

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
TOXICOLÓGICOS EM AMOSTRAS DE SANGUE DE
DOADORES FUMANTES E EFEITO DA NICOTINA *in*
vitro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Valério B. Melo da Silva

Santa Maria, RS, Brasil
2006

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS EM
AMOSTRAS DE SANGUE DE DOADORES FUMANTES E
EFEITO DA NICOTINA *in vitro***

por

Valério B. Melo da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS EM
AMOSTRAS DE SANGUE DE DOADORES FUMANTES E EFEITO DA
NICOTINA *in vitro***

elaborada por
Valério B. Melo da Silva

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Maria Ester Pereira - Orientadora, Prof^a. Dr^a. - UFSM
(Presidente/Orientadora)

Rodrigo Bainya Leal, Prof. Dr. – UFSC

Cristina Wayne Nogueira, Prof^a. Dr^a. – UFSM

Santa Maria, 31 de outubro de 2006.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS EM AMOSTRAS DE SANGUE DE DOADORES FUMANTES E EFEITOS DA NICOTINA *in vitro*

AUTOR: VALÉRIO B. MELO DA SILVA
ORIENTADORA: MARIA ESTER PEREIRA
Santa Maria, 31 de outubro de 2006.

Os serviços de Hemoterapia no Brasil são regulados de acordo com a RDC-153/2004. Em geral, os fumantes apresentam HT e níveis de Hb dentro dos valores de referência para a doação de sangue. Considerando que os valores de referência estão em uma faixa muito ampla, este trabalho estudou a qualidade do sangue utilizada para a doação em relação a alguns parâmetros hematológicos e em relação à atividade das enzimas sanguíneas, PBG-sintase e colinesterase. Além disto, também se investigou a sensibilidade destas enzimas à nicotina *in vitro*. Este estudo pode ajudar a esclarecer o possível uso destas enzimas como biomarcadores a este agente desde que as mesmas são sensíveis a compostos oxidantes e inseticidas, respectivamente. Para os experimentos *in vivo*, trinta amostras de sangue foram divididas em três grupos de acordo com o hábito de fumar dos doadores: NF - não fumante, F10 – fumante de 10±5 cigarros/dia e F20 - fumante de 20 ou mais cigarros/dia. Para os experimentos *in vitro*, somente as amostras de doadores não fumantes foram usadas. Os resultados demonstraram que os níveis de HT e de Hb do grupo F20 foram significativamente mais elevados do que os dos outros grupos. Os níveis de COHb foram significativamente mais elevados em ambos os grupos de fumantes (F10 e F20) do que no grupo controle (NF). Com relação à PBG-sintase e a colinesterase, o hábito de fumar não alterou suas atividades. O grupo F20 apresentou uma pequena diminuição na atividade de PBG-sintase e no índice de reativação. A atividade da colinesterase do grupo F20 foi mais elevada (18%) do que a dos outros grupos, mas não significativamente. Os resultados *in vitro* demonstraram que para a PBG-sintase, somente as concentrações maiores que 10 mM foram capazes de inibir sua atividade, e o mecanismo envolvido nesta inibição parece não estar relacionado a efeitos oxidantes, uma vez que o DTT não recuperou a atividade. A AChE sanguínea foi mais sensível a nicotina que a colinesterase plasmática, uma vez que as IC₅₀ para suas atividades foram 3 e 22 mM de nicotina, respectivamente. Tomando os resultados em conjunto, verificou-se que estas enzimas apresentam baixa sensibilidade ao tabagismo e a nicotina. Entretanto, é necessário considerar que todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos com concentrações saturantes de substrato, o que não é uma condição fisiológica normal. Este fato é importante principalmente com relação a AChE de sangue, desde que a inibição por nicotina envolve um componente competitivo; assim, a inibição endógena pode ocorrer mesmo sem ser aparente nos testes *in vitro*. Estes resultados sugerem que mais atenção deve ser dispensada quanto à qualidade do sangue utilizado nos serviços hemoterapia no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Parâmetros hematológicos; Colinesterases; Porfobilinogênio sintase; Tabagismo; Hemoterapia; Nicotina.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

HEMATOLOGIC AND TOXICOLOGIC PARAMETERS IN BLOOD SAMPLES OF SMOKER DONATORS AND EFFECTS OF NICOTINE *IN VITRO*

AUTHOR: VALÉRIO B. MELO DA SILVA

ADVISOR: MARIA ESTER PEREIRA
Santa Maria, 31 de outubro de 2006.

Hemotherapy services in the Brazil are regulated according to the RDC-153. In general, smokers presented HT and Hb levels inside of the reference values to blood donations. Considering that reference values are in ample zone, this work studied the quality of blood utilized to donation in relations to hematologic parameters and two blood enzyme activities, PBG-synthase and cholinesterase. Besides, we also investigated the sensitivity of these enzymes to nicotine *in vitro*. These experiments may be explanatory as regard possible use of these enzymes as biomarkers to this agent since they are sensitive to oxidant and insecticides compounds respectively. For *in vivo* experiments, thirty blood samples were divided in three groups according to smoke habit from donators: NF - non smoker, F10 - smoker of 10±5 cigarettes/day and F20 - smoker of 20 or more cigarettes/day. For *in vitro*, only samples from not smoker donators were used. The results demonstrated that HT and Hb levels in the F20 group were significantly higher than others. The COHb levels were significantly higher in the both smoker groups, F10 and F20, than control group (NF). In relation to PBG-synthase and cholinesterase, smoke habit did not alter their activities. The F20 group presented a short decrease in PBG-synthase activity and in reactivation index. The cholinesterase activity from F20 group was higher (18%) than other groups, but not significantly. The *in vitro* results demonstrated that to PBG-synthase, only concentrations higher than 10 mM were able to inhibit the its activity, and the mechanism involved in these inhibition seems to be not related to oxidative effects since the DTT was not able to recover the activity. Total blood AChE is much more sensitive to nicotine than the plasma ChE, since the IC₅₀ for these activities were 3 and 22 mM of nicotine, respectively. Taking as a whole, these results show the low sensitivity of these enzymes to smoke and to nicotine. However, it is need to consider that all experiments were conducted with substrate concentration at levels of saturation and this is not a physiologic condition. This fact is important mainly in relation to blood AChE since the competitive component is involved in this inhibition; thus, the endogenous inhibition can occur even when this not appear in the *in vitro* assays. Then, according to these data, we suggest more attention as to quality of human blood utilized in the hemotherapy services in the Brazil.

KEY WORDS: Hematologic parameters. Cholinesterases. Porphobilinogen-synthase. Smoker. Hemotherapy. Nicotine.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

QUADRO 1 - Constituintes mais importantes da fumaça do tabaco 15

MATERIAL E MÉTODOS

QUADRO 2 - Fluxograma do ensaio para a determinação da atividade da porfobilinogênio sintase eritrocitária humana 36

ARTIGO 1

TABELA 1 -. Valores de HT, Hb e COHb das amostras coletadas dos três grupos experimentais: grupo 1 - não fumantes (NF); grupo 2 - fumantes de 10 ± 5 cigarro/dia (F10); e, grupo 3 - fumantes de 20 ou mais cigarros/dia (F20)..... 60

TABELA 2 - Atividade da PBG-sintase eritrocitária e índice de reativação (I.R.) de amostras coletadas de doadores não fumantes (NF), fumantes de 10 ± 5 cigarros por dia (F10) e de fumantes de 20 ou mais cigarros por dia (F20)..... 60

TABELA 3 - Atividade da ChE sangüínea total em amostras de sangue coletadas de doadores não fumantes (NF), fumantes de 10 ± 5 cigarros por dia (F10) e fumantes de 20 ou mais cigarros por dia (F20)..... 61

LISTA DE FIGURAS

RESULTADOS

FIGURA 1 - Curva de tempo de incubação dos sistemas de ensaio da PBG-sintase	41
FIGURA 2 - Curva de material enzimático da PBG-sintase	42
FIGURA 3 - Atividade da PBG-sintase na presença de DTT (0, 1,4, 2,8, 4,2, 5,6, 7,0, 8,4, e 10 mM).....	43

ARTIGO 1

FIGURA 1 - Correlação entre os parâmetros COHb e hematócrito. Gráfico A-grupo NF; Gráfico B-grupo F10 e gráfico C-grupo F20	62
---	----

MANUSCRITO 2

FIGURA 1 - Effect of nicotine on erythrocytic PBG-synthase activity	76
FIGURA 2 - Erythrocytic PBG-synthase activity. Effects of nicotine and DTT pre-incubated or not with the enzyme before addition of substrate	77
FIGURA 3 - Blood AChE (A) and plasma BuChE (B) activities in the presence of nicotine	78

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	5
LISTA DE TABELAS	6
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Objetivos	12
1.1.1 Objetivo geral	12
1.1.2 Experimentos <i>in vivo</i>	12
1.1.3 Experimentos <i>in vitro</i>	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Tabaco, generalidades e constituição química	13
2.2 Nicotina	16
2.3 Cádmio	17
2.4 Monóxido de Carbono (CO): uma visão bioquímico-toxicológica	18
2.5 Monitorização biológica	19
2.6 Porfobilinogênio sintase (PBG-sintase, E.C.:4.2.1.2.4)	20
2.6.1 Índice de reativação enzimática	23
2.7 Colinesterases	23
2.7.1 Acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3. 1. 1. 7)	24
2.7.2 AChE e inibição por organofosforado	26
2.7.3 Butirilcolinesterase (BuChE, E.C 3. 1. 1.8)	28
2.8 Hemoterapia: breve consideração	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Reagentes	30
3.2 Equipamentos	30
3.3 Material biológico	31
3.4 Determinação do hematócrito	32
3.5 Determinação da hemoglobina	33

3.6 Determinação da carboxihemoglobina (COHb)	34
3.7 Determinação da atividade da enzima PBG-sintase	35
3.7.1 Cálculo e expressão dos resultados	36
3.7.2 Determinação da reativação da enzima PBG-sintase	37
3.8 Determinação da atividade da enzima AChE	38
3.9 Determinação da atividade da enzima BuChE	38
3.10 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Padronização de alguns parâmetros da técnica usada para a determinação da atividade da PBG-sintase eritrocitária	40
4.2 Artigo1: Parâmetros hematológicos e toxicológicos em amostras de sangue de doadores fumantes	44
4.3 Manuscrito 2: <i>Nicotine inhibits human blood porphobilinogen synthase and cholinesterases activities in vitro</i>	63
5 DISCUSSÃO GERAL	79
5.1 Parâmetros hematológicos e toxicológicos em amostras de doadores de sangue fumantes	79
5.1.1 Parâmetros hematológicos	79
5.1.2 Parametros toxicológicos	81
5.1.2.1 Atividade da enzima PBG-sintase e índice de reativação	81
5.1.2.2 Atividade da enzima ChE sangüínea total	82
5.2 Efeito da nicotina <i>in vitro</i> sobre a atividade da PBG-sintase, AChE eritrocitária e BuChE plasmática	83
5.2.1 Atividade da PBG-sintase eritrocitária com e sem pré-incubação: efeitos da nicotina e do DTT <i>in vitro</i>	83
5.2.2 Efeito da nicotina sobre as atividades das colinesterases	84
CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

O tabaco é uma planta da família das solanáceas, sendo a espécie *Nicotiana tabacum* a mais usada. Durante o desenvolvimento da planta são usados vários tipos de inseticidas, incluindo os organoclorados e organofosforados. Após a confecção, o cigarro apresenta-se constituído por várias substâncias tóxicas e após a sua combustão incompleta, encontra-se na fumaça do cigarro, entre outras substâncias nocivas, o monóxido de carbono (CO), a nicotina e o cádmio (LARINI & SALGADO, 1997).

CO é rapidamente absorvido ao nível de alvéolo pulmonar, difunde-se no plasma e fixa-se à hemoglobina (Hb). A conseqüente formação de carboxihemoglobina (COHb) altera o transporte de O₂ (LARINI & SALGADO, 1997; SMITH, 1996). O cádmio está presente em cigarros e assemelhados (KALCHER et al., 1993). O consumo de cigarros é uma forma de intoxicação não ocupacional significativa; um cigarro contém de 1 a 2 ug do metal. A excreção do cádmio é lenta e sua meia-vida chega há três décadas (SALGADO, 1996; GOYER, 1996).

Os serviços de hemoterapia no Brasil são regulamentados segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (2004), RDC153: Regulamento Técnico para a Obtenção, Testagem e Controle de Qualidade de Sangue e Hemocomponentes para o uso Humano. Segundo esta regulamentação, o indivíduo candidato à doação passa por duas triagens, clínica e hematológica, mas nenhuma questão relativa ao ato de fumar é avaliada. Alterações em parâmetros hematológicos como Hb, hematócrito (HT) e COHb em indivíduos fumantes são evidentes e bem conhecidos na literatura (HODGSON, 1997; LEVI, 1997). Assim, o presente trabalho visa investigar alguns parâmetros hematológicos e enzimáticos em amostras de sangue de indivíduos fumantes considerados aptos à doação. Como parâmetros hematológicos foram analisados HT, Hb, COHb e correlação entre HT e COHb. Quanto às enzimas foram estudadas as atividades da porfobilinogênio-sintase (PBG-sintase, também

conhecida como delta-aminolevulinato desidratase) eritrocitária e da colinesterase (ChE) sanguínea total. Ainda, foi investigado o efeito da nicotina *in vitro* sobre estas atividades enzimáticas.

A nicotina é um alcalóide líquido produzido nas raízes da planta que sobe pelo caule até as folhas. Farmacologicamente é o princípio ativo mais potente da fumaça do cigarro, sendo absorvido pela pele, mucosas e pulmões. A via pulmonar produz os efeitos perceptíveis no SNC e cardiovascular (LARINI, 1999), causando dependência em seus usuários.

A nicotina [3-(1-metil-2-pirrolidil)-piridina] está extensamente disponível em produtos do tabaco. Ao ligar-se aos receptores colinérgicos nicotínicos, tem ações farmacológicas diversas e pode ser uma fonte de intoxicação considerável (ANTHONY et al., 1995; YILDIZ, 2004). Visto que o envenenamento agudo é incomum, a exposição em longo prazo ao alcalóide é muito comum e de interesse epidemiológico considerável (ANTHONY et al., 1995). A nicotina se liga fracamente às proteínas plasmáticas, o que facilita sua distribuição sistêmica; seu metabolismo ocorre no fígado e a excreção renal é dependente do pH urinário (LARINI, 1999; YILDIZ, 2004). Concentrações sanguíneas altas, variando de 15 a 50 ng/mL, são alcançadas em poucos minutos após o uso do tabaco e caem a aproximadamente 5 a 15 ng/mL após 120 minutos da tragada (DOMINO et al., 2004; SOHN et al., 2003; MALSON et al., 2003).

A PBG-sintase é uma enzima sulfidrídica, o que a torna extremamente sensível a agentes oxidantes e metais pesados (ROCHA et al., 1995; EMANUELLI et al., 1996; PEIXOTO, 2000; PEIXOTO et al., 2003), sendo então considerada como indicador biológico de intoxicação e/ou exposição a estes agentes (GOYER, 1996).

A manutenção da integridade da célula sanguínea e do metabolismo do heme são de importância fundamental ao transporte dos gases (LEHNINGER et al., 1993). Assim, as alterações na biossíntese do heme podem ter como consequência a produção de porfirinas circulantes, as quais produzem espécies reativas do oxigênio (AFONSO et al., 1997). O mais freqüente órgão alvo desta alteração do metabolismo é o sistema nervoso central, pela presença de alterações

neuropsiquiátricas, e a pele por apresentar a fotossensibilidade (SMITH et al., 1985; LEHNINGER et al., 1993).

De importância notável devido a sua sensibilidade a oxidações e ser objeto de diversos estudos é a enzima PBG-sintase (E.C. 4.2.1.24) (ROCHA et al., 1995; EMANUELLI et al., 1996; PEIXOTO et al., 2003; ROZA, 2001). Esta é uma enzima citosólica (peso molecular de aproximadamente 280.000 Da) que requer zinco (metaloenzima), catalisa a segunda reação da síntese do heme ao condensar duas moléculas de ácido aminolevulínico (δ -ALA) para formar o pirrol porfobilinogênio (PBG) (SMITH, 1985; JAFFE et al., 1992).

Uma outra classe importante de enzimas séricas são as colinesterases (ChE). E, por terem suas atividades inibidas por organofosforados são usadas na prática clínica como diagnóstico de exposição a estes inseticidas (SMITH, 1985). As ChE são encontradas em diversos tecidos e em todos os vertebrados, tendo um papel crucial na neurotransmissão colinérgica e em outros eventos fisiológicos. Os mamíferos têm duas classes principais de ChE: acetilcolinesterase (AChE; E.C.3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE; E.C.3.1.1.8). No sangue humano, as atividades da ChE são representadas principalmente pela BuChE no plasma (também como AChE em quantidades muito baixas) e pela AChE no eritrócito (MASSOULIÉ et al., 1993). Em geral ambas as atividades são investigadas como ChE total de sangue humano quando se suspeita de intoxicação e/ou exposição. O sangue humano é um material de acesso fácil e fornece uma série de informações essenciais relacionadas ao estado de saúde do indivíduo. É uma fonte importante das enzimas ChE e PBG-sintase, usadas extensamente como biomarcadores de intoxicação e/ou da exposição a diversos agentes tóxicos (WOREK et al., 1999).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

A abordagem deste trabalho, sob o ponto de vista da toxicologia, visa relacionar o hábito de fumar com a hemoterapia e com as enzimas PBG-sintase e colinesterases, como bioindicadores enzimáticos; e o papel da nicotina neste processo.

1.1.2 Experimentos *in vivo*

Para evidenciar alterações bioquímicas e hematológicas no sangue de doadores tabagistas moderados e assíduos e colocar em questão a segurança do indivíduo receptor ao ser transfundido com este tipo de hemocomponente, têm-se como objetivos específicos:

- Verificar o efeito do tabagismo sobre os parâmetros Hb, HT e COHb;
- Estudar a atividade da PBG-sintase eritrocitária de indivíduos fumantes;
- Determinar a atividade da ChE sanguínea total destes indivíduos.

1.1.3 Experimentos *in vitro*

Desde que a nicotina é, em termos farmacológicos, o principal componente da fumaça do cigarro (NAKAIAMA et al., 1993), têm-se como objetivos:

- Demonstrar o efeito do alcalóide sobre a atividade da enzima PBG-sintase eritrocitária, na ausência e presença de ditiotreitol;
- Determinar o efeito da nicotina sobre a atividade da enzima AChE eritrocitária;
- Determinar o efeito da nicotina sobre a atividade da enzima BuChE plasmática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tabaco, generalidades e constituição química

O cultivo e o uso do tabaco tiveram sua origem no continente americano, onde os primeiros a usar foram os índios. Com a descoberta da América, o hábito de fumar foi importado para a Europa, tornando-se hoje, o que se pode chamar de uma epidemia mundial. O consumo aumentou a partir da primeira Guerra Mundial e culminou com a industrialização, com isso o tabagismo disseminou-se no mundo todo e o produto tornou-se extremamente lucrativo, permanecendo até hoje (DELLA ROSA, 1981).

Taxonomicamente, o tabaco é uma planta da família das solanáceas sendo a espécie *Nicotiana tabacum* a mais usada. O cultivo da planta é trabalhoso e delicado, pois se trata de uma cultura onde a defesa fitossanitária é amplamente empregada para combater pragas e plantas invasoras que acometem a lavoura do fumo. Durante o desenvolvimento da planta vários tipos de inseticidas são empregados, como por exemplo: organoclorados e organofosforados. Quimicamente, após a confecção, o cigarro é constituído por várias substâncias tóxicas que variam de acordo como tipo de tabaco, tipo do solo, clima, doses e composição dos agrotóxicos, tipo de colheita, grau de amadurecimento e com o tratamento dado a planta depois da colheita (DELLA ROSA, 1981).

Entre os constituintes mais importantes do tabaco podem-se distinguir os seguintes grupos, conforme relata SALGADO (1996):

- Substâncias nitrogenadas;
- Hidratos de carbono;
- Substâncias minerais;
- Óleos etéreos e resinas;
- Corantes, polifenóis;
- Alcalóides e gases.

A fumaça do cigarro é resultante da combustão incompleta do tabaco, já que a combustão completa somente se realiza na brasa, onde a temperatura atinge 850°C. Durante a combustão ocorrem três tipos principais de reação: pirólise, pirossíntese e destilação (DELLA ROSA, 1981). Na pirólise, também chamada decomposição térmica, as substâncias orgânicas do tabaco são fracionadas em pequenas moléculas devido à alta temperatura, oxigenação do fogo e atmosfera rica em hidrogênio. Na pirossíntese, síntese pelo calor, os elementos oriundos da pirólise recombina-se em novos componentes que originalmente não existiam no tabaco. A destilação é o processo através do qual se evapora ou se condensa um líquido, com o fim de obtê-lo puro ou separado de outro, por exemplo, a nicotina (SALGADO, 1996).

A composição química da fumaça depende da qualidade do tabaco, das características do filtro e papel, da temperatura de combustão e da maneira de fumar. Neste contexto duas fases fundamentais da composição da fumaça podem ser diferenciadas conforme descrito na quadro 1 (SALGADO, 1996).

As substâncias se distribuem nestas fases segundo suas propriedades físico-químicas. Durante o ato de fumar são produzidas duas correntes de inalação: corrente primária e corrente secundária. A corrente primária é formada quando o fumante traga o cigarro, é produzida a temperaturas altas, sendo esta, a fonte predominante de exposição dos fumantes ativos. A corrente secundária é produzida a temperatura mais baixa, durante a queima lenta do cigarro entre as tragadas, e é responsável pelo acometimento do fumante passivo (ROSEMBERG, 1981).

Os gases e vapores dispersos na fase gasosa são formados na pirólise e pirossíntese. Os constituintes mais importantes desta fase, sob o ponto de vista toxicológico, são: monóxido de carbono, óxido de nitrogênio, amônia, aldeídos e nitrosaminas voláteis (nitrilas) (CARL, 1998). A fase particulada, também chamada de condensada, é constituída de um aerossol contendo substâncias voláteis incluídas na fase de dispersão. Existem em média 5×10^9 partículas por mL de fumaça, com tamanho que varia de 0,1 a 0,8 μm . Os filtros somente retêm partículas com diâmetro igual ou superior a 0,3 μm . Segundo ROSEMBERG (1981), os constituintes mais importantes desta fase são: alcatrão, nicotina e água.