



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LABORATÓRIO DE ELETROFORESE CAPILAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM QUÍMICA

**ESTUDO DE INTERAÇÃO DA SÉRIE HOMÓLOGA DOS
p-HIDROXIBENZOATOS DE ALQUILA COM MICELA ANIÔNICA
UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR**

Aluna: Kaline Caon

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis
2008

KALINE CAON

**ESTUDO DE INTERAÇÃO DA SÉRIE HOMÓLOGA DOS
p-HIDROXIBENZOATOS DE ALQUILA COM MICELA ANIÔNICA
UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Química.

Florianópolis
2008

A meus pais, Rui e Marlene, pela dedicação de parte de suas vidas as “minhas” realizações e pelo importante apoio e incentivo em minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver e compreender seus desígnios e crescer em minha vocação;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke pelo grande incentivo, inestimável apoio e constante orientação;

À banca examinadora;

À Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, coordenação do curso, funcionários do Departamento de Química pela oportunidade de conviver e adquirir novos e importantes conhecimentos;

À Ana Carolina, pelas orientações e sugestões que foram de grande valia para a realização deste trabalho e pelas palavras amigas.

Aos amigos do laboratório, Marcel, Melina e Michelle pelo convívio e ajuda nas mais diversas situações, sempre com sorriso e abraços.

Aos meus pais, Rui e Marlene, pelo amor, segurança, compreensão e incentivo que sempre me confortaram, pelo exemplo de dignidade e caráter e por ter imprimido em mim o desejo de crescer.

As minhas irmãs, Kátia e Kelly – mãe do bebezinho que estamos esperando! A titia aqui está muito feliz! - e a seus digníssimos maridos, Alessandro e André, pela amizade, disposição nas mais diversas situações e pelos momentos de alegria.

Agradeço aos grandes amigos Fabi, Chai, Kellyzinha, Filipi e Camis; ao grande primo Thiago, sempre ao lado! Aos amigos desde infância: Rubi, Lulu, Sil e Grá, que compartilharam esses anos de estudos e expectativas, e que presentes ou não, sempre auxiliaram, de alguma forma, com palavras amigas.

Agradeço a todos os amigos e colegas do curso, em especial: Cris, Io, Sil, Josi, Fefita, Carol e Gláu pelos momentos de aprendizagem e descontração.

À Maria Bertilia por me apresentar o estudo científico, a sua amizade e presença até hoje.

Não poderia deixar de agradecer ao Juca, Duda, Ivo, Vanessa, Fran, Carli e Juli... o começo sem vocês poderia ter sido mais difícil.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que estiveram presentes nesta minha caminhada, dedicando seu tempo e esforço.

Que fique registrado o meu profundo agradecimento!

“A inteligência é o farol que nos guia,
mas é a vontade que nos faz caminhar”
(Anônimo)

SUMÁRIO

LISTA DE EQUAÇÕES	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 OS p – HIDROXIBENZOATOS DE ALQUILA	11
1.2 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ANALITO-MICELA	13
1.3 ELETROFORESE CAPILAR	14
1.3.1 INSTRUMENTAÇÃO	15
1.3.2 O FLUXO ELETROSMÓTICO	16
1.3.3 MODOS DE SEPARAÇÃO	17
1.3.3.1 ELETROFORESE CAPILAR EM ZONA (CZE)	18
1.3.3.2 CROMATOGRAFIA ELETROKINÉTICA MICELAR (MECK)	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	21
3.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INTERAÇÃO ANALITO MICELA	21
3.3 EQUIPAMENTOS	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	23
4.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INTERAÇÃO ANALITO MICELA	27
5. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1: Constante de equilíbrio_____	13
EQUAÇÃO 2: Constante de interação analito micela da forma não dissociada (HA)_____	13
EQUAÇÃO 3: Constante de interação analito micela da forma dissociada (A)_____	13
EQUAÇÃO 4: Fator de Retenção_____	13
EQUAÇÃO 5: Fator de Retenção experimental_____	14
EQUAÇÃO 6: Fator de Retenção _____	14

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura da série homóloga dos p-hidroxibenzoato de alquila	11
FIGURA 2: Esquema de um equipamento de eletroforese capilar	16
FIGURA 3: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal	17
FIGURA 4: Mecanismo de separação por MEKC	19
FIGURA 5: Curvas construídas utilizando o software Peakmaster. Condição analítica: concentração constante de 20 mmol L ⁻¹ de HIBA, e concentração de TEA variando de 22 a 45 mmol L ⁻¹	23
FIGURA 6: Eletroferogramas com diferentes concentrações de Hexa-Br adicionadas ao eletrólito de corrida. Condições analíticas: eletrólito com concentração constante de 20 mmol L ⁻¹ de HIBA, 30 mmol L ⁻¹ de TEA e com concentrações de Hexa-Br variando de 0 a 0,4 mmol L ⁻¹ . Injeção hidrodinâmica 50 mbar, 3 s; tensão aplicada 30 kV, polaridade positiva; detecção em 297 nm	24
FIGURA 7: Eletroferograma dos padrões de parabeno e do padrão interno. Condições Analíticas: eletrólito constituído por 20 mmol L ⁻¹ de HIBA, 30 mmol L ⁻¹ de TEA e 0,2 mmol L ⁻¹ de Hexa-Br; injeção hidrodinâmica 50 mbar, 3 s; tensão aplicada 30 kV, polaridade positiva; detecção em 297 nm	25
FIGURA 8: Eletroferogramas das amostras: (A) Extrato de banana, (B) Anti-séptico bucal, (C) Xampu e (D) creme hidratante para o corpo. Condições analíticas: eletrólito constituído por 20 mmol L ⁻¹ de HIBA, 30mmol L ⁻¹ de TEA e 0,2 mmol L ⁻¹ de Hexa-Br; injeção hidrodinâmica 50 mbar, 3 s; tensão aplicada 30 kV, polaridade positiva; detecção em 297 nm. * Pico desconhecido	26
FIGURA 9: Comparativo do comportamento <i>k</i> do BP, MP, EP e MP em pH de 7,59 e com variações de SDS de 0 a 0,4 mmol L ⁻¹ na composição do eletrólito de corrida	28
FIGURA 10: Comportamento da variação de SDS em função de cada pH estudado para BP	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Dados obtidos das curvas de calibração	<u>26</u>
TABELA 2: Resultados da quantificação das amostras	<u>27</u>
TABELA 3: Composição de cada solução tampão	<u>27</u>
TABELA 4: Valores obtidos para as constantes de interação analito-micela	<u>29</u>

SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEC - Eletrocromatografia Capilar
CG - Cromatografia Gasosa
CGE - Eletroforese Capilar em Gel
CIEF - Focalização Isoelétrica Capilar
CITP - Isotacoforese Capilar
CZE - Eletroforese Capilar em Zona
EC – Eletroforese Capilar
EMD - Dispersão por eletromigração
EOF – Fluxo Eletrosmótico
FIA - Análise por Injeção em Fluxo
HA - Analito
HIBA – Ácido 2-hidroxiisobutírico
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
 k - Fator de retenção
M - Micela
MEKC - Cromatografia Eletrocinética Micelar
SDS - Dodecilsulfato de sódio
TEA – Trietilamina
TRIS - Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV/VIS – Ultravioleta/Visível
[M] - Concentração do surfactante – a concentração micelar crítica (cmc)
 v_{EOF} - Velocidade do fluxo eletrosmótico
 v_{mc} – Velocidade da micela
 μ_{eff} - Mobilidade efetiva
 μ_{EOF} – Mobilidade do fluxo eletrosmótico.
 μ_{mc} – Mobilidade da micela
 t_0 - Tempo de migração do fluxo eletrosmótico
 t_{MC} - Tempo de migração micela
 t_R - Tempo de migração do analito

RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo desenvolvido por eletroforese capilar (EC) para a elaboração de uma metodologia analítica empregada na determinação de p-hidroxibenzoatos de alquila em produtos cosméticos. Os p-hidroxibenzoatos de alquila são comumente conhecidos como parabenos; sua série homóloga de metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) e butilparabeno (BP) é largamente utilizada como conservantes. São utilizados individualmente ou de forma combinada entre si, há mais de 50 anos, nos alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, toxicidade relativamente baixa, boa estabilidade e não-volatilidade. Foram avaliadas amostras de xampu, creme hidratante para o corpo, queratina líquida para cabelo, anti-séptico bucal, extratos hidroglicólicos de banana e aloe vera. O eletrólito de corrida otimizado foi constituído de ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) 20 mmol L⁻¹, trietilamina (TEA) 30 mmol L⁻¹ e hexano-1,6-bis(trimetil amônio) (Hexa-Br) 0,2 mmol L⁻¹. O método se mostrou eficiente já que as informações apresentadas nos rótulos dos produtos foram comprovadas através da análise das amostras. Quanto a quantificação, esta foi realizada através de curvas de calibração obtidas com concentrações variando de 1 a 40 mg L⁻¹ mantendo-se fixa a concentração do padrão interno, ácido cinâmico, em 10 mg L⁻¹. Foram obtidos valores para o coeficiente de determinação (R²) maior que 0,99. Os valores de parabenos nas amostras de cosméticos analisadas apresentaram-se dentro do limite permitido, 0,4% quando aplicados individualmente e 0,8% quando apresentam-se associados entre si, estabelecido pela ANVISA. Também foram determinados os valores das constantes de interação analito-micela (K_{HA} e K_{A^-}) e do valor do pK_a dos analitos, através de modelos matemáticos em diferentes valores de pH's e concentrações de dodecilsulfato de sódio (SDS).

Palavras chaves: eletroforese capilar; SDS; constantes de interação; pK_a, cosméticos, p-hidroxibenzoatos de alquila.

1. INTRODUÇÃO

1.1 OS p – HIDROXIBENZOATOS DE ALQUILA

Os p-hidroxibenzoatos de alquila (Figura 1), comumente chamados de parabenos, são ésteres derivados do ácido p-hidroxibenzóico amplamente utilizados como conservantes antimicrobianos (por demonstrarem atividade inibitória frente a fungos e leveduras), e empregados em produtos cosméticos, farmacêuticos e alimentícios ¹.

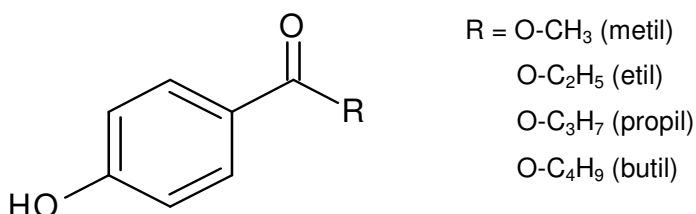


Figura 1: Estrutura da série homóloga dos p-hidroxibenzoato de alquila

Os parabenos vêm sendo utilizados há mais de 50 anos, atualmente estima-se que estão presentes em mais de 13.200 formulações; individualmente ou em combinações. Estão presentes em diversos produtos empregados rotineiramente, como hidratantes, cremes dentais, sabonetes, desodorantes e xampus ^{2, 3} em concentração de até 0,4% quando aplicados individualmente e 0,8% quando associados, conforme estabelecido pela Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000 da ANVISA⁴.

Utilizados em produtos farmacêuticos a partir de meados dos anos 1920, os parabenos também estão presentes em uma ampla variedade de medicamentos, geralmente em concentrações não superiores a 1% ⁵.

A atividade antimicrobiana do parabeno aumenta, mas a sua solubilidade em água diminui com o aumento do grupo alquila³. Por esta razão, metil e propil parabenos são os mais amplamente utilizados⁶.

A grande aplicação de parabenos como conservantes em cosméticos deve-se ao fato destes apresentarem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, são seguros para uso (ou seja, relativamente não-irritante, não-sensibilizantes, e de

baixa toxicidade), são estáveis durante determinado intervalo de pH, são suficientemente solúveis em água, apresentam boa estabilidade, não-volatilidade, além de apresentarem baixo custo^{7,8}. Estudos *in vitro* sugerem que os parabenos exibem atividade estrogênica⁹, sendo a mesma dependente da estrutura dos parabenos¹⁰, contribuindo para o desenvolvimento de linhagens celulares de adenocarcinoma de mama (MCF-7) como também influenciando a expressão de genes estrogênio-dependente^{11,12}. Estudos *in vivo* sugerem aumento do peso do útero de roedores fêmeas após exposição aos parabenos butílico, isobutílico e benzílico¹² e em roedores masculinos demonstraram diminuição do nível de excreção da testosterona e, alguns, redução do aparelho reprodutor após exposição ao butil e propilparabenos¹³, não sendo observado quando da exposição de metil e etil parabenos¹⁴.

A atividade estrogênica dos parabenos em animais e a presença destes compostos no tecido mamário humano têm ressaltado preocupações com relação à sua segurança. Esta preocupação aumenta ainda mais quando se considera o potencial de utilização dos mesmos na vida diária. A exposição humana a parabenos é estimada em 1,3 mg / kg dia ou 76 mg / dia (relacionada ao uso de: cosméticos, 50 mg / dia; medicamentos, 25 mg / dia; alimentos, 1 mg / dia)¹⁵. Diversos estudos farmacocinéticos têm sido conduzidos, demonstrando que, os parabenos, após serem absorvidos, são hidrolisados a ácido p-hidroxibenzóico, podendo então serem excretados na urina como glicina, conjugados glucuronídeo e sulfato^{8,16}. Considerando a necessidade de estudos para comprovação da segurança dos parabenos e sua ampla aplicabilidade, é imprescindível o desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas e robustas visando a quantificação dos parabenos em diferentes produtos.

Na literatura são apresentados vários métodos analíticos utilizados para a quantificação de parabenos em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, os quais estão baseados em técnicas como a cromatografia gasosa (CG)^{17,18}, a análise por injeção em fluxo (FIA)¹⁹, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)²⁰⁻²² e a eletroforese capilar (EC)²³⁻²⁵.

Considerando alguns aspectos da eletroforese capilar, tais como o curto tempo de análise, a alta eficiência, o baixo custo por análise e o consumo mínimo de amostra, reagentes e solventes^{26,27}, esta se mostra como sendo uma ferramenta atrativa para o desenvolvimento de métodos de análise de parabenos.

1.2 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ANALITO-MICELA

Além de análises qualitativas e quantitativas a EC permite também a determinação da lipofilicidade, a qual está relacionada a afinidade que uma molécula ou um fragmento apresenta por um ambiente lipofílico^{28,29}. Este é considerado um parâmetro muito importante como primeira etapa na avaliação da atividade antimicrobiana, por estar correlacionada com a permeação celular³⁰.

O estudo da lipofilicidade em diferentes pHs permite definir qual o pH mais eficiente para a aplicação dos conservantes investigados.

A lipofilicidade pode ser obtida utilizando a EC em meio micelar onde podem ser medidas as constantes de interação analito-micela. Os equilíbrios entre um analito (HA) e a micela (M) podem ser descritos por:



Uma das maneiras de se determinar estas constantes é através do ajuste da Equação 4 proposta por M. G. KHALEDI e colaboradores³¹⁻³³. Esta equação relaciona o fator de retenção (k) com a concentração de micelas e o pH do eletrólito de corrida.

$$k = \frac{K_{HA}^m [M] + K_{A^-}^m [M] 10^{pH - pK_a}}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (4)$$

Onde: K_{HA}^m é a constante de interação analito-micela da forma não dissociada (HA).

$K_{A^-}^m$ é a constante de interação analito-micela da forma dissociada (A^-).

[M] é a concentração do surfactante – a concentração micelar crítica (cmc).

O fator de retenção³⁴, k , é determinado experimentalmente através da Equação 5.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0 (1 - t_R / t_{MC})} \quad (5)$$

Sendo t_R = tempo de migração do analito;

t_0 = tempo de migração do fluxo eletrosmótico;

t_{MC} = tempo de migração analito-micela.

O t_{MC} é determinado utilizando-se pireno como marcador e o t_0 é determinado pelo tempo de migração da acetona.

Outra maneira de determinação destas constantes é utilizando a Equação 6³¹.

$$k = K^m [M] \quad (6)$$

Esta equação mostra que a reta obtida de k versus $[M]$ tem o valor de K^m como coeficiente angular, se for utilizado um $\text{pH} \gg \text{pK}_a$ obtém-se o valor de $K_{A^-}^m$, se for utilizado um $\text{pH} \ll \text{pK}_a$ obtém-se o valor de K_{HA}^m .

1.3 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese é uma técnica de separação que se baseia na migração diferenciada de espécies iônicas ou ionizáveis, em um meio líquido, quando submetidas à ação de um campo elétrico³⁵.

Historicamente, a eletroforese foi introduzida por Tiselius no início da década de 30 através do elegante método da fronteira móvel aplicada à separação de alguns constituintes protéicos em soro humano, por este trabalho pioneiro Tiselius foi o ganhador do Prêmio Nobel de Química de 1948³⁶.

A EC é uma técnica relativamente nova, primeiramente idealizada por Hjertén³⁷ em 1967. Os primeiros trabalhos publicados datam da década de 70, entretanto, a primeira análise desenvolvida com sucesso foi publicada por Everaerts e seus colaboradores em 1979³⁸, seguida de Jorgenson e Lukacs³⁹ em 1981. A partir de então, vem sendo utilizada por um número cada vez maior de pesquisadores na área da química⁴⁰, bioquímica⁴¹, ciência forense⁴², laboratórios clínicos⁴², indústrias farmacêuticas⁴⁴ etc, confirmando a importância e aceitação desta potente ferramenta analítica.

A EC mostra-se muito eficiente na separação de íons pequenos, tanto orgânicos como inorgânicos, fármacos, explosivos, corantes, polímeros, proteínas e peptídeos, DNA e RNA, entre outros ²⁷.

Entre as suas características, são destacadas a rapidez e a capacidade de aplicação de vários métodos de análise à mesma amostra utilizando o mesmo tubo capilar^{27,45}.

Além da quantidade reduzida de amostra injetadas (da ordem de nanolitros), outras vantagens inerentes a esta técnica são o baixo custo por análise, alto poder de separação, consumo mínimo de amostras, reagentes e solventes e a completa automação da análise, com possibilidade de injeção e detecção em fluxo²⁷. Outro benefício é o fato de ser compatível com diversos tipos de detectores, entre eles os de absorção no UV-VIS e de espectrometria de massas⁴⁶.

Entre todos os métodos eletroforéticos, a eletroforese capilar se sobressai porque consegue dissipar, com maior eficiência, o calor gerado pelo efeito Joule, devido à aplicação de campos elétricos altos. Este melhor desempenho está relacionado à geometria do capilar, cuja área superficial interna é bem maior em relação ao volume⁴⁶.

1.3.1 INSTRUMENTAÇÃO

O instrumento utilizado em eletroforese capilar é composto de uma fonte de alta tensão, capilares (geralmente de sílica fundida com diâmetro interno de 15 a 100 μm e comprimento entre 30 e 150 cm), eletrodos (os de platina são os mais usados) e um detector ⁴⁶ (Figura 2). As fontes servem para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar e podem funcionar à voltagem constante (-30 a 30 kV) e/ou corrente constante (0 - 200 μA) ^{27,46}.

Nos instrumentos disponíveis comercialmente, os capilares são mantidos dentro de um dispositivo, denominado cartucho, que facilita a introdução no aparelho. O controle de temperatura do capilar é muito importante para assegurar a reprodutibilidade das separações. Este é feito geralmente por ar ou líquido refrigerante, que passa através do cartucho onde se encontra o capilar ^{27,46}.

O tubo capilar é, então, preenchido com uma solução tampão, também chamada de eletrólito de corrida, e suas extremidades são mergulhadas em recipientes (contendo a mesma solução), onde é aplicado um campo elétrico, que gera uma corrente no interior do capilar. Os eletrodos também são mergulhados na

solução para fechar o circuito. O capilar passa através de um detector, usualmente um detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis, já que este pode ser utilizado na detecção de muitos tipos de substâncias²⁷.

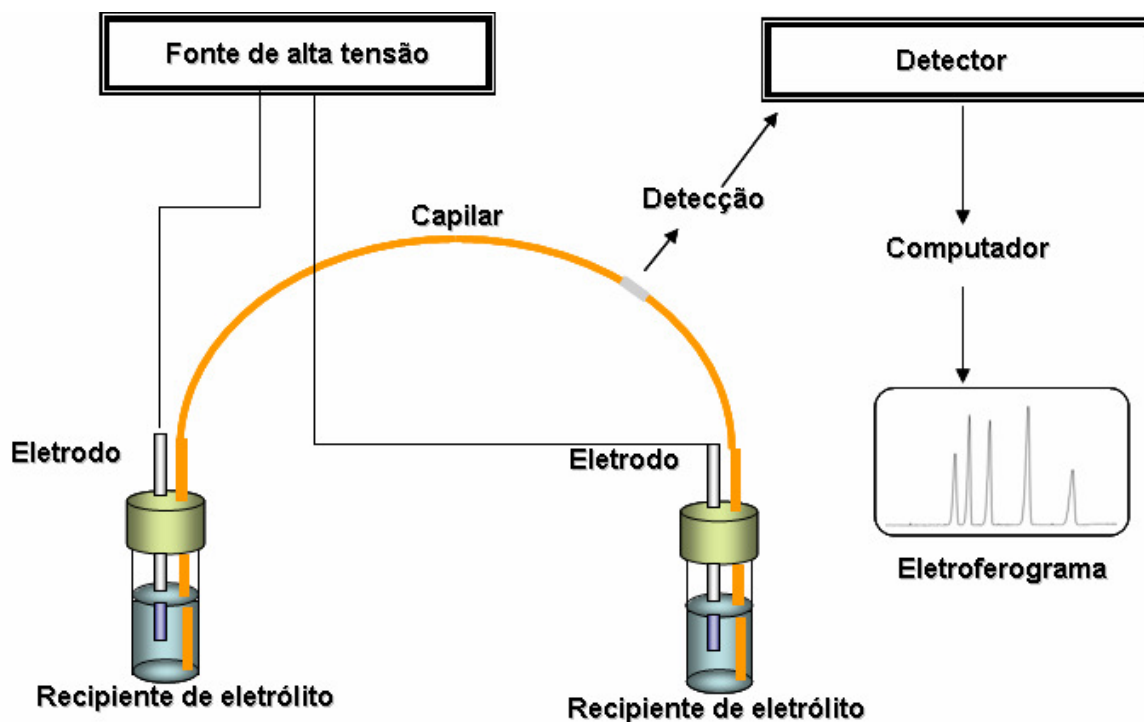


Figura 2: Esquema de um equipamento de eletroforese capilar

A injeção da amostra pode ser de forma eletrocinética ou hidrodinâmica. Na injeção eletrocinética a amostra é introduzida no capilar devido a uma variação de potencial que se forma ao longo do tubo. Como consequência, a quantidade de material injetado é uma função da mobilidade eletroforética do soluto, das condutividades da amostra e do eletrólito, bem como da grandeza do fluxo eletrosmótico. No modo de injeção hidrodinâmica, a amostra é introduzida no capilar por uma diferença de pressão que se estabelece entre o reservatório do eletrólito e o capilar, sendo assim, o volume injetado depende do tempo de injeção, dimensões do capilar e viscosidade da solução tampão⁴⁶.

1.3.2 O FLUXO ELETROSMÓTICO

Outro fator fundamental em eletroforese capilar é a presença do fluxo eletrosmótico, (EOF, do inglês “electroosmotic flow”)⁴⁶. Este fenômeno ocorre no interior dos capilares de sílica fundida quando em contato com uma solução com valor de pH acima de 2. Na superfície do capilar estão dispostos os grupamentos

silanol que apresentarão um caráter ácido neste pH e portanto encontram-se desprotonados conferindo carga negativa à parede, então ocorre uma interação entre a solução que preenche o capilar e os grupos silanóis, com isso os prótons H^+ migrarão para o seio da solução.

No momento em que o campo elétrico é aplicado, os íons H^+ hidratados movimentam-se em direção ao eletrodo de carga oposta, este movimento de migração faz com que moléculas de água sejam transportadas induzindo um fluxo de solução como um todo na direção do cátodo, caracterizando assim o fluxo eletrosmótico.

Este fluxo é o responsável pela condução dos analitos sem distinção de cargas até o detector, possibilitando a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos. Este movimento de migração das moléculas quando ocorre do pólo positivo para o pólo negativo é denominado fluxo eletrosmótico normal, e seu mecanismo está ilustrado na Figura 3⁴⁶.

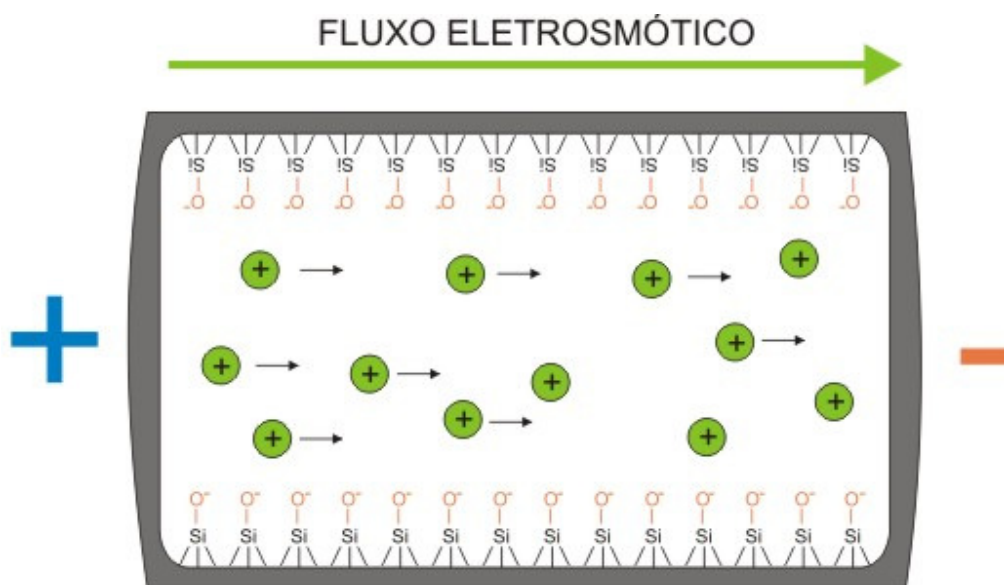


Figura 3: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal

1.3.3 MODOS DE SEPARAÇÃO

Atualmente, o termo eletroforese tem sido utilizado genericamente para designar todos os tipos de técnicas de separação que englobem o estabelecimento de um campo elétrico ao longo de um tubo capilar. No entanto, cada modo de separação eletroforético possui suas próprias características, o que varia entre um processo e outro é o preenchimento da coluna e a solução tampão empregada⁴⁵.

Alguns destes modos são:

- Eletroforese Capilar em Zona (CZE, do inglês “capillary zone electrophoresis”)
- Eletroforese Capilar em Gel (CGE, do inglês “capillary gel electrophoresis”)
- Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF, do inglês “capillary isoelectric focusing”)
- Isotacoforese Capilar (CITP, do inglês “capillary isotachopheresis”)
- Eletrocromatografia Capilar (CEC, do inglês “capillary electrochromatography”)
- Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC, do inglês “micellar electrokinetic chromatography”).

No presente trabalho foram utilizados a Eletroforese Capilar em Zona (CZE) e a Cromatografia Eletrocinética Micelar (MECK).

1.3.3.1 ELETROFORESE CAPILAR EM ZONA (CZE)

A separação em CZE consiste em introduzir a amostra num tubo capilar na presença de uma solução tampão (aquosa ou orgânica), ao qual é aplicado uma diferença de potencial. Após a geração de um campo elétrico ao longo do tubo capilar, os componentes da amostra migram com velocidade constante, independentemente uns dos outros, como consequência de suas mobilidades^{27,45}.

O mecanismo de separação é baseado nas diferenças de razão volume/carga dos solutos em um dado valor de pH. Na CZE espécies neutras não são separadas, porém é permitida a separação de cátions e ânions na mesma corrida⁴⁷.

1.3.3.2 CROMATOGRAPHIA ELETROKINETICA MICELAR (MECK)

Estabelecida em 1984 por S. Terabe⁴⁸ e colaboradores, a MECK é caracterizada como uma versão modificada da CE. Neste mecanismo de separação, uma espécie carregada, as micelas, as quais possuem interação com moléculas neutras, são utilizadas como parte da composição do eletrólito de separação em quantidades que excedem a concentração micelar crítica (cmc).³⁵

Nestes estudos pioneiros, Terabe descreve o mecanismo de separação por MECK, onde micelas formadas por dodecilsulfato de sódio (SDS), carregadas negativamente, se deslocam no sentido do fluxo eletrosmótico, com velocidade v_{mc} . Utilizando-se polaridade normal, moléculas neutras que não possuam interação com as micelas de SDS deverão se mover com a velocidade do fluxo eletrosmótico, v_{EOF} . Moléculas neutras com alto caráter apolar se comportam de maneira a ficarem

retidas no interior das micelas e, portanto adquirindo velocidade entre v_{EOF} e v_{mc} .⁴⁸ A Figura 4 ilustra o processo de separação por MEKC.

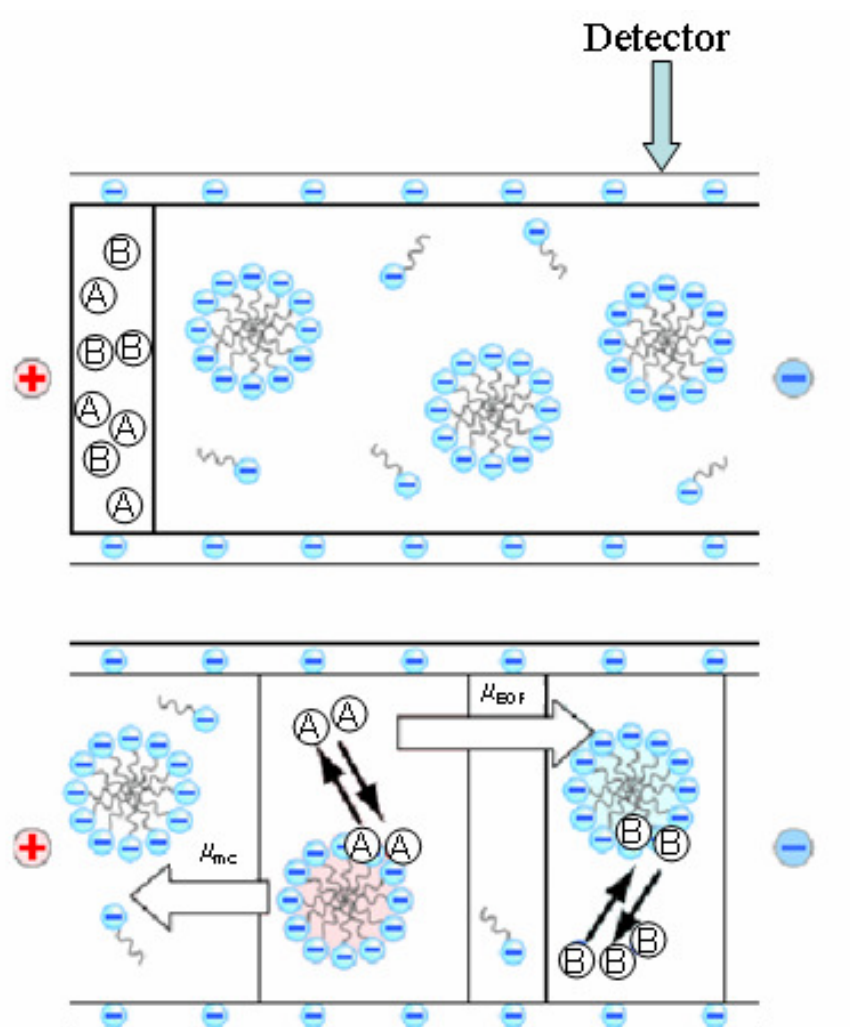


Figura 4: Mecanismo de separação por MEKC.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica para determinação de parabenos em produtos cosméticos e determinar o valor das constantes de interação analito-micela (K_{HA} e K_{A^-}) e valor do pK_a dos analitos aplicando MECK.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização do método de separação e quantificação dos parabenos através de CZE;
- Utilização de softwares de simulação de eletroforese capilar para otimização do método de separação;
- Estudo da interação dos parabenos com micelas aniônicas de dodecilsulfato de sódio (SDS);
- Utilização de modelos numéricos para determinação das constantes.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada (desionizador Mili-Q, Milipore, Bedford, MA, E.U.A.).

3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras analisadas foram: creme hidratante para o corpo, xampu, queratina líquida – tratamento para cabelos, anti-séptico bucal, extrato de banana e extrato de aloe vera. Foram estabelecidas curvas de calibração, obtidas com concentrações da solução padrão na ordem de 1 a 40 mmol L⁻¹, o padrão interno utilizado foi o ácido cinâmico, com concentração de 10 mg L⁻¹. O eletrólito de corrida empregado foi composto por trietilamina (TEA) 30 mmol L⁻¹, ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) 20 mmol L⁻¹ e Hexa-Br 0,2 mmol L⁻¹. Para o preparo das amostras, utilizou-se 100 mg de amostra para 10 g de água; as amostras foram agitadas durante 10 min e centrifugadas por 5 min (1000 rpm).

3.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INTERAÇÃO ANALITO-MICELA

Os reagentes utilizados para o preparo das soluções tampão foram:

- hidrogênio ortofosfato disódico dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O) e dihidrogênio ortofosfato sódico dihidratado (NaH₂PO₄·2H₂O), (Merk, Rio de Janeiro), para solução com pH 7,5.
- tris-metilaminometano (TRIS) e HIBA, obtidos da (Sigma Aldrich, São Paulo) para soluções com valores de pH entre 8,0 a 9,0.
- carbonato de sódio (Na₂CO₃), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), (Merck, Rio de Janeiro) para soluções com pH entre 9,5 e 10,5.
- hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L⁻¹ para ajustar o pH.

Os eletrólitos de corrida foram preparados com os tampões determinados para cada pH e com diferentes concentrações de SDS, variando de 0 a 40 mmol L⁻¹.

Para a injeção foi feita uma mistura das soluções: solução estoque padrão dos parabenos, (Merck, Rio de Janeiro) preparados individualmente em água na concentração aproximada de 1000 mg L⁻¹; soluções de tampão; pireno em quantidades de 10 µL, 20 µL ou 30 µL (conforme necessidade) e 10 µL de acetona como marcador do fluxo eletrosmótico.

3.3 EQUIPAMENTOS

As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar, da marca Agilent Technologies, modelo HP^{3D} (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com um detector de arranjo de diodos. As medidas foram realizadas a 25 °C em capilar de sílica fundida proveniente da empresa Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA); o tamanho do capilar utilizado na determinação das amostras foi de 32 cm (8,5 cm tamanho efetivo) e para a determinação das constantes de interação analito-micela foi de 48,5 cm e (40 cm de tamanho efetivo). Antes da primeira utilização os capilares foram condicionados a 25°C da seguinte forma: 30 minutos com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹, 30 minutos com água e 20 minutos com o eletrólito de corrida a ser utilizado na análise. O condicionamento entre as corridas foi de 1 minuto com o eletrólito de corrida. Ao final de cada sessão de análise foi necessário lavar o capilar com NaOH e com água deionizada, 10 minutos cada.

A detecção através do UV, foi realizada no comprimento de onda de 297 nm. O programa para aquisição e tratamento de dados utilizado foi o software HP Chemstation. A injeção foi hidrodinâmica com pressão de 50 mbar, durante 3 segundos. O sistema eletroforético foi operado através de polaridade positiva, aplicada na extremidade de injeção e tensão constante de 30 kV.

Os valores de pH foram checados com um pHmetro MICRONAL – B474.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento do método e quantificação das amostras

Para o desenvolvimento do método de separação do BP, PP, EP e MP, construíram-se curvas com valores obtidos do software Peakmaster® e utilizando dados de pK_a e mobilidade iônica citados por Muijselaar e colaboradores.³³

São apresentadas as curvas de mobilidade efetiva (μ_{eff}), valores de dispersão por eletromigração (EMD), capacidade tamponante e condutividade para eletrólitos de corrida constituídos de um valor constante de 20 mmol L⁻¹ de HIBA e valores variáveis de 22 – 45 mmol L⁻¹ de TEA, estabelecendo faixa de pH conforme ilustrado na Figura 5.

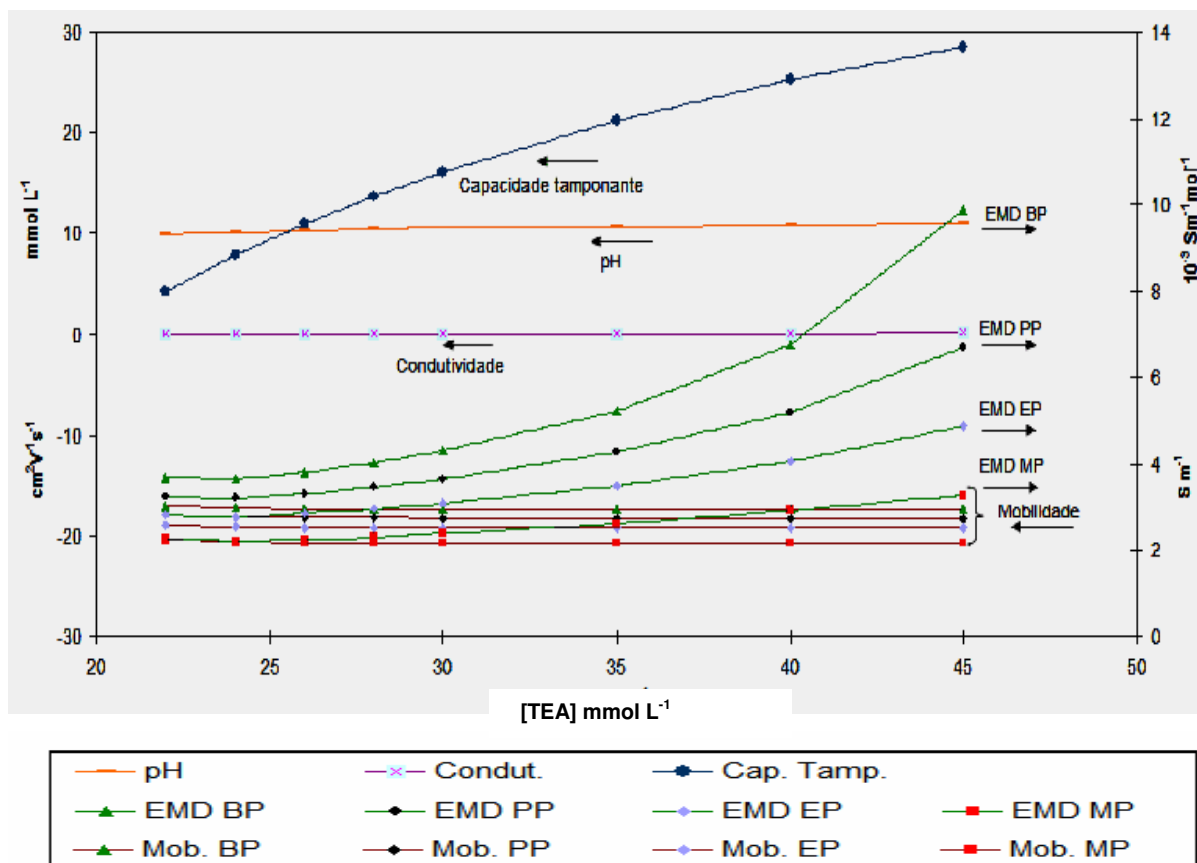


Figura 5: Curvas construídas utilizando o software *Peakmaster*®. Condição analítica: concentração constante de 20 mmol L⁻¹ de HIBA e concentração de TEA variando de 22 a 45 mmol L⁻¹

De acordo com estes dados, determinou-se como condição satisfatória para a separação, o eletrólito constituído por 20 mmol L⁻¹ de HIBA e 30 mmol L⁻¹ de TEA,

pois nesta condição há um valor adequado de capacidade tamponante e o valor de EMD é suficientemente baixo para a obtenção de picos simétricos. Quanto ao pH, a condutividade e as diferenças de mobilidade efetiva, é possível a utilização de quaisquer condições dentro dos limites estudados, uma vez que estas grandezas se mostraram praticamente constantes.

Na Figura 6 (A) é apresentado um eletroferograma com as condições estabelecidas: eletrólito de corrida com concentração de 20 mmol L⁻¹ de HIBA, 30 mmol L⁻¹ de TEA. Injeção hidrodinâmica 50 mbar, 3 s; tensão aplicada 30 kV, polaridade positiva; detecção em 297 nm. Pode-se observar que em tais condições experimentais não foi obtida a separação completa dos parabenos devido a alta mobilidade do fluxo eletrosmótico.

Uma maneira de reduzir a mobilidade do fluxo eletrosmótico é utilizando Hexa-Br como componente do eletrólito de corrida. Na Figura 6 B-D, são apresentados eletroferogramas obtidos utilizando-se as mesmas condições experimentais do eletroferograma da Figura 6A variando-se a concentração de Hexa-Br.

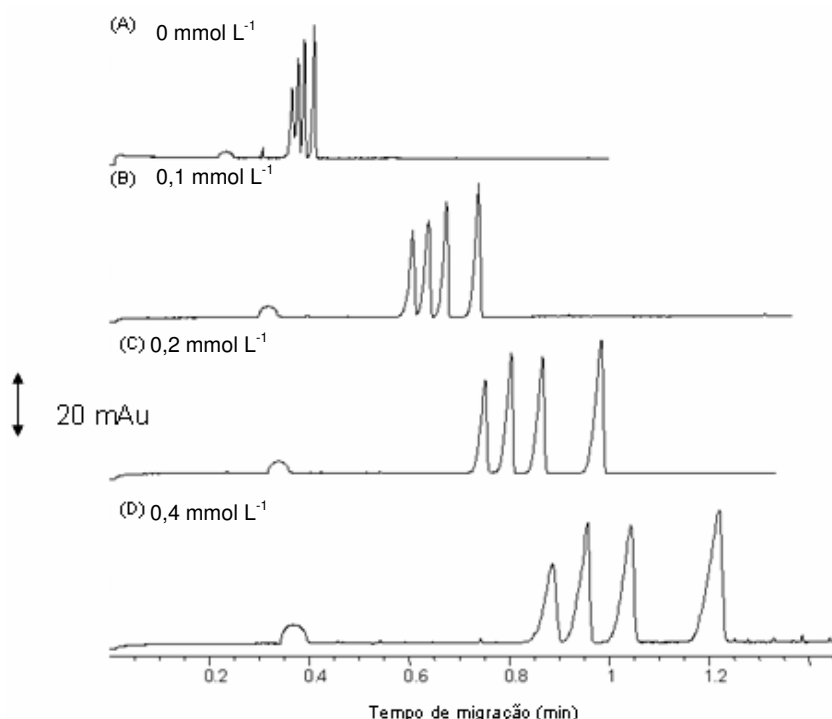


Figura 6: Eletroferogramas com diferentes concentrações de Hexa-Br adicionadas ao eletrólito de corrida. Condições analíticas: eletrólito de corrida com concentração de 20 mmol L⁻¹ de HIBA, 30 mmol L⁻¹ de TEA e com concentrações de Hexa-Br variando de 0 a 0,4 mmol L⁻¹. Injeção hidrodinâmica 50 mbar, 3 s; tensão aplicada 30 kV, polaridade positiva; detecção em 297 nm.

Foi determinada a concentração de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 6(C)) de Hexa-Br, como a adequada, pois foi alcançada a resolução completa dos analitos em um curto tempo de análise.

Foi escolhido o ácido cinâmico como padrão interno para minimizar erros de injeção. A Figura 7 mostra o eletroferograma referente à separação dos analitos e o padrão interno nas condições otimizadas.

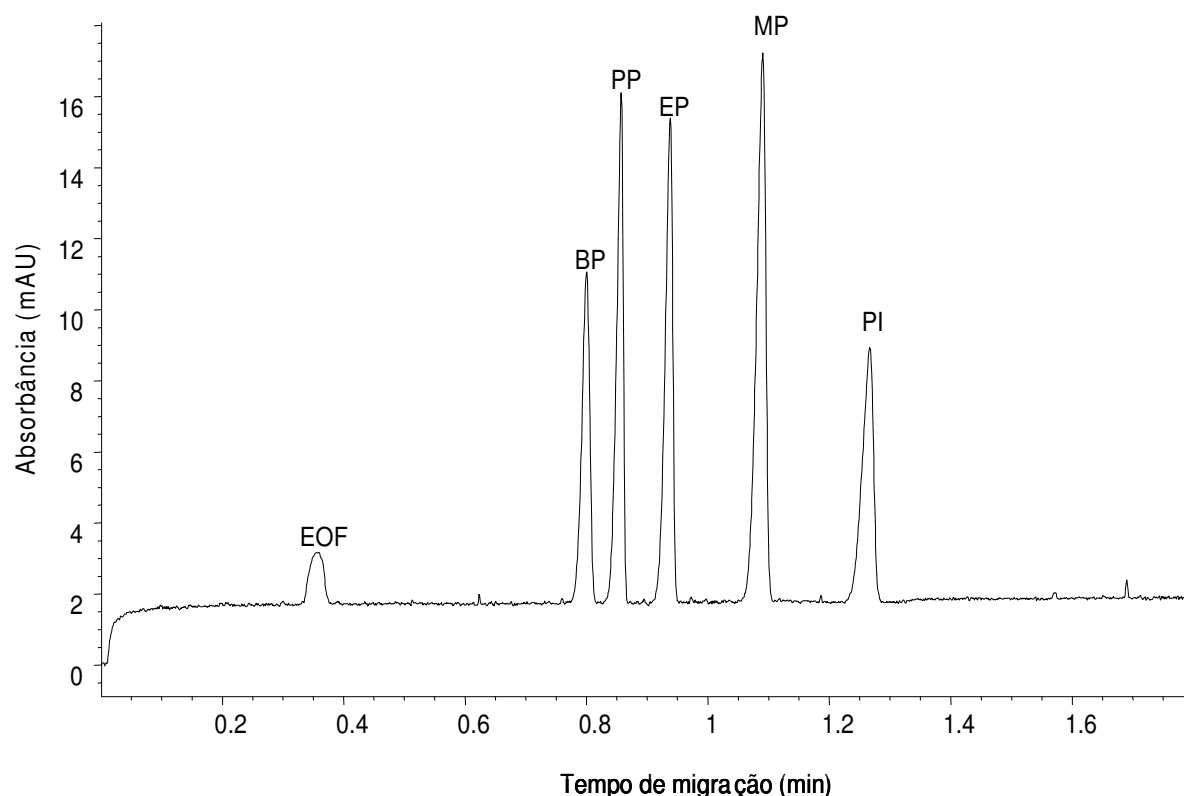


Figura 7: Eletroferograma dos padrões de parabeno e do padrão interno. Condições analíticas: eletrólito constituído por 20 mmol L^{-1} de HIBA, 30 mmol L^{-1} de TEA e $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Hexa-Br; injeção hidrodinâmica 50 mbar, 3 s; tensão aplicada 30 kV, polaridade positiva; detecção em 297 nm.

Foram construídas curvas de calibração com variação de 1 a 40 mg L^{-1} mantendo-se fixa a concentração do padrão interno em 10 mg L^{-1} , os valores dos coeficientes linear (b) e angular (a) bem como o coeficiente de determinação (R^2) estão apresentados na Tabela 1. Foram obtidos valores para o coeficiente de determinação maior que 0,99.

Tabela 1: Dados obtidos das curvas de calibração.

Analito	a	b	R ²
Metilparabeno	0.107477	-0.03367	0.997
Etilparabeno	0.135916	-0.04399	0.997
Propilparabeno	0.146873	-0.03477	0.997
Butilparabeno	0.204663	-0.0749	0.997

A Figura 8 apresenta os eletroferogramas obtidos para a análise dos parabenos nas amostras de extrato de banana (A), anti-séptico bucal (B), xampu (C) e creme hidratante para o corpo (D).

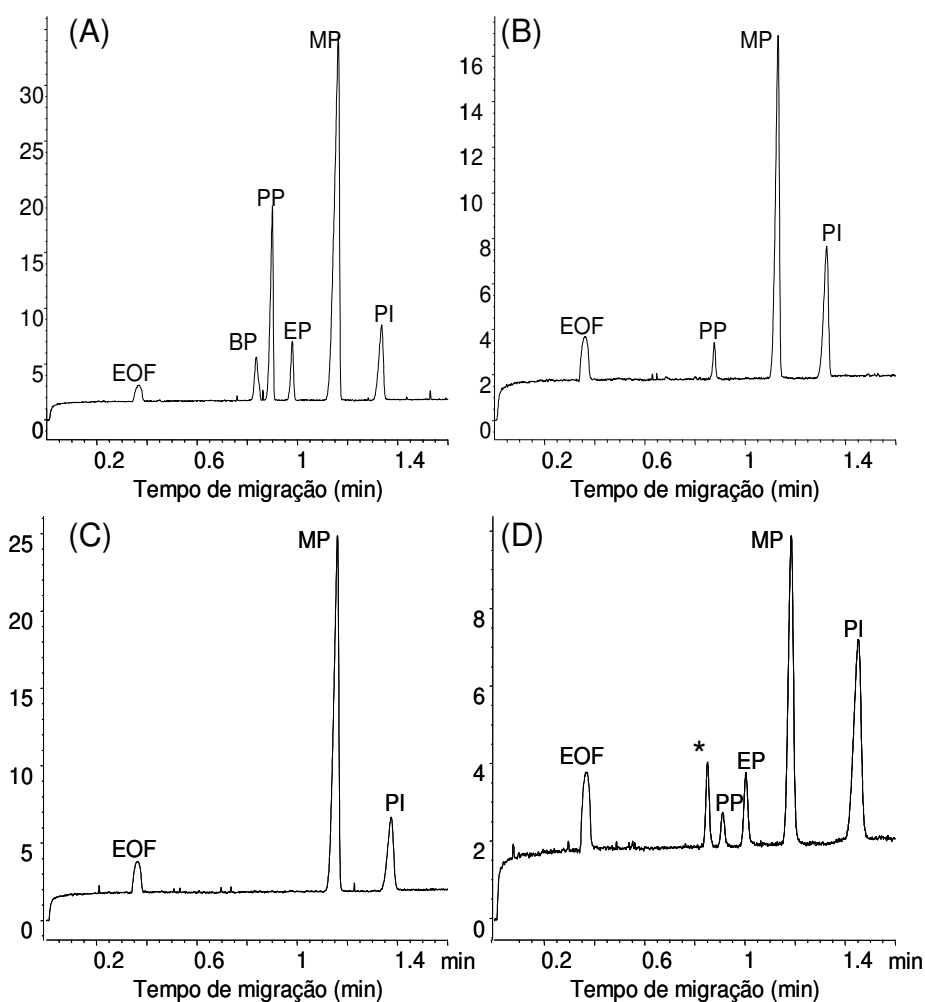


Figura 8: Eletroferogramas das amostras: (A) Extrato de banana, (B) Anti-séptico bucal, (C) Xampu e (D) Creme hidratante para o corpo. Condições analíticas: eletrólito constituído por 20 mmol L⁻¹ de HIBA, 30 mmol L⁻¹ de TEA e 0,2 mmol L⁻¹ de Hexa-Br; injeção hidrodinâmica 50 mbar, 3 s; tensão aplicada 30 kV, polaridade positiva; detecção em 297nm. * Pico desconhecido.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos na quantificação das amostras.

Tabela 2: Resultados da quantificação das amostras.

Amostra	MP (mg)	EP (mg)	PP (mg)	BP(mg)	Total (g)	%
Creme hidratante para o corpo	260,1	215,1	942,7	nd	1,42	0,14
Xampu	3868,0	nd	nd	nd	3,87	0,39
Queratina líquida	3927,6	nd	nd	nd	3,93	0,39
Anti-séptico bucal	157,8	nd	1536,6	nd	1,69	0,17
Extrato de banana	193,5	1307,6	370,6	2804,5	4,97	0,50
Extrato de aloe vera	796,5	nd	3185,5	nd	3,98	0,40

Legenda: nd. -Não detectado.

Os eletroferogramas obtidos das amostras confirmam as informações apresentadas no rótulo dos produtos, quanto a indicação de qual ou quais parabenos estão presentes em cada amostra. Na tabela de quantificação, pode-se perceber que as amostras, apresentaram-se dentro do limite permitido, estabelecido pela ANVISA, na Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000.

4.2 Determinação das constantes de interação analito-micela

A Tabela 3 estabelece quais foram as condições empregadas para a obtenção das constantes de interação analito-micela.

Tabela 3: Composição de cada solução tampão.

Solução Tampão	pH	[SDS] (mmol L ⁻¹)
Fosfato/Sódio	7,59	0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04
TRIS/HIBA	8,39	0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04
TRIS/HIBA	8,58	0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04
TRIS/HIBA	8,93	0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04
Sódio/Carbonato	9,52	0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04
Sódio/Carbonato	10,08	0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04
Sódio/Carbonato	10,61	0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04

A Figura 9 representa um comparativo dos valores de k dos parabenos em um mesmo valor de pH. Pode-se observar que os valores de k aumentam a medida que o comprimento da cadeia aumenta, ou seja, quanto mais hidrofóbico o analito maior o valor de k . Em pH 7,59 os parabenos estão essencialmente neutros tendo em vista que o pK_a é de aproximadamente 8,5, assim a interação com as micelas é máxima.

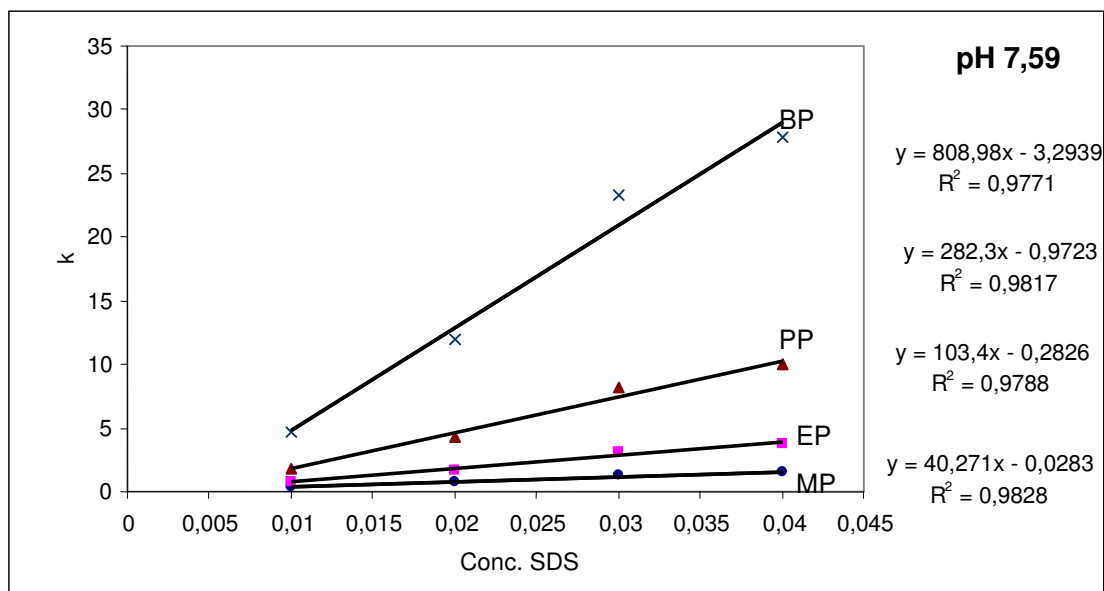


Figura 9: Comparativo do comportamento k do BP, MP, EP e MP em pH de 7,59 e com variações de SDS de 0 a 0,4 mmol L⁻¹ na composição do eletrólito de corrida.

Estão apresentados na Figura 10 os resultados de k obtidos para o BP em diferentes valores de pH.

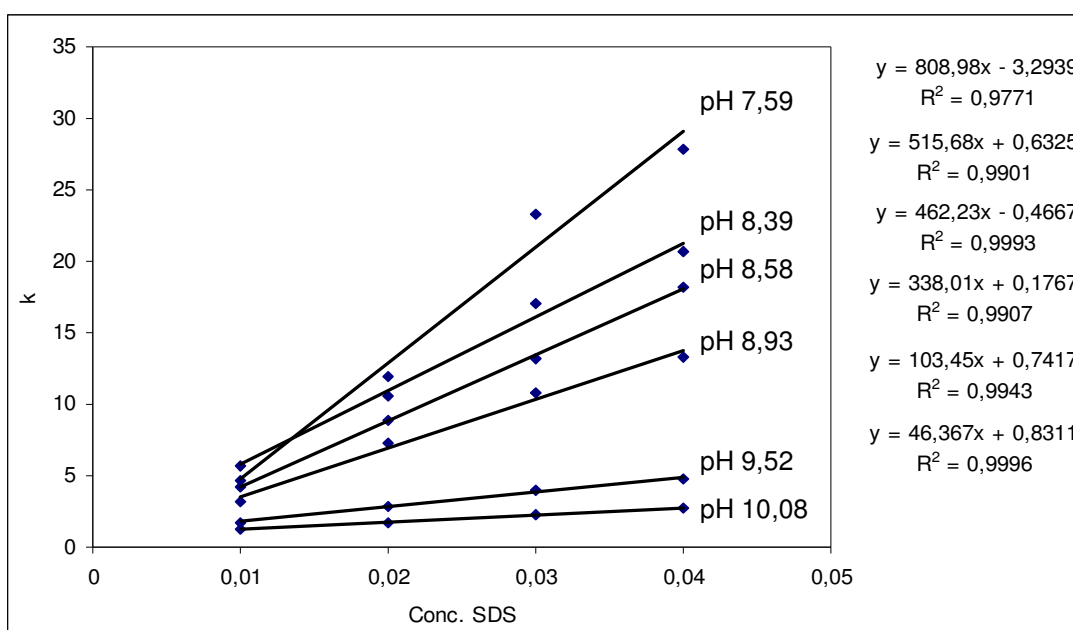


Figura 10: Comportamento da variação de SDS em função de cada pH estudado para o BP.

Pode-se observar que a medida que o pH aumenta o valor de k diminui devido a um aumento da carga efetiva o que implica numa redução da hidrofobicidade.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados obtidos para as constantes de interação analito-micela para os quatro parabenos, utilizando-se as Equações (4) e (6). Os valores utilizados para a cmc dos analitos em cada uma das condições, foram os citados por Téllez e colaboradores³¹.

Tabela 4: Valores obtidos para as constantes de interação analito-micela.

	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
K_{HA}^m	40,2 40,27	103,88 103,4	289,45 282,3	806,25 808,98
$K_{A^-}^m$	3,4 3,45	40,65 13,28	50,1 37,91	37,43 46,37
pK_a	8,76	8,73	8,72	8,77

Obs: Os valores em negrito referem-se ao resultado obtido pela Equação (4) e os que não estão em negrito, aos obtidos pela Equação (6)

Os valores de K_{HA}^m aumentam com o aumento da interação do grupo alquil dos parabenos, conforme o aumento da série homóloga, enquanto que os valores de $K_{A^-}^m$ diminuíram de acordo com o aumento da série homóloga. Considerando os modelos matemáticos utilizados, pode-se observar que os valores não diferem significativamente, principalmente para os valores de K_{HA} .

Quanto aos valores de pK_a, estes foram obtidos utilizando-se a Equação 4. Na literatura o valor relatado do pK_a é de aproximadamente 8,5.

5. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a técnica de eletroforese capilar pode ser aplicada, de forma rápida e eficiente, para determinar parabenos em amostras de cosmético; complexas como é o caso de xampu e creme hidratante, sem necessidade de prévia preparação da amostra, além de diluição e centrifugação. Os valores obtidos dos parabenos nas amostras de cosméticos analisadas apresentaram-se dentro do limite permitido, 0,4% quando aplicado individualmente e 0,8% quando associados, estabelecido pela ANVISA.

Quanto aos resultados das constantes de interação analito-micela, pode-se observar que o aumento dos valor das mesmas ocorreu conforme o aumento do grupo alquil do parabeno. Dos modelos matemáticos utilizados para medir estas constantes, percebeu-se pequena diferença nos resultados, no entanto, os valores de pK_a , foram superiores a faixa do valore citado pela literatura ($\sim 8,5$).

REFERÊNCIAS

1. YE, X. et al. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 884, p. 53-59, 2006.
2. CANOSA, P. et al. Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, p. 3-10, 2006.
3. ELDER, R.L. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 3, p.147, 1984.
4. ANVISA. Estabelece a definição e Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes e outros com abrangência neste contexto. Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000. Diário Oficial da União.
5. ORTH, D.S. Use of parabens as cosmetic preservatives. **International Journal of Dermatology. Int. J.**, v. 19, p. 504-505, 1980.
6. JACKSON, E.M. Moisturizers of today. **Journal of Toxicology - Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 11, p. 173-184, 1992.
7. SONI, M.G. Et al. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p. 1335-1373, 2002.
8. SONI, M.G.; CARABIN, I.G.; BURDOCK, G.A. Burdock. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 985-1015, 2005.
9. ROUTLEDGE, E.J. et al., Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 153, p. 12-19, 1998.
10. GOLDEN, R.; GANDY, J.; VOLLMER, G. A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health. [Critical Reviews in Toxicology](#), v. 35, p. 435-458, 2005.
11. BYFORD, J.R. et al. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 80, p. 49-60, 2002.
12. DARBRE, P.D. et al. Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. **Journal of Applied Toxicology**. v. 22, p. 219-226, 2002.

13. OISHI, S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. **Toxicology and Industrial Health**. v. 17, p. 31, 2001.
14. OISHI, S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1845-1849, 2004.
15. SONI, M. G. Et al. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 513-532, 2001.
16. KIWADA, H.; AWAZU, S.; HANANO, M. The study on the biological fate of paraben at the dose of practical usage in rat. I. The metabolism and excretion of ethyl p-hydroxybenzoate (ethyl paraben) and p-hydroxybenzoic acid. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**., v. 2, p. 356-364, 1979.
17. CROO, F.D. et al. **Chromatographia**, v. 18, p. 260, 1984.
18. LIN, H.J.; CHOONG, Y.M. Kinetics and mechanism of acid dissociation of nickel(II) complexes of novel C-functionalized macrocyclic dioxotetraamines. **Journal of Coordination Chemistry**. v. 46, p. 291-299, 1999.
19. MYINT, A. et al. Flow injection-chemiluminescence determination of paraben preservative in food safety. **Analytica Chimica Acta**, v. 517, p.119–124, 2004.
20. BURINI, G. Determination of the alkyl esters of p-hydroxybenzoic acid in mayonnaise by high-performance liquid chromatography and fluorescence labelling. **Journal of Chromatography A**. v. 664, p. 213-219, 1994.
21. MAEDA, Y. et al. High-performance liquid chromatographic determination of six p-hydroxybenzoic acid esters in cosmetics using Sep-Pak florisil cartridges for sample pre-treatment. **Journal of Chromatography A**. v. 410, p.413-418, 1987.
22. SERRANO, F.O.; LOPEZ, I.S.; REVILLA, G.N. **Journal of Liquid Chromatography**., v. 14, p. 709, 1991.
23. HEO, Y.J.; LEE, K.J. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.17, p.1371,1998.
24. WANG, S.P.; CHANG, C.L. **Analytica Chimica Acta**, v. 377, p. 85, 1998.
25. LIN, Y.H. et al. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, p.345, 2000.
26. SILVA, J. A. F., et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**. v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.
27. CHEMKEYS. **Eletroforese Capilar: Vantagens e Limitações**. Disponível em: <http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elec4p_4/vel_18/vel_18.htm>. Acesso em: 14 de maio de 2008.

28. SCOTTI, Luciana. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, 2007.
29. GHOSE, A.K.; PRITCHETT, A.; CRIPPEN, G.M. Atomic physicochemical parameters of three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships III: Modeling hydrophobic interactions. **Journal of Computacional Chemistry**, v. 9, n. 1, p.80-90, 1988.
30. KOROTKOVA, E.I. et al., Investigation of antioxidant activity and lipophilicity parameters of some preservatives. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 324–332, 2005.
31. TÉLLEZ, Adolfo, FUGUET, Elisabet, ROSÉS, Martí. Comparison of migration models for acidic solutes in micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, p. 143–151, 1997.
32. KHALEDI, M.G.; SMITH S.C.; STRASTERS, J.K. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 1820, 1991.
33. MUIJSELAAR, P.G., CLAESSENS, H.A.; CRAMERS, C. A. Migration behaviour of monovalent weak acids in micellar electrokinetic chromatography - Mobility model versus retention model. **Journal of Chromatography A**, v. 765, p. 295-306, 1997.
34. MICKE, Gustavo A., et al. A ssessing the separation of neutral plant secondary metabolites by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1004, p. 131–143, 2003.
35. SKOOG, D.A, HOLLER, F.J., NIEMAN, T. **Princípios de análise instrumental**. Tradução de Ignez Caracelli [et al.] 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 687 p..
36. SILVA, F.A.J. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, p. 56, 2003.
37. HJERTÉN, S.; **Chromatography**, Rev. V. 9, p.122, 1967.
38. MIKKERS, F.E.P.; EVERAERTS, F.M.; VERHEGGEN, T.P.E.M.; **Chromatogr.**, v. 11, p. 169, 1979.
39. JORGENSEN, J.W.; LUKACS, K.D.; **Analytical Chemistry** v. 53, p. 1298, 1981.
40. TAVARES, M.F.M., MCGUFFIN, V.L.; Theoretical-Model of Electroosmotic Flow For Capillary Zone Electrophoresis **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 3687-3696, 1995.
41. PIATAK, M., et. al., Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. **Biotechniques**, v. 70-81, p.14, 1993.

42. NORTHROP, D.M., MCCORD, B.R., BUTLER, J.M.; Forensic applications of capillary electrophoresis, **Journal of Capillary Electrophoresis**, v.1, p. 158, 1994.
43. GORDON, M.J, et. al., Protocol for Resolving Protein Mixtures in Capillary Zone Electrophoresis, **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 69 -72, 1991.
44. FRENZ, J., WU, S.L.; HANCOCK, W.S., Separation of Collagens by Capillary Zone Electrophoresis, **Journal of Chromatography A**, v. 480, p. 371-378, 1989.
45. SILVA, J.A.F. et. al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**. v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.
46. TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.
47. AGILENTE TECHNOLOGIES – Capillary Electrophoresis Principles, Disponível em:<<http://www.chem.agilent.com/Scripts/Generic.ASP?!Page=833&indcol=N&pr odcol=Y>>. Acesso em: 13 de maio de 2008.
48. TERABE, S. et al. **Analytical Chemistry**, v. 56, p. 111, 1984.