

Maressa Danielli Dolzan

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO RÁPIDO
PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE METIL, ETIL,
PROPIL E BUTILPARABENO EM AMOSTRAS
COSMÉTICAS E FARMACÊUTICAS E ESTUDOS
DE INTERAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS
BIOLÓGICAS UTILIZANDO ELETROFORESE
CAPILAR**

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

Florianópolis
2012

Maressa Danielli Dolzan

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO RÁPIDO
PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE METIL, ETIL,
PROPILO E BUTILPARABENO EM AMOSTRAS
COSMÉTICAS E FARMACÊUTICAS E ESTUDOS
DE INTERAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS
BIOLÓGICAS UTILIZANDO ELETROFORESE
CAPILAR**

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2012

Prof. Almir Spinelli, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Ana Carolina de Oliveira Costa, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Ivan Gonçalves de Souza, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcone Augusto Leal de Oliveira, Dr.
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

À Natureza, por tornar a vida possível e linda de viver. Obrigada pela energia e pela paz que me sustenta.

À minha família, em especial à minha mãe, Dóris, e minha irmã, Mayra, pelo nosso amor incomum e pelos verdadeiros valores. Obrigada por me ensinarem a ser livre sendo eu mesma. Sempre uma saudade no meu coração.

Aos meus tios, Lide e Sérgio, por me acolherem de coração em suas vidas, e na sua casa por tantos anos, com tanto conforto, carinho e compreensão.

Ao professor Gustavo por me ensinar muito de Química e da vida. Pelo seu conhecimento compartilhado sem limites, e pelo profissional humano e admirável que é.

A todos os membros do LABEC por fazerem do laboratório um ambiente de estudo, respeito e amizade, bem trabalhados. Por me confirmarem que o companheirismo é o caminho do sucesso quando se trabalha em grupo.

À Lola, pela presença carinhosa e por me ajudar a descobrir portas abertas – e abrir portas. Ao Caio, pelo companheirismo e otimismo e por estar sempre tão disposto. Ao Santista, pelo carinho “exagerado” e ao Vicente, pelo sentimento e admiração infindáveis que sinto.

À Gislaïne Fongaro, do Laboratório de Virologia da UFSC, por fornecer a amostra de DNA tão prontamente. E ao Thiago, pelos trâmites.

À UFSC e ao Departamento de Química, pela infra-estrutura.

Ao INCT-catálise, ao CNPq, à CAPES e à *FARMA service* pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os *p*-hidroxibenzoatos de alquila, ou parabenos, fazem parte de uma classe de compostos com atividade antimicrobiana mais utilizada em todo o mundo. Desde os anos 20 eles são adicionados às formulações. Entretanto, o avanço científico e tecnológico levantou a hipótese destes apresentarem atividade cancerígena, entre outros malefícios. Por isto este trabalho propõe tanto o controle da concentração destes compostos em produtos comerciais (capítulo 1), quanto um maior entendimento da sua ação biológica (capítulo 2). O primeiro capítulo aborda o desenvolvimento de um método simples e rápido por eletroforese capilar para análises de rotina de metil, etil, propil e butilparabeno em produtos comerciais, com preparo simples de amostra. O pH e os constituintes do eletrólito foram selecionados usando curvas de mobilidade efetiva *versus* pH e simulações com o software Peakmaster[®]. Ácido cinâmico foi usado como padrão interno. O eletrólito foi composto por 20 mmol L⁻¹ de ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA), 30 mmol L⁻¹ de trietilamina (TEA) e 0,3 mmol L⁻¹ de brometo de hexano-1,6-bis(trimetilamônio) (HMB), pH = 10,6. Os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo HP 7100 CE equipado com detector UV em 297 nm.. As separações eletroforéticas foram conduzidas em um capilar com 32 cm de comprimento total, 8,5 cm de tamanho efetivo e 50 µm de diâmetro interno (d.i.). O tempo de corrida foi cerca de 1 minuto. O método apresenta R² > 0,99 num intervalo entre ~ 0,5 e 30 mg L⁻¹, limite de detecção de 0,1 mg L⁻¹ e de quantificação 0,3-0,4 mg L⁻¹, exatidão avaliada pela adição interna de padrão e pela técnica de HPLC/MS/MS com aplicação em amostras cosméticas e farmacêuticas diversas. O segundo capítulo desta dissertação é o estudo *in vitro* da interação dos parabenos com albumina do soro bovino (BSA) e o ácido desoxirribonucléico (DNA),

utilizando para ambos a técnica de eletroforese capilar. Foram aplicados dois métodos para os estudos de interação com BSA e cálculos das constantes de associação (K_{ass}): eletroforese capilar de afinidade (ACE), e o método baseado no preenchimento parcial do capilar (PF-ACE). Os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo HP^{3D} CE com detector UV a 270 nm. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida com 32 cm de comprimento total, 8,5cm de tamanho efetivo e 50 μm de d.i. As condições eletroforéticas foram escolhidas com base nas condições biológicas: o eletrólito de corrida foi composto por 30 mmol L^{-1} de fosfato e 50 mmol L^{-1} de Na^+ , $\text{pH} = 7,3$, 70 mmol L^{-1} de força iônica e temperatura do capilar mantida em $36,5^\circ\text{C}$. Os resultados qualitativos convergiram em ambos os métodos. Quando estudados simultaneamente, as interações paralelas não apresentaram interferência em cada interação específica. As constantes de associação foram calculadas pelo modelo não-linear e pelo modelo linear do duplo-recíproco, e comparadas. O modelo não-linear demonstrou maior confiabilidade apresentando resultados na ordem de 10^3 e 10^4 , crescentes com o crescimento da hidrofobicidade dos compostos. O estudo de interação com o DNA, por sua vez, foi realizado apenas para o composto propilparabeno, utilizando-se também dois métodos: PF-ACE e outro, *offline*, por ultrafiltração. Não foi possível observar interação em nenhum dos métodos empregados.

Palavras-chave: parabenos, cosméticos, fármacos, estudos de interação, BSA, constante de associação, DNA

ABSTRACT

The alkyl *p*-hydroxybenzoates or parabens, belong to a class of compounds with antimicrobial activity most used around the world. They have been added to several formulas since 1920. However, the scientific and technological progress opened the possibility of cancer activity and other evils. Therefore, this paper proposes both the control of the concentration of these compounds in commercial products (Chapter 1), and a greater understanding of its biological action (Chapter 2). The first chapter discusses the development of a simple and rapid method by capillary electrophoresis for routine analysis of methyl, ethyl, propyl and butylparaben in commercial products with simple sample preparation. The pH and the background electrolyte (BGE) constituents were selected using effective mobility-versus-pH curves and simulations using Peakmaster[®] software. Cinnamic acid was used as internal standard. The BGE was composed of 2-hydroxiisobutírico acid 20 mmol L⁻¹, triethylamine 30 mmol L⁻¹ and methyl hexane-1,6-bis(trimethylammonium) 0.3 mmol L⁻¹, pH = 10.6. The experiments were performed on a capillary electrophoresis device model HP 7100 with UV detector at 297 nm. CE separations conducted in a 32 cm long capillary with 8.5 cm effective length and 50 μm internal diameter (i.d.). The run time was about 1 minute. The method developed had R² > 0.99 in a range between ~ 0.5 and 30 mg L⁻¹, detection limit of 0.117-0.127 mg L⁻¹ and quantification limit of 0.3- 0.4 mg L⁻¹, accurately assessed by internal standard addition and by LC-MS/MS technique, and application in several cosmetic and pharmaceutical samples. The second chapter of this dissertation is in vitro interaction of parabens study with bovine serum albumin (BSA) and deoxyribonucleic acid (DNA), using both the capillary electrophoresis technique. Were applied two methods for BSA interaction studies and association constants calculation (K_{ass}): affinity capillary

electrophoresis (ACE), and the method based on capillary partial filling (PF-ACE). The experiments were performed on a capillary electrophoresis device model HP^{3D} CE with UV detector at 270 nm. The separations were conducted in a 32 cm long fused silica capillary with 8.5 cm effective length and 50 μm internal diameter (i.d.) The electrophoretic conditions were chosen based on biological conditions. The BGE composed of phosphate 30 mmol L^{-1} , pH 7.3, ionic strength 70 mmol L^{-1} and capillary temperature maintained at 36.5 $^{\circ}\text{C}$. The qualitative results in both methods converged. When studied simultaneously, parallel interactions showed no interference in each specific interaction. The association constants were calculated by nonlinear model and by the linear model of the double-reciprocal, and compared. The non-linear model showed a higher reliability results presented in the order of 10^3 and 10^4 , increasing with the growth of the compounds hydrophobicity. The DNA- interaction study, in turn, was made only for propylparaben, also using two methods: PF-ACE and the other, offline, by ultrafiltration. Interaction was not observed in any methods employed.

Key-words: parabens, cosmetics, drugs, interaction studies, BSA, binding constant, DNA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução Geral

- Figura 1** Estruturas químicas simplificadas dos compostos metil (MP), etil (EP), propil (PP) e butilparabeno (BP). **31**

Capítulo 1

- Figura 1** Curva de mobilidade efetiva *versus* pH para o sistema: parabenos, ácido cinâmico e HIBA. Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; PI – padrão interno (ácido cinâmico), HIBA, ácido 2-hidroxiisobutírico. **43**

- Figura 2** Curvas construídas utilizando o *software* Peakmaster[®]. Condição analítica: eletrólito composto por concentração fixa de 20 mmol L⁻¹ de HIBA e concentração de TEA variando de 22 a 40 mmol L⁻¹. As setas indicam o eixo respectivo a cada parâmetro e as curvas de mobilidade são, de cima para baixo, para o BP, PP, EP, MP e ácido cinâmico, respectivamente. Legenda: EMD, dispersão por eletromigração; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno. **44**

- Figura 3** Eletroferogramas obtidos pelo *software* Peakmaster[®] nas condições experimentais estabelecidas: capilar com 32 cm, 8,5 cm de tamanho efetivo, 50 µm d.i e eletrólito composto por 20 mmol L⁻¹ de HIBA, 30 mmol L⁻¹ de TEA e concentrações variadas de HMB. Tensão, -30 kV. Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; HMB – hexano-1,6-bis(trimetilamônio). A ordem de migração dos analitos permaneceu a mesma em todas as condições estudadas. **46**

- Figura 4** Condições do eletrólito otimizadas: 20 mmol L⁻¹ de HIBA, 30 mmol L⁻¹ de TEA, 0,3 mmol L⁻¹ de HMB, pH = 10,6. A) eletroferograma real dos padrões dos analitos e do ácido cinâmico; B) eletroferograma simulado pelo *software* Peakmaster[®]. Tensão, -30 kV; para o eletroferograma A, λ = 297 nm e T = 25 °C. Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; **47**

PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; EOF, fluxo eletrosmótico. A ordem de migração dos analitos permaneceu a mesma em todas as condições estudadas.

Figura 5 Eletroferogramas obtidos para amostras com diferentes matrizes. Condições experimentais: eletrólito com 20 mmol L⁻¹ de HIBA, 30 mmol L⁻¹ de TEA e 0,3 mmol L⁻¹ de HMB, pH = 10,6. Capilar 32 cm de comprimento, 8,5 cm tamanho efetivo, 50 µm d.i.; V = -30 kV; λ = 297 nm; T = 25 °C. Legenda: EOF, fluxo eletrosmótico; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP butilparabeno; PI – padrão interno (ácido cinâmico), EOF, fluxo eletrosmótico. **51**

Capítulo 2

Figura 1 Ligação de fármacos no sítio 1 da albumina do soro humano (HSA) já ligada a um tetradecanoato. a) azapropazona e b) indometacina (Ghuman, Zunszain et al. 2005). **69**

Figura 2 Ligação de fármacos no sítio 2 da albumina do soro humano (HSA). a) diazepam e b) indoxil-sulfato (Ghuman, Zunszain et al. 2005). **70**

Figura 3 Esquema simplificado da adsorção de proteínas em superfícies sólidas não porosas retirado da referência (Lucy, MacDonald et al. 2008) **81**

Figura 4 Gráfico da variação do fluxo eletrosmótico (EOF) antes e após o tratamento do capilar com albumina do soro bovino (BSA). Condições: capilar 32 cm de comprimento, 23,5 cm de tamanho efetivo, 50 µm d.i., eletrólito 30 mmol L⁻¹ PO₄³⁻, 50 mmol L⁻¹ Na⁺, pH 7,3. **88**

Figura 5 Gráficos da voltagem aplicada *versus* corrente gerada no interior de um capilar com dimensões 32 cm x 50 µm d.i, tamanho efetivo 8,5 cm, preenchido com eletrólito composto por 30 mmol L⁻¹ de PO₄³⁻ e 50 mmol L⁻¹ de Na⁺, pH = 7,3, e termostatizado à 25 °C e 36,5 °C. **91**

Figura 6 Gráfico obtido a partir do modelo linear do duplo **95**

recíproco para o metil, etil, propil e butilparabeno. Condições: aproximadamente $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada analito e concentrações de BSA que variaram entre 0 e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

Figura 7 Perfil apresentado pelas mobilidades efetivas obtidas experimentalmente pelo método ACE (método 1 - réplica 3) dos compostos metil, etil, propil e butilparabeno em função da concentração de BSA. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; ACE, eletroforese capilar de afinidade. **98**

Figura 8 Gráficos da razão $[\text{substrato}]_{\text{ligado}}/[\text{substrato}]_{\text{total}}$ versus a razão $[\text{BSA}]/[\text{substrato}]_{\text{total}}$, onde $[\text{substrato}]_{\text{total}}$ é igual a $250 \mu\text{mol L}^{-1}$. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno. **100**

Figura 9 Gráficos de mobilidade (experimental e calculada) versus $[\text{BSA}]$ para os compostos A) butilparabeno e B) propilparabeno na réplica 1. Legenda: BSA, albumina do soro bovino. **102**

Figura 10 Eletroferogramas obtidos para os compostos metil, etil, propil e butilparabenos em concentrações de BSA $10\text{-}75 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições: capilar de 32 cm (8,5 cm de tamanho efetivo) x $50 \mu\text{m}$ d.i. com revestimento dinâmico de BSA; eletrólito composto por 30mmol L^{-1} de PO_4^{3-} + 50mmol L^{-1} de Na^+ + concentrações variadas de BSA, pH 7,3; 17 kV; $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica 3s/50mbar, polaridade positiva. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; EOF, fluxo eletrosmótico. **103**

Figura 11 Eletroferogramas obtidos, em azul, para todos os parabenos estudados e, em vermelho, para o composto etilparabeno em condições experimentais idênticas. Condições: capilar de 32 cm (8,5 cm de tamanho efetivo) x $50 \mu\text{m}$ d.i. com revestimento dinâmico de BSA; eletrólito composto por 30mmol **104**

L^{-1} de PO_4^{3-} + 50 mmol L^{-1} de Na^+ + 100 $\mu mol L^{-1}$ de BSA, pH 7,3; 17 kV; 36,5 °C; injeção hidrodinâmica 3s/50mbar, polaridade positiva. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; EOF, fluxo eletrosmótico; n.i, não identificado.

Figura 12 Esquema ilustrativo do método 2, PF-ACE. Em azul está representado o volume injetado de BSA no capilar, seguido pelo volume injetado de parabeno, em vermelho. Os sinais + e – são as polaridades dos eletrodos nas extremidades do capilar. Legenda: PF-ACE, eletroforese capilar de afinidade com preenchimento parcial do capilar; BSA, albumina do soro bovino. **105**

Figura 13 Perfil apresentado pelas mobilidades efetivas obtidas experimentalmente pelo método PF-ACE (método 2 - réplica 1) dos compostos metil, etil, propil e butilparabeno em função da concentração de BSA. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno. **108**

Figura 14 Gráficos da razão entre a concentração de complexo formado pela concentração total de substrato ($250 \mu mol L^{-1}$), em função da razão $[BSA]/[substrato]_{total}$ para os compostos metil, etil, propil e butilparabeno, nos métodos 1 (ACE) e 2 (PF). Legenda: BSA, albumina do soro bovino; $[substrato]_{total}$, concentração molar total de substrato; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; ACE, eletroforese capilar de afinidade; PF-ACE, eletroforese capilar de afinidade com preenchimento parcial do capilar. **110**

Figura 15 Gráficos das constantes de associação em função do $\log P$ dos compostos metil, etil, propil e butilparabeno obtidas A) por Otagiri e colaboradores (Otagiri e Perrin 1977) e B) pelo método 1 (ACE) neste trabalho pelo tratamento dos dados através modelo não-linear. Legenda: K_{ass} , constante de associação; $\log P$, coeficiente de partição etanol/água (parâmetro de hidrofobicidade); ACE, eletroforese capilar de afinidade. **111**

Figura 16 Eletroferogramas obtidos para a interação A) PP-BSA **114**

antes (em azul) e após incubação por 15 minutos com BSA (vermelho) e; B) PP-DNA, após a incubação por 5 (em rosa), 10 (em azul), e 15 minutos (em vermelho). Em verde é o eletroferograma do PP antes de ser incubado com o DNA. Após todas as incubações, as soluções foram filtradas e centrifugadas com membrana de celulose 10000 NMWL. Legenda: PP, propilparabeno; BSA, albumina do soro bovino; DNA, ácido desoxirribonucleico; NMWL, limite de peso molecular.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 Parâmetros do espectrômetro de massas	40
Tabela 2 Dados de mobilidade iônica e pKa para os parabenos e o ácido cinâmico	42
Tabela 3 Parâmetros de desempenho do método avaliados para o metil, etil, propil e butilparabeno	49
Tabela 4 Resultados analíticos para a determinação de metil, etil, propil e butilparabeno em produtos comerciais	52
Tabela 5 Percentagem de recuperação de cada analito (metil, etil, propil e butilparabeno) em diferentes amostras e o desvio padrão entre os três níveis de concentração adicionados utilizando adição interna de padrão	54
Tabela 6 Resultados obtidos para a determinação de parabenos em amostras comerciais pelas técnicas de HPLC/MS/MS e CE-UV (proposta deste trabalho)	55
Tabela 7 Comparação da proposta deste método com outros métodos desenvolvidos para determinação de parabenos em produtos cosméticos	57

Capítulo 2

Tabela 1 LD ₅₀ (mg Kg ⁻¹) de parabenos em diferentes espécies de animais por diferentes rotas ^a	64
Tabela 2 Parâmetros utilizados para determinação da mobilidade efetiva do EOF antes e após o tratamento com solução de BSA	87
Tabela 3 Propriedades físico-químicas da BSA e composição da solução de lavagem utilizada no procedimento de modificação do capilar	89

Tabela 4 Parâmetros físico-químicos do eletrólito de corrida ^a	91
Tabela 5 Parâmetros experimentais do método 1 aplicado para estudo das interações parabenos-BSA	93
Tabela 6 Modelos matemáticos utilizados para determinação de constantes de associação (K_{ass}) de estequiometria 1:1 aplicados em ACE (Armstrong e Jiang 2010; El-Hady, Kuhne et al. 2010)	94
Tabela 7 Coeficientes angulares e lineares correspondentes as curvas $1/(\mu_{\text{eff}} - \mu_f)$ versus $1/[\text{BSA}]$, seus respectivos coeficientes de determinação (R^2), valores de K_d e K_{ass} para cada sistema parabenos-BSA	96
Tabela 8 Valores de constante de associação entre os parabenos e BSA utilizando o modelo linear do duplo recíproco	96
Tabela 9 Valores de constante de associação entre os parabenos e BSA utilizando o modelo não-linear da isoterma de ligação	99
Tabela 10 Coeficientes de determinação (R^2) para as curvas μ_{eff} versus μ_{calc} para metil, etil, propil e butilparabeno	101
Tabela 11 Parâmetros experimentais do método 2 (PF-ACE) aplicado para estudo das interações parabenos-BSA	106
Tabela 12 Valores de constantes de associação entre os parabenos e BSA utilizando o método 2 (PF-ACE) e o modelo não-linear da isoterma de ligação	107
Tabela 13 Razões obtidas entre as constantes de associação parabenos-BSA, nos métodos 1 (ACE) e 2 (PF-ACE)	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina do Soro Bovino
BP	Butilparabeno
BGE	Eletrólito de corrida
B. subtilis	Bactéria <i>Bacillus subtilis</i>
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
CE	Eletroforese Capilar
CE-UV	Eletroforese Capilar com detector Ultravioleta
CTAB	Brometo de cetil trimetilamônio
CV%	Coefficiente de Variação
CE	Eletroforese Capilar
CE-UV	Eletroforese Capilar com detector Ultravioleta
CAD*	Ativação da colisão de dissociação
CEP*	Potencial de Entrada na Colisão
CE*	Energia de Colisão
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
d.i.	Diâmetro interno do capilar
d.e.	Diâmetro externo do capilar
dp	Desvio padrão
DE	Desreguladores Endócrinos
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DDE	Diclorodifeniltricloroetileno
DP*	Potencial de desagrupamento
EP*	Potencial de Entrada
EOF	Fluxo Eletrosmótico
ESI	Íon Eletro Spray
EP	Etilparabeno
E	Campo elétrico
EMD	Dispersão por Eletromigração
E. coli	Bactéria <i>Escherichia coli</i>
eV	Elétron-volt
FA	Análise Frontal
F e [D_f]	Concentração de substrato livre
HIBA	Ácido 2-hidroxiisobutírico
HD	Hummel-Dreyer
HMB	Brometo de hexano-1,6-bis(trimetilamônio)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC/MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a um Espectrômetro de Massas

HPLC-ED	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta
HPLC-C-CAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector <i>Corona-Charged Aerosol</i>
HSA	Albumina do Soro Humano
I	Força iônica
i	Corrente elétrica
K_{ass}	Constante de Associação
k	Fator de Retenção
k₁	Constante de velocidade da reação direta
k₋₁	Constante de velocidade da reação inversa
K_d	Constante de Dissociação
L	Ligante (ou proteína)
L_{det} e l_{det}	Comprimento efetivo até o detector
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LD₅₀	Dose letal 50%
LD₁₀₀	Dose letal
L_{tot}	Comprimento total do capilar
MEKC	Cromatografia Eletrocínética Micelar
MP	Metilparabeno
MMQ	Método dos Mínimos Quadrados
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
n.d.	Não detectado
n	Número de mol de proteína injetado
NMWL	Limite de Peso Molecular
NMR H¹	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
pKa	Logaritmo negativo da Constante de Ionização Ácida
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
PF	Preenchimento Parcial
PF-ACE	Eletroforese Capilar de Afinidade por Preenchimento Parcial
PP	Propilparabeno
PI	Padrão Interno
PCBs	Bifenilas Policloradas
PVC	Cloreto de Polivinila
R²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto

RNA	Ácido Ribonucléico
r	Razão entre a concentração de substrato ligado e a concentração de substrato total
R	Resposta experimental
R_f	Resposta experimental do substrato livre
R_C	Resposta experimental do complexo substrato-ligante
RMTR	Razão Relativa do Tempo de Migração
r^2	Segunda potência do raio interno do capilar
S	Substrato
SPME	Microextração em Fase Sólida
SPE	Extração em Fase Sólida
SFE	Extração em Fluido Supercrítico
TEA	Trietilamina
t_m	Tempo de migração do analito
t_{migr}	Tempo de migração
t_d	Tempo de resposta do equipamento para o início da operação
t_{inj}	Tempo de injeção
t_{N1}	Tempo de migração do marcador neutro da primeira injeção
t_{N2}	Tempo de migração do marcador neutro da segunda injeção
t_{N3}	Tempo de migração do marcador neutro da terceira injeção
t_{ramp}	Rampa de voltagem
T e $[D_{total}]$	Concentração total de substrato
$t_{0,det}$	Tempo de migração do substrato livre de proteína
t_A	Tempo de migração do analito
t_{EOF}	Tempo de migração do fluxo eletrosmótico
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível
V e V_{prog}	Potencial aplicado
VACE	Eletroforese Capilar de Afinidade por Vacância
VP	Vacância de Pico
β	Razão entre a concentração de substrato livre e ligado
$\mu_{act,A}^-$	Mobilidade real do analito A
$\mu_{0,A}^-$	Mobilidade iônica do analito A
$\mu_{eff,A}^-$	Mobilidade efetiva do analito A
μ_{eff}	Mobilidade efetiva do substrato na presença de proteína

μ_f	Mobilidade efetiva do substrato na ausência de proteína
μ_C	Mobilidade efetiva do complexo substrato-ligante
$\mu_{m\acute{a}x}$	Mobilidade máxima do substrato quando a concentração de proteína no eletrólito é alta
[L]	Concentração Molar de Ligante
[S]	Concentração Molar de Substrato
[SL]	Concentração Molar do Complexo substrato-ligante
Δt	Diferença entre os tempos de migração do substrato na presença e ausência de proteína
% m/v	Percentagem massa/volume
% m/m	Percentagem massa/massa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	31
Capítulo 1	35
Desenvolvimento de método rápido para análise simultânea de metil, etil, propil e butilparabeno em amostras cosméticas e farmacêuticas utilizando eletroforese capilar	
1. OBJETIVOS	37
1.1. Geral	37
1.2. Específicos	37
2. EXPERIMENTAL	39
2.1. Sistema de eletroforese capilar	39
2.2. Sistema de HPLC/MS/MS	39
2.3. Reagentes e Soluções	40
2.4. Soluções padrão e preparo de amostras	41
2.5. Desenvolvimento do método	41
2.5.1. Redução do tempo total de análise	45
3. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO	49
3.1. Figuras de mérito	49
3.2. Aplicação da metodologia desenvolvida	50
3.3. Exatidão	53
3.3.1. Adição interna de padrão	53
3.3.2. Comparação com a técnica de HPLC/MS/MS	55
4. COMPARAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA COM OUTROS MÉTODOS REPORTADOS	57
5. CONCLUSÕES	59
Capítulo 2	61
Estudo da interação entre <i>p</i>-hidroxibenzoatos de alquila e macromoléculas biológicas utilizando eletroforese capilar	

1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	63
1.1.	Ação biológica dos parabenos	63
1.2.	Interação entre compostos exógenos/xenobióticos e biomoléculas	67
1.2.1.	A ligação com proteínas plasmáticas	69
1.2.2.	Interações de moléculas pequenas com o DNA	70
1.3.	Estudos de interações com biomoléculas e a técnica de eletroforese capilar	72
1.4.	Adsorção de proteínas em superfícies de sílica e a modificação de capilares em eletroforese capilar	80
2.	OBJETIVOS	83
2.1.	Geral	83
2.2.	Específicos	83
3.	EXPERIMENTAL	85
3.1.	Instrumentação	85
3.2.	Reagentes e soluções	85
3.3.	Soluções padrão	85
4.	MODIFICAÇÃO DO CAPILAR COM ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA)	87
4.1.	Demais parâmetros eletroforéticos e procedimento experimental	87
4.2.	Resultados e Discussão	88
5.	ESTUDO DE INTERAÇÃO E CÁLCULOS DE CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO (K_{ass}) ENTRE OS PARABENOS E BSA	90
5.1.	Condições eletroforéticas	90
5.2.	Escolha do eletrólito de corrida	90
5.3.	Aplicação do método por eletroforese capilar de afinidade (ACE – método 1) para determinação das constantes de associação (K_{ass}) entre os parabenos e BSA	92
5.3.1.	Escolha dos demais parâmetros eletroforéticos	92
5.3.2.	Resultados e Discussão	93
5.3.2.1.	Tratamento dos dados com o modelo linear do duplo-recíproco	95
5.3.2.2.	Tratamento dos dados com modelo não-linear	97
5.4.	Aplicação do método por preenchimento parcial (PF-ACE – método 2) para determinação das constantes de associação (K_{ass}) entre os parabenos e BSA	105
5.4.1.	Escolha dos demais parâmetros eletroforéticos	105
5.4.2.	Resultados e Discussão	106

6. ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE OS PARABENOS E O ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO (DNA)	113
6.1. Demais parâmetros eletroforéticos	113
6.2. Descrição das metodologias e resultados	113
7. CONCLUSÕES	117

CONCLUSÃO FINAL	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os parabenos correspondem à classe de conservantes antimicrobianos mais utilizada no mundo. Estes compostos são ésteres do ácido p-hidroxibenzóico e se diferem entre si pela cadeia carbônica ligada ao grupo éster. Este trabalho irá abordar especificamente os compostos metil (MP), etil (EP), propil (PP) e butilparabeno (BP), cujas estruturas são apresentadas na Figura 1.

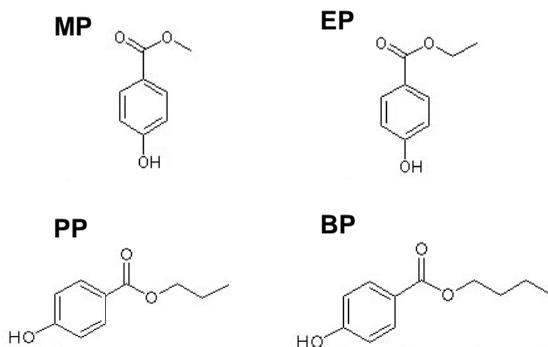


Figura 1 Estruturas químicas simplificadas dos compostos metil (MP), etil (EP), propil (PP) e butilparabeno (BP).

A estrutura química destes compostos apresenta alta atividade contra microrganismos de diversos tipos, além de fornecer outras propriedades físicas e químicas interessantes para a sua utilização em produtos diversos, como cosméticos, formulações farmacêuticas e alimentos, por se apresentarem hidrossolúveis, insípidos, incolores e inodoros (Rodríguez, Canosa et al. 2006).

Quando os parabenos são utilizados em conjunto, apresentam efeito sinérgico e, por isso, são encontrados muitas vezes em associações, mas também podem ser encontrados individualmente. Os limites permitidos pela União Européia e pela Agência de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA 2001), são 0,8% e 0,4%, respectivamente, em produtos cosméticos. Em fármacos normalmente não excedem 1% (Rodríguez, Canosa et al. 2006). As estatísticas demonstram que uma mulher americana usa em média 12 produtos cosméticos e de cuidado pessoal por dia (Sutton 2008). No Brasil este índice cai para 5, enquanto na Europa alcança o patamar de 17 produtos/dia. Entretanto desde que a presença de parabenos foi detectada em tumores de mama humana

(Darbre 2003; Darbre, Aljarrah et al. 2004) a alta exposição a estes compostos está sendo questionada e discutida em todo o mundo. Outros estudos ainda reportam atividade estrogênica, por terem apresentado ligação a receptores estrógenos de diferentes fontes (Darbre, Byford et al. 2002; Lemini, Jaimez et al. 2003), porém permanece como a maior classe de conservantes utilizada no mundo.

Recentemente, a Dinamarca foi a precursora na proibição dos parabenos, mas a restrição se refere somente ao propil e butilparabeno em produtos destinados a crianças de até 3 anos (Danish Legislation 2011). Apenas em meados de 2011, o parlamento francês aprovou, em primeira leitura, o projeto de lei que proíbe a fabricação, importação, venda ou fornecimento de quaisquer produtos que contenham ftalatos, alquilfenóis e parabenos. Sendo o projeto aprovado pelo senado, a França pode se tornar o primeiro país a proibir, sem exceções, a comercialização de produtos contendo parabenos. Nos demais países permanecem permitidos, no entanto, o que se vê são grandes empresas optando por outros conservantes, menos ativos e polêmicos, como as isotiazolinonas,

O uso generalizado dos parabenos, junto com as dúvidas que têm gerado quanto os seus malefícios à saúde, tem tornado esta classe de compostos alvo de diversos estudos e linhas de pesquisa, tanto pela suas ações no organismo quanto pela monitoração destes compostos em produtos comerciais, principalmente aqueles que apresentam exposição prolongada, como os desodorantes, protetores solares e cremes hidratantes (Li, Fei et al. 2011).

Por isto, este trabalho será subdividido em dois capítulos: 1) é o desenvolvimento de um método para determinação de parabenos em amostras de cosméticos e fármacos; e 2) estudo da interação entre estes compostos e macromoléculas (albumina do soro bovino - BSA; e ácido desoxirribonucleico- DNA) – ambos utilizando a técnica de eletroforese capilar.

O segundo capítulo consistiu no estudo focado num maior entendimento da disponibilidade e ação dos parabenos quando em contato com o organismo, bem como da aplicação da eletroforese capilar em estudos de interação com macromoléculas biológicas. Para isto foram feitos estudos com proteína plasmática (albumina) e com o DNA utilizando a técnica de CE em diferentes modos, que inclui a interação *online* dos componentes por preenchimento total e parcial do capilar, bem como interação *offline*.

Ainda nos anos 20, em que se deu início a comercialização dos parabenos através de formulações, a pesquisa e a tecnologia

caminhavam a passos lentos, e pouco se conhecia daquilo que estava disponível (hoje isto permanece devido a quantidade de novos compostos descobertos e sintetizados no mundo todos os dias). O avanço nas pesquisas científicas se deu apenas após a Segunda Guerra Mundial e, principalmente, após a Revolução Microeletrônica no final dos anos 50, que permitiu a incorporação de computadores aos equipamentos de pesquisa. Com isto, a espectrometria de massa, a tecnologia laser, os instrumentos de ressonância magnética, e os equipamentos para a sequencia de proteínas e DNA têm melhorado de 1.000 a 1.000.000 de vezes (Silva 1997). E então os parabens, bem como os agrotóxicos, os corantes sintéticos, o triclosan, o formaldeído e centenas de outras substâncias inseridas no comércio, foram indicados potentes prejudiciais, geradores de doenças.

O maior mistério para os cidadãos comuns e para a comunidade científica é a vida: a origem da vida, o dinamismo da vida, a evolução da vida, o fim da vida. E, ainda, o prolongamento da vida (humana). Entender o funcionamento do corpo humano com suas trilhões de células, bilhões de enzimas, DNA, sistema sanguíneo, cardíaco, digestivo, etc, bilhões de reações, interações, espécies e, ainda, o que acontece com tudo que vem de fora pra dentro: nutrientes, alimentos, medicamentos e venenos, exigiria que 100% da massa cefálica dos 6 bilhões de habitantes da Terra pensasse nisso durante inúmeros anos. Sem tecnologia nada adiantaria.

Dentre as metodologias empregadas para biomoléculas, cita-se com extraordinária relevância a técnica de Eletroforese (do grego: *electro*, eletricidade; *phóresis*, transporte) que, historicamente, foi introduzida pelo químico sueco Arne Tiselius (Tavares 1996). A idéia surgiu pela necessidade de separar as diversas proteínas que estavam sendo descobertas desde o início do século XX, e encontravam-se misturadas. De maneira geral, o fundamento da técnica é a separação de compostos baseada nas diferenças entre as suas mobilidades. Quando componentes presentes em um mesmo sistema interagem entre si, ocorrem mudanças em uma ou mais propriedades físico-químicas como viscosidade, pK_a , solubilidade e, dentre outras, mobilidade. Estudos de interação devem ser trabalhados de maneira singular para cada sistema, considerando a intensidade na mudança das propriedades físico-químicas (ora é vantajoso estudar mudanças na viscosidade, ora no pK_a , etc), condições limitadoras tanto do sistema em que ocorre a interação quanto das técnicas analíticas, intensidade de interação, etc.

Capítulo 1

Desenvolvimento de método rápido para análise simultânea de metil, etil, propil e butilparabeno em amostras cosméticas e farmacêuticas utilizando eletroforese capilar

Este capítulo apresenta um método rápido e simples para a determinação de parabenos em produtos comerciais, para análise de rotina e controle de qualidade. Diversas metodologias estão reportadas na literatura. Destacam-se as metodologias desenvolvidas por cromatografia líquida (Li, Fei et al. 2011; Lee, Lin et al. 2006; Valcarcel, Marquez-Sillero et al. 2010; Martins, Carreira et al. 2011), cromatografia gasosa (Shen, Jiang et al. 2008) e eletroforese capilar, que inclui eletroforese capilar de zona (CZE) (Uysal e Guray 2008), mas principalmente cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) (Uysal e Guray 2008) e isotacoforese (Kaniansky, Bodor et al. 2001). Em geral, estas metodologias apresentam preparos de amostras laboriosos, como microextração em fase sólida (SPME) (Rodriguez, Canosa et al. 2006; Li, Fei et al. 2011) e extração em fase sólida (SPE) (Uysal e Guray 2008; Valcarcel, Marquez-Sillero et al. 2010; Martins, Carreira et al. 2011), bem como extração com fluido supercrítico (SFE) (Lee, Lin et al. 2006). Estas técnicas de *cleanup* e pré-concentração reduzem a quantidade de compostos indesejáveis presentes nas matrizes das amostras, que é indispensável em determinadas análises e, também, permitem a detecção dos analitos em matrizes menos concentradas. No entanto, a técnica de CE permite a injeção de matrizes complexas sem prévio tratamento e, apresenta limite de detecção satisfatório para determinação de parabenos em formulações cosméticas e farmacêuticas, uma vez que a concentração permitida pela legislação e adicionada de fato nos produtos é relativamente alta. Além disto, a eletroforese capilar associa alta eficiência, baixo custo por análise e consumo mínimo de amostras, reagentes e solventes, mostrando-se uma ferramenta analítica apropriada à análise dos parabenos em diferentes matrizes.

O objetivo deste primeiro capítulo foi desenvolver um método analítico por CE-UV para análises de rotina dos compostos metil, etil, propil e butilparabeno, que são os mais comumente encontrados em produtos comerciais. Para isto optou-se por trabalhar com as amostras sem pré-tratamentos laboriosos, e condições eletroforéticas otimizadas de forma a diminuir o tempo total de análise dos quatro compostos simultaneamente, utilizando curvas de mobilidade efetiva versus pH em

conjunto com o software de simulação em CE, Peakmaster[®], *freeware*. Os resultados obtidos utilizando CE-UV foram estatisticamente comparados com a metodologia de cromatografia líquida acoplada com um espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS).

1. OBJETIVOS

1.1. Geral

Desenvolver um método analítico simples, rápido e de baixo custo por Eletroforese capilar, que seja viável para determinação de metil, etil, propil e butilparabeno em amostras diversas de formulações farmacêuticas e cosméticas, visando análises de rotina e controle de qualidade.

1.2. Específicos

- Utilizar curvas de mobilidade efetiva versus pH para otimização do eletrólito de corrida;
- Utilizar softwares de simulação, como Peakmaster[®] e SIMUL para desenvolvimento do método;
- Trabalhar com preparo simples de amostra, sem técnicas sofisticadas de *clean up* e pré-concentração;
- Calcular as mobilidades eletroforéticas do metil, etil, propil e butilparabeno, bem como do ácido cinâmico;
- Calcular a mobilidade do fluxo eletrosmótico (EOF) na presença de diferentes concentrações de brometo de hexano-1,6-bis(trimetilamônio) (HMB);
- Utilizar alguns parâmetros de validação para avaliação do desempenho do método, como precisão instrumental, intra-ensaio e inter-ensaio, além da linearidade (R^2 e falta de ajuste), limites de detecção e quantificação e ensaios de recuperação através da adição de padrão;
- Aplicar a metodologia proposta em amostras de cosméticos e fármacos, como xampu, condicionador, hidratantes e medicamentos sintéticos e naturais, dentre outros
- Determinar e quantificar metil, etil, propil e butilparabeno em algumas das amostras analisadas pela metodologia proposta, utilizando a técnica de HPLC/MS/MS e comparar os resultados através do *teste-t* pareado a fim de avaliar a exatidão do método desenvolvido por CE;
- Comparar a metodologia desenvolvida com métodos reportados na literatura por técnicas cromatográficas.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Sistemas de eletroforese capilar

Um equipamento de eletroforese capilar modelo P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, E.U.A.) equipado com detector de arranjo de diodo, foi utilizado nos experimentos para determinação da mobilidade efetiva dos *p*-hidroxibenzoatos de alquila. O capilar utilizado foi de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com 60,2 cm × 50 µm d.i. × 375 µm d.e. e os dados foram tratados com o software 32Karat.

Já os experimentos para a determinação de *p*-hidroxibenzoatos de alquila foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo HP 7100 CE (Agilent Technologies, Palo Alto, U.S.A.) equipado com detector de arranjo de diodos. A resposta foi acompanhada em 297 nm, que é o comprimento de absorção máxima dos parabenos quando ionizados, e a temperatura do cartucho foi mantida a 25 °C. As amostras foram injetadas por 3s a uma pressão de 50 mbar e a tensão aplicada para a separação dos analitos foi de 30 kV, com polaridade positiva na injeção. Para todos os experimentos foi utilizado capilar de sílica fundida com 32 cm de comprimento, 8,5 cm de tamanho efetivo, 50 µm d.i. e 375 µm d.e. Os dados foram tratados com o software HP Chemstation.

2.2. Sistema HPLC/MS/MS

As análises por HPLC/MS/MS foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). A separação ocorreu em uma coluna Shim-Pack XRODS C18 (30 mm, 2,0 mm d.i. e tamanho da partícula de 2,2 µm) Shimadzu. Foi aplicado o modo isocrático utilizando os solventes A e B na proporção 30/70, sendo o solvente A 0,1% de ácido fórmico em água e o solvente B acetonitrila/solvente A, 95/5. A velocidade do fluxo foi mantida 0,2 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 5 µL e a temperatura da coluna fixada em 30°C. O sistema foi acoplado a um sistema de espectrometria de massas consistindo em um espectrômetro de massas triploquadropolo/linear íon trap Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canadá). O *software* Analyst, versão 1.5.1 foi usado para o controle do sistema HPLC/MS/MS bem como para a análise dos

dados. O espectrômetro de massas foi calibrado para os modos negativo e positivo por infusão de solução de polipropileno glicol. Os experimentos foram realizados usando a fonte de *spray* Turbo Ion (*ion-electrospray*-ESI) no modo negativo. A voltagem do capilar foi mantida -4500V. Parâmetros do espectrômetro de massas (MS/MS): gás de dessolvatação (*curtain gas*), 10 psi; temperatura da fonte, 400 °C; gás 1 nebulizante, 45 psi; gás 2 secante, 45 psi; gás de colisão (CAD), médio. Outros parâmetros para a energia de colisão e do cone são listados na Tabela 1. Os parabenos foram monitorados e quantificados usando o modo monitoramento de reações múltiplas (MRM). O espectrômetro de massas foi otimizado por infusão direta de uma solução aquosa contendo os quatro analitos investigados neste estudo.

Tabela 1 Parâmetros do espectrômetro de massas

	<i>m/z</i>	DP* (V)	EP* (eV)	CEP* (V)	CE* (eV)
MP	150,9/91,9	-35	-11	-10	-30
EP	164,9/92,3	-30	-8	-18	-30
PP	178,9/92,1	-40	-4	-10	-28
BP	192,9/91,9	-40	-4	-8	-30

Legenda: *m/z*, razão massa/carga; DP*, potencial de desagrupamento; EP*, potencial de entrada; CEP*, potencial de entrada na célula de colisão; CE*, energia de colisão; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

O tempo de corrida foi de 4 minutos com pré-condicionamento de 3 minutos.

2.3. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água deionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A). O solvente metanol foi adquirido da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O brometo de hexano-1,6-bis(trimetilamônio) (HMB) e o ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) foram comprados da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), a trietilamina (TEA) comprada da Vetec (São Paulo, SP, Brasil) e o hidróxido de sódio da Tedia Brasil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os padrões de parabenos e do ácido cinâmico foram adquiridos também da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).

2.4. Soluções padrão e preparo das amostras

Soluções estoque dos padrões de metil, etil, propil e butilparabeno foram preparadas individualmente pela dissolução de 25 mg em 25 mL de metanol/água 80:20 (v/v). A solução estoque de ácido cinâmico, utilizado como padrão interno (PI), foi preparada pela dissolução de 25 mg em 25 mL de água deionizada.

Foram analisadas amostras de cosméticos e fármacos produzidos por diferentes empresas e comprados em comércios locais. Em geral, todas as amostras foram preparadas pela dissolução em água deionizada.

Amostras a base de cremes e géis foram pesadas cerca de um grama e diluídas em 100 ou 50 mL de água deionizada e submetida e agitação com barra magnética, dependendo do caso. As soluções estoques foram diluídas de 2 a 10 vezes e as soluções finais centrifugadas para remoção de partículas (10000 rpm/2 min), de forma a serem utilizadas alíquotas com as concentrações dos parabenos dentro dos limites das curvas de calibração. As amostras líquidas, no entanto, foram diluídas volumetricamente, e injetadas no equipamento sem a necessidade de centrifugação.

2.5. Desenvolvimento do método

Em trabalhos recentes apresentados pelo nosso grupo de pesquisa (Micke, Costa et al. 2007; Micke e Goncalves 2007; Micke, Costa et al. 2008; Micke, Costa et al. 2009) foi demonstrada a potencialidade da utilização de curvas de mobilidade efetiva versus pH em conjunto com o software Peakmaster[®] (Gas, Coufal et al. 2001; Gas, Stedry et al. 2002; Gas, Stedry et al. 2003) para a obtenção de métodos rápidos utilizando CE. Para utilização desta ferramenta é necessário o conhecimento dos valores de pKa e mobilidade iônica dos analitos de interesse. Como para os parabenos os dados de mobilidade iônica não são conhecidos, na primeira etapa deste estudo foram determinados estes valores. Para esta determinação foi utilizado o procedimento proposto por Williams e Vigh (Williams e Vigh 1996) na determinação da mobilidade real, μ_{act,A^-} , e para obtenção da mobilidade iônica, μ_{o,A^-} , foi utilizada a Equação 1 (MARCUS 1985.)

$$\mu_{act,A^-} = \mu_{0,A^-} - \left[0.23\mu_{0,A^-} + 31.3 \times 10^{-5} \right] \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \quad (1)$$

onde I é a força iônica do meio e os valores 0,23 e 31,3 estão relacionados à permissividade do composto no vácuo e a viscosidade do sistema.

Os dados de pK_a para os parabenos foram obtidos da literatura (Muijselaar, Claessens et al. 1997). A Tabela 2 mostra os dados de pK_a e mobilidade iônica obtidos experimentalmente.

Tabela 2 Dados de mobilidade iônica e pK_a para os parabenos e o ácido cinâmico

Analito	pK_a	μ_{0,A^-} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
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

Com os dados da Tabela 2 e usando a Equação 2 (BOČEK 1988) foram construídas as curvas de mobilidade efetiva (μ_{eff,A^-}) versus pH apresentadas na Figura 1.

$$\mu_{eff,A^-} = \frac{\mu_{act,A^-}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (2)$$

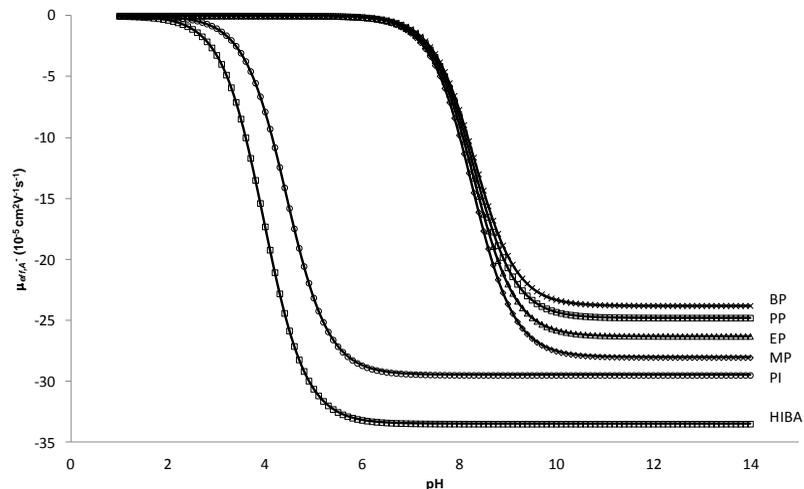


Figura 1 Curva de mobilidade efetiva *versus* pH para o sistema: parabenos, ácido cinâmico e HIBA. Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; PI – padrão interno (ácido cinâmico), HIBA, ácido 2-hidroxiisobutírico.

A fim de melhorar a precisão do método foi introduzido um padrão interno. Com base nas características estruturais dos analitos foi pré-selecionado para esta função o ácido cinâmico, utilizando o *software* SIMUL, pois além de este apresentar absorção no UV no mesmo comprimento de onda dos analitos, está completamente dissociado em pHs elevados ($pK_a = 4,43$). A seleção do PI foi decidida após os experimentos descritos acima para determinação das mobilidades dos componentes terem confirmado um valor de mobilidade do ácido cinâmico, Tabela 2, próximo à dos analitos.

Como é possível observar na Figura 1, a utilização de um valor de pH maior que 10 permite a separação dos quatro analitos numa região onde apresentam-se totalmente dissociados.

Um fenômeno que ocorre em eletroforese é a dispersão por eletromigração (EMD) dos analitos, acarretando o alargamento dos picos e prejudicando a quantificação. Para minimizar este efeito, foi utilizado um co-íon (componente do eletrólito de corrida que possui a mesma carga dos analitos) também totalmente dissociado nesta região de pH (Gas, Coufal et al. 2001; Gas, Stedry et al. 2002; Gas, Stedry et al. 2003). O co-íon HIBA ($pK_a 3,98$) foi escolhido por apresentar estas características, Figura 1, porém não apresenta capacidade tamponante em $pH > 10$, por isso, como contra-íon foi escolhida a trietilamina (pK_a

10,6), conferindo capacidade tamponante ao eletrólito de corrida (BGE). A otimização das concentrações foi feita utilizando-se o software Peakmaster® onde foram inseridos os dados de pK_a e mobilidade iônica dos parabeno e do PI, Tabela 1.

Mantendo-se constante a concentração de HIBA em 20 mmol L^{-1} e variando-se a concentração de TEA de 22 a 40 mmol L^{-1} foram construídas as curvas de mobilidade efetiva (μ_{eff,A^-}), valores de EMD, capacidade tamponante e condutividade para as diferentes composições do eletrólito, utilizando valores fornecidos pelo *software* Peakmaster®, Figura 2.

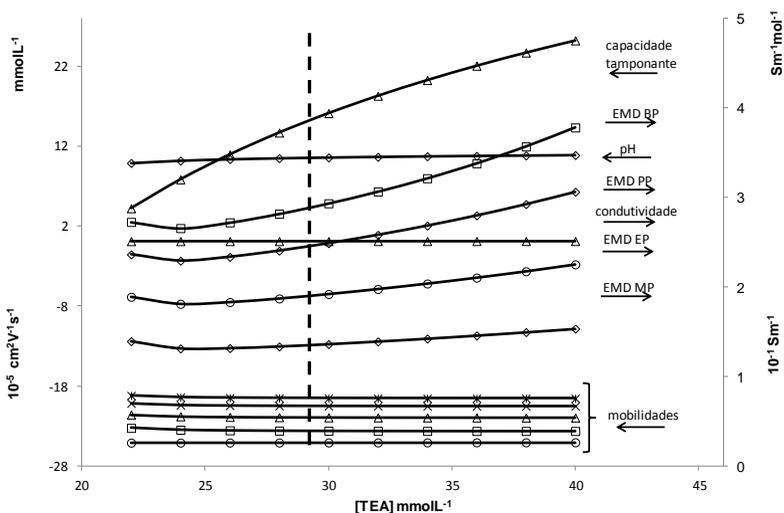


Figura 2 Curvas construídas utilizando o *software* Peakmaster®. Condição analítica: eletrólito composto por concentração fixa de 20 mmol L^{-1} de HIBA e concentração de TEA variando de 22 a 40 mmol L^{-1} . As setas indicam o eixo respectivo a cada parâmetro e as curvas de mobilidade são, de cima para baixo, para o BP, PP, EP, MP e ácido cinâmico, respectivamente. Legenda: EMD, dispersão por eletromigração; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

A condição escolhida como adequada para a separação foi 20 mmol L^{-1} de HIBA e 30 mmol L^{-1} de TEA, pois nessa condição o valor de capacidade tamponante será maior que 10 mmol L^{-1} , adequado para a manutenção do pH, os valores de EMD são menores que $3,0$, o que permite a formação de picos simétricos, a condutividade é menor que

0,134 S m⁻¹ o que minimiza o efeito Joule e as diferenças entre as mobilidade são altas.

2.5.1. Redução do tempo total de análise

Foram utilizadas 4 estratégias para a redução do tempo total de análise: 1) minimização das dimensões do capilar; 2) aplicação de tensão elevada para a separação; 3) injeção pelo lado mais próximo do detector; 4) preparo da amostra pela simples diluição em água.

Foi utilizado um capilar de 32 cm e foi aplicada uma tensão de -30 kV, o que gerou um elevado campo elétrico ($E = -937,5 \text{ V cm}^{-1}$) e a amostra foi introduzida pela extremidade mais próxima do detector, L_{det} 8,5 cm.

Já a quarta estratégia, além de diminuir o tempo total de análise, torna o procedimento muito menos laborioso quando comparado aos métodos para determinação de *p*-hidroxibenzoatos de alquila apresentados na literatura (Wang e Chang 1998; Lee, Lin et al. 2006; Uysal e Guray 2008; Li, Fei et al. 2011; Martins, Carreira et al. 2011). O preparo das amostras em diferentes matrizes pela simples diluição em água (e centrifugação no caso de amostras que apresentam partículas em suspensão), sem a necessidade de outro tratamento *on* e/ou *off-line*, torna o método rápido, o que é relevante em análises para teste de qualidade.

Com as condições otimizadas, foi realizada uma corrida eletroforética para a determinação do valor da mobilidade do fluxo eletrosmótico. Com o valor obtido experimentalmente foi realizada a simulação da separação utilizando o *software* Peakmaster, Figura 3.

É possível observar que há uma baixa resolução entre os picos do butil e propilparabeno. Para uma separação mais eficiente, foi introduzido no eletrólito o brometo de hexano-1,6-bis(trimetilamônio) (HMB), composto capaz de reduzir a carga superficial do capilar por interação eletrostática reduzindo assim o potencial zeta da superfície do capilar e o fluxo eletrosmótico (Dworschak e Pyell 1999). A concentração deste aditivo foi então variada entre 0,0 e 0,4 mmol L⁻¹, Figura 3, os valores de mobilidade do EOF obtidos experimentalmente, adicionados ao software e as separações simuladas para todos os sistemas. A concentração escolhida como satisfatória foi de 0,3 mmol L⁻¹ de HMB, pois apresentou total separação dos analitos com tempo de análise inferior a um minuto.

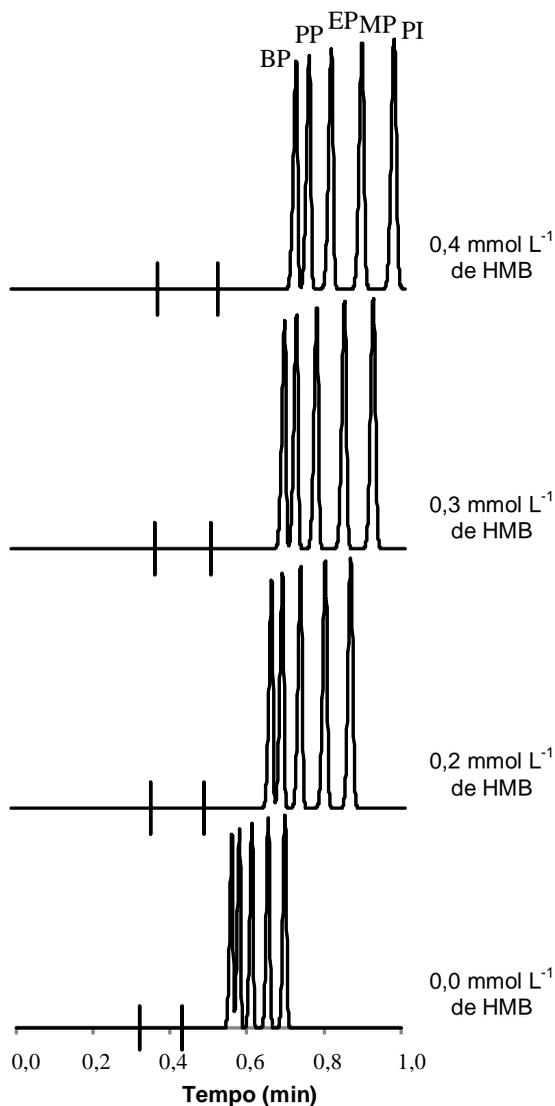


Figura 3 Eletroferogramas obtidos pelo software Peakmaster[®] nas condições experimentais estabelecidas: capilar com 32 cm, 8,5 cm de tamanho efetivo, 50 μm d.i e eletrólito composto por 20 mmol L^{-1} de HIBA, 30 mmol L^{-1} de TEA e concentrações variadas de HMB. Tensão, -30 kV. Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; HMB – hexano-1,6-bis(trimetilamônio). A ordem de migração dos analitos permaneceu a mesma em todas as condições estudadas.

Na Figura 4 (A e B) estão apresentados os eletroferogramas, experimental e simulado, respectivamente. É possível observar uma excelente correlação entre os resultados obtidos.

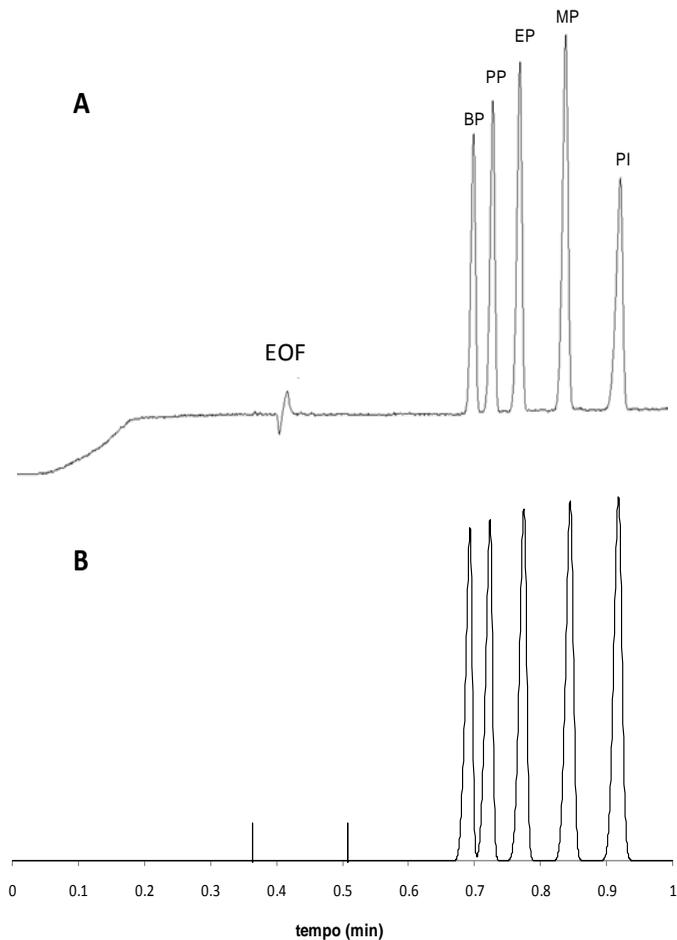


Figura 4 Condições do eletrólito otimizadas: 20 mmol L⁻¹ de HIBA, 30 mmol L⁻¹ de TEA, 0,3 mmol L⁻¹ de HMB, pH = 10,6. A) eletroferograma real dos padrões dos analitos e do ácido cinâmico; B) eletroferograma simulado pelo software Peakmaster®. Tensão, -30 kV; para o eletroferograma A, $\lambda = 297$ nm e T = 25 °C. Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; EOF, fluxo eletrosmótico. A ordem de migração dos analitos permaneceu a mesma em todas as condições estudadas.

3. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO

3.1. Figuras de mérito

A fim de avaliar a metodologia proposta para a análise dos parabenos foram determinados alguns parâmetros importantes: precisão instrumental; precisão intra e inter-ensaio; linearidade; limite de detecção e quantificação, que são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Parâmetros de desempenho do método avaliados para o metil, etil, propil e butilparabeno

PARÂMETRO	MP	EP	PP	BP
Faixa linear (mg L⁻¹)		0,50 - 30		
Precisão Instrumental - t_m (CV%) ^a	1,98	1,78	2,40	1,51
Precisão Instrumental – área (CV%) ^b	0,78	0,79	0,71	0,79
Precisão intra-ensaio – área (CV%) ^a	0,7-2,3	1,3-2,1	0,3-1,6	2,0-2,8
Precisão inter-ensaio – área (CV%) ^c	3,9-5,6	3,2-5,7	3,6-5,1	2,6-5,3
Linearidade	0,0798	0,0628	0,0547	0,0467
Desvio Padrão da Inclinação	0,00226	0,00182	0,00192	0,00177
Coefficiente de determinação – R²	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
F	30.264	12.637	19.344	10.537
LOQ^d (mg L⁻¹)	0,4	0,3	0,4	0,4
LOD^d (mg L⁻¹)	0,1	0,1	0,1	0,1

^a n = 18; ^b n = 10; ^c n = 12; ^d LOD e LOQ, são os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno, t_m, tempo de migração.

Os valores de precisão instrumental foram menores que 1% para todos os analitos (n = 8), os valores de precisão intra-ensaio e inter-ensaio foram menores que 5,7 %, o que demonstra uma precisão adequada.

Os valores de F apresentados na Tabela 3 demonstram que a regressão é significativa, F_{crit} = 4,24. A fim de atestar que o modelo linear é adequado, foi testada a falta de ajuste e os valores de t_{calc} foram 0,0393, 0,0814, 0,0522 e 0,103 (t_{crit} foi 2,58), o que demonstra que não há falta de ajuste para os modelos lineares obtidos. Os valores de LOD foram cerca de 0,1 mg L⁻¹ e LOQ inferior a 0,4 mg L⁻¹, calculados pela relação sinal ruído [Ribani, 2004].

3.2. Aplicação da metodologia desenvolvida

Na Figura 5 são apresentados os eletroferogramas de algumas das amostras estudadas. É possível observar um deslocamento no tempo de migração dos analitos em relação aos padrões. Isso pode ser justificado por uma alteração no EOF acarretada pela introdução da matriz da amostra no capilar. Entretanto isso não prejudica a identificação dos analitos, pois é possível usar o padrão interno ou o EOF como referência em conjunto com o espectro de UV-Vis de cada analito, e então a alteração no tempo de migração não altera a ordem de migração dos analitos que permanece próxima a 1 minuto.

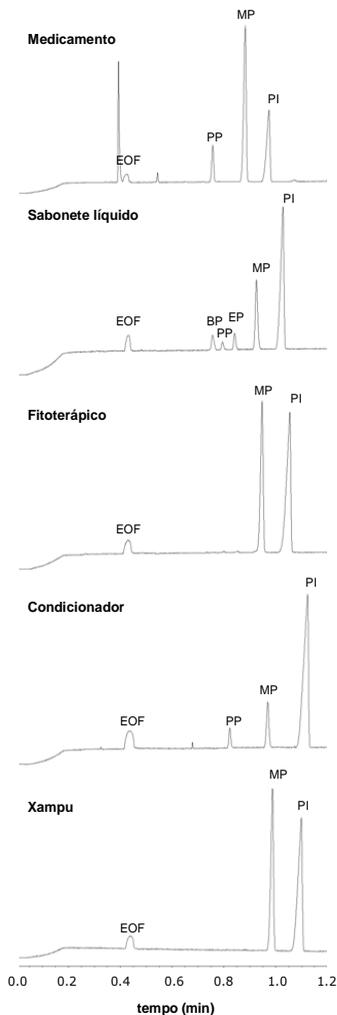


Figura 5 Eletroferogramas obtidos para amostras com diferentes matrizes. Condições experimentais: eletrólito com 20 mmol L⁻¹ de HIBA, 30 mmol L⁻¹ de TEA e 0,3 mmol L⁻¹ de HMB, pH = 10,6. Capilar 32 cm de comprimento, 8,5 cm tamanho efetivo, 50 μm d.i.; V = -30 kV; λ = 297 nm; T = 25 °C. Legenda: EOF, fluxo eletrosmótico; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP butilparabeno; PI – padrão interno (ácido cinâmico), EOF, fluxo eletrosmótico.

A Tabela 4 apresenta os resultados das análises de 13 amostras, entre cosméticos e fármacos, além de uma amostra de adoçante.

Tabela 4 Resultados analíticos para a determinação de metil, etil, propil e butilparabeno em produtos comerciais

AMOSTRAS	MP	EP	PP	BP	TOTAL
Fitoterápico 1 (% m/v)	0,175 ± 4,4 x 10 ⁻³	n.d ^a	n.d	n.d	0,175 ± 4,4 x 10 ⁻³
Fitoterápico 2 (% m/v)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Medicamento sintético 1 (% m/v)	0,081 ± 1,33 x 10 ⁻³	n.d	0,019 ± 4,64 x 10 ⁻⁴	n.d	0,100 ± 1,41 x 10 ⁻³
Medicamento sintético 2 (% m/v)	0,107 ± 5,33 x 10 ⁻⁴	n.d	0,013 ± 2,33 x 10 ⁻⁴	n.d	0,120 ± 5,8 x 10 ⁻⁴
Medicamento sintético 3 (% m/v)	0,106 ± 1,22 x 10 ⁻⁴	n.d	n.d	n.d	0,106 ± 1,22 x 10 ⁻⁴
Sabonete líquido (% m/m)	0,070 ± 8,9 x 10 ⁻⁴	0,021 ± 6,0 x 10 ⁻⁴	0,0078 ± 4,2 x 10 ⁻⁴	0,0284 ± 9,56 x 10 ⁻⁵	0,127 ± 1,16 x 10 ⁻³
Condicionador (% m/m)	0,26 ± 6,4 x 10 ⁻⁴	n.d	0,13 ± 3,0 x 10 ⁻³	n.d	0,390 ± 3,07 x 10 ⁻³
Xampu (% m/m)	0,172 ± 7,8 x 10 ⁻³	n.d	n.d	n.d	0,172 ± 7,8 x 10 ⁻³
Hid, Corpo 1 (% m/m)	0,34 ± 2,19 x 10 ⁻⁴	n.d	n.d	n.d	0,34 ± 2,19 x 10 ⁻⁴
Hid, Corpo 2 (% m/m)	0,147 ± 1,3 x 10 ⁻³	n.d	0,073 ± 1,0 x 10 ⁻⁴	n.d	0,220 ± 1,3 x 10 ⁻³
Hidratante mãos (% m/m)	0,0615 ± 4,1 x 10 ⁻³	n.d	n.d	n.d	0,0615 ± 4,1 x 10 ⁻³
Creme cutícula (% m/m)	0,1235 ± 2,1 x 10 ⁻³	n.d	n.d	n.d	0,1235 ± 2,1 x 10 ⁻³
Adoçante (% m/v)	0,052 ± 4,2 x 10 ⁻³	n.d	n.d	n.d	0,052 ± 4,2 x 10 ⁻³

^a Não detectado.

De fato, pode ser observada uma maior utilização dos compostos MP e PP nas formulações, com apenas uma das amostras apresentando os quatro analitos simultaneamente. As amostras foram variadas, a fim de se ter informação quanto a aplicabilidade do método e possíveis restrições. Os resultados foram bastante satisfatórios, com desvios padrões relativamente baixos, quando se trata de amostras com matrizes muito distintas e complexas.

Todas as amostras apresentaram concentração de parabenos abaixo do limite permitido pela legislação, que é de 0,4% e 0,8% quando adicionado individualmente ou em associação, respectivamente (ANVISA 2001). A maior concentração encontrada foi de 0,39% para o condicionador, sendo que em uma das amostras de fitoterápico não foram detectados nenhum dos analitos, contraditório a informação do fabricante. Os demais produtos apresentaram especificados os parabenos adicionados.

3.3. Exatidão

3.3.1. Ensaio de Recuperação

Devido a variedade e complexidade das amostras, foram realizadas duplicatas de curvas de adição de padrão com amostras de diferentes matrizes, a fim de observar a interferência destas na quantificação dos analitos. Para isto, foram adicionados três níveis conhecidos de concentração dos analitos (5, 10 e 15 mg L⁻¹) em amostra de xampu, condicionador, hidratante, sabonete líquido, adoçante dietético e medicamentos sintéticos e naturais (fitoterápicos), de forma a obter as áreas dos sinais dentro dos limites da curva de calibração externa.

Obtidas as curvas analíticas de adição interna e externa de padrão, a as equações que as descrevem, foram calculados e são apresentados na Tabela 5, as médias dos valores de recuperação obtidos para cada analito em diferentes amostras e os desvios padrão correspondentes aos resultados dos três níveis de padrão adicionados.

Tabela 5 Percentagem de recuperação de cada analito (metil, etil, propil e butilparabeno) em diferentes amostras e o desvio padrão entre os três níveis de concentração adicionados utilizando adição interna de padrão

Amostras	MP		EP		PP		BP	
	rec (%)	dp	rec (%)	dp	rec (%)	dp	rec (%)	dp
Med.	93,9	4,02	97,8	2,77	96,0	3,06	98,5	2,52
sintético 1								
Hid. 1	98,3	1,78	97,1	2,90	97,1	2,44	97,6	3,09
Xampu	74,2	10,3	98,4	0,95	94,0	4,98	96,6	0,40
Fitoteráp.	89,2	6,01	94,3	4,16	101	4,89	99,0	4,0
Sabonete líquido								
Cond.	85,9	0,378	92,4	1,24	90,4	0,858	95,1	1,46
Adoçante dietético	87,5	3,10	91,9	1,99	97,7	2,30	96,4	1,54

Legenda: rec, recuperação; dp, desvio padrão; Med., medicamento; Hid, hidratante; Fitoteráp., fitoterápico; Cond., condicionador; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

Os dados da Tabela 6 denotam uma recuperação adequada dos analitos para a maioria das amostras (entre 80 e 120%) (Ribani, Bottoli et al. 2004). A amostra de xampu apresentou recuperação média de MP entre os três níveis adicionados inferior a 80% com desvio padrão elevado: a recuperação foi mais eficiente com o aumento da concentração de analito adicionada. Uma recuperação inferior a 80% foi encontrada também para o composto butilparabeno na amostra de sabonete líquido. Estes resultados indicam uma possível interferência das matrizes destas duas amostras. Amostras de cosméticos são consideradas complexas devido à quantidade e variedade de componentes da matriz. Dentre estes, merecem destaque os surfactantes presentes em xampus, condicionadores e sabonetes, que geralmente interagem com os demais componentes da amostras, principalmente na presença de micelas. Além disto, são compostos que merecem atenção quando é utilizada a técnica de eletroforese capilar, pois podem interagir também com a parede do capilar e/ou com os componentes do eletrólito, podendo acarretar desvios na mobilidade do EOF.

Apesar disso, a análise geral dos dados, considerando-se a variedade e complexidade das matrizes, bem como o elevado índice permitido pela ANVISA para adição destes compostos, sugere resultados satisfatórios para esta análise específica.

3.3.2. Comparação do método com a técnica de HPLC/MS/MS

Para avaliar a exatidão do método desenvolvido, por CE, foi realizado um procedimento por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC/MS/MS) para determinação de MP, EP, PP e BP. Foi utilizado um grupo de amostras analisadas por CE, com diferentes matrizes, e os resultados, comparados. Foram realizadas análises com as amostras de xampu, condicionador, sabonete líquido, hidratante 2, medicamento sintético 1 e fitoterápico 1. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 Resultados obtidos para a determinação de parabenos em amostras comerciais pelas técnicas de HPLC/MS/MS e CE-UV (proposta deste trabalho)

AMOSTRAS	HPLC/MS/MS (média)	CE-UV (média)
Xampu (mg Kg⁻¹)	1849	1720
Condicionador (mg Kg⁻¹)	2756	2601
Sabonete líquido (mg Kg⁻¹)	863,1	700,0
Hidratante (mg Kg⁻¹)	1963	1470
Medicamento sint. (mg L⁻¹)	194,7	190,0
Fitoterápico (mg L⁻¹)	1715	1750
Condicionador (mg Kg⁻¹)	1301	1300
Sabonete líquido (mg Kg⁻¹)	78,70	78,00
Hidratante (mg Kg⁻¹)	928,5	730,0

Legenda: sint., sintético; HPLC/MS/MS, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas; CE-UV, Eletroforese Capilar com detector Ultravioleta-visível.

Para avaliar se os métodos apresentam resultados estatisticamente iguais, foi aplicado o *Teste-t* pareado, utilizando o *software* Instat. O valor de *t* obtido foi de 2,26 ($< t_{\text{crit}} = 2,30$) e valor de *P* apresentou-se maior que 0,05, o que demonstra equivalência entre os resultados obtidos em ambos os métodos.

Os dados obtidos por HPLC/MS/MS versus EC-UV, apresentou correlação de Pearson com valor de 0,9832, mostrando-se uma boa correlação entre ambas as metodologias.

4. COMPARAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA COM OUTROS MÉTODOS REPORTADOS

O presente método foi comparado com outras alternativas descritas na literatura para a determinação de parabenos em produtos cosméticos e algumas características dos métodos comparativos são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 Comparação da proposta deste método com outros métodos desenvolvidos para determinação de parabenos em produtos cosméticos

Método	Amostras	LOD	Tempo de análise	Preparo da amostra	Referência
CE-UV	Xarope, xampu, creme dental	~ 0,26-0,55 mg L ⁻¹	> 10 min	SPE	(Uysal e Guray 2008)
HPLC-ED	xampu	0,4 mg L ⁻¹	> 7min	SPE	(Martins, Carreira et al. 2011)
HPLC-UV	bloqueador solar, cremes	0,1-0,2 mg L ⁻¹	> 4,5 min	SPME	(Li, Fei et al. 2011)
CZE	cremes	1,0 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	> 3,4 min	SFE	(Wang e Chang 1998)
HPLC-C-CAD	cremes, xampu, maquiagens	0,5-2,1 mg L ⁻¹	> 15 min	SPE	(Valcarcel, Marquez-Sillero et al. 2010)
CE-UV	cosméticos e fármacos diversos	0,1 mg L ⁻¹	< 1,2 min	Diluição em água centrifugação	Este trabalho

Legenda: LOD, limite de detecção; SPE, extração em fase sólida; SPME, microextração em fase sólida; SFE, extração com fluido supercrítico; CE-UV, eletroforese capilar com detector ultravioleta-visível; HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência; CZE, eletroforese capilar de zona; ED, detector eletroquímico; C-CAD, detector *corona charged aerosol*.

Com os dados da Tabela 7 pode-se observar que o método proposto apresenta tempos de migração apreciavelmente inferiores com limites de detecção da mesma ordem de grandeza e um preparo de amostra simples, que envolve apenas diluição e centrifugação. Por outro lado, a não utilização de técnicas de *cleanup* e pré-concentração utilizadas pelas metodologias reportadas e apresentadas na Tabela 8

influenciou diretamente na precisão e exatidão do método. Os limites de detecção e quantificação não foram diretamente afetados, se comparados com as metodologias reportadas aplicadas para amostras de cosméticos e fármacos.

5. CONCLUSÕES

As curvas de mobilidade efetiva junto com o software Peakmaster[®] tem se mostrado uma ferramenta auxiliar importante no desenvolvimento de metodologias por CE (Gas, Coufal et al. 2001; Gas, Stedry et al. 2002; Gas, Stedry et al. 2003). Estratégias para redução do tempo total de análise e alta frequência analítica, reportados neste artigo e em outros trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Micke, Costa et al. 2009; Micke, Piovezan et al. 2010; Micke, Vitali et al. 2011) apresentam-se como atrativos para testes de controle de qualidade, como também para estudos cinéticos.

O método experimental reportado neste trabalho apresenta-se como alternativa interessante para análises simultâneas de MP, EP, PP e BP em formulações cosméticas e farmacêuticas diversas, com limites de detecção ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e quantificação ($0,3\text{-}0,4 \text{ mg L}^{-1}$), precisão e exatidão adequados para os tipos de aplicações. Exibe vasta aplicabilidade, tendo sido avaliado em amostras de xampu, condicionador, cremes diversos, sabonete líquido, medicamentos, etc. O tempo de análise das amostras para determinação simultânea dos quatro analitos foi cerca de um minuto, que é significativamente baixo quando comparado aos métodos reportados na literatura até o momento. A metodologia proposta apresentou-se simples, principalmente no preparo das amostras que não utilizou técnicas de pré-concentração laboriosas como SPE e SPME, versátil, de baixo custo analítico e com quantidades de reagentes, solventes orgânicos e resíduos bastante reduzidas.

Capítulo 2

Estudo da interação entre *p*-hidroxibenzoatos de alquila e macromoléculas biológicas utilizando eletroforese capilar

A literatura reporta alguns métodos e técnicas utilizadas no estudo de interações moleculares e cálculos de constantes de associação (K_{ass}), como dicroísmo circular (Otagiri e Perrin 1977; Uekama, Hirayama et al. 1977), espectroscopia UV-vis, RMN, cromatografia, espectroscopia de fluorescência e eletroforese capilar (Armstrong e Jiang 2010).

A CE tem se mostrado um método atrativo para estudar a interação entre compostos diversos e proteínas, porém tem recebido pouca atenção. Até 1997 haviam descritos na literatura 5 métodos para se determinar estas constantes de associação (Busch, Carels et al. 1997). Com exceção do método de eletroforese capilar de vacância (VACE), estes métodos têm sido desenvolvidos em HPLC antes de serem implementadas as técnicas de eletroforese capilar de zona (CZE). Os vários métodos por CZE (análise frontal - FA; Hummel-Dreyer - HD; vacância de pico - VP; eletroforese capilar de vacância - VACE; eletroforese capilar de afinidade - ACE), podem ser subdivididos de acordo com a forma com que os parâmetros de interação são adquiridos (Busch, Carels et al. 1997; Armstrong e Jiang 2010). Um sexto método, mais recente, reportado por CE (*Partial Filling* - PF) envolve o preenchimento parcial do capilar com solução do receptor (no caso a proteína ou o DNA) e permite, inclusive, injeções múltiplas, porém este último apresenta-se bastante limitado, exige um planejamento elaborado sem poder ser estendida a aplicação para demais sistemas, além daquele em estudo (Heegaard e Schou 2006; Gomez, Zavaleta et al. 2007). Apesar destas possibilidades de metodologias, os métodos, na verdade, são considerados complementares mais do que competitivos, pois cada um exibe extensão específica de aplicabilidade, limitações, vantagens e desvantagens.

Para a proposta deste trabalho foram aplicados, nos estudos com BSA, os métodos por ACE e PF-ACE, e seus desempenhos comparados. Além da metodologia, os modelos matemáticos para a obtenção das constantes de associação devem ser de acordo com o princípio das metodologias e técnicas empregadas, bem como com a natureza da interação. Apesar dos parabens apresentarem interação com dois sítios

da albumina (Strom e Jun 1981), os modelos matemáticos utilizados foram para associações do tipo 1:1, fornecendo um valor médio da K_{ass} .

Conhecimentos quanto a interação desta classe de compostos com albumina são esclarecedores, porém com DNA permanecem escassos. Ensaio com DNA são geralmente realizados com a técnica de eletroforese em gel (não capilar) que incluem detectores de fluorescência (Kang, Chung et al. 2005; Lanznaster, Neves et al. 2005), entretanto há estudos de interação que utilizam da técnica de CE-UV (Timerbaev, Rudnev et al. 2005; Armstrong e Jiang 2010): a interação ocorre fora do equipamento (*offline*) e avalia-se a diminuição da concentração do ligante livre nesta solução após um determinado tempo de incubação (Timerbaev, Rudnev et al. 2005; Medina-Hernandez, Diniz et al. 2008). Neste caso, o DNA livre e ligado é filtrado e, portanto, não injetado no equipamento, sendo necessário apenas um método para determinação do substrato (no caso, propilparabeno) livre, sem variações pelo fato de envolver a biomolécula. Este tipo de experimento *offline* é aplicado tanto com proteínas quanto com DNA ou polímeros sintéticos e utiliza-se de filtros com membrana de celulose. No presente trabalho foram aplicados dois métodos, com fins qualitativos: o *offline*, descrito acima e o PF-ACE, e apresentaram ambos os mesmos resultados.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Ação biológica dos *p*-hidroxibenzoatos de alquila

A partir de uma avaliação realizada no início da década de 70, foi reportado que os parabenos (especificamente MP e PP) são facilmente absorvidos pelo sistema gastrointestinal de uma série de mamíferos, incluindo seres humanos, e metabolizados. São hidrolisados por enzimas a ácido *p*-hidroxibenzoico e demais metabólitos, e estes são excretados na urina. Logo após a administração intra-venosa, o éster puro foi detectado no cérebro, baço e pâncreas e altos níveis de metabólitos foram detectados no fígado e nos rins. A conclusão dos autores destes e de outros estudos realizados nos anos 60 é de que nenhum dos dois compostos estudados é acumulado nos tecidos, ou este índice foi muito ínfimo a ponto de ser descartado (Soni, Burdock et al. 2001; Soni, Taylor et al. 2002).

Outra informação importante é acerca da absorção subcutânea dos parabenos, já que a maioria dos cosméticos é aplicada externamente. Ainda na década de 70 foram realizados estudos em sapos e pele de porco e mais recentemente em pele humana e de ratos. O resultado é que a absorção ocorre rapidamente na pele e aumenta com o aumento da cadeia carbônica ligada ao grupo éster do parabeno. Além disto, a permeabilidade do composto é dependente da composição da formulação e tempo de exposição. Outra observação feita nos estudos realizados com pele de rato é que cerca de 30% dos parabenos absorvidos foi detectado na sua forma intacta logo após a permeação, atingindo a corrente sanguínea (Soni, Carabin et al. 2005).

Estudos de toxicidade aguda, crônica e subcrônica com os parabenos indicaram baixa toxicidade destes compostos e que esta diminui com o aumento da cadeia carbônica (Soni, Carabin et al. 2005). Valores de LD₅₀ para os diferentes parabenos em diferentes animais e vias de administração são expostos na Tabela 1.

Tabela 1 LD₅₀ (mg Kg⁻¹) de parabenos em diferentes espécies de animais por diferentes rotas^a

Espécie	Rota	MP	EP	PP	BP
Camundongo	Oral	> 8.000		6.322- >8.000	13.200
Camundongo	Oral	2.000	1.500	3.700	950
Camundongo	Subcutânea	125- 1.200		1.650	
Camundongo	Intra- peritoneal	760-960		640	
Rato	Oral	2.100- 8.000	4.300	> 8.000	
Coelho	Oral	3.000 ^b	4.000 ^b	6.000 ^b	
Cão	Oral	3.000 ^b	5.000 ^b	4.000 ^b	

^a Dados obtidos (Soni, Carabin et al. 2005); ^b LD₁₀₀ ou dose letal. Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

Quantidades de parabenos abaixo da LD₅₀ administradas via subcutânea apresentaram paralisias, ataxia e dificuldade respiratória em ratos. A toxicidade foi estudada para misturas de parabenos e o resultado é de que estes não apresentam efeito tóxico sinérgico. Em concentração de 10% apresentaram-se levemente irritantes quando aplicados em pele de coelho, mas em baixas concentrações não apresentaram irritação. A maioria dos estudos também conclui que não são sensibilizantes. Em humanos, na população com a pele normal, os parabenos também apresentaram-se praticamente não-irritantes e não sensibilizantes, porém a aplicação de medicamentos contendo estes aditivos em pele danificada resultou em sensibilização (Soni, Burdock et al. 2001; Soni, Taylor et al. 2002; Soni, Carabin et al. 2005).

Estudos realizados *in vitro* demonstram que os compostos propil e butilparabeno apresentam citotoxicidade. Metil, etilparabeno e o metabólito majoritário ácido *p*-hidroxibenzóico têm essa toxicidade bastante reduzida. Por este motivo, dispõe-se que *in vivo* a citotoxicidade do PP e BP são descartadas, já que são, segundo relatos, rapidamente hidrolisados por enzimas carboxiesterase, no entanto, não há estudos que comprovam esta extrapolação. O mecanismo de citotoxicidade dos parabenos ainda não é definido, porém há evidências de que não é via formação de radicais livres (Fawthrop, Boobis et al. 1991). O potencial tóxico dos parabenos em hepatócitos ou mitocôndria, bem como a permeabilidade destes pela membrana mitocondrial, foram novamente relacionados ao aumento da cadeia alquílica ligada ao grupo éster. (Fawthrop, Boobis et al. 1991)

Ensaaios de mutagenicidade dos parabenos foram realizados pelo teste de Ames, por ensaios citogenéticos, ensaio letal dominante e ensaio de hospedeiros e indicaram que os parabenos não são genotóxicos. Os dados são de 1974 e os resultados corroborados em trabalhos reportados no final da década de 70 (Soni, Burdock et al. 2001; Soni, Carabin et al. 2005).

Por outro lado, em culturas com fibroblastos de embriões de ratos, os compostos MP, EP e PP reduziram significativamente a biossíntese de RNA e DNA. Curiosamente nenhum dos parabenos afetou o teor de proteína das culturas celulares (Soni, Carabin et al. 2005). Em 1983 foram reportados os efeitos de alguns parabenos sobre a síntese de RNA, DNA e proteínas em *E. coli* e *B. subtilis*. Ambas as sínteses de DNA e RNA foram inibidas. A síntese de proteína em extratos de células livres de *B. subtilis* foi mais sensível aos parabenos que a síntese de RNA e DNA, enquanto a síntese de proteínas em células de *E. coli* foi pouco afetada. Entre os parabenos testados, MP apresentou-se o menos ativo (Soni, Taylor et al. 2002; Soni, Carabin et al. 2005).

Quanto aos efeitos farmacológicos e o processo de distribuição, a literatura dispõe que os parabenos se ligam nos sítios 1 e 2 da albumina do soro, tendo essa interação aumentada também com o aumento da cadeia carbônica ligada ao grupo éster. O processo é endotérmico e, usando uma sonda fluorescente, foi documentado que a cadeia lateral do parabeno é o principal local de ligação a albumina (Jun, Mayer et al. 1971). Esta ligação diminui a sua ação antifúngica e, no caso do metilparabeno, ocorre o deslocamento da bilirrubina (Soni, Taylor et al. 2002). Além disto, a constante de interação do propil para o butilparabeno aumenta significativamente (Otagiri e Perrin 1977).

Com relação a elevada atividade antimicrobiana dos parabenos o que se relata é uma maior eficiência contra fungos quando comparada com bactérias e a relação atividade e comprimento da cadeia carbônica ligada ao grupo éster (quanto maior, mais eficaz). Os parabenos são altamente ativos em quase toda faixa de pH (ácida, neutra e ligeiramente básica) e, neste quesito, apresentam efeito sinérgico. Um fator que altera a eficácia dos parabenos é a presença de solventes como metanol e propilenoglicol, em grande parte explicada pelo aumento da solubilidade destes compostos e pelos seus efeitos combinados sobre a integridade das membranas celulares (Soni, Carabin et al. 2005).

Uma atenção às datas correspondentes aos estudos biológicos discutidos até o momento faz perceber uma carência de estudos atuais. A maioria dos estudos se deu entre as décadas de 50 e 80, embora haja

relatos de ensaios biológicos com parabenos no final da década de 20. Estas referências são citadas em artigos de revisão que abordaram o assunto nos anos 2001, 2002 e 2005 e, de fato, praticamente não há referências atuais destes estudos. No entanto, trabalhos publicados no final dos anos 90 e, principalmente, na primeira metade dos anos 2000, têm colocado em prova a segurança do uso destes conservantes (Soni, Burdock et al. 2001; Soni, Taylor et al. 2002; Soni, Carabin et al. 2005).

Estudos recentes sugerem que os parabenos possuem potencial estrogênico (Lemini, Jaimez et al. 2003; Andersen, Lundsbye et al. 2007; Bila e Dezotti 2007; Chen, Ahn et al. 2007). No final dos anos 90, foi estudada a atividade estrogênica de MP, EP, PP e BP *in vitro* e os resultados foram que a atividade aumenta com o aumento da cadeia carbônica, porém, foram consideradas baixas: o BP, por exemplo, apresentou ser cerca de 10.000 vezes menos potente que o 17 β -estradiol. O principal metabólito dos parabenos, o ácido *p*-hidroxibenzóico, apresentou-se inativo (Soni, Carabin et al. 2005). Em 2001, foi relatada atividade estrogênica dos compostos PP, BP, isobutil e isopropil parabeno em células cancerosas de mama humana (MCF-7) e os resultados foram confirmados mais tarde por Darbre e colaboradores (2002, 2003). Em 2004, Darbre e colaboradores detectaram quantidades de parabenos em tecido de tumor de mama humana. Destes, 60% correspondeu ao composto MP, mas também foram encontrados EP, PP, BP e isobutilparabeno. Com isso, verdades acerca da sua capacidade de ser completamente excretado do organismo, como era afirmado, foram colocadas em dúvida (Darbre, Aljarrah et al. 2004). Segundo os autores, há comprovações suficientes de que os parabenos podem sim ser absorvidos e bioacumulados nos tecidos.

Ainda com relação a atividade estrogênica desta classe de compostos, estudos *in vivo* também foram realizados e o que se relatou foi um aumento no peso do útero de ratas no 4º dia de aplicação subcutânea de BP e no 3º dia de aplicação subcutânea de isobutilparabeno. Estas respostas foram atribuídas a atividade estrogênica dos compostos. Quando ensaios foram realizados em peixes, todos os parabenos foram considerados estrogênicos, enquanto o ácido *p*-hidroxibenzóico novamente não demonstrou qualquer atividade. O potencial estrogênico do propil e do butilparabeno foi comparado a atividade do bisfenol A. Ainda estudos realizados com ratas grávidas mostraram que, no grupo tratado com 200 mg Kg⁻¹ de BP, a proporção de filhotes nascidos vivos e que sobreviveram ao desmame diminuiu significativamente (Soni, Carabin et al. 2005).

Martín e colaboradores em 2010 reportaram resultados de estudos realizados com células de rim de macaco constatando atividade tóxica do propilparabeno e contribuição deste na oxidação do DNA. Os resultados mostraram que a exposição ao composto por 24h causou mudanças na velocidade de proliferação das células e na viabilidade das células estudadas. Dados revelaram a indução da quebra da dupla-fita do DNA por mecanismo oxidativo. Os autores ainda comentam que há estudos em andamento buscando informações que corroborem e definam o modo de ação do propilparabeno em culturas de células (Martin, Peropadre et al. 2010).

Em 2007, estes compostos foram apresentados na lista dos desreguladores endócrinos (DE), junto a compostos como organoclorados e outras classes de pesticidas, ftalatos, alquilfenóis, alguns metais pesados e bifenilas policloradas (PCBs) (Bila e Dezotti 2007). Segundo a União Européia, os desreguladores endócrinos podem: danificar diretamente um órgão endócrino; alterar diretamente a função de um órgão endócrino; interagir com um receptor de hormônios ou, alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino. A hipótese da ação dos DE deve-se a acontecimentos como o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram dietilestilbestrol (estrogênio sintético) na gravidez entre os anos 40 e 70, além de anomalias no sistema reprodutivo observadas em jacarés que habitavam o lago da Flórida contaminado com diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seu metabólito diclorodifeniltricloroetileno (DDE) (Bila e Dezotti 2007).

A presença de DE em estações de tratamento de esgotos e fontes de água potável, demonstram uma ineficácia dos tratamentos atuais para remoção destas substâncias, apresentando riscos não apenas aos seres humanos e mamíferos, como também a animais aquáticos que, de maneira geral, são muito mais suscetíveis à exposição de xenobióticos (Yamamoto, Tamura et al. 2011). A possível bioacumulação destes compostos em animais aquáticos pode ainda acarretar biomagnificação na cadeia trófica. Por este motivo, os parabenos têm sido largamente estudados como poluentes, junto a outros DE (Bila e Dezotti 2007).

1.2. Interação entre compostos exógenos/xenobióticos e biomoléculas

A exposição diária a uma variedade de compostos estranhos (xenobióticos) é capaz de levar à absorção desses através dos pulmões,

da pele ou ingeridos, de maneira intencional ou não. Alguns são inofensivos; outros, porém, podem provocar respostas biológicas de natureza farmacológica ou tóxica (Oshima-Franco 2003). Há, portanto, um interesse em se conhecer os processos os quais estes componentes irão participar no organismo, sendo necessários conhecimentos de toda farmacodinâmica e farmacocinética envolvida.

Especificamente, a farmacodinâmica estuda a inter-relação entre o composto e a estrutura-alvo, desejável ou não, bem como o respectivo mecanismo de ação, benéfico e/ou maléfico. Com relação aos mecanismos de ação, estão envolvidas interações do tipo ligações de hidrogênio, iônicas, covalentes, interações hidrofóbicas e de Van der Waals, que envolvem principalmente enzimas, proteínas carregadoras (albumina) e ácidos nucleicos (Goodman; Gilman 1996).

Já a farmacocinética é definida como o estudo quantitativo dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação dos componentes exógenos ou dos seus metabólitos que estão descritos abaixo:

Absorção: É a passagem da substância para a circulação sistêmica e está relacionado com a permeação do composto através de membranas biológicas. Fatores como características físico-químicas do composto e das membranas, e as vias de administração, influenciam a absorção (Katzung 1995; Goodman; Gilman 1996).

Distribuição: Depois de absorvido ou injetado na corrente sanguínea, a substância pode distribuir-se para os líquidos intersticial e celular. A distribuição é dependente do fluxo sanguíneo, das possíveis interações com proteínas presentes no plasma e da taxa de difusão nos tecidos, que são influenciadas principalmente pelas características físico-químicas do composto e, por isso, é singular para cada um (Katzung 1995; Goodman; Gilman 1996).

Metabolismo ou Biotransformação: É toda e qualquer transformação química do composto dentro do organismo. Em geral, as biotransformações são catalisadas por enzimas que se encontram em maior concentração no fígado, mas também nos rins, pulmões, trato gastrointestinal e na pele (Katzung 1995; Goodman; Gilman 1996; Meyer 1996)

A principal atividade da biotransformação, em especial se tratarem de compostos lipossolúveis, é produzir um derivado que, ao passar pelos túbulos renais, não seja reabsorvido e tenha, portanto, real possibilidade de excreção.

Eliminação ou Excreção: É o último processo que envolve a participação do composto exógeno no organismo. A excreção pode

ocorrer através de diferentes órgãos como o intestino (fecal) e os pulmões, porém o rim (urina) é o principal órgão envolvido neste processo (Goodman; Gilman 1996). A bioacumulação pode ocorrer quando este processo é ineficiente.

A partir do momento que a composto é administrado, interna ou externamente, as etapas descritas acima ocorrem simultaneamente, sendo essa divisão apenas de caráter didático.

1.2.1 A ligação com proteínas plasmáticas

Uma grande quantidade de compostos, quando atinge a corrente sanguínea, é capaz de interagir com os constituintes daquele meio, como os eritrócitos e as proteínas plasmáticas. Dentre as proteínas, a principal participante deste processo é a albumina do soro, podendo ser também a beta-globulina e a α 1-glicoproteína ácida, dentre outras (Ghuman, Zunszain et al. 2005). A maior afinidade por uma das proteínas presentes se dá pelos níveis de concentração das mesmas, sendo que a albumina representa cerca de 50% do total de proteínas no sangue, como também pelas características do composto e dos sítios de ligação das proteínas, que são geralmente os sítios 1 e 2, localizados nos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente (Ghuman, Zunszain et al. 2005). As Figuras 1 e 2 apresentam as ligações de alguns fármacos nos sítios 1 e 2 da albumina do soro humano (HSA).

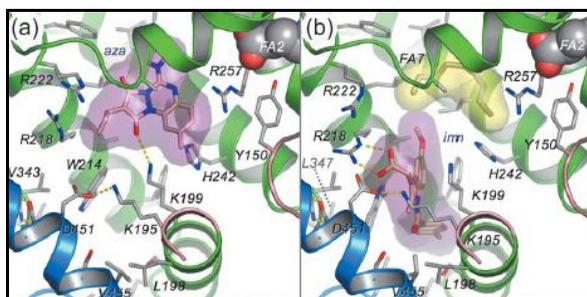


Figura 1 Ligação de fármacos no sítio 1 da albumina do soro humano (HSA) já ligada a um tetradecanoato. a) azapropazona e b) indometacina (Ghuman, Zunszain et al. 2005).

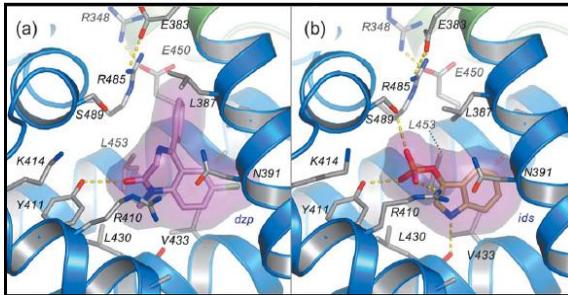


Figura 2 Ligação de fármacos no sítio 2 da albumina do soro humano (HSA). a) diazepam e b) indoxil-sulfato (Ghuman, Zunszain et al. 2005).

Estudos de interação entre xenobióticos e proteínas plasmáticas são importantes porque as forças de ligação têm efeitos significativos sobre as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (descritas anteriormente), relevantes para a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção, bem como para as concentrações destes compostos nos seus locais de ação e em tecidos.

A interação de um determinado composto com a proteína plasmática deve ser um processo reversível e dinâmico em que complexos continuamente se formam e se desfazem. Uma vez que as proteínas não passam através das paredes capilares, a fração do composto livre é que atravessará as membranas tornando-se disponível para interações com receptores, como proteínas específicas e DNA (Katzung 1995; Goodman; Gilman 1996). No caso de fármacos, vitaminas e antioxidantes, esta interação é desejável, porém muitos compostos podem causar alterações maléficas como mutação gênica indesejada, desequilíbrio protéico e interação medicamentosa (Oshima-Franco 2003).

1.2.2. Interações de moléculas pequenas com o DNA

Sabe-se que a capacidade de informação genética se dá pela leitura de determinadas seqüências de pares de base que estruturam o DNA. Uma leitura alterada fornece informações alteradas. Esta e qualquer mudança física ou química que ocorra na estrutura do DNA pode acarretar danos irreparáveis à saúde das células e funcionamento do organismo. Por outro lado, células que se multiplicam mutantes devem sofrer uma nova mutação para que seja cessada a sua replicação. Um mesmo princípio, portanto, pode causar e curar danos, entre diversos, o câncer.

Uma grande variedade de dados científicos dá força a hipótese de que o câncer é uma doença da atualidade, causado principalmente por fatores ambientais e hábitos de vida, que inclui o maior consumo de industrializados e *junk foods*. De acordo com Arnes, substâncias mutagênicas ambientais, e estende-se para as demais, além de causar o câncer e defeitos genéticos, também podem agravar doenças cardíacas, alergias e induzir a malformação no desenvolvimento do feto (HOJO 1981).

São classificados 4 principais grupos de mutagênicos químicos: agentes alquilantes que interagem com centros nucleofílicos do DNA adicionando grupamentos alquila; análogos de base que são compostos cuja estrutura é muito parecida com a de uma base-estrutural, e por isso são incorporados no DNA em seu lugar; agentes desaminantes que reagem com as bases que possuem grupo amino e; agentes intercalantes que são compostos que se intercalam entre as bases nitrogenadas (HOJO 1981).

Substâncias mutagênicas são encontradas em produtos industriais, como o cloreto de vinila utilizado para produzir PVC (cloreto de polivinila – polímero utilizado na fabricação de materiais plásticos); em defensivos agrícolas (organoclorados, organofosforados, carbamatos, triazinas, etc); aditivos alimentares (nitrosaminas, nitrito, bissulfito, etc) como também em medicamentos e cosméticos (antibióticos, drogas usadas no tratamento da esquistossomose e do câncer, alguns psicotrópicos, corantes sintéticos, etc.) (HOJO 1981). Desta última classe, os mais discutidos atualmente quanto a sua capacidade de ação mutagênica estão o formaldeído, o triclosan e os parabenos.

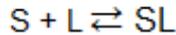
Atualmente é grande o número de medicamentos anti-câncer DNA-dirigidos, ou seja, que tem atividade diretamente na molécula de DNA, porém apresentam baixa seletividade e efeitos colaterais intensos, já que agem tanto no DNA de células mutagênicas quanto de células saudáveis. Além disso, o modo exato de ação para muitos destes compostos não é bem definida (He, Li et al. 2002). Por outro lado, cresce da mesma forma o questionamento quanto a segurança de produtos industrializados que já estão nas prateleiras, intensificado por descobertas que fizeram alguns produtos saírem do mercado (exemplo: o formaldeído em alisantes de cabelo).

Como resultado disso há um grande interesse econômico e social que faz crescer o número de pesquisadores e núcleos de pesquisa que trabalham neste sentido e visam a base molecular das interações

entre moléculas pequenas e DNA, com ênfase na natureza e intensidade da interação, sítio de ligação e especificidade estrutural.

1.3. Eletroforese capilar no estudo de interações com biomoléculas

Interações moleculares podem assumir estequiometrias $n:1$, onde n é um número inteiro limitado de acordo com os sítios de ligação. O sistema mais simples, $1:1$, é descrito pela equação química abaixo:



Assim, a constante de associação (K_{ass}), que é a medida da afinidade de um substrato S pelo seu local de ligação no ligante L , é definida pela Equação 1 (Armstrong e Jiang 2010).

$$K_{\text{ass}} = \frac{[SL]}{[S] + [L]} \quad (1)$$

onde $[SL]$, $[S]$ e $[L]$ correspondem a concentração no equilíbrio do complexo, do substrato livre e do ligante livre, respectivamente.

Além disso, a razão entre o substrato ligado e o total de substrato, r , pode ser expresso pela Equação 2 (Armstrong e Jiang 2010).

$$r = \frac{[SL]}{[S] + [SL]} = \frac{K_{\text{ass}} [L]}{1 + K_{\text{ass}} [L]} \quad (2)$$

A razão, r , pode ser substituída pela resposta experimental, R , quando o sistema de resposta é referente a resposta do substrato livre e do complexo. A Equação 2 pode ser então rearranjada e expressa como a isoterma de associação descrita na Equação 3 (Armstrong e Jiang 2010; El-Hady, Kuhne et al. 2010).

$$\frac{\Delta R}{\Delta R_{\text{max}}} = \frac{R - R_f}{R_c - R_f} = \frac{K_{\text{ass}} [L]}{1 + K_{\text{ass}} [L]} \quad (3)$$

onde R é o sistema de resposta, R_f e R_c são as respostas do ligante livre e do complexo. A mesma equação pode ser encontrada com outros rearranjos na literatura (Nilsson, Harang et al. 2004).

O sistema de resposta pode ser mudança de mobilidade em eletroforese capilar de afinidade (ACE), RMTR (razão relativa do tempo de migração) em ACE com preenchimento parcial (PF-ACE), fator de retenção, k , em cromatografia, deslocamento químico em RMN, mudança de absorvância em UV-vis, etc (Busch, Carels et al. 1997; Heegaard, Nilsson et al. 1998; Armstrong e Jiang 2010). Entretanto, esta mudança de resposta deve ser causada apenas pela associação entre o substrato e o ligante. Alguns sistemas de resposta de CE, como a mobilidade, pode ser afetada por outros fatores como viscosidade, força iônica e interação com a parede do capilar. Estes fatores devem ser eliminados ou quantificados de modo que a mobilidade possa ser corrigida (Armstrong e Jiang 2010).

A Equação 3 pode, então, ser rearranjada para as formas lineares descritas nas Equações 4, 5 e 6.

$$\frac{1}{\Delta R} = \frac{1}{\Delta R_{\max} K_{\text{ass}} [L]} + \frac{1}{\Delta R_{\max}} \quad (4)$$

$$\frac{[L]}{\Delta R} = \frac{1}{\Delta R_{\max} K_{\text{ass}}} + \frac{[L]}{\Delta R_{\max}} \quad (5)$$

$$\frac{\Delta R}{[L]} = -K_{\text{ass}} \Delta R + K_{\text{ass}} \Delta R_{\max} \quad (6)$$

Constantes de associação podem ser estimadas através das equações lineares recém descritas, bem como por ajuste dos dados experimentais para a isoterma de ligação não-linear (Equação 3) usando o ajuste dos mínimos quadrados (MMQ). As equações 4-6 foram ditas o *duplo*-recíproco, o *y*-recíproco e o *x*-recíproco, respectivamente. Na literatura é possível encontrar outros nomes: duplo recíproco é também chamado *Benesi-Hildebrand* em espectrofotometria e *Lineweaver-Burk*; o *x*-recíproco é conhecido como *Eadie plot* em cinéticas enzimáticas ou *Scatchard* em estudos de associação a proteínas. Embora as equações 4-6 sejam apenas rearranjos algébricos da Equação 3, os dados têm pesos diferentes e os resultados não produzem exatidão e precisão equivalentes (Armstrong e Jiang 2010; El-Hady, Kuhne et al. 2010). Todas as equações acima são relevantes para sistemas 1:1. Entretanto, sistemas biológicos, como interações com proteínas, geralmente apresentam múltiplos tipos de interação e múltiplos sítios de ligação. A

isoterma de ligação nestes casos pode ser expressa pela Equação 7 (Armstrong e Jiang 2010).

$$r = \sum_{j=1}^m \frac{n_j K_{ass,j}[L]}{1 + K_{ass,j}[L]} \quad (7)$$

onde m são os tipos de ligação, n o número de sítios para cada tipo de ligação e r é a razão de substrato ligado pela concentração total de substrato. Por outro lado, a análise dos dados por este modelo pode ser muito complicada e é preferível um conhecimento prévio da estequiometria de ligação para que se obtenham resultados mais próximos do real.

As constantes de associação também podem ser calculadas a partir de parâmetros cinéticos. Para a associação de substrato S e ligante L, a constante é igual a razão das constantes de velocidade k_1 e k_{-1} das reações direta e inversa, respectivamente. A CE também pode ser aplicada neste caso (Armstrong e Jiang 2010).

Embora muitos métodos como Ressonância Magnética Nuclear de H^1 (RMN H^1), Infra-Vermelho, Raman, espectrometria de massas, raio-X, fluorescência e voltametria cíclica, etc, tem sido utilizados para cálculos de constantes de associação e estudos de interações entre compostos e biomoléculas, a sua maioria exige experimentos laboriosos, demorados, e necessidade de grande quantidade de amostra (He, Li et al. 2002). A técnica de CE, por sua vez, apesar de ter sido iniciada com análise de proteínas (Tavares 1996), teve seus primeiros trabalhos publicados em análise de DNA apenas em 1988, e desde então sua aplicação tem crescido exponencialmente (Singhal, Otim et al. 1995; Fang, Zhang et al. 1996; Li, Dou et al. 2011). Muitos sistemas biomoleculares, como proteína-proteína, DNA-proteína, proteína-droga, proteína-açúcar, DNA-peptídeo, antígeno-anticorpo, etc, são estudados utilizando técnicas de CE (Heegaard e Schou 2006). As maiores vantagens estão na possibilidade dos experimentos serem realizados em solução aquosa (em análises com DNA, por exemplo, solventes orgânicos se ligam em regiões não polares do sulco menor além de afetarem a solubilidade de muitas proteínas), a simplicidade da técnica, baixo custo tanto da instrumentação quanto dos reagentes, permitir trabalhar em pH fisiológico, a amostra não precisar ser necessariamente pura e avançada automatização da instrumentação (Araya 2007; Yamamoto, Tamura et al. 2011).

Os métodos reportados por CE para a determinação das constantes de associação são subdivididos em três grupos, de acordo

com o sistema de resposta, que pode ser: altura do pico (método FA); área do pico (métodos VP e HD) e; mobilidade (métodos VACE, ACE e PF-ACE) (Busch, Carels et al. 1997; Heegaard, Nilsson et al. 1998; Armstrong e Jiang 2010).

A maioria dos trabalhos reportados foram estudos realizados com proteínas, porém os métodos se estendem para estudos bioquímicos com peptídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, etc. Os métodos citados são descritos a seguir:

FA – método por análise frontal: o capilar é preenchido com o tampão (eletrólito) e um grande plugue de amostra é injetado. A amostra consiste em substrato e proteína em equilíbrio, o que significa que o plugue irá conter substrato e proteína livres e ambos ligados. Assume-se que proteína e complexo droga-proteína tenham praticamente a mesma mobilidade. Uma limitação do método é que a mobilidade do composto livre deve ser suficientemente diferente da mobilidade da proteína. Neste caso trabalha-se com uma concentração fixa de proteína e varia-se a concentração de substrato. A altura do pico referente ao composto livre representa a concentração deste e pode ser obtida através de uma curva de calibração comum. Em FA requer que $\mu_L = \mu_C$ ou $\mu_S = \mu_C$, onde μ_L , μ_C e μ_S são as mobilidades da proteína, do complexo e do substrato, respectivamente (Busch, Carels et al. 1997; Ostergaard e Heegaard 2003; Armstrong e Jiang 2010).

VP – método por vacância de pico: o capilar é preenchido com eletrólito contendo ligante e substrato. A concentração de um deles é fixada, normalmente a de ligante, e a do outro componente, varia. Em seguida uma pequena quantidade do eletrólito é injetada e o eletroferograma apresenta três picos: de um marcador inerte, do complexo+proteína livre (negativo) e, do substrato livre (negativo). A quantidade de composto livre é obtida através de uma calibração interna das áreas dos picos. Uma série de amostras (tampão puro) aumentando a concentração do substrato é injetada. Quando a concentração do composto na amostra é alta, a área do pico muda de negativo para positivo. Uma interpolação permite calcular a concentração do substrato livre quando o pico negativo desaparece. Mensurando, portanto, a concentração do composto livre e sabendo-se a concentração total de proteína e de composto no eletrólito, é possível calcular a constante de associação (Busch, Carels et al. 1997; Armstrong e Jiang 2010).

HD - método de Hummel-Dreyer: o experimento é realizado preenchendo o capilar com eletrólito contendo concentrações variadas do substrato. Quando uma pequena quantidade de proteína é injetada,

têm-se um eletroferograma com o pico do marcador inerte, o pico da proteína livre + proteína ligada e, por fim, um pico negativo referente ao substrato livre. A área do pico negativo é diretamente relacionada à quantidade de substrato ligada à proteína. O número de substrato ligado por molécula de proteína é fixado pela concentração deste no tampão e, portanto, pode ser considerado constante durante a análise. A quantidade de substrato ligada pode ser quantificada a partir de uma calibração interna ou externa. Na calibração interna, trabalha-se com uma série de amostras com concentrações fixas de proteína e aumenta-se a concentração de substrato. Quando se aumenta a concentração de substrato injetada com a proteína, a área diminui, e quando estiver numa concentração suficientemente elevada, um pico positivo pode vir a aparecer. Para quantificação, uma interpolação é capaz de informar a quantidade presente de substrato ligado. Na calibração externa, a quantidade de substrato ligado é calculada a partir da diferença da área obtida após a injeção da amostra de proteína e através da área obtida quando o tampão sem substrato é injetado. Este método permite estudar o modelo de estequiometria, pois a concentração de substrato ligado é mensurada (Busch, Carels et al. 1997; Armstrong e Jiang 2010).

ACE – o procedimento experimental é exatamente igual ao método de HD, porém a formação do complexo é acompanhada pela mudança de mobilidade do substrato na presença de proteína. O método pode ser realizado a partir de dois princípios: A) a proteína é adicionada no eletrólito e o substrato é injetado, ou, B) o substrato é adicionado no eletrólito, e a proteína é injetada. Entretanto, quando proteína e complexo tem a mesma mobilidade, os experimentos podem ser realizados apenas com o princípio do modo A. No caso de um complexo 1:1 e quando todas as mobilidades diferem, ambos, A e B, podem ser empregados (Busch, Carels et al. 1997; Tanaka e Terabe 2002; Armstrong e Jiang 2010).

As equações que serão descritas a seguir são aplicadas para o primeiro caso (A) (que foi aplicado neste trabalho), porém, podem ser deduzidas também para o modo B.

Como em ACE o sistema de resposta é a mobilidade eletroforética, a Equação 8 (rearranjo da Equação 3) relaciona constante de dissociação (K_d) e mobilidade num sistema 1:1.

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_f + (\mu_c - \mu_f) \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (8)$$

onde μ_{eff} e μ_f são as mobilidades efetivas do substrato na presença e ausência de proteína, respectivamente, μ_c é a mobilidade do complexo formado, $[L]$ a concentração de proteína e K_d é a constante de dissociação, facilmente revertida para constante de associação ($1/K_d = K_{\text{ass}}$).

As mobilidades do substrato, na presença e na ausência de proteína no eletrólito, e a mobilidade do complexo formado estão relacionadas entre si pela Equação 9.

$$\mu_{\text{eff}} = (1 - \beta)\mu_c + \beta\mu_f \quad (9)$$

onde beta (β) representa a razão entre a concentração de substrato livre e ligado e pode ser expresso pela Equação 10.

$$\beta = \frac{F}{T} = \frac{\mu_{\text{eff}} - \mu_f}{\mu_c - \mu_f} = \frac{[D_f]}{[D_{\text{total}}]} \quad (10)$$

onde F e $[D_f]$ refletem a concentração de substrato livre e T e $[D_{\text{total}}]$ a concentração total de substrato. Geralmente a mobilidade do complexo não é conhecida e μ_c é substituída nas por $\mu_{\text{máx}}$, que é a mobilidade máxima do substrato observada quando a concentração de proteína no eletrólito é alta.

Se a mobilidade do substrato livre e do complexo for a mesma, $\mu_f = \mu_c$, então nenhuma mudança na mobilidade é observada e, portanto o método não pode ser usado desta forma. Neste caso, é possível aplicar o método B: adicionar substrato no eletrólito e injetar proteína (Busch, Carels et al. 1997).

Em muitos casos a interação substrato-ligante não é descrita por uma estequiometria 1:1. As complicações envolvem dois aspectos: diferentes valores de K_{ass} e a ligação de mais de um composto no mesmo sítio, n . Com o método de ACE a ocorrência de múltiplos valores de K_{ass} leva a dificuldades. O ponto é que não há, em geral, nenhum mapeamento linear sobre a mobilidade média observada de, por exemplo, proteína, sobre o valor de r . Isto só poderia ser aplicado quando a mudança na mobilidade com o aumento da complexação ($P \rightarrow PD \rightarrow PD_2$) fosse proporcional ao número de associações. Este modelo, no entanto, descreve apenas a conversão de uma forma de μ_f para a outra de μ_c ou $\mu_{\text{máx}}$. Quando não se tem informação quanto a magnitude do valor de n , não é possível encontrar o valor absoluto de r , mesmo

quando o limite da mobilidade (para a conversão total para PD₂) é conhecido. Outra desvantagem é que em ACE não é possível obter a concentração de substrato livre, nem pode esta ser derivada de outras medidas feitas por ACE e esta informação é necessária para poder construir uma isoterma de ligação correta (Busch, Carels et al. 1997; Heegaard, Nilsson et al. 1998; Heegaard e Schou 2006; Armstrong e Jiang 2010).

Para muitos sistemas utilizando ACE, $\mu_{\text{máx}}$ geralmente não pode ser mensurado, devido limitações experimentais, porém uma regressão não-linear, da mobilidade da proteína na presença de diferentes concentrações de substrato (μ_{eff}) versus a concentração de substrato no eletrólito, permite estimar o valor de K_{ass} sem conhecer $\mu_{\text{máx}}$, e, então, é possível estimar simultaneamente as duas incógnitas (Armstrong e Jiang 2010).

Quando há interação em mais de um sítio, o valor da constante de associação obtido é um valor médio entre todas as constantes (Jun, Luzzi et al. 1972).

VACE – método de eletroforese capilar de afinidade por vacância: o procedimento experimental é idêntico ao método VP, porém aqui a mudança no tempo de migração do pico negativo é usada para mensurar a quantidade de ligação. O tratamento dos dados é análogo ao método por ACE e, da mesma forma, com VACE, a concentração de analito livre não pode ser conhecida, podendo acarretar um erro sistemático de K_{ass} (Busch, Carels et al. 1997; Armstrong e Jiang 2010).

De maneira geral, os métodos HD, VP, FA e VACE podem trazer informações quanto aos sítios de ligação e constante de associação, enquanto por ACE, é obtida apenas a constante de associação. Os métodos, na verdade, são considerados complementares mais do que competitivos, pois cada um exhibe extensão específica de aplicabilidade, limitações, vantagens e desvantagens (Busch, Carels et al. 1997; Armstrong e Jiang 2010).

PF-ACE (*partial filling*) – método por preenchimento parcial: o método mais recentemente reportado por CE é, na verdade, uma variação do método de ACE. Envolve o preenchimento parcial do capilar com solução do ligante (também chamado de receptor em alguns artigos), e pode ser variada tanto a concentração do receptor quanto o tamanho do plugue. O método permite, injeções múltiplas (MIPF-ACE), porém apresenta limitações quanto a natureza do substrato e do receptor, devido a sobreposição indesejada de plugues. Além disso, há desvantagens quanto ao número de injeções. Quando se trabalha com

condições experimentais já limitadas (como quando se quer mimetizar as condições biológicas de onde de fato ocorre a interação em estudo e, em especial quando se trabalha com moléculas complexas como macromoléculas), a MIACE apresenta-se ainda mais limitada, exigindo um planejamento e otimização do método bastante exigente e peculiar (aplicável para aquele receptor e para aquele ligante, somente) (Gomez e Zhang 2000; Zavaleta, Chinchilla et al. 2007).

Em PF-ACE a interação ocorre quando a tensão é aplicada. Durante a eletroforese, o substrato migra através do plugue do receptor (proteína ou DNA, no caso), e ambos ficam disponíveis um ao outro. Neste caso é necessária uma maior concentração de receptor se comparado com o clássico por ACE, pois o tamanho do plugue é geralmente muito menor quando comparado com o tamanho total do capilar (Nilsson, Harang et al. 2004; Heegaard e Schou 2006; Armstrong e Jiang 2010).

Em PF-ACE, após a eletroforese, o tempo de migração do substrato é monitorado e, na maioria dos estudos reportados, os dados são tratados de maneira análoga à ACE, utilizando valores de mobilidade como sistema de resposta nas equações 3-6 para associações 1:1 (Armstrong e Jiang 2010).

Em 2004, foi proposto foi Nilsson e colaboradores, um novo modelo matemático para cálculos de constante de associação por PF-ACE (Nilsson, Harang et al. 2004). A relação entre os parâmetros e a constante de dissociação do complexo formado é descrita na Equação 11.

$$\frac{1}{K_d} = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot l_{\text{det}}}{t_{0,\text{det}}} \cdot \frac{d\Delta t}{dn} \quad (11)$$

onde r é o raio interno do capilar, l_{det} é a distância do substrato até o detector, $t_{0,\text{det}}$ o tempo de migração do substrato livre de proteína, n o número de mol de proteína e Δt é diferença entre os tempos de migração do substrato na presença e ausência de proteína.

A proposta foi fundamentada na idéia de que o monitoramento da razão do tempo de migração em PF-ACE deve ser feito considerando o tempo em que o substrato passa através do plugue do receptor e para isso é necessário além da razão relativa do tempo de migração (RMTR), o diâmetro interno do capilar e a quantidade absoluta de proteína injetada.

1.4. Adsorção de proteínas em superfícies de sílica e a modificação interna de capilares em CE

A adsorção de proteínas e peptídeos é um fato quase sempre presente em análises desta natureza por eletroforese capilar, principalmente devido a progressiva ionização do silanol em qualquer valor de pH acima de 2,5 (Castelletti, Verzola et al. 2000; Verzola, Gelfi et al. 2000). Muitos estudos buscam minimizar este fenômeno, incluindo o uso de pHs extremos, força iônica elevada e aditivos zwitteriônicos, entretanto a opção mais estudada tem sido o revestimento interno do capilar, já que as duas primeiras alternativas apresentam-se bastante limitadoras. Os revestimentos podem ser classificados como poliméricos covalentemente ligados, poliméricos fisicamente adsorvidos, ou aditivos de moléculas pequenas (Lucy, MacDonald et al. 2008).

Os revestimentos poliméricos covalentemente ligados apresentam melhores desempenhos devido a alta estabilidade da ligação formada na parede do capilar, como é o caso das quitosanas quaternizadas (Lucy, MacDonald et al. 2008), porém este tipo de tratamento exige procedimentos laboriosos. Assim, entre protocolos de modificação da superfície, parece particularmente atraente o procedimento do chamado “revestimento dinâmico”, ou seja, compostos que podem interagir de forma transitória com a parede, por um mecanismo de adsorção, uma vez que não necessitam de tratamentos químicos complexos na superfície de sílica (Castelletti, Verzola et al. 2000; Verzola, Gelfi et al. 2000). Este último procedimento segue o mesmo princípio dos tratamentos comuns utilizados em eletroforese capilar para inversão e retardamento do EOF com surfactantes como brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) e moléculas pequenas como hexano-1,6(bis)trimetilamônio (HMB - descrito anteriormente no desenvolvimento do método apresentado no Capítulo 1, para determinação de parabenos).

A adsorção de proteína diminui o potencial zeta da superfície interna do capilar, causando alterações no fluxo eletrosmótico que agrega baixa repetibilidade entre as corridas e erros nas leituras dos dados.

Um modelo realista simplificado da adsorção de proteínas em superfícies sólidas não porosas é descrito na Figura 3.

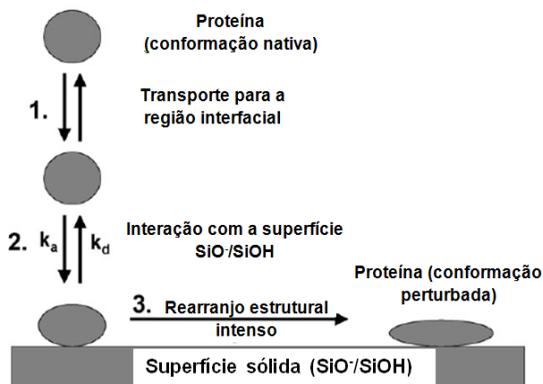


Figura 3 Esquema simplificado da adsorção de proteínas em superfícies sólidas não porosas retirado da referência (Lucy, MacDonald et al. 2008).

A primeira etapa (1) consiste no transporte da proteína para a superfície. A segunda (2) envolve a interação e ligação da proteína na superfície e pode envolver uma perturbação estrutural da mesma. Esta etapa é reversível e pode ocorrer a dessorção de proteína. Alternadamente a proteína adsorvida pode relaxar para suas conformações *steady-state* que retida na superfície é irreversível (etapa 3). As etapas 2 e 3 são essencialmente controladas por forças coulômbicas e de hidratação entre a proteína e a superfície, mas também incluem interações com a água, com outras proteínas adsorvidas e com os componentes do eletrólito na região interfacial (Lucy, MacDonald et al. 2008).

A principal contribuição para adsorção de proteínas em uma superfície lisa e rígida se origina a partir de interações eletrostáticas entre a proteína e a superfície, alterações no estado de hidratação da superfície do adsorvente e de partes da molécula de proteína e, de arranjos estruturais na proteína (Norde e Giacomelli 2000). Segundo Norde e Haynes (Norde e Haynes 1995), as principais forças motrizes para a adsorção de proteínas são eletrostáticas e hidrofóbicas, assim como mudanças estruturais da proteína. Proteínas globulares com elevada estabilidade interna, como a lisozima, muito pouco adsorve em superfícies hidrofílicas, a menos que haja interação eletrostática. Já proteínas globulares como albuminas do soro bovino (BSA) e humano (HSA), imunoglobulina, caseína e hemoglobina, conhecidas como proteínas “macias”, pois apresentam baixa estabilidade interna, tendem a adsorver em todas as superfícies independentemente de interações eletrostáticas, isto devido a um ganho na entropia

conformacional resultante da adsorção (Lucy, MacDonald et al. 2008). Assim, proteínas macias adsorvem mesmo em um sistema em que são eletrostaticamente repelidas da superfície, podendo ser observadas, quando em soluções aquosas, em toda a faixa de pH.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Aplicar a técnica de eletroforese capilar para estudos de interação e determinação das constantes de associação entre parabenos e albumina do soro bovino (BSA) bem como para estudos de interação com DNA.

2.2. Específicos

- Modificar a superfície do capilar para as análises com BSA utilizando a própria proteína;
- Estudar a influência da modificação interna do capilar através de cálculos das mobilidade do fluxo eletrosmótico (EOF) nas condições estudadas;
- Desenvolver um método para determinação simultânea das constantes de associação (K_{ass}) entre metil, etil, propil e butilparabeno a partir do método clássico de eletroforese capilar de afinidade (ACE);
- Aplicar e comparar diferentes modelos matemáticos (linear e não-linear) nos cálculos das K_{ass} entre os parabenos e BSA;
- Aplicar um segundo método com preenchimento parcial do capilar (*PF-ACE*) para determinação destas K_{ass} , individualmente;
- Observar a relação estrutura/atividade;
- Aplicar os métodos *PF-ACE* e, outro, *offline* para analisar possível interação entre os parabenos e DNA;
- Utilizar o software Peakmaster[®] para simulações;
- Comparar os resultados obtidos com reportados na literatura.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

Para todos os experimentos foi utilizado um equipamento de eletroforese capilar modelo HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Palo Alto, E.U.A) equipado com detector de arranjo de diodos.

Quando necessária ultrafiltração foi utilizada membrana de celulose regenerada Microcon 10.000 NMWL (Millipore Corporation, E.U.A) e uma centrífuga Eppendorf Mini Spin plus.

3.2. Reagentes e Soluções

Como reagentes foram utilizados padrões analíticos de albumina do soro bovino (BSA), metil (MP), etil (EP) , propil (PP) e butilparabeno (BP) adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Hidrogeno fosfato monossódico e dissódico, hidróxido de sódio da Tedia Brasil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Como solventes, metanol e acetona comprados da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água deionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A). O DNA é de célula de rim de embrião de Macaco-rhesus (linhagem FRhK-4), adquirido do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC.

3.3. Soluções padrão

O eletrólito de corrida foi preparado com $\text{Na}_2\text{PO}_4^{3-}$ e NaHPO_4^{3-} de forma a obter uma solução com 30 mmol L^{-1} de fosfato e 50 mmol L^{-1} de íons sódio.

Soluções estoque dos padrões de metil, etil, propil e butilparabeno foram preparadas individualmente pela dissolução de 25 mg em 25 mL de metanol/água 80/20 (a mesma utilizada para o desenvolvimento do método descrito no Capítulo 1).

A partir das soluções estoque, foi preparada para as análises uma solução diluída em eletrólito de corrida com aproximadamente $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada analito, diluídos individualmente e em conjunto. A solução de BSA foi preparada com cerca de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA também em eletrólito. Esta precisou ser preparada logo antes das análises, pois apresentou turbidez após menos de uma semana mantida refrigerada em aproximadamente $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (geladeira comum).

Para os experimentos com o DNA foram preparadas soluções contendo 150 e 15 ng μL^{-1} do mesmo, provenientes de um estoque de 30 μL de solução aquosa contendo 150 ng μL^{-1} de DNA. Apenas o propilparabeno foi utilizado nesta etapa do trabalho, numa solução aproximadamente 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Para evitar alterações indesejadas durante os experimentos, antes de desenvolver os métodos para os estudos de interação parabeno-BSA, optou-se por um procedimento de modificação dinâmica do capilar. A partir do próximo item, então, o capítulo 2 será subdividido em três itens: 4) modificação da superfície interna do capilar com BSA; 5) estudo de interação entre os parabenos e BSA, e os cálculos das constantes de associação (K_{ass}) e; 6) estudos de interação com o DNA.

4. MODIFICAÇÃO DO CAPILAR COM ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA)

4.1. Demais parâmetros eletroforéticos e procedimento experimental

Para os experimentos foi utilizado capilar de sílica fundida de 32 cm de comprimento (efetivo 23 cm) x 50 μm de diâmetro interno (d.i.), à 36,5 $^{\circ}\text{C}$, e os dados obtidos em 260 nm (comprimento de absorção máxima da acetona, utilizada como marcador do EOF).

Para modificação dinâmica da superfície foram feitas sucessivas lavagens com solução de BSA em eletrólito de corrida, (30 mmol L^{-1} de PO_4^{3-} , 50 mmol L^{-1} de Na^+ , 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA), e observado o efeito deste fenômeno na mobilidade do fluxo eletrosmótico.

As medidas de mobilidade foram realizadas a cada intervalo de tempo de contato entre a superfície e a proteína utilizado o método proposto por Williams e Vigh (Williams e Vigh 1996). Os parâmetros do método são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Parâmetros utilizados para determinação da mobilidade efetiva do EOF antes e após o tratamento com solução de BSA

Parâmetros	Pré-lavagem com BSA	Pós-lavagem com BSA	Pós lavagem 10 min NaOH + 10 min H_2O + 10 min BGE
t_{inj} (s)	3	3	3
t_{d} (s)	2	2	2
t_{migr} (s)	15	15	15
$t_{\text{ramp-up}}$ (s)	2	2	2
$t_{\text{ramp-down}}$ (s)	1	1	1
V_{prog} (kV)	15	15	15
L_{tot} (cm)	32	32	32
L_{d} (cm)	23,5	23,5	23,5
t_{N1} (min)	1,72	1,97-2,02	1,69
t_{N2} (min)	2,09	2,34-2,39	2,05
t_{N3} (min)	2,88	2,84-2,95	2,82

Legenda: BSA, albumina do soro bovino; BGE, eletrólito de corrida; t_{inj} , tempo de injeção; t_{d} , tempo de resposta do equipamento para o início da operação; t_{migr} , tempo de migração; t_{ramp} , rampa de voltagem; V_{prog} , potencial aplicado; L_{tot} , comprimento total do capilar; L_{d} , comprimento entre a extremidade de injeção e o detector; t_{N1} , t_{N2} e t_{N3} , tempo de injeção do marcador neutro da primeira, segunda e terceira injeção, respectivamente.

4.2. Resultados e Discussão

A Figura 4 apresenta o gráfico da mobilidade do EOF versus tempo de contato entre a proteína e a superfície do capilar.

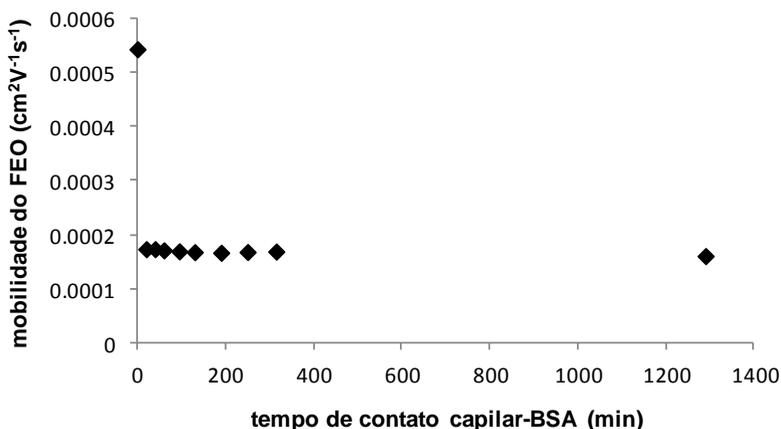


Figura 4 Gráfico da variação do fluxo eletrosmótico (EOF) antes e após o tratamento do capilar com albumina do soro bovino (BSA). Condições: capilar 32 cm de comprimento, 23,5 cm de tamanho efetivo, 50 μm d.i., eletrólito 30 $\text{mmol L}^{-1} \text{PO}_4^{3-}$, 50 $\text{mmol L}^{-1} \text{Na}^+$, pH 7,3.

O que se observa é uma alteração de cerca de 3 vezes o valor do EOF gerado pela superfície após a saturação. Além disto, observou-se que isto ocorre já nos primeiros minutos de lavagem, mantendo-se praticamente constante ao longo do tratamento. No entanto, a lavagem do capilar com $\text{NaOH } 1\text{mol L}^{-1}$, seguido por água e BGE, comumente empregada nos experimentos de eletroforese, faz com que a superfície interna do capilar retorne a sua condição pré-tratamento. Já a lavagem com água e/ou BGE é capaz de manter a condição de saturação da superfície com BSA. Os valores de mobilidade antes e depois do tratamento foi $54,4 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ e $16,8 \times 10^{-5} \pm 3,91 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Após a lavagem do capilar com NaOH , a mobilidade do EOF foi novamente determinada, e observou-se próxima a mobilidade apresentada antes do tratamento ($53,1 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$).

Esta mudança intensa nas mobilidades dos EOF mesmo em condições desfavoráveis eletrostaticamente (pH da análise maior que o pI da BSA), pode ser explicada devido a um ganho na entropia

conformacional resultante da adsorção de proteínas globulares de baixa estabilidade interna (Lucy, MacDonald et al. 2008).

Alguns parâmetros físico-químicos da BSA e do sistema utilizado para modificação do capilar estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 Propriedades físico-químicas da BSA e composição da solução de lavagem utilizada no procedimento de modificação do capilar

Proteína ^a	BSA
Massa Molar ^a (g mol ⁻¹)	67000
Ponto isoelétrico (unidades de pH) ^a	4,7
Características conformacionais	Alto grau de estrutura secundária; baixa estabilidade térmica
Solução de lavagem	30 mmol L ⁻¹ PO ₄ ³⁻ , 50 mmol L ⁻¹ Na ⁺ , 500 µmol L ⁻¹ BSA

^a Adaptado da referência (Norde e Giacomelli 2000). Legenda: BSA, albumina do soro bovino.

Apesar da modificação interna do capilar ter sido mantida pelos próximos dias após o tratamento, achou-se apropriado para os experimentos de interação pré-condicionar o capilar durante 20 minutos com eletrólito de corrida contendo 500 µmol L⁻¹ de BSA (10 minutos de lavagem, contato dinâmico + 10 minutos de contato estático), seguido por 5 minutos de água e 10 minutos de eletrólito isento de BSA, no início de cada dia de experimento. Para conservar a condição, NaOH não foi utilizado nas lavagens aos longos dos dias. No final dos dias de experimento a lavagem foi feita apenas com água, durante 10 minutos.

O procedimento empregado foi considerado interessante para o propósito das metodologias envolvidas, não havendo necessidade de tratamentos químicos complexos nem de outros reagentes como surfactantes e polímeros sintéticos. A solução de BSA utilizada para a lavagem foi a mesma utilizada nos experimentos.

5. ESTUDO DE INTERAÇÃO E CÁLCULOS DAS CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO (K_{ass}) ENTRE OS PARABENOS BSA

5.1. Condições eletroforéticas

Para os experimentos foi utilizado capilar de sílica fundida com 32 cm de comprimento, 8,5 cm de tamanho efetivo, 50 μm d.i. e 375 μm d.e, com superfície interna modificada conforme descrito no item 4.. A resposta foi acompanhada em 270 nm, e a temperatura do cartucho foi mantida a 36,5 °C. Os dados foram tratados com o software HP Chemstation. Para todas as análises foi utilizado eletrólito base com 30 mmol L^{-1} de PO_4^- e 50 mmol L^{-1} de Na^+ , pH 7,3.

Para os experimentos realizados pelo método 1 foi feito um pré-condicionamento no início de cada dia de análise lavando o capilar durante 20 minutos com eletrólito de corrida contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA (10 minutos de lavagem, contato dinâmico + 10 minutos de contato estático), seguido por 5 minutos de água e 10 minutos de eletrólito isento de BSA, no início de cada dia de experimento. Entre as corridas o capilar foi lavado com eletrólito de corrida por um minuto.

Já os experimentos realizados pelo método 2, as dimensões do capilar, o comprimento de onda de obtenção dos dados, a composição eletrolítica e a temperatura, foram mantidos, porém foi utilizado capilar de sílica não modificado e por isso o tratamento realizado antes de cada dia de análise envolveu a lavagem por 10 minutos com NaOH, seguido por 5 minutos com água e 10 minutos com BGE.

5.2. Escolha do eletrólito de corrida

As condições experimentais foram escolhidas de forma a mimetizar o sistema biológico no qual a interação estudada ocorre naturalmente – meio plasmático. Para isto o eletrólito de corrida foi composto por 30 mmol L^{-1} de fosfato e 50 mmol L^{-1} de sódio fornecendo condições tampão semelhantes ao tampão sanguíneo (pH em torno de 7,4). Os parâmetros físico-químicos do eletrólito estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Parâmetros físico-químicos do eletrólito de corrida^a

Eletrólito de corrida 30 mmol L ⁻¹ de PO ₄ ³⁻ e 50 mmol L ⁻¹ de Na ⁺	
pH	7,30
Força iônica (mmol L ⁻¹)	70,0
Condutividade (S m ⁻¹)	0,400
Resistividade (Ohm)	2,50
Capacidade Tamponante (mmol L ⁻¹)	15,8

^a Dados obtidos do software Peakmaster[®]

As concentrações dos constituintes e a proporção fosfato/sódio foram escolhidas de maneira a fornecer, além do pH ~ 7,3, uma força iônica elevada para auxiliar na simulação de condições biológicas. Porém há desvantagens em se trabalhar com eletrólitos de alta força iônica em eletroforese devido a geração de calor no interior do capilar, fenômeno conhecido por efeito Joule (Tavares 1996). O aumento da temperatura é um dos fatores que influenciam este fenômeno, além da força iônica e outros parâmetros, então foi acompanhada a corrente gerada pela aplicação de voltagens que variaram entre 1,0 e 25 kV, em temperaturas de 25 e 36,5 °C, num capilar de 32 cm de comprimento e 50 µm de diâmetro interno. Os gráficos de corrente (i) versus tensão (V) para estes sistemas estão apresentados na Figura 5.

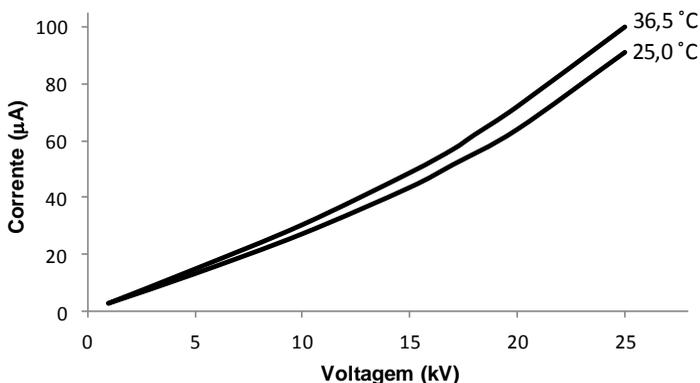


Figura 5 Gráficos da voltagem aplicada *versus* corrente gerada no interior de um capilar com dimensões 32 cm x 50 µm d.i, tamanho efetivo 8,5 cm, preenchido com eletrólito composto por 30 mmol L⁻¹ de PO₄³⁻ e 50 mmol L⁻¹ de Na⁺, pH = 7,3, e termostatizado à 25 °C e 36,5 °C.

De fato, a quantidade de íons, principalmente Na^+ , limitam a aplicação de voltagens elevadas em ambos os sistemas (25 °C e 36,5 °C). O aumento da temperatura manteve o perfil, porém, como o esperado, houve acréscimo na geração de corrente quando uma mesma tensão foi aplicada e um desvio da lei de Ohm pode ser observado.

5.3. Aplicação do método por ACE (método 1) para determinação das constantes de associação (K_{ass}) parabeno-BSA

5.3.1. Escolha dos demais parâmetros eletroforéticos

O primeiro método (que será abordado como método 1) aplicado para a determinação das constantes de associação entre os parabenos e BSA foi baseado nos métodos publicados por ACE, como descrito no ítem 1 deste capítulo:

Foram preparados eletrólitos de corrida (30 mmol L^{-1} de PO_4^{3-} e 50 mmol L^{-1} de Na^+ , pH 7,3) contendo concentrações de BSA que variaram entre 0 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e uma solução contendo cerca de 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada parabeno (metil, etil, propil e butil) dissolvidos em eletrólito isentos de proteína.

Como descrito anteriormente, no início de cada dia de experimento o capilar foi lavado por 10 minutos com solução eletrolítica contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA, seguido por 5 minutos de água e 10 minutos de eletrólito ausente de proteína. Durante as corridas, o capilar foi lavado por um minuto, apenas, com o eletrólito contendo a concentração de proteína desejada (0-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$), garantindo o preenchimento total. Preenchido o capilar, a solução contendo os parabenos foi injetada hidrodinamicamente por 3s à uma pressão de 50 mbar na extremidade mais curta do capilar (8,5 cm até o detector). As condições de injeção foram baseadas nos resultados apresentados por Jun (Jun, Luzzi et al. 1972), que estudou os efeitos da injeção (por aplicação de voltagem – eletrocinética; ou pressão – hidrodinâmica), concluindo que não há uma mudança significativa, porém os sinais apresentaram-se mais intensos quando aplicada injeção hidrodinâmica. Esta diferença foi atribuída a distinção de migração das espécies quando utiliza-se injeção eletrocinética e, por este motivo, recomenda-se o uso de injeção hidrodinâmica em experimentos por ACE.

A escolha da tensão de 17 kV aplicada para a corrida eletroforética, foi baseada na influência da adição de BSA no eletrólito e no comportamento observado no gráfico ohmico apresentado na Figura 5 à 36,5 °C. Os parâmetros experimentais do método 1 são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 Parâmetros experimentais do método 1 aplicado para estudo das interações parabenos-BSA

Parâmetros	Condições
Eletrólito	30 mmol L ⁻¹ de PO ₄ ³⁻ , 50 mmol L ⁻¹ de Na ⁺ e [BSA] entre 0-300 µmol L ⁻¹ , pH 7,3
Dimensões do capilar	32 cm x 50 µm d.i
Comprimento até o detector	8,5 cm
Voltagem aplicada	17 kV
Amostra	MP, EP, PP e BP ~ 250 µmol L ⁻¹ de cada em solução eletrolítica
Injeção	Hidrodinâmica; 3s/50mbar; polaridade positiva
Pré-condicionamento	1 minuto com eletrólito de corrida

Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

Durante as análises foi observada a formação do complexo parabeno-BSA devida a mudança na mobilidade dos parabenos livres quando em contato com diferentes concentrações de proteína. A proteína, apesar da carga elevada, apresenta massa molar de aproximadamente 67000 g mol⁻¹ (Norde e Giacomelli 2000) e sua mobilidade é bastante reduzida com relação a mobilidade dos parabenos. O que quer dizer que quando o parabeno é “adicionado” a estrutura da proteína na formação do complexo parabeno-BSA, a mobilidade do complexo formado é muito mais próxima da mobilidade da proteína que do composto livre. Neste caso, não é possível perceber alterações na mobilidade da proteína e, por isso, foi acompanhado os picos de resposta referentes aos parabenos.

5.3.2. Resultados e Discussão

Obtidos os tempos de migração do fluxo eletrosmótico e dos analitos (parabenos) em cada corrida eletroforética, foram calculadas as mobilidades efetivas (μ_{eff}) de cada um deles na presença e ausência de BSA no eletrólito utilizando a Equação 11 (Tavares 1996).

$$\mu_{\text{eff}} = \left(\frac{1}{t_A} - \frac{1}{t_{\text{EOf}}} \right) \frac{L_{\text{tot}} L_{\text{det}}}{V} \quad (11)$$

onde t_A e t_{EOf} são os tempos de migração do analito e do fluxo eletrosmótico, respectivamente. L_{tot} , L_{det} , os comprimentos total e efetivo do capilar e V a voltagem aplicada. O termo que envolve estes últimos três parâmetros é constante e igual a $0,016 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1}$ neste caso.

Com estes dados e com as concentrações de proteína que foram adicionadas em cada eletrólito foi possível estimar a constante de associação a partir das equações descritas na revisão bibliográfica e sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6 Modelos matemáticos utilizados para determinação de constantes de associação (K_{ass}) de estequiometria 1:1 aplicados em ACE (Armstrong e Jiang 2010; El-Hady, Kuhne et al. 2010)

	Equações	Modelo
3	$\frac{\Delta R}{\Delta R_{\text{max}}} = \frac{R - R_f}{R_C - R_f} = \frac{K_{\text{ass}} [L]}{1 + K_{\text{ass}} [L]}$	Não-linear
4	$\frac{1}{\Delta R} = \frac{1}{\Delta R_{\text{max}} K_{\text{ass}} [L]} + \frac{1}{\Delta R_{\text{max}}}$	Linear Duplo-recíproco
5	$\frac{[L]}{\Delta R} = \frac{1}{\Delta R_{\text{max}} K_{\text{ass}}} + \frac{[L]}{\Delta R_{\text{max}}}$	Linear y-recíproco
6	$\frac{\Delta R}{[L]} = -K_{\text{ass}} \Delta R + K_{\text{ass}} \Delta R_{\text{max}}$	Linear x-recíproco

Legenda: R , R_C e R_f são as mobilidades efetivas do composto na presença de uma determinada concentração de ligante (μ_{eff}), do complexo formado (μ_c) e do composto na ausência de ligante (μ_f), respectivamente.

Na Tabela 6, $[L]$ é a concentração de proteína (ligante) e K_{ass} é a constante de associação. R , R_f e R_C correspondem a mobilidade efetiva do composto na presença e na ausência (o subscrito f é do termo *free* - livre) de proteína e a mobilidade do complexo formado.

Os dados obtidos nos experimentos nesta etapa do trabalho foram tratados pelo modelo linear do duplo-recíproco (Equação 4) e pelo modelo não-linear da isoterma de ligação (Equação 3). Os resultados de ambos serão apresentados nos próximos tópicos.

5.3.2.1. Tratamento dos dados com o modelo linear do duplo-recíproco

Com o modelo linear do duplo-recíproco obtém-se a constante de associação a partir dos coeficientes linear e angular da curva regida pela Equação 4 que, para melhor visualização, é novamente exposta no trabalho.

$$\frac{1}{\Delta R} = \frac{1}{\Delta R_{\max} K_{\text{ass}} [L]} + \frac{1}{\Delta R_{\max}} \quad (4)$$

Sabendo-se que no método por ACE, ΔR é igual a $\mu_{\text{eff}} - \mu_f$, e que neste caso específico $[L]$ é igual a $[BSA]$, foi construído um gráfico de $1/(\mu_{\text{eff,P}} - \mu_{\text{eff,0}})$ versus $1/[BSA]$ de experimentos realizados em duplicata ($n = 18$). Não serão expostos aqui todos os gráficos obtidos em todas as réplicas, mas a Figura 6 expõe o perfil apresentado pelos quatro compostos em uma delas (réplica 1) e a discussão estendida.

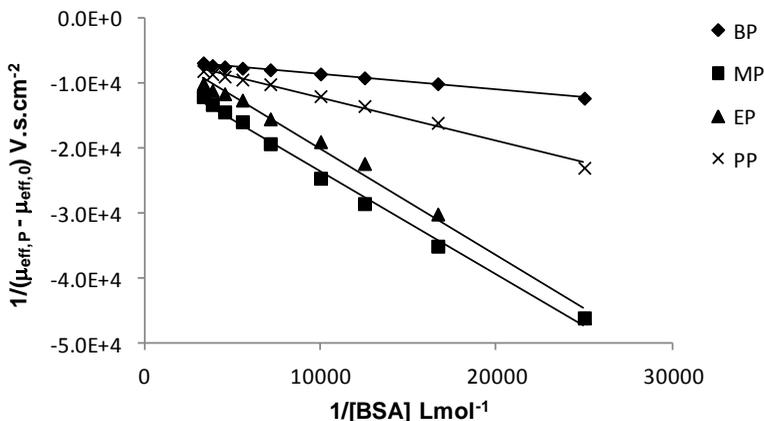


Figura 6 Gráfico obtido a partir do modelo linear do duplo recíproco para o metil, etil, propil e butilparabeno. Condições: aproximadamente $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada analito e concentrações de BSA que variaram entre 0 e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

Os coeficientes angulares e lineares correspondentes às retas apresentadas na Figura 6, seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e os valores de K_{ass} são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Coeficientes angulares e lineares correspondentes as curvas $1/(\mu_{\text{eff}} - \mu_i)$ versus $1/[\text{BSA}]$, seus respectivos coeficientes de determinação (R^2), valores de K_d e K_{ass} para cada sistema parabeno-BSA

	a	b	R^2	$K_d (a/b)$ ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)	$K_{\text{ass}} (1/K_d)$ (L mol^{-1})
MP	-1,5995	-7488,5	0,9941	2,14	4672,9
EP	-1,6341	-3711,0	0,9913	4,40	2272,7
PP	-0,6671	-5592,9	0,9913	1,19	8403,4
BP	-0,2379	-6196,5	0,9951	0,384	26041

Legenda: a e b são os coeficientes linear e angular, respectivamente; R^2 , coeficiente de determinação; K_{ass} e K_d as constantes de associação e dissociação; MP, metilparabeno, EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

O perfil apresentado pelos dados da Tabela 7 não corresponde ao perfil apresentado pelas três réplicas, que logo serão abordados. No entanto, foi escolhido como exemplo, pois o que se vê são bons coeficientes de determinação (R^2 – que aqui será abordado como único parâmetro de linearidade) em todas as retas obtidas (com 9 pontos para todos os sistemas), porém o que ocorre é um perfil irreal na ordem crescente de K_{ass} . Como já descrito, e esperado, as K_{ass} aumentam de acordo com o aumento da cadeia carbônica lateral ligada ao grupo éster e, neste caso específico, K_{ass} obtido para o composto MP é praticamente o dobro do obtido para o composto EP.

A Tabela 8, seguinte, apresenta o valor médio obtido para as três réplicas, com tratamento a partir do modelo linear do duplo recíproco.

Tabela 8 Valores de constante de associação entre os parabenos e BSA utilizando o modelo linear do duplo recíproco

Réplica	$K_{\text{ass}} (\text{L mol}^{-1})$				
	Faixa [BSA] $\mu\text{mol L}^{-1}$	MP	EP	PP	BP
1	n = 18 0-300	4672,9	2272,7	8403,4	26041
2	n = 12 0-150	4552,0	1397,6	4905,8	18914
3	n = 18 0-300	3879,7	4971,9	10547	16439
média		4368,2	2880,7	7952,1	20465
CV%		9,8	64,7	35,8	24,4

Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno, K_{ass} , constante de associação.

Como observado na Tabela 8 o maior problema se deu entre os compostos MP e EP. Apenas a réplica 3 apresentou um perfil crescente dos valores K_{ass} de acordo com o esperado, porém, uma observação relevante foi feita com o tratamento dos dados a partir deste modelo linear: em alguns casos pontos de maior ou de menor concentração de BSA diminuíram a linearidade das curvas, e nem sempre a linearidade pôde ser atribuída aos resultados mais satisfatórios. Isto gera limitações e erros de leitura, principalmente quando não se tem conhecimento do perfil que deve ser apresentado pelo composto que é, na verdade, a utilidade dos métodos utilizados em estudos de interação, como por exemplo, em desenvolvimentos de um fármacos.

5.3.2.2. Tratamento dos dados com modelo não-linear

Com este modelo, as constantes de associação foram calculadas a partir da Equação 8, descrita novamente abaixo.

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_f + (\mu_c - \mu_f) \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (8)$$

Neste trabalho μ_c foi determinado como sendo a mobilidade máxima do substrato em altas concentrações de proteína (μ_{max}). Como descrito anteriormente um modelo não linear permite a obtenção de K_{ass} (ou K_d) tendo desconhecido o valor de μ_{max} e, mais do que isso, ambos podem ser determinados quando há x variações na concentração de proteína (Armstrong e Jiang 2010). Portanto, os dados de um sistema com x equações e 2 incógnitas foram tratados o *software* Excel com o aplicativo Solver. A Figura 7 apresenta os gráficos de $(\mu_{\text{eff}} - \mu_f)$ versus [BSA] obtidos com os dados da réplica 1 para os quatro compostos.

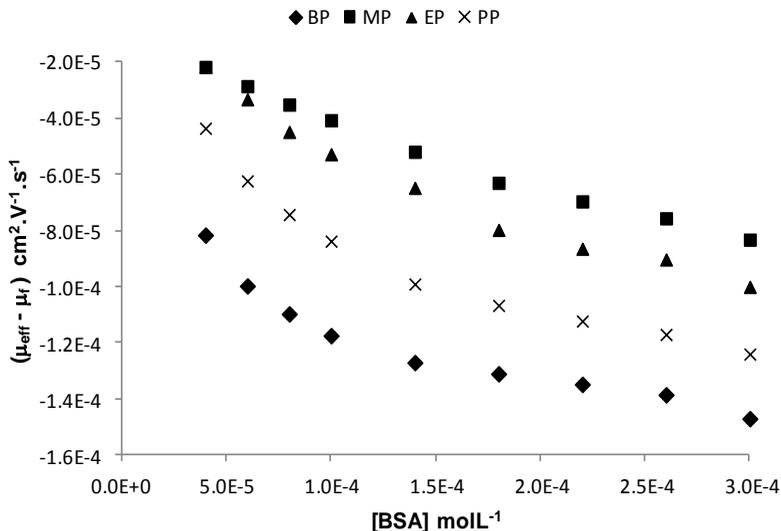


Figura 7 Perfil apresentado pelas mobilidades efetivas obtidas experimentalmente pelo método ACE (método 1 - réplica 3) dos compostos metil, etil, propil e butilparabeno em função da concentração de BSA. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; ACE, eletroforese capilar de afinidade.

Sabendo que a mobilidade dos compostos é praticamente a mesma na ausência de proteína, o que se vê é uma diferença mais pronunciada da mobilidade do composto BP quando presente uma dada concentração de BSA, se comparada com a dos demais compostos. O resultado está de acordo com o esperado, já que uma associação mais intensa implica numa mudança mais intensa da propriedade físico-química observada (no caso, mobilidade) que torna-se cada vez mais próxima da mobilidade da proteína, nestes casos. Os valores de K_{ass} obtidos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 Valores de constante de associação entre os parabenos e BSA utilizando o modelo não-linear da isoterma de ligação

Réplica		Faixa [BSA] $\mu\text{mol L}^{-1}$	$K_{\text{ass}} (\text{L mol}^{-1})$			
			MP	EP	PP	BP
1	n = 18	0-300	3737,0	4379,5	10578	36218
2	n = 12	0-150	3156,6	3045,7	6477,5	23823
3	n = 18	0-300	3238,7	3789,1	10078	28086
média			3377,4	3738,1	9044,5	29376
CV%			9,3	17,9	24,7	21,4

Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno, K_{ass} , constante de associação.

Na Tabela 9, réplica 2, novamente se vê valores incomuns das K_{ass} dos compostos MP e EP, porém, numa proporção muito mais baixa do que a ocorrente quando os mesmos dados foram tratados pelo modelo linear descrito anteriormente. Se forem observados os valores obtidos na réplica 2 com os obtidos nas réplicas 1 e 3 da Tabela 9, o que se vê é uma diminuição notória na maioria deles e como as constantes de associação para MP e EP obtidas no método são consideravelmente próximas, a margem de erro teve maior influência nesta réplica. Esta diminuição nas constantes de associação foi atribuída a faixa de [BSA] trabalhada também ter sido menor (0-150 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Obtidos os valores de K_{ass} foi possível calcular r , que é a razão entre a concentração de substrato (MP, EP, PP ou BP) ligado e a concentração de substrato total e é obtido a partir da Equação 2. A Figura 8 apresenta os gráficos de r versus $[\text{substrato}]_{\text{total}}/[\text{BSA}]$ para os quatro compostos a partir dos dados da réplica 1.

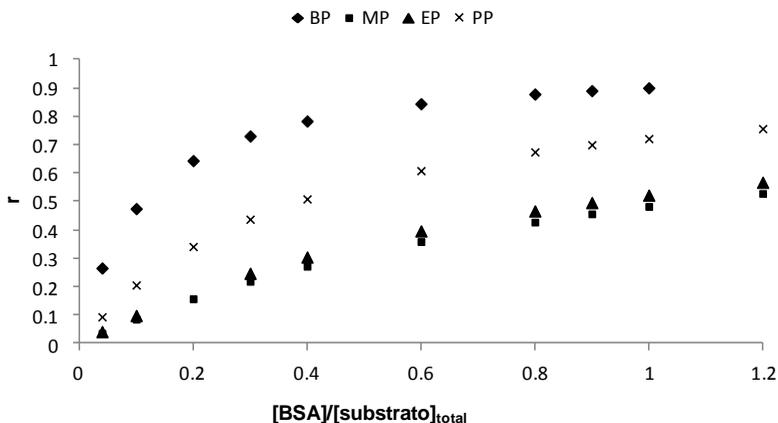


Figura 8 Gráficos da razão $[\text{substrato}]_{\text{ligado}}/[\text{substrato}]_{\text{total}}$ versus a razão $[\text{BSA}]/[\text{substrato}]_{\text{total}}$, onde $[\text{substrato}]_{\text{total}}$ é igual a $250 \mu\text{mol L}^{-1}$. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

Como o sistema parabeno-BSA foi tratado de maneira simplificada como sendo de estequiometria 1:1, os valores de r mensurados não são valores absolutos, mas relativos, no entanto, são úteis em estudos comparativos (Busch, Carels et al. 1997).

Com os gráficos expostos na Figura 8 é possível uma melhor visualização do aumento da afinidade parabeno-BSA com o aumento da cadeia carbônica ligada ao grupo éster. Observa-se que com as maiores razões $[\text{BSA}]/[\text{substrato}]_{\text{total}}$ trabalhadas, cerca de 90% do total de butilparabeno apresenta-se na forma ligada, seguiu do por 70%, 50% e ligeiramente abaixo de 50%, para os compostos PP, EP e MP, respectivamente.

Neste modelo de tratamento dos dados, utilizando a ferramenta Solver do Excel, os valores das mobilidades obtidas experimentalmente são ajustadas pelo método dos mínimos quadrados (MMQ). Foram então construídas curvas da mobilidade obtida experimentalmente versus a mobilidade ajustada pelo MMQ, que será descrita “mobilidade calculada” ou μ_{cal} , e os valores de R^2 são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 Coeficientes de determinação (R^2) para as curvas μ_{eff} versus μ_{calc} para metil, etil, propil e butilparabeno

Réplicas		Coeficientes de determinação (R^2)			
		MP	EP	PP	BP
1	n = 18	0,9931	0,9937	0,9936 ^a	0,9903 ^a
2	n = 10	0,9983	0,9892	0,9814	0,9410
3	n = 18	0,9984	0,9942	0,9950 ^b	0,9828
				0,9952	0,9902

^a dados obtidos desconsiderando os valores de mobilidade após a saturação (n = 16 para PP e n = 12 para BP); ^b n = 12; Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno.

Os valores de F foram calculados para os três sistemas apresentados na Tabela 10. Para a réplica 1, F apresentou-se superior a 1000, exceto para o composto BP (407,0); na réplica 2, F apresentou-se superior a 1200 para todos os compostos e, na réplica 3, o valor de F para MP foi de aproximadamente 1790, seguido por 276, 790 e 230, para os compostos EP, PP e BP, respectivamente. Estes valores são coerentes com os coeficientes de determinação obtidos. Os elevados valores de F indicam que a regressão é significativa para todos os casos.

Os valores de R^2 apresentados na Tabela 10 para os compostos PP e BP na réplica 1 quando n = 18, ocorrem, pois, a saturação de BSA pode implicar em desvios no comportamento dos compostos. O ajuste pelo método dos mínimos quadrados (MMQ) corrige este fenômeno. Uma melhor visualização é feita a partir dos gráficos da Figura 9 para os compostos propil e butilparabeno na réplica 1.

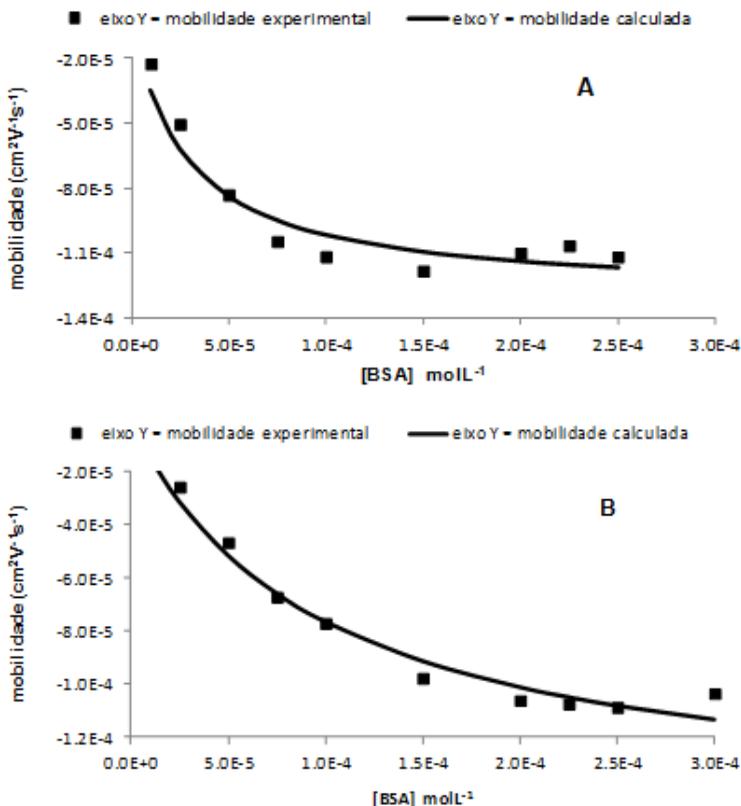


Figura 9 Gráficos de mobilidade (experimental e calculada) versus [BSA] para os compostos A) butilparabeno e B) propilparabeno na réplica 1. Legenda: BSA, albumina do soro bovino.

Com base nos parâmetros de linearidade (R^2 e F), considerando os desvios nas mobilidades ocorrentes após a saturação, o modelo matemático aplicado demonstrou-se adequado para o sistema estudado.

A Figura 10 apresenta os eletroferogramas obtidos para os compostos MP, EP, PP e BP com adição de diferentes concentrações de [BSA], considerando que na ausência de BSA, todos os compostos apresentam mobilidade iguais entre si e próximas a zero, por estarem quase completamente nas suas formas neutras em pH 7,3.

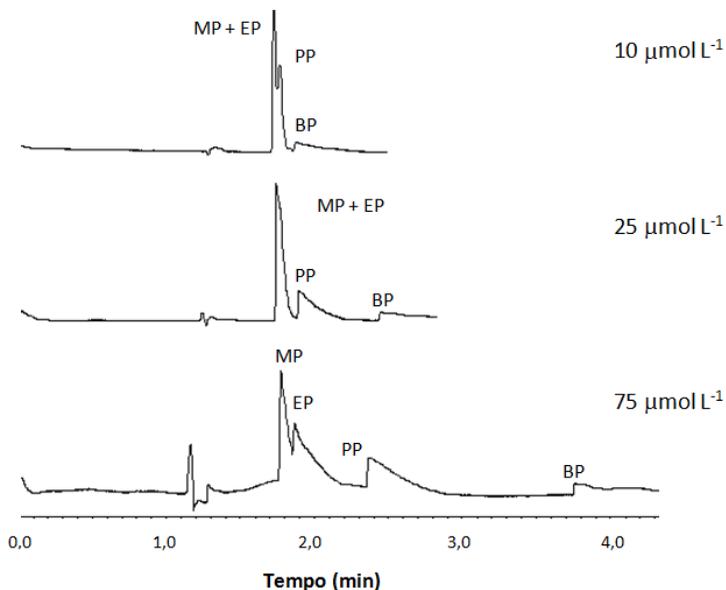


Figura 10 Eletroferogramas obtidos para os compostos metil, etil, propil e butilparabenos em concentrações de BSA 10-75 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições: capilar de 32 cm (8,5 cm de tamanho efetivo) x 50 μm d.i. com revestimento dinâmico de BSA; eletrólito composto por 30 mmol L^{-1} de PO_4^{3-} + 50 mmol L^{-1} de Na^+ + concentrações variadas de BSA, pH 7,3; 17 kV; 36,5 °C; injeção hidrodinâmica 3s/50mbar, polaridade positiva. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; EOF, fluxo eletrosmótico.

Apesar do método por ACE para estudos de interação ter sido reportado há pelo menos duas décadas, normalmente é aplicado para um único sistema ligante-receptor. Por isso, foi avaliada a influência dos diversos equilíbrios simultâneos presentes no sistema estudado. Para isso foram feitas injeções dos quatro parabenos simultaneamente, que é a proposta do método, e em paralelo a injeção individual de cada um deles.

A Figura 11 apresenta os eletroferogramas sobrepostos da injeção em grupo e individual do etilparabeno com eletrólito de corrida composto por 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA. O que se observa é uma correlação muito boa entre os tempos de migração do analito em ambos os sistemas, o que indica que os equilíbrios envolvidos não são afetados entre si.

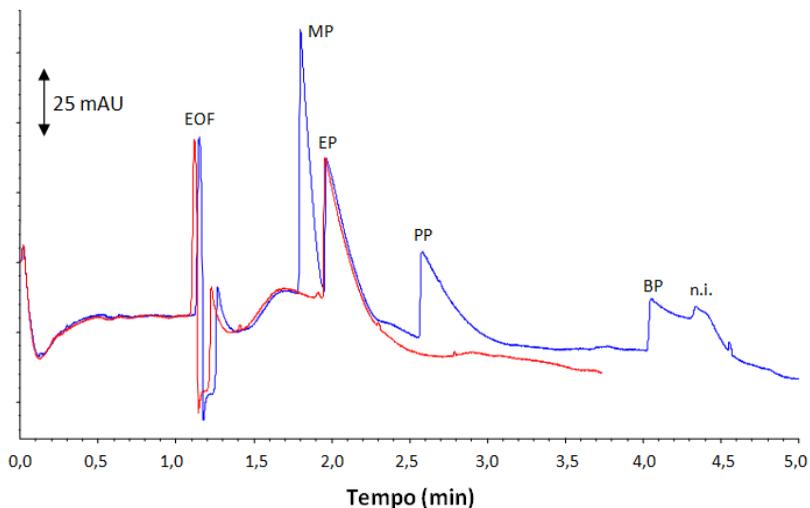


Figura 11 Eletroferogramas obtidos, em azul, para todos os parabenos estudados e, em vermelho, para o composto etilparabeno em condições experimentais idênticas. Condições: capilar de 32 cm (8,5 cm de tamanho efetivo) x 50 μm d.i. com revestimento dinâmico de BSA; eletrólito composto por 30 mmol L^{-1} de PO_4^{3-} + 50 mmol L^{-1} de Na^+ + 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA, pH 7,3; 17 kV; 36,5 $^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica 3s/50mbar, polaridade positiva. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; EOF, fluxo eletrosmótico; n.i., não identificado.

Outras técnicas *online* utilizadas para determinação de constantes de associação e estudos de interação, como a de dicróismo circular e espectroscopia UV-vis, não permitem um estudo simultâneo dos analitos, apresentando-se como uma vantagem do método aplicado e desenvolvido neste trabalho até o presente momento. Por outro lado, este método sem alterações não permite o estudo de interações medicamentosas, por exemplo, já que foi observada uma não influência dos equilíbrios envolvidos. Para isto seria necessária a adição do interferente na solução onde está presente o receptor (BSA), acarretando limitações quanto a absorção na região do UV e/ou mobilidade e/ou carga dos componentes da análise.

5.4. Aplicação do método por PF-ACE (método 2) para determinação das constantes de associação (K_{ass}) parabeno-BSA

As condições experimentais descritas nos itens 3.0 à 4.3 deste capítulo, são as mesmas utilizadas na aplicação do método 2, por PF-ACE, e que será apresentado neste tópico.

5.4.1. Escolha dos demais parâmetros eletroforéticos

Neste procedimento, o eletrólito de corrida foi único e composto por 30 mmol L⁻¹ de PO₄³⁻ e 50 mmol L⁻¹ de Na⁺, pH 7,3. Neste método não há adição de proteína no eletrólito, diferente do que ocorre no método clássico por ACE apresentado anteriormente.

Novamente a concentração de BSA foi variada entre 0-350 μmol L⁻¹ e as soluções de parabenos foram preparadas mantendo a mesma concentração de 250 μmol L⁻¹ trabalhada no método anterior, porém agora foram preparados individualmente.

Para melhor entendimento, a Figura 12 apresenta um esquema ilustrativo do método 2.

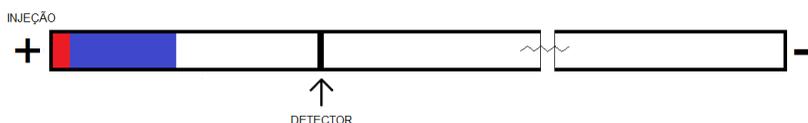


Figura 12 Esquema ilustrativo do método 2, PF-ACE. Em azul está representado o volume injetado de BSA no capilar, seguido pelo volume injetado de parabeno, em vermelho. Os sinais + e - são as polaridades dos eletrodos nas extremidades do capilar. Legenda: PF-ACE, eletroforese capilar de afinidade com preenchimento parcial do capilar; BSA, albumina do soro bovino.

Como mostrado na Figura 12, primeiramente foi injetado um volume de BSA e em seguida um volume menor de parabeno. Essa sequência foi escolhida, pois nestas condições de pH (7,3) a BSA apresenta-se aniônica e os parabenos praticamente neutros, como já descrito. Desta forma, e nessas condições de polaridade, quando é aplicado o potencial para a corrida eletroforética, a BSA migra em direção a extremidade de injeção, enquanto o parabeno migra com o fluxo eletrosmótico em direção ao eletrodo de carga positiva, fazendo com que ambos entrem em contato e possam interagir.

Ambos os componentes, BSA e parabenos, foram injetados por pressão de 50 mbar, pela extremidade do capilar mais próxima ao detector. O tempo de injeção do parabeno foi de 3s (exatamente como no método 1) e da proteína, 10s.

A tensão para a separação foi de 20 kV escolhida com base no gráfico de Ohm apresentado na Figura 5. O valor escolhido é ligeiramente maior que a tensão aplicada no método 2, pois não houve adição de BSA no eletrólito e a corrida eletroforética é reduzida. Os parâmetros experimentais do método 2 são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 Parâmetros experimentais do método 2 (PF-ACE) aplicado para estudo das interações parabenos-BSA

Parâmetros	Condições
Eletrólito	30 mmol L ⁻¹ de PO ₄ ³⁻ e 50 mmol L ⁻¹ de Na ⁺ , pH 7,3
Dimensões do capilar	32 cm x 50 µm d.i
Comprimento até o detector	8,5 cm
Voltagem aplicada	20 kV
Amostra	MP, EP, PP e BP ~ 250 µmol L ⁻¹ em solução eletrolítica, preparados individualmente
Injeção	Hidrodinâmica; 10s/50 mbar de BSA seguido por 3s/50mbar de parabeno; polaridade positiva
Pré-condicionamento	1 minuto com eletrólito de corrida

Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; EOF, fluxo eletrosmótico.

O tempo de injeção de BSA foi escolhido de forma que, na faixa de concentração escolhida, fosse possível observar a formação do complexo parabeno-BSA através de mudanças significativas na mobilidade dos quatro analitos. Injeções de 5 s e 15 s também foram testadas, porém 5 s não apresentou mudança significativa nas mobilidades dos analitos em concentrações baixas, principalmente para MP e EP, e 15 s apresentou comportamento semelhante a injeção por 10 s.

5.4.2. Resultados e Discussão

Como definido após o tratamento dos dados obtidos nos experimentos pelo método 1, e a partir de conclusões obtidas em trabalhos anteriores (Busch, Carels et al. 1997; Armstrong e Jiang 2010;

El-Hady, Kuhne et al. 2010), dentre os dois modelos matemáticos aplicados, o modelo não-linear apresentou maior confiabilidade dos resultados. Por isso, serão apresentados os valores das constantes de associação obtidos por este método (PF-ACE) apenas através do mesmo modelo não-linear. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 Valores de constantes de associação entre os parabeno e BSA utilizando o método 2 (PF-ACE) e o modelo não-linear da isoterma de ligação

Réplica		K_{ass} ($L mol^{-1}$)				
		Faixa [BSA] $\mu mol L^{-1}$	MP	EP	PP	BP
1	n = 26	0-350	3275,4	4117,6	5894,9	11081 ^a
2	n = 20	0-400	2262,0	2467,5	5173,6	10153
média			2768,7	3292,6	5534,3	10617
CV%			25,881	35,437	9,2160	6,1806

^a n = 24; Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; K_{ass} , constante de associação.

A partir dos dados tabelados, novamente o que se observa é o aumento da constante de associação parabeno-BSA crescendo com o aumento da hidrofobicidade do composto. O comportamento da mudança observadas nas mobilidades em função da concentração de BSA é observado na Figura 13.

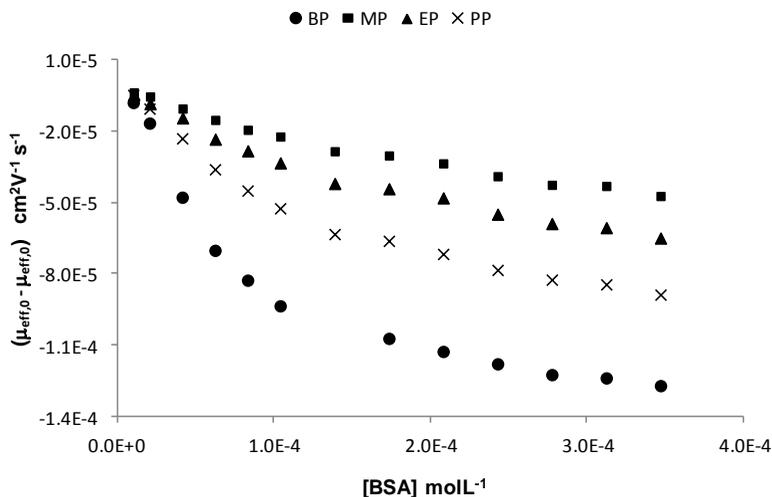


Figura 13 Perfil apresentado pelas mobilidades efetivas obtidas experimentalmente pelo método PF-ACE (método 2 - réplica 1) dos compostos metil, etil, propil e butilparabeno em função da concentração de BSA. Legenda: BSA, albumina do soro bovino; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; PF-ACE, eletroforese capilar de afinidade com preenchimento parcial do capilar.

O que se observa na Figura 13, é uma mudança mais pronunciada do composto butilparabeno quando presente uma dada concentração de proteína. Esta mobilidade fica mais negativa a medida que os compostos interagem com a BSA, dado que a proteína encontra-se em $\text{pH} > \text{pI}$ ($7,3 > 4,7$) e, portanto, com carga total negativa.

Os resultados dos métodos 1 e 2, ambos com tratamento dos dados realizados pelo modelo não-linear, apresentaram aumento na constante de associação com o aumento da cadeia carbônica ligada ao grupo éster de cada parabeno. No entanto, de maneira geral, os resultados obtidos pelo método 2 (PF-ACE) são ligeiramente menores para os compostos MP e EP e significativamente menores para os compostos PP e BP. Isto foi atribuído ao fato que MP e EP encontram-se num sistema distante da saturação, diferente do que ocorre com PP e, principalmente, com BP, e a saturação é, portanto um parâmetro importante para a determinação das constantes de associação.

Para uma melhor visualização comparativa entre os métodos, a Tabela 13 apresenta a razão encontrada entre as constantes de associação BP-PP; PP-EP e EP-MP, nos métodos 1 e 2.

Tabela 13 Razões obtidas entre as constantes de associação parabeno-BSA, nos métodos 1 (ACE) e 2 (PF-ACE)

	ACE (método 1)	PF-ACE (método 2)
$K_{ass} \text{ BP} / K_{ass} \text{ PP}$	3,25	1,92
$K_{ass} \text{ PP} / K_{ass} \text{ EP}$	2,42	1,68
$K_{ass} \text{ EP} / K_{ass} \text{ MP}$	1,11	1,19

Legenda: MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; K_{ass} , constante de associação; ACE, eletroforese capilar de afinidade; PF-ACE, eletroforese capilar de afinidade com preenchimento parcial do capilar.

De fato, no método 1 obteve-se um aumento pronunciado entre as constantes de associação do propilparabeno para o butilparabeno, corroborando com o que é reportado na literatura. Já no método 2 esta diferença não foi pronunciada. A diminuição dos valores obtidos para as constantes de associação no método foi atribuída a dois fatores: 1) a faixa de concentração de proteína estudada foi mantida praticamente a mesma em ambos os métodos, porém a quantidade de proteína é muito maior no método 1, em que ela se encontra no eletrólito do que no método 2, em que é injetado um volume bastante menor e; 2) o tempo de contato entre parabeno e proteína é maior no primeiro caso e esta diferença não foi considerada no tratamento dos dados, o que pode estar de acordo com as conclusões de Nilsson e colaboradores e justificar o modelo proposto por eles (Equação 10) em 2004, no entanto até o momento pouco aplicado nos trabalhos publicados.

A Figura 14 apresenta os gráficos da razão $[\text{substrato}]_{\text{ligado}} / [\text{substrato}]_{\text{total}}$ versus a razão $[\text{BSA}] / [\text{substrato}]_{\text{total}}$ para ambos os métodos.

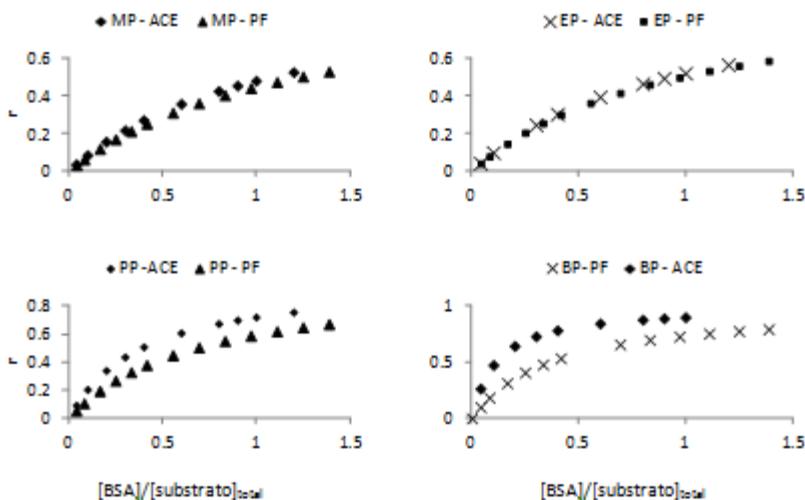


Figura 14 Gráficos da razão entre a concentração de complexo formado pela concentração total de substrato ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$), em função da razão $[\text{BSA}]/[\text{substrato}]_{\text{total}}$ para os compostos metil, etil, propil e butilparabeno, nos métodos 1 (ACE) e 2 (PF). Legenda: BSA, albumina do soro bovino; $[\text{substrato}]_{\text{total}}$, concentração molar total de substrato; MP, metilparabeno; EP, etilparabeno; PP, propilparabeno; BP, butilparabeno; ACE, eletroforese capilar de afinidade; PF-ACE, eletroforese capilar de afinidade com preenchimento parcial do capilar.

O que se vê na Figura 14 é que a razão $[\text{substrato}]_{\text{ligado}}/[\text{substrato}]_{\text{total}}$ apresenta comportamento muito próximo para os compostos MP e EP em ambos os métodos. Para PP, no final do experimento, a razão de 70% obtida no método 1 caiu para aproximadamente 60% e, para BP, a diferença foi de 90% no método 1 para aproximadamente 80% no método 2.

As constantes de ligação de reportadas por (Jun 1771) são relativamente independentes da cadeia lateral dos compostos, ao contrário do presente trabalho que é semelhante ao perfil apresentado por (Otagiri e Perrin 1977) e afirmados em trabalhos recentes de revisão (Soni, Carabin et al. 2005), em que é possível observar uma relação direta entre a hidrofobicidade dos compostos ($\log P$) e as constantes de associação, ocorrendo um aumento pronunciado nas constantes de ligação do propilparabeno para butilparabeno, principalmente pela aplicação do método 1. O gráfico de K_{ass} em função de $\log P$ obtidos por (Otagiri e Perrin 1977) e por este trabalho é exposto na Figura 15.

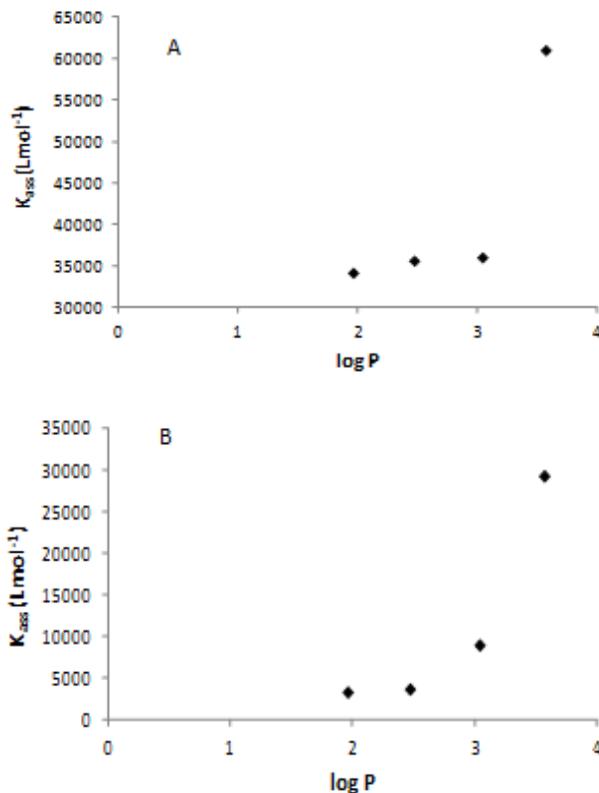


Figura 15 Gráficos das constantes de associação em função do $\log P$ dos compostos metil, etil, propil e butilparabeno obtidas A) por Otagiri e colaboradores (Otagiri e Perrin 1977) e B) pelo método 1 (ACE) neste trabalho pelo tratamento dos dados através modelo não-linear. Legenda: K_{ass} , constante de associação; $\log P$, coeficiente de partição etanol/água (parâmetro de hidrofobicidade); ACE, eletroforese capilar de afinidade.

O que é possível observar na Figura 15 é um comportamento qualitativo próximo entre ambas as metodologias, porém com os valores de K_{ass} obtidos neste trabalho bastante diminutos com relação ao reportado por Otagiri e Perrin com HSA, utilizando a técnica de dicróismo circular que, segundo os autores, são similares aos obtidos por Jun e colaboradores com BSA. Os resultados obtidos por Patel e colaboradores com BSA também se encontram significativamente abaixo dos reportados por Otagiri e Perrin, e Jun e colaboradores, e é atribuído à baixa razão droga-proteína (Otagiri e Perrin 1977).

6. ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE O PROPILPARABENO E O ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO (DNA)

6.1. Demais parâmetros eletroforéticos

Os experimentos foram realizados em um capilar de sílica fundida com 48,5 cm de comprimento, 8,5 cm de tamanho efetivo, 50 μm d.i. e 375 μm d.e. A resposta foi acompanhada em 200 nm e a temperatura do cartucho mantida a 25 °C.

Para a ultrafiltração foi utilizada membrana de celulose regenerada Microcon centrifugal filter devices de 10.000 NMWL (Millipore Corporation, USA) e uma centrífuga Eppendorf Mini Spin plus.

Para todas as análises foi utilizado eletrólito com 15 mmol L⁻¹ de PO₄⁻, 25 mmol L⁻¹ de Na⁺, pH 7,3 e tensão aplicada de 30 kV.

6.2. Descrição das metodologias e resultados

Para a análise de interação entre o propilparabeno (PP) e o DNA, na sua forma selvagem, foi aplicado o método por eletroforese capilar de afinidade com preenchimento parcial do capilar (PF-ACE): primeiramente foi feita a injeção de um volume maior de DNA concentrado (150 ng μL^{-1}) seguido pela injeção de uma solução contendo ~ 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PP por 3 s a 50 mbar. A polaridade na injeção foi mantida positiva ocorrendo a transposição dos plugues do ligante e do receptor quando aplicado o potencial, já que DNA apresenta-se aniônico devida ionização dos grupos fosfato.

Foram feitas injeções em triplicata de 5 s e 10 s de aplicação de DNA, e o que se observou foi que em ambos os sistemas estudados os compostos não apresentaram interação (os valores de mobilidade se mantiveram as mesmas na presença ausência de DNA).

Para avaliar a veracidade do resultado, foi aplicado um outro método, que consiste na encubação *offline* de ambos os compostos, seguida pela ultrafiltração e injeção do sobrenadante no capilar. Neste método acompanha-se a área do pico do PP livre.

As condições experimentais foram mantidas as mesmas, porém foi feita uma única injeção de 50 mbar por 3 s de uma solução contendo

inicialmente $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de propilparabeno. Em seguida foram preparadas soluções contendo a mesma concentração de PP junto a $15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA e incubadas por 5, 10 e 15 minutos, seguida por filtração e 5 minutos de centrifugação com membrana de celulose 10000 NMWL a 14000 rpm.

A Figura 16 B apresenta eletroferogramas obtidos para o PP antes e após a incubações com DNA e, na Figura 16 A, eletroferogramas obtidos para três injeções consecutivas da mesma amostra de PP quando incubado com BSA ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 15 minutos, a título de comparação.

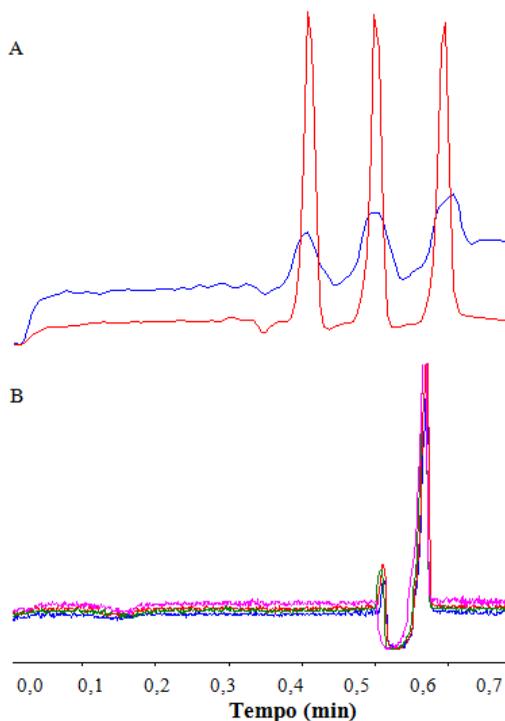


Figura 16 Eletroferogramas obtidos para a interação A) PP-BSA antes (em azul) e após incubação por 15 minutos com BSA (vermelho) e; B) PP-DNA, após a incubação por 5 (em rosa), 10 (em azul), e 15 minutos (em vermelho). Em verde é o eletroferograma do PP antes de ser incubado com o DNA. Após todas as incubações, as soluções foram filtradas e centrifugadas com membrana de celulose 10000 NMWL. Legenda: PP, propilparabeno; BSA, albumina do soro bovino; DNA, ácido desoxirribonucleico; NMWL, limite de peso molecular.

O que se vê na Figura 16, novamente, é que não há interação entre o propilparabeno e o DNA. Esta observação é clara quando a Figura 16 A é comparada à Figura 16 B, em que a diminuição na área do composto livre é intensa após a incubação com BSA, cuja interação é forte.

7. CONCLUSÕES

Os estudos de interação realizados neste trabalho entre os parabenos e a albumina foram possíveis pelos seguintes fatos: trabalhou-se com sistema aquoso e o pH foi mantido próximo ao pH sanguíneo (7,3). Nestas condições, os analitos encontram-se praticamente neutros e a BSA ($pI = 4,7$) (Norde e Giacomelli 2000) na sua forma aniônica, além de evitar repulsão eletrostática parabeno-albumina, é possível acompanhar a formação do complexo parabeno-BSA através de mudanças nas mobilidades efetivas do parabenos quando presente a proteína.

Outro fator considerado no desenvolver deste trabalho foi a interação que ocorre entre a BSA e os grupos silanóis ($SiOH/SiO^-$) presentes na parede do capilar. Muitos estudos buscam minimizar este fenômeno e, dentre eles, a opção mais estudada tem sido o revestimento interno do capilar que pode ser classificado como polimérico covalentemente ligado, polimérico fisicamente adsorvido, ou aditivos de moléculas pequenas (Lucy, MacDonald et al. 2008). Uma força iônica elevada do eletrólito de corrida também minimiza efeitos de adsorção, entretanto, apresenta-se limitadora na técnica de eletroforese capilar. Neste trabalho trabalhou-se com uma força iônica elevada buscando condições mais próximas às do sistema vivo e, além disto, foi realizado um pré-tratamento com a própria albumina, de forma a saturar os sítios de interação da superfície do capilar e minimizar efeitos de adsorção durante as corridas eletroforéticas de análise.

A metodologia utilizada para modificação do capilar com a própria BSA é simples, e rapidamente atinge a saturação na superfície do capilar. Com os devidos cuidados, manteve-se estável durante todos os experimentos, proporcionando dados eletroforéticos mais precisos e exatos nas condições estudadas. Além disto, destaca-se por não foram necessários reagentes além daqueles utilizados nos estudos de interação.

O método por eletroforese capilar de afinidade (ACE) (método 1) aplicado no estudo das interações entre os parabenos e a albumina, apresentou-se simples e rápido, considerando o estudo simultâneo dos quatro compostos. Esta é, talvez, a principal vantagem do método: em uma única corrida eletroforética é possível fazer comparações entre as intensidades de interação de um grupo de compostos. Por outro lado, o tempo de corrida e a quantidade de reagentes e *vials* é muito maior se comparado com o método 2, PF-ACE. O procedimento experimental do método 2 é simples com relação ao método por ACE e o eletrólito de corrida é exatamente o mesmo para todas as corridas.

Um parâmetro importante nestes estudos é a faixa de concentração de receptor (ou do ligante, em determinados casos) e/ou o tempo de contato entre ligante e receptor durante as análises. Neste trabalho, a faixa de concentração estudada mostrou-se adequada para que conclusões qualitativas confiáveis fossem obtidas, no entanto, para os cálculos das constantes de associação dos quatro compostos, foi baixa, resultando em valores abaixo dos apresentados na literatura (Otagiri e Perrin 1977).

Outra ferramenta fundamental para que os resultados sejam precisos e exatos, é o modelo matemático utilizado no tratamento dos dados. O modelo deve corresponder às condições disponíveis pelo método. Dos dois modelos estudados, linear do duplo-recíproco e não-linear da isoterma de ligação 1:1, o modelo linear apresentou resultados insatisfatórios, podendo gerar conclusões inequívocas.

O modelo não-linear foi aplicado não apenas para o método 1 para o estudo com BSA, mas para o método *PF-ACE*, que apresentou resultados ainda menores de K_{ass} . Esta diminuição ainda mais pronunciada foi atribuída não apenas a baixa faixa de concentração de BSA estudada, mas ao fato do modelo matemático não-linear aplicado não ser adequado para este sistema uma vez que, segundo Nilsson, deve ser considerado o tempo em que substrato e proteína permanecem em contato (Nilsson, Harang et al. 2004). Os resultados dos estudos com o DNA, por outro lado, são inconclusivos com relação ao possível mecanismo de ação dos parabenos na formação de câncer. A interação entre o propilparabeno e o DNA não foi observada nos métodos empregados, sugerindo uma baixa ou inexistente interação nas condições estudadas. Informações mais precisas podem ser obtidas estudando a interação deste composto com enzimas da classe DNA-polimerase e observar influência na síntese do DNA.

O grupo estudado neste trabalho foi dos *p*-hidroxibenzoatos de alquila, ou parabenos (metil, etil, propil e butilparabeno), cuja estrutura química difere-se uma da outra apenas pela cadeia carbônica ligada ao grupo éster. Apesar de já ser conhecida a relação direta que ocorre entre a hidrofobicidade destes compostos e a interação com a albumina, há uma série de compostos sendo desenvolvidos e estudados diariamente com finalidade biológica e o estudo de interação destes com biomoléculas faz parte do seu processo de desenvolvimento. Estes estudos ocorrem não apenas com proteínas séricas, mas com outras proteínas-alvo, que irão depender da finalidade, ou o DNA, como também foi demonstrado neste trabalho. Saber diferenciar compostos que, dentre uma série, apresentam maior atividade biológica, é bastante

útil em estudos bioquímicos e farmacológicos. Outras informações como tempo de meia vida ($t_{1/2}$), biodisponibilidade e toxicidade destes compostos também podem ser obtidas a partir de estudos *in vitro* com biomoléculas. Além de intensidade de interação, quando se trabalha com compostos que apresentam semelhanças e diferenças estruturais, é possível conhecimento acerca da natureza destas interações.

Além do baixo custo apresentado pela instrumentação de eletroforese capilar quando comparado com outras técnicas de separação e/ou utilizadas em estudos de interação, outras características baixaram ainda mais o custo dos experimentos realizados. De maneira geral, neste trabalho foram utilizados poucos reagentes e a maioria de fácil acesso. Como solventes, apenas água deionizada, um volume pequeno de metanol (inferior a 100 mL) e ainda menor de acetona, na ordem de nanolitros. O eletrólito de corrida é de fácil preparo e manuseio, exceto quando presente BSA.

Com relação ao impacto da utilização destes compostos na saúde e no meio ambiente, os dados da literatura demonstram-se não exatamente controversos, mas complementares e, principalmente, incompletos. Controversas são as conclusões acerca da segurança do uso de parabenos com os dados que se têm. Em cerca de $\frac{3}{4}$ de século estudiosos e órgãos que avaliaram a qualidade dos parabenos afirmaram que a utilização destes como conservantes não só em medicamentos e cosméticos, mas também em alimentos, era completamente segura (exceto em pele danificada). Apenas na última década com resultados de novos estudos é que coloca isto foi a prova. São poucos dados, e estes, de poucos laboratórios e pesquisadores, no entanto, se não há comprovações de que é indevido o uso de parabenos, é evidente a necessidade de estudos aprofundados e amplos para que exista um consenso ou, mais clareza.

A potencial atividade estrogênica dos parabenos e a detecção destes em tecidos da mama, embora a partir de uma amostra muito pequena, é notável. No entanto, ao invés de investigar essas questões como eventos independentes, é importante uma investigação mais abrangente. Além disto, estudos de várias gerações seriam o mais adequado, já que a exposição aos parabenos se dá já nos primeiros meses de vida e permanece até o fim durante todos os dias, para a maioria da população mundial.

Em anos anteriores, PCBs e drogas como a cocaína, dentre inúmeras substâncias, tinham o consumo liberado, até que uma série de dados científicos afirmou malefícios causados a saúde e ao meio ambiente, o que resultou em proibição. Por outro lado, a segurança do

uso de lanolina e do óleo mineral também foi colocada em dúvida em tempos anteriores, porém intensificados os estudos acerca da ação biológica destas duas substâncias, convenceu-se de que são seguros e podem ser consumidos. O fato é que uma substância deveria ou não ser comercializada não apenas pela sua influência no tempo de prateleira ou no interesse do consumidor (que é o caso dos corantes), mas principalmente pelo impacto que trazem na vida do ser humano como ser individual e membro da sociedade, bem como dos animais e do meio ambiente, a curto e longo prazo. Por isto, apesar dos parabens serem estudados há cerca de 80 anos, a falta de dados e certezas fazem com que estudos com estes compostos permaneçam atuais e, igualmente ou mais importantes, já que estão diariamente em exposição.

CONCLUSÃO FINAL

Os resultados dos estudos apresentados nesta dissertação (capítulos 1 e 2) demonstraram ainda a versatilidade da técnica de eletroforese capilar, sendo útil tanto para desenvolvimento de métodos analíticos para determinação e quantificação de componentes em diversas matrizes, quanto para estudos de interação, inclusive com moléculas complexas como proteínas e ácidos nucleicos. A aplicação ainda pode estender-se para o estudo cinético de reações químicas, bem como para estudos de interação medicamentosa e desenvolvimento de fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- The Council Directive 76/768/EEC, 1976 and subsequent modifications.
- Andersen, H. R., M. Lundsbye, et al. (2007). "Estrogenic personal care products in a greywater reuse system." Water Science and Technology **56**(12): 45-49.
- ANVISA (2001). Resolution nº 162, 09/11/2001. D.O.U. 10/02/2001
- Araya, F. H., G.; McGroarty, I.; Skellern, G. G.; Waigh, R. D. (2007). "Capillary electrophoresis for studying drug-DNA interactions." Methods **42**: 141-149.
- Armstrong, D. W. ; C. X. Jiang (2010). "Use of CE for the determination of binding constants." Electrophoresis **31**(1): 17-27.
- Bila, D. M. ; M. Dezotti (2007). "Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências." Quimica Nova **30**: 651-666.
- BOČEK, P., DEML, M., GEBAUER P., DOLNÍK, V., RADOLA, B. J. (1988). Analytical Isotachophoresis. New York.
- Busch, M. H. A., L. B. Carels, et al. (1997). "Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **777**(2): 311-328.
- Castelletti, L., B. Verzola, et al. (2000). "Quantitative studies on the adsorption of proteins to the bare silica wall in capillary electrophoresis III: Effects of adsorbed surfactants on quenching the interaction." Journal of Chromatography A **894**(1-2): 281-289.
- Chen, J. G., K. C. Ahn, et al. (2007). "Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products." Toxicology and Applied Pharmacology **221**(3): 278-284.
- Danish Legislation (2011). Special Danish Legislation for Child Products.
- Darbre, P. D. (2003). "Underarm cosmetics and breast cancer." Journal of Applied Toxicology **23**(2): 89-95.
- Darbre, P. D., A. Aljarrah, et al. (2004). "Concentrations of parabens in human breast tumours." Journal of Applied Toxicology **24**(1): 5-13.
- Darbre, P. D., J. R. Byford, et al. (2002). "Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **80**(1): 49-60.

- Dworschak, A. ; U. Pyell (1999). "Widening of the elution window in micellar electrokinetic chromatography with cationic surfactants II. Cationic additives and modifiers of the electroosmotic flow." Journal of Chromatography A **855**(2): 669-679.
- El-Hady, D., S. Kuhne, et al. (2010). "Precision in affinity capillary electrophoresis for drug-protein binding studies." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **52**(2): 232-241.
- Fang, Y., J. Z. Zhang, et al. (1996). "Activation energy of the separation of DNA sequencing fragments in denaturing noncross-linked polyacrylamide by capillary electrophoresis." Electrophoresis **17**(9): 1436-1442.
- Fawthrop, D. J., A. R. Boobis, et al. (1991). "Mechanisms of Cell-Death." Archives of Toxicology **65**(6): 437-444.
- Gas, B., P. Coufal, et al. (2001). "Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis I. Mathematical and computational model." Journal of Chromatography A **905**(1-2): 269-279.
- Gas, B., M. Stedry, et al. (2002). "Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis - I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes." Journal of Chromatography A **960**(1-2): 187-198.
- Gas, B., M. Stedry, et al. (2003). "Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes." Electrophoresis **24**(3): 536-547.
- Ghuman, J., P. A. Zunszain, et al. (2005). "Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin." Journal of Molecular Biology **353**(1): 38-52.
- Gomez, F. A., J. Zavaleta, et al. (2007). "Partial filling multiple injection affinity capillary electrophoresis (PFMIACE) to estimate binding constants of receptors to ligands." Talanta **71**(1): 192-201.
- Gomez, F. A. ; Y. Zhang (2000). "Multiple-step ligand injection affinity capillary electrophoresis for determining binding constants of ligands to receptors." Journal of Chromatography A **897**(1-2): 339-347.
- Goodman; Gilman, A. (1996). As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- He, X. Y., D. Z. Li, et al. (2002). "Interaction between netropsin and double-stranded DNA in capillary zone electrophoresis and

- affinity capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **982**(2): 285-291.
- Heegaard, N. H. H., S. Nilsson, et al. (1998). "Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **715**(1): 29-54.
- Heegaard, N. H. H. ; C. Schou (2006). "Recent applications of affinity interactions in capillary electrophoresis." Electrophoresis **27**(1): 44-59.
- HOJO, E. T. S. (1981). "Efeitos mutagênicos de substâncias químicas presentes no meio ambiente." Revista de Ensino de Ciências - USP **4**: 16-18.
- Jun, H. W., L. A. Luzzi, et al. (1972). "Phenylbutazone Sodium Warfarin Binding Using a Fluorescent Probe Technique." Journal of Pharmaceutical Sciences **61**(11): 1835-&.
- Jun, H. W., R. T. Mayer, et al. (1971). "Binding Study of Para Hydroxybenzoic Acid Esters to Bovine Serum Albumin by Fluorescent Probe Technique." Journal of Pharmaceutical Sciences **60**(12): 1821-1825.
- Jun, H. W. M., R. T.; Himel, C. M.; Luzzi L. A. (1971). "Binding study of p-hydroxybenzoic acid esters to bovine serum albumin by fluorescent probe technique." Journal of Pharmaceutical Sciences **60**(12): 1821-1825.
- Kang, D., D. S. Chung, et al. (2005). "Separation of DNA with hydroxypropylmethyl cellulose and poly(ethylene oxide) by capillary gel electrophoresis." Microchemical Journal **80**(2): 121-125.
- Kaniansky, D., R. Bodor, et al. (2001). "Isotachopheresis and isotachopheresis-zone electrophoresis of food additives on a chip with column-coupling separation channels." Journal of Separation Science **24**(9): 802-809.
- Katzung, B. G. (1995). Farmacologia Básica & Clínica Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Lanznaster, M., A. Neves, et al. (2005). "A new heterobinuclear (FeCuII)-Cu-III complex with a single terminal Fe-III-O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases." Journal of Biological Inorganic Chemistry **10**(4): 319-332.
- Lee, M. R., C. Y. Lin, et al. (2006). "Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical

- fluid extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1120**(1-2): 244-251.
- Lemini, C., R. Jaimez, et al. (2003). "In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens." Toxicology and Industrial Health **19**(2-6): 69-79.
- Li, H. F., T. Fei, et al. (2011). "Determination of parabens in cosmetic products by solid-phase microextraction of poly(ethylene glycol) diacrylate thin film on fibers and ultra high-speed liquid chromatography with diode array detector." Journal of Separation Science **34**(13): 1599-1606.
- Li, Z. Q., X. M. Dou, et al. (2011). "Separation of long DNA fragments by inversion field capillary electrophoresis." Analytical and Bioanalytical Chemistry **401**(5): 1661-1667.
- Lucy, C. A., A. M. MacDonald, et al. (2008). "Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **1184**(1-2): 81-105.
- MARCUS, Y. (1985.). Ion Solvation. Chichester, .
- Martin, J. M. P., A. Peropadre, et al. (2010). "Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylparaben in mammalian cells." Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **702**(1): 86-91.
- Martins, I., F. C. Carreira, et al. (2011). "Determination of parabens in shampoo using high performance liquid chromatography with amperometric detection on a boron-doped diamond electrode." Talanta **85**(1): 1-7.
- Medina-Hernandez, M. J., A. Diniz, et al. (2008). "Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis." Analytical and Bioanalytical Chemistry **391**(2): 625-632.
- Meyer, U. A. (1996). "Overview of enzymes of drug metabolism." Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics **24**(5): 449-459.
- Micke, G. A., A. C. O. Costa, et al. (2007). "Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples." Journal of Chromatography A **1171**(1-2): 140-143.
- Micke, G. A., A. C. O. Costa, et al. (2009). "Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol-Total analysis time reduction strategies." Journal of Chromatography A **1216**(45): 7957-7961.

- Micke, G. A., A. C. O. Costa, et al. (2008). "Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis - Optimization of the method with inspection of ionic mobilities." Journal of Chromatography A **1204**(1): 123-127.
- Micke, G. A. ; L. C. Goncalves (2007). "Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **1154**(1-2): 477-480.
- Micke, G. A., M. Piovezan, et al. (2010). "Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples." Analytica Chimica Acta **673**(2): 200-205.
- Micke, G. A., L. Vitali, et al. (2011). "Using multiple short-end injections to develop fast electrophoretic separations-Applications in iodide analysis." Journal of Chromatography A **1218**(28): 4586-4591.
- Muijselaar, P. G., H. A. Claessens, et al. (1997). "Migration behaviour of monovalent weak acids in micellar electrokinetic chromatography mobility model versus retention model." Journal of Chromatography A **765**(2): 295-306.
- Nilsson, M., V. Harang, et al. (2004). "Determination of protein-ligand affinity constants from direct migration time in capillary electrophoresis." Electrophoresis **25**(12): 1829-1836.
- Norde, W. ; C. E. Giacomelli (2000). "BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states." Journal of Biotechnology **79**(3): 259-268.
- Norde, W. ; C. A. Haynes (1995). "Reversibility and the mechanism of protein adsorption." Proteins at Interfaces Ii **602**: 26-40.
- Oshima-Franco, Y. F., L. M. (2003). "Biotransformação: importância e toxicidade." SAÚDE REV. **5**(9): 69-76.
- Ostergaard, J. ; N. H. H. Heegaard (2003). "Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug-plasma protein binding." Electrophoresis **24**(17): 2903-2913.
- Otagiri, M. ; J. H. Perrin (1977). "Circular Dichroic Investigations of Binding of Salicylate and Related Compounds to Human-Serum Albumin." Biochemical Pharmacology **26**(4): 283-288.
- Ribani, M., C. B. G. Bottoli, et al. (2004). "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos." Química Nova **27**: 771-780.
- Rodriguez, I., P. Canosa, et al. (2006). "Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in

- water samples at the low ng per litre level." Journal of Chromatography A **1124**(1-2): 3-10.
- Shen, H. Y., H. L. Jiang, et al. (2008). "Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods (vol 30, pg 48, 2007)." Journal of Separation Science **31**(10): 1864-1864.
- Silva, J. d. (1997). "A evolução da Pesquisa Científica." Interciência **22**: 285-288.
- Singhal, R. P., O. Otim, et al. (1995). "DNA-Protein Interactions and Separation of Restriction Fragments by Capillary Electrophoresis." Faseb Journal **9**(6): A1423-A1423.
- Soni, M. G., G. A. Burdock, et al. (2001). "Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature." Food and Chemical Toxicology **39**(6): 513-532.
- Soni, M. G., I. G. Carabin, et al. (2005). "Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)." Food and Chemical Toxicology **43**(7): 985-1015.
- Soni, M. G., S. L. Taylor, et al. (2002). "Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature." Food and Chemical Toxicology **40**(10): 1335-1373.
- Strom, J. G. ; H. W. Jun (1981). "An Undergraduate Experiment in Pharmaceutics - the Effect of Temperature on Chemical-Kinetics." American Journal of Pharmaceutical Education **45**(1): 6-8.
- Sutton, R. (2008). Teen Girls' Body Burden of Hormone-Altering Cosmetics Chemicals.
- Tanaka, Y. ; S. Terabe (2002). "Estimation of binding constants by capillary electrophoresis." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **768**(1): 81-92.
- Tavares, M. (1996). "Eletroforese Capilar: conceitos básicos." Química Nova **19**: 173-181.
- Timerbaev, A. R., A. V. Rudnev, et al. (2005). "Comparative binding of antitumor indazolium [trans-tetrachlorobis(1H-indazole) ruthenate(III)] to serum transport proteins assayed by capillary zone electrophoresis." Analytical Biochemistry **341**(2): 326-333.
- Uekama, K., F. Hirayama, et al. (1977). "Circular-Dichroism Study on Inclusion Complexes of Some Prostaglandins with Alpha-Cyclodextrin and Beta-Cyclodextrin." Chemistry Letters(12): 1389-1392.

- Uysal, U. D. ; T. Guray (2008). "Determination of parabens in pharmaceutical and cosmetic products by capillary electrophoresis." Journal of Analytical Chemistry **63**(10): 982-986.
- Valcarcel, M., I. Marquez-Sillero, et al. (2010). "Determination of parabens in cosmetic products using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction sorbent and corona-charged aerosol detection system." Journal of Chromatography A **1217**(1): 1-6.
- Verzola, B., C. Gelfi, et al. (2000). "Quantitative studies on the adsorption of proteins to the bare silica wall in capillary electrophoresis II. Effects of adsorbed, neutral polymers on quenching the interaction." Journal of Chromatography A **874**(2): 293-303.
- Wang, S. P. ; C. L. Chang (1998). "Determination of parabens in cosmetic products by supercritical fluid extraction and capillary zone electrophoresis." Analytica Chimica Acta **377**(1): 85-93.
- Williams, B. A. ; C. Vigh (1996). "Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis." Analytical Chemistry **68**(7): 1174-1180.
- Yamamoto, H., I. Tamura, et al. (2011). "Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach." Science of The Total Environment **410**(411): 102-111.
- Zavaleta, J., D. B. Chinchilla, et al. (2007). "Partial filling multiple injection affinity capillary electrophoresis (PFMIACE) to estimate binding constants of receptors to ligands." Talanta **71**(1): 192-201.