fechados num lugar fresco, bem ventilado e ao abrigo da humidade.⁸⁰

Classifica-se a substância como apresentando toxicidade aguda por via oral e cutânea, bem como quando é inalada e também toxicidade para o ambiente aquático. Estes avisos são representados graficamente no rótulo da embalagem com os símbolos A e B da Figura 2.1.⁸⁰



Figura 2.1 – Símbolos de advertência de perigo. A – Mortal por ingestão/ em contacto com a pele/ por inalação.
B – Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.⁸⁰

Recomenda-se a utilização de equipamento de proteção individual (EPI) durante a manipulação da nicotina, recorrendo a luvas, vestuário de proteção e proteção ocular e facial. Em caso de entrar em contacto com a pele deve lavar-se a zona com sabonete e água abundantes e em caso de inalação deve mover-se a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração. Caso entre em contacto com a boca deve enxaguar-se com bastante água e no caso de ingestão deve contactar-se imediatamente um centro de informação antivenenos ou um médico.⁸⁰

Na Tabela 2.1 descrevem-se as advertências e principais precauções constantes das FDS dos solventes utilizados no decorrer do trabalho.

Solvente	Advertência	Precauções
Metanol	Altamente inflamável. Provoca irritação ocular.	Não manipular perto de chamas e/ou faíscas. Utilizar EPI.
Propilenoglicol	Provoca irritação cutânea e ocular. Pode causar tonturas.	Utilizar EPI. Evitar inalar vapores.
Ácido clorídrico	Provoca irritação cutânea. Pode causar danos oftálmicos graves.	Utilizar EPI. Lavar muito bem pele exposta após manuseamento.
Hidróxido de potássio	Provoca queimaduras cutâneas e irritação das vias respiratórias. Pode causar danos oftálmicos graves.	Utilizar EPI. Evitar inalar vapores. Lavar muito bem pele exposta após manuseamento.

Tabela 2.1 – Advertências e precauções a tomar durante a manipulação dos solvente utilizados (adaptada).⁸¹⁻⁸⁴

2.3. Procedimento

Na pesquisa bibliográfica realizada não se encontraram publicações que descrevessem o uso de técnicas de espectroscopia UV-Vis para a quantificação de nicotina, pelo que se iniciou o trabalho experimental pela realização de alguns ensaios com a amostra de NicShot.

Para este efeito prepararam-se várias soluções por diluição de uma solução mãe de amostra medindo 2 mL da solução de NicShot num balão de 25 mL e perfazendo o volume com metanol. Prepararam-se também soluções da base PGVG e do modificador de sabor usando também uma diluição de 2:25 para verificar se estas substâncias tinham bandas que se sobrepusessem com as bandas do NicShot. Prepararam-se ainda duas soluções NicShot diluídas em propilenoglicol por este ser um dos solventes usados nas preparações para cigarros eletrónicos. Traçaram-se espectros de absorção UV-Vis destas soluções na gama de 190 a 500 nm, com uma largura de fenda de 2,0 nm, resolução de 2,0 nm e uma velocidade de varrimento de 240 nm/min.

A partir destes espectros identificaram-se os comprimentos de onda de interesse para o estudo como 256,5, 262,0 e 267,5 nm, e com base nos valores de absorvência obtidos para as soluções diluídas foram construídas curvas de calibração preliminares para se determinar de um modo aproximado limites de deteção, quantificação e linearidade.

Procedeu-se ao estudo do efeito da variação de pH para uma das soluções com concentração intermédia de NicShot. Assim, preparou-se uma amostra com 2,5 mL de NicShot e perfez-se o volume com água miliQ num balão de 100 mL. Fizeram-se diluições sucessivas até se obter um espectro em que fosse possível observar claramente as bandas pretendidas. Traçaram-se também os espectros das soluções de KOH 0,1 M e HCl 2 M usadas para acertar o pH a fim de confirmar a ausência de impurezas que pudessem interferir nas bandas de absorção de nicotina. Os

espectros foram traçados na gama de 190 a 300 nm, com uma largura de fenda de 0,5 nm, resolução de 0,5 nm e uma velocidade de varrimento de 240 nm/min.

O medidor de pH foi calibrado com tampões a pH 7 e a pH 4. Adicionaram-se 5 mL de KCl 3 M aos 100 mL da solução de amostra, aumentando a força iónica para melhorar a estabilidade das leituras de pH e 3 mL de KOH 0,1M para ajustar o pH da solução a um valor superior a 11. De seguida adicionaram-se sucessivamente pequenas quantidades de HCl 2M e com agitação constante de modo a homogeneizar a solução.

Ao longo do estudo do efeito da variação de pH foram retiradas amostras e traçados os espectros UV-Vis nas condições descritas, mas apenas quando ocorriam variações de pH significativas. Na Figura 2.2 mostra-se a evolução de pH em função do volume de HCl adicionado.

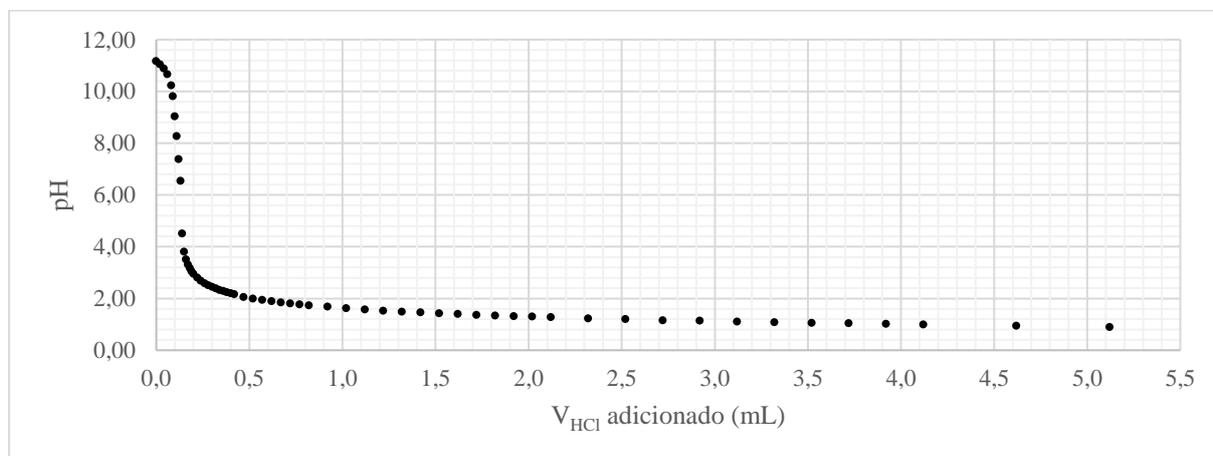


Figura 2.2 – Variação de pH em função do volume de ácido clorídrico 2 M adicionado numa solução de 90 ppm de nicotina preparada a partir de NicShot à qual foi adicionada KOH.

Depois destes ensaios com a solução de NicShot, procedeu-se à preparação de soluções com várias concentrações de nicotina, utilizando a nicotina com grau de pureza de 99 % e o metanol como solvente. As soluções foram preparadas através de uma solução *stock* de 145 ppm de nicotina e as diluições tinham concentrações compreendidas entre os 1,2 e 52,2 ppm. Os espectros de absorção UV-Vis destas soluções foram traçados na gama de 190 a 400 nm, com uma largura de fenda de 0,5 nm, resolução de 0,5 nm e uma velocidade de varrimento de 240 nm/min. As leituras em triplicado foram feitas aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm a uma largura de fenda de 0,5 nm e um tempo de integração de 3 segundos.

Traçaram-se espectros de duas soluções com concentrações de nicotina diferentes (87 e 290 ppm) em que soluções tampão a diferentes valores de pH e HCl 0,1 M, de modo a verificar se existia degradação da nicotina consoante o pH e se estas soluções poderiam vir a ser

utilizadas como solventes. Os espectros foram traçados usando água miliQ para fazer a linha de base e na gama de 190 a 300 nm, com uma largura de fenda de 0,5 nm, resolução de 0,5 nm e uma velocidade de varrimento de 240 nm/min.

Com base nos resultados obtidos nas primeiras curvas de calibração obtidas com as soluções de nicotina, prepararam-se padrões na gama de concentrações de 1,6 a 200,0 ppm a partir de uma solução *stock* de 399,9 ppm de nicotina em que o solvente era metanol, para se tentar identificar o limite de linearidade. Esta análise foi feita aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm e as leituras em triplicado foram feitas com uma largura de fenda de 0,5 nm e um tempo de integração de 3 segundos.

Após estes ensaios seguiram-se os ensaios de quantificação de nicotina nas amostras de NicShot e de NicoDIY. A quantificação através do método analítico do padrão externo fez-se recorrendo a dois conjuntos de soluções: um conjunto em que o solvente era metanol e um outro conjunto em que o solvente era uma mistura de metanol e da base de PGVG numa concentração de 8 % (V/V).

A quantificação da nicotina em amostras de NicShot foi feita através do método analítico de padrão externo e em que o solvente era metanol. Prepararam-se cinco amostras de NicShot e quatro amostras fortificadas para os ensaios de recuperação. As concentrações de nicotina nos padrões preparados estavam numa gama de concentrações de 1,2 a 72,5 ppm.

Foram também feitos ensaios para a quantificação de nicotina em amostras de NicShot e NicoDIY utilizando o método de padrão externo em que o solvente era uma mistura de metanol e da base de PGVG numa concentração de 8 % (V/V). As concentrações dos padrões encontravam-se numa gama de concentrações de 5,0 a 141,0 ppm de nicotina. Foram preparadas seis amostras dos dois e-líquidos disponíveis (três de NicShot e três de NicoDIY) e seis amostras fortificadas para os ensaios de recuperação (três com NicShot e três com NicoDIY).

Para além do método de padrão externo também se quantificou nicotina nas amostras de NicShot e NicoDIY através do método de adição de padrão. Foram preparados dois conjuntos de padrões com concentrações de nicotina entre os 5,0 e 141,0 ppm. Num dos conjuntos foi adicionado a cada padrão 1,0 mL de uma solução mãe de NicShot e no outro conjunto adicionou-se a cada padrão 1,0 mL de uma solução mãe de NicoDIY.

Para cada método realizado, antes de se proceder à quantificação das amostras foram realizadas curvas de calibração para determinar a linearidade de cada método. No método de padrão externo em que o solvente das soluções era metanol este ensaio realizou-se com padrões preparados com concentrações entre 1,2 e os 145,0 ppm. A curva para o método de padrão externo em que o solvente era a mistura de metanol com a base de PGVG a 8 % foi realizada

preparando padrões com concentrações entre os 10,1 e 805,5 ppm. Os padrões na curva para o método de adição de padrão tinham concentrações de nicotina entre os 10,1 e 805,5 ppm, com a particularidade que a cada padrão foi adicionado 1,0 mL de uma solução mãe de NicShot.

As leituras em triplicado foram feitas nos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm com uma largura de fenda de 0,5 nm e um tempo de integração de 3 segundos e os espectros de algumas das soluções preparadas para estes ensaios foram traçados na gama de 190 a 300 nm, com uma largura de fenda de 0,5 nm, resolução de 0,5 nm e uma velocidade de varrimento de 240 nm/min. Os detalhes das preparações das soluções nos diferentes métodos encontram-se nas tabelas A2 a A7 no Anexo II.

Foi feito o estudo de uma segunda amostra de mistura para cigarros eletrônicos, NicoDIY, com uma concentração de 20 g/L de nicotina e realizaram-se diluições usando o metanol como solvente de modo a se preparar soluções com diluições semelhantes às já estudadas de NicShot. Posteriormente foram traçados os espectros destas soluções entre 190 e 300 nm, largura de fenda de 0,5 nm, resolução de 0,5 nm e velocidade de varrimento de 240 nm/min em que o metanol foi usado para traçar a linha de base.

A estabilidade das soluções de nicotina foi estudada para a nicotina pura para o qual se preparou uma solução *stock* de 503,4 ppm de nicotina utilizando como solvente uma mistura de metanol e a base de PGVG a 8 %. A partir da solução prepararam-se dois padrões a 10,1 e 40,3 ppm de nicotina. Os espectros destes dois padrões e do solvente foram feitos usando metanol como linha de base entre 190 e 400 nm, com uma largura de fenda de 0,5 nm, resolução de 0,5 nm e uma velocidade de varrimento de 240 nm/min. Os espectros foram obtidos no próprio dia da preparação, no dia seguinte à preparação e passadas uma, duas, três e sete semanas da preparação. Entre leituras a solução *stock* foi guardada num lugar protegido da luz solar e à temperatura ambiente.

2.4. Tratamento de dados experimentais

A obtenção de dados dos espectros e das leituras de absorvência foi feita recorrendo ao software VisionPro do espectrofotómetro. O tratamento de dados foi feito utilizando o programa Microsoft Excel.

Para se construir as retas de calibração para as diferentes amostras de nicotina recorreu-se ao método dos mínimos quadrados. Este método é bastante utilizado para fazer o ajuste de parâmetros a dados experimentais, permitindo analisar a relação entre uma variável dependente e as variáveis independentes, e com isso prever valores da variável dependente utilizando os

valores da variável independente. No caso de uma relação linear entre as duas variáveis, o método permite exprimir um conjunto de resultados experimentais através de uma equação de reta do tipo $y=mx+b$, em que y corresponde aos valores do sinal experimental (variável dependente, que neste trabalho é a absorvência), m ao declive da reta, x à variável independente (no caso deste trabalho, à concentração de nicotina) e b representa a ordenada na origem.⁸⁵⁻⁸⁷

Para se poder utilizar o método dos mínimos quadrados no ajuste de dados experimentais a uma reta têm de verificar as seguintes condições: (i) os únicos erros nas medidas são devidos a flutuações na variável dependente; (ii) a variância do erro é constante; (iii) os valores do declive e da ordenada na origem são valores fixos desconhecidos e os seus erros são independentes entre si; (iv) o erro tem um comportamento de distribuição normal.^{86,88,89}

A partir da aplicação do método dos mínimos quadrados no tratamento dos dados experimentais pode calcular-se o desvio padrão dos residuais (s_y) e o coeficiente de correlação (r) e, conseqüentemente, o coeficiente de determinação (r^2). Estes parâmetros indicam o nível de ajuste da reta aos valores das variáveis.

A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados subentende que há uma relação linear entre as variáveis. Qualquer método de análise tem um limite máximo a partir do qual deixa de se observar linearidade, pelo que é essencial avaliar a gama de trabalho em que esta relação linear se observa. Há diversos métodos possíveis para identificar os pontos que estão fora do comportamento linear e devem ser excluídos (*outliers*).

A confirmação de que os dados utilizados para a obtenção das retas de calibração de nicotina são os mais adequados, ou seja, que estas não apresentam *outliers*, pode ser obtida utilizando a Equação 1. Esta permite obter um intervalo de prognóstico (IP) para um dado valor de sinal instrumental e para um grau de confiança de 95%.⁹⁰

$$IP(P_x)=b+m \cdot C_{P_x} \pm t_{(95\%,N-2)} \cdot s_y \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{N-1} + \frac{(C_{P_x} - \bar{C}_P)^2}{\sum C_P^2 - \frac{1}{N-1} \cdot (\sum C_P)^2}} \quad \text{Equação 1}$$

Nesta equação P_x corresponde ao padrão para o qual se está a calcular o IP, b corresponde à ordenada na origem e m ao declive da reta de calibração, C_{P_x} corresponde à concentração do padrão, $t_{(95\%,N-2)}$ corresponde ao valor de *t-student* para um grau de confiança de 95% e $N-2$ graus de liberdade, s_y representa o desvio padrão dos residuais, N representa o número de padrões com que se obteve a reta de calibração e \bar{C}_P corresponde à média das concentrações excluindo C_{P_x} .

O cálculo do IP necessita que se escolha o melhor conjunto de dados com resposta linear entre a concentração e o sinal, o que pode ser feito através do coeficiente de determinação. Os parâmetros de ajuste m , b e s_y são então utilizados na Equação 1 para todos os pontos experimentais. Valores experimentais de absorvência que não se encontrem no IP são identificados como *outliers*, ou seja, os pontos que não se encontrem entre o valor mínimo e máximo do intervalo de prognóstico.^{91,92}

Parâmetros que caracterizam o método analítico, como os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), são parâmetros de ajuste obtidos através do método dos mínimos quadrados. O limite de detecção pode ser definido como a concentração de analito a partir da qual é possível detetar a presença do mesmo com um grau de confiança estatístico razoável. O limite de quantificação é definido como a concentração a partir da qual o sinal é dez vezes superior ao ruído e, por isso, considera-se que é aceitável quantificar o analito.^{90,93}

Embora existam várias formas de calcular estes limites analíticos, dependendo da fonte que se consulta, neste trabalho vão ser calculados através da Equação 2. O valor de k tipicamente utilizado para o limite de detecção é 3 e para o limite de quantificação é 10.^{90,93,94}

$$\text{LD ou LQ} = k \cdot \frac{s_y}{m} \quad \text{Equação 2}$$

A gama dinâmica (GD) é a grandeza que indica a extensão do comportamento linear de um conjunto de dados experimentais e pode ser calculada através da Equação 3.⁹⁰

$$\text{GD} = \frac{\text{LL}}{\text{LQ}} \quad \text{Equação 3}$$

Na Tabela A8 no Anexo II apresentam-se as equações que permitem obter a equação da reta bem como as equações utilizadas para calcular o erro associado ao cálculo do declive, da ordenada na origem e o cálculo do erro associado à concentração de analito. Encontram-se também as equações que permitem calcular o valor do desvio padrão dos residuais e do coeficiente de correlação.

No método de padrão externo para além de se prepararem os padrões e amostras, prepararam-se também amostras fortificadas de modo a realizar leituras dos ensaios de recuperação. As amostras fortificadas são preparadas adicionando um volume conhecido de solução *stock* e um volume de solução de amostra que corresponda no final a no máximo metade da concentração do analito puro. As amostras fortificadas devem ser semelhantes às da reta de calibração e, por isso, o solvente utilizado deve ser o mesmo do método.

Os ensaios de recuperação são uma forma de determinar a quantidade de analito recuperado no processo, em relação à quantidade presente na amostra, e podem ser uma forma de determinar se há erros sistemáticos por perdas de analito num método de análise.^{95,96}

Os intervalos aceitáveis para as percentagens de recuperação podem variar consoante a fonte consultada, mas geralmente na gama de concentrações utilizada (ppm) é de 80–120%.⁹⁷ A percentagem de recuperação (%Rec) de uma amostra fortificada calcula-se através da Equação 4.

$$\%Rec = \frac{m_{\text{amostra fortificada}} - m_{\text{amostra}}}{m_{\text{padrão}}} \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

Nesta equação $m_{\text{amostra fortificada}}$ corresponde à massa de analito na amostra fortificada e é obtida por interpolação na reta de calibração, m_{amostra} à massa de analito calculada da amostra original e $m_{\text{padrão}}$ representa a massa de analito calculada no volume de stock adicionado.

3. Resultados e Discussão

Antes de se proceder ao desenvolvimento do método para a quantificação de nicotina nas amostras disponíveis, teve de se proceder à caracterização espectral da nicotina e dos e-líquidos de modo a determinar qual o melhor solvente e as gamas de trabalho mais adequadas. Uma vez que a pesquisa bibliográfica realizada para este trabalho remetia maioritariamente para estudos que utilizavam como técnica a cromatografia, os ensaios iniciais têm também como objetivo avaliar as condições que deveriam ser utilizadas numa análise por espectroscopia de absorção em UV-Vis.

3.1. Caracterização espectral da nicotina e das amostras

É conhecido que a nicotina é solúvel em vários solventes, tais como água, álcoois, clorofórmio e alguns óleos.⁹⁸ No caso dos seus espectros UV-Vis, nicotina extraída de amostras de folhas de tabaco apresentam uma absorção forte entre os 240 e 270 nm.^{70,73}

Utilizou-se uma diluição de 2:25 de NicShot (e-líquido comercial) em metanol para se fazer um primeiro espectro e identificar as bandas associadas à nicotina. A partir desta solução realizaram-se outras diluições para estimar a gama de trabalho a utilizar (Figura 3.1).

Traçaram-se também os espectros da base de propilenoglicol e glicerina vegetal comercializada e do modificador de aroma, usando metanol como solvente e com diluição 2:25 (Figura 3.2) de modo a avaliar se algum destes componentes iria interferir nas leituras aos mesmos comprimentos de onda da nicotina.

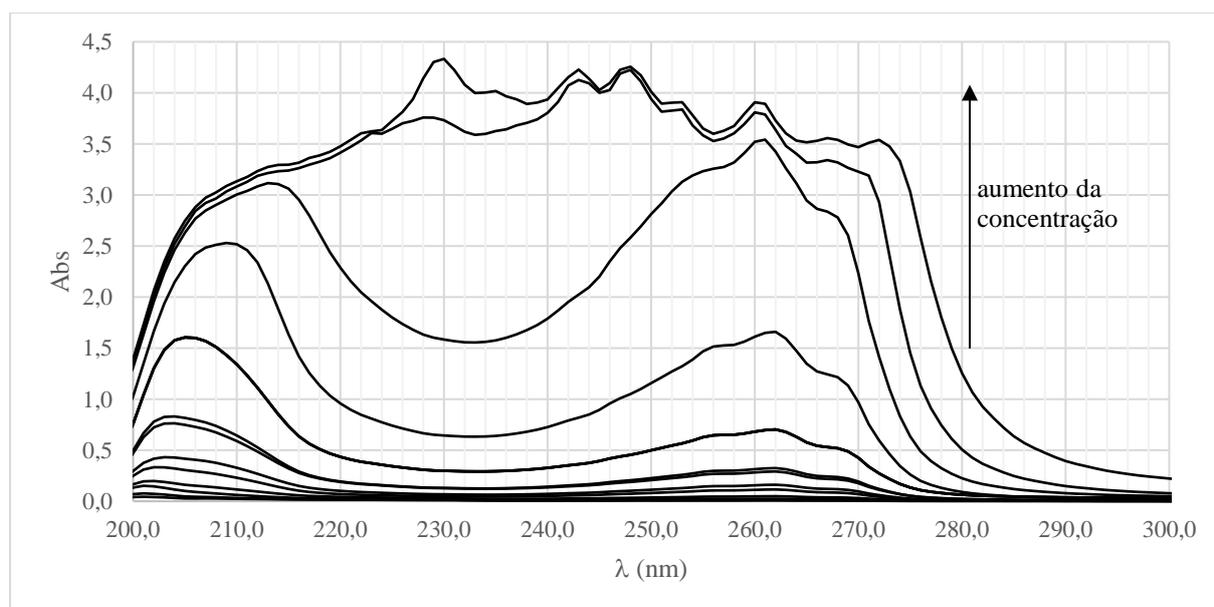


Figura 3.1 – Espectros de absorção de soluções de NicShot em metanol. Linha de base traçada com metanol.

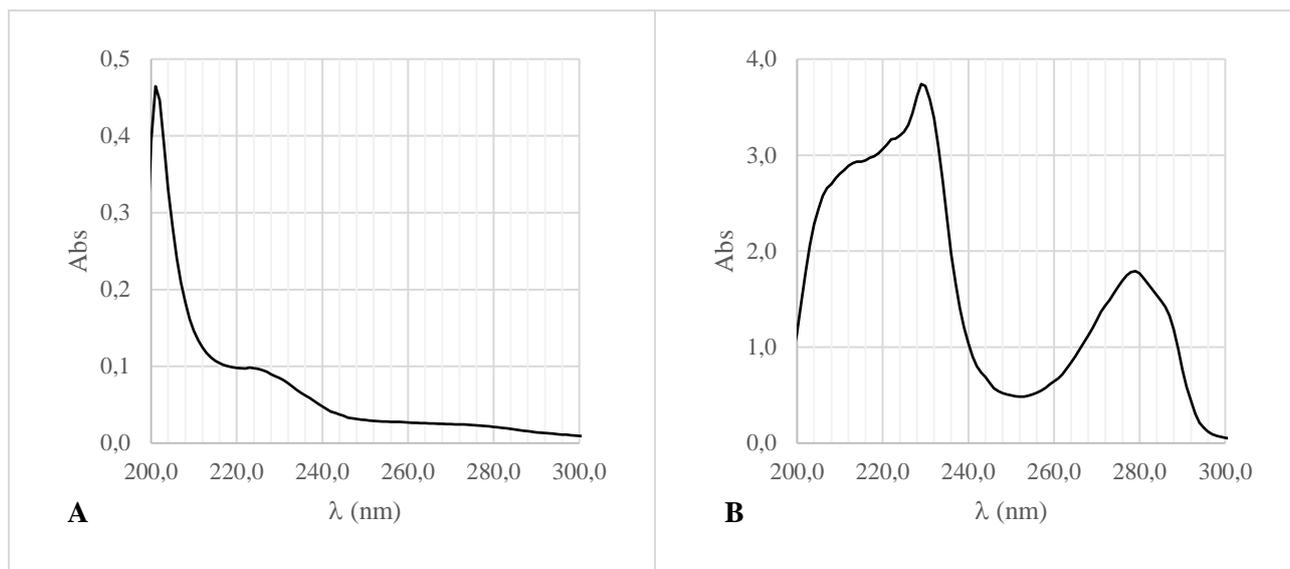


Figura 3.2 – Espectros de absorção: (A) base (mistura de propilenoglicol e glicerina vegetal) e (B) modificador de sabor, diluições 2:25 em metanol. Linha de base traçada com metanol.

A análise dos espectros das figuras acima apresentadas permite tirar algumas conclusões sobre as condições que parecem mais favoráveis para a quantificação de nicotina nas amostras. Usando metanol como solvente (Figura 3.1), o espectro do e-líquido (diluições entre 2:25 e $2,1 \times 10^{-4}$:25) apresenta um máximo absoluto que varia com a concentração entre 205 e 213 nm e outra banda com máximo relativo a 262,0 nm e dois ombros a 256,5 e 267,5 nm. Nas concentrações mais elevadas (diluições 2:25 e 0,8:25) os espectros são muito diferentes, mas tendo em conta que os valores de absorvência são muito elevados, este efeito não deverá ser devido a alteração na estrutura do analito ou das suas interações, mas por se estar em condições experimentais no limite de leitura do equipamento.

A composição da amostra de NicShot indicada pelo fabricante apresenta como solventes uma mistura de propilenoglicol e glicerina vegetal, numa proporção de 50:50. No caso de se querer utilizar um meio semelhante à matriz da amostra, a base de propilenoglicol e glicerina vegetal pode ser utilizada, uma vez que não apresenta banda de absorção na área espectral que se pensa pertencer à nicotina, tal como se pode ver na Figura 3.2.A.

No caso da análise de amostras de e-líquido com modificador de sabor, a quantificação de nicotina não poderá ser feita de um modo tão direto, uma vez que, como se pode concluir a partir da Figura 3.2.B, há uma grande sobreposição das bandas do modificador de sabor com as bandas da nicotina.

No sentido de mimetizar a mistura completa da amostra, foram efetuadas duas diluições de NicShot usando propilenoglicol como solvente, de modo que tivessem teoricamente, concentrações semelhantes às utilizadas nas soluções com metanol para comparar os espectros

relativamente à estrutura de bandas e ao sinal resultante. O espectro da solução de concentração mais elevada não se encontra representado pois, tal como aconteceu com essa concentração em metanol, não representa corretamente o espectro da nicotina por os valores de absorvência já se encontrarem no limite de leitura do equipamento.

Na Figura 3.3 representa-se os espectros de NicShot diluído na mesma proporção em metanol e propilenoglicol.

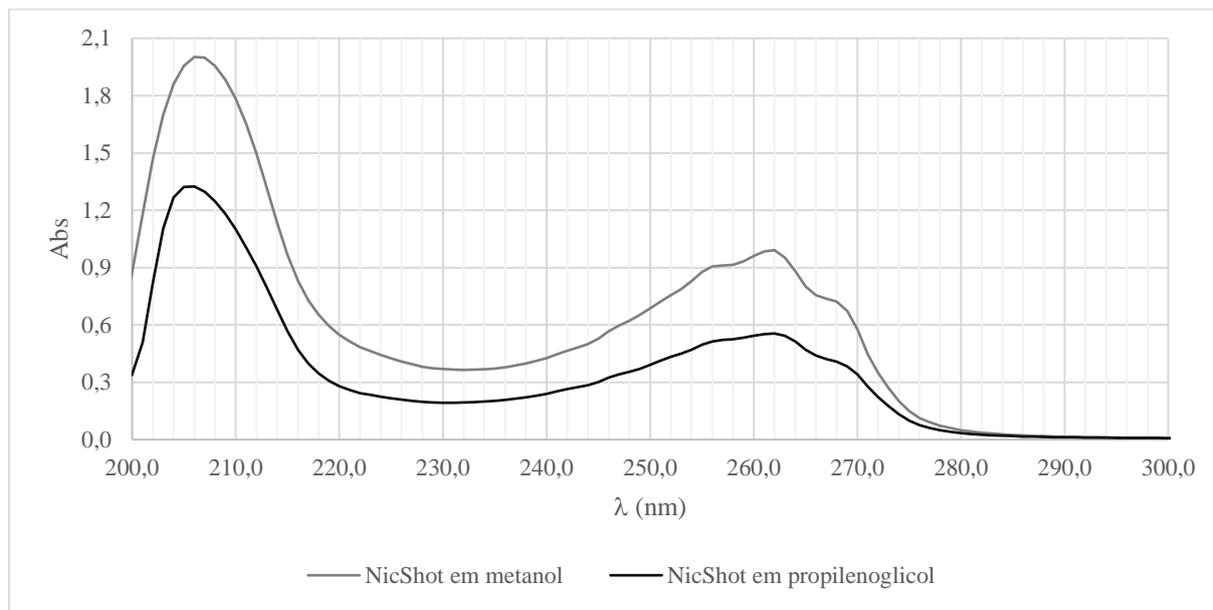


Figura 3.3 – Espectros de absorção de soluções de NicShot com diluições semelhantes (0,064:25) em metanol e em propilenoglicol.

O espectro da diluição de NicShot em propilenoglicol parece apresentar um comportamento muito semelhante ao da diluição em metanol. No entanto, como é possível observar na Figura 3.3, as absorvências no espectro com propilenoglicol são inferiores. Na Tabela 3.1 apresentam-se os valores dos comprimentos de onda máximos da banda da nicotina e os respetivos coeficientes de absorvência. O cálculo dos coeficientes de absorvência foi feito recorrendo à expressão matemática que representa a Lei de Lambert-Beer (Equação 5).

$$A = \epsilon \cdot C \cdot b$$

Equação 5

Esta lei relaciona o coeficiente de absorvência (ϵ) com o percurso ótico da célula (b) que contém a solução e com a concentração de analito presente na solução (C).^{99,100} Tendo em conta que o percurso ótico da célula utilizada no trabalho experimental é de 1 cm, obtém-se a expressão que permite calcular o coeficiente de absorvência a partir da razão entre os valores de absorvência e a concentração das soluções ($\epsilon = A/C$).

Solvente	λ , nm ($\epsilon \times 10^{-2}$, ppm $^{-1}$ cm $^{-1}$)	$\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon_{\text{máx}} \times 10^{-2}$, ppm $^{-1}$ cm $^{-1}$)	λ , nm ($\epsilon \times 10^{-2}$, ppm $^{-1}$ cm $^{-1}$)
Metanol	256,0 (1,12)	262,0 (1,22)	267,0 (0,92)
Propilenoglicol	256,0 (0,89)	262,0 (0,96)	267,0 (0,73)

Tabela 3.1 – Valores dos máximos de absorção observados nos espectros diluição 0,8:25 em metanol e em propilenoglicol respetivo coeficiente de absorvidade (ϵ) para cada comprimento de onda (λ).

Com a informação da Tabela 3.1 percebe-se que apesar da posição do máximo e dos ombros serem iguais nos dois solventes, os coeficientes de absorvidade são mais elevados no metanol, tal como seria de esperar pelo facto do valor de absorvência ser superior ao do propilenoglicol para concentrações semelhantes.

Para completar os ensaios de caracterização espectral foram também preparadas soluções com nicotina pura, cujos espectros estão na Figura 3.4.

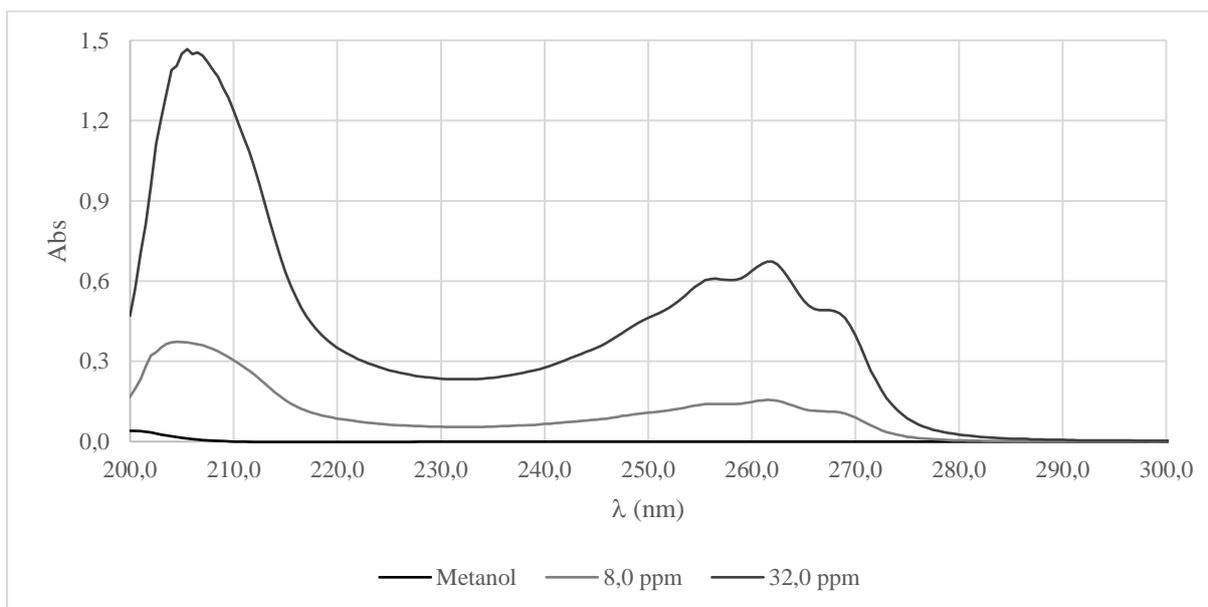


Figura 3.4 – Espectros de absorção de soluções preparadas com nicotina de pureza 99%. Solvente: metanol. Linha de base traçada com metanol.

As bandas de absorção observadas no espectro de UV-Vis podem ser atribuídas, de acordo com a literatura, a uma transição eletrónica π - π_1^* (centrada a ~ 260 nm) com estrutura vibrónica que se reflete no perfil da banda na forma de ombros, enquanto a banda larga 215-180 nm foi atribuída a quatro transições eletrónicas sobrepostas e, embora não sendo claro em nenhum dos espectros, a cerca de 240 nm poderia ainda ser observada a transição n - π_1^* atribuído ao grupo piridil.¹⁰¹ A banda a menores comprimentos de onda, de acordo com a bibliografia consultada,

pode ser composta por: (i) a ~206 nm uma transição $n-\sigma^*$ ou uma banda de transferência de carga que envolve o par de elétrons não ligantes do nitrogénio do grupo pirrolidina para a orbital π^* do grupo piridil; (ii) a ~200 nm a transição $\pi-\pi_2^*$ do grupo piridina; (iii) a ~188 nm a transição $\pi-\pi_3^*$ do grupo piridil; e (iv) a ~180 nm a absorção pode estar associada com a transição $\pi-\pi_4^*$. O facto de não ser visível a banda a 240 nm pode ser explicado por a transição $n-\pi_1^*$ ser proibida por dipolo elétrico o que leva a que o seu coeficiente de absorção seja muito baixo ($\epsilon < 100 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).¹⁰¹

Na Tabela 3.2 comparam-se os comprimentos de onda máximos da banda e os coeficientes de absorvidade de nicotina numa solução de NicShot e de nicotina pura com concentrações teoricamente semelhante.

Solução	λ , nm ($\epsilon \times 10^{-2}$, ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon_{\text{máx}} \times 10^{-2}$, ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	λ , nm ($\epsilon \times 10^{-2}$, ppm ⁻¹ cm ⁻¹)
NicShot	256,0 (1,62)	262,0 (1,76)	267,0 (1,32)
Nicotina pura	257,5 (1,76)	262,0 (1,94)	267,5 (1,40)

Tabela 3.2 – Valores dos máximos de absorção das soluções de NicShot e de nicotina pura e o coeficiente de absorvidade (ϵ) para cada comprimento de onda (λ).

Após análise dos valores da Tabela 3.2 conclui-se que os comprimentos de onda máximos são semelhantes. Os coeficientes de absorvidade são próximos em ambas as soluções embora no espectro de nicotina pura sejam ligeiramente superiores. Esta diferença, que se reflete obviamente na intensidade do sinal, pode ser devida simplesmente à diferença de concentrações, pois no caso da amostra de NicShot foi assumida como real a concentração indicada no rótulo da embalagem. Por outro lado, a diferença de valores dos coeficientes de absorvidade pode também ser devida à presença de propilenoglicol e glicerina vegetal na mistura de NicShot que, como já se concluiu anteriormente, provoca diminuição nos valores de absorvência.

3.1.1. Efeito do pH nos espectros da amostra

A nicotina tem duas constantes de acidez e, por isso, teoricamente pode dar origem a três estruturas com diferentes graus de protonação.²⁹ Um estudo de pH foi feito com o objetivo de se observar esse efeito no espectro de absorção UV-Vis resultante da variação de pH numa solução aquosa de NicShot. Antes de se adicionar KOH 0,1M para aumentar o pH da solução aquosa de NicShot, fez-se uma medição com o medidor de pH onde se observou um valor de

pH de 8,90. Na Figura 3.5 são apresentados os espectros obtidos por variação do pH, entre 0,90 e 11,17, da solução aquosa da amostra refletindo o seu comportamento ácido-base. Embora os espectros tenham sido traçados na presença de uma pequena quantidade de propilenoglicol proveniente da amostra de NicShot este, como já foi referido, não apresenta espectro de absorção significativo na região acima de 240nm (Figura 3.2.A).

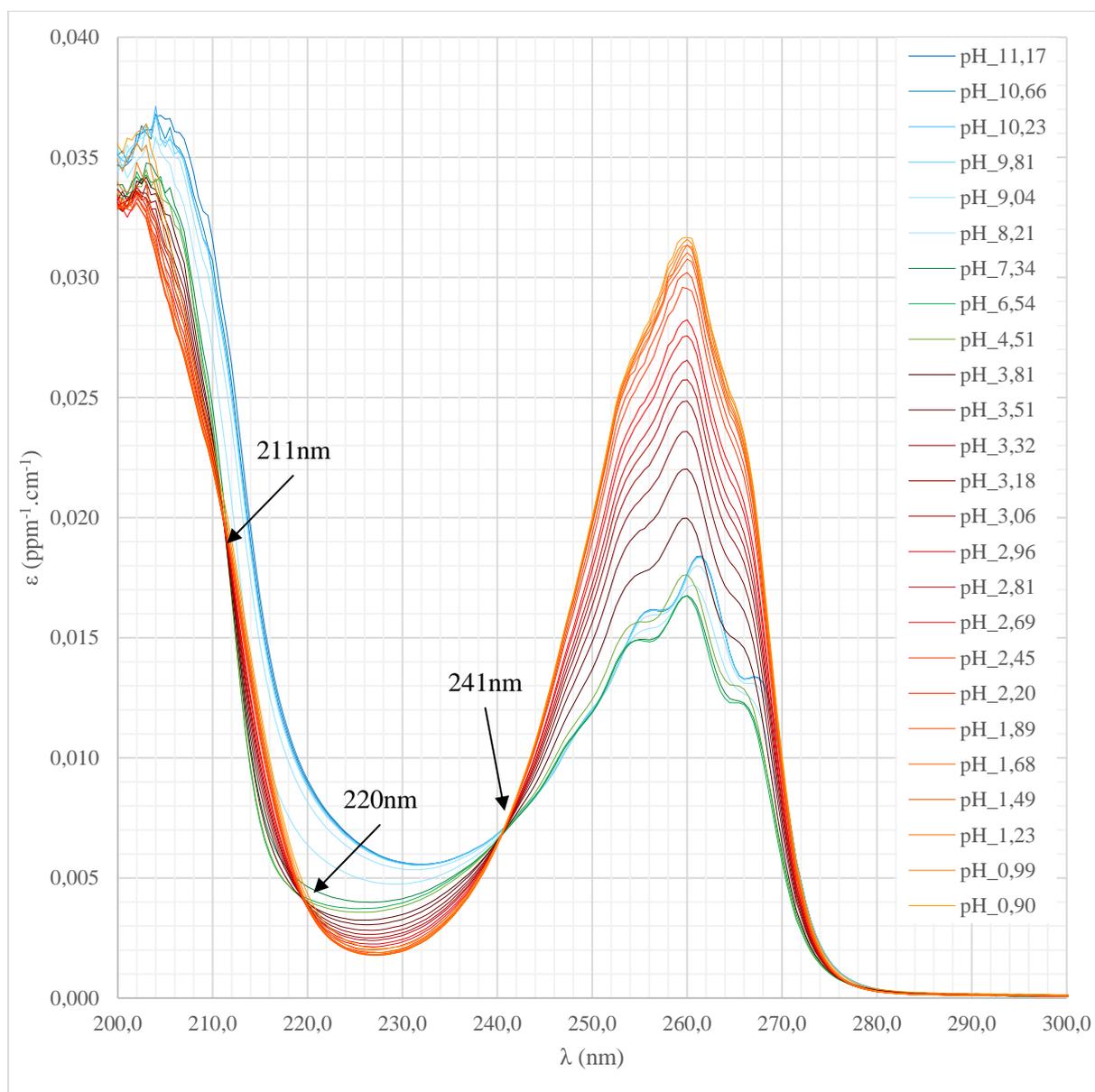


Figura 3.5 – Espectro de absorção da nicotina em solução aquosa, com variação do pH. Linha de base traçada com água miliQ.

Os espectros da solução de nicotina quando se vario o pH (Figura 3.5) mostram, para alguns intervalos de pH, a existência de pontos com comportamento de ponto isobástico a 211, 220 e 241 nm. Estes comprimentos de onda podem ser úteis na quantificação da nicotina em solução aquosa por terem um comportamento independente do pH da solução.

Na região entre 230 e 280 nm da Figura 3.5 identificam-se um máximo de absorção da nicotina ($\lambda_{\text{máx}}$) e ainda dois máximos relativos (ombros bem definidos da banda principal) que se resumem na Tabela 3.3, com os respetivos coeficientes de absorvidade do máximo ($\epsilon_{\text{máx}}$) e dos ombros (ϵ). De realçar ainda uma diminuição do coeficiente de absorvidade na região espectral de 230 a 240 nm com a diminuição do pH.

pH	λ , nm ($\epsilon \times 10^{-2}$, ppm $^{-1}$ cm $^{-1}$)	$\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon_{\text{máx}} \times 10^{-2}$, ppm $^{-1}$ cm $^{-1}$)	λ , nm ($\epsilon \times 10^{-2}$, ppm $^{-1}$ cm $^{-1}$)
9 – 11	256,5 (1,60-1,62)	261,5 (1,80-1,84)	267,0 (1,31-1,34)
8	257,0 (1,55)	260,5 (1,72)	267,0 (1,24)
5 – 7	255,0-256,0 (1,49-1,57)	260,0 (1,67-1,76)	265,5-266,5 (1,21-1,23)
1 – 4	*	259,5-260,0 (2,00-3,14)	*

Tabela 3.3 – Efeito de pH nos comprimentos de onda (λ) dos máximos absoluto e relativos e respetivo coeficiente de absorvidade (ϵ) da nicotina.

* Não é possível definir com rigor os comprimentos de onda do máximo relativo de absorção.

Analisando a Figura 3.5 e a Tabela 3.3 pode concluir-se que apesar de a diferença nos comprimentos de onda do máximo da banda e seus ombros ser pouco significativa, há efetivamente um desvio com a diminuição do pH da solução. No caso do coeficiente de absorvidade, observa-se uma diminuição dos seus valores com a diminuição do pH entre 11,17 e 4,51, mas para valores e pH mais baixos observa-se aumento do coeficiente de absorvidade. Na Tabela 3.3 de notar que nesta banda da nicotina não é possível definir com rigor a posição dos máximos relativos (ombros) nos espetros obtidos com soluções de pH inferiores a 3.

Estes resultados experimentais podem ser explicados pela existência de diferentes formas protonadas da nicotina, tal como já representado na Figura 1.5, a pH < 3 é esperada a forma em que a nicotina tenha os dois nitrogénios protonados, a pH > 8 a forma não protonada deve ser predominante e na região de pH intermédia com a protonação apenas do nitrogénio do grupo pirrolidina. Este efeito do pH no espetro de absorção UV-Vis da nicotina foi estudado em detalhe num trabalho publicado por Clayton *et al.*¹⁰¹, tendo sido observada esta mesma evolução. Nesse trabalho os autores justificam ainda a diminuição da banda a 240 nm (transição n- π_1^*), observada por dicroísmo circular, com o efeito de protonação do grupo piridil, que no presente trabalho não é observada, mas que pode refletir-se na diminuição de absorção na região 230 a 240 nm quando o pH diminui.

3.1.2. Soluções de nicotina pura em diferentes soluções tampão

Em seguimento do estudo da variação do pH em solução aquosa, prepararam-se duas soluções com concentrações de nicotina intermédias, usando como solvente tampões a vários valores de pH. Para além das soluções de nicotina, traçaram-se os espectros dos tampões utilizados como solvente para que se pudesse observar se havia interferência ou não destes dos espectros das duas soluções. A Figura 3.6 mostra a evolução dos espectros da nicotina com a concentração em soluções tampão a pH 11, 7, 5 e 3 e numa solução de HCl 0,1 M.

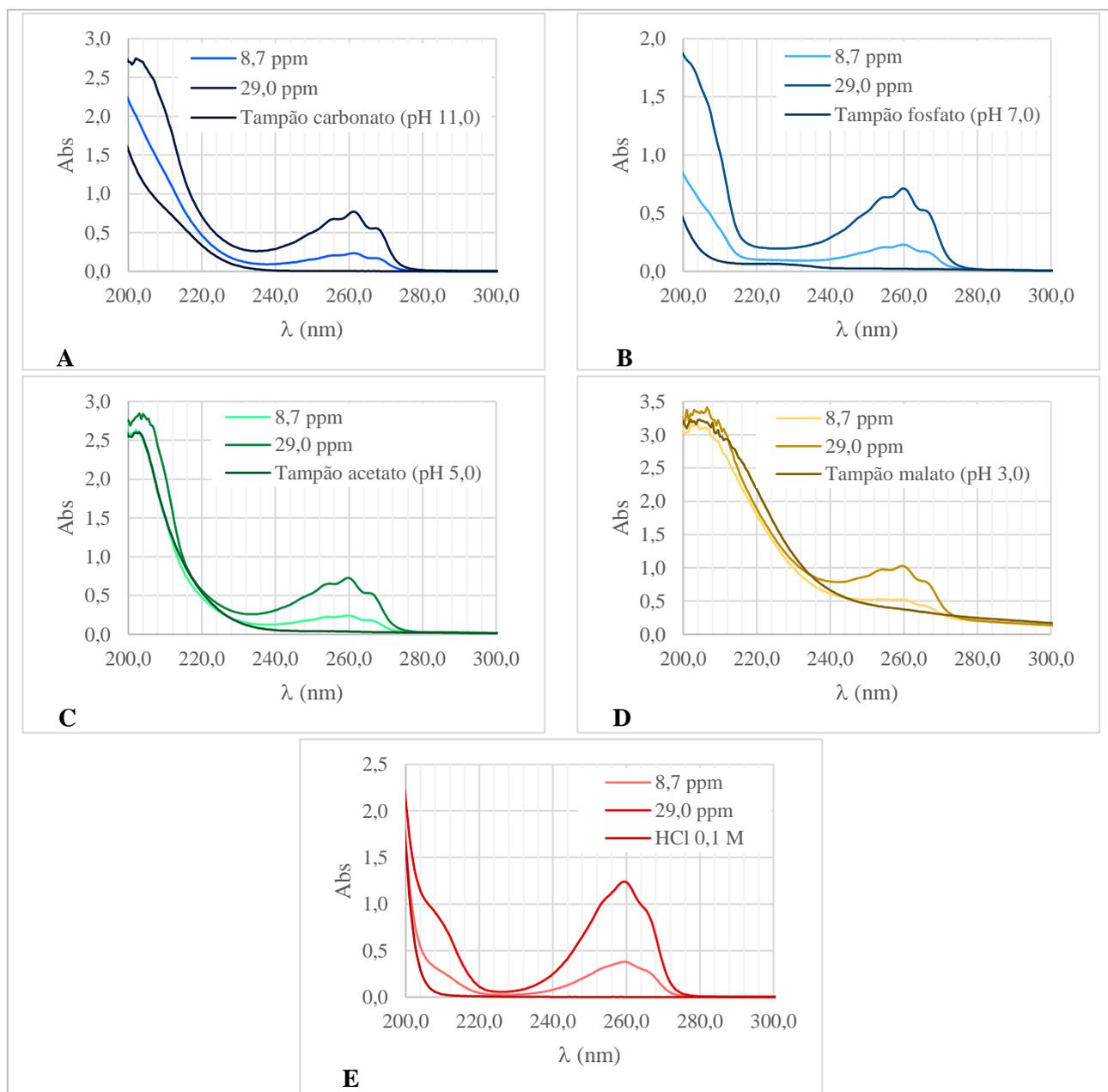


Figura 3.6 – Espectros das soluções preparadas com: (A) tampão carbonato 0,01 M (pH 11,0); (B) tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0); (C) tampão acetato 0,01 M (pH 5,0); (D) tampão malato 0,01 M (pH 3,0); (E) HCl 0,1 M.

Linha de base traçada com água miliQ.

Analisando os espectros na Figura 3.6, verifica-se que os comprimentos de onda da banda de nicotina se mantêm relativamente constantes independentemente do pH do solvente, com exceção do pH 11,0. Nos espectros do tampão malato (Figura 3.6.D) pode observar-se que o solvente interfere bastante nas leituras por haver sobreposição espectral. Nos espectros de HCl (Figura 3.6.E) verifica-se uma perda da estrutura vibrônica característica da banda da nicotina com máximo a ~260 nm e que pode ser observada nos espectros das soluções preparadas com as outras soluções tampão bem como nos espectros das soluções preparadas com água, propilenoglicol e metanol.

No sentido de eliminar o efeito do solvente e ter um melhor modo de comparação destes espectros, fez-se um acerto de linha de base para os espectros das soluções de 29,0 ppm de nicotina. A Figura 3.7 permite comparar os espectros num intervalo de comprimentos de onda próximo à região espectral de maior interesse (entre 240 e 280 nm).

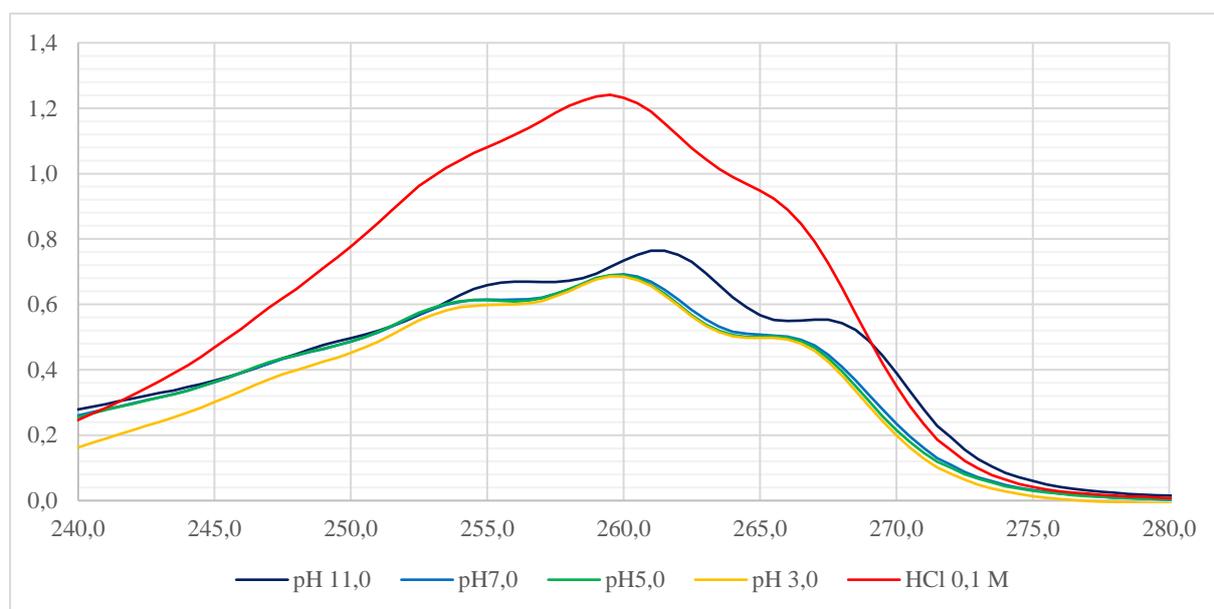


Figura 3.7 – Comparação entre espectros de nicotina a diferentes valores de pH, após correção do espectro do solvente.

Ao analisar esta figura pode concluir-se que há diferenças nos comprimentos de onda máximos quando se altera o pH, observando-se diferenças na posição do máximo da nicotina no pH mais alto (261,5nm) e mais baixo (259,5nm) estudados. Estes dados vão de encontro às conclusões dos espectros observados no artigo por Clayton *et al.*¹⁰¹ e no presente trabalho no estudo de pH inicial.

Na Tabela 3.4 apresentam-se os comprimentos de onda máximos da banda de nicotina e os seus respectivos coeficientes de absorvidade determinados a partir dos espectros representados na Figura 3.7, onde já se tinha realizado acerto da linha de base.

Solução	λ, nm ($\epsilon \times 10^{-2}$, ppm⁻¹cm⁻¹)	$\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon_{\text{máx}} \times 10^{-2}$, ppm⁻¹cm⁻¹)	λ, nm ($\epsilon \times 10^{-2}$, ppm⁻¹cm⁻¹)
Tampão carbonato 0,01M	256,5 (2,31)	261,5 (2,63)	267,5 (1,91)
Tampão fosfato 0,01M	256,0 (2,12)	260,0 (2,39)	267,0 (1,63)
Tampão acetato 0,01M	256,5 (2,11)	260,0 (2,38)	267,0 (1,61)
Tampão malato 0,01M	256,0	259,5 (2,37)	267,0 (1,58)
HCl 0,1M	*	259,5 (4,28)	*

Tabela 3.4 – Efeito das soluções tampão usadas como solvente nos máximos de absorção dos espectros de nicotina e respetivos coeficientes de absorvidade (ϵ) das soluções.

* Não é possível definir com rigor os comprimentos de onda de absorção.

3.1.3. Comparação entre espectros de e-líquidos comerciais

No trabalho foram utilizados dois e-líquidos comerciais de fabricantes diferentes: NicoDIY (ND) com concentração indicada de 20 g/L e NicShot (NS) com concentração indicada de 18 g/L. Prepararam-se quatro diluições (entre 0,2:25 e 0,02:25) de cada e-líquido em metanol e traçaram-se espectros que se apresentam na Figura 3.8 para verificar se o espectro de absorção do e-líquido NicoDIY apresentava diferenças relativamente ao espectro de NicShot.

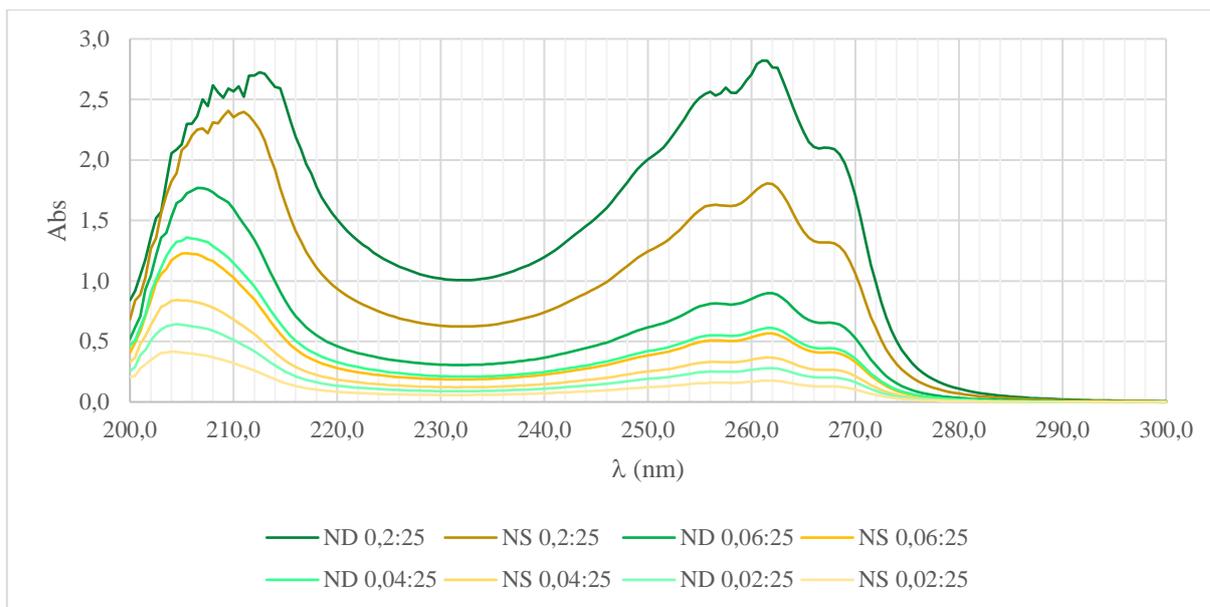


Figura 3.8 – Espectros de soluções metanólicas de NicoDIY e NicShot com as diluições indicadas. Linha de base traçada com metanol.

A Figura 3.8 mostra que as bandas do espectro de nicotina anteriormente discutidas também se observam nos espectros das diluições de NicoDIY e que, como era esperado, diluições iguais de NicoDIY resultaram em espectros com maiores valores de absorvência em relação a espectros de NicShot, em concordância com as concentrações indicadas pelos fabricantes. De modo a determinar se as bandas da nicotina tinham comportamento semelhante nos dois e-líquidos normalizaram-se os espectros a 262,0 nm, como apresentado na Figura 3.9.

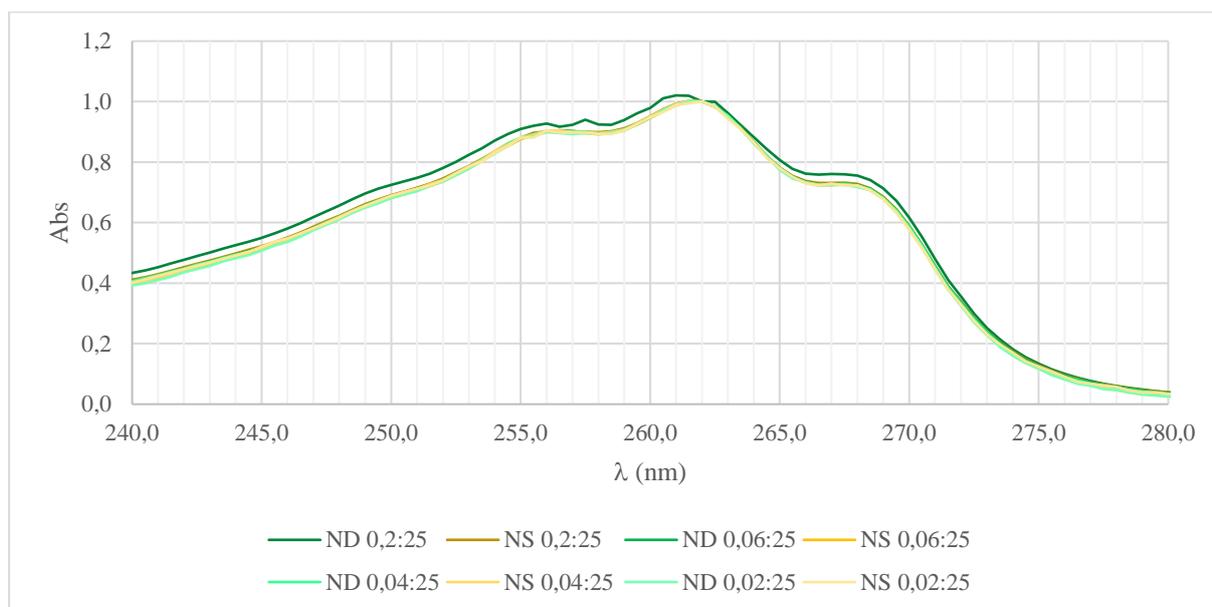


Figura 3.9 – Espectros normalizados a 262,0 nm de NicShot e NicoDIY em metanol com as diluições indicadas. Linha de base traçada com metanol.

Esta figura permite concluir que não há diferenças significativas entre os dois e-líquidos na região espectral entre 240 e 280 nm. O desvio aparente da amostra de NicoDIY mais concentrada pode justificar-se pelo maior ruído (Figura 3.8) devido ao facto de os valores de absorvência serem muito elevados.

3.2. Quantificação de nicotina em e-líquidos

3.2.1. Escolha das condições experimentais

Tendo em conta a análise anterior dos espectros da nicotina e das amostras, foi possível estabelecer as condições espectroscópicas em que se poderá obter melhores resultados, bem como as gamas de trabalho e o solvente a utilizar. Os comprimentos de onda escolhidos para fazer a análise e construir curvas de calibração foram: 256,5, 262,0 e 267,5 nm, que correspondem ao máximo de absorção da segunda banda da nicotina (262,0 nm) e aos máximos relativos correspondentes aos ombros (256,5 e 267,5 nm). Excluiu-se a análise na banda mais intensa de ~200 nm, uma vez que é uma banda que apresenta ruído por possível interferência do solvente, apesar de se fazer linha de base com o respetivo solvente, e porque se encontra na zona do limite espectral do detetor.

Descartou-se a utilização do propilenoglicol por se tratar de um líquido que apresenta viscosidade elevada o que dificulta a homogeneização das soluções e deu origem a espectros com valores de absorvência menores (Figura 3.2.A), quando comparados com soluções com as mesmas concentrações que foram preparadas com metanol e cujos espectros foram obtidos utilizando os mesmos parâmetros no espectrofotómetro.

De modo a comparar os comportamentos dos restantes solventes utilizados nos ensaios anteriores, calculou-se o coeficiente de absorvência com os valores de absorvência da banda máxima de nicotina (262,0 nm). Com esta comparação na Tabela 3.5 espera-se determinar qual solvente resulta num coeficiente de absorvência superior, pois este é um determinante do declive da reta de calibração, ou seja, da sensibilidade do método analítico.

Solvente	C _{nic} (ppm)	Abs λ=262,0 nm	ε, λ=262,0 nm (ε×10 ⁻² ppm ⁻¹ .cm ⁻¹)
Água MiliQ	90,0	1,532	1,70
Metanol	32,0	0,673	2,10
Tampão carbonato 0,01M	29,0	0,752*	2,59
Tampão fosfato 0,01M	29,0	0,615*	2,12
Tampão acetato 0,01M	29,0	0,600*	2,07
Tampão malato 0,01M	29,0	0,563*	1,94
HCl 0,1M	29,0	1,116*	3,85

Tabela 3.5 – Coeficientes de absorvência da nicotina a 262,0 nm nos vários solventes utilizados.

* Absorvência indicada corresponde à subtração da Abs do solvente correspondente à Abs do espectro da solução de nicotina.

Para o trabalho de quantificação a água descartou-se como possível solvente pois, além de ter um coeficiente de absorvência menor, também se observou no estudo do pH que há equilíbrios ácido-base da nicotina que se estabelecem, não havendo garantia de que a análise quantitativa fosse completamente fiável. Esta ionização da nicotina poderia ser revertida utilizando bases e ácidos fortes para fazer acerto do pH para um valor em que a nicotina se mantivesse na sua forma não protonada, mas isto poderia implicar que a uniformidade da matriz das soluções estivesse em causa, uma vez que se poderiam utilizar quantidades diferentes das bases e ácidos utilizados para o acerto de pH.

Trabalhar com HCl 0,1 M seria uma possibilidade, pois manteria o pH suficientemente ácido para garantir que toda a nicotina estaria na forma diprotonada.^{1,34} No entanto, em meio ácido o espectro perde resolução vibrónica o que limita as possibilidades de análise a um comprimento de onda. Além disso, a adição de HCl pode introduzir impurezas que venham a interferir nas leituras, por não ser um solvente suficientemente puro. Por essas razões descartou-se o HCl como solvente de análise.

Descartou-se também a utilização do tampão malato 0,01 M, uma vez que o tampão interfere bastante nas leituras na área espectral da banda de nicotina, como é possível verificar na Figura 3.6.D e a sua utilização implicaria uma quantificação não direta de nicotina, uma vez que se teria de fazer correção dos valores de absorvência com a linha de base. Os tampões fosfato 0,01 M e acetato 0,01 M apresentam valores de coeficiente de absorvência semelhantes ao de metanol (Tabela 3.5), no entanto também não serão os mais adequados uma vez que, teoricamente, nestes valores de pH (7,0 e 5,0, respetivamente) coexistem em solução duas formas da nicotina: a forma neutra e a forma monoprotónada.^{1,34}

Uma outra possibilidade seria a utilização do tampão carbonato 0,01M. Este apresenta um coeficiente de absorvidade superior ao obtido em metanol (Tabela 3.5). No entanto, a adição de carbonato às amostras tornaria o procedimento de análise mais complexo do que a utilização de um solvente puro. As matrizes seriam mais complexas o que poderia levar a interferência graves no caso de, por exemplo, presença nas amostras de metais vestigiários que hidrolisem ou precipitem sob a forma de hidróxidos ou carbonatos. Tendo em conta estas desvantagens, o facto de ter um coeficiente de absorvidade apenas ligeiramente superior ao do metanol não justifica a sua utilização. Assim sendo, optou-se por utilizar metanol na preparação das várias soluções para quantificação de nicotina nos e-líquidos.

Em termos de método analítico para a quantificação da nicotina no e-líquido utilizaram-se o método de padrão externo e o de adição de padrão.

O método de padrão externo consiste na preparação de soluções padrão de concentração e volume conhecidos preparadas a partir de uma solução *stock* do analito que se pretende quantificar. Neste método preparam-se também amostras a partir de uma solução mãe da amostra a analisar. A maior vantagem deste método deve-se à sua simplicidade quanto à preparação das soluções a serem analisadas, bem como à facilidade dos cálculos para quantificação do analito na amostra que é feita por interpolação do sinal da amostra na reta de calibração obtida. Outra vantagem importante é que por cada reta obtida podem ser quantificadas um número ilimitado de amostras, desde que se garanta a validade da reta de calibração. No entanto, este método requer que a matriz dos padrões e das amostras sejam semelhantes de modo a que as leituras do sinal não sejam influenciadas por outras espécies existentes na amostra e que eventualmente possam interferir na resposta do instrumento de medida.^{90,102}

O método de adição de padrão é bastante adequado para quantificar amostras com matriz complexa ou desconhecida. Os padrões a serem lidos devem ser preparados adicionando a cada padrão um volume conhecido de solução mãe de amostra, garantindo que a concentração de amostra é constante em todos os padrões, e volumes conhecidos e crescentes de solução *stock* do analito. Assim, o sinal obtido na análise vai ser uma soma do sinal do analito presente na solução *stock* e do analito na amostra e a concentração de analito vai ser calculada por extrapolação na reta de calibração. Apesar de apresentar como vantagem a eliminação do efeito da matriz nas leituras, este método exige que se prepare um conjunto de padrões, ou seja, uma reta de calibração para cada amostra a ser analisada.^{90,103}

No trabalho para o método de padrão externo decidiu-se desenvolver um usando como solvente apenas metanol e outro em que o solvente seria uma mistura de metanol com a base

de propilenoglicol e glicerina vegetal a 8 % para assegurar maior semelhança com a matriz das amostras. Tendo em conta que nos e-líquidos a nicotina se encontra diluída numa mistura com dois solventes, pensou-se que o método analítico da adição de padrão fosse um método de quantificação que deveria ter interesse neste trabalho

Após a escolha das condições experimentais, iniciou-se o desenvolvimento dos protocolos para a quantificação de nicotina nos dois e-líquidos comerciais (NicShot e NicoDIY), começando por preparar um conjunto de padrões para obter definir uma gama de linearidade do método.

Os valores experimentais obtidos foram estatisticamente tratados para se obterem os parâmetros da reta: declive (associada à sensibilidade do método analítico) e ordenada na origem com os respetivos erros associados, o coeficiente de determinação (r^2), os limites do método (LD, LQ e LL) e respetiva gama dinâmica. Foi ainda confirmada a não existência de *outliers* nos pontos experimentais utilizados para a obtenção das retas, pelo que se calculou o intervalo de prognóstico (Equação 3) para cada ponto experimental.

3.2.2. Análise pelo método de padrão externo em metanol

Prepararam-se soluções de nicotina pura com concentrações entre os 1,16 e 145 ppm para construir uma curva de calibração a cada comprimento de onda a ser estudado e se poder estimar a gama de linearidade do método (Figura 3.10).

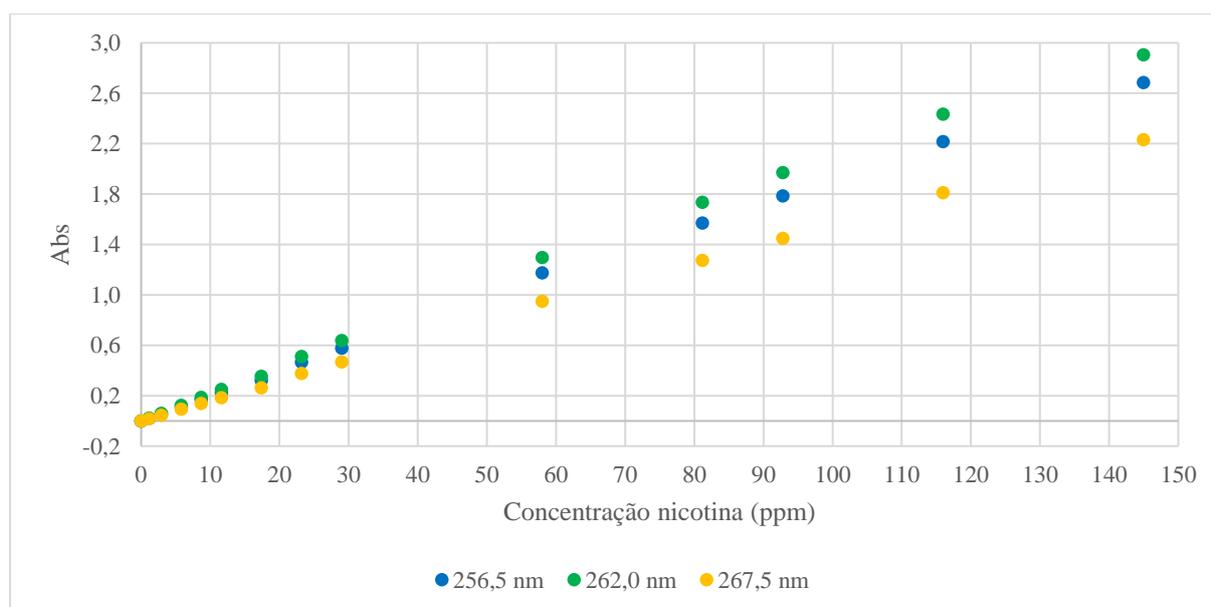


Figura 3.10 – Dados para calibração de nicotina em metanol aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm pelo método de padrão externo. Gama de concentrações entre 1,16 e 145 ppm.

Os dados experimentais obtidos mostram que a linearidade era observada até 58 ppm para a análise a 256,5 e 262,0 nm e até 116 ppm para 267,5 nm. Os pontos que têm comportamento linear foram tratados estatisticamente e calcularam-se os parâmetros de ajuste a uma reta por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e também os limites analíticos. Os cálculos foram efetuados de acordo com as equações apresentadas na Tabela A8 no Anexo II e os resultados estão na Tabela 3.6.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
$m \pm s_{m(t(95\%,N-1))}$ (ppm ⁻¹)	0,0203±0,0005	0,0224±0,0005	0,0155±0,0003
$b \pm s_{b(t(95\%,N-1))}$	-0,008±0,010	-0,01±0,02	0,01±0,02
r ²	0,99942	0,99939	0,99955
LD (ppm)	1,4	1,4	3,2
LQ (ppm)	4,5	4,6	10,6
LL (ppm)	58	58	116
GD	12,8	12,6	11,0

Tabela 3.6 – Parâmetros das curvas de calibração de nicotina em metanol pelo método de padrão externo.

A avaliação da existência de *outliers* nos pontos utilizados foi feita por determinação do intervalo de prognóstico para cada ponto, estando os resultados apresentados na Tabela 3.7.

C _{nic} ±U (ppm)	256,5 nm			262,0 nm			267,5 nm		
	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}
0	-0,0007	-0,0313	0,0153	-0,0007	-0,0350	0,0173	-0,0007	-0,0298	0,0445
1,16±0,03	0,0197	-0,0076	0,0387	0,0223	-0,0089	0,0431	0,0180	-0,0118	0,0624
2,9±0,1	0,0537	0,0279	0,0737	0,0597	0,0303	0,0819	0,0450	0,0152	0,0894
5,8±0,2	0,1120	0,0869	0,1322	0,1237	0,0955	0,1465	0,0920	0,0603	0,1343
8,7±0,2	0,1693	0,1459	0,1907	0,1867	0,1607	0,2112	0,1383	0,1053	0,1793
11,6±0,4	0,2257	0,2048	0,2494	0,2490	0,2258	0,2759	0,1843	0,1503	0,2243
17,4±0,5	0,3217	0,3224	0,3669	0,3550	0,3557	0,4057	0,2617	0,2403	0,3142
23,2±0,5	0,4643	0,4397	0,4846	0,5123	0,4853	0,5358	0,3780	0,3302	0,4042
29,0±0,6	0,5773	0,5568	0,6027	0,6377	0,6145	0,6662	0,4683	0,4201	0,4943
58±2	1,1743	1,1384	1,1965	1,2977	1,2569	1,3223	0,9497	0,8700	0,9443
81±2	1,5693	1,6033	1,6719	1,7337	1,7704	1,8476	1,2737	1,2291	1,3050
93±2	1,7843	1,8348	1,9106	1,9710	2,0260	2,1114	1,4490	1,4084	1,4857
116±3	2,2170	2,2971	2,3886	2,4343	2,5366	2,6396	1,8100	1,7665	1,8474
145±3	2,6847	2,8744	2,9867	2,9043	3,1741	3,3005	2,2313	2,2134	2,3003

Tabela 3.7 – Valores do intervalo de prognóstico das curvas de calibração de nicotina em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.

Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Os valores calculados do intervalo de prognóstico na Tabela 3.7 mostram que aos comprimentos de onda 256,5 e 262,0 nm as concentrações a partir dos 58 ppm são *outliers* (absorvências marcadas a vermelho). Assim, a exclusão destes valores justifica-se por estarem fora da zona de comportamento de linearidade e, por essa razão, não devem ser utilizados como pontos para cálculo das equações das retas. A 267,5 nm o ponto de 58 ppm está ligeiramente fora dos limites do intervalo de prognóstico. Isto pode dever-se a alteração do ruído espectral numa das réplicas. Contudo, por se tratar de um ponto intermédio e a diferença relativamente ao IP não ser significativa, considerou-se não haver justificação para eliminar este ponto.

Após analisadas as curvas de calibração anteriores, prosseguiu-se a análise limitando a gama de concentrações a serem utilizadas para as retas de calibração. Prepararam-se padrões numa gama de concentrações entre 1,16 e 72 ppm partindo de uma solução *stock* de 145 ppm de nicotina. Na Figura 3.11 apresentam-se as retas de calibração aos comprimentos de onda estudados e os respetivos gráficos dos residuais. Na Tabela A3 no Anexo II pode consultar-se o detalhe de como foram preparadas as soluções padrão de nicotina e os respetivos erros associados e na Tabela A11 no Anexo III pode consultar-se as absorvências lidas nas leituras em triplicado.

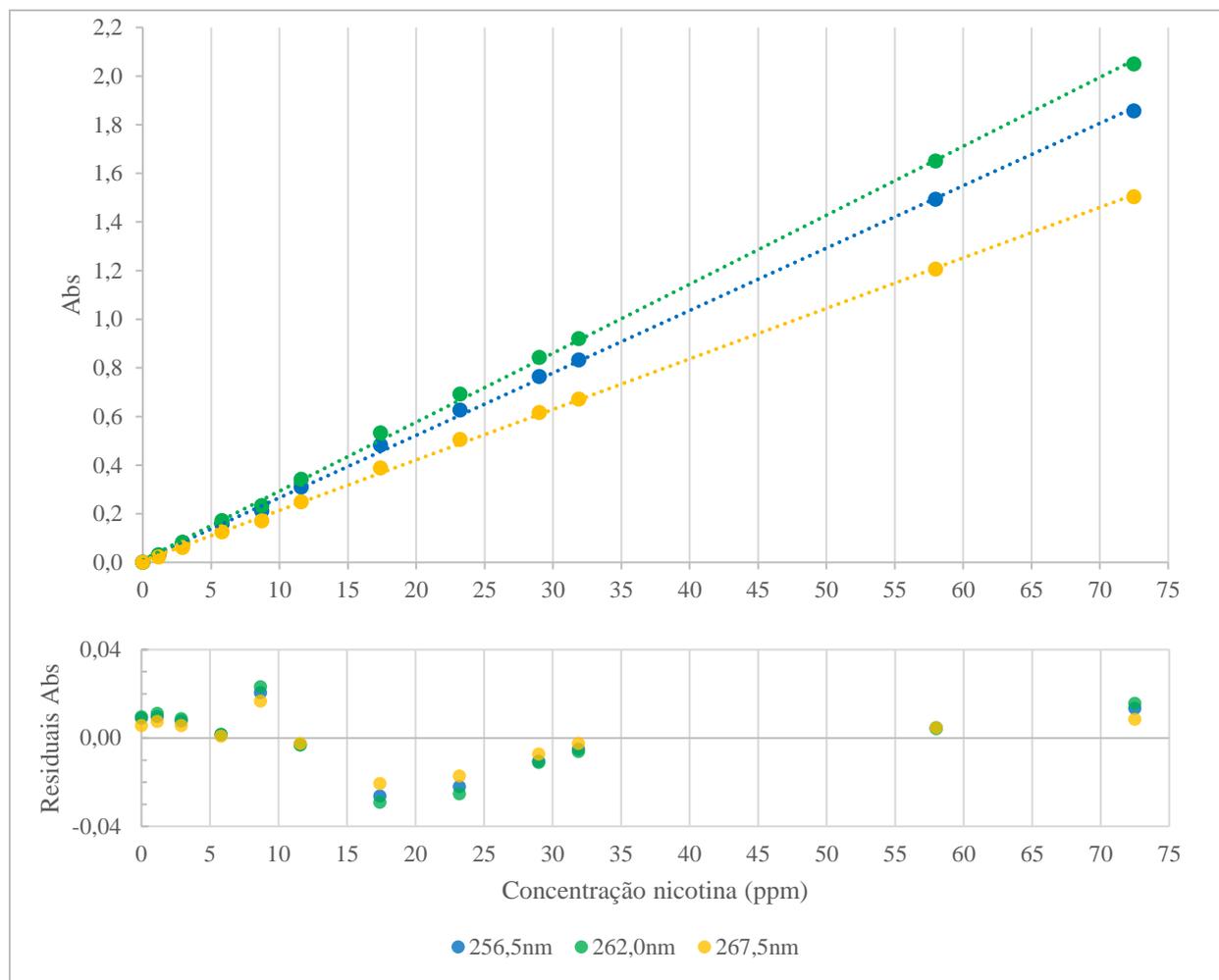


Figura 3.11 – Retas de calibração para a quantificação de nicotina em metanol pelo método de padrão externo a 256,5, 262,0 e 267,5 nm e respectivos gráficos dos residuais. Gama de concentrações entre 1,16 e 72 ppm.

Na Tabela 3.8 apresentam-se os parâmetros da reta, o coeficiente de determinação e os limites e gama dinâmica a cada comprimento de onda estudado. Na Tabela 3.9 observam-se os valores do intervalo de prognóstico para cada ponto das retas.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
$m \pm s_{m_{t(95\%,N-1)}} \text{ (ppm}^{-1}\text{)}$	0,0257±0,0005	0,0284±0,0005	0,0208±0,0004
$b \pm s_{b_{t(95\%,N-1)}}$	0,01±0,02	0,01±0,02	0,01±0,02
r^2	0,99943	0,99941	0,99949
LD (ppm)	1,7	1,8	1,6
LQ (ppm)	5,8	5,9	5,4
LL (ppm)	72	72	72
GD	12,6	12,4	13,3

Tabela 3.8 – Parâmetros da reta de calibração de nicotina em metanol pelo método de padrão externo.

C _{nic} ±U (ppm)	256,5 nm			262,0 nm			267,5 nm		
	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}
0	0,0003	-0,0266	0,0453	0,0000	-0,0309	0,0500	0,0003	-0,0215	0,0336
1,16±0,04	0,0293	0,0033	0,0749	0,0313	0,0022	0,0827	0,0227	0,0027	0,0575
2,9±0,6	0,0760	0,0482	0,1193	0,0830	0,0518	0,1318	0,0607	0,0391	0,0935
5,8±0,2	0,1567	0,1229	0,1934	0,1723	0,1344	0,2137	0,1257	0,0996	0,1535
8,7±0,2	0,2120	0,1976	0,2675	0,2330	0,2170	0,2956	0,1700	0,1600	0,2135
11,6±0,3	0,3100	0,2723	0,3417	0,3417	0,2995	0,3776	0,2493	0,2204	0,2735
17,4±0,4	0,4820	0,4214	0,4903	0,5320	0,4643	0,5417	0,3880	0,3411	0,3938
23,2±0,5	0,6267	0,5703	0,6390	0,6927	0,6288	0,7061	0,5050	0,4616	0,5142
29,0±0,6	0,7640	0,7190	0,7880	0,8430	0,7931	0,8708	0,6157	0,5820	0,6348
31,9±0,6	0,8330	0,7932	0,8626	0,9203	0,8751	0,9532	0,6710	0,6421	0,6952
58±2	1,4930	1,4590	1,5363	1,6500	1,6108	1,6978	1,2060	1,1811	1,2403
72±2	1,8563	1,8273	1,9122	2,0497	2,0178	2,1132	1,5033	1,4794	1,5443

Tabela 3.9 – Valores do intervalo de prognóstico das retas de calibração de nicotina em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.

Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Como se pode observar na Tabela 3.9 todos os pontos da reta podem ser considerados nos cálculos das equações das retas aos vários comprimentos de onda, pois todos os pontos estão no IP e, portanto, não se verifica a existência de qualquer *outlier*.

Para se quantificar a nicotina no e-líquido NicShot, preparou-se uma solução mãe de amostra com uma diluição de NicShot 2:25 a partir das quais se prepararam amostras com 2 mL da solução mãe e metanol até se perfazerem 25 mL. Na Tabela 3.10 apresentam-se a média das absorvências nos comprimentos de onda estudados para cada amostra preparada, a respetiva concentração de nicotina na amostra e a concentração de nicotina calculada no e-líquidos NicShot com o respetivo erro associado ao cálculo para um grau de confiança de 95%.

	256,5 nm		262,0 nm		267,5 nm	
	Abs	C _{nic,Am} (ppm)	Abs	C _{nic,Am} (ppm)	Abs	C _{nic,Am} (ppm)
Am1	1,353	52,4	1,495	52,4	1,093	52,3
Am2	1,426	55,2	1,574	55,2	1,153	55,2
Am3	1,427	55,3	1,577	55,3	1,154	55,3
Am4	1,430	55,3	1,578	55,3	1,156	55,3
Am5	1,427	55,2	1,576	55,2	1,154	55,3
C_{nic NS±U} (g/L)	8,5±0,2		8,5±0,2		8,5±0,2	

Tabela 3.10 – Concentração de nicotina para o e-líquido comercial NicShot em metanol pelo método de padrão externo. Incerteza calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Comparando as concentrações de nicotina em NicShot calculadas através deste método (cerca de 8,5 g/L) com a concentração apresentada no rótulo do fabricante de NicShot (18 g/L), verifica-se uma grande discrepância. Esta diferença entre valores calculados e do fabricante vão de encontro ao que foi encontrado na pesquisa bibliográfica, onde artigos que se focavam na quantificação de nicotina nos e-líquidos concluem que estas concentrações não são semelhantes havendo inclusive variação entre lotes do mesmo produto.^{60,62,76}

Prepararam-se também amostras fortificadas para os ensaios de recuperação, em balões de 25mL, com 2 mL de solução mãe de amostra, 4 mL de solução *stock* de padrão e perfazendo o volume com metanol. Na Tabela 3.11 apresenta-se a média das absorvências das réplicas em triplicado aos comprimentos de onda estudados para cada amostra fortificada, a respetiva percentagem de recuperação (%Rec) e a média destas percentagens.

	256,5 nm		262,0 nm		267,5 nm	
	Abs	%Rec	Abs	%Rec	Abs	%Rec
Rec1	2,031	104,0	2,237	102,9	1,649	105,3
Rec2	2,048	106,7	2,252	105,2	1,664	108,3
Rec3*	1,839	71,7	2,024	70,5	1,494	73,0
Rec4	2,066	109,8	2,274	108,5	1,679	111,4
Média %Rec	106,8		105,6		108,3	

Tabela 3.11 – Ensaios de recuperação para o e-líquido comercial NicShot em metanol pelo método de padrão externo.

* Não se teve em consideração este ensaio de recuperação para a %Rec.

Segundo os dados da Tabela 3.11, as percentagens de recuperação encontram-se dentro do intervalo de valores de referência para este parâmetro. Isto poderia indicar que não há perdas

de analito durante a análise, no entanto os valores calculados não apresentam significado estatístico, pois foram preparadas apenas quatro amostras fortificadas e uma delas foi excluída do cálculo da média de %Rec uma vez que os valores obtidos para os replicados tiveram uma grande dispersão.

No sentido de esclarecer dúvidas sobre a gama de trabalho, uma vez que as primeiras curvas de calibração não pareciam apresentar perda de linearidade mesmo nas concentrações mais elevadas de nicotina, foram comparados os padrões de nicotina pura com concentrações semelhantes às diluições de NicShot que se prepararam nos ensaios iniciais. Nesta análise verificou-se que os padrões de nicotina pura resultavam em espectros com menores valores de absorvência.

A consulta mais detalhada do rótulo de NicShot permitiu perceber a existência de duas indicações em rótulos diferentes no mesmo frasco: no rótulo principal havia a indicação do volume de e-líquido (10 mL), da massa de nicotina (18 mg) e do solvente (50PG×50VG) e no rótulo secundário havia indicação do teor de nicotina (18 mg/mL). As concentrações de nicotina no e-líquido que se tinham assumido nos ensaios iniciais eram dez vezes inferiores ao seu valor real, isto é, a solução de NicShot que se considerou ter 144 ppm de nicotina tinha na realidade 1440 ppm.

Os padrões preparados para as curvas de calibração para averiguação da gama de linearidade dos métodos realizados a seguir tiveram em consideração esta informação e as gamas de trabalho foram aumentadas.

3.2.3. Análise pelo método de padrão externo com PGVG a 8 % em metanol

Foi preparado um novo protocolo para realizar uma segunda reta de calibração usando o método de padrão externo para a quantificação de nicotina, mas usando uma mistura da base de propilenoglicol e glicerina vegetal 50/50 com metanol, para que se pudesse obter um solvente com maior semelhança à matriz do solvente dos e-líquidos comerciais disponíveis (NicoDIY e NicShot). Assim, preparou-se uma mistura de PGVG a 8 % com metanol que serviria como solvente e branco neste método e soluções de nicotina com concentrações entre os 10,1 e 805 ppm, cujos detalhes podem ser consultados na Tabela A4 no Anexo II, para construir as curvas de calibração (apresentadas na Figura 3.12).

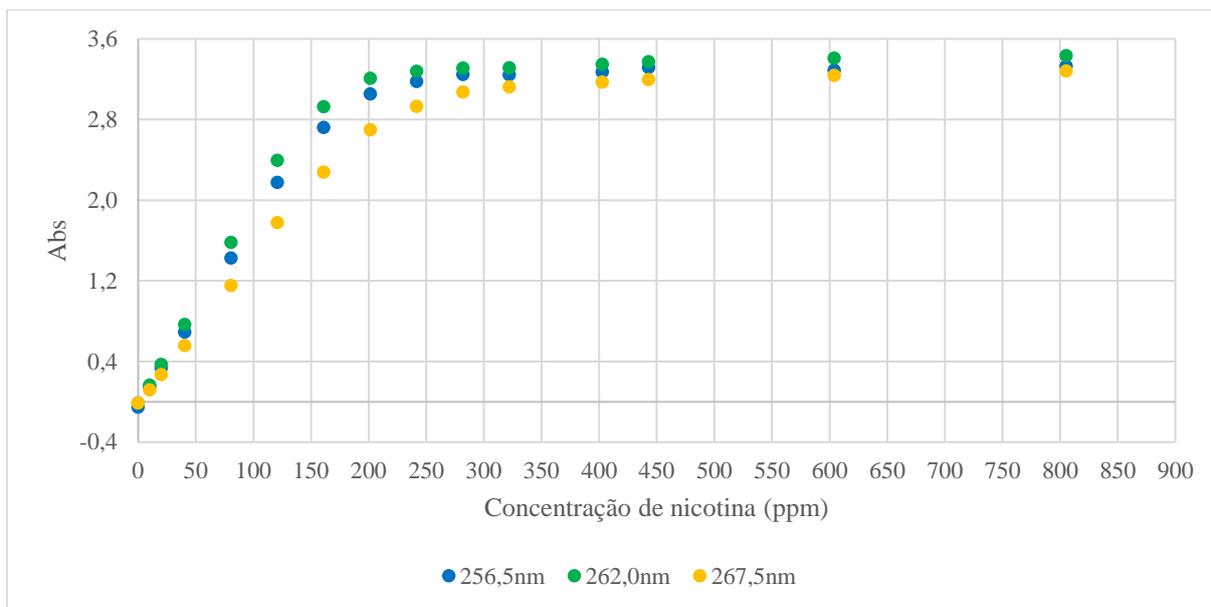


Figura 3.12 – Dados de calibração de nicotina na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm. Gama de concentrações entre 10,1 e 805 ppm.

Analisando a Figura 3.12 observa-se claramente que a partir de 121 ppm se perde a linearidade, pelo que foi preparado um novo conjunto de padrões a partir de uma solução *stock* de 503ppm com concentrações de nicotina entre os 5,0 e 141 ppm. O detalhe das soluções preparadas para as retas de calibração estão na Tabela A5 no Anexo II. As retas obtidas com os pontos experimentais que apresentam relação linear e os respetivos gráficos dos residuais apresentam-se na Figura 3.13.

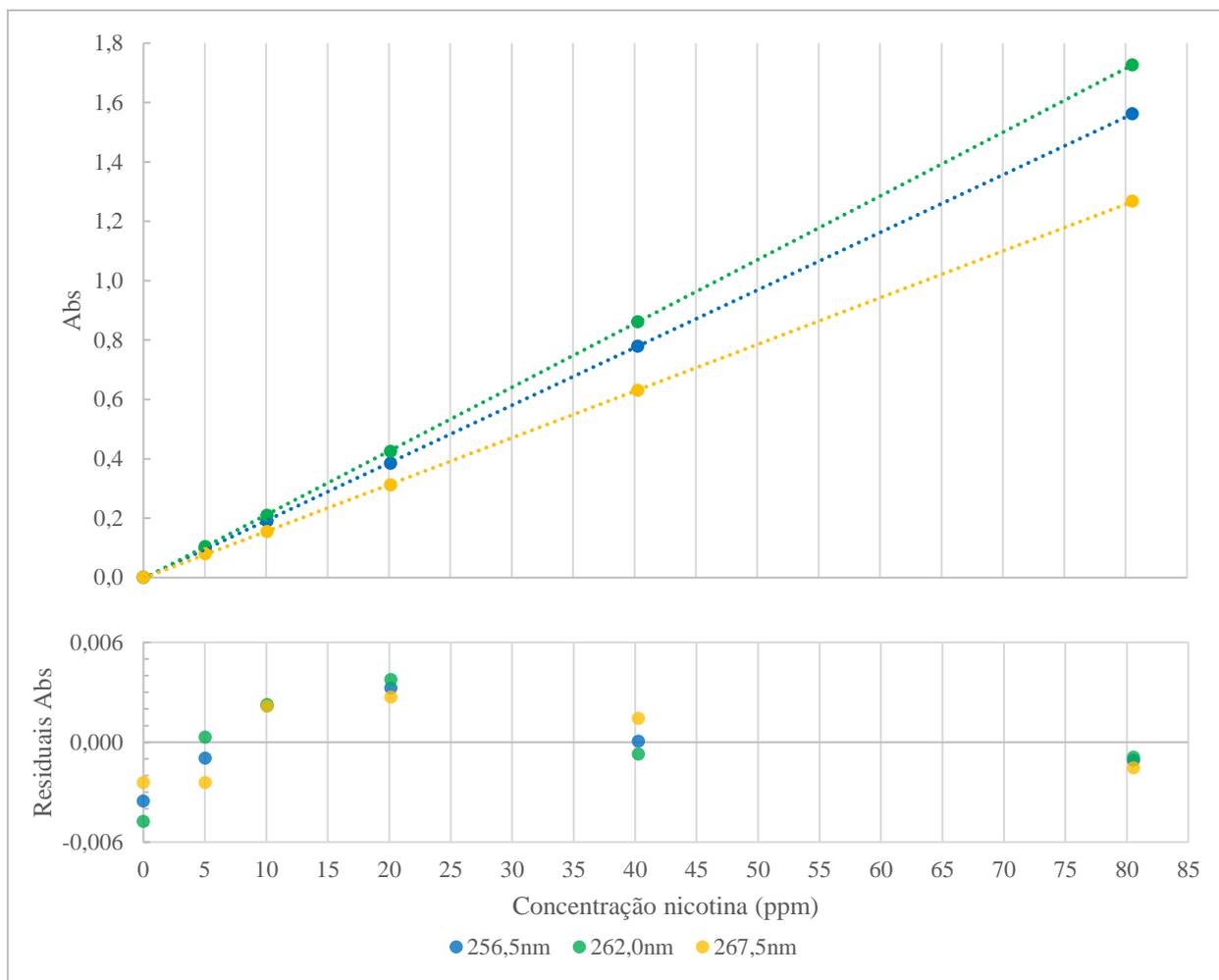


Figura 3.13 – Retas de calibração para a quantificação de nicotina na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm e respectivos gráficos dos residuais. Gama de concentrações entre 5,0 e 80,5 ppm.

Calcularam-se os parâmetros das retas de calibração aplicando o método dos mínimos quadrados e os seus parâmetros são apresentados na Tabela A17 no Anexo III. Na Tabela 3.12 apresentam-se os valores do declive e ordenada da origem bem como os respetivos erros associados, o coeficiente de determinação, os limites e gama dinâmica das retas de calibração aos três comprimentos de onda em estudo. Na Tabela 3.13 apresentam-se os valores do intervalo de prognóstico calculado através da Equação 1 para confirmar a não existência de *outliers* nos pontos utilizados para obter as retas de calibração.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
$m \pm s_{m_{t(95\%,N-1)}} \text{ (ppm}^{-1}\text{)}$	0,0194±0,0002	0,0215±0,0002	0,0157±0,0002
$b \pm s_{b_{t(95\%,N-1)}}$	-0,002±0,005	-0,004±0,006	-0,002±0,005
r^2	0,99998	0,99998	0,99998
LD (ppm)	0,4	0,5	0,5
LQ (ppm)	1,4	1,5	1,7
LL (ppm)	81	81	81
GD	57,1	52,5	47,7

Tabela 3.12 – Parâmetros da reta de calibração de nicotina na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo.

$C_{nic \pm U}$ (ppm)	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}
0	0,0012	-0,0115	0,0069	0,0010	-0,0148	0,0073	0,0005	-0,0108	0,0070
5,0±0,2	0,0963	0,0865	0,1043	0,1040	0,0936	0,1150	0,0798	0,0687	0,0860
10,1±0,3	0,1909	0,1844	0,2018	0,2102	0,2020	0,2229	0,1544	0,1482	0,1650
20,1±0,5	0,3852	0,3801	0,3969	0,4249	0,4186	0,4388	0,3123	0,3069	0,3232
40,3±0,9	0,7793	0,7707	0,7879	0,8619	0,8509	0,8716	0,6305	0,6236	0,6403
81±2	1,5621	1,5494	1,5726	1,7271	1,7123	1,7402	1,2674	1,2546	1,2771
121±3	2,1716	2,3283	2,3570	2,3905	2,5739	2,6086	1,7798	1,8857	1,9137
141±3	2,5022	2,7170	2,7500	2,7265	3,0039	3,0436	2,0760	2,2006	2,2326

Tabela 3.13 – Valores do intervalo de prognóstico das retas de quantificação de nicotina na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.

Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Os valores do intervalo de prognóstico confirmam que os valores de absorvência a 121 e 141 ppm são *outliers* e, por isso, validam a sua exclusão nos cálculos dos parâmetros das mesmas.

Pode observar-se na Tabela 3.12 que o coeficiente de determinação calculado para as três retas de calibração é igual e que se encontra bastante próximo de 1, indicando que as três retas se ajustam bem aos valores experimentais observados. O declive é um indicador da sensibilidade do método analítico e quanto maior o seu valor, maior a capacidade de uma dada reta diferenciar duas concentrações de analito muito próximas. Assim sendo, a reta obtida a 262,0 nm é a que apresenta maior sensibilidade e a reta obtida a 267,5 nm é a que apresenta menor sensibilidade.

Os limites de deteção calculados foram semelhantes e tendo em conta a informação sobre o intervalo de prognóstico da Tabela 3.13 confirmou-se como limite de linearidade para os três métodos a concentração de 81 ppm. Aplicando a Equação 3 obtiveram-se os valores das gamas

dinâmicas razoáveis e que indicam que a reta obtida para 256,5 nm é a que tem um maior intervalo de concentrações onde se pode observar um comportamento linear com a gama dinâmica da reta a ter um valor bastante próximo para a análise a 262,0 nm.

Ponderando todos os parâmetros dos métodos, como a sensibilidade, os limites analíticos e a gama dinâmica, pode afirmar-se que o método que melhor se ajusta à quantificação de nicotina é o que corresponde à análise a 262,0 nm.

Tendo em atenção os resultados obtidos no método de padrão externo com metanol, decidiu-se utilizar um volume menor de e-líquido para fazer as soluções mãe de amostra. Foram então preparadas soluções mãe distintas com 0,5 mL dos e-líquidos comerciais NicoDIY e NicShot perfazendo-se até 25 mL com metanol para que se pudesse fazer quantificação de nicotina. As amostras lidas foram preparadas com 1 mL de solução mãe perfazendo com metanol até aos 25 mL. As absorvências lidas, concentração nas amostras e no e-líquido e respetivo erro são apresentados na Tabela 3.14.

	256,5 nm		262,0 nm		267,5 nm	
Amostras de e-líquido NicoDIY						
	Abs	C_{nic,Am} (ppm)	Abs	C_{nic,Am} (ppm)	Abs	C_{nic,Am} (ppm)
ND1	0,232	12,1	0,259	12,2	0,183	11,8
ND2	0,246	12,8	0,274	13,0	0,196	12,5
ND3	0,241	12,6	0,270	12,7	0,191	12,2
C_{nic,ND±U} (g/L)	15,6±0,3		15,8±0,3		15,2±0,4	
Amostras de e-líquido NicShot						
	Abs	C_{nic,Am} (ppm)	Abs	C_{nic,Am} (ppm)	Abs	C_{nic,Am} (ppm)
NS1	0,223	11,6	0,249	11,8	0,176	11,3
NS2	0,218	11,3	0,244	11,5	0,172	11,0
NS3	0,228	11,9	0,254	12,0	0,181	11,6
C_{nic,NS±U} (g/L)	14,5±0,3		14,7±0,3		14,2±0,4	

Tabela 3.14 – Concentração de nicotina para os e-líquidos comerciais NicoDIY e NicShot na mistura de PGVG a 8 % em metanol pelo método de padrão externo. Incerteza calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Na Tabela 3.14 pode observar-se que, tal como aconteceu no método anterior em que o solvente era apenas metanol, os valores de concentração de nicotina nos e-líquidos obtidos neste trabalho e as concentrações indicadas pelos fabricantes são diferentes. Contudo, não apresentam uma discrepância tão grande quando se utiliza como solvente a mistura de PGVG e metanol como solvente. Estes valores calculados de concentração de nicotina nos e-líquidos vão de

encontro a resultados obtidos em artigos consultados onde concluíram que os teores de nicotina presentes em várias amostras de cigarros eletrônicos não correspondiam aos teores indicados pelo fabricante.^{60,62,76} Na pesquisa bibliográfica realizada artigos consultados concluíam haver discrepância de teores de nicotina entre lotes do mesmo e-líquido comercial, o que pode explicar a diferença de concentrações de nicotina nas amostras de NicShot entre estes métodos, uma vez que se utilizaram lotes diferentes deste produto.^{17,18}

Os ensaios de recuperação foram feitos com amostras fortificadas com 1 mL de solução mãe de amostra, 2 mL de *stock* de padrão e metanol até se perfazer 25 mL. Na Tabela 3.15 apresentam-se a média das absorvências lidas nos comprimentos de onda estudados para cada amostra fortificada preparada, a respetiva percentagem de recuperação (%Rec) e a média e desvio-padrão (sd) destas percentagens.

	256,5 nm		262,0 nm		267,5 nm	
	Abs	%Rec	Abs	%Rec	Abs	%Rec
Rec1	0,968	95,3	1,074	95,4	0,780	95,2
Rec2	0,964	94,8	1,069	94,8	0,776	94,7
Rec3	0,990	98,1	1,097	98,1	0,798	98,0
Rec4	1,001	97,4	1,110	97,4	0,806	97,2
Rec5	1,017	99,4	1,128	99,4	0,819	99,3
Rec6	1,011	98,7	1,122	98,8	0,814	98,5
Média %Rec±sd	97,3±1,9		97,3±1,9		97,2±1,9	

Tabela 3.15 – Ensaio de recuperação para os e-líquidos comerciais NicoDIY e NicShot pelo método de padrão externo na com mistura de PGVG a 8 % em metanol.

Os valores de percentagem de recuperação das amostras fortificadas preparadas estão dentro do intervalo de referência para este parâmetro, significando que não há perdas significativas de analito ao longo da análise.

3.2.4. Análise pelo método de adição de padrão

Realizou-se também quantificação de nicotina nos e-líquidos NicoDIY e NicShot através do método de adição de padrão, uma vez que este é um método que permite eliminar o efeito de matriz. Prepararam-se padrões com concentrações entre 10,1 e 805 ppm de nicotina e a cada padrão foi adicionado 1 mL de solução mãe de Nicshot previamente diluída numa proporção 1:50.

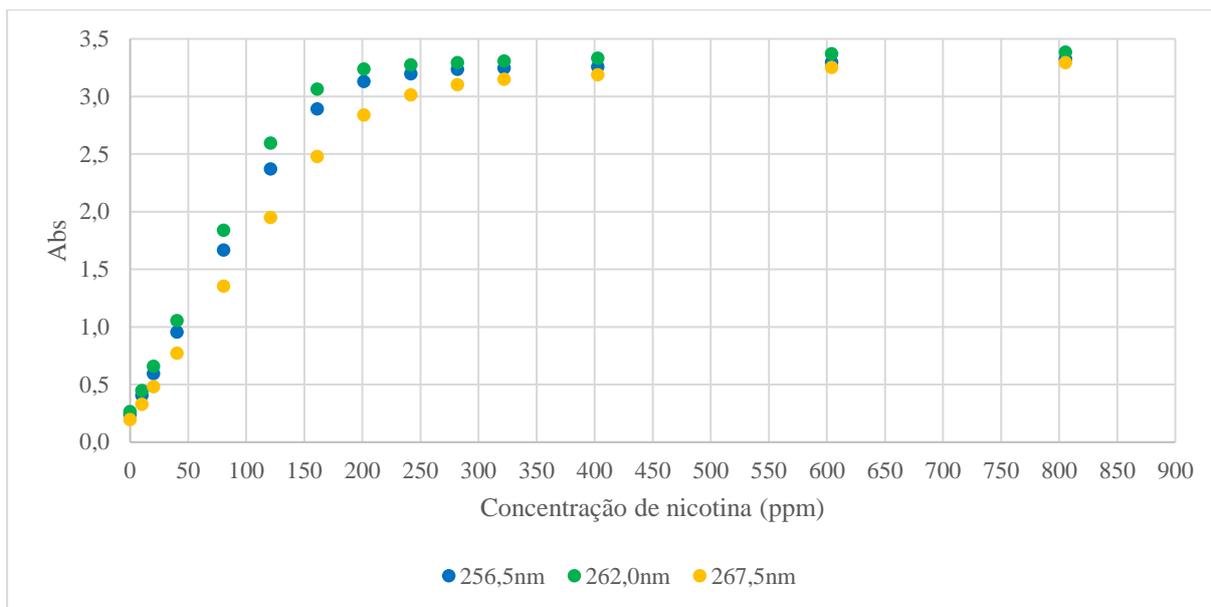


Figura 3.14 – Dados de calibração de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm. Gama de concentrações 10,1 e 805 ppm.

Após análise da Figura 3.14 conclui-se que para as retas de calibração não deveriam ser preparados padrões com concentrações muito superiores a 121 ppm. Tomando este valor como referência, preparou-se uma solução mãe do e-líquido NicoDIY numa diluição 1:50 e, em seguida, padrões com concentrações entre 5,0 e 141 ppm de nicotina a partir de uma solução *stock* de 503 ppm e a cada padrão adicionou-se 1 mL da solução mãe de amostra.

Na Figura 3.14 apresentam-se as retas de calibração aos três comprimentos de onda estudados e respectivos gráficos dos residuais resultantes das leituras dos padrões preparados com a solução mãe de NicoDIY.

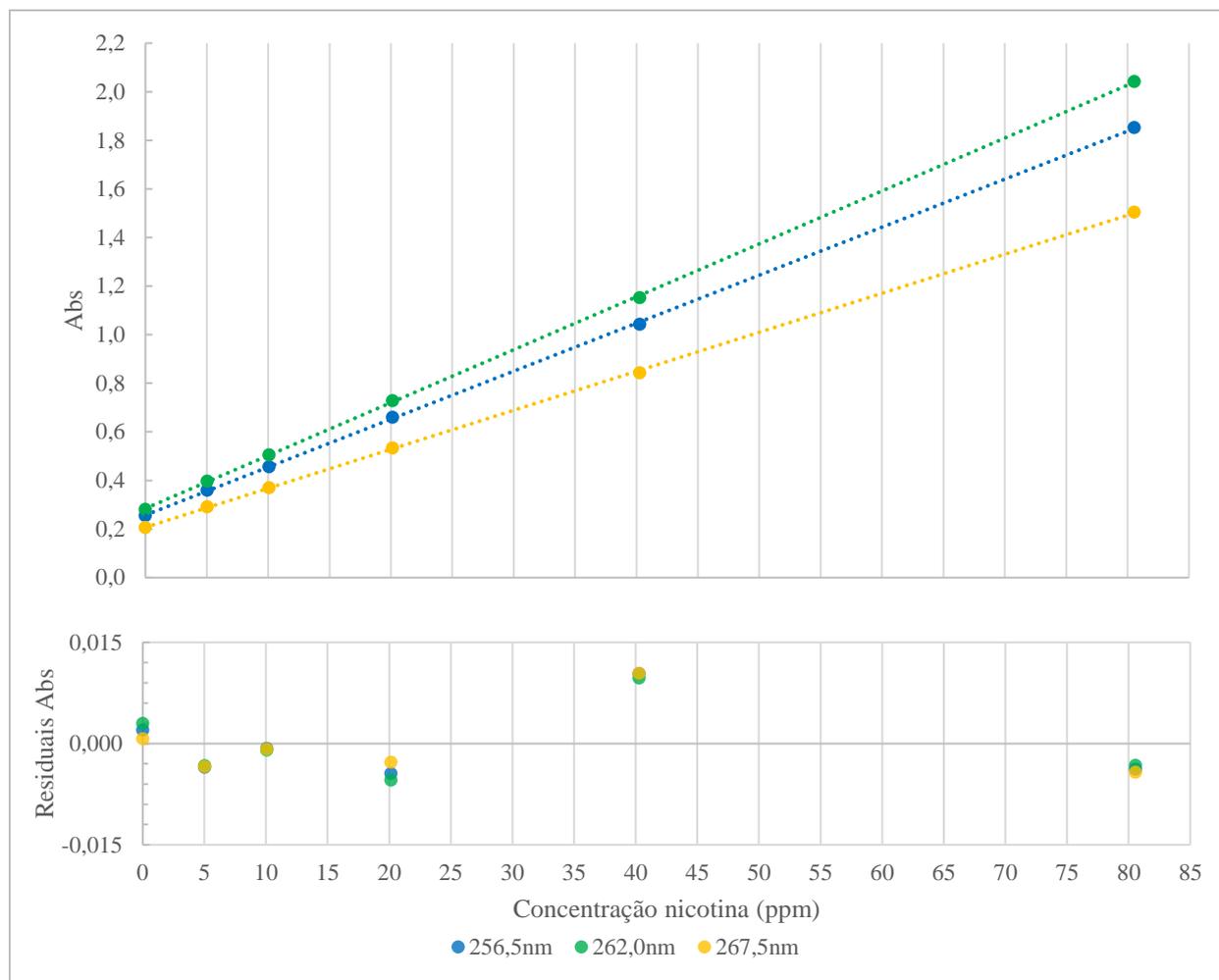


Figura 3.15 – Retas de calibração utilizadas para a quantificação de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicoDIY a 256,5, 262,0 e 267,5 nm. Gama de concentrações entre 5,0 e 80,5 ppm.

Através da aplicação das equações do método mínimos quadrados obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela A22 no Anexo III. Na Tabela 3.16 observam-se os valores do declive, ordenada na origem e respetivos erros associados, coeficiente de determinação, limites e gama dinâmica das retas.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
$m \pm s_{m(t(95\%,N-1))} \text{ (ppm}^{-1}\text{)}$	0,0198±0,0003	0,0218±0,0003	0,0161±0,0003
$b \pm s_{b(t(95\%,N-1))}$	0,257±0,010	0,284±0,010	0,207±0,010
r^2	0,99991	0,99993	0,99988
LD (ppm)	1,0	0,9	1,1
LQ (ppm)	3,2	2,9	3,8
LL (ppm)	81	81	81
GD	25,3	28,2	21,4

Tabela 3.16 – Parâmetros da reta de calibração de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicoDIY.

A confirmação da ausência de *outliers* nas retas foi feita pelo cálculo do intervalo de prognóstico para cada ponto que se apresenta na Tabela 3.17. A análise do IP para cada ponto confirma que todos os pontos exceto 121 e 141 ppm devem fazer parte dos cálculos das equações das retas de quantificação de nicotina no e-líquido NicoDIY. A partir dos dados desta tabela considerou-se também que o limite de linearidade para os três métodos seria a concentração de 81 ppm.

C _{nic} (ppm)	256,5 nm			262,0 nm			267,5 nm		
	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}
0	0,2550	0,2359	0,2781	0,2814	0,2636	0,3053	0,2062	0,1866	0,2272
5,0±0,2	0,3600	0,3361	0,3769	0,3973	0,3739	0,4143	0,2912	0,2681	0,3074
10,1±0,3	0,4567	0,4361	0,4758	0,5047	0,4841	0,5234	0,3694	0,3495	0,3878
20,1±0,5	0,6593	0,6356	0,6741	0,7285	0,7041	0,7421	0,5330	0,5118	0,5488
40±1	1,0424	1,0330	1,0725	1,1520	1,1422	1,1813	0,8432	0,8347	0,8727
81±3	1,8523	1,8218	1,8752	2,0423	2,0127	2,0654	1,5046	1,4747	1,5261
121±4	2,5005	2,6112	2,6773	2,7189	2,8837	2,9491	2,0606	2,1153	2,1789
141±5	2,7884	3,0042	3,0800	2,9825	3,3176	3,3925	2,3378	2,4340	2,5069

Tabela 3.17 – Valores do intervalo de prognóstico das retas de quantificação de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicoDIY aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.

Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Os parâmetros analíticos resultantes das três retas de calibração (apresentados na Tabela 3.16) indicam que a maior sensibilidade e melhor ajuste aos valores experimentais é obtida na análise a de 262,0 nm, uma vez que é a este comprimento de onda em que o declive e o coeficiente de determinação, respetivamente, apresentam os valores mais elevados. Para além disso, a este comprimento de onda verifica-se a maior gama dinâmica, indicando que há um maior intervalo onde os valores de concentração são lineares. Tendo em conta a informação, 262,0 nm parece ser o comprimento de onda mais indicado para se realizar quantificação de nicotina na amostra de NicoDIY.

O cálculo da concentração de analito na amostra no método de adição de padrão é diferente em relação ao método padrão externo, pois é realizado através de extrapolação na reta. Sabe-se que o sinal instrumental vai resultar da soma das absorvências de analito provenientes do volume de solução *stock* e de solução mãe de amostra adicionados em cada padrão. Sabe-se também que a concentração do analito proveniente da solução mãe de amostra é constante em todos os padrões.

$$y=m \cdot x \Leftrightarrow y=m \cdot (C_a+C_p) \Leftrightarrow y=m \cdot C_a+m \cdot C_p$$

Então, sendo a concentração de analito da amostra (C_a) constante, a parcela $m \cdot C_a$ também o vai ser podendo ser igualada à ordenada da origem e assim obtém a equação da reta $y=m \cdot x+b$, em que x é a concentração de analito no padrão (C_p) e $b=m \cdot C_a$.

A concentração de analito na amostra vai ser então calculada através da razão entre a ordenada na origem e o declive da reta de calibração. Na Tabela 3.18 apresentam-se a concentração de nicotina calculada na amostra e no e-líquido NicoDIY com o respetivo erro.

	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
$C_{nic,Am}$ (ppm)	13,0	13,1	12,9
$C_{nic,ND \pm U}$ (g/L)	16,3 \pm 0,6	16,3 \pm 0,6	16,1 \pm 0,7

Tabela 3.18 – Concentração de nicotina em metanol para o e-líquido comercial NicoDIY (ND) pelo método de adição de padrão. Incerteza calculada para 95% com fator de expansão $K=2$.

Na determinação da concentração de nicotina no e-líquido de NicShot pelo método de adição de padrão foi seguido o mesmo procedimento utilizado para o e-líquido NicoDIY. Assim, foi preparado um conjunto de padrões com concentrações entre 5,0 e 141 ppm de nicotina a partir de uma solução *stock* de 503 ppm e a cada padrão adicionou-se 1 mL da solução mãe de amostra de NicShot com diluição 1:50. Na Figura 3.16 pode observar-se as retas de calibração obtidas com este conjunto de padrões, bem como os respetivos gráficos dos residuais.

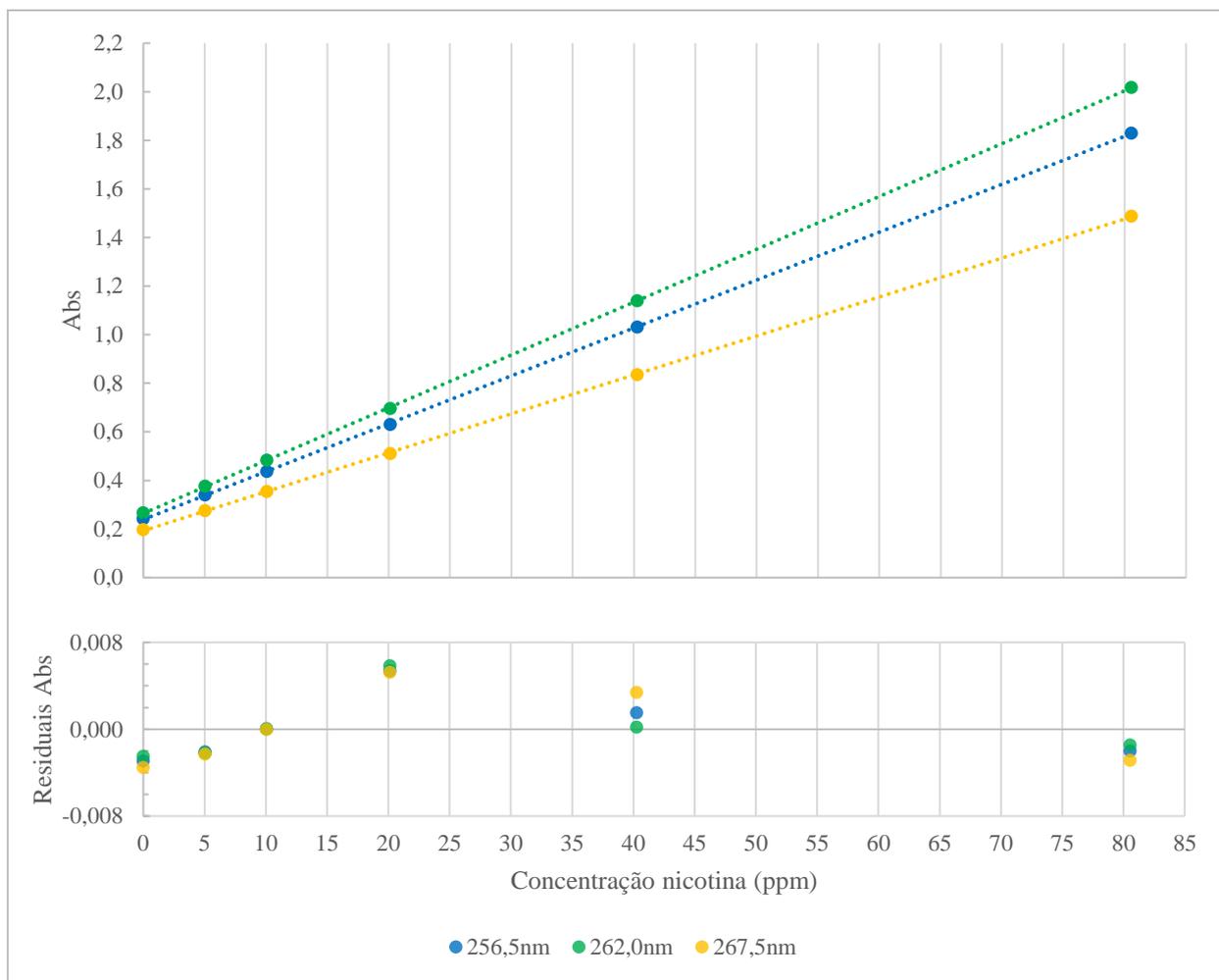


Figura 3.16 – Retas de calibração utilizadas para a quantificação de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicShot a 256,5, 262,0 e 267,5 nm. Gama de concentrações entre 5,0 e 80,5 ppm.

Calcularam-se os parâmetros das retas de calibração através do método dos mínimos quadrados que podem ser consultados na Tabela A25 no Anexo III. Na Tabela 3.19 apresentam-se os valores obtidos para o declive, ordenada na origem e respetivos erros associados, coeficiente de determinação, limites e gama dinâmica. O intervalo de prognóstico para cada ponto das retas é apresentado na Tabela 3.20.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
$m \pm s_{m_{t(95\%,N-1)}} \text{ (ppm}^{-1}\text{)}$	0,0197±0,0002	0,0218±0,0002	0,0160±0,0002
$b \pm s_{b_{t(95\%,N-1)}}$	0,239±0,006	0,264±0,006	0,192±0,007
r^2	0,99997	0,99998	0,99995
LD (ppm)	0,5	0,5	0,8
LQ (ppm)	1,8	1,6	2,5
LL (ppm)	81	81	81
GD	45,7	50,9	32,1

Tabela 3.19 – Parâmetros da reta de calibração de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicShot.

C_{nic} (ppm)	256,5 nm			262,0 nm			267,5 nm		
	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}	Abs	IP _{mín}	IP _{máx}
0	0,2419	0,2273	0,2506	0,2666	0,2526	0,2757	0,1964	0,1794	0,2064
5,0±0,2	0,3403	0,3270	0,3495	0,3758	0,3624	0,3848	0,2759	0,2606	0,2867
10,1±0,3	0,4374	0,4265	0,4485	0,4831	0,4722	0,4940	0,3544	0,3417	0,3671
20,1±0,5	0,6306	0,6254	0,6467	0,6962	0,6915	0,7126	0,5106	0,5035	0,5281
40±1	1,0315	1,0222	1,0440	1,1398	1,1292	1,1508	0,8354	0,8262	0,8514
81±3	1,8292	1,8124	1,8419	2,0173	2,0013	2,0305	1,4876	1,4676	1,5018
121±4	2,4146	2,6030	2,6395	2,6334	2,8737	2,9099	1,9894	2,1095	2,1517
141±5	2,7119	2,9974	3,0392	2,9215	3,3090	3,3505	2,2721	2,4293	2,4778

Tabela 3.20 – Valores do intervalo de prognóstico das retas de quantificação de nicotina em metanol pelo método de adição de padrão numa amostra de NicShot aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm.

Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Os valores do intervalo de prognóstico na Tabela 3.20 indicam que os pontos 121 e 141 ppm são de facto *outliers* e, por isso, justifica a sua não utilização nos cálculos das equações das retas para a quantificação de nicotina no e-líquido NicShot.

Analisando os parâmetros analíticos do método, a reta a 262,0 nm apresenta maior sensibilidade em relação aos outros dois comprimentos de onda, pois é a que apresenta maior declive. A reta obtida para 256,5 nm tem um declive muito próximo indicando que também apresenta uma boa sensibilidade. Em termos de melhor ajuste aos valores experimentais, as três retas apresentam coeficientes de determinação semelhantes e muito próximos a 1, significando que todas têm um bom ajuste, embora a 262,0 nm seja onde se observa o maior coeficiente de determinação. A 256,5 e 262,0 nm verificam-se limites de deteção e de quantificação muito próximos, no entanto a 262,0 observa-se uma gama dinâmica superior.

Tal como se concluiu nos métodos anteriores, a análise a 262,0 nm parece ser a mais adequada para a quantificação de nicotina no e-líquido NicShot.

A concentração de analito na amostra, calculada através da razão entre a ordenada na origem e o declive da reta de calibração, é apresentada na Tabela 3.21 em que pode observar-se a concentração de nicotina calculada na amostra e no e-líquido com o respetivo erro.

	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
C_{nic,Am} (ppm)	12,1	12,1	12,0
C_{nic,NS±U} (g/L)	15,2±0,4	15,2±0,3	15,0±0,5

Tabela 3.21 – Concentração de nicotina em metanol para o e-líquido comercial NicoShot (NS) pelo método de adição de padrão. Incerteza calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Como se verificou no método de padrão externo, também no método de adição de padrão as concentrações de nicotina calculadas nos e-líquidos NicoDIY e NicShot (cerca de 16,3 e 15,2 g/L, respetivamente) são inferiores às apresentadas nos rótulos dos e-líquidos (20 e 18 g/L, respetivamente). Mais uma vez estes valores vão de encontro às conclusões de outros artigos de quantificação de nicotina neste tipo de produtos.^{60,62,76}

3.3. Comparação entre o desempenho dos métodos

A comparação de vários parâmetros dos métodos desenvolvidos no trabalho que permitirá discutir os parâmetros de desempenho dos métodos estão resumidos na Tabela 3.22.

Nesta tabela, para além de parâmetros já calculados anteriormente (sensibilidade, limites, gama dinâmica e percentagem de recuperação), apresenta-se também uma estimativa do desvio padrão da repetibilidade (s_r) de cada método.

Repetibilidade associada a uma análise está relacionada com um protocolo sucessivamente repetido num curto espaço de tempo utilizando o mesmo procedimento, mesmo operador, mesmos instrumentos de medição, mesmas condições e local de preparação e replicados preparados utilizando os mesmos materiais.⁹⁰ Assim, o desvio padrão da repetibilidade refere-se à variabilidade entre resultados de replicados obtidos nestas condições. A repetibilidade de um método pode ser estimada como sendo o desvio padrão do método, determinado pela razão entre o desvio padrão dos residuais e o declive (s_y/m).¹⁰⁴

	Sensibilidade (ppm ⁻¹)	LD (ppm)	LQ (ppm)	LL (ppm)	GD	S _r (ppm)	%Rec
Padrão Externo – Metanol							
256,5 nm	0,0257	1,7	5,8	72	12,6	0,58	107
262,0 nm	0,0284	1,8	5,9	72	12,4	0,59	106
267,5 nm	0,0208	1,6	5,4	72	13,3	0,54	108
Padrão Externo – PGVG em Metanol							
256,5 nm	0,0194	0,4	1,4	81	57,1	0,14	97
262,0 nm	0,0215	0,5	1,5	81	52,5	0,15	97
267,5 nm	0,0157	0,5	1,7	81	47,7	0,17	97
Adição de Padrão – NicoDIY							
256,5 nm	0,0198	1,0	3,2	81	25,3	0,32	X
262,0 nm	0,0218	0,9	2,9	81	28,2	0,29	X
267,5 nm	0,0161	1,1	3,8	81	21,4	0,38	X
Adição de Padrão – NicShot							
256,5 nm	0,0197	0,5	1,8	81	45,7	0,18	X
262,0 nm	0,0218	0,5	1,6	81	50,9	0,16	X
267,5 nm	0,0160	0,8	2,5	81	32,1	0,25	X

Tabela 3.22 – Comparação entre os parâmetros analíticos dos métodos desenvolvidos.

A sensibilidade é semelhante aos três comprimentos de onda estudados, exceto no método de padrão externo em metanol onde é superior. Esta diferença é indicativa da existência de interferências de matriz que afetam a absorção de radiação. Em todos os métodos a sensibilidade é mais elevada a 262,0 nm, como seria de esperar, de acordo com a Lei de Lambert-Beer, por se tratar de um máximo do espectro de absorção de nicotina e, por isso, a análise deve ser feita a este comprimento de onda.

Apesar de apresentar maior sensibilidade em relação aos outros métodos, o método de padrão externo com metanol é o que apresenta limites de detecção e quantificação mais elevados e limite de linearidade mais baixo, resultando em gamas dinâmicas mais estreitas. O método que apresenta os melhores limites de quantificação e, conseqüentemente, as maiores gamas dinâmicas é o padrão externo realizado com a mistura de PGVG e metanol. Com exceção do

método de padrão externo em metanol, todos os métodos apresentam gamas dinâmicas superiores a 262,0 nm, indicando a este comprimento de onda se consegue observar linearidade numa gama de concentrações superior em relação aos outros dois comprimentos de onda em estudo.

Esta observação é consistente com o facto de a 262,0 nm se observar um máximo absoluto enquanto os máximos a 256,5 e 267,5 nm podem surgir como ombros dependendo das condições, como solvente utilizado e concentração da solução, estando sujeitos aos desvios previstos à Lei de Lamber-Beer.¹⁰⁵

A repetibilidade do método, avaliada pelo desvio padrão dos residuais e pelo declive da reta de calibração, será tanto melhor quanto menor for o valor estimado para a razão s_y/m . Assim, o método com melhor repetibilidade é o de método de padrão externo na mistura de PGVG em metanol e o método com pior repetibilidade é o método de padrão externo em metanol.

As concentrações de nicotina nas duas amostras analisadas pelos diferentes métodos são apresentadas na Tabela 3.23.

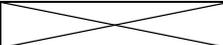
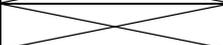
	$C_{nic,ND\pm U}$ (g/L)	$C_{nic,NS\pm U}$ (g/L)
Indicado no rótulo		
	20	18
Padrão Externo – Metanol		
256,5 nm		8,5±0,2
262,0 nm		8,5±0,2
267,5 nm		8,5±0,2
Padrão Externo – PGVG em Metanol		
256,5 nm	15,6±0,3	14,5±0,3
262,0 nm	15,8±0,3	14,7±0,3
267,5 nm	15,2±0,4	14,2±0,4
Adição de Padrão		
256,5 nm	16,3±0,6	15,2±0,4
262,0 nm	16,3±0,6	15,2±0,3
267,5 nm	16,1±0,7	15,0±0,5

Tabela 3.23 – Concentrações de nicotina calculadas a 256,5, 262,0 e 267,5 nm pelos diferentes métodos analíticos. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão $K=2$.

Os valores das concentrações obtidas e as indicadas no rótulo têm uma diferença que varia de 19 a 24 % no caso do NicoDIY e entre 16 e 21 % para o NicShot, excluído o protocolo do padrão externo em solução metanólica. Neste método a diferença entre concentração de nicotina

no NicShot indicada no rótulo e a obtida é bastante elevada, motivo pelo qual, sem uma confirmação do resultado, não será possível retirar qualquer conclusão.

Existe uma interferência de matriz que fica evidente quando se comparam os valores de concentração da nicotina nos e-líquidos comerciais dos métodos. Na Tabela 3.23 é possível observar que as concentrações obtidas no método de padrão externo com PGVG em metanol e no método de adição de padrão apresentam maior concordância entre si em relação aos valores do método de padrão externo em metanol.

Tendo em conta a informação reunida na Tabela 3.22 e 3.23, o método que permite obter melhores resultados é o de adição de padrão, uma vez que apresenta vantagens quanto à sensibilidade e gamas dinâmicas, para além de eliminar o efeito de interferência de matriz que se observou nestas amostras de e-líquidos comerciais.

No entanto, o método de adição de padrão requer que se prepare um conjunto de pelo menos cinco padrões para cada amostra a ser analisada, o que se apresenta como desvantagem. Neste trabalho foram analisados apenas dois e-líquidos, mas no caso de se utilizarem mais amostras de e-líquidos ou se pretenderem fazer análises de rotina este método não seria o mais eficiente em termos de utilização de material e reagentes nem em termos de tempo de análise. Portanto, o mais indicado seria utilizar o método de padrão externo em que o solvente se assemelhe o mais possível com a matriz das misturas para cigarros eletrónicos a analisar (no caso do NicoDIY e o NicShot, propilenoglicol e glicerina vegetal).

3.4. Estabilidade de soluções de nicotina

Realizou-se um estudo de estabilidade com dois padrões de nicotina cujo solvente era a mistura de PGVG a 8 % em metanol para aferir de eventuais alterações no espectro de nicotina ao longo do tempo. O estudo decorreu durante um período de 49 dias e entre leituras a solução *stock*, a partir da qual se prepararam no dia correspondente os padrões a serem analisados, foi guardada num lugar protegido da luz solar e à temperatura ambiente.

Os espectros de absorção das três soluções, a mistura de PGVG a 8 % em metanol e padrões com 10,1 e 40,3 ppm de nicotina, obtidos ao longo deste ensaio estão apresentados na Figura 3.17.

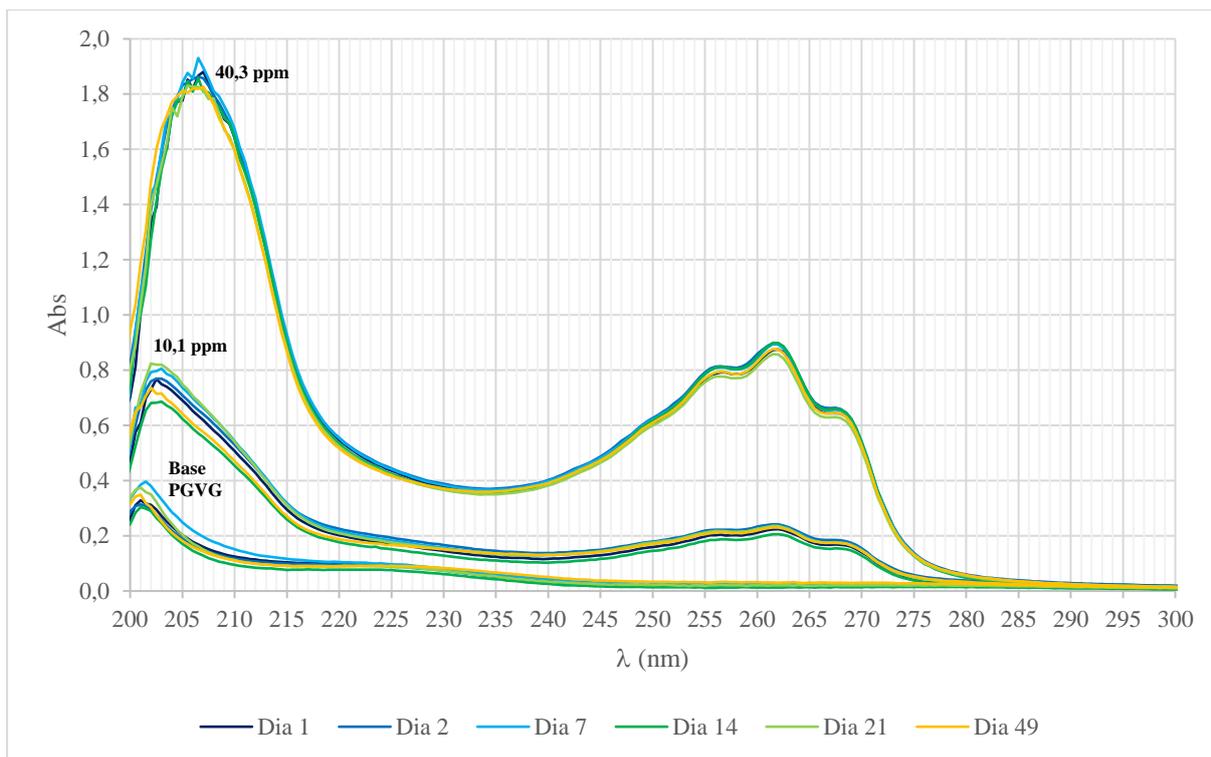


Figura 3.17 – Estudo de estabilidade. Espectros de base PGVG e de soluções de 10,1 e 40,3 ppm de nicotina. Linha de base traçada com metanol.

Os espectros obtidos ao longo do tempo mostram grande estabilidade da solução *stock*, observando-se apenas pequenas variações aleatórias nos espectros das soluções analisadas ao longo dos vários dias que podem ser justificadas por alterações na linha de base, indicando que a estrutura da nicotina não sofreu alterações durante o período em análise.

4. Conclusão e trabalho futuro

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para quantificação de nicotina em misturas para cigarros eletrônicos por espectroscopia de absorção UV-Vis. Este trabalho é relevante na análise e quantificação da nicotina por a técnica proposta ser de fácil utilização, quando comparada com as técnicas descritas na pesquisa bibliográfica realizada, onde só se encontraram artigos focados em técnicas cromatográficas ou em técnicas ainda mais complexas.

A caracterização espectral de nicotina pura e das amostras de e-líquidos comerciais (NicoDIY e NicShot), comprovou a existência de duas regiões com bandas fortes da nicotina e três pontos isobésticos, evidenciando a possibilidade da análise por espectroscopia de absorção. Tendo em conta que na região de 200 e 230 nm, onde se observa a banda mais forte é também a região onde a influência do solvente poderá ser maior, neste trabalho as análises foram feitas na segunda banda observada entre 240 e 280 nm aos comprimentos de onda de 256,5, 262,0 e 267,5 nm. A escolha destes foi feita por se tratar do máximo da banda (262,0 nm) e de dois ombros bem definidos (256,5 e 267,5 nm) resultantes da estrutura vibrónica.

A escolha dos parâmetros espectrofotométricos, tais como os comprimentos de onda de análise, larguras das fendas e saída da radiação ou mesmo o tempo de resposta do equipamento, podem ser alvo de um estudo posterior mais detalhado. Nestes, a utilização dos comprimentos de onda de pontos isobésticos pode ter interesse acrescido uma vez que a nicotina pode ser considerada um ácido fraco poliprótico. Nos pontos isobésticos todas as espécies em solução resultantes de equilíbrios ácido-base, apresentam o mesmo valor de coeficiente de absorvidade, podendo ser aplicada a lei de Lambert-Beer para a determinação da concentração total do analito.

Dentre os solventes estudados, o metanol foi a opção que garantia maior sensibilidade e menor possibilidade de introdução de possíveis interferências nas medidas. No entanto, o metanol é um solvente que apresenta impacto ambiental considerável e, por isso, o estudo de um método que envolva a utilização de um solvente mais amigo do ambiente deve ser um ponto a ter em consideração para trabalho futuro. Em particular, deve explorar-se a escolha de condições experimentais que permitam a utilização de água como solvente para a análise. Os resultados obtidos em meio acidificado em HCl mostraram potencial para desenvolvimento.

A quantificação foi realizada através do método de padrão externo utilizando dois solventes, metanol e uma mistura da base de propilenoglicol e glicerina vegetal em metanol, e ainda do método de adição de padrão.

Nos métodos que foram desenvolvidos foi possível verificar que a sensibilidade não se altera significativamente com o comprimento de onda de análise, pois todas as retas de calibração obtidas apresentam declives semelhantes nos comprimentos de onda estudados. Os limites de linearidade são semelhantes com 72 ppm para o método de padrão externo em metanol e 81 ppm para o método de padrão externo na mistura de PGVG em metanol e para o método de adição de padrão. No entanto, observaram-se limites de detecção e de quantificação mais elevados no método de padrão externo em metanol em relação aos outros dois métodos e, conseqüentemente, gamas dinâmicas menores.

Os ensaios de recuperação resultaram numa percentagem de recuperação próximo de 100 %, numa indicação clara de que não há perdas de analito no processo de análise em nenhum dos métodos desenvolvidos neste trabalho.

Os resultados obtidos na quantificação de nicotina nos e-líquidos comerciais (NicoDIY e NicShot) mostrou que, para os métodos propostos, a concentração de nicotina obtida é inferior ao teor apresentado pelos fabricantes nos rótulos das embalagens, com discrepância muito significativa verificada no método analítico do padrão externo e metanol como solvente. Pelo que este método requer consolidação dos resultados com repetição da análise ou ser adaptado a outras condições experimentais.

A matriz dos líquidos para cigarros eletrônicos é uma interferência na análise, uma vez que o valor obtido para a concentração de nicotina nas amostras é mais consistente quando se diminui o efeito de matriz na análise, ou seja, utilizando um solvente com composição próxima à amostra (a mistura de PGVG em metanol) no método de padrão externo ou utilizando o método de adição de padrão.

Apesar do método analítico da adição de padrão ter revelado uma maior exatidão, tendo em conta o teor de nicotina indicado no rótulo que pode não ser correto, deve ter-se em conta que para cada amostra é necessária uma calibração. Assim, a quantificação da nicotina pelo método de adição de padrão implica um custo muito superior de tempo de análise e de reagentes. Estas desvantagens quando aplicadas a poucas amostras podem não ser significativas, mas para análises de rotina terá decerto um impacto demasiado elevado.

A análise de nicotina nestas amostras também implicou a necessidade de grandes diluições que envolvem erros maiores na incerteza das concentrações dos padrões. Assim, em trabalho futuro seria importante explorar outras condições experimentais ou espectrofotométricas, que permitissem alargar a gama de trabalho até concentrações mais adequadas ao teor de nicotina dos e-líquidos. Por exemplo, a análise aos comprimentos de onda dos pontos isobésticos que

foi inicialmente descartada por conduzir a uma menor sensibilidade, poder ser eventualmente uma boa alternativa.

Na quantificação de nicotina em e-líquidos, a concentração obtida na análise apresentou um valor entre 15,6 e 24 % inferior à indicada no rótulo, confirmando o que já referido em alguma bibliografia consultada.^{60,62,76} Relativamente à informação indicada pelo fabricante, o teor de nicotina na amostra de NicShot (18 g/L) era apresentado no rótulo secundário. Esta situação não se verificou na amostra de NicoDIY, pelo que se conclui que deveria haver uniformização dos dados apresentados pelos fabricantes de misturas para cigarros eletrónicos nos rótulos principais.

Em trabalho futuro, a diversificação das amostras será um ponto importante para confirmar a validade destes métodos de análise relativamente às amostras. Contudo, a utilização de materiais de referência certificados já existentes no mercado¹⁰⁶ seria o teste fundamental para a validação do método de análise para a determinação de nicotina em e-líquidos comerciais.

5. Referências

1. Benowitz, N. Clinical pharmacology of nicotine. *Annu. Rev. Med.* **37**, 21–32 (1986).
2. Organização Mundial de Saúde. *European Tobacco Use: Trends Report 2019*. (2019).
3. Comissão Europeia. *Special Eurobarometer 458: Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes*. (2017).
4. Feliu, A., Filippidis, F. T., Joossens, L., Fong, G. T., Vardavas, C. I., Baena, A., Castellano, Y., Martínez, C. & Fernández, E. Impact of tobacco control policies on smoking prevalence and quit ratios in 27 European Union countries from 2006 to 2014. *Tob. Control* **28**, 101–109 (2019).
5. Instituto Nacional de Estatística. *Inquérito Nacional de Saúde 2014*. (2016).
6. Direção-Geral da Saúde. *Programa Nacional para a Prevenção e Cessação do Tabagismo 2012-2016*. (2013).
7. Direção-Geral da Saúde. *Circular Normativa: Programa-tipo de actuação em cessação tabágica*. (2007).
8. Organização Mundial de Saúde. *WHO framework convention on tobacco control*. (2003).
9. Comissão Europeia. *Special Eurobarometer 506: Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes*. (2021).
10. Direção-Geral da Saúde. Algoritmo do tratamento farmacológico do tabagismo. <https://www.dgs.pt/programa-nacional-para-a-prevencao-e-controlo-do-tabagismo/material-de-informacao/monofolha-algoritmo-do-tratamento-farmacologico-do-tabagismo.aspx> (Consultado a 10 de maio de 2020).
11. Infarmed. Medicamentos para tratamento da dependência de drogas: Nicotina. *Prontuário Farmacêutico* <http://app10.infarmed.pt/prontuario/framepesactivos.php?palavra=nicotina&rb1=1&x=6&y=12> (Consultado a 1 de maio de 2020).
12. Agência Europeia do Medicamento. Resumo das Características do Medicamento Champix 0,5mg. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/champix-epar-product-information_pt.pdf (Consultado a 11 de maio de 2020).
13. Mendes, A. P. Cessação Tabágica I: Terapêutica Farmacológica. *Boletim do Centro de Informação do Medicamento* (2019).

14. Agência Europeia do Medicamento. Resumo das Características do Medicamento: Zyban 150 mg. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/opinion-following-article-36-referral-bupropion-hydrochloride-international-non-proprietary-name-inn_pt.pdf (Consultado a 11 de maio de 2020).
15. Russel, M. A. H. The future of nicotine replacement. *Br. J. Addict.* **86**, 653–658 (1991).
16. McNeill, A., Brose, L., Calder, R., Bauld, L. & Robson, D. Evidence review of e-cigarettes and heated tobacco products 2018. A report commissioned by Public Health England. *Public Heal. Engl.* 1–243 (2018).
17. Kaisar, M. A., Prasad, S., Liles, T. & Cucullo, L. A Decade of e-Cigarettes: Limited Research & Unresolved Safety Concerns. *Toxicology* **365**, 67–75 (2016).
18. Aicher, B. O. & Frishman, W. H. Electronic cigarettes. *Cardiol. Rev.* **24**, 261–267 (2016).
19. Institute for Global Tobacco Control. Country Laws Regulating E-Cigarettes: Portugal. <https://www.globaltobaccocontrol.org/e-cigarette/portugal> (Consultado a 14 de maio de 2020).
20. Wang, M., Ho, S., Leung, L. & Lam, T. Electronic Cigarette Use and Respiratory Symptoms in Chinese Adolescents in Hong Kong. *JAMA Pediatr.* **170**, 89–91 (2016).
21. McConnell, R., Barrington-Trimis, J. L., Wang, K., Urman, R., Hong, H., Unger, J., Samet, J., Leventhal, A. & Berhane, K. Electronic Cigarette Use and Respiratory Symptoms in Adolescents. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 1043–1049 (2017).
22. Cho, J. H. & Paik, S. Y. Association between Electronic Cigarette Use and Asthma among High School Students in South Korea. *PLoS One* **11**, (2016).
23. Schweitzer, R., Wills, T., Tam, E., Pagano, I. & Choi, K. E-cigarette use and asthma in a multiethnic sample of adolescents. *Prev. Med. (Baltim.)* **105**, (2017).
24. Layden, J., Ghinai, I., Pray, I., Kimball, A., Layer, M., Tenforde, M., Navon, L., Hoots, B., Salvatore, P. P., Elderbrook, M., *et al.* Pulmonary Illness Related to E-Cigarette Use in Illinois and Wisconsin - Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* **382**, 903–916 (2020).
25. Hammond, D. Outbreak of pulmonary diseases linked to vaping. *BMJ* **366**, 15445 (2019).
26. Bekki, K., Uchiyama, S., Ohta, K., Inaba, Y. & Nakagome, H. Carbonyl Compounds Generated from Electronic Cigarettes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **11**, 11192–11200 (2014).
27. Wang, G., Liu, W. & Song, W. Toxicity assessment of electronic cigarettes. *Inhal. Toxicol.* **31**, 259–273 (2019).

28. Doolittle, D. J., Winegar, R., Lee, J. K., Caldwell, W. S., Wallace, A., Hayes, J. & Bethozy, J. D. The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat. Res.* **344**, 95–102 (1995).
29. Gorrod, J. W. & Jacob III, P. *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites*. (Elsevier, 1999).
30. Armstrong, D. W., Wang, X. & Ercal, N. Enantiomeric composition of nicotine in smokeless tobacco, medicinal products, and commercial reagents. *Chirality* **10**, 587–591 (1998).
31. Benowitz, N., Hukkanen, J. & Jacob III, P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb. Exp. Pharmacol.* **192**, 29–60 (2009).
32. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E. & Hutchison, G. R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* **4**, (2012).
33. Duell, A. K., Pankow, J. F. & Peyton, D. H. Nicotine in tobacco product aerosols: «It's déjà vu all over again». *Tob. Control* **29**, 656–662 (2019).
34. Yildiz, D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* **43**, 619–632 (2004).
35. Murphy, S. E. Nicotine metabolism and smoking: Ethnic differences in the role of P450 2A6. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 410–419 (2016).
36. Nakajima, M., Kuroiwa, Y. & Yokoi, T. Interindividual differences in nicotine metabolism and genetic polymorphisms of human CYP2A6. *Drug Metab. Rev.* **34**, 865–877 (2002).
37. Raunio, H., Rautio, A., Gullstén, H. & Pelkonen, O. Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **52**, 357–363 (2001).
38. Picciotto, M. R., Caldarone, B. J., King, S. L. & Zachariou, V. Nicotinic receptors in the brain: Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology* **22**, 451–465 (2000).
39. Wonnacott, S. The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 216–219 (1990).
40. Cryer, P., Haymond, M., Santiago, J. & Shah, S. Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic mediation of smoking-associated hemodynamic and metabolic events. *N. Engl. J. Med.* **295**, 573–577 (1976).
41. McGehee, D. S. & Role, L. W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 521–546 (1995).

42. Brown, E. N. Can Nicotine Treat COVID-19? French Researchers Think So. <https://reason.com/2020/04/24/can-nicotine-treat-covid-19-french-researchers-think-so/> (Consultado a 30 de abril de 2020).
43. Goga, F. French researchers suggest nicotine could protect against coronavirus. <http://www.rfi.fr/en/science-and-technology/20200423-french-researchers-suggest-nicotine-could-protect-against-covid-19> (Consultado a 1 de maio de 2020).
44. Gaubert, C. Covid-19: la nicotine pourrait avoir un rôle protecteur, une étude est lancée. https://www.sciencesetavenir.fr/sante/tabac-et-covid-19-la-nicotine-pourrait-avoir-un-role-protecteur_143710 (Consultado a 30 de abril de 2020).
45. Organização Mundial de Saúde. Tobacco and waterpipe use increases the risk of suffering from COVID-19. <http://www.emro.who.int/tfi/know-the-truth/tobacco-and-waterpipe-users-are-at-increased-risk-of-covid-19-infection.html> (Consultado a 1 de maio de 2020).
46. Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S. C., *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 1–13 (2020).
47. Berlin, I., Thomas, D., Faou, A. Le & Cornuz, J. COVID-19 and Smoking. *Nicotine Tob. Res.* 1–3 (2020).
48. Vardavas, C. I. & Nikitara, K. COVID-19 and smoking: A systematic review of the evidence. *Tob. Induc. Dis.* **18**, 1–4 (2020).
49. Benowitz, N., Porchet, H., Sheiner, L., Jacob III, P. & Francisco, S. Nicotine absorption and cardiovascular effects with smokeless tobacco use: Comparison with cigarettes and nicotine gum. *Clin. Pharmacol. Ther.* **44**, 23–28 (1988).
50. Gori, G., Benowitz, N. & Lynch, C. Mouth versus deep airways absorption of nicotine in cigarette smokers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **25**, 1181–1184 (1986).
51. Armitage, A., Dollery, C., Houseman, T., Kohner, E., Lewis, P. & Turner, D. Absorption of nicotine from small cigars. *Clin. Pharmacol. Ther.* **23**, 143–151 (1978).
52. Benowitz, N. Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: implications in understanding nicotine dependence. *NIDA Res. Monogr.* **99**, 12–29 (1990).
53. Henningfield, J., Stapleton, J., Benowitz, N., Grayson, R. & London, E. Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend.* **33**, 23–29 (1993).

54. West, R., Hajek, P., Foulds, J., Nilsson, F., May, S. & Meadows, A. A comparison of the abuse liability and dependence potential of nicotine patch, gum, spray and inhaler. *Psychopharmacol.* **149**, 198–202 (2000).
55. Fant, R., Henningfield, J., Shiffman, S., Strahs, K. & Reiberg, D. A pharmacokinetic crossover study to compare the absorption characteristics of three transdermal nicotine patches. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **67**, 479–482 (2000).
56. Benowitz, N., Jacob III, P. & Savanapridi, C. Determinants of nicotine intake while chewing nicotine polacrilex gum. *Clin. Pharmacol. Ther.* **41**, 467–473 (1987).
57. Gourlay, S. & Benowitz, N. Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray, and intravenous nicotine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **62**, 453–463 (1997).
58. Guthrie, S., Zubieta, J., Ohl, L., Ni, L., Koeppe, R., Minoshima, S. & Domino, E. Arterial/ venous plasma nicotine concentrations following nicotine nasal spray. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **55**, 639–643 (1999).
59. Hariharan, M., Vannoord, T. & Greden, J. F. A High-Performance Liquid-Chromatographic Method for Routine Simultaneous Determination of Nicotine and Cotinine in Plasma. *Clin. Chem.* **34**, 724–729 (1988).
60. Ogunwale, M. A., Chen, Y., Theis, W. S., Nantz, M. H., Conklin, D. J. & Fu, X.-A. A novel method of nicotine quantification in electronic cigarette liquids and aerosol. *Anal. Methods* **9**, 4261–4266 (2017).
61. Dobrinas, M., Choong, E., Noetzli, M., Cornuz, J., Ansermot, N. & Eap, C. B. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine and varenicline in human plasma by a sensitive and specific UPLC-tandem mass-spectrometry procedure for a clinical study on smoking cessation. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**, 3574–3582 (2011).
62. Dai, J., Kim, K. H., Szulejko, J. E., Jo, S. H., Kwon, K. & Choi, D. W. Quantification of nicotine and major solvents in retail electronic cigarette fluids and vaped aerosols. *Microchem. J.* **140**, 262–268 (2018).
63. Stanfill, S. B., Jia, L. T., Ashley, D. L. & Watson, C. H. Rapid and chemically selective nicotine quantification in smokeless tobacco products using GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **47**, 902–909 (2009).
64. Østergaard, J., Meng-Lund, E., Larsen, S. W., Larsen, C., Petersson, K., Lenke, J. & Jensen, H. Real-time UV imaging of nicotine release from transdermal patch. *Pharm. Res.* **27**, 2614–2623 (2010).

65. Piller, M., Gilch, G., Scherer, G. & Scherer, M. Simple, fast and sensitive LC-MS/MS analysis for the simultaneous quantification of nicotine and 10 of its major metabolites. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **951–952**, 7–15 (2014).
66. Man, C. N., Gam, L. H., Ismail, S., Lajis, R. & Awang, R. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **844**, 322–327 (2006).
67. Moyer, T. P., Charlson, J. R., Enger, R. J., Dale, L. C., Ebbert, J. O., Schroeder, D. R. & Hurt, R. D. Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles. *Clin. Chem.* **48**, 1460–1471 (2002).
68. Alharbi, O., Xu, Y. & Goodacre, R. Simultaneous multiplexed quantification of nicotine and its metabolites using surface enhanced Raman scattering. *Analyst* **139**, 4820–4827 (2014).
69. Omara, H. & Attaf, S. Spectrophotometric Determination of Nicotine in Cigarette Tobacco and Biological Samples of Smokers. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**, 1–14 (2014).
70. Estrada, J. & Pumachagua, R. Cigarette Nicotine Determination Applying the Second Derived Technique. *Rev. La Soc. Química Del Perú* **2**, 94–103 (2007).
71. Duell, A. K., Pankow, J. F. & Peyton, D. H. Free-Base Nicotine Determination in Electronic Cigarette Liquids by ¹H NMR Spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **31**, 431–434 (2018).
72. Tassew, Z. & Chandravanshi, B. S. Levels of nicotine in Ethiopian tobacco leaves. *Springerplus* **4**, 1–6 (2015).
73. Wei, X. N., Liu, Y. & Tang, Y. L. Nicotine content of tobacco leaf estimated by UV spectrum. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **185**, (2018).
74. Adamson, J., Li, X., Cui, H., Thorne, D., Xie, F. & Gaca, M. D. Nicotine Quantification In Vitro : A Consistent Dosimetry Marker for e-Cigarette Aerosol and Cigarette Smoke Generation. *Appl. Vit. Toxicol.* **3**, 14–27 (2017).
75. Figueiredo, E. C., de Oliveira, D. M., de Siqueira, M. E. P. B. & Arruda, M. A. Z. On-line molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers. *Anal. Chim. Acta* **635**, 102–107 (2009).
76. El-Hellani, A., El-Hage, R., Baalbaki, R., Talih, S., Shihadeh, A. & Saliba, N. Quantification of free-base and protonated nicotine in electronic cigarette liquids and

- aerosol emissions. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 1532–1537 (2015).
77. Gray, T. R., Shakleya, D. M. & Huestis, M. A. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, nornicotine and norcotinine in human meconium by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **863**, 107–114 (2008).
78. RELACRE. *Guia RELACRE 1 - Calibração de Material Volumétrico*. (1995).
79. Occupational Safety and Health Administration. Hazard Communication Standard: Safety Data Sheets. <https://www.osha.gov/sites/default/files/publications/OSHA3514.pdf> (Consultado a 3 de novembro de 2020).
80. Thermo Fisher. *(S)-(-)-Nicotina: Ficha de Dados de Segurança*. (2012).
81. Honeywell. *Metanol: Ficha de Dados de Segurança*. (2016).
82. Thermo Fisher. *Propilenoglicol: Ficha de Dados de Segurança*. (2018).
83. Thermo Fisher. *Ácido clorídrico: Ficha de Dados de Segurança*. (2018).
84. Thermo Fisher. *Hidróxido de potássio: Ficha de Dados de Segurança*. (2018).
85. Filho, D., Nunes, F., Rocha, E. da, Santos, M., Batista, M. & Silva, J. O que fazer e o que não fazer com a regressão: pressupostos e aplicações do modelo linear de mínimos quadrados ordinários (MQO). *Rev. Política Hoje* **20**, 44–99 (2011).
86. Pimentel, M. & Neto, B. Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. *Química Nova* vol. 19 268–277 (1996).
87. Danzer, K. & CURRIE, L. Guidelines For Calibration in Analytical Chemistry. *Pure Appl. Chem.* **70**, 993–1014 (1998).
88. Kennedy, P. *A Guide to Econometrics*. (John Wiley & Sons, 2008).
89. Lewis-Beck, C. & Lewis-Beck, M. *Applied Regression: An Introduction*. (SAGE Publications, 2015).
90. Wenclawiak, B. W., Koch, M. & Hadjicostas, E. *Quality Assurance in Analytical Chemistry. Journal of Chemical Information and Modeling* vol. 53 (Springer, 2010).
91. Kwak, S. K. & Kim, J. H. Statistical data preparation: management of missing values and outliers. *Korean J. Anesthesiol.* **70**, 407–411 (2017).
92. Miller, J. N. Tutorial Review Outliers in Experimental Data and Their Treatment. *Analyst* **118**, 455–461 (1993).
93. RELACRE. *Guia RELACRE 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. (2000).

94. Analytical Methods Committee. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst* **112**, 199–204 (1987).
95. Brito, N., Amarante, O., Polese, L. & Ribeiro, M. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pestic. Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambient.* **13**, 129–146 (2003).
96. Association of Official Analytical Chemists. *Peer Verified Methods Policies and Procedures Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods fo Tracelevel concentrations of Organic Chemicals.* Association of Official Analytical Chemists International (1998).
97. Green, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Anal. Chem. News Featur.* 305–309 (1996).
98. National Center for Biotechnology Information. PubChem Annotation Record for Nicotine. *Hazardous Substances Data Bank* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/1107> (Consultado a 15 de maio de 2019).
99. Swinehart, D. F. The Beer-Lambert law. *J. Chem. Educ.* **39**, 333–335 (1962).
100. Wentworth, W. E. Dependence of the Beer-Lambert absorption law on monochromatic radiation. *J. Chem. Educ.* **43**, 262–264 (1966).
101. Clayton, P. M., Vas, C. A., Bui, T. T. T., Drake, A. F. & McAdam, K. Spectroscopic studies on nicotine and nornicotine in the UV region. *Chirality* **25**, 288–293 (2013).
102. Ettre, L. S. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure Appl. Chem.* **65**, 819–872 (1993).
103. Ostroukhova, O. K. & Zenkevich, I. G. A comparison of the external standard and standard addition methods for the quantitative chromatographic determination of pesticide concentrations in plant samples. *J. Anal. Chem.* **61**, 442–451 (2006).
104. International Organization of Standardization. *International Standard ISO 8488-1 «Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods of the linear calibration function».* (1990).
105. Skoog, D. A., Holler, F. J., West, D. M. & Crouch, S. R. *Fundamentals of Analytical Chemistry.* (Thomson Brooks Cole, 2004).
106. Quigley, J. LGC announces the release of a new certified reference material: Electronic Cigarette Liquid - Nicotine and Water. <https://www.lgcgroup.com/newsroom-and-blog/news-and-blog/lgc-announces-the-release-of-a-new-certified-reference-material-electronic-cigarette-liquid-nicotine-and-water/> (Consultado a 2 de março de 2021).

Anexos

I. Introdução

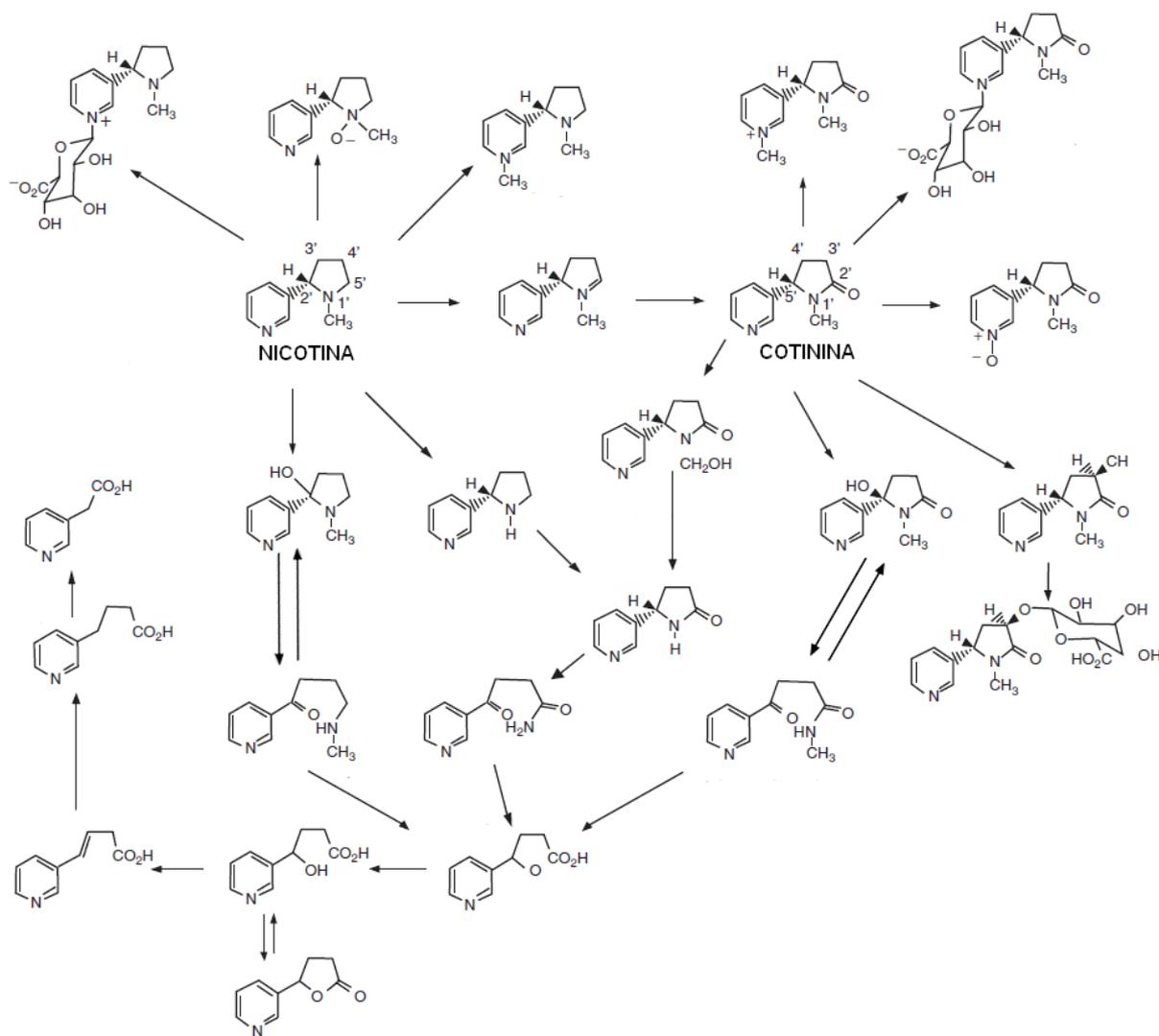


Figura A1 – Vias de metabolização da nicotina e principais metabolitos (adaptada).³¹

II. Parte Experimental

Micropipeta (V _{medido} , mL)	Massa (g)	V ₂₀ (mL)	Média V ₂₀ (mL)	(V-V _{médio}) ²	S _{massa}	E _{absoluto}	E _{relativo} (%)	S _{Volume}	CV (%)
P200 (0,050)	0,0502	0,0503	0,0501	$6,28 \times 10^{-8}$	0,0002	0,0003	0,5005	0,0002	0,4848
	0,0496	0,0497		$1,23 \times 10^{-7}$		-0,0004	0,7007		
	0,0500	0,0501		$2,51 \times 10^{-9}$		0,0001	0,1001		
	0,0501	0,0502		$2,26 \times 10^{-8}$		0,0002	0,3003		
	0,0504	0,0505		$2,04 \times 10^{-7}$		0,0005	0,9009		
	0,0500	0,0501		$2,51 \times 10^{-9}$		0,0001	0,1001		
	0,0497	0,0498		$6,28 \times 10^{-8}$		-0,0003	0,5005		
	0,0499	0,0500		$2,51 \times 10^{-9}$		-0,0001	0,1001		
	0,0498	0,0499		$2,26 \times 10^{-8}$		-0,0002	0,3003		
	0,0498	0,0499		$2,26 \times 10^{-8}$		-0,0002	0,3003		
P200 (0,100)	0,0999	0,1002	0,1003	$1,01 \times 10^{-8}$	0,0002	-0,0001	0,1000	0,0002	0,1891
	0,0997	0,1000		$9,05 \times 10^{-8}$		-0,0003	0,3000		
	0,1002	0,1005		$4,02 \times 10^{-8}$		0,0002	0,2000		
	0,1000	0,1003		0		0,0000	0,0000		
	0,0999	0,1002		$1,01 \times 10^{-8}$		-0,0001	0,1000		
	0,0998	0,1001		$4,02 \times 10^{-8}$		-0,0002	0,2000		
	0,1000	0,1003		0		0,0000	0,0000		
	0,1003	0,1006		$9,05 \times 10^{-8}$		0,0003	0,3000		
	0,1000	0,1003		0		0,0000	0,0000		
	0,1002	0,1005		$4,02 \times 10^{-8}$		0,0002	0,2000		
P1000 (0,250)	0,2512	0,2519	0,2519	$4,02 \times 10^{-10}$	0,0003	0,0000	0,0080	0,0003	0,1231
	0,2515	0,2522		$7,88 \times 10^{-8}$		0,0003	0,1115		
	0,2515	0,2522		$7,88 \times 10^{-8}$		0,0003	0,1115		
	0,2516	0,2523		$1,45 \times 10^{-7}$		0,0004	0,1513		
	0,2515	0,2522		$7,88 \times 10^{-8}$		0,0003	0,1115		
	0,2511	0,2518		$1,45 \times 10^{-8}$		-0,0001	0,0478		
	0,2506	0,2513		$3,86 \times 10^{-7}$		-0,0006	0,2468		
	0,2511	0,2518		$1,45 \times 10^{-8}$		-0,0001	0,0478		
	0,2510	0,2517		$4,87 \times 10^{-8}$		-0,0002	0,0876		
	0,2511	0,2518		$1,45 \times 10^{-8}$		-0,0001	0,0478		
P1000 (0,500)	0,5002	0,5015	0,5014	$2,57 \times 10^{-8}$	0,0003	0,0002	0,0320	0,0003	0,0561
	0,5004	0,5017		$1,30 \times 10^{-7}$		0,0004	0,0720		
	0,4999	0,5012		$1,97 \times 10^{-8}$		-0,0001	0,0280		
	0,5000	0,5013		$1,61 \times 10^{-9}$		0,0000	0,0080		
	0,5000	0,5013		$1,61 \times 10^{-9}$		0,0000	0,0080		
	0,5005	0,5018		$2,13 \times 10^{-7}$		0,0005	0,0920		
	0,5000	0,5013		$1,61 \times 10^{-9}$		0,0000	0,0080		
	0,5001	0,5014		$3,62 \times 10^{-9}$		0,0001	0,0120		
	0,4996	0,5009		$1,95 \times 10^{-7}$		-0,0004	0,0880		
	0,4997	0,5010		$1,16 \times 10^{-7}$		-0,0003	0,0680		

P1000 (1,000)	0,9980	1,0007	1,0008	$1,45 \times 10^{-8}$	0,0010	-0,0001	0,0120	0,0010	0,1036
	0,9994	1,0021		$1,65 \times 10^{-6}$		0,0013	0,1282		
	0,9997	1,0024		$2,51 \times 10^{-6}$		0,0016	0,1583		
	0,9969	0,9996		$1,50 \times 10^{-6}$		-0,0012	0,1222		
	0,9969	0,9996		$1,50 \times 10^{-6}$		-0,0012	0,1222		
	0,9978	1,0005		$1,03 \times 10^{-7}$		-0,0003	0,0321		
	0,9972	0,9999		$8,51 \times 10^{-7}$		-0,0009	0,0922		
	0,9982	1,0009		$6,43 \times 10^{-9}$		0,0001	0,0080		
	0,9978	1,0005		$1,03 \times 10^{-7}$		-0,0003	0,0321		
	0,9993	1,0020		$1,40 \times 10^{-6}$		0,0012	0,1182		
P5000 (2,000)	2,0137	2,0191	2,0212	$4,52 \times 10^{-6}$	0,0022	-0,0021	0,1052	0,0022	0,1093
	2,0157	2,0211		$1,45 \times 10^{-8}$		-0,0001	0,0060		
	2,0141	2,0195		$2,97 \times 10^{-6}$		-0,0017	0,0853		
	2,0195	2,0249		$1,36 \times 10^{-5}$		0,0037	0,1826		
	2,0134	2,0188		$5,89 \times 10^{-6}$		-0,0024	0,1201		
	2,0157	2,0211		$1,45 \times 10^{-8}$		-0,0001	0,0060		
	2,0150	2,0204		$6,76 \times 10^{-7}$		-0,0008	0,0407		
	2,0188	2,0242		$8,93 \times 10^{-6}$		0,0030	0,1478		
	2,0143	2,0197		$2,32 \times 10^{-6}$		-0,0015	0,0754		
	2,0180	2,0234		$4,78 \times 10^{-6}$		0,0022	0,1081		
P5000 (3,000)	3,0089	3,0169	3,0133	$1,29 \times 10^{-5}$	0,0033	0,0036	0,1191	0,0033	0,1099
	3,0000	3,0080		$2,85 \times 10^{-5}$		-0,0053	0,1770		
	3,0076	3,0156		$5,23 \times 10^{-6}$		0,0023	0,0759		
	3,0052	3,0132		$1,45 \times 10^{-8}$		-0,0001	0,0040		
	3,0061	3,0141		$6,12 \times 10^{-7}$		0,0008	0,0260		
	3,0004	3,0084		$2,43 \times 10^{-5}$		-0,0049	0,1637		
	3,0049	3,0129		$1,77 \times 10^{-7}$		-0,0004	0,0140		
	3,0083	3,0163		$8,93 \times 10^{-6}$		0,0030	0,0992		
	3,0030	3,0110		$5,41 \times 10^{-6}$		-0,0023	0,0772		
	3,0088	3,0168		$1,22 \times 10^{-5}$		0,0035	0,1158		
P5000 (5,000)	5,0147	5,0281	5,0277	$1,69 \times 10^{-7}$	0,0016	0,0004	0,0082	0,0016	0,0315
	5,0155	5,0289		$1,47 \times 10^{-6}$		0,0012	0,0241		
	5,0123	5,0257		$3,98 \times 10^{-6}$		-0,0020	0,0397		
	5,0149	5,0283		$3,74 \times 10^{-7}$		0,0006	0,0122		
	5,0155	5,0289		$1,47 \times 10^{-6}$		0,0012	0,0241		
	5,0126	5,0260		$2,87 \times 10^{-6}$		-0,0017	0,0337		
	5,0137	5,0271		$3,50 \times 10^{-7}$		-0,0006	0,0118		
	5,0140	5,0274		$8,45 \times 10^{-8}$		-0,0003	0,0058		
	5,0172	5,0306		$8,51 \times 10^{-6}$		0,0029	0,0580		
	5,0125	5,0259		$3,22 \times 10^{-6}$		-0,0018	0,0357		

Tabela A1 – Dados relativos à calibração das micropipetas P200, P1000 e P5000.

$u_{\text{pipeta}} \text{ ou } u_{\text{balão}} = \frac{\text{tolerância}}{\sqrt{3}}$		Equação 6
$u(C_p) = C_p \times \sqrt{\sum \left(\frac{u}{\text{Volume}} \right)^2}$	Equação 7	$U = K \times u(C_p)$
		Equação 8

Tabela A2 – Equações para cálculo de propagação de erros de Gauss.

Solução	V _{pipeta} (mL)	V _{balão} (mL)	C _{nic} ± U(C _{nic}) (ppm)
Stock	0,0288	100,0	290±5
P1	0,100	25,00	1,16±0,03
P2	0,250	25,00	2,9±0,1
P3	0,500	25,00	5,8±0,2
P4	0,750	25,00	8,7±0,2
P5	1,000	25,00	11,6±0,4
P6	1,500	25,00	17,4±0,5
P7	2,000	25,00	23,2±0,5
P8	5,000	50,00	29,0±0,6
P9	5,000	25,00	58±2
P10	7,00	25,00	81±2
P11	8,00	25,00	93±2
P12	10,00	25,00	116±3
P13	25,00	25,00	145±3

Tabela A3 – Preparação das soluções para as curvas de calibração de nicotina pelo método de padrão externo em metanol. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Solução	V _{pipeta} (mL)	V _{balão} (mL)	C _{nic} ± U(C _{nic}) (ppm)
Stock	0,0144	100,0	145±3
P1	0,200	25,00	1,16±0,04
P2	0,500	25,00	2,9±0,6
P3	1,000	25,00	5,8±0,2
P4	1,500	25,00	8,7±0,2
P5	2,000	25,00	11,6±0,3
P6	3,000	25,00	17,4±0,4
P7	4,000	25,00	23,2±0,5
P8	10,00	50,00	29,0±0,6
P9	11,00	50,00	31,9±0,6
P10	20,00	50,00	58±2
P11	25,00	50,00	72±2

Tabela A4 – Preparação das soluções para as retas de quantificação de nicotina pelo método de padrão externo em metanol. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Solução	V_{pipeta} (mL)	V_{balão} (mL)	C_{nic} ± U(C_{nic}) (ppm)
Stock	0,1000	100,0	1007±12
P1	0,250	25,00	10,1±0,3
P2	0,500	25,00	20,1±0,3
P3	1,000	25,00	40,3±0,6
P4	2,000	25,00	81±2
P5	3,000	25,00	121±2
P6	4,000	25,00	161±3
P7	5,000	25,00	201±3
P8	6,000	25,00	242±3
P9	7,00	25,00	282±4
P10	8,00	25,00	322±4
P11	10,00	25,00	403±5
P12	11,00	25,00	443±6
P13	15,00	25,00	604±7
P14	20,00	25,00	805±10

Tabela A5 – Preparação das soluções para as curvas de calibração de nicotina pelo método de padrão externo em mistura de PGVG a 8 % em metanol. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Solução	V_{pipeta} (mL)	V_{balão} (mL)	C_{nic} ± U(C_{nic}) (ppm)
Stock	0,0500	100,0	503±10
P1	0,250	25,00	5,0±0,2
P2	0,500	25,00	10,1±0,3
P3	1,000	25,00	20,1±0,5
P4	2,000	25,00	40,3±0,9
P5	4,000	25,00	81±2
P6	6,000	25,00	121±3
P7	7,00	25,00	141±3

Tabela A6 – Preparação das soluções para as retas de quantificação de nicotina pelo método de padrão externo em mistura de PGVG a 8 % em metanol. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Solução	V _{pipeta} (mL)	V _{solução mãe} (mL)	V _{balão} (mL)	C _{nic} ± U(C _{nic}) (ppm)
Stock	0,1000	1,000	100,0	1007±12
P0	0	1,000	25,00	0
P1	0,250		25,00	10,1±0,3
P2	0,500		25,00	20,1±0,3
P3	1,000		25,00	40,3±0,6
P4	2,000		25,00	81±2
P5	3,000		25,00	121±2
P6	4,000		25,00	161±3
P7	5,000		25,00	201±3
P8	6,000		25,00	242±3
P9	7,00		25,00	282±4
P10	8,00		25,00	322±4
P11	10,00		25,00	403±5
P12	15,00		25,00	604±7
P13	20,00		25,00	805±10

Tabela A7 – Preparação das soluções para as curvas de calibração de nicotina pelo método de adição de padrão em metanol. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Solução	V _{pipeta} (mL)	V _{solução mãe} (mL)	V _{balão} (mL)	C _{nic} ± U(C _{nic}) (ppm)
Stock	0,0500	1,000	100,0	503±10
P0	0	1,000	25,00	0
P1	0,250		25,00	5,0±0,2
P2	0,500		25,00	10,1±0,3
P3	1,000		25,00	20,1±0,5
P4	2,000		25,00	40±1
P5	4,000		25,00	81±3
P6	6,000		25,00	121±4
P7	7,00		25,00	141±5

Tabela A8 – Preparação das soluções para as retas de quantificação de nicotina pelo método de adição de padrão em metanol. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

$S_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$	Equação 9	$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$	Equação 14
$S_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$	Equação 10	$s_y = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 \cdot S_{xx}}{N-2}}$	Equação 15
$S_{xy} = \sum x_i y_i - \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{N}$	Equação 11	$s_m = \frac{s_y}{\sqrt{S_{xx}}}$	Equação 16
$m = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$	Equação 12	$s_b = s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{N - \frac{(\sum x_i)^2}{\sum x_i^2}}}$	Equação 17
$b = \bar{y} - m \cdot \bar{x}$	Equação 13	$s_c = \frac{s_y}{m} \cdot \sqrt{\frac{1}{L} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y}_p)^2}{m^2 \cdot S_{xx}}}$	Equação 18

Tabela A9 – Equações para aplicação do método dos mínimos quadrados.

III. Resultados e Discussão

Solução	C _{nic}	Leituras Abs $\lambda=256,5$ nm			Leituras Abs $\lambda=262,0$ nm			Leituras Abs $\lambda=267,5$ nm		
P0	0	0,000	0,000	-0,002	0,000	0,000	-0,002	0,000	0,000	-0,002
P1	1,16	0,021	0,019	0,019	0,023	0,022	0,022	0,019	0,017	0,018
P2	2,9	0,053	0,053	0,055	0,059	0,059	0,061	0,045	0,044	0,046
P3	5,8	0,111	0,111	0,114	0,123	0,122	0,126	0,091	0,091	0,094
P4	8,7	0,169	0,168	0,171	0,186	0,185	0,189	0,138	0,137	0,140
P5	11,6	0,225	0,226	0,226	0,249	0,249	0,249	0,184	0,185	0,184
P6	17,4	0,319	0,323	0,323	0,353	0,356	0,356	0,259	0,263	0,263
P7	23,2	0,461	0,464	0,468	0,509	0,512	0,516	0,374	0,378	0,382
P8	29,0	0,579	0,575	0,578	0,640	0,635	0,638	0,470	0,466	0,469
P9	58	1,175	1,175	1,173	1,299	1,298	1,296	0,951	0,950	0,948
P10	81	1,565	1,571	1,572	1,729	1,736	1,736	1,269	1,275	1,277
P11	93	1,783	1,787	1,783	1,970	1,973	1,970	1,448	1,451	1,448
P12	116	2,216	2,216	2,219	2,432	2,432	2,439	1,809	1,808	1,813
P13	145	2,678	2,683	2,693	2,898	2,903	2,912	2,226	2,228	2,240

Tabela A10 – Concentrações e leituras em triplicado das absorvências a 256,5, 262,0 e 267,5 nm das soluções para as curvas de calibração de nicotina pelo método de padrão externo em metanol.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
N	10	10	14
t _(95%,n-2)	2,306	2,306	2,179
S _{xx}	2810,1849	2810,1849	29881,6736
S _{yy}	1,1551	1,4096	7,1972
S _{xy}	56,9570	62,9196	463,6457
s _y	0,0092	0,0103	0,0164
m (ppm ⁻¹)	0,02027	0,02239	0,01552
s _m (ppm ⁻¹)	0,00017	0,00019	0,00009
s _m 95%	0,00040	0,00045	0,00021
b	-0,00798	-0,00885	0,00732
s _b	0,00399	0,00449	0,00594
s _b 95%	0,00191	0,01034	0,01294
r	0,99971	0,99970	0,99978
r ²	0,99942	0,99939	0,99955
LD (ppm)	1,4	1,4	3,2
LQ (ppm)	4,5	4,6	10,6
LL (ppm)	58	58	116
GD	12,8	12,6	11,0

Tabela A11 – Parâmetros das curvas de calibração de nicotina pelo método de padrão externo em metanol.

Solução	C _{nic}	Leituras Abs $\lambda=256,5$ nm			Leituras Abs $\lambda=262,0$ nm			Leituras Abs $\lambda=267,5$ nm		
P0	0	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
P1	1,16	0,030	0,029	0,029	0,032	0,031	0,031	0,023	0,023	0,022
P2	2,9	0,076	0,076	0,076	0,083	0,083	0,083	0,061	0,060	0,061
P3	5,8	0,156	0,157	0,157	0,172	0,173	0,172	0,125	0,126	0,126
P4	8,7	0,212	0,212	0,212	0,233	0,233	0,233	0,170	0,170	0,170
P5	11,6	0,308	0,310	0,312	0,340	0,341	0,344	0,247	0,249	0,252
P6	17,4	0,482	0,482	0,482	0,532	0,532	0,532	0,388	0,388	0,388
P7	23,2	0,625	0,628	0,627	0,691	0,694	0,693	0,503	0,506	0,506
P8	29,0	0,764	0,762	0,766	0,843	0,841	0,845	0,616	0,614	0,617
P9	31,9	0,833	0,833	0,833	0,921	0,920	0,920	0,671	0,671	0,671
P10	58	1,494	1,492	1,493	1,651	1,649	1,650	1,207	1,205	1,206
P11	72	1,858	1,854	1,857	2,051	2,048	2,050	1,504	1,502	1,504
Am1		1,351	1,353	1,355	1,492	1,495	1,498	1,090	1,093	1,095
Am2		1,424	1,428	1,425	1,573	1,576	1,573	1,151	1,155	1,152
Am3		1,428	1,426	1,428	1,577	1,576	1,577	1,155	1,153	1,154
Am4		1,429	1,432	1,428	1,573	1,582	1,578	1,155	1,157	1,155
Am5		1,426	1,430	1,424	1,576	1,580	1,573	1,154	1,157	1,151
Rec1		2,030	2,033	2,031	2,235	2,242	2,234	1,648	1,651	1,648
Rec2		2,031	2,057	2,055	2,236	2,261	2,260	1,649	1,671	1,671
Rec3		1,259	2,120	2,139	1,388	2,330	2,354	1,012	1,725	1,744
Rec4		2,068	2,064	2,066	2,276	2,274	2,272	1,681	1,677	1,678

Tabela A12 – Concentrações e leituras em triplicado das absorvências a 256,5, 262,0 e 267,5 nm das soluções para as retas de quantificação de nicotina pelo método de padrão externo em metanol.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
N	12		
t _(95%,n-2)	2,228		
L	5		
t _(95%,n-1)	2,776		
S _{xx}	5844,8546	5844,8546	5844,8546
S _{yy}	3,8518	4,7038	2,5233
S _{xy}	150,0021	165,7608	121,4120
s _y	0,0148	0,0166	0,0113
m (ppm ⁻¹)	0,02566	0,02836	0,02077
s _m (ppm ⁻¹)	0,00019	0,00022	0,00015
s _m 95%	0,00043	0,00048	0,00033
b	0,00934	0,00958	0,00605
s _b	0,00599	0,00674	0,00459
s _b 95%	0,01336	0,01502	0,01022
r	0,99972	0,99971	0,99975
r ²	0,99943	0,99941	0,99949
LD (ppm)	1,7	1,8	1,6
LQ (ppm)	5,8	5,9	5,4
LL (ppm)	72	72	72
GD	12,6	12,4	13,3

Tabela A13 – Parâmetros das retas de quantificação de nicotina pelo método de padrão externo em metanol.

	Replicado	Abs	Camostra (ppm)	SC (ppm)	Csolução mãe (ppm)	C _{E-líquido} (g/L)	Média C _{E-líquido} (g/L)	U(C _{E-líquido}) (g/L)
256,5 nm	A1	1,353	52,356	0,393	654,451	8,181	8,543	0,128
	A2	1,426	55,188		689,844	8,623		
	A3	1,427	55,252		690,656	8,633		
	A4	1,430	55,343		691,792	8,647		
	A5	1,427	55,226		690,331	8,629		
262,0 nm	A1	1,495	52,377	0,400	654,713	8,184	8,542	0,130
	A2	1,574	55,163		689,533	8,619		
	A3	1,577	55,257		690,709	8,634		
	A4	1,578	55,292		691,150	8,639		
	A5	1,576	55,245		690,562	8,632		
267,5 nm	A1	1,093	52,311	0,372	653,882	8,174	8,543	0,121
	A2	1,153	55,199		689,987	8,625		
	A3	1,154	55,263		690,789	8,635		
	A4	1,156	55,343		691,792	8,647		
	A5	1,154	55,263		690,789	8,635		

Tabela A14 – Cálculo de concentração de nicotina nas amostras de NicShot pelo método de padrão externo em metanol. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

	Replicado	Abs	Camostra fortificada (ppm)	Mamostra fortificada (mg)	mamostra (mg)	mstock (mg)	%Rec	Média %Rec
256,5 nm	Rec1	2,031	78,79	1,97	1,37	0,58	104,0	106,8
	Rec2	2,048	79,42	1,99	1,37	0,58	106,7	
	Rec3*	1,839	71,31	1,78	1,37	0,58	71,7*	
	Rec4	2,066	80,14	2,00	1,37	0,58	109,8	
262,0 nm	Rec1	2,237	78,5	1,96	1,37	0,58	102,9	105,6
	Rec2	2,252	79,1	1,98	1,37	0,58	105,2	
	Rec3*	2,024	71,0	1,78	1,37	0,58	70,5*	
	Rec4	2,274	79,8	2,00	1,37	0,58	108,5	
267,5 nm	Rec1	1,649	79,1	1,98	1,37	0,58	105,3	108,3
	Rec2	1,664	79,8	1,99	1,37	0,58	108,3	
	Rec3*	1,494	71,6	1,79	1,37	0,58	73,0*	
	Rec4	1,679	80,5	2,01	1,37	0,58	111,4	

Tabela A15 – Cálculo da percentagem de recuperação nas amostras fortificadas pelo método de padrão externo em metanol.

*Valor não incluído no cálculo da média de %Rec.

Solução	C _{nic}	Leituras Abs $\lambda=256,5$ nm			Leituras Abs $\lambda=262,0$ nm			Leituras Abs $\lambda=267,5$ nm		
P0	0	-0,008	-0,009	-0,143	-0,008	-0,009	-0,014	-0,008	-0,009	-0,014
P1	10,1	0,148	0,146	0,151	0,166	0,164	0,169	0,118	0,116	0,120
P2	20,1	0,340	0,331	0,336	0,377	0,369	0,373	0,273	0,265	0,270
P3	40,3	0,695	0,694	0,688	0,771	0,768	0,763	0,562	0,561	0,556
P4	81	1,419	1,433	1,429	1,575	1,589	1,583	1,147	1,161	1,157
P5	121	2,183	2,180	2,163	2,401	2,401	2,382	1,786	1,782	1,766
P6	161	2,723	2,724	2,718	2,913	2,928	2,940	2,270	2,278	2,281
P7	201	3,048	3,055	3,060	3,199	3,213	3,212	2,697	2,697	2,706
P8	242	3,178	3,178	3,175	3,273	3,302	3,258	2,936	2,933	2,922
P9	282	3,235	3,246	3,258	3,300	3,333	3,297	3,064	3,078	3,078
P10	322	3,273	3,237	3,218	3,313	3,311	3,320	3,124	3,122	3,121
P11	403	3,277	3,253	3,284	3,359	3,335	3,348	3,167	3,164	3,185
P12	443	3,330	3,338	3,282	3,377	3,386	3,355	3,208	3,195	3,186
P13	604	3,303	3,284	3,281	3,406	3,416	3,402	3,234	3,234	3,244
P14	805	3,331	3,325	3,334	3,439	3,414	3,452	3,279	3,288	3,282

Tabela A16 – Concentrações e leituras em triplicado das absorvências a 256,5, 262,0 e 267,5 nm das soluções para as curvas de calibração de nicotina pelo método de padrão externo na mistura de PGVG a 8 % em metanol.

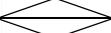
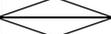
Solução	C _{nic}	Leituras Abs $\lambda=256,5$ nm			Leituras Abs $\lambda=262,0$ nm			Leituras Abs $\lambda=267,5$ nm		
P0	0	0,002	-0,003	0,005	0,002	-0,003	0,004	0,001	-0,003	0,004
P1	5,0	0,120	0,090	0,079	0,127	0,098	0,088	0,102	0,074	0,064
P2	10,1	0,192	0,187	0,194	0,211	0,206	0,213	0,155	0,150	0,158
P3	20,1	0,387	0,393	0,376	0,427	0,432	0,415	0,315	0,320	0,303
P4	40,3	0,781	0,779	0,778	0,863	0,862	0,860	0,632	0,631	0,629
P5	81	1,568	1,565	1,553	1,733	1,730	1,719	1,272	1,270	1,260
P6	121	2,155	2,178	2,182	2,379	2,394	2,398	1,768	1,782	1,790
P7	141	2,502	2,490	2,515	2,731	2,710	2,738	2,076	2,062	2,091
ND1		0,228	0,232	0,236	0,255	0,259	0,263	0,180	0,183	0,187
ND2		0,246	0,245	0,249	0,273	0,274	0,277	0,194	0,195	0,198
ND3		0,237	0,248	0,239	0,266	0,276	0,267	0,187	0,197	0,189
NS1		0,231	0,219	0,218	0,257	0,245	0,244	0,184	0,173	0,172
NS2		0,216	0,219	0,219	0,242	0,245	0,244	0,170	0,173	0,173
NS3		0,226	0,226	0,233	0,252	0,251	0,259	0,179	0,179	0,186
Rec1		0,969	0,967	0,967	1,075	1,073	1,073	0,781	0,779	0,779
Rec2		0,961	0,963	0,968	1,066	1,067	1,073	0,774	0,775	0,781
Rec3		0,985	0,992	0,993	1,093	1,100	1,100	0,793	0,799	0,800
Rec4		0,996	1,006	1,001	1,106	1,115	1,110	0,801	0,811	0,806
Rec5		1,015	1,019	1,017	1,126	1,130	1,128	0,817	0,821	0,819
Rec6		1,011	1,011	1,012	1,122	1,122	1,123	0,814	0,814	0,815

Tabela A17 – Concentrações e leituras em triplicado das absorvências a 256,5, 262,0 e 267,5 nm das soluções para as retas de quantificação de nicotina pelo método de padrão externo na mistura de PGVG a 8 % em metanol.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
N	6		
t(95%,n-2)	2,776		
L	3		
t(95%,n-1)	4,303		
S _{xx}	4582,7988	4582,7988	4582,7988
S _{yy}	1,7264	2,1142	1,1353
S _{xy}	88,9472	98,4322	72,1287
s _y	0,0027	0,0033	0,0027
m (ppm ⁻¹)	0,01941	0,02148	0,01574
s _m (ppm ⁻¹)	0,00004	0,00005	0,00004
s _m 95%	0,00011	0,00014	0,00011
b	-0,00232	-0,00379	-0,00188
s _b	0,00153	0,00185	0,00149
s _b 95%	0,00426	0,00513	0,00414
r	0,99999	0,99999	0,99999
r ²	0,99998	0,99998	0,99998
LD (ppm)	0,4	0,5	0,5
LQ (ppm)	1,4	1,5	1,7
LL (ppm)	81	81	81
GD	57,1	52,5	47,7

Tabela A18 – Parâmetros das retas de quantificação de nicotina pelo método de padrão externo na mistura de PGVG a 8 % em metanol.

	Replicado	Abs	Camostra (ppm)	sc (ppm)	C _{solução mãe} (ppm)	C _{E-líquido} (g/L)	Média C _{E-líquido} (g/L)	U(C _{E-líquido}) (g/L)
256,5 nm	ND1	0,232	12,071	0,104	301,779	15,089	15,603	0,265
	ND2	0,246	12,818		320,456	16,023		
	ND3	0,241	12,557		313,930	15,697		
	NS1	0,223	11,602	0,104	290,058	14,503	14,511	0,265
	NS2	0,218	11,346		283,661	14,183		
	NS3	0,228	11,879		296,971	14,849		
262,0 nm	ND1	0,259	12,232	0,113	305,793	15,290	15,801	0,287
	ND2	0,274	12,955		323,873	16,194		
	ND3	0,270	12,735		318,364	15,918		
	NS1	0,249	11,751	0,113	293,766	14,688	14,697	0,288
	NS2	0,244	11,521		288,024	14,401		
	NS3	0,254	12,002		300,051	15,003		
267,5 nm	ND1	0,183	11,757	0,124	293,929	14,696	15,225	0,315
	ND2	0,196	12,543		313,572	15,679		
	ND3	0,191	12,240		306,000	15,300		
	NS1	0,176	11,310	0,125	282,757	14,138	14,149	0,316
	NS2	0,172	11,033		275,821	13,791		
	NS3	0,181	11,615		290,381	14,519		

Tabela A19 – Cálculo de concentração nicotina nas amostras de NicoDIY e NicShot pelo método de padrão externo na mistura de PGVG a 8 % em metanol. Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

	Replicado	Abs	Camostra fortificada (ppm)	mamostra fortificada (mg)	mamostra (mg)	mstock (mg)	%Rec	Média %Rec	Desvio padrão (%)
256,5 nm	Rec1	0,968	49,97	1,25	0,29	1,01	95,3	97,3	1,9
	Rec2	0,964	49,77	1,24	0,29	1,01	94,8		
	Rec3	0,990	51,13	1,28	0,29	1,01	98,1		
	Rec4	1,001	51,69	1,29	0,31	1,01	97,4		
	Rec5	1,017	52,52	1,31	0,31	1,01	99,4		
	Rec6	1,011	52,22	1,31	0,31	1,01	98,7		
262,0 nm	Rec1	1,074	50,16	1,25	0,29	1,01	95,4	97,3	1,9
	Rec2	1,069	49,93	1,25	0,29	1,01	94,8		
	Rec3	1,097	51,27	1,28	0,29	1,01	98,1		
	Rec4	1,110	51,86	1,30	0,32	1,01	97,4		
	Rec5	1,128	52,68	1,32	0,32	1,01	99,4		
	Rec6	1,122	52,42	1,31	0,32	1,01	98,8		
267,5 nm	Rec1	0,780	49,66	1,24	0,28	1,01	95,2	97,1	1,9
	Rec2	0,776	49,44	1,24	0,28	1,01	94,7		
	Rec3	0,798	50,80	1,27	0,28	1,01	98,0		
	Rec4	0,806	51,31	1,28	0,30	1,01	97,2		
	Rec5	0,819	52,15	1,30	0,30	1,01	99,3		
	Rec6	0,814	51,86	1,30	0,30	1,01	98,5		

Tabela A20 – Cálculo da percentagem de recuperação e respetivo desvio padrão nas amostras fortificadas pelo método de padrão externo na mistura de PGVG a 8 % em metanol.

Solução	C _{nic}	Leituras Abs $\lambda=256,5$ nm			Leituras Abs $\lambda=262,0$ nm			Leituras Abs $\lambda=267,5$ nm		
P0	0	0,241	0,241	0,241	0,266	0,266	0,266	0,194	0,195	0,195
P1	10,1	0,406	0,407	0,406	0,448	0,449	0,449	0,328	0,329	0,328
P2	20,1	0,594	0,596	0,595	0,656	0,658	0,658	0,480	0,482	0,482
P3	40,3	0,956	0,955	0,955	1,057	1,056	1,054	0,774	0,773	0,773
P4	81	1,669	1,667	1,666	1,843	1,839	1,838	1,355	1,353	1,352
P5	121	2,372	2,373	2,371	2,595	2,595	2,592	1,950	1,949	1,949
P6	161	2,890	2,896	2,890	3,056	3,073	3,065	2,478	2,480	2,479
P7	201	3,140	3,131	3,123	3,232	3,252	3,229	2,838	2,839	2,842
P8	242	3,191	3,205	3,194	3,284	3,249	3,292	3,009	3,013	3,017
P9	282	3,230	3,224	3,250	3,284	3,297	3,304	3,096	3,108	3,102
P10	322	3,237	3,248	3,253	3,294	3,314	3,311	3,148	3,155	3,149
P11	403	3,262	3,261	3,248	3,344	3,335	3,317	3,189	3,189	3,187
P12	604	3,286	3,321	3,284	3,381	3,359	3,374	3,245	3,252	3,257
P13	805	3,333	3,326	3,324	3,374	3,364	3,418	3,288	3,303	3,293

Tabela A21 – Concentrações e leituras em triplicado das absorvências a 256,5, 262,0 e 267,5 nm das soluções para as curvas de calibração de nicotina pelo método adição de padrão em metanol.

Solução	C _{nic}	Leituras Abs $\lambda=256,5$ nm			Leituras Abs $\lambda=262,0$ nm			Leituras Abs $\lambda=267,5$ nm		
P0	0	0,254	0,256	0,255	0,281	0,282	0,282	0,206	0,207	0,206
P1	5,0	0,360	0,360	0,360	0,398	0,397	0,397	0,291	0,291	0,291
P2	10,1	0,457	0,457	0,456	0,505	0,505	0,504	0,370	0,370	0,369
P3	20,1	0,660	0,660	0,658	0,729	0,729	0,728	0,533	0,533	0,533
P4	40	1,042	1,042	1,043	1,152	1,152	1,152	0,843	0,844	0,843
P5	81	1,852	1,854	1,852	2,040	2,044	2,042	1,504	1,506	1,504
P6	121	2,503	2,499	2,500	2,723	2,714	2,720	2,058	2,061	2,063
P7	141	2,789	2,788	2,788	2,976	2,994	2,978	2,338	2,338	2,338

Tabela A22 – Concentrações e leituras em triplicado das absorvências a 256,5, 262,0 e 267,5 nm das soluções para as retas de quantificação de nicotina em NicoDIY pelo método adição de padrão em metanol.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
N	6		
t(95%,n-2)	2,776		
t(95%,n-1)	2,571		
S _{xx}	4582,7988	4582,7988	4582,7988
S _{yy}	1,7893	2,1749	1,1819
S _{xy}	90,5489	99,8328	73,5932
s _y	0,0063	0,0062	0,0061
m (ppm ⁻¹)	0,01976	0,02178	0,01606
s _m (ppm ⁻¹)	0,00009	0,00009	0,00009
s _m 95%	0,00026	0,00026	0,00025
b	0,25702	0,28442	0,20693
s _b	0,00353	0,00349	0,00339
s _b 95%	0,00979	0,00968	0,00942
r	0,99996	0,99996	0,99994
r ²	0,99991	0,99993	0,99988
LD (ppm)	1,0	0,9	1,1
LQ (ppm)	3,2	2,9	3,8
LL (ppm)	81	81	81
GD	25,3	28,2	21,4

Tabela A23 – Parâmetros das retas de quantificação de nicotina em NicoDIY pelo método de adição de padrão em metanol.

	C _{amostra} (ppm)	S _c (ppm)	C _{solução} mãe (ppm)	C _{E-líquido} (g/L)	U(C _{E-líquido}) (g/L)
256,5 nm	13,008	0,225	325,197	16,260	0,565
262,0 nm	13,056	0,202	326,405	16,320	0,508
267,5 nm	12,886	0,266	322,142	16,107	0,667

Tabela A24 – Cálculo de concentração de nicotina em NicoDIY pelo método adição de padrão em metanol.

Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.

Solução	C _{nic}	Leituras Abs $\lambda=256,5$ nm			Leituras Abs $\lambda=262,0$ nm			Leituras Abs $\lambda=267,5$ nm		
		P0	0	0,240	0,242	0,243	0,265	0,267	0,268	0,195
P1	5,0	0,340	0,340	0,341	0,375	0,376	0,376	0,275	0,276	0,276
P2	10,1	0,437	0,438	0,437	0,483	0,484	0,482	0,354	0,355	0,354
P3	20,1	0,630	0,632	0,630	0,695	0,698	0,696	0,510	0,512	0,510
P4	40	1,030	1,033	1,032	1,138	1,141	1,140	0,833	0,837	0,836
P5	81	1,828	1,831	1,829	2,014	2,020	2,018	1,486	1,489	1,488
P6	121	2,412	2,418	2,414	2,634	2,629	2,637	1,988	1,990	1,989
P7	141	2,707	2,720	2,709	2,917	2,926	2,922	2,272	2,274	2,271

Tabela A25 – Concentrações e leituras em triplicado das absorvências a 256,5, 262,0 e 267,5 nm das soluções para as retas de quantificação de nicotina em NicShot pelo método adição de padrão em metanol.

Parâmetro	256,5 nm	262,0 nm	267,5 nm
N	6		
t(95%,n-2)	2,776		
t(95%,n-1)	2,571		
S _{xx}	4582,7988	4582,7988	4582,7988
S _{yy}	1,7818	2,1677	1,1788
S _{xy}	90,3622	99,6695	73,4991
s _y	0,0035	0,0034	0,0040
m (ppm ⁻¹)	0,01972	0,02175	0,01604
s _m (ppm ⁻¹)	0,00005	0,00005	0,00006
s _m 95%	0,00014	0,00014	0,00016
b	0,23898	0,26412	0,19289
s _b	0,00195	0,00193	0,00225
s _b 95%	0,00541	0,00536	0,00626
r	0,99999	0,99999	0,99997
r ²	0,99997	0,99998	0,99995
LD (ppm)	0,5	0,5	0,8
LQ (ppm)	1,8	1,6	2,5
LL (ppm)	81	81	81
GD	45,7	50,9	32,1

Tabela A26 – Parâmetros das retas de quantificação de nicotina em NicShot pelo método de adição de padrão em metanol.

	C _{amostra} (ppm)	S _c (ppm)	C _{solução} mãe (ppm)	C _{E-líquido} (g/L)	U(C _{E-líquido}) (g/L)
256,5 nm	12,120	0,123	303,003	15,150	0,311
262,0 nm	12,144	0,110	303,610	15,181	0,281
267,5 nm	12,027	0,174	300,681	15,034	0,439

Tabela A27 – Cálculos de concentração de nicotina em NicShot pelo método adição de padrão em metanol.

Incerteza da concentração calculada para 95% com fator de expansão K=2.