

Análise microbiológica dos componentes do narguilé
Microbiological analysis of narguilé components
Análisis microbiológico de los componentes de la cachimba

Recebido: 13/09/2020 | Revisado: 20/09/2020 | Aceito: 21/09/2020 | Publicado: 22/09/2020

Augusto Rubens Lopes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3303-3004>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: augustorlopes@gmail.com

Jaqueline Hoscheid

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0020-9002>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: jaquelinehoscheid@prof.unipar.br

Nathielle Miranda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9692-9636>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: nathielle@prof.unipar.br

Resumo

O narguilé é uma nova tendência dos jovens entre 20 e 30 anos, sempre presente em festas ou em rodas de conversas, sendo usado tabaco glicerinado para o seu fumo, também conhecida como essência. Sabendo os malefícios do tabaco, utilizado como principal componente do narguilé, como câncer e problemas respiratórios, ele também pode conter outras possíveis causas para doenças, como micro-organismos patogênicos. Assim, apesar da grande popularização dessa prática, existem poucas pesquisas ainda sobre o mesmo. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi realizar análises microbiológicas dos componentes do narguilé a fim de encontrar bactérias de origem patológica ou não. Para isso, foi utilizada a metodologia de inoculação *in vitro*, em placa de Petri contendo ágar solidificado, em casos de crescimento bacteriano, os microrganismos foram isolados e submetidos a identificação por provas bioquímicas. Foram encontradas *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, nas peças do narguilé. Portanto é necessária uma boa higienização e outras contramedidas para os fumantes evitarem infecções.

Palavras-chave: Narguile; Bactérias; Identificação.

Abstract

The hookah is a new trend of young people between the ages of 20 and 30, always present at parties or on conversation wheels, using glycerinated tobacco for their smoke, also known as essence. Knowing the harms of tobacco, used as the main component of hookah, such as cancer and breathing problems, it can also contain other possible causes for diseases such as pathogenic microorganisms. Thus, despite the widespread popularization of this practice, there is still little research on it. Therefore, the objective of this work was to perform microbiological analysis of the components of the hookah in order to find bacteria of pathological origin or not. For this, the *in vitro* inoculation methodology was used in petri dish containing solidified agar. In case of bacterial growth, the microorganisms were isolated and subjected to identification by biochemical tests. *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* were found in the hookah pieces. Therefore good hygiene and other countermeasures are required for smokers to prevent infections.

Keywords: Water pipe; Bacterium; Identification.

Resumen

La pipa de agua es una nueva tendencia para jóvenes de entre 20 y 30 años, siempre presente en fiestas o en círculos de conversación, utilizándose para fumar tabaco glicerinado, también conocido como esencia. Conociendo los efectos nocivos del tabaco, utilizado como principal componente de las pipa de agua, como el cáncer y los problemas respiratorios, también puede contener otras posibles causas de enfermedades, como los microorganismos patógenos. Por lo tanto, a pesar de la gran popularidad de esta práctica, todavía hay poca investigación al respecto. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar análisis microbiológicos de los componentes de la cachimba con el fin de encontrar bacterias de origen patológico o no. Para ello, se utilizó la metodología de inoculación *in vitro*, en placa de Petri conteniendo agar solidificado, en los casos de crecimiento bacteriano, los microorganismos fueron aislados y sometidos a identificación mediante pruebas bioquímicas. Se encontraron *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* en los trozos de narguile. Por lo tanto, los fumadores necesitan una buena higiene y otras contramedidas para evitar infecciones.

Palabras clave: Narguile; Bacterias; Identificación.

1. Introdução

O narguilé é um cachimbo de água utilizado para fumar tabaco especial, foi inventado na Índia no século XVII, pelo médico Hakim Abul Fath, como método de retirar as impurezas da fumaça. Ele possui diferentes partes, o jarro onde se coloca a água, geralmente feitos de vidro, rosh ou cabeça, feito de cerâmica ou barro, local onde se coloca a essência (tabaco especial), stem (ou corpo) estrutura cilíndrica geralmente de alumínio, que conecta o rosh e o jarro, e a piteira com mangueira, onde se faz a aspiração da fumaça (Brasil, 2017).

Seu funcionamento se inicia assim que se aspira o ar pelo tubo, ocorre redução da pressão no interior da base e isso faz com que o ar aquecido pelo carvão passe pelo tabaco, produzindo a fumaça, a mesma desce pelo corpo até a base, onde é resfriada e filtrada pela água que retém partículas sólidas. A fumaça segue pela mangueira até chegar ao usuário (Brasil, 2017).

O uso do narguilé se popularizou por vários fatores, dentre eles, a introdução do tabaco aromatizado com uma grande variedade de essências. No Brasil, estima-se que mais de 2,5 milhões de pessoas usam esta forma de tabaco (Bertoni *et al.*, 2019). Nas Américas o consumo aumentou consideravelmente nas últimas décadas, sendo que em alguns estados dos Estados Unidos a taxa de experimentação chegou a 50% entre estudantes do ensino médio (Sutfin *et al.*, 2011).

Apesar da presença da água reter algumas partículas sólidas, esse tipo de tabaco possui nicotina que é uma substância que capaz de causar dependência e induzir à tolerância, ou seja, o organismo passa a ter cada vez mais necessidade de doses maiores a fim de obter o mesmo efeito. Atua nas vias dopaminérgicas do sistema mesolímbico, diminuindo a atividade do tálamo, bem como, outras drogas psicoativas, liberando dopamina e estimulando a sensação de prazer e “recompensa” (Marques *et al.*, 2001).

Além disso, evidências indicam que a nicotina, aumenta o risco de câncer de pulmão, doenças respiratórias, acidente vascular cerebral, envelhecimento precoce e recém-nascidos de mães fumantes podem apresentar baixo peso ao nascer (Akl *et al.*, 2010). Os efeitos adversos à saúde do fumo de narguilé tornaram-se mais evidentes nos últimos anos (Safizadeh *et al.*, 2014), pois estudos demonstraram que o uso do narguilé leva à dependência (Akl *et al.*, 2010; Maziak, 2011).

Muitos médicos alertam para outros problemas decorrentes do uso do narguilé, pois como normalmente a piteira é compartilhada com várias pessoas, é aumentado o risco de adquirir doenças infectocontagiosas, como a herpes e a tuberculose (Ribeiro & Cruz, 2016).

Em alguns países o uso compartilhado do narguilé foi relatado entre 90 a 100% dos consumidores, sendo que em algumas culturas é um ato desrespeitoso a recusa em compartilhar (Maziak *et al.*, 2004).

Pesquisas já demonstraram que os componentes desse aparato também podem apresentar várias bactérias, dentre elas *Enterobacter* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Comamonas testosteroni*, algumas patogênicas, pois além do uso compartilhado, temos um ambiente propício para o crescimento de microrganismos, que inclui umidade, melaço (subproduto do açúcar) e calor (Alaidarous, Alanazi & Abdel-Hadi, 2017).

Tendo em vista os relatos de aumento do risco de infecção devido ao uso do narguilé (Alaidarous, Alanazi & Abdel-Hadi, 2017; Balaky, Hamasaeed & Mawlood, 2018), e o ambiente propício para o crescimento bacteriano, o presente estudo buscou detectar a presença de bactérias nos diferentes componentes do narguilé limpo, bem como após seu uso.

2. Metodologia

2.1 Coleta das amostras

As coletas e análises microbiológicas das amostras foram realizadas na Universidade Paranaense (UNIPAR) campus Toledo em julho de 2019.

Obteve-se amostras de 5 narguilés diferentes com um intuito de reprodutibilidade e assegurar veracidade dos resultados. Foram coletados 5 componentes (jarro, piteira, rosh, stem e mangueira), tanto limpos quanto depois de utilizados, sendo denominado neste estudo de “sujos”, totalizando 25 amostras limpas e 25 amostras sujas.

A coleta foi realizada percorrendo-se um swab na parte interna de cada componente, o qual foi acondicionado em água peptonada (0,1%).

2.2 Isolamento, caracterização e identificação bacteriana

Seguindo as práticas assépticas e com auxílio de uma alça de platina foi realizada a inoculação em ágar Cled e MacConkey, em duplicata, e as amostras foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Foi utilizado o meio Cled por permitir a diferenciação de bactérias fermentadoras de lactose e não fermentadoras (Mackey & Sandys, 1965), e o meio

MacConkey por ser seletivo para Gram negativas e por também diferenciar as fermentadoras de lactose (Koneman, 2001).

Para as placas de Cled que apresentaram crescimento bacteriano, as diferentes colônias foram coletadas e submetidas à coloração de Gram para diferenciação morfológica.

Após crescimento bacteriano, as colônias de interesse foram coletadas e a identificação foi realizada com Kit de enterobactérias Laborclin. As análises qualitativas foram feitas utilizando os meios Rugai, LMI, MIO, Rhamnose, Citrato e o reagente Kovac's, as amostras foram incubadas a 35-37 °C por 24-48 h e realizada a leitura visual, seguindo os protocolos do kit e de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3. Resultados

A Tabela 1 indica a relação de bactérias Gram positivas e Gram negativas encontradas nos diferentes componentes do narguilé. Foi possível observar que no Rosh e Jarro limpos houve uma maior quantidade de Gram negativas, enquanto que nestes componentes sujos observou-se predomínio de bactérias Gram positivas. Já no Stem, Mangueira e Piteira foi observado que nas amostras limpas houve uma maior quantidade de bactérias Gram positivas e negativas comparando-se com as amostras sujas.

Tabela 1 – Relação de bactérias Gram Positivas e Gram negativas nos componentes do narguilé.

Componente	n	Gram positivo		Gram negativo	
		Limpo	Sujo	Limpo	Sujo
Rosh	1	-	+	-	+
	2	-	+	+	-
	3	+	-	+	-
	4	-	+	+	-
	5	+	-	-	+
Jarro	1	+	-	+	-
	2	+	-	-	+

Stem	3	-	+	+	-
	4	-	+	-	+
	5	+	-	+	-
Jarro	1	-	+	+	-
	2	+	-	+	-
	3	-	+	+	-
	4	-	+	-	+
	5	+	-	-	+
Mangueira	1	+	-	-	+
	2	-	+	+	-
	3	-	+	+	-
	4	+	-	-	+
	5	+	-	+	-
Piteira	1	+	-	+	-
	2	+	-	+	-
	3	-	+	+	-
	4	+	-	-	+
	5	+	-	-	+

Fonte: O autor. Nota: (+) presença; (-) ausência.

Os resultados da Tabela 2 indicam a predominância de *Escherichia coli* incluindo uma pequena presença de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, e um conjunto de diferentes bactérias, principalmente nos componentes sujos.

Nas amostras obtidas dos Rosh limpos a presença de *E. coli* se encontra com mais frequência, já quando sujos, devido à grande quantidade de açúcares, é possível verificar uma diversidade maior de bactérias, entre elas *Pseudomonas aeruginosa*, *Comamonas testosteroni* e *Enterobacter cloacae complex*. Por sua vez, no Steam houve um maior predomínio de outros tipos de bactérias, incluindo principalmente as Gram positivas, que nesse estudo não foram identificadas.

Tabela 2 – Identificação de Colônias de bactérias nos componentes do narguilé.

Componente	n	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Enterobacter aerogenes</i>		Outras bactérias	
		S	L	S	L	S	L	S	L
Rosh	1	+	+	-	-	-	-	-	-
Rosh	2	-	+	-	-	-	-	-	+
Rosh	3	-	+	-	-	-	-	+	-
Rosh	4	-	-	-	-	+	-	-	+
Rosh	5	-	-	+	-	-	-	-	-
Stem	1	-	-	-	-	-	-	+	-
Stem	2	+	+	-	-	-	-	-	-
Stem	3	-	-	-	-	-	-	+	+
Stem	4	+	-	-	-	-	+	+	-
Stem	5	-	-	-	-	+	-	+	+
Jarro	1	-	+	-	-	+	-	+	-
Jarro	2	-	+	-	-	-	-	-	+
Jarro	3	+	+	-	-	+	-	+	-
Jarro	4	-	-	-	-	-	-	+	+
Jarro	5	-	+	-	-	-	+	+	-
Mangueira	1	-	+	-	-	-	-	-	-
Mangueira	2	+	-	-	-	+	-	+	-
Mangueira	3	+	-	-	-	-	-	+	-
Mangueira	4	-	-	-	-	+	-	+	-
Mangueira	5	+	+	-	-	-	+	-	-
Piteira	1	-	+	-	-	-	-	+	-
Piteira	2	-	-	-	-	-	-	+	-

Piteira	3	-	-	-	-	+	+	-	-
Piteira	4	-	-	-	-	-	-	+	-
Piteira	5	-	+	-	-	+	-	+	+

Fonte: O autor. Nota: (+) presença; (-) ausência; (S) sujo; (L) limpo.

Observou-se ainda que houve um aumento de bactérias encontradas principalmente nos jarros sujos, onde a fumaça que vem do rosh traz consigo as bactérias que ficam depositadas na água. Entretanto, cabe ressaltar que o maior foco de perigo encontra-se nas piteiras e mangueiras, as quais além de serem compartilhadas, não recebem uma grande quantidade de calor para eliminar as bactérias presentes. Nestes componentes foram isoladas e identificadas *E. coli*, *E. aerogenes* e outras bactérias.

4. Discussão

Inicialmente cabe ressaltar que este é um estudo pioneiro realizado em nosso País para investigar a contaminação microbiana de componentes de narguilés. Portanto buscou-se encontrar quais partes do narguilé possuem maior contaminação bacteriana, e destas foi identificado o grupo das enterobactérias, pois se apresentam de forma mais frequente no ambiente e causam infecções facilmente (Lopes *et al.*, 2016; Stella & Oliveira, 2020).

Visto que o narguilé já foi considerado como uma alternativa mais segura e menos danosa de se fumar tabaco, por utilizar a água como mecanismo de filtro, evidências científicas atuais revelam que o seu uso é ainda mais prejudicial em comparação aos cigarros, e que uma sessão de 20 a 80 minutos corresponde a exposição tóxica presente na fumaça de cerca de 100 cigarros (Who, 2005; O'Connor, 2011; Rivas *et al.*, 2012; Menezes *et al.*, 2015, Brasil, 2019).

Mas os riscos do narguilé não se relacionam somente ao tabaco, e não param por aqui, doenças infectocontagiosas transmitidas por esse aparato também podem ocorrer. Neste contexto, Alaidaros, Alanzazi e Aabdel-Hadi (2017) identificaram na água, que é usada no narguilé um total de 55 bactérias, dentre as quais 51% foram Gram negativas e 49% foram Gram positivas, o que se assemelha a esse estudo, onde foi encontrado Gram negativas em maior proporção. No estudo anteriormente mencionado, a bactéria Gram negativa com maior frequência encontrada foi a *Klebsiella oxytoca*, enquanto que na presente pesquisa a maior prevalência foi de *E. coli* (38%), especialmente em narguilés já sujos, devido a usos anteriores

sem a higienização. Adicionalmente, após o teste de antibiograma, os mesmos pesquisadores encontraram bactérias mais resistentes aos antibióticos presentes na água e no jarro, alegando que possivelmente a água cria uma certa resistência para essas bactérias, provavelmente por muitos componentes do tabaco que ela retém (Alaidaros, Alanzazi & Aabel-Hadi, 2017).

As bactérias Gram positivas não passaram pelo processo de identificação, porém foram contabilizadas. Balaky (2018) encontrou em seu trabalho uma maior contaminação de bactérias Gram positivas, sendo *Staphylococcus albus* e *Staphylococcus aureus*, enquanto que dentre as bactérias Gram negativas a mais frequente foi *E. coli*, corroborando com nossos resultados.

Em vista da popularidade do narguilé e com a deficiência de pesquisas e de regulamentação, permitindo que qualquer pessoa de qualquer idade adquira o aparato, é de extrema importância a detecção e identificação de bactérias que poderiam até mesmo ocasionar infecções, principalmente nas áreas da laringe, esôfago, pulmão e estômago, lugares onde a fumaça inalada passa levando consigo as bactérias, ocasionando pneumonia e infecções no trato respiratório (Alaidaros, Alanzazi & Aabel-Hadi, 2017).

Dentre os achados a *E. coli* é a que menos possui capacidade de gerar uma infecção do trato respiratório, por possuir tropismo para o trato urinário, porém apresenta cepas com elevado perfil de resistência (Marks *et al.*, 2020; Stella & Oliveira, 2020). Já *K. pneumoniae* é responsável por infecção hospitalar no sistema respiratório que agride principalmente pacientes imunodeprimidos (Moura *et al.*, 2007), porém a presença dessa bactéria não foi detectada na grande maioria das amostras aqui estudadas.

Segundo Paterson (2006), a *Enterobacter* spp. pode causar diversas doenças como bacteremia, osteomielite, pneumonia e septicemia no trato respiratório. Neste estudo, observou-se a presença dessa bactéria em vários componentes, prevalecendo em sua maioria nos componentes sujos.

As bactérias encontradas neste estudo são consideradas, em sua maioria, patogênicas. Cabe ressaltar que o grande problema se concentra principalmente no compartilhamento da piteira, visto que nos outros componentes do narguilé, durante a utilização, devido às temperaturas acima de 100 °C, uma grande parcela destes micro-organismos são eliminados.

5. Considerações Finais

Foi observado predomínio na contaminação dos componentes do narguilé por bactérias Gram negativas, dentre as quais houve prevalência de *E. coli*. Entretanto, colônias

bacterianas de *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* também foram identificadas. Cabe ressaltar que *E. aerogenes* apresenta elevado potencial de indução à infecções respiratórias, representando um risco grave à saúde do usuário. Um enfoque especial deve ser dado às piteiras, pelas quais ocorre a passagem da fumaça já resfriada e carregada de bactérias provenientes da água acondicionada no jarro contaminado.

Para evitar certos malefícios, uma boa higienização é necessária, utilizando esponjas com imãs para a limpeza do jarro, escovas especiais para a limpeza interna da Stem, assim como manter todos os outros componentes sanitizados.

Além desse estudo ser uma importante fonte de informação para que os usuários desse aparato redobrem os cuidados de higiene, sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas principalmente com o objetivo de identificar a presença das possíveis bactérias Gram positivas.

Referências

Akl, E. A., Gaddam, S., Gunukula, S. K., Honeine, R., Jaoude, P. A., Irani, J. (2010). The effects of waterpipe tobacco smoking on health outcomes: a systematic review. *International Journal of Epidemiology*, 39(3), 834–857.

Alaidarous, M., Alanazi, M., Abdel-Hadi A. (2017). Isolation, Identification, and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Associated with Waterpipe Contaminants in Selected Area of Saudi Arabia. *BioMed Research International*, 2017, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2017/8042603>.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2004). *Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica*. Recuperado de: http://www.anvisa.gov.br/servicos/medica/microbiologia/mod_5_2004.pdf

Balaky, S. T. J., Hamasaeed. P. A., Mawlood, A. H. (2018). Screening Microbial Contamination of Smoking Waterpipe (Narghile) in Erbil city/ Iraq. *Journal of University of Babylon, Pure and Applied Sciences*, 26(5).

Bertoni, N., Szkloa, A., Bonic, R., Coutinho, C., Vasconcellos, M., Silva, P. N., Almeida, L. M., Bastos, F. I. (2019). Electronic cigarettes and narghile users in Brazil: Do they differ from cigarettes smokers? *Addictive Behaviors*, 98.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. (2017). *Uso de narguilé: efeitos sobre a saúde, necessidades de pesquisa e ações recomendadas para legisladores*. Recuperado de: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/notas-tecnicas/uso-de-narguile-efeitos-sobre-saude-necessidades-de-pesquisa-e-aco-es>

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. (2019) *Narguilé: o que sabemos?* Recuperado de: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.s ti.inca.local/files//media/document//narguile-o-que-sabemos.pdf>

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M. (2001). *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. Rio de Janeiro: MEDSI.

Lopes, E. S., Maciel, W. C., Teixeira, R. S. C., Albuquerque, Á. H., Vasconcelos, R. H., Machado, D. N., Bezerra, W. G. A., Santos, I. C. L. (2016). Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psittaciformes: relevância em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*, 83.

Mackey, J. P., Sandys. G. H. (1965). Laboratory diagnosis of infection of the urinary tract in general practice by means of a dip-inoculum transport medium. *Br. Med. J.* 2, 1286-1288.

Marques, A. C. P. R., Campana, A., Gigliotti, A. P., Lourenço, M. T. C., Ferreira, M. P., Laranjeira, R. (2001). Consenso sobre o tratamento da dependência de nicotina. *Rev Bras Psiquiatr* 23, 200-14.

Marks, F. O., Oliveira, T. M. S., Ferreira, G., Dallabrida, M. M., Bisewski, C. G., Souza, P. A. (2020). Infecção do trato urinário: etiologia, perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos em hospital pediátrico. *Research, Society and Development*, 9 (8).

Maziak, W., Fouad, F. M., Asfar, T., Hammal, F., Bachir, E. M., Rastam, S., Eissenberg, T., Ward, K. D. (2004). Prevalence and characteristics of narghile smoking among university students in Syria. *International Journal Tuberculosis Lung Disease*, 8 (7), 882–889.

Menezes, A. M. B., Wehrmeister, F. C., Horta, B. L., Szwarcwald, C. L., Vieira, M. L., Malta, D. C. (2015). Frequência do uso de narguilé em adultos e sua distribuição conforme características sociodemográficas, moradia urbana ou rural e unidades federativas: Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), 2013. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 18 (2), 57-67.

Moura, M. E. B., Campelo, S. M. A., Brito, F. C. P., Batista, O. M. A., Araújo, T. M. E., Oliveira, A. D. S. (2007). Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 60 (4), 416-421.

O'Connor, J. R. (2012). Non-cigarette tobacco products: what have we learnt and where are we headed? *Tobacco Control*, 21, 181-190.

Paterson, D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American journal of medicine*, 119 (6), 20-28.

Ribeiro, M., Cruz, R. C. (2016). Jovens e o uso do narguilé: A saúde pode ser comprometida? *Assobrafir Ciência*, 7(1), 7-10.

Rivas, L. R., Somsamouth, K., Mounivong, B., Sinclair, R., Singh, P. N. (2012). Carbon monoxide levels in water pipe smokers in rural Laos PDR. *Tobacco Control*, 21, 517-518.

Safizadeh, H., Moradi, M., Rad, M. R. Nakhaee, N. (2014) Bacterial contamination of different components of the waterpipe. *International Journal Tuberculosis Lung Disease*, 18 (8), 988-991.

Stella, A. E., Oliveira, A. F. (2020). Padrões de resistência a antibióticos em enterobactérias isoladas de infecções do trato urinário em gestantes. *Research, Society and Development*, 9 (8).

Sutfin, E. L., McCoy T. P., Reboussin, B. A., Wagoner, K. G., Spangler, J., Wolfson, M. (2011). Prevalence and correlates of waterpipe tobacco smoking by college students in North Carolina. *Drug Alcohol Depend*, 115(1-2), 131-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2011.01.018>.

Who, World health organization. (2005). *Who study group on tobacco product regulation*. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/161512/9789241209892.pdf?sequence=1>

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Augusto Rubens Lopes – 60%

Jaqueline Hoscheid – 20%

Nathielle Miranda – 20%