

Alysson Vasques Fernandes Sako

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE METIL, ETIL, PROPIL E
BUTILPARABENO ADSORVIDO EM CABELO POR CZE-UV
MEDIANTE *STACKING* POR POLARIDADE REVERSA
AUTOMÁTICA**

Dissertação de mestrado submetida ao
Programa de Pós Graduação de
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu
Micke

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Sako, Alysson Vasques Fernandes

Determinação simultânea de metil, etil, propil e
butilparabeno adsorvido em cabelo por cze-uv mediante
stacking por polaridade reversa automática / Alysson
Vasques Fernandes Sako ; orientador, Gustavo Amadeu Micke
- Florianópolis, SC, 2015.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. parabenos. 3. cabelo. 4. eletroforese
capilar. 5. pré-concentração online . I. Micke, Gustavo
Amadeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Alysson Vasques Fernandes Sako

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE METIL, ETIL, PROPIL E BUTILPARABENO ADSORVIDO EM CABELO POR CZE-UV MEDIANTE *STACKING* POR POLARIDADE REVERSA AUTOMÁTICA

Esta Dissertação foi julgado(a) adequado(a) para obtenção do Título de Mestre em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de pós graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 20 de Julho de 2015.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
Orientador- UFSC

Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Luiz Augusto Dos Santos Madureira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Luciano Vitali
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Cristiane Luisa Jost
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a Deus, a
minha família e aos meus amigos do
LABEC.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por nos conceder os dons e talentos necessários para o desenvolvimento da ciência. Também agradeço ao meu orientador e amigo Gustavo Amadeu Micke por todo cuidado e apoio acadêmico ao longo dos anos em que estive trabalhando em seu laboratório.

Também agradeço a minha família que me apoiou durante todo meu crescimento na vida acadêmica e me incentiva até hoje a continuar crescendo.

À Maressa pela ajuda e tempo concedido, à Lizandra pelas amostras de cabelos, ao Alex pelas manutenções realizadas nos instrumentos sem os quais não teríamos chegado até aqui. Aos amigos do laboratório em especial ao Victor e a Samantha pelos momentos engraçados que compartilhamos.

Aos professores Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira, Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira, Dr. Luciano Vitalli e Dr^a. Cristiane Luisa Jost pelas avaliações e observações construtivas referentes ao trabalho apresentado.

Em conclusão, não poderia me esquecer de agradecer ao INCT-CNPQ e a CAPES por todos os equipamentos que nos deixam a disposição e pelo apoio financeiro.

"E naquele tempo se levantará Miguel, o grande príncipe, que se levanta a favor dos filhos do teu povo, e haverá um tempo de angústia, qual nunca houve, desde que houve nação até àquele tempo; mas naquele tempo livrar-se-á o teu povo, todo aquele que for achado escrito no livro.

E muitos dos que dormem no pó da terra ressuscitarão, uns para vida eterna, e outros para vergonha e desprezo eterno.

Os que forem sábios, pois, resplandecerão como o fulgor do firmamento; e os que a muitos ensinam a justiça, como as estrelas sempre e eternamente.

E tu, Daniel, encerra estas palavras e sela este livro, até ao fim do tempo; muitos correrão de uma parte para outra, e o conhecimento se multiplicará."

Daniel 12:1-4

RESUMO

Os parabenos são ésteres derivados do ácido p-hidroxibenzóico. Esses compostos orgânicos são incolores, inodoros e apresentam atividades bactericidas. Devido a essas características, os parabenos são utilizados como conservantes em produtos como fármacos, cosméticos e alimentos desde de a década de 1920. Entretanto, estudos publicados recentemente demonstraram que os parabenos apresentavam atividades estrogênicas e talvez cancerígenas. Outras pesquisas científicas demonstrando que os parabenos apresentaram capacidade de permeação dérmica ou que poderiam formar forte oxidante dentro de condições específicas. Por esses motivos, o proposto trabalho verificou a capacidade de adsorção dos parabenos em amostras de cabelo durante um processo de lavagem com xampu. A técnica de escolha para análise dos parabenos em amostras de cabelo foi a eletroforese capilar em zona com detecção no UV aprimorada com pré-concentração *online*. Métodos de pré-concentração *online* são utilizados para aumentar a detectabilidade dos métodos desenvolvidos por eletroforese capilar. Entre os métodos de pré-concentração *online* descritos na literatura está o modo de reversão de polaridade do eletrodo, cujo método é baseado na aplicação de uma voltagem contrária a voltagem de separação após a injeção da amostra para realização da pré-concentração. Entretanto, a reversão da polaridade durante a análise normalmente é realizada de maneira manual pelo operador. Por esse motivo, os métodos apresentados na literatura carecem de parâmetros de precisão. Nesse trabalho foi desenvolvido um modo de reversão automático da polaridade do eletrodo para análise rápida de metil, etil, propil e butilparabeno em amostras de cabelo. O método apresenta limites de detecção e de quantificação melhores que $0,017 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,050 \text{ mg L}^{-1}$. Os parâmetros de precisão método automático também apresentaram valores de desvio padrão relativo aceitáveis, cujos valores não ultrapassaram 6,2%. As análises de amostras de cabelos lavados com xampu contendo metil, etil, propil e butilparabeno demonstraram que todos as amostras de cabelos adsorveram os parabenos citados. Em geral, parabenos mais hidrofílicos foram encontrados em maior concentração nas amostras testadas.

Palavras-chave: Parabenos; cabelo; adsorção; eletroforese capilar; *stacking*

ABSTRACT

Parabens are esters derived of p-hydroxybenzoic acid. These organic compounds are colorless, odorless and it exhibit bactericidal activity. Because of these characteristics, parabens are used as preservatives in products such as pharmaceuticals, cosmetics and food since 1920s. However, recently published studies demonstrated that parabens have estrogenic activity and maybe carcinogen activity. Another scientific researches demonstrated that parabens permeate through the skin or that it could generate strong oxidant under specified conditions. Therefore, the proposed work verified the adsorption capacity of parabens unto hair samples during a simulated washing process with shampoo. The chosen technique to analysis of parabens in hair samples was capillary zone electrophoresis with UV detection improved with online preconcentration. Methods of preconcentration are performed to increase the detectability of the methods in capillary electrophoresis. Among the methods of online preconcentration described in the literature there is the reverse electrode polarity stacking mode, which method is based in the application of a reverse voltage after the sample injection to perform the stacking process before the application of the voltage separation. However, the polarity is reversed manually by the operator. Thus, methods which this stacking process is used usually lack in precision parameters. This work describes the development of an fast and automatic reverse electrode polarity stacking mode to analysis methyl, ethyl, propyl and butylparaben in hair samples. The proposed has LOD and LOQ better than 0,017 mg L⁻¹. The precision parameters of the method are below 6,2% (RSD). Five human hair samples were analyzed after the washing with shampoo containing methyl, ethyl, propyl and butylparaben and all the samples tested adsorbed the four parabens. In general, the concentration of parabens adsorbed unto hair increased with the hydrophilic character of the paraben.

Keywords: *Parabens; hair; adsorption; electrophoresis; stacking.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Componentes básicos de um instrumento de eletroforese capilar com detecção por UV/VIS (adaptado Weinberger, 2000).....27
- Figura 2:** Amostras de cabelo classificadas de A até E utilizadas para teste de adsorção de parabenos durante a lavagem com xampu.....37
- Figura 3:** Representação esquemática do procedimento para análise de parabenos adsorvidos em amostras de cabelo após a lavagem com xampu.....47
- Figura 4:** Curvas de mobilidade efetiva vs pH dos parabenos e do padrão interno (PI) geradas a partir da equação 8.....48
- Figura 5:** Eletroferograma da injeção de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ dos parabenos e $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido cinâmico em ACN : H_2O 50 % v/v. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV variada de 5 a 55 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C. Ordem de Migração : BP, PP, EP, MP e PI.....50
- Figura 6:** Eletroferograma da injeção de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ dos parabenos e $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido cinâmico em ACN : H_2O 50 % v/v. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV variada de 5 a 55 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C. Ordem de Migração : BP, PP, EP, MP e PI.....52

Figura 7: Eletroferograma da injeção de 1,0 mg L⁻¹ dos parabenos e 0,5 µg L⁻¹ de ácido cinâmico em ACN : H₂O 50 % v/v. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9,3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....54

Figura 8: Curvas de calibração externa obtidas com o método de pré-concentração desenvolvido para os 4 parabenos na faixa de 0,1 a 5,0 mg L⁻¹ em 50% de ACN : H₂O 50% v/v.....55

Figura 9: Espectro de absorção de UV do metilparabeno em pH 9,3. A região de máxima absorção corresponde a 297 nm.....56

Figura 10: Perfil do *stacking* monitorado a cada 5 s até 35 s com injeções de 5 mg L⁻¹ de MP 50% de ACN : H₂O 50% v/v. Após cada tempo monitorado, o *plug* da amostra é empurrado em direção ao detector através da injeção de eletrólito de corrida com 50 mbar durante 13 minutos. A voltagem de separação não foi aplicada após os tempos de *stacking* estudados. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9,3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min. Injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV de 0 a 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....57

Figura 11: Representação das zonas existentes dentro do capilar. Antes da aplicação da diferença de potencial para realização do *stacking* poucas moléculas de MP ionizadas (círculos) devido ao pH mais baixo da região da zona da amostra.....58

Figura 12: Representação dos primeiros instantes logo após a aplicação da diferença de potencial entre os eletrodos. Os íons borato (quadrados) entram na zona da amostra e aumentam o pH na região devido a existência do fluxo eletrosmótico. Assim, a fração molar do MP ionizado (círculos) aumentam. Legenda: EOF - Fluxo eletrosmótico.....59

Figura 13: Representação do *stacking* que ocorre com os íons MP após sua ionização. O MP ionizado apresenta alta velocidade na região da amostra e baixa velocidade na zona do eletrólito. O empilhamento ocorre devido a drástica mudança de velocidade que o MP ionizado (círculo) apresenta nas diferentes duas diferentes zonas. Os íons borato e o fluxo eletrosmótico não estão representados aqui, entretanto eles estão presentes durante todo processo de *stacking*.....60

Figura 14: Perfil pós *stacking* observado em intervalos de 5 s até 50 s com aplicação da voltagem de separação. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9,3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Aplicação de voltagem de separação 30 kV por tempos de 5 a 50 s. Após a voltagem de separação, o *plug* de amostra é empurrado em direção ao detector com eletrólito de corrida durante 13 minutos aplicando-se 50 mbar. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....61

Figura 15: Perfil do pico do MP Antes de ser atravessado pelo fluxo eletrosmótico e depois de ser atravessado pelo fluxo eletrosmótico durante aplicação da voltagem de separação por 10 s e 15 s. Eletroferograma da injeção de 5 mg L⁻¹ dos parabenos ACN : H₂O 50 % v/v. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol. pH :9,3 Injeção: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Logo após, aplicação de 30 KV por 10 e 15, e após esses tempos, a amostra é empurrada em direção ao detector através da injeção de eletrólito de corrida (50 mbar por 13 minutos). Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....62

Figura 16: Eletroferogramas sobrepostos de uma injeção convencional (50 mbar por 3s) de 5 mg L⁻¹ de metilparabeno em ACN:H₂O 50% v/v e a injeção da mesma amostra com o método com o método de *stacking* desenvolvido.....63

Figura 17: Eletroferogramas da mesma amostra de xampu diluído antes (B) e depois adição dos parabenos (A). Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*".

Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....64

Figura 18: Perfil de extração dos parabenos adsorvidos no cabelo. Legenda : A - 1ª etapa da extração, B - 2ª etapa da extração, C- 3ª etapa da extração. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C....66

Figura 19: Perfil de extração dos parabenos adsorvidos no cabelo. Legenda: A- extração direta com 10 mL de ACN: H₂O 50% v/v. B- 2ª extração com 5 mL de ACN : H₂O 50% v/v após lavagem dos cabelos com água deionizada. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....67

Figura 20: Curvas de calibração por adição de padrão em extrato de cabelo e externa para o metilparabeno.....69

Figura 21: Curvas de calibração por adição de padrão em extrato de cabelo e externa para o etilparabeno.....70

Figura 22: Curvas de calibração por adição de padrão em extrato de cabelo e externa para o propilparabeno.....70

Figura 23: Curvas de calibração por adição de padrão em extrato de cabelo e externa para o butilparabeno.....71

Figura 24: Eletroferograma da amostra A diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....73

Figura 25: Eletroferograma da amostra B diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....73

Figura 26: Eletroferograma da amostra C diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....74

Figura 27: Eletroferograma da amostra D diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....74

Figura 28: Eletroferograma da amostra E diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Faixa linear, Limites de detecção e quantificação de alguns métodos descritos na literatura para análise de parabenos através de HPLC em diversas amostras.....	32
Tabela 2: Faixa linear, Limites de detecção e quantificação de alguns métodos descritos na literatura para análise de parabenos através de GC em diversas amostras.....	34
Tabela 3: Faixa linear, Limites de detecção e quantificação de alguns métodos descritos na literatura para análise de parabenos através de CE em diversas amostras.....	36
Tabela 4: Modos mais comuns utilizados em eletroforese capilar e suas principais características.....	39
Tabela 5: Valores de pKa e mobilidade iônica ($\mu_{iônica}$) encontrados na literatura para cada parabeno estudado (MUIJSELAAR; CLAESSENS; CRAMERS, 1997).....	49
Tabela 6: Concentração de MP, PP, EP, BP, encontrada nas amostras de xampu após adição dos padrões.....	65
Tabela 7: Figuras de mérito do método proposto para análise de cabelos.....	68
Tabela 8: Concentração de parabenos adsorvidos em amostras de cabelos.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP – Butilparabeno
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CE - *Capillary electrophoresis* (Eletroforese Capilar)
CZE – *Capillary Zone Electrophoresis* (Eletroforese Capilar em Zona)
EP – Etilparabeno
FASS – Field-Amplified Stacking Sample (*Stacking* da amostra com campo amplificado)
GC - *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)
IEF – *Isoelectric Focusing* (Focalização Isoelétrica)
INCT- CNPQ – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de Quantificação
LVSS – *Large Volume Sample Stacking* (*Stacking* de grande volume de amostra)
MEKC – *Micellar Electrokinetic Chromatography* (Cromatografia Eletrocinética Micelar)
MeOH – Metanol
MP – Metilparabeno
MRB – *Moving Reaction Boundary* (fronteira de reação em movimento)
MSS – *Micelle to Solvent Stacking* (*Stacking* de micela para solvente)
NRB – *Neutralization Reaction Boundary* (Reação de Neutralização na Fronteira)
PDMS – Polidimetilsiloxano
PI- Padrão interno
PP – Propilparabeno
REPSM – *Reverse Electrode Polarity Stacking Mode*
TBS – Tetraborato de Sódio
tMCRB – *transient Moving Chemical Reaction boundary* (fronteira de reação química em movimento transiente)
UV/VIS – Ultravioleta/ Visível
v/v – volume/ volume

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	27
1.1 OS PARABENOS: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E A PROBLEMÁTICA DE SEU USO.....	27
1.2 OS CABELOS.....	28
1.2.1 Capacidade de adsorção do cabelo.....	28
1.2.2 Parabenos e cabelos: por que estudar a relação entre eles?.....	29
1.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E POR ELETROMIGRAÇÃO PARA SEPARAÇÃO DE PARABENOS DESCRITOS NA LITERATURA.....	30
1.4 ELETROFORESE CAPILAR.....	37
1.4.1 Aspectos teóricos e instrumentais.....	37
1.4.2 Classificação dos modos eletroforéticos mais comuns.....	38
1.4.3 Métodos de "stacking" em eletroforese capilar.....	40
1.4.3.1 Princípio básico do <i>stacking</i>	40
1.4.3.2 Diferentes modos de <i>stacking</i>	40
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.1.1 Objetivos Específicos.....	43
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	44
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	44
3.2 INSTRUMENTAÇÃO.....	44
3.3 PROCEDIMENTOS.....	44
3.4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO CZE-UV UTILIZANDO PRÉ CONCENTRAÇÃO POR <i>STACKING</i> DE POLARIDADE REVERSA.....	45
3.5 PREPARO DE AMOSTRA DE XAMPU.....	45
3.6 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO.....	46
3.7 FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO E ANÁLISE DE AMOSTRAS DE CABELO.....	46
3.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE CABELO APÓS LAVAGEM COM XAMPU CONTENDO PARABENOS.....	47

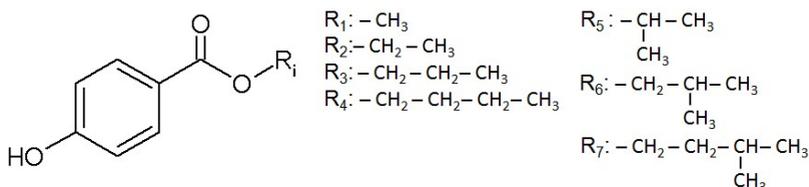
4. Resultados e discussão.....	49
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	49
4.2 ESTUDO DO MÉTODO POR <i>STACKING</i>	56
4.3 ANÁLISE DE AMOSTRA DE XAMPU COMERCIAL ANTES E APÓS ADIÇÃO DE PARABENOS.....	63
4.4 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PARABENOS ADSORVIDOS NO CABELO.....	65
4.5 FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO E ANÁLISE DE AMOSTRA DE CABELOS.....	67
4.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE CABELO.....	71
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1.INTRODUÇÃO

1.1 OS PARABENOS: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E A PROBLEMÁTICA DE SEU USO.

Os parabenos são amplamente utilizados como conservantes sendo adicionados em cosméticos, alimentos e medicamentos devido a sua atuação antimicrobiana. Esses compostos são produzidos comercialmente através da esterificação do ácido *p*-hidroxibenzóico na presença de um álcool em meio ácido.(BLEDZKA; GROMADZINSKA; WASOWICZ, 2014). sua estrutura está representada na Figura 1.

Figura 1: Estrutura básica dos parabenos. O grupo R pode ser metil, etil, butil, propil, isopropil, isobutil, isopentil ou qualquer outro grupo que acompanhe alguma dessas duas séries homólogas.



Entre os parabenos, o metilparabeno é o que melhor atende os requisitos necessários de um bom conservante, sendo algumas de suas características: Apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana, é incolor e inodoro, estável em uma ampla faixa de pH, resistente a hidrólise em água quente ou fria, baixa volatilidade, baixa adsorção em plásticos, baixa toxicidade e não mutagênico (HANDA *et al.*, 2006).

Os parabenos estão presentes em mais de 13200 formulações e esses produtos são aplicados na pele, no cabelo, no couro cabeludo, nos lábios, nas mucosas e nas unhas. Esses compostos também são encontrados em produtos alimentícios. Nos últimos anos, os parabenos têm sido considerados poluentes emergentes constantemente encontrados em esgotos, nos efluentes das estações de tratamento, e em águas superficiais (SHANMUGAM *et al.*, 2010).

Na metade da década de 1920, os parabenos eram encontrados em 80 % dos produtos de higiene pessoal. O uso dos parabenos foi gradualmente reduzido mas até 1981 esses compostos ainda eram encontrados em 25 % em dos cosméticos (BLEDZKA *et al.*, 2014). Entre 1998 a 2004 trabalhos mostraram que os parabenos foram encontrados em tecidos tumorais e também atividades estrogênicas foram observados (DARBRE *et al.*, 2004; ROUTLEDGE *et al.*, 1998; OISHI, 2001; DARBRE *et al.*, 2002). Anos mais tarde, em 2008, o Japão determinou que a concentração de parabenos em

cosméticos fosse no máximo 1 %. A união Européia, no ano de 2009, limitou o uso em no máximo 0,8 % para parabenos totais e, individualmente, cada parabenos pode ser encontrado no máximo em 0,4 %. Embora o Comitê científico de Segurança do consumidor tenha informado que concentrações de até 0,19 % não são prejudiciais a saúde humana, a União Européia não alterou o que havia sido estipulado em 2009 (BLEDZKA *et al.*, 2014). Diversos países seguem as normas estipuladas na União Europeia incluindo o Brasil. (MARTÍN *et al.*, 2010).

1.2 OS CABELOS

Os seres humanos possuem até 5 milhões de fios de cabelo. Os cabelos se dividem em 3 tipos : O cabelo Lanugo que desaparece logo após o nascimento; os velos que são os cabelos finos distribuídos por todo corpo (pêlos); e os cabelos terminais que são os fios mais grossos e compridos. Menos de 2% dos homens e 45% das mulheres possuem a cabeça repleta de cabelos durante toda a vida. O folículo capilar é uma estrutura epitelial complexa. Ele é cercado por uma bainha radicular externa e interna. A bainha radicular externa protege o cabelo em crescimento em quanto que a bainha interna segue o eixo do cabelo até a abertura da glândula sebácea. A base do folículo capilar é constituída de uma papila dérmica repleta de nervos sensoriais e vasos sanguíneos e pela papila capilar que contém o bulbo capilar dentro de sua estrutura e onde o fio de cabelo é originado. No folículo capilar se encontra o bulge que comporta células epiteliais e melanocíticas que apresentam funções como a formação de folículos capilares e das glândulas sebáceas (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013).

Os fios de cabelos são uma estruturas epiteliais queratinizadas e consistem de 3 áreas concêntricas : A cutícula, correspondente a membrana que recobre o cabelo; o cortéx, correspondente a maior parte do cabelo e concede resistência ao fio; e a medula, que é a área central do fio mas nem sempre está presente (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013). As duas estruturas principais do cortéx são a queratina e queratina associada a outras proteínas. A queratina é uma proteína fibrosa composta principalmente de proteínas α -helicoidais e ligações dissulfeto em baixa quantidade. Esta estrutura está alinhada ao longo do eixo da fibra e incorporado a segunda estrutura amorfa de queratina associada a proteína com várias ligações dissulfeto. As ligações dissulfeto formam ligações cruzadas nas fibras da queratina melhorando as propriedades físicas e mecânicas e a estabilidade da estrutura (KUZUHARA, 2013).

1.2.1 Capacidade de adsorção do cabelo

A capacidade de adsorção do cabelo já foi explorada anteriormente. Um dos primeiros estudos realizados nesse sentido foi realizado em 1966. A experiência tinha como propósito estudar a adsorção de vários metais no cabelo e a maioria dos elementos estudados adsorveram. Metais como Au^{+3} , Ag^+ , e

Se⁺⁴ adsorveram de tal forma que a remoção desses elementos do cabelo não foi possível com os solventes testados (BATE, 1966).

Estudos foram realizados para observar a capacidade de adsorção do cabelo em relação aos componentes majoritários presentes nos óleos essenciais de capim-limão, lavanda, *tea tree* e time timol e os resultados indicaram que sesquiterpenos incluindo hidrocarbonetos e alcoóis exibiram grande capacidade adsorção. Aparentemente a queratina apresenta algum sítio de afinidade em relação aos sesquiterpenos, principalmente devido a adsorção predominante dos sesquiterpenos sobre os monoterpenos (INOUYE; ABE, 2006).

Em 2009, Ran *et al.* estudaram o comportamento de adsorção de um surfactante de amônio quaternário no cabelo. Os sais quaternários de amônio são adicionados em produtos para o cabelo, principalmente em condicionadores. Esses sais apresentam a capacidade de absorver luz na região ultravioleta e também atuam como veículos para outros ingredientes. (RAN *et al.*, 2009).

1.2.2 Parabenos e cabelos: por que estudar a relação entre eles?

Existem algumas razões pela qual é interessante estudar a interação entre fibra capilar e parabenos. Nishizawa *et al.* 2006 comprovaram que os parabenos apresentam a capacidade de produzir fortes oxidantes na pele. Os parabenos produzem hidroquinona e 1,4 - benzoquinona. Essas benzoquinonas geram glutatonas, conjugados de hidroquinonas, e as glutatonas tri-substituídas, em especial, produzem grandes quantidades de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A formação de forte oxidante ocorre devido a 4 fatores principais: Presença de luz, oxigênio singlete, água e parabenos. O oxigênio singlete pode ser formado na pele (NISHIZAWA *et al.*, 2006), e de acordo com estudos realizados termograficamente, a quantidade de água encontradas em amostras de cabelo apresentam uma média de quase 15 % de água (BARBA *et al.*, 2009).

A luz na região do visível pode vir do próprio meio ambiente. Se os fios de cabelo adsorverem os parabenos durante a lavagem com xampu, os requisitos mínimos necessários para formação do forte oxidante estarão completos. A formação desses oxidantes nos cabelos não é desejada devido a capacidade deles atacarem a estrutura do cabelo.

Estudos também foram realizados tendo como foco a permeação de parabenos pela pele humana através de experimentos realizados com a pele de orelha de porco. Em 2007, estudos comprovaram que a pele humana absorvia parabenos, e os parabenos sofriam hidrólise durante esse processo, entretanto o conhecimento sobre o destino dos parabenos metabolizados é limitado (JEWELL *et al.*, 2007). Em 2010 foi demonstrado que entre o metil, etil, propil e butilparabeno, o parabeno que mais permeava pela pele era o metilparabeno (CAON *et al.*, 2010). Em 2013, a permeação do metilparabeno foi estudada individualmente devido a possibilidade de permeação dérmica do composto e é sugerido que cosméticos utilizados na pele e que contenham parabenos sejam enxaguáveis. A pele da orelha do porco é frequentemente utilizada para representar a pele humana em estudos biológicos e comumente é aceito que os

parabenos encontrados em tecidos humanos são provenientes mais de aplicações dérmicas que por administração oral (PAZOUREKOVA *et al.*, 2013). A discussão em relação aos parabenos a nível biológico provém do fato de que eles já foram encontrados anteriormente em níveis de traço em tecidos humanos cancerosos (DARBRE *et al.*, 2004; SHANMUGAM *et al.*, 2010) e foi cogitado a possibilidade de que esses compostos eram provenientes de loções corporais, levando a comunidade científica a suspeitar dos problemas de saúde que poderiam ser gerados com o uso dos parabenos. Se os parabenos adsorvem nos cabelos após lavagem com xampu, os parabenos adsorvidos talvez permeiem pela pele humana gradativamente devido ao contato direto do cabelo com a epiderme. Também deve ser lembrado que o corpo é coberto por pêlos e caso a adsorção de parabenos aconteça, os parabenos permaneceriam em contato com a pele mesmo que um produto enxaguável fosse utilizado.

Caso a adsorção de parabenos nos cabelos não implique na formação de fortes oxidantes, ou em futura permeação pela epiderme, talvez as características antimicrobiais deles permaneçam e desse modo, a adsorção do composto poderá ser algo vantajoso. A adsorção dos parabenos em cabelos, seus efeitos sobre eles ou suas consequências posteriores ainda não foram reportados. O estudo realizado nesse trabalho é uma introdução a esse assunto que ainda não foi explorado no ambiente acadêmico, por isso, a preocupação inicial consiste em investigar se realmente existe a adsorção desses compostos e se eles estão em quantidades significativas nos cabelos.

1.3 MetodoS cromatográficos e POR eletroMIGRAÇÃO para separação de parabenos descritos na literatura

Técnicas de separação são ferramentas úteis para determinação de parabenos em diversos tipos de amostras. Nas próximas seções, vários métodos para determinação de parabenos e outros analitos foram citados. Alguns métodos chamam a atenção devido ao tipo de amostra que pode ser analisado.

1.3.1 Métodos de separação de parabenos desenvolvidos por HPLC

Em 2011, Gao e Legido-Quigley desenvolveram um método para determinação de hidroquinona, ácido benzóico, fenol, ácido sórbico, metil, etil, propil e butilparabeno em amostra de cremes. Resumidamente, o preparo de amostra era realizado com a adição de solvente (metanol:H₂O 60:40 v/v) em 0,2 g de creme. A mistura então é sonicada por 30 minutos e o extrato é centrifugado por 10 minutos, filtrado, e injetado no sistema de separação. Nesse método, foi utilizado uma coluna C18 (100 mm x 2.1 mm d.i) e a fase móvel é composta por MeOH : CHO₂NH₄ (0,05 mol L⁻¹) com pH 3. O Fluxo da fase móvel é de 200 µl min⁻¹ e um gradiente foi programado da seguinte maneira : entre 0 - 2 min : 45% MeOH; entre 2 - 5 min : 45 - 70% MeOH; entre 5 - 20 min: 70% MeOH.

Métodos desenvolvidos por HPLC também podem ser utilizados para determinação de parabenos em rádiofarmacos. Zodda *et al.* em 1994 desenvolveram um método para determinação de metil e propilparabeno em Choletec (kit para preparação do rádiofarmaco). De uma maneira geral, o preparo do kit é realizado adicionando água purgada de nitrogênio e NaOH seguido de aquecimento. Posteriormente é adicionado a solução fluoreto estanoso e mebrotfenina. A mistura ainda quente é diluída, ajustada para pH 5.4 e filtrada antes de ser injetada. A coluna utilizada para separação dos analitos foi uma ODS-Hypersil (250 mm x 4.6 mm d.i). A fase móvel utilizada foi composta de KH_2PO_4 0,05 mol L^{-1} ajustada para pH 6,8 com solução 10 mol L^{-1} de NaOH ; ACN e MeOH (35:30:35 v/v/v) e o Fluxo foi mantido em 1,5 ml min^{-1} em modo isocrático.

Em 2010, Zotou *et al.* propuseram um método para análise de metil, etil, propil, butil e isobutilparabeno em amostra de saliva e cremes dentais. Antes da coleta da saliva, os voluntários lavaram a boca com solução de ácido cítrico e a saliva coletada foi centrifugada, filtrada e misturada com metanol. A solução resultante ainda passa por cartuchos de extração em fase sólida e os analitos retidos são eluídos com MeOH e o solvente então é evaporado. Os analitos são resuspendidos então com uma solução metanólica e injetados. Para análise do creme dental, 1 g do produto foi disperso com metanol e centrifugado. O sobrenadante foi coletado e diluído. A solução diluída também passa pelo mesmo processo de extração em fase sólida. A coluna utilizada no desenvolvido do método foi uma *SpeedRod* monolítica (50 mm x 4.5 mm d.i). A fase móvel utilizada é composta por H_2O :ACN. O gradiente utilizado na fase móvel foi: entre 0-5 min : 3 - 10% ACN; entre 5-10 min : 10 - 20 %ACN ; entre 10-20 min : 20% ACN. O fluxo da fase móvel é de 3 ml min^{-1} .

A Tabela 1 descreve as faixas lineares, limites de detecção e quantificação para cada método desenvolvido por HPLC citado. Os melhores limites de detecção são de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o tempo de geração do cromatograma até a injeção seguinte podem levar até 20 minutos características das metodologias que foram citadas.

Tabela 1: Faixa linear, Limites de detecção e quantificação de alguns métodos descritos na literatura para análise de parabenos através de HPLC em diversas amostras.

Parabeno	Faixa linear	Limite de detecção	Limite de quantificação	Referência
Metilparabeno	0,882-8,82 ^a	0,9 ^a	2,7 ^a	ZODDA; MONTEFE; RANTE; EAKINS, 1994
Propilparabeno	0,097-0,972 ^a	0,1 ^a	3,0 ^a	
Metilparabeno	0,5-200 ^a	0,2 ^a	0,6 ^a	GAO; Legido- Quigley, 2011
Etilparabeno	0,5-200 ^a	0,2 ^a	0,6 ^a	
Propilparabeno	0,5-200 ^a	0,2 ^a	0,6 ^a	
butilparabeno	0,5-200 ^a	0,2 ^a	0,6 ^a	
Metilparabeno	0,5-50 ^a	0,2 ^a	0,6 ^a	ZOTOU; SAKLA; TZANAVAR AS, 2010
Etilparabeno	0,5-50 ^a	0,2 ^a	0,6 ^a	
propilparabeno	0,5-50 ^a	0,2 ^a	0,6 ^a	
butilparabeno	1,0-50 ^a	0,3 ^a	0,9 ^a	
isobutilparabeno	1,0-50 ^a	0,3 ^a	0,9 ^a	

^aValores dados em mg L⁻¹

Várias metodologias também foram desenvolvidas por GC para determinação de parabenos. Shanmugam *et al.* em 2010 analisaram metil, etil, propil e butilparabeno em amostras de tecidos cancerosos humanos utilizando GC-MS. O tecido canceroso é tratado com uma mistura de acetona:n-hexano (1:1 v/v), centrifugado, reconcentrado através de um rotaevaporador e eluído por uma coluna de sílica gel. Após esses procedimentos, os parabenos são derivatizados antes da injeção no sistema cromatográfico. A separação foi realizada numa coluna DB -1 (30 m x 0.32 mm x 0,25 µm d.i), utilizando hélio como gás de arraste em um fluxo de 2,25 mL min⁻¹. Uma rampa de temperatura da coluna foi utilizada com a seguinte programação: Entre 0-1 min : 50 °C; 30 °C min⁻¹ até atingir 220 °C; 2 °C min⁻¹ até atingir 230 °C; 15 °C min⁻¹ até atingir 320 °C; 320 °C mantidos por 10 minutos (SHANMUGAM *et al.*, 2010).

Em 2013, Jain *et al.* desenvolveram um método por GC para determinação de metil,etil,propil e butilparabeno em alimentos, cosméticos e água de diversas fontes. As amostras de alimentos foram cortadas em pequenos pedaços e homogeneizadas. Nas amostras de alimento sólido, os analitos eram extraídos com etanol durante agitação e sonicação seguido de centrifugação. O sobrenadante então diluído 20 vezes. Amostras de alimentos líquidos foram filtrados e diluídos com água. Após diluição, os analitos foram pré-concentrados e derivatizados em uma única etapa. Nas amostras de cosméticos, os parabenos também foram extraídos com adição de etanol durante agitação e sonicação seguido de centrifugação. O sobrenadante foi diluído 50 vezes com etanol e foi pré-concentrado e derivatizado simultaneamente antes da injeção no sistema cromatográfico. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Elite -5 (5% difenil

95% dimetil polisiloxano) de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm d.i. O gás de arraste utilizado foi Nitrogênio com fluxo de 1 ml min^{-1} . Foi utilizada também uma rampa de temperatura com a seguinte programação: entre 0 - 2 min 100 °C; 10 °C min^{-1} até 250 °C; 250 °C durante 5 minutos. A injeção foi realizada no modo *splitless*. As maiores concentrações de parabenos foram encontrados nos cosméticos, desde 137,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de metilparabeno até 2258,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de propilparabeno. A maior concentração encontrada em amostras de alimento foi de butilparabeno (44,69 $\mu\text{g g}^{-1}$). Em amostras de água potável, as concentrações de metil,etil,propil e butilparabeno não chegaram a atingir 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (JAIN *et al.*, 2013).

Em 2011, Ramírez *et al.* desenvolveram um método por GC-MS para determinação de metil, etil, propil, isopropil e butilparabeno em poeira doméstica. Os parabenos foram extraídos de poeira doméstica utilizando água quente pressurizada como solvente. Os parabenos então passaram por um processo de derivatização (acetilação) para aumentar a sua interação com um agitador revestido de uma película de PDMS. Desse modo, os parabenos podem ser pré-concentrados nos agitadores diretamente durante o processo de extração, agilizando o processo como um todo. A dessorção dos parabenos então era realizada térmicamente com uma unidade dessorção térmica acoplada em um sistema de injeção automática do GC. A injeção da amostra é realizada no modo *splitless*. Foi utilizada uma coluna Zebron ZB-50 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm d.i) e o gás de arraste foi Hélio com fluxo de 2 mL min^{-1} . O gradiente de temperatura utilizado para a coluna foi programado como: em 0 min: 100°C; 30 °C min^{-1} até 150 °C; 5 °C min^{-1} até 190 °C; 15 °C min^{-1} até 290 °C. Com o método desenvolvido, os 5 parabenos foram encontrados. As concentrações variaram médias variaram de 33 ng g^{-1} até 912 ng g^{-1} , sendo que o metilparabeno foi o parabeno encontrado em maiores concentrações e o isopropil em menor concentração entre os parabenos analisados (RAMIREZ, MARCE; BORRULL, 2011).

Em 2014, Alvarez-rivera *et al.* utilizaram um GC-MS/MS para determinação de metil,etil,butil e fenilbenzoato; metil, etil, propil, isopropil, butil, isobutil e fenilparabeno; Hidroxianisol butilado, Hidroxitolueno butilado e triclosan. Devido a complexidade dos diferentes cosméticos analisados, os mesmos foram diluídos com água deionizada e os analitos passaram por um processo de derivatização e logo após foram pré-concentrados utilizando microextração em fase sólida. Os analitos então são dessorvidos térmicamente da fibra diretamente no sistema de injeção do cromatógrafo. A separação ocorreu em uma coluna TG-5 SILMS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm d.i) com um fluxo de gás hélio de 1 mL min^{-1} . Foi utilizado um gradiente de temperatura programado da seguinte maneira: entre 0-3 min: 80 °C; 14 °C min^{-1} até 280 °C e mantido por mais 3 minutos. A injeção foi realizada no modo *splitless* até que a corrida atingisse 2 minutos, depois desse tempo a injeção é alterada para o modo *split*. Nos cosméticos onde foram encontrados parabenos, as concentrações de parabeno totais variaram de 13.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 5320 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ALVAREZ-RIVERA *et al.*, 2014).

A Tabela 2 descreve as faixas lineares, limites de detecção e quantificação para cada método desenvolvido por GC citado.

Tabela 2: Faixa linear, Limites de detecção e quantificação de alguns métodos descritos na literatura para análise de parabenos através de GC em diversas amostras.

Parabeno	Faixa linear	Limite de detecção	Limite de quantificação	Referência
Metilparabeno	0,050-0,30 ^a	0,00202 ^b	0,00675 ^b	SHANMUGAM et al., 2010
Etilparabeno	0,050-0,30 ^a	0,00105 ^b	0,00349 ^b	
Propilparabeno	0,050-0,30 ^a	0,00171 ^b	0,00568 ^b	
Butilparabeno	0,050-0,30 ^a	0,00375 ^b	0,0125 ^b	
Metilparabeno	0,100-10 ^a	0,029 ^a	0,095 ^a	JAIN <i>et al.</i> , 2013
Etilparabeno	0,350-10 ^a	0,102 ^a	0,336 ^a	
Propilparabeno	0,250-10 ^a	0,071 ^a	0,234 ^a	
Butilparabeno	0,120-10 ^a	0,033 ^a	0,108 ^a	
Metilparabeno	2,1-1500 ^c	0,0021 ^b	0,0085 ^b	RAMIREZ, MARCE; BORRULL, 2011
Etilparabeno	1,9-1500 ^c	0,0019 ^b	0,0060 ^b	
Isopropilparabeno	1,3-1500 ^c	0,0013 ^b	0,0038 ^b	
Propilparabeno	1,0-1500 ^c	0,0010 ^b	0,0033 ^b	
Butilparabeno	1,5-1500 ^c	0,0015 ^b	0,0043 ^b	
Metilparabeno	5-5000 ^b	0,016 ^b	0,053 ^b	ALVAREZ-RIVERA <i>et al.</i> , 2014
Etilparabeno	5-5000 ^b	0,26 ^b	0,89 ^b	
Isopropilparabeno	5-5000 ^b	0,043 ^b	0,059 ^b	
propilparabeno	5-5000 ^b	0,017 ^b	0,14 ^b	
Isobutilparabeno	5-1000 ^b	0,12 ^b	0,41 ^b	
butilparabeno	5-1000 ^b	0,0075 ^b	0,025 ^b	

^aValores dados em mg L⁻¹

^bValores dados em µg g⁻¹

^cValores dados em ng g⁻¹

Outra ferramenta útil para análise de parabenos em diversas amostras é a eletroforese capilar. Em 1998, Wang e Chang utilizaram um sistema de extração de fluido supercrítico para extrair parabenos de cremes cosméticos. Para separação de metil, etil, propil e butilparabeno, as condições instrumentais utilizadas foram : Capilar de 60 cm x 75 µm d.i; Voltagem : 25 kV; Temperatura: 30 °C; Injeção hidrodinâmica da amostra: 50 mbar por 5 s; eletrólito de corrida : 30 mmol L⁻¹ de Na₂B₄O₇ com ACN 5 % v/v pH 9,18.

Nesse trabalho, 11 cosméticos foram analisados e as quantidades de parabenos variaram de 0,03 a 0,74% w/w. Em geral, o parabeno que mais foi encontrado nos cosméticos (10 em 11) foi o metilparabeno e as concentrações mais representativas também foram de metilparabeno. O etilparabeno foi encontrado em apenas 5 dos cremes, o propilparabeno foi encontrado em 8 amostras de cremes e o butilparabeno foi encontrado em 6 amostras.

Em 2013, Dolzan *et al.* utilizaram CZE para separar determinar metil, etil, propil e butilparabeno em amostras de cosméticos e formulações farmacêuticas. Para a separação, foi utilizado um capilar de 32 cm x 50 μm d.i.; Voltagem de 25 kV; Temperatura de 25 °C e Injeção hidrodinâmica da amostra: 50 mbar por 3 s. O eletrólito de corrida otimizado para separação foi de 20 mmol L^{-1} de ácido 2-hidroxiisobutírico 30 mmol L^{-1} de trietilamina 0,3 mmol L^{-1} de brometo de hexano -1,6-bis(trimetilamônio) cujo pH é 10. Através desse método, foram encontrados metil e propilparabeno nas amostras testadas.

Em 2010, Chu *et al.* determinaram parabenos em molho de soja utilizando CZE. As condições instrumentais utilizadas foram: Capilar : 70 cm x 25 μm d.i; voltagem : 25 kV; temperatura: 25 °C; injeção eletrocínética da amostra: 16 kV por 6s. O eletrólito de corrida usado na separação foi $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 80 mmol L^{-1} ajustado com solução de NaOH para pH 9,94. Os analitos foram extraídos do molho com uma solução de etanol/água/ácido acético 70:30:0,5 e a mistura foi sonicada por 30 minutos e posteriormente filtrada e, antes da injeção, as amostras foram diluídas. Ao todo, 6 amostras foram analisadas, e apenas etilparabeno foi detectado. As concentrações de etilparabeno foram na faixa de 0,08 a 0,14 mg mL^{-1} .

Jaworska *et al.* em 2005 desenvolveram dois métodos para determinação de vários conservantes (álcool benzílico, fenol, m-cresol, clorobutanol, timerosal, metil e propilparabeno) em formulações farmacêuticas por MEKC e CZE. O procedimento para separação dos parabenos foi elaborado utilizando os seguintes parâmetros : Capilar : 60 cm x 75 μm d.i; Voltagem : 25 kV; Temperatura: 20 °C; Injeção hidrodinâmica da amostra: sifonagem por elevação do vial de amostra em 10 cm por 10s. O eletrólito de corrida usado foi 100 mmol L^{-1} de tampão borato com pH 8,4. Os métodos desenvolvidos foram comparados a métodos publicados anteriormente e os resultados foram satisfatórios. O preparado de amostra dos fármacos foram simples, baseado apenas na diluição das amostras com água, padrão interno ou extração líquido-líquido. A Tabela 3 mostra alguns dos parâmetros de validação dos métodos citados.

Tabela 3: Faixa linear, Limites de detecção e quantificação de alguns métodos descritos na literatura para análise de parabenos através de CE em diversas amostras.

Parabeno	Faixa Linear	Limite de detecção	Limite de quantificação	Referência
Metilparabeno	0,35-60 ^a	0,97 ^b	2,91 ^b	WANG ; CHANG, 1998
Etilparabeno	0,35-60 ^a	1,09 ^b	3,27 ^b	
Propilparabeno	0,35-60 ^a	1,22 ^b	3,66 ^b	
Butilparabeno	0,35-60 ^a	1,02 ^b	3,06 ^b	
Metilparabeno	0,5-30 ^a	0,1 ^a	0,4 ^a	DOLZAN <i>et al.</i> , 2013
Etilparabeno	0,5-30 ^a	0,1 ^a	0,3 ^a	
Propilparabeno	0,5-30 ^a	0,1 ^a	0,4 ^a	
Butilparabeno	0,5-30 ^a	0,1 ^a	0,4 ^a	
Metilparabeno	0,5-100 ^a	0,057 ^a	0,190 ^a	CHU <i>et al.</i> , 2010
Etilparabeno	0,5-50 ^a	0,055 ^a	0,183 ^a	
Propilparabeno	0,5-50 ^a	0,053 ^a	0,177 ^a	
Butilparabeno	0,5-50 ^a	0,044 ^a	0,147 ^a	
Metilparabeno	2-1000 ^a	0,5 ^a	2,0 ^a	JAWORSKA; SZULINSKA; WILK, 2005
propilparabeno	2-1000 ^a	0,5 ^a	2,0 ^a	

^aValores dados em mg L⁻¹

^bValores dados em ng

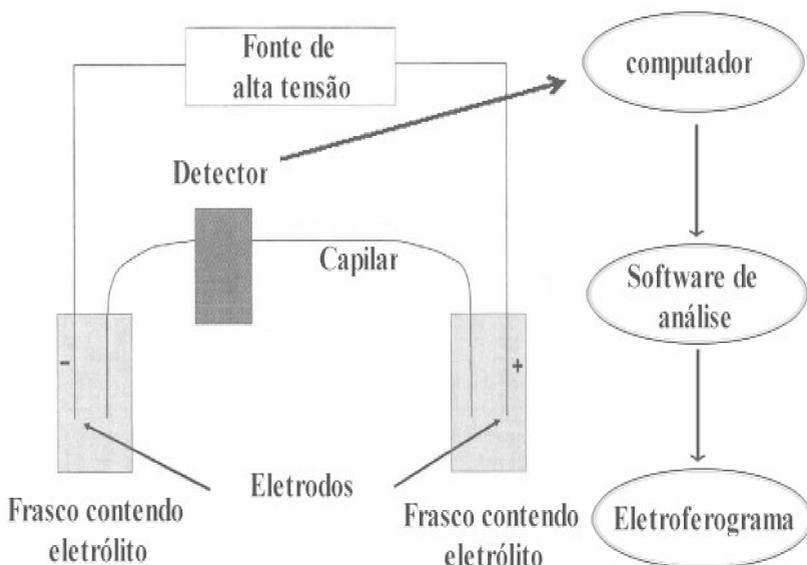
Dentre as três técnicas apresentadas aqui, a técnica selecionada para análise de parabenos foi a eletroforese capilar. A eletroforese capilar apresenta baixo custo operacional, baixo consumo de reagentes e amostra, automação, alta seletividade e eficiência, desenvolvimento rápido dos métodos e alta velocidade de análise (WEINBERGER, 2000). Todas essas características são grande de importância para escolha do método de separação.

1.4 Eletroforese Capilar

1.4.1 Aspectos teóricos e instrumentais

A base da eletroforese capilar está na separação de compostos que adquirem diferentes velocidades dentro de um capilar quando um campo elétrico é aplicado. Um esquema do equipamento de eletroforese é representado na Figura 2 e consiste de uma fonte alta tensão que pode aplicar uma diferença de até 30kV, capilares cujos os diâmetros internos variam de 25 a 100 μ m, eletrodos inertes(prata, platina) e um sistema de detecção(UV/Vis, fluorescência, espectrômetros de massa entre outros). Nas extremidades do capilar existem dois reservatórios contendo o eletrólito de corrida. A introdução do eletrólito e da amostra no capilar pode ser realizada hidrodinamicamente, através da diferença de pressão entre dois reservatórios. A amostra também pode ser introduzida por injeção eletrocinética com a aplicação de uma diferença de potencial por alguns s , ou por sifonagem, devido diferença de altura entre os dois recipientes. Após a injeção, a aplicação do campo elétrico faz com que cada componente da amostra migre em uma determinada velocidade pelo capilar (WEINBERGER, 2000).

Figura 2: Componentes básicos de um instrumento de eletroforese capilar com detecção por UV/VIS (adaptado Weinberger, 2000).



Os capilares mais comuns em eletroforese capilar são feitos de sílica fundida. Embora capilares de teflon ou quartzo também sejam fabricados, o custo e a eficiência deles são menores. Os capilares de sílica também apresentam a particularidade devido a formação do fluxo eletrosmótico. Os grupos silanóis encontram-se ionizados com carga negativa acima de pH 3. A superfície negativa da superfície do capilar atrai cargas positivas que ficam adsorvidas e imóveis mesmo com a aplicação do campo elétrico. Entretanto os íons adsorvidos nessa primeira camada adsorvida não conseguem neutralizar totalmente as cargas negativas dos grupos silanóis. Logo, outros cátions se aproximam da parede do capilar e formam uma outra camada de caráter positivo, que não está adsorvido e podem se locomover com a aplicação do campo elétrico. Quanto mais longe está a solução da superfície interna do capilar, mais a solução se aproxima da neutralidade elétrica e o potencial zeta da superfície não é mais sentido. Com a aplicação da diferença de potencial entre os eletrodos, os cátions solvatados da camada difusa geram um fluxo em direção ao eletrodo de carga negativa e carregam compostos neutros, positivos bem como espécies aniônicas se a mobilidade do fluxo eletrosmótico for maior que a mobilidade do ânion (WEINBERGER, 2000).

1.4.2 Classificação dos modos utilizados em eletroforese capilar mais comuns

Um sistema de eletrólito contínuo promove um meio eletricamente condutor e com capacidade tamponante ao longo do caminho de migração. Se a composição do eletrólito de corrida é constante (contínuo), o campo elétrico e as mobilidades efetivas dos componentes da amostra é constante e cada componente irá migrar com velocidade constante mas diferentes entre si (WEINBERGER, 2000). Se o sistema é descontínuo a amostra migra como uma zona distinta entre 2 eletrólitos diferentes. Diferentemente do sistema contínuo, onde o eletrólito é primeiramente responsável pela condução da corrente na zona da amostra, a condução da corrente através da zona de amostra em um sistema descontínuo é provida exclusivamente pelos íons da amostra e do sistema contra-iônico. A Tabela 4 mostra um breve resumo de algumas das características dos 5 modos mais comuns utilizados em eletroforese capilar. O método desenvolvido nesse trabalho entra na classificação CZE.

Tabela 4: Modos mais comuns utilizados em eletroforese capilar e suas principais características.

Modo	Características
CZE Eletroforese capilar em zona	Sistema contínuo de processo cinético onde o campo elétrico e as mobilidades efetivas dos componentes da amostra é constante e cada componente irá migrar com velocidade constante mas diferentes entre si. (WEINBERGER, 2000).
MEKC Cromatografia eletrocínética micelar	Sistema contínuo de processo cinético. (WEINBERGER, 2000). Utiliza o mesmo aparato instrumental que CZE. Um surfactante é adicionado no eletrólito, formando assim micelas que funcionam como uma fase pseudoestacionária de cromatografia. Nesse modo, espécies carregadas ou neutras podem ser separadas devido as diferenças interações dos componentes da amostra com as micelas que apresentam carga. (WATANABE; TERABE, 2000)
IEF Focalização isoeletrica	Sistema contínuo de processo em estado estacionário. Nesse caso, o campo elétrico e as mobilidades efetivas dos analitos variarão durante a migração pelo capilar. Em algumas regiões, a migração do analito pelo capilar será virtualmente inexistente e assim os diferentes analitos podem apresentar velocidades semelhantes (WEINBERGER,2000).
Gel	Sistema contínuo de processo cinético(WEINBERGER, 2000). Utilizado na separação de biopolímeros, proteínas e fragmentos de DNA. A separação ocorre em matrizes de Gel. Um biopolímero pequeno facilmente migra através dos poros da solução polimérica (matriz de peneiramento) enquanto biopolímeros maiores migram com dificuldade pela solução, sendo assim possível realizar a separação. (MIKŠÍK <i>et al.</i> 2005)
Isotacoforese	Nesse modo, o sistema é descontínuo e a amostra migra como uma zona distinta entre 2 eletrólitos diferentes, uma das zonas corresponde a um eletrólito líder e a outra zona corresponde ao eletrólito terminal. O eletrólito líder contém coíons com mobilidades maiores que os íons da zona da amostra. Por outro lado, o eletrólito terminal contém coíons com mobilidades menores que os íons da amostra. (WEINBERGER,2000).

1.4.3 Métodos de "*stacking*" em eletroforese capilar

Devido ao pequeno caminho ótico do capilar, a sensibilidade dos métodos desenvolvidos por eletroforese capilar com detector de UV/Vis pode ser reduzida. É possível melhorar a detectabilidade do equipamento através de meios de pré-concentração *online*. Métodos de pré-concentração *online* em eletroforese capilar são chamados de "*stacking*". Devido a flexibilidade da instrumentação da eletroforese capilar, um *stacking* pode ser realizado com certa facilidade, se os parâmetros certos forem modificados. A maioria dos *stacking* são realizados através da mudança da velocidade dos íons dentro do capilar através da descontinuidade do eletrólito de corrida (SHIHABI, 2000)

1.4.3.1 Princípio básico do *stacking*

A continuidade do eletrólito de corrida é mantida quando a injeção da amostra no capilar é menor que 1% do volume do capilar. Nessas condições a velocidade dos íons é uniforme durante a migração pelo capilar e os parâmetros de difusão que causam alargamento de banda são mantidas no mínimo. Quando a injeção da amostra ultrapassa 5% do volume do capilar, os picos apresentam baixa eficiência e resolução. Frequentemente são injetadas amostras com volumes entre 5 a 50% do volume total do capilar. Os analitos dentro desse *plug* de injeção adquirem mesma velocidade com aplicação do campo elétrico. Para realização do *stacking*, é necessário empacotar os íons da amostra encontrados espalhados por toda região do *plug* injeção da amostra. Isso pode ser realizado através de mudanças do campo elétrico, força iônica ou condutividade na região da amostra. O *stacking* deve ocorrer antes que a amostra atinja a região do eletrólito de corrida (SHIHABI, 2000).

1.4.3.2 Diferentes modos de *stacking*

Diversas formas para realização de *stacking* foram desenvolvidas através da eletroforese capilar. Existem *stacking* de campo amplificado, junção de pH dinâmico, micela para solvente, de grande volume de amostra entre muitos outros.

O *Stacking* da amostra com campo amplificado (FASS) ocorre devido a diferença de condutividade entre as regiões do eletrólito de corrida e da matriz que contém o analito. Na região da matriz, a condutividade da região é menor, e o campo elétrico local é maior nessa região comparado a região do eletrólito de corrida. e, por isso, os analitos ionizados apresentam mobilidade eletroforética maior. Quando os analitos chegam a interface entre eletrólito de corrida e matriz, suas mobilidades eletroforéticas diminuem devido a maior condutividade nessa região e a velocidade dos íons decresce rapidamente. Dessa maneira os analitos são pré-concentrados, aumentando desse modo a sensibilidade do método. No decorrer da análise, o gradiente de condutividade

desaparece dentro do capilar, a separação então ocorre normalmente (da LUZ *et al.*, 2014).

O *stacking* de junção de pH dinâmico é conhecido por vários nomes : *stacking* mediado por pH (*pH-mediated stacking*), Reação de Neutralização na Fronteira (NRB), fronteira de reação em movimento (MRB) ou fronteira de reação química em movimento transiente (tMCRB). Nesse modo de *stacking*, a mobilidade eletroforética dos analitos é manipulada com a mudança de pH entre as zonas de amostra e eletrólito de corrida (KITAGAWA; OTSUKA, 2014).

O *Stacking* de micela para solvente (MSS) é realizado com a injeção de uma grande quantidade de amostra contendo um surfactante. O eletrólito de corrida utilizado contém um modificador orgânico que geralmente são metanol, acetonitrila ou isopropanol e o modificador pode representar de 20 % a 50 % do volume do eletrólito. Quando uma diferença de potencial é aplicada entre os eletrodos, as micelas carregadas movem-se em direção ao eletrodo de carga oposta. Ao atingir a região do eletrólito de corrida, a presença do modificador orgânico naquele meio diminui a interação entre analito e micela, e os analitos são liberados. O *stacking* então ocorre na interface entre o *plug* de amostra e o eletrólito de corrida. Nesse modo, quando os analitos são ânions, as micelas devem ser catiônicas e quando os analitos são cátions, as micelas devem ser aniônicas (YANG, *et al.*, 2013).

No *Stacking* de grande volume de amostra (LVSS), o volume injetado da amostra pode preencher totalmente o capilar. A condutividade da zona contendo amostra é menor e, assim como acontece no *stacking* de campo amplificado, o empacotamento dos analitos acontece na interface entre eletrólito de corrida e zona de amostra. Esse *stacking* pode ser acoplado com inversão de polaridade para eliminação da matriz. (KITAGAWA; OTSUKA, 2014).

O *stacking* de reversão da polaridade do eletrodo, abreviado no inglês como REPSM (*Reverse Electrode Polarity Stacking Mode*), é uma forma de pré-concentração dos analitos que ocorre dentro do capilar. Esse método pode ser resumido em três etapas. Na primeira etapa a amostra é injetada de maneira hidrodinâmica. Na segunda etapa, a polaridade dos eletrodos é selecionada de maneira que a matriz seja eliminada pelo fluxo eletrosmótico na mesma extremidade de injeção. Na terceira etapa, quando a corrente atinge 95% da corrente do valor original, correspondente a corrente que ocorre quando o capilar está preenchido totalmente pelo eletrólito de corrida, a polaridade dos eletrodos é invertida e os analitos seguem em direção ao detector (LIU, 2010; MAIJO *et al.*, 2013; PUIG *et al.*, 2006). Quando a inversão de polaridade é utilizada, os analitos são pré-concentrados na extremidade de injeção do capilar. Entretanto, a inversão de polaridade é realizada manualmente através da observação da corrente e algumas vezes o método se torna irreprodutível (KITAGAWA; OTSUKA, 2014). Puig *et al.* (2006) desenvolveram um método para análise de penicilinas utilizando a inversão de polaridade para aumentar a sensibilidade do método eletroforético. A injeção da amostra em micro emulsão foi realizada hidrodinamicamente com 50 mbar por 270 s. A voltagem aplicada para realização do *stacking* é de - 5 kV (negativo na injeção). O método

desenvolvido para nove penicilinas alcançou limites de detecção menores que $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Em 2010 um *stacking* de polaridade reversa foi utilizado para separação de nanopartículas de ouro. O eletrólito utilizado no método desenvolvido é composto por dodecil sulfato de sódio e ácido 3-ciclohexilamino - 1 - propanosulfônico pH 10. A polaridade é invertida de -20 kV até 20 kV seguindo um gradiente de *potencial* de 1333 kV min^{-1} até chegar ao valor máximo (LIU, 2010).

Maijo *et al.* (2013) desenvolveram métodos de *stackings* com padrões de parabenos e entre eles está o *stacking* de grande volume de amostra com inversão de polaridade. Nas condições ótimas, o tempo de migração dos parabenos chega até cerca de 8.5 minutos e a injeção da amostra demora 500 s e o tempo de aplicação de polaridade reversa é de cerca 3.5 minutos. A polaridade é trocada quando a corrente chega a 95 % do valor final.

Dentro dos modos de pré-concentração *online* para determinação de metil, etil, propil e butilparabeno adsorvidos em amostras de cabelo, foi escolhido o modo de *stacking* de polaridade reversa como metodologia de pré-concentração *online*. Os trabalhos reportados na literatura com esse modo de *stacking* carecem de parâmetros de precisão, visto que a inversão da polaridade acontece de maneira manual, de acordo com a precisão do operador, tornando assim a metodologia de difícil reprodução. É possível realizar a inversão automática, entretanto a voltagem da polaridade reversa deve ser baixa para que a corrente não sofra alterações súbitas, o que aumenta muito o tempo de análise. (LEE, BOYCE; BREADMORE, 2012). Devido a esses problemas, uma das novidades apresentadas com relação ao trabalho desenvolvido foi o desenvolvimento de um método rápido de *stacking* de reversão da polaridade do eletrodo para análise de parabenos adsorvidos em amostras de cabelo, onde a reversão ocorre de maneira automática, sem interferência do operador e de maneira reprodutível.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método determinação simultânea de metil, etil, propil e butilparabeno adsorvido em cabelo por cze-uv mediante stacking por polaridade reversa automática.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver um método rápido de *stacking* por polaridade reversa automático para pré-concentração *online* dos parabenos, utilizando alta pressão de injeção através do comando *flush* do software de análise e utilizando alta voltagem para realização do *stacking*.

-Verificar a formação do *stacking* modificando parâmetros operacionais.

- Analisar uma amostra de xampu cujo rótulo indica que não há presença de parabenos em sua composição e adicionar parabenos em sua composição para simular a lavagem dos cabelos com um produto contendo metil, etil, propil e butilparabeno em quantidades permitidas pela ANVISA e União Europeia.

- Verificar a adsorção de parabenos em amostras de cabelos durante a lavagem com o xampu contendo metil, etil, propil e butilparabeno e otimizar o processo de extração desses compostos.

- Validar o método analítico desenvolvido.

- Quantificar metil, etil, propil e butilparabeno encontrados nas amostras de cabelo.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 reagentes E soluções

Os padrões de metilparabeno (MP), etilparabeno(EP), propilparabeno (PP), butilparabeno (BP) , ácido cinâmico (PI) e Tetraborato de sódio (TBS) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Para o preparo de todas as soluções aquosas foi utilizada água deionizada (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). Os solventes orgânicos utilizados foram metanol, acetonitrila e foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).

3.2 instrumentação

O equipamento de Eletroforese Capilar utilizado nas análises foi da marca HP modelo CE^{3D}, equipado com detector de arranjo de diodos, sistema de injeção hidrodinâmica, e sistema de dissipação de calor controlado. O capilar utilizado foi de sílica revestido externamente de poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com 50 cm de comprimento e 50 µm de diâmetro interno, cujo comprimento efetivo foi de 41,5 cm.

3.3 PROCEDIMENTOS

A temperatura do cartucho onde é introduzido o capilar foi controlada em 20 °C. O condicionamento do capilar foi realizado com solução de 1,0 mol L⁻¹ de solução de NaOH por 30 minutos e lavado com água deionizada por mais 30 minutos. O equipamento foi configurado para realizar um pré-condicionamento do capilar durante 1 minuto (940 mbar, *flush*) antes de cada corrida com o eletrólito de corrida, cuja composição é a mesma utilizada por UYSAL e GURAY em 2008 (20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio (TBS) em 10% de metanol). Os recipientes contendo eletrólito de corrida utilizados nos eletrodos durante a aplicação da polaridade reversa foram diferentes dos recipientes utilizados durante a aplicação do potencial de separação. A injeção das amostras foi realizada com o comando "*flush*" que aplica aproximadamente 940 mbar por 6 s e foram realizadas pela extremidade mais afastada da janela de detecção. Após injeção da amostra, aplica-se uma polaridade invertida de -25 KV. O tempo de aplicação dessa diferença de potencial foi testado de 5 até 50 s. Após selecionado o

tempo de polaridade reversa, um *plug* de eletrólito injetado pelo comando *flush* por 1.2 s foi adicionado ao método. Após essa etapa, a corrida ocorre normalmente aplicando-se 30 KV.

3.4 AVALIAÇÃO Do método cze-uv utilizando pré concentração por *stacking* de polaridade reversa

O estudo foi realizado com a injeção de padrão de metilparabeno 5 mg L^{-1} em 50% ACN: H_2O v/v com o comando *flush* (940 mbar) por 6 s. Após injeção do padrão, um *plug* de eletrólito de corrida foi injetado através do comando *flush* por 1.2s. tempo de aplicação de polaridade reversa (-25 kV) foi observada em 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 s. Após o tempo de aplicação da polaridade reversa proposto em cada etapa se completar, a amostra foi empurrada em direção ao detector com injeção do eletrólito de corrida durante 13 minutos com 50 mbar. Depois, o tempo de aplicação de polaridade reversa foi fixado em 35s e o tempo de voltagem de separação (+30 kV) foi avaliado no tempo de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 s. Após o tempo de aplicação de voltagem de separação proposto em cada etapa se completar, a amostra foi empurrada em direção ao detector com injeção do eletrólito de corrida durante 13 minutos com 50 mbar. O comprimento de onda observado foi de 297 nm.

3.5 Preparo de amostra de xampu

Uma amostra de xampu cujo rótulo não indicava presença de parabenos foi adquirida em um mercado local. A amostra de xampu foi analisada pelo método desenvolvido antes da adição de parabenos. A análise foi realizada com 100 mg de xampu em um volume final de 100 mL de água deionizada. Antes de injetar, a amostra foi diluída 1:1 v/v com ácido cinâmico 1 mg L^{-1} em ACN. Na etapa seguinte, cerca de 600 mg de cada parabeno estudado foi adicionado a aproximadamente 350 mL do xampu. A amostra foi agitada por 5 minutos e deixada em repouso por 1 dia para garantir completa solubilização dos parabenos. A análise da amostra de xampu com parabenos adicionados também foi realizada com 100 mg de amostra em 100 mL de água deionizada. Antes de injetar, 100 μL da solução foi diluída com 100 μL de ACN e 200 μL de ácido cinâmico 1 mg L^{-1} .

3.6 Otimização da extração

Uma amostra de cabelo foi lavada 2 vezes com o xampu contendo metil,etil,propil e butilparabeno que foram adicionados de modo que a concentração de cada parabeno no xampu não ultrapassasse 0,2% em massa, que no caso do xampu utilizado, corresponde a cerca de 600 mg de cada parabeno para 350 mL de xampu. A otimização da extração foi realizada em 3 etapas com 300 mg de cabelo. Na primeira etapa foram adicionados 5 mL de ACN : H₂O 50 % v/v aos cabelos e a mistura foi agitada por 1 minuto. O solvente foi coletado e os cabelos foram enxaguados com água deionizada. Na segunda etapa foram adicionados mais 5 mL de ACN : H₂O 50% v/v e a mistura foi novamente agitada por 1 minuto. O solvente foi novamente coletado e o procedimento anterior foi repetido uma terceira vez. Ao final foi utilizado um volume total de solvente de 15 mL. O procedimento foi realizado em triplicata e as frações coletadas foram analisadas. Extrações em triplicata também foram realizadas em uma única etapa com 300 mg de cabelo em 10 mL de ACN : H₂O 50 % v/v seguido de agitação por 1 minuto.

3.7 Figuras de mérito do método para análise de extratos das amostras de cabelos

Os parâmetros avaliados do método foram a faixa linear de trabalho, seletividade, linearidade, precisão, exatidão limite de quantificação e detecção. Em relação a precisão foram avaliados a repetitividade, a precisão *intraday* e *interday*. A linearidade do método foi avaliada entre a faixa linear de 0,1 mg L⁻¹ a 5,0 mg L⁻¹ e a curva foi injetada 2 vezes (n = 2). Os limites de quantificação e detecção foram determinados através da relação sinal ruído 10:1 e 3:1. A precisão *interday* foi obtida usando concentrações de parabenos em 0,5 , 1,0, e 2,0 mg L⁻¹ e cada solução foi injetada em 3 diferentes dias (n=9). A precisão *interday* foi obtida através de 10 injeções consecutivas de uma solução contendo 1,0 mg L⁻¹ de parabenos. A repetitividade foi avaliada através do preparo de soluções de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ 5 vezes e cada ponto foi injetado 1 vez (n=10). A exatidão foi avaliada através de uma curva de adição de padrão, e foram realizados ensaios de recuperação. Foram adicionados padrões de parabenos em 5 níveis : 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 µg L⁻¹ nas amostras. Durante todo processo de validação, as soluções foram mantidas em ACN : H₂O 50% v/v e o padrão interno em 0.5 mg L⁻¹.

3.8 Análise das amostras de cabelo após lavagem com xampu contendo parabenos

Foram utilizadas 5 amostras de cabelo de diferentes pessoas para verificar se a adsorção dos parabenos acontece. As amostras estão apresentadas na Figura 3 e foram classificadas como amostras A, B, C, D e E. Cada amostra de cabelo foi lavada 2 vezes com xampu contendo os 4 parabenos. A extração dos parabenos do cabelo foi realizada após secagem a temperatura ambiente das amostras por um período de 12 horas. A extração foi realizada com 300 mg de cabelo em 10 mL de ACN : H₂O 50 % v/v em uma única etapa e agitação. O mesmo cabelo foi submetido a extração em triplicata. Os extratos foram diluídos 4 vezes antes de serem injetados. A porcentagem de ACN sempre foi mantida em 50% v/v . Para facilitar a compreensão, a Figura 4 foi adicionada para exemplificar o procedimento para análise das amostras de cabelo.

Figura 3: Amostras de cabelo classificadas de A até E utilizadas para teste de adsorção de parabenos durante a lavagem com xampu.

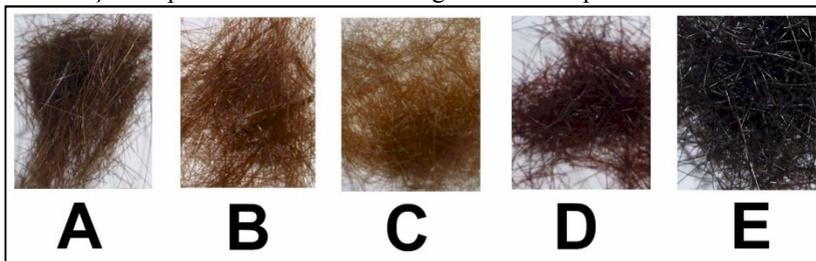
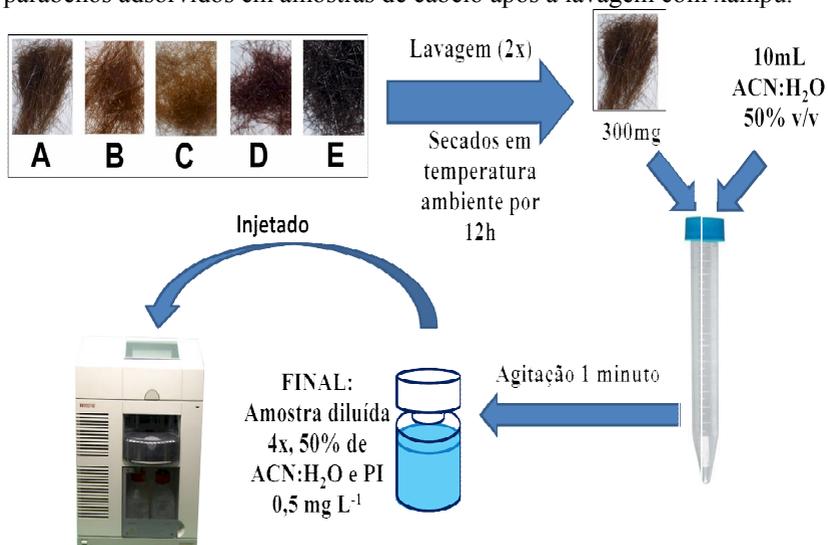


Figura 4: Representação esquemática do procedimento para análise de parabenos adsorvidos em amostras de cabelo após a lavagem com xampu.



4. Resultados e discussão

4.1 Desenvolvimento do método

A primeira etapa desenvolvida no trabalho foi a determinação da faixa de pH em que as mobilidades efetivas dos parabeno são diferentes. A equação 1 representa uma função da mobilidade efetiva de compostos monopróticos, que varia de acordo com a mudança de pH. Indiretamente, a equação 1 mostra que a mobilidade efetiva é proporcional a fração das espécies que se encontram na forma desprotonada (COSTA *et al.*, 2008).

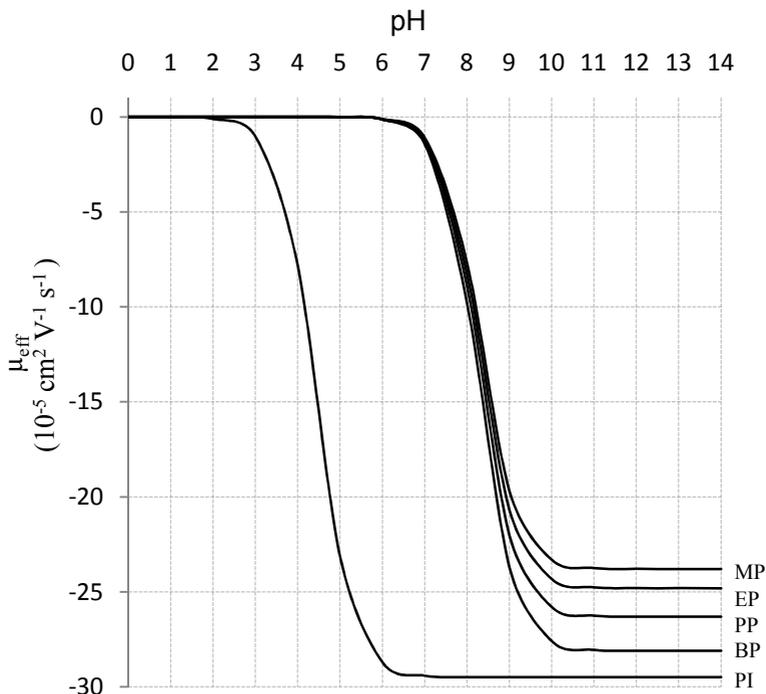
$$\mu_{mob.efetiva} = \mu_{iônica} \times \frac{Ka}{[H^+] + Ka} \text{ (equação 1)}$$

Através da equação 1, plota-se um gráfico de $\mu_{efetiva}$ vs pH para os parabeno desejados. Como uma das maneiras para se separar os compostos em eletroforese capilar é através da diferença de mobilidade efetiva, a melhor faixa de pH para separação dos parabeno corresponde a região onde as mobilidades efetivas deles são diferentes. O gráfico está representado na Figura 5, e contém também a curva de mobilidade do ácido cinâmico, que está presente no gráfico por ter sido utilizado como padrão interno no método. A mobilidade iônica do padrão interno como também sua estrutura são parecidas com as mobilidades iônicas e estruturas dos parabeno. Dessa forma, o ácido cinâmico pode compensar os erros eletroforéticos e de injeção do equipamento que podem ocorrer. Os valores de pKa e mobilidades iônicas utilizadas para elaboração da Figura 5 foram obtidos da literatura e estão representados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de pKa e mobilidade iônica ($\mu_{iônica}$) encontrados na literatura para cada parabeno estudado (MUIJSELAAR; CLAESSENS; CRAMERS, 1997).

Composto	pKa	$\mu_{iônica} (10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$
Metilparabeno	8,27	-28,1
Etilparabeno	8,29	-26,3
Propilparabeno	8,30	-24,8
Butilparabeno	8,32	-23,8
Ácido Cinâmico	4,44	-29,5

Figura 5: Curvas de mobilidade efetiva vs pH dos parabenos e do padrão interno (PI) geradas a partir da equação 8.



A Figura 5 mostra que a partir do pH 9, as mobilidades efetivas dos compostos são diferentes, sendo possível a partir desse valor, separar os analitos. De acordo com a equação 1, a mobilidade efetiva começa a ser constante e igual a mobilidade iônica quando a fração molar das espécies ionizadas é 1. No valor onde pH é igual ao pKa dos parabenos, a mobilidade efetiva é 50% da mobilidade iônica pois 50% das moléculas encontram-se ionizadas. O eletrólito de corrida utilizado foi 20 mmol L^{-1} de TBS e 10% de metanol que apresenta pH de 9,3. O metanol foi adicionado ao eletrólito como modificador orgânico. Os modificadores orgânicos aumentam a solubilidade dos analitos no eletrólito, alteram os valores de pKa dos analitos e do fluxo eletrosmótico, modificando assim a capacidade de separação dos analitos (SCHUTZNER; KENNDLER, 1992). Como o modificador orgânico aumenta a solubilidade dos analitos no eletrólito de corrida, espera-se que com o aumento da porcentagem do modificador, a

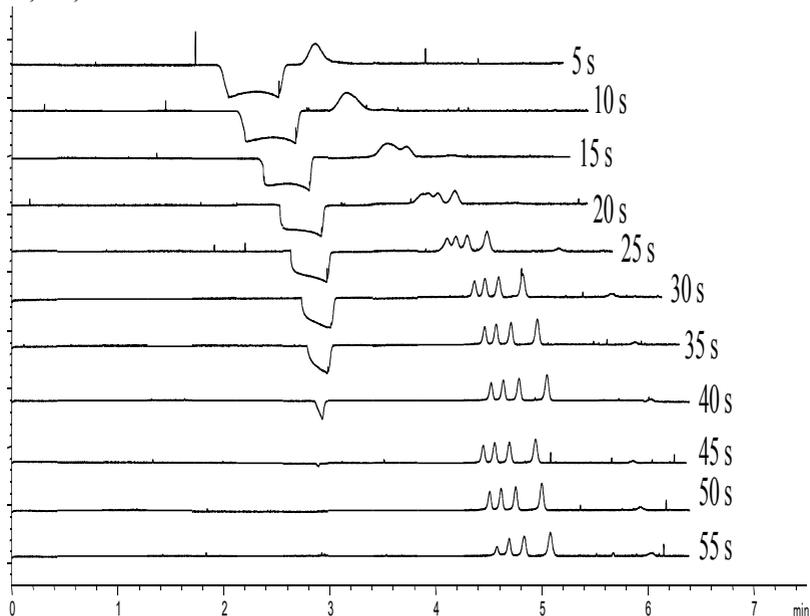
realização do *stacking* será mais complicada, considerando que os analitos penetrariam na zona do eletrólito com maior facilidade. Entretanto, a proximidade entre as mobilidades iônicas dos parabenos também pode dificultar a separação, então o uso de modificadores orgânicos pode melhorar a seletividade do método. Considerando esses dois fatores, a quantidade de modificador utilizado no eletrólito foi mantida em 10% v/v. Como o eletrólito utilizado não é composto por componentes modificadores da superfície interna do capilar, o modo de análise é contra-eletrosmótico.

Selecionado o eletrólito, a próxima etapa do trabalho foi o desenvolvimento do *stacking* de polaridade reversa automático. Os trabalhos reportados na literatura se baseiam no valor que a corrente adquire para que a polaridade seja invertida e essa inversão é realizada pelo próprio operador, o que acarreta em dificuldades na hora de reprodução do método. Nesse trabalho, a variável observada foi o tempo de aplicação da polaridade reversa. Embora corrente e tempo estejam interligadas, o tempo pode ser programado no software, por isso, a precisão e reprodutibilidade do método são aprimoradas. Outro objetivo do trabalho é o desenvolvimento de um método rápido. Porém, para injetar grandes volumes de amostra com pressões de injeção convencionais, 50 mbar por exemplo, o tempo necessário para injeção de um grande volume de amostra seria elevado. Assim, as injeções das amostras foram realizadas com um comando do software de análise chamado *flush*, que exerce pressões de aproximadamente 940 mbar. O tempo de injeção usando o comando *flush* foi fixado em 6 s. Os valores estimados pelo software *CE Expert Lite* de volume de injeção com 940 mbar de pressão em 6 s equivale a 172,62 nL e com 50 mbar por 5 s é de 7,65 nL. Embora o volume de injeção estimado pelo software seja referente a água, a proporção relativa entre a razão do tempo de injeção é a mesma, independente do líquido injetado, ou seja, a injeção com a função *flush está* inserindo no capilar um volume quase 24 vezes maior que o usual. A injeção de um grande volume de amostra acompanha a ideia de que a concentração de parabenos adsorvidos no cabelo não é muito alta.

O tempo de aplicação de polaridade reversa então foi observado em tempos de 5s a 55s. A diferença de potencial escolhida como parâmetro fixo foi de -25 kV (negativo na injeção). Para otimização do método, foi injetado uma mistura de padrões dos parabenos em 1,0 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹ do ácido cinâmico em 50% v/v de acetonitrila. A acetonitrila foi utilizada devido a escolha desse solvente para extração dos parabenos do cabelo. A utilização de acetonitrila na amostra

também pode colaborar para formação de um *stacking*. No *plug* de amostra, o campo elétrico é maior em relação ao eletrólito que apresenta maior condutividade, logo os íons da amostra são mais velozes enquanto permanecerem nesse *plug* e suas velocidades são drasticamente reduzidas ao encontrarem uma região de força iônica maior, favorecendo assim uma espécie de *stacking* de campo amplificado. Os eletroferogramas gerados estão apresentados na Figura 6.

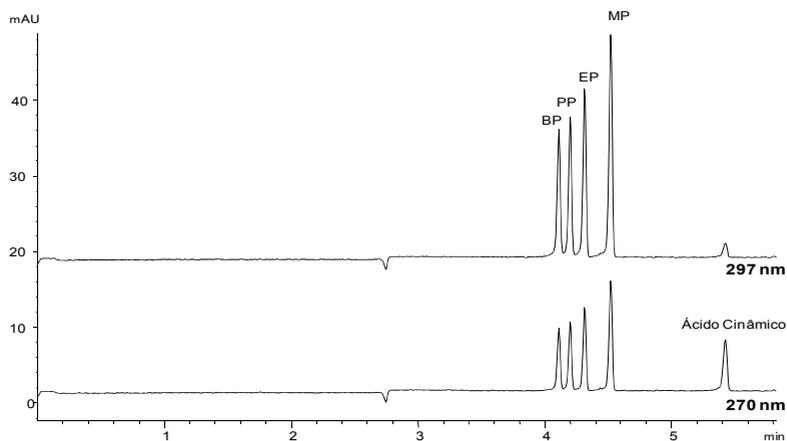
Figura 6: Eletroferograma da injeção de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ dos parabenos e $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido cinâmico em ACN : H_2O 50 % v/v. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x $50 \text{ } \mu\text{m}$ de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV variada de 5 a 55 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C . Ordem de Migração : BP, PP, EP, MP e PI.



A observação da figura 6 mostra que tempos de aplicação da polaridade reversa revela que tempos menores que 35 s apresentam baixa resolução. Em de 50 s o fluxo eletrosmótico (representado pelo perturbação de sinal negativo) também já foi retirado do capilar. Em 55 s o butilparabeno começa a migrar para fora do capilar pela extremidade

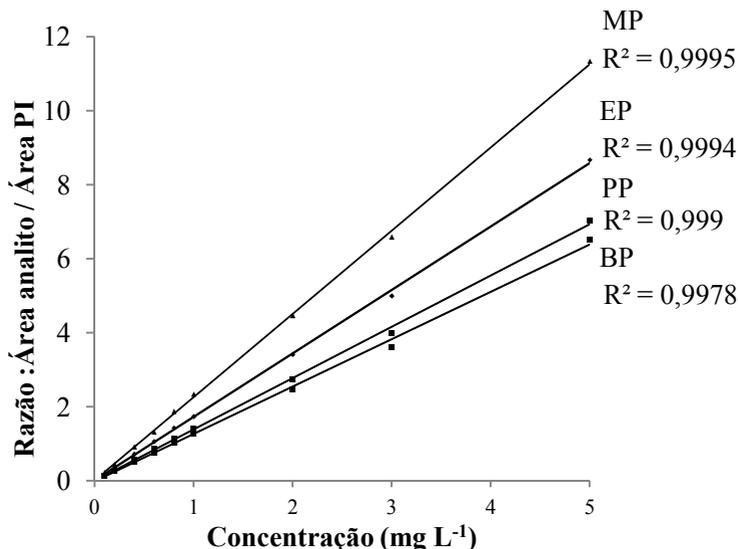
de injeção também. Isso pode ser observado pela redução do tamanho do pico que aparece em menor tempo de migração no eletroferograma de 55 s. Visualmente, qualquer tempo entre 35 a 50 s poderia ser utilizado. Entretanto a dificuldade em manter o fluxo eletrosmótico constante em eletroforese capilar é comum. Para compensar as variações do fluxo eletrosmótico, o tempo de 35 s foi selecionado. Nesse tempo, existe uma margem de segurança de 15s para que os analitos não migrem para fora do capilar. Entretanto essa margem de segurança não é suficiente para compensar as variações do fluxo eletrosmótico sozinha. Outra medida aplicada para compensar as variações do fluxo eletrosmótico que empurram os analitos para fora do capilar foi adicionar um *plug* de eletrólito logo após a injeção da amostra. O *plug* foi injetado por 1,2 s com 940 mbar (*flush*). Esse tempo foi escolhido por ter sido o maior tempo de injeção possível sem que houvesse interferência considerável na resolução dos picos dos parabenos. A resolução dos picos entre BP - PP, PP - EP e EP - MP nessas condições foram respectivamente de 1,2, 1,3 e 1,9. As corridas então foram realizadas 46 vezes consecutivas sem que os analitos saíssem do capilar pela extremidade da injeção. Sem o *plug* de eletrólito adicionado após injeção de amostras, os parabenos já começavam a migrar para fora do capilar a partir da 17^a injeção consecutiva. O problema também não ocorreu durante o processo de validação do método. Dessa maneira, o problema da saída dos analitos durante a realização do *stacking* com polaridade reversa foi resolvido com sucesso. O eletroferograma da corrida em condições otimizadas está representado na Figura 7. Também deve ser considerado que ao selecionar essas condições de *stacking*, a matriz não é totalmente eliminada. Entretanto os efeitos de matriz não são intensos. Isso pode ser observado mais a frente na Tabela 7 nos parâmetros de validação do método, cujo coeficientes angulares das curvas de calibração externa e adição de padrão apresentam valores próximos.

Figura 7: Eletroferograma da injeção de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ dos parabenos e $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido cinâmico em ACN : H_2O 50 % v/v. Condições operacionais: Capilar de $50 \text{ cm} \times 50 \text{ } \mu\text{m}$ de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C .



A injeção realizada com a função *flush* é mais suscetível a erros devido a elevada pressão aplicada, sendo assim mais difícil para o próprio equipamento controlar a variação de pressão durante a injeção. Quando a pressão é aplicada por alguns minutos, é observado que a pressão decresce com o tempo. Para verificar se a variação de pressão era significativa nas condições selecionadas, foram feitas curvas de calibração para os parabenos na faixa de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ até $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ em 50% de Acetonitrila : H_2O v/v. As quatro curvas de calibração estão representadas na Figura 8.

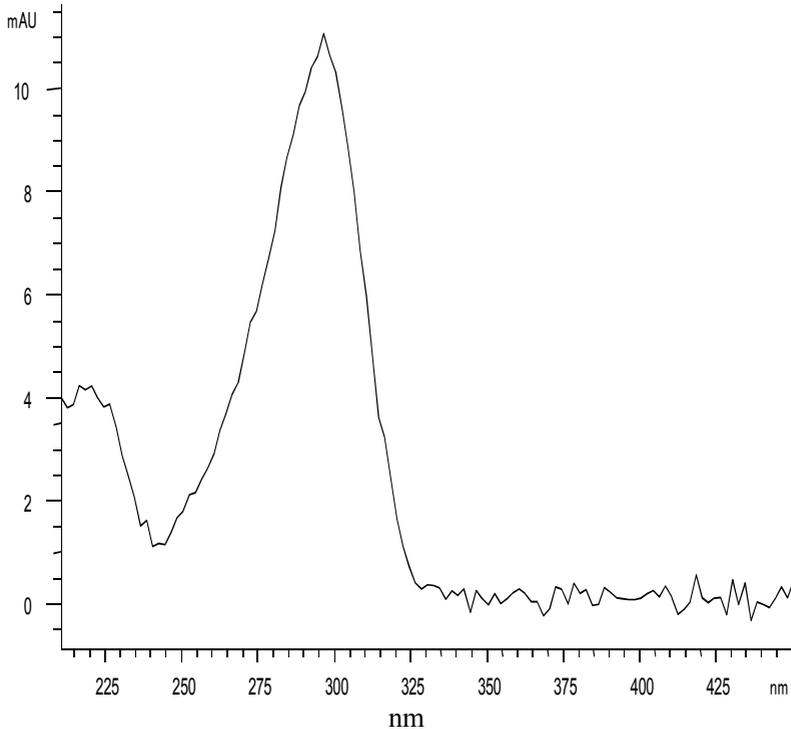
Figura 8: Curvas de calibração externa obtidas com o método de pré-concentração desenvolvido para os 4 parabenos na faixa de 0,1 a 5,0 mg L⁻¹ em 50% de ACN : H₂O 50% v/v



A linearidade das curvas foi mantida mesmo com pressões de injeção elevadas, comprovando assim que as variações de pressão da função *flush* do software de análise são desprezíveis ou que podem ser compensadas pelo uso do padrão interno.

O método foi desenvolvido observando-se o comprimento de onda de 297 nm correspondente a máxima absorção dos parabenos. O espectro de absorção no UV do MP está representado na Figura 9. Como a região cromófora dos parabenos é igual entre eles, o espectro de UV de um determinado parabeno não é muito diferente do espectro de outro parabeno.

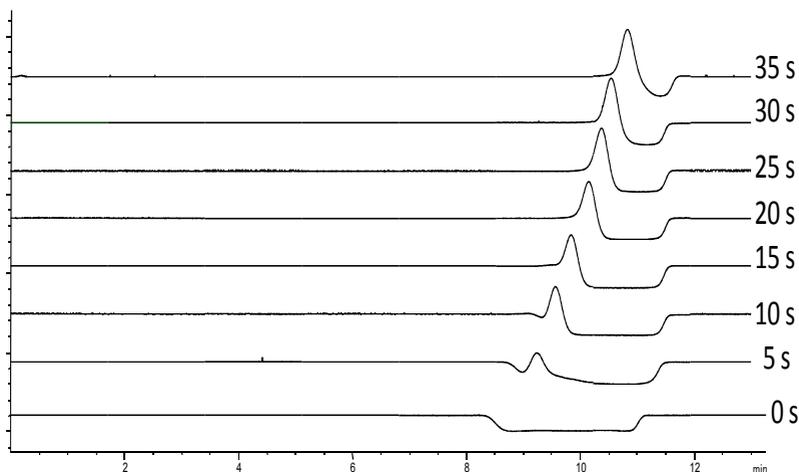
Figura 9: Espectro de absorção de UV do metilparabeno em pH 9,3. A região de máxima absorção corresponde a 297 nm.



4.2 Estudo do método por *stacking*

Para estudo do fenômeno de *stacking*, intervalos de 5 em 5 s foram observados durante a aplicação de polaridade reversa. A amostra então é empurrada em direção ao detector com baixa pressão. Na Figura 10 estão representados os 8 eletroferogramas desde 0 s até 35 s de aplicação de polaridade reversa. Nota-se que o pico do metilparabeno é formado na interface entre a zona do eletrólito e a zona da amostra.

Figura 10: Perfil do *stacking* monitorado a cada 5 s até 35 s com injeções de 5 mg L^{-1} de MP 50% de ACN : H_2O 50% v/v. Após cada tempo monitorado, o *plug* da amostra é empurrado em direção ao detector através da injeção de eletrólito de corrida com 50 mbar durante 13 minutos. A voltagem de separação não foi aplicada após os tempos de *stacking* estudados. Condições operacionais: Capilar de $50 \text{ cm} \times 50 \text{ }\mu\text{m}$ de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9,3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min. Injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV de 0 a 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Temperatura do cartucho controlada em 20°C .



No tempo 0 s não há indício de ionização dos parabenos, pois os parabenos neutros não absorvem em 297 nm. Uma hipótese possível é que, devido a pré-concentração ainda não ter ocorrido no tempo 0 s, a concentração de parabenos ionizados no *plug* de amostra não é grande o suficiente para ser detectada. A aplicação da polaridade reversa a partir de 5 s gera a formação de um pico em uma das interfaces entre a zona da amostra e a zona do eletrólito. O *stacking* ocorre na interface entre as duas zonas devido a diferença de condutividade entre as diferentes zonas presentes.

Para compreender de uma maneira mais visual o que pode estar ocorrendo foram utilizadas as Figuras 11, 12 e 13. Cada figura representa as etapas em ordem do que possivelmente está ocorrendo dentro do capilar durante o processo de *stacking*. A Figura 11,

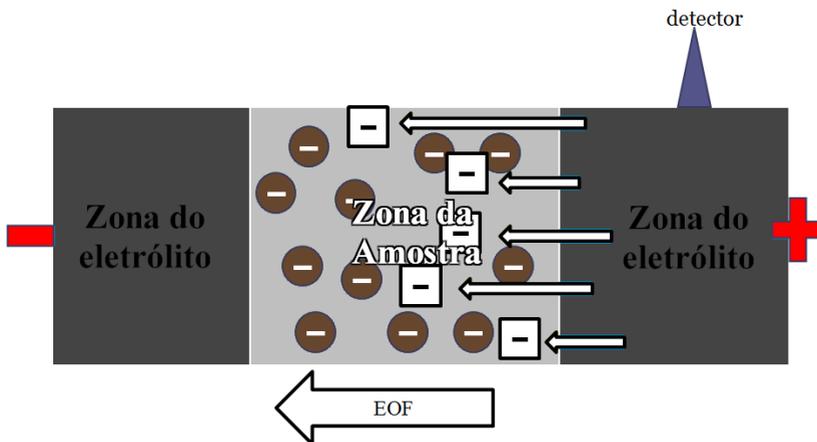
representa as diferentes zonas presentes dentro do capilar antes da aplicação da diferença de potencial para formação do *stacking*. O pH na zona da amostra é menor que o pH da zona do eletrólito. Desse modo, uma pequena fração (ou nenhuma) do MP encontra-se ionizada.

Figura 11: Representação das zonas existentes dentro do capilar. Antes da aplicação da diferença de potencial para realização do *stacking* poucas moléculas de MP ionizadas (círculos) devido ao pH mais baixo da região da zona da amostra.



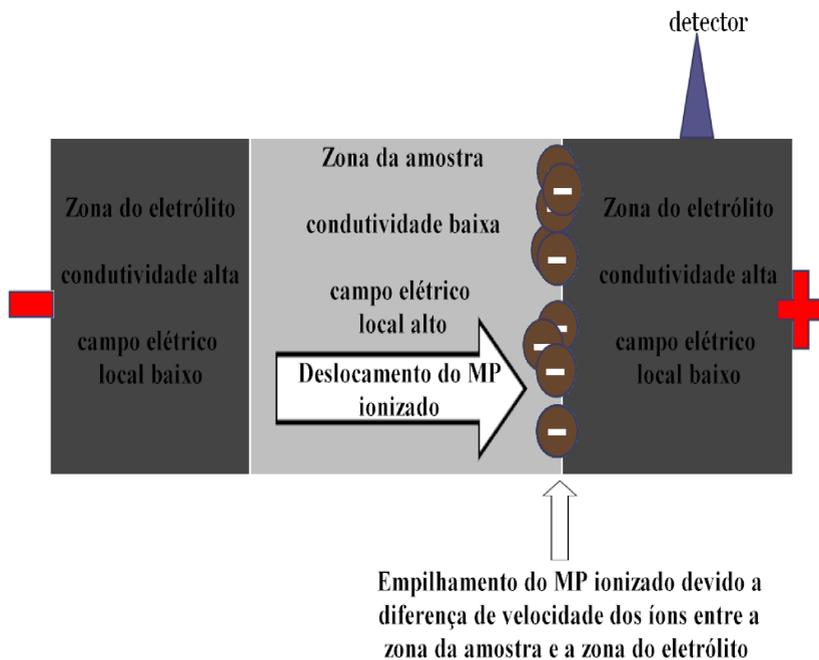
Na próxima etapa, representada pela Figura 12, quando a diferença de potencial é aplicada para formação do *stacking*, íons borato penetram na zona da amostra e aumentam o pH daquela zona, e a fração molar de MP ionizado aumenta gradativamente e proporcionalmente ao tempo de aplicação da diferença de potencial. O fluxo eletrosmótico também está presente durante a realização do *stacking* e é esse fluxo que empurra os íons borato para dentro da zona da amostra.

Figura 12: Representação dos primeiros instantes logo após a aplicação da diferença de potencial entre os eletrodos. Os íons borato (quadrados) entram na zona da amostra e aumentam o pH na região devido a existência do fluxo eletrosmótico. Assim, a fração molar do MP ionizado (círculos) aumentam. Legenda: EOF - Fluxo eletrosmótico.



Na etapa seguinte (Figura 13), está apresentado o que ocorre com o MP logo após a sua ionização. Quando o MP adquire carga negativa, o íon move-se rapidamente em direção ao eletrodo de carga positiva, tanto devido a atração eletrostática em relação a esse eletrodo como também devido a repulsão eletrostática referente ao eletrodo de carga negativa que está mais próximo da zona da amostra. Isso ocorre por que o campo elétrico local na zona da amostra é muito alto devido a condutividade ser muito baixa. Portanto, os íons que estiverem na zona da amostra adquirem uma velocidade muito alta. Entretanto ao atingir a interface entre a zona da amostra e a zona do eletrólito os íons MP sofrem uma redução drástica de velocidade. Isso ocorre devido a alta condutividade da zona do eletrólito que produz um campo elétrico local muito baixo e por isso, a velocidade dos íons diminui drasticamente quando começam a entrar na zona do eletrólito. Logo, os analitos que estavam localizados em diferentes partes da zona da amostra (devido ao grande volume de injeção) podem ser empilhados na interface entre as 2 diferentes zona do capilar. Dessa maneira, o *stacking* é realizado. Embora o estudo tenha sido realizado apenas com o MP, esse processo de *stacking* ocorre para todos os ânions que estiverem na zona da amostra.

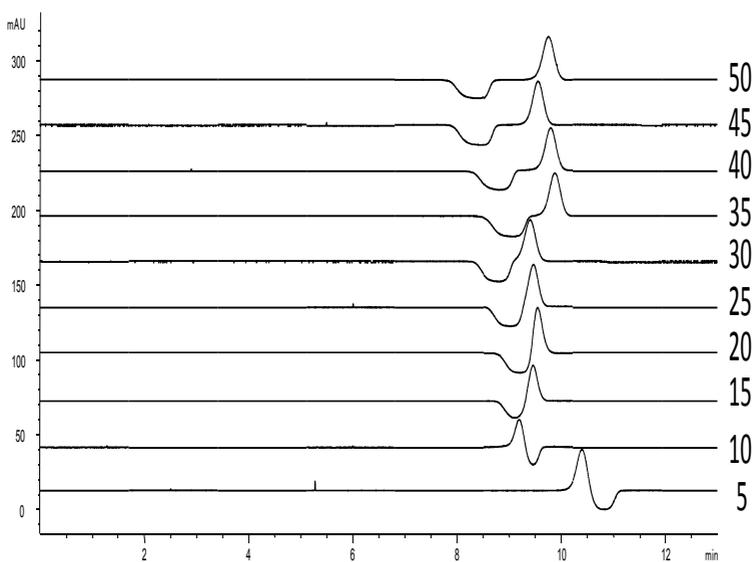
Figura 13: Representação do *stacking* que ocorre com os íons MP após sua ionização. O MP ionizado apresenta alta velocidade na região da amostra e baixa velocidade na zona do eletrólito. O empilhamento ocorre devido a drástica mudança de velocidade que o MP ionizado (círculo) apresenta nas diferentes duas diferentes zonas. Os íons borato e o fluxo eletrosmótico não estão representados aqui, entretanto eles estão presentes durante todo processo de *stacking*.



Pode-se notar que empilhamento do MP ocorre na interface mais próxima ao detector devido aos eletroferogramas gerados na figura 6. Observando a zona da amostra que foi empurrada em direção ao detector por pressão, a formação do pico referente ao MP aparece no eletroferograma em apenas uma das interfaces da zona de amostra. Como o pico do lado esquerdo da zona da amostra no eletroferograma (tempo de migração menor), pode-se concluir que os analitos estavam empilhados na interface que estava mais próxima ao detector.

Depois dos 35 s de polaridade reversa, foi estudado a aplicação da voltagem de separação de 5 a 50 s. Os eletroferogramas estão representados na Figura 14.

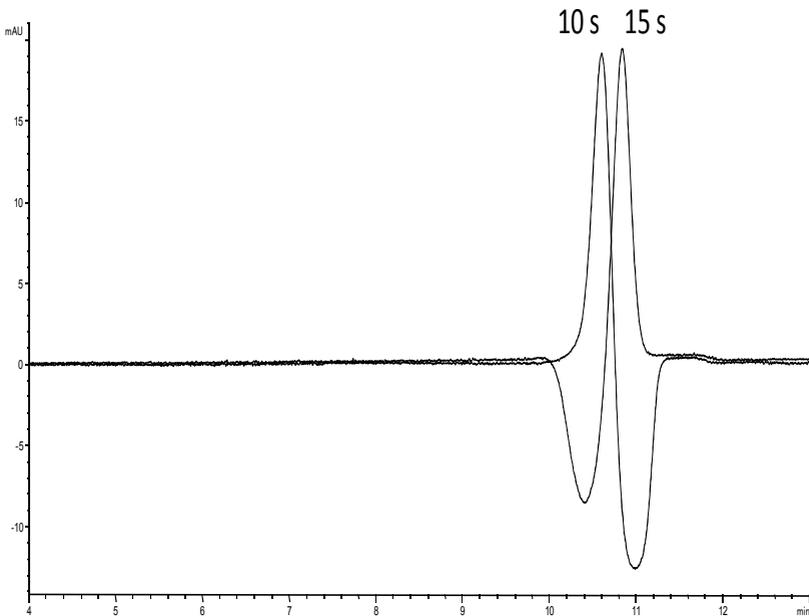
Figura 14: Perfil pós *stacking* observado em intervalos de 5 s até 50 s com aplicação da voltagem de separação. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9,3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Aplicação de voltagem de separação 30 kV por tempos de 5 a 50 s. Após a voltagem de separação, o *plug* de amostra é empurrado em direção ao detector com eletrólito de corrida durante 13 minutos aplicando-se 50 mbar. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.



Observando a Figura 14, notamos que entre 10s e 15s o fluxo eletrosmótico atravessa novamente MP quando a voltagem de separação é aplicada. Durante o tempo de 30s, o fluxo já está quase separado do MP. A ampliação dos eletroferogramas de 10s e 15s sobrepostos fornece uma informação interessante. A ampliação está na Figura 15. Note que o

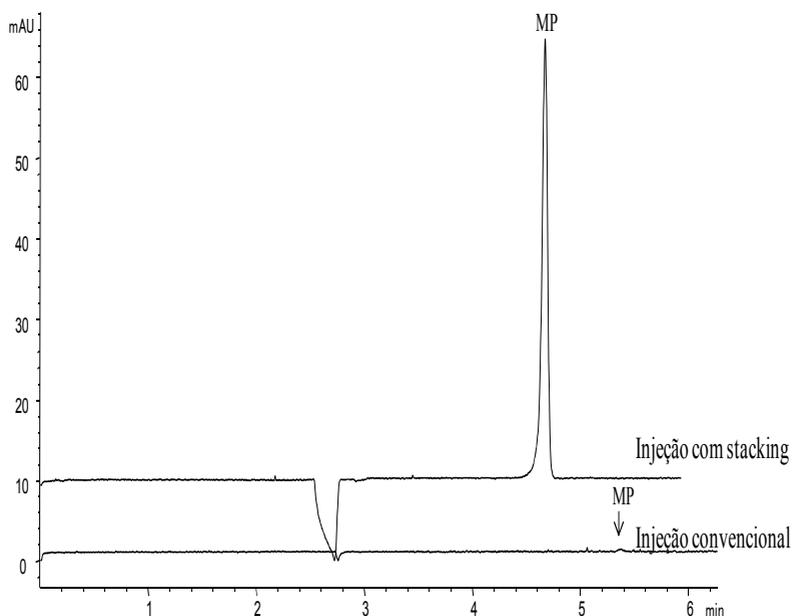
pico do MP antes e depois de ser ultrapassado pelo fluxo eletrosmótico permanece praticamente do mesmo tamanho. Esse fato indica que o fluxo eletrosmótico gerado durante a voltagem de separação não promove um segundo *stacking*. O *stacking* ocorre de apenas durante o processo de aplicação da polaridade reversa.

Figura 15: Perfil do pico do MP Antes de ser atravessado pelo fluxo eletrosmótico e depois de ser atravessado pelo fluxo eletrosmótico durante aplicação da voltagem de separação por 10 s e 15 s. Eletroferograma da injeção de 5 mg L⁻¹ dos parabenos ACN : H₂O 50 % v/v. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol. pH :9,3 Injeção: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do *stacking*. Logo após, aplicação de 30 KV por 10 e 15, e após esses tempos, a amostra é empurrada em direção ao detector através da injeção de eletrólito de corrida (50 mbar por 13 minutos). Temperatura do cartucho controlada em 20°C.



Para mostrar a diferença entre a injeção da amostra seguida de *stacking* e uma injeção convencional de 50 mbar por 3 s os eletroferogramas das duas situações foram sobrepostos e estão representados na Figura 16. Note que o pico do MP referente ao método sem *stacking* não pode ser observado direito devido ao tamanho da escala. A razão entre as áreas dos MP com e sem *stacking* é de cerca de 154 vezes. Esse dado reflete o tamanho do ganho de sinal em virtude da pré-concentração realizada.

Figura 16: Eletroferogramas sobrepostos de uma injeção convencional (50 mbar por 3s) de 5 mg L^{-1} de metilparabeno em ACN:H₂O 50% v/v e a injeção da mesma amostra com o método de *stacking* desenvolvido.

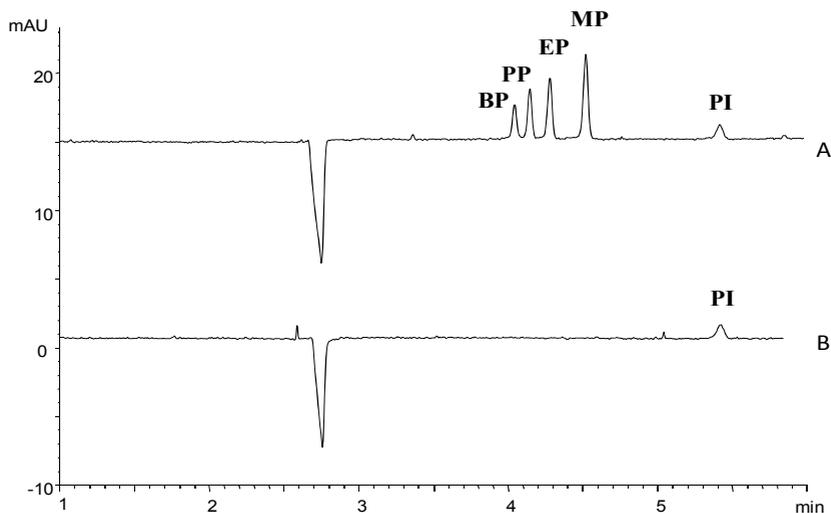


4.3 Análise de amostra de xampu comercial antes e após adição de parabenos

A análise da amostra de xampu com a qual os cabelos serão lavados deve ser analisada para que uma simulação de adsorção possa ser realizada. Amostras de cabelo aleatórias sem lavagem prévia não poderiam ser usadas pois não seria possível descobrir se os parabenos encontrados na amostra de cabelo eram provenientes de um creme sem

necessidade de enxague por exemplo. A análise do xampu comercial utilizado não demonstrou a presença de parabenos (conforme o rotulado) como pode ser observado no eletroferograma da Figura 17. Na mesma Figura, é possível observar o eletroferograma da amostra do mesmo xampu com adição dos parabenos.

Figura 17: Eletroferogramas da mesma amostra de xampu diluído antes (B) e depois adição dos parabenos (A). Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "stacking". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.



As concentrações encontradas dos parabenos na análise da amostra de xampu modificado estão representadas na Tabela 6. Os valores encontrados estão de acordo com o máximo permitido de 0.2 % para cada parabeño individualmente. De acordo com esses dados, é possível realizar uma simulação de lavagem dos cabelos dentro dos limites de concentração estipulado para cosméticos pela ANVISA e pela União Européia.

Tabela 6: Concentração de MP, PP, EP, BP, encontrada nas amostras de xampu após adição dos padrões.

Parabeno	MP	EP	PP	BP
Concentração (% m/m)	0.15 ± 0.010	0.17 ± 0.003	0.17 ± 0.003	0.18 ± 0.004

4.4 Otimização da extração de parabenos adsorvidos no cabelo

O perfil de extração seguiu o mesmo padrão em todas as triplicatas. Através da altura dos picos, como pode ser observado na Figura 18, os parabenos são extraídos principalmente nos primeiros 5 mL de solvente utilizado. Na segunda etapa ainda pode ser observado uma pequena quantidade de parabenos sendo extraídos e na 3ª etapa não há quantidade significativa extraída.

Para evitar extrações em várias etapas da mesma amostra de cabelo, também foi testada uma extração direta com 10 mL de solvente para a mesma massa de cabelo. A Figura 19 apresenta o perfil da extração com 1 etapa direta com 10 mL e uma segunda extração com 5 mL. Pode ser observado que após lavagem com água deionizada, a extração com mais 5 mL de solvente praticamente não extraiu mais quantidades significativas dos parabenos estudados.

Figura 18: Perfil de extração dos parabenos adsorvidos no cabelo. Legenda : A - 1ª etapa da extração, B - 2ª etapa da extração, C- 3ª etapa da extração. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.

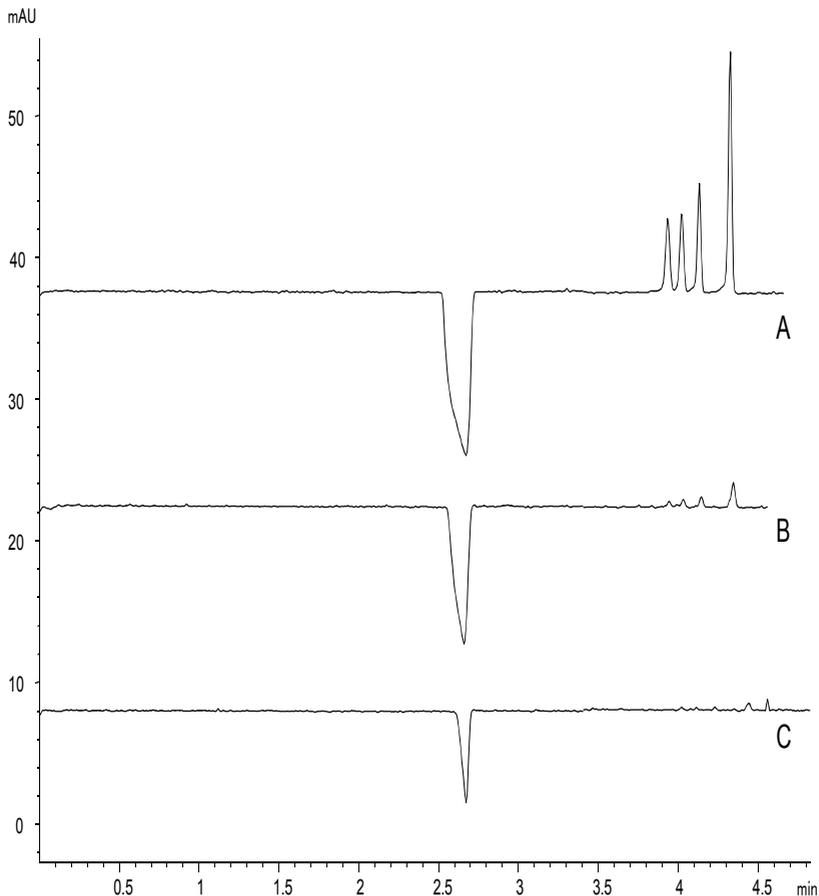
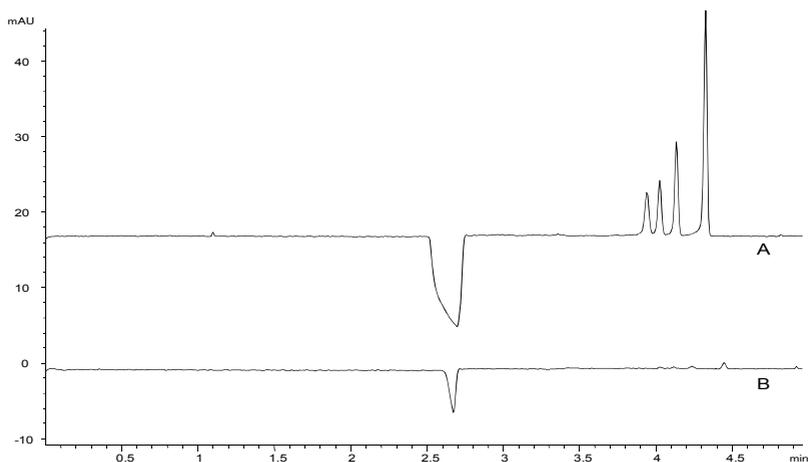


Figura 19: Perfil de extração dos parabenos adsorvidos no cabelo. Legenda: A- extração direta com 10 mL de ACN: H₂O 50% v/v. B- 2^a extração com 5 mL de ACN : H₂O 50% v/v após lavagem dos cabelos com água deionizada. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 µm de D.I. Eletrólito 20 mmol L⁻¹ TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.



A comprovação da adsorção dos parabenos no cabelo foi comprovada nessa etapa de maneira qualitativa.

4.5 Figuras de mérito do método e análise de amostra de cabelos

As Figuras de mérito do método estão representadas na Tabela 7. Todos os valores de desvio padrão relativo em relação a precisão também apresentam baixos valores (entre 6.2 % e 2.0 %) , dessa maneira, o método proposto pode ser considerado preciso. Os parâmetros de precisão inter-day e intraday são de grande importância nesse método, visto que a metodologia faz o *stacking* de maneira automática, sem interferência humana, e de maneira rápida. Os valores de recuperação encontrados (entre 87.1 % e 116.8 %) também foram aceitáveis (GUIDELINES FOR THE VALIDATION OF CHEMICAL METHODS FOR THE FDA FOODS PROGRAM, 2012)

Tabela 7: Figuras de mérito do método proposto para análise de cabelos.

Parâmetro	MP	EP	PP	BP
Número de pratos	34730	44600	55260	49290
Faixa linear (mg L ⁻¹)		0.1 - 5.0		
Coefficiente de determinação (R ²)	0.999	0.999	0.999	0.998
Coefficiente angular (L mg ⁻¹)	0.00220	0.00170	0.00140	0.00130
Erro padrão do Coefficiente angular	0.00002	0.00002	0.00002	0.00003
Intercepto	0.0097	0.0085	0.0020	-0.0182
LOD (mg L ⁻¹) ^a	0.017	0.016	0.013	0.011
LOQ (mg L ⁻¹) ^a	0.050	0.047	0.038	0.032
Precisão <i>inter-day</i> (RSD%) ^b	< 4.8	< 6.2	< 5.8	< 6.1
Precisão <i>intraday</i> (RSD%) ^c	< 2.2	< 2.0	< 3.6	< 2.3
Precisão instrumental (RSD%) ^c	< 4.3	< 3.3	< 4.1	< 4.6
Recuperação (%) ^d	87.1 a 105.6	90.8 a 102.3	93.6 a 116.8	99.8 a 107.2
Coefficiente angular da curva de calibração da adição de padrão (L mg ⁻¹)	0.00230	0.00170	0.00140	0.00120

^a Valores obtidos da relação sinal ruído 3:1 e 10:1 para o LOD e LOQ, respectivamente; ^b n = 9; ^c n = 10; ^d calculado para 5 níveis de concentração.

O método desenvolvido apresentou uma grande sensibilidade. Os valores de LOQ obtidos foram entre 0,050 e 0,032 mg L⁻¹ e LOD entre 0,017 e 0,011 mg L⁻¹. Em comparação com os métodos desenvolvidos por HPLC e CE citados nas tabelas 2 e 3, os valores obtidos com o método proposto neste trabalho obtiveram melhores LOQ

e LOD. Considerando também que o tempo para geração dos cromatogramas para os métodos citados por HPLC e GC nas tabelas 1 e 2 podem chegar aos 20 minutos, o método de *stacking* nesse trabalho pode ser realizado em menos de 7 minutos, ganhando assim grande capacidade de frequência analítica. O preparo de amostra também é realizado de maneira simples, evitando as várias etapas que os métodos por HPLC e GC normalmente necessitam para realização de um *cleanup* ou derivatização da amostra.

Os efeitos de matriz sobre os analitos no método proposto não são consideráveis. Como mostram as figuras 20, 21, 22 e 23, onde podem ser observadas as comparações dos coeficientes angulares das curvas de calibração externa e de adição de padrão mostram que não há interferência significativa de matriz, mesmo que a matriz não seja eliminada totalmente pela extremidade de injeção durante a realização do *stacking*.

Figura 20: Curvas de calibração por adição de padrão em extrato de cabelo e externa para o metilparabeno.

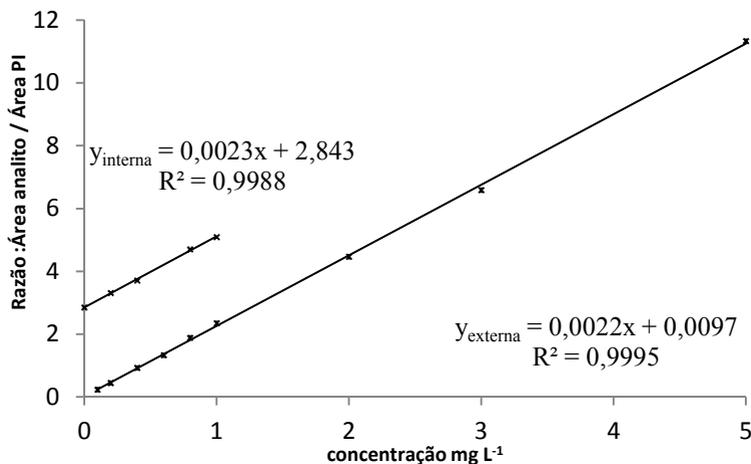


Figura 21: Curvas de calibração por adição de padrão em extrato de cabelo e externa para o etilparabeno.

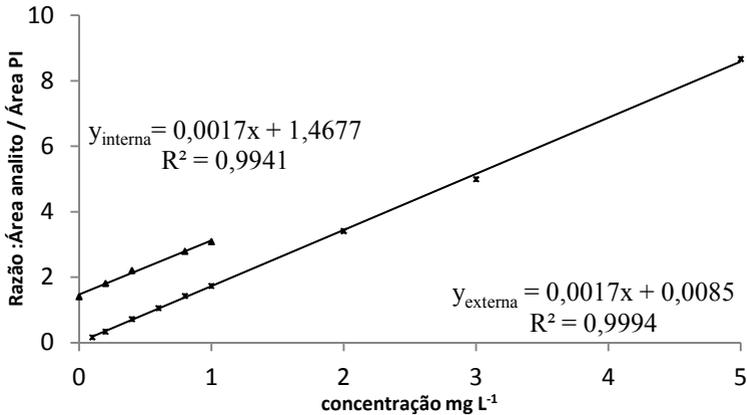


Figura 22: Curvas de calibração por adição de padrão em extrato de cabelo e externa para o propilparabeno.

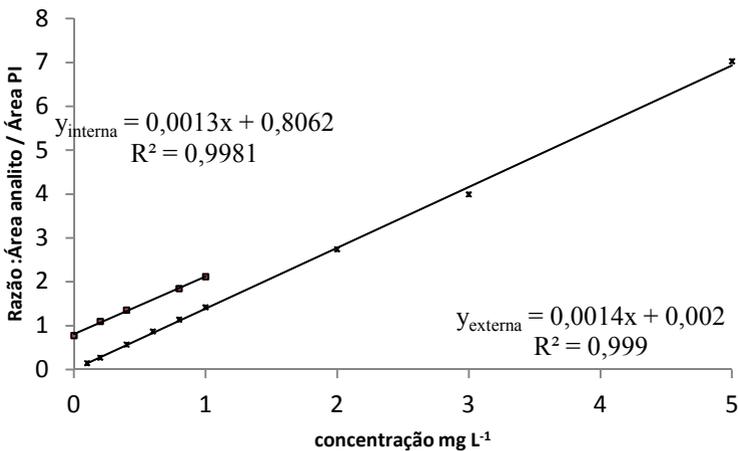
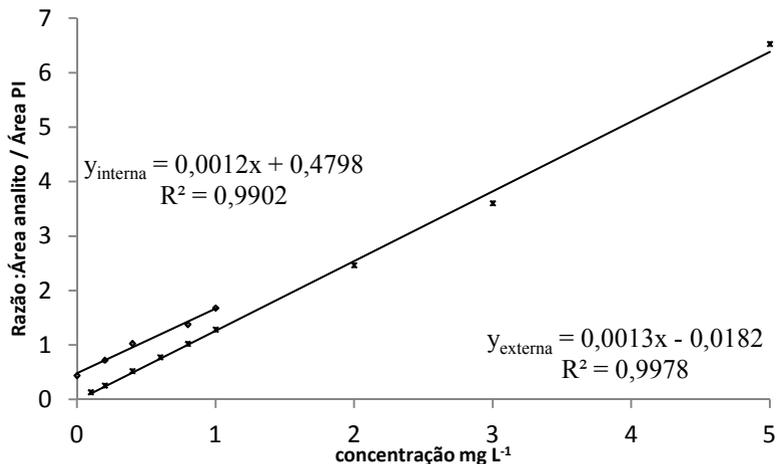


Figura 23: Curvas de calibração por adição de padrão em extrato de cabelo e externa para o butilparabeno.



4.6 Análise das amostras de cabelo

Na etapa de otimização da extração foi comprovado de maneira qualitativa que os parabens adsorvem nos cabelos. Para avaliar a adsorção dos parabens nos cabelos de maneira quantitativa foram analisadas 5 amostras de cabelos diferentes.

As concentrações de cada parabeno encontrados nas amostras estão representados na Tabela 8. O branco dos extratos dos cabelos não mostrou picos referentes a parabens nem interferentes, logo os parabens encontrados nas amostras de cabelos são provenientes de adsorção do composto encontrado no xampu.

Tabela 8: Concentração de parabenos adsorvidos em amostras de cabelos.

Amostra de cabelo	MP^a	EP^a	PP^a	BP^a
A	196,26 ± 9,54	167,24 ± 14,02	90,23 ± 12,79	68,23 ± 9,34
B	256,40 ± 3,70	233,72 ± 0,79	110,83 ± 8,82	72,32 ± 1,91
C	284,47 ± 0,83	254,15 ± 17,67	166,20 ± 17,48	130,29 ± 9,58
D	493,59 ± 7,26	374,50 ± 47,29	293,77 ± 17,48	207,01 ± 4,78
E	167,37 ± 5,42	148,66 ± 9,82	72,46 ± 5,76	49,29 ± 2,86

^a $\mu\text{g g}^{-1}$ de cabelo.

Dentre as amostras, é conhecido que as amostras de cabelo C e D são cabelos tingidos e análise informa que elas adsorveram mais que as outras. A amostra E é uma amostra de cabelo que nunca foi tingido e apresentou a menor concentração de parabenos adsorvidos. Não há conhecimento de que as amostras de cabelo A e B foram tingidos. A menor concentração de parabenos totais adsorvidos em amostra de cabelo foi da amostra E, apresentando uma média de aproximadamente 438 μg por grama de cabelo. A amostra D foi a amostra com maior concentração de parabenos adsorvidos com 1477 μg por grama de cabelo. Testes adicionais seriam necessários para afirmar que os cabelos tingidos adsorvem mais. As Figuras de 24 a 28 representam os eletroferogramas dos extratos de cabelo das amostras A, B, C, D e E diluídos 4 vezes. Em 297 nm não há interferência significativa de outros picos encontrados nos extratos para cada amostra.

Figura 24: Eletroferograma da amostra A diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "stacking". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.

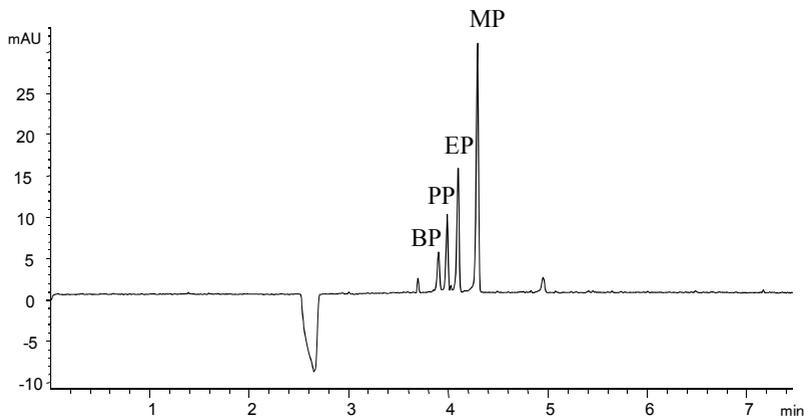


Figura 25: Eletroferograma da amostra B diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "stacking". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.

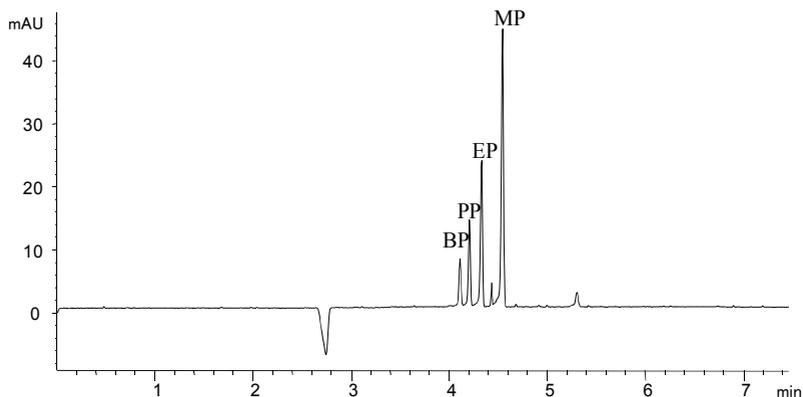


Figura 26: Eletroferograma da amostra C diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.

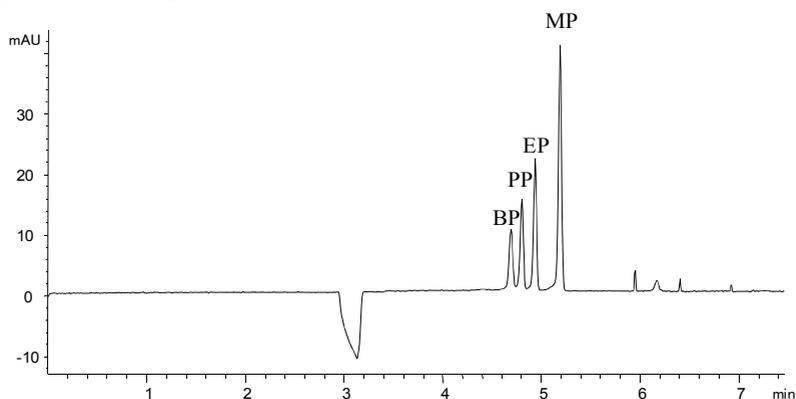


Figura 27: Eletroferograma da amostra D diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.

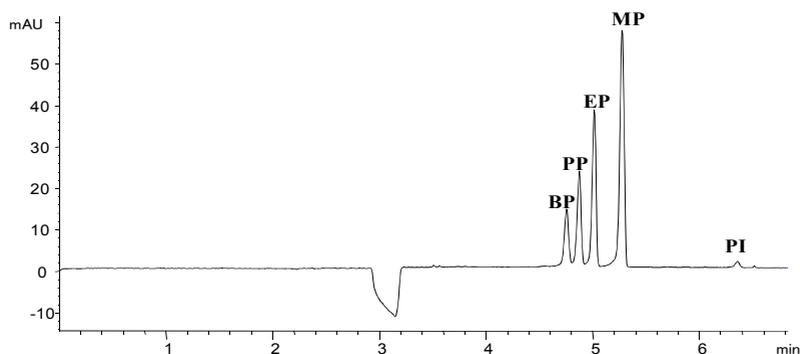
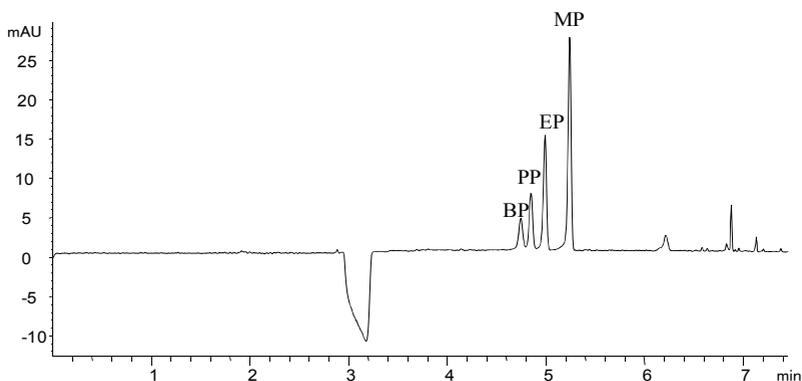


Figura 28: Eletroferograma da amostra E diluída 4 vezes. Condições operacionais: Capilar de 50 cm x 50 μm de D.I. Eletrólito 20 mmol L^{-1} TBS em 10% de metanol pH 9.3. Injeção da amostra: 940 mbar (*flush*) por 0,1 min, injeção de eletrólito logo após o *plug* de amostra *flush* de 0,02 min e aplicação de -25 KV por 35 s em vials contendo o eletrólito de corrida para realização do "*stacking*". Aplicação de 30 KV para separação dos parabenos. Temperatura do cartucho controlada em 20°C.



As análises mostram que o metilparabeno é espécie que mais adsorveu no cabelo em todas as amostras testadas, embora fosse esperado que o butilparabeno adsorvesse mais por ser mais hidrofóbico. A hipótese sugerida para o ocorrido é que o xampu é um meio micelar e quando os cabelos foram enxaguados, o butilparabeno foi retirado junto com as micelas. O metilparabeno entretanto interage menos com as micelas e permanece em maior quantidade no cabelo.

Embora a concentração de parabenos encontrado nas amostras aparentemente não seja grande, deve ser considerado que muitas pessoas estão em contato frequente com os parabenos através da adsorção do composto devido ao uso diário de xampu ou outros produtos de enxágue que apresentem parabenos em sua composição, não sendo descartado a possibilidade de que a adsorção ocorra também nos pêlos devido sua semelhança estrutural com o cabelo. A concentração encontrada em tecidos cancerosos em trabalhos anteriores também foi baixa, sendo da ordem de ng g^{-1} (DARBRE *et al.*, 2004; SHANMUGAM *et al.*, 2010) logo a ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ talvez apresente efeito biológico considerável. A possibilidade de formação de forte oxidante que pode danificar o cabelo também pode ser cogitada agora, visto que os dados experimentais comprovaram a presença dos parabenos na amostras. Entretanto estudos

adicionais são requeridos para verificar qual é o real comportamento dos parabenos adsorvidos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de um método inédito de reversão automático da polaridade para realização do *stacking* dos parabenos foi concluído de maneira satisfatória. O procedimento operacional é realizado de maneira rápida, com injeção de grande volume de amostra em poucos *s* e reversão da polaridade sem interferência humana, aumentando assim a frequência analítica e reprodutibilidade do método comparado a outros trabalhos reportados na literatura. O método também apresentou alta sensibilidade, levando em conta o sistema de detecção e o comprimento do caminho ótico do capilar. Os parâmetros de precisão do método foram satisfatórios e o problema de perda dos picos devido a variação do fluxo eletrosmótico foram compensados através das diferenciadas medidas tomadas para contornar o problema. O procedimento experimental para observação da formação do *stacking* também foi realizado com sucesso, sendo assim possível observar a formação do fenômeno durante intervalos fixos.

A análise das amostras também confirmaram a presença de parabenos adsorvidos nos cabelos, sendo essa a primeira vez que a adsorção de parabenos é confirmada no meio científico. Os efeitos dos parabenos sobre os cabelos ainda é desconhecido. Existe a possibilidade de que os parabenos formem oxidantes, visto que as condições para que isso aconteça podem ser cumpridas de acordo com estudos liderados por Nishizawa em 2006. Uma vez comprovada a adsorção dos parabenos pelos cabelos e, devido a semelhança estrutural, possivelmente através dos pêlos, a permeação dérmica dos compostos talvez aconteça devido ao contato frequente ou direto com a epiderme. São necessários estudos adicionais para verificar qual dos eventos ocorre com os parabenos adsorvidos e se realmente acontecem. A permeação dérmica é mais preocupante, visto que é geralmente aceito que parabenos encontrados em amostras de tecidos humanos são provenientes de aplicações dermais, e que existem evidências na literatura de que os parabenos foram encontrados em tecidos cancerosos. O trabalho desenvolvido sugere como perspectiva a realização de estudos mais aprofundados de caráter biológico para verificar as consequências do fenômeno sob a saúde humana e/ou dos cabelos.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, J. M. *et al.* High performance liquid chromatographic determination of phenoxetol, methyl paraben, ethyl paraben, n-propyl paraben, iso-butyl paraben, n-butyl paraben and croconazole center dot HCl. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical** p. 1609-1613. Ago. 1996.
- ALVAREZ-RIVERA, G. *et al.* Development of a multi-preservative method based on solid-phase microextraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry for cosmetic analysis. **Journal of Chromatography A** p. 13-25. Abr. 2014.
- BARBA, C. *et al.* Water content of hair and nails. **Thermochimica Acta** p. 136-140. Out. 2009.
- BATE, L. C. Adsorption and Elution of Trace Elements on Human Hair. **International Journal of Applied Radiation and Isotopes** p. 417- 423. Jul 1996.
- BLEDZKA, D.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. (2014). Parabens. From environmental studies to human health. **Environment International** p. 27-42. Jun 2014.
- CAON, T. *et al.* Evaluation of the transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. **International Journal of Pharmaceutics**. p. 1-6. Mai. 2010.
- CHU, Q. C. *et al.* Sensitive determination of parabens in soy sauces by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **European Food Research and Technology** p. 891-897. Out. 2010.
- Costa, A. C. O. *et al.* Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis - Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. **Journal of Chromatography A** p. 123-127. Set. 2008.
- da LUZ, E. R. *et al.* Capillary zone electrophoresis separation of azaarenes with sensitive UV absorption photometric detection after cationic solid phase extraction and field amplified sample stacking. **Fuel** p. 20-26. Aug. 2014.
- DARBRE, P. D. *et al.* Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of Applied Toxicology** p. 5-13. Jan. 2004.
- DOLZAN, M. D. *et al.* A fast method for simultaneous analysis of methyl, ethyl, propyl and butylparaben in cosmetics and pharmaceutical formulations using capillary zone electrophoresis with UV detection. **Analytical Methods** p. 6023–6029. Aug. 2013.

GAO, W. H.; LEGIDO-QUIGLEY, C. Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. **Journal of Chromatography A** p. 4307-4311. Jul. 2011.

GUIDELINES FOR THE VALIDATION OF CHEMICAL METHODS FOR THE FDA FOODS PROGRAM : FOODS PROGRAM SCIENCE AND RESEARCH STEERING COMMITTEE p 35. 2012.

HANDA, O. *et al.* Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. **Toxicology** p. 62-72 . Out 2006.

INOUYE, S.; ABE, S. Predominant adsorption of sesquiterpene constituents of lavender, tea tree, lemongrass and thyme thymol oils on hairless mouse and human hairs in an aromatic bath. **International Journal of Aromatherapy** p. 75-83. Jul. 2006.

JAIN, R. *et al.* Simultaneous derivatisation and preconcentration of parabens in food and other matrices by isobutyl chloroformate and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatographic analysis. **Food Chemistry** p. 436-443. Nov. 2013.

JAWORSKA, M.; SZULINSKA, Z.; WILK, M. Application of a capillary electrophoresis method for simultaneous determination of preservatives in pharmaceutical formulations. **Journal of Separation Science** p. 137-143. Fev. 2005.

JEWELL, C. *et al.* Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. **Toxicology and Applied Pharmacology** p. 221-228. Dez 2007.

KITAGAWA, F.; OTSUKA, K. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A** p. 43-60. Mar. 2014.

KUZUHARA, A. Analysis of internal structure changes in black human hair keratin fibers resulting from bleaching treatments using Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure** p. 186-193. Set. 2013.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine** p. 317-320. Jun 2013.

LEE, I. S. L.; BOYCE, M. C.; BREADMORE, M. C. Extraction and on-line concentration of flavonoids in Brassica oleracea by capillary electrophoresis using large volume sample stacking. **Food Chemistry** p. 205-211. Jul. 2012.

- LIU, F. K. Monitoring the On-line Concentration and Separation of Gold Nanoparticles Using the Reversed Electrode Polarity Stacking Mode and Micellar Electrokinetic Chromatography. **Analytical Sciences** p. 1145-1150. Nov. 2010.
- MAIJO, I. *et al.* Different strategies for the preconcentration and separation of parabens by capillary electrophoresis. **Electrophoresis** p. 363-373. Feb 2013.
- MARTÍN, J. M. P. *et al.* Oxidative dna damage contributes to the toxic activity OF propylparaben in mammalian cells. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis** p. 86-91. Set. 2010.
- MIKŠÍK, I.; *et al.* Matrices for capillary gel electrophoresis — a brief overview of uncommon gels. **Biomedical Chromatography** p. 458-465. Jan. 2006.
- 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** p. 295-306. Mar. 1997.
- NISHIZAWA, C. *et al.* Reaction of para-hydroxybenzoic acid esters with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress. **Free Radical Research** p. 233-240. Mar. 2006.
- PAZOUREKOVA, S. *et al.* Dermal absorption and hydrolysis of methylparaben in different vehicles through intact and damaged skin: Using a pig-ear model in vitro. **Food and Chemical Toxicology** p. 754-765. Set. 2013.
- PUIG, P. *et al.* Sample stacking for the analysis of penicillins by microemulsion electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences** p.196-204. Feb. 2006.
- RAMIREZ, N.; MARCE, R. M.; BORRULL, F. Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** p. 6226-6231. Set. 2011.
- RAN, G. X. *et al.* The adsorption behavior of cationic surfactant onto human hair fibers. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces** p. 106-110. Jan. 2009.
- SCHUTZNER, W.; KENNDLER, E. Electrophoresis in Synthetic Organic Polymer Capillaries - Variation of Electroosmotic Velocity and Zeta Potential with Ph and Solvent Composition. **Analytical Chemistry** p. 1991-1995. Set. 1992.
- SHANMUGAM, G. *et al.* GC-MS method for the determination of paraben preservatives in the human breast cancerous tissue. **Microchemical Journal** p. 391-396. Nov. 2010.

SHIHABI, Z. K. Stacking in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A** p.107-117. Dez 2000.

UYSAL, U. D.; GURAY, T. Determination of parabens in pharmaceutical and cosmetic products by capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry** p. 982-986. Out. 2008.

WANG, S. P.; CHANG, C. L.. Determination of parabens in cosmetic products by supercritical fluid extraction and capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, p. 85-93. Dez. 1998.

WATANABE, T.; TERABE, S.; Applications of in-capillary reaction electrokinetic chromatography in food industry. **Journal of chromatography A**, p.295-301. Jun. 2000.

WEINBERGER, R. (2000). **Practical Capillary Electrophoresis** 2 ed. San Diego : San Diego: Academic Press.

YANG, X. M. *et al.* Development of Micellar to Solvent Stacking On-line Preconcentration Technique in Capillary Electrophoresis. **Chinese Journal of Analytical Chemistry** p. 1939-1946. Dez. 2008.

ZODDA, J. P.; MONTEFERRANTE, J. A.; EAKINS, M. N. Separation and Simultaneous Determination of Methyl Paraben and Propyl Paraben in Choletec(R) (Kit for the Preparation of Tc-99m Mebrofenin) by High-Performance Liquid-Chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** p. 573-577. Abr. 1994.

ZOTOU, A.; SAKLA, I.; TZANAVARAS, P. D. LC-determination of five paraben preservatives in saliva and toothpaste samples using UV detection and a short monolithic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** p.785-789. Nov. 2010.