

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO - UNIGRANRIO
INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA –
INMETRO
CENTRO UNIVERSITÁRIO ESTADUAL DA ZONA OESTE - UEZO
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA
TRANSLACIONAL

Ingrid Gomes Veras

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DE METIL-, ETIL- PROPIL- E
BUTILPARABENO SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS, UMA ABORDAGEM
BASEADA NA SEGURANÇA DE USO EM COSMÉTICOS.

Duque de Caxias

2025

Ingrid Gomes Veras

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DE METIL-, ETIL- PROPIL- E BUTILPARABENO SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS: ABORDAGEM BASEADA NA SEGURANÇA DE USO EM COSMÉTICOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia e Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Celso Barbosa de Sant'Anna Filho

Orientador

Duque de Caxias – RJ

2025

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO/AFYA

V476a

Veras, Ingrid Gomes.

Avaliação dos efeitos citotóxicos de Metil-, Etil-, Propil- e Butilparabeno sobre queratinócitos humanos, uma abordagem baseada na segurança de uso em cosméticos / Ingrid Gomes Veras.

xv, 80 f. : il.

Dissertação (mestrado em Biomedicina) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy, Escola de Ciências da Saúde, 2025.

“Orientador: Profº. Celso Barbosa Sant’Anna Filho”.

Bibliografia: f. 56-80.

1. Biomedicina. 2. Parabenos. 3. Queratinócitos. 4. Estresse oxidativo. 5. Proliferação celular. 6. Cosméticos - Segurança. I. Sant’Anna Filho, Celso Barbosa. II. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy/Afya. III. Título.

CDD – 616.5

Ingrid Gomes Veras

**EVALUATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF METHYL-, ETHYL-,
PROPYL-, AND BUTYLPARABEN ON HUMAN KERATINOCYTES: A SAFETY-
BASED APPROACH FOR COSMETIC USE**

**Master thesis submitted as partial fulfilment of
the requirements for the Degree of Master of
Science in the Postgraduate Program in
Translational Biomedicine at the University of
Grande Rio, National Institute of Metrology,
Quality and Tecnology and West Zone State
University Center.**

Celso Barbosa de Sant'Anna Filho

Advisor

Duque de Caxias, RJ

2025

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



ATA DE EXAME DE QUALIFICAÇÃO DE DISSERTAÇÃO

Às 08:45 horas, do dia 25 de abril de 2025, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de Defesa da Dissertação do projeto intitulado “Avaliação dos efeitos citotóxicos de metil-, etil-, propil- e butilparabeno sobre queratinócitos humanos baseado na segurança de uso em cosméticos”, de autoria de Ingrid Gomes Veras, aluna do Mestrado Acadêmico, sob orientação do Professor Celso Barbosa de Sant’Anna Filho. A sessão foi aberta pelo Prof. Leonardo da Cunha Boldrini, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof Wanderson de Souza e Profa. Emile Barrias. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **SATISFATÓRIAS**.

O presidente declarou a mestranda Ingrid Gomes Veras **APROVADA**, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.



Documento assinado digitalmente

LEONARDO DA CUNHA BOLDRINI PEREIRA

Data: 08/07/2025 15:44:03-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Duque de Caxias, 25 de abril de 2025.

Prof. Dr. Leonardo da Cunha Boldrini

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO

Presidente da banca



Documento assinado digitalmente

WANDERSON DE SOUZA

Data: 19/08/2025 15:52:34-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Wanderson de Souza

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO

Emile Santos Barrias

Inmetro/DIMAV

Matrícula SIAPE: 1896357

Emile J. Barrias

Profa. Dra. Emile Barrias

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO

Sergian Vianna Cardozo

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo

Coordenador Geral

Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional - BIOTRANS

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



(i) Aprovado com Ressalvas e Modificações

Comentários:

Não se aplica.

Presidente:

DEDICATÓRIA

À minha amada filha, Stela.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por todas as bênçãos em minha vida e pela capacidade de raciocínio.

A minha família, em especial minha filha, por sempre me incentivar a novas conquistas e a me tornar uma pessoa melhor, todos os dias.

Aos meus amigos Deborah, Juliana, Thais, Bruno e Mike por me apoiarem na vida e principalmente durante esse processo.

Ao meu orientador Celso Sant'Anna, pelo apoio, por toda dedicação e principalmente pela paciência ao longo da pós-graduação.

As minhas amigas e colegas de grupo Nathalia, Isabel e Michelle que me acompanharam desde o processo de seleção, obrigada pelo companheirismo e toda ajuda.

Os meus colegas de grupo Verônica, Fernanda, Julia, Lilian, Manuella por me ajudarem em tarefas do laboratório até mesmo o fornecimento de insumos e orientações. E principalmente a Beatriz Kopke e Beatriz Lima por me ajudarem a iniciar os ensaios.

Os técnicos do laboratório Flávio e Claudio, muito obrigada pelas discussões científicas e orientações que me ajudaram muito no desenvolvimento sobre o meu projeto.

Aos meus colegas de turma Dallila e Danilo pela ajuda nos estudos e nos insumos necessários para a elaboração do trabalho.

A todos do prédio 47.

Durante esse tempo de desenvolvimento desta pesquisa obtive de cada um aprendizado que serão levados para minha vida, tanto profissional quanto pessoal. E por isso serei sempre muito grata a todos.

EPÍGRAFE

"Há poesia no mundo real.

A ciência é a poesia da realidade."

(Richard Dawkins)

"Cada parte do aprendizado é uma pequena morte. Cada parte de uma nova informação desafia um conceito anterior, forçando-o a se dissolver no caos antes que renasça como algo melhor. As vezes esses detalhes quase nos destroem. Em situações assim, podemos nunca nos recuperar e, se conseguirmos, mudaremos muito."

(Jordan B. Peterson)

RESUMO

Os parabenos são ésteres do ácido p-hidroxibenzóico amplamente utilizados como conservantes em cosméticos, produtos de higiene pessoal e farmacêuticos, devido à sua comprovada ação antimicrobiana e à estabilidade em formulações. Apesar de sua popularidade industrial, preocupações crescentes sobre seus possíveis efeitos adversos à saúde humana têm incentivado pesquisas sobre sua toxicidade, especialmente no tecido cutâneo, onde o contato direto e prolongado é mais frequente. Evidências sugerem que os parabenos podem induzir efeitos estrogênicos, danos celulares e estresse oxidativo, motivando a necessidade de compreender seus impactos em nível celular. Este estudo teve como objetivo investigar a citotoxicidade e os efeitos pró-oxidativos dos principais parabenos utilizados em formulações comerciais — metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno — sobre queratinócitos humanos (linha HaCaT), em diferentes concentrações (0,07 a 2,5 µg/mL) e tempos de exposição (24h, 48h e 72h). Foram realizados ensaios de viabilidade celular, ensaio de MTT para avaliar a atividade metabólica, ensaio de liberação de LDH como marcador de integridade da membrana celular, análise de espécies reativas de oxigênio (ROS) para mensurar o estresse oxidativo, além do cálculo do tempo de duplicação da população celular (TDDP) como parâmetro proliferativo. Os resultados demonstraram um padrão de resposta tempo e dose-dependente. Nas primeiras 24 horas, os efeitos foram menos pronunciados, com algumas concentrações induzindo inclusive leve aumento da viabilidade celular, possivelmente associado a um efeito proliferativo transitório. No entanto, a partir de 48h e, mais acentuadamente em 72h, observou-se redução significativa da viabilidade celular nas concentrações mais elevadas. O aumento expressivo na liberação de LDH após 72h em concentrações elevadas confirmou a perda da integridade da membrana plasmática, enquanto o aumento na produção de ROS, especialmente em células expostas ao propilparabeno e butilparabeno, sugere que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade induzida por esses compostos. Esses achados foram corroborados pela análise do tempo de duplicação celular, que demonstrou significativo prolongamento do TDDP após 72 horas de exposição, indicando inibição da proliferação celular. Esses resultados não apenas corroboram dados da literatura que associam os parabenos de cadeia longa à maior toxicidade celular e potencial estrogênico, como também oferecem novas evidências sobre seus efeitos prejudiciais em células epiteliais humanas. Considerando a ampla exposição cutânea aos parabenos por meio de produtos de uso diário, os achados deste estudo sugerem que a segurança

do uso contínuo desses compostos deve ser reavaliada, especialmente em populações mais sensíveis.

Palavras-chave: Parabenos; Queratinócitos; Toxicidade cutânea; Estresse oxidativo; Proliferação celular; Segurança cosmética; Citotoxicidade.

ABSTRACT

Parabens are esters of p-hydroxybenzoic acid widely used as preservatives in cosmetics, personal care products, and pharmaceuticals due to their proven antimicrobial activity and formulation stability. Despite their industrial popularity, growing concerns regarding their potential adverse effects on human health have stimulated research into their toxicity, particularly in skin tissue, where direct and prolonged contact is more frequent. Evidence suggests that parabens may induce estrogenic effects, cellular damage, and oxidative stress, reinforcing the need to understand their impacts at the cellular level. This study aimed to investigate the cytotoxic and pro-oxidative effects of the main parabens used in commercial formulations — methylparaben, ethylparaben, propylparaben, and butylparaben — on human keratinocytes (HaCaT cell line), at different concentrations (0.07 to 2.5 $\mu\text{g/mL}$) and exposure times (24h, 48h, and 72h). Cell viability assays, the MTT assay to evaluate metabolic activity, the LDH release assay as a marker of membrane integrity, and reactive oxygen species (ROS) analysis to measure oxidative stress were conducted, along with the calculation of population doubling time (PDT) as a proliferation parameter. The results demonstrated a time- and dose-dependent response pattern. In the first 24 hours, the effects were less pronounced, with some concentrations even inducing a slight increase in cell viability, possibly associated with a transient proliferative effect. However, from 48 hours onwards — and more notably at 72 hours — a significant reduction in cell viability was observed at higher concentrations. A marked increase in LDH release after 72 hours at elevated concentrations confirmed the loss of plasma membrane integrity, while increased ROS production, particularly in cells exposed to propylparaben and butylparaben, suggests that oxidative stress is one of the main mechanisms involved in the toxicity induced by these compounds. These findings were supported by the population doubling time analysis, which showed a significant extension of PDT after 72 hours of exposure, indicating inhibition of cell proliferation. These results not only corroborate existing literature associating long-chain parabens with greater cytotoxicity and estrogenic potential, but also provide new evidence of their harmful effects on human epithelial cells. Considering the widespread dermal exposure to parabens through daily-use products, the findings of this study suggest that the safety of continuous use of these compounds should be re-evaluated, especially in more sensitive populations

Keywords: Parabens; Keratinocytes; Skin toxicity; Oxidative stress; Cell proliferation; Cosmetic safety; Cytotoxicity

LISTA DE abreviações

® - Marca registrada

™ – Do inglês, *Trade Mark*, marca comercial

°C - graus célsius

µL - Microlitro

µm – Micrómetro

µg - Micrograma

mg - Miligrama

ng - Nanograma

kg - Quilograma

µM - Micromolar

M – Mol

mL- Mililitros

nm – Nanômetros

CO₂ – Gás carbônico

pH – Potencial hidrogênico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

FDA – Food and Drug Administration

SCCS – Scientific Committee on Consumer Safety

Q.S.P. – Quantidade suficiente para

INCA- Instituto Nacional do Câncer

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

IC₅₀ - Do inglês, *Inibitory Concentration of 50%*, concentração inibitória de 50%

IC – Índice celular

ROS – Espécies reativas de oxigênio

DMEM- Do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, meio modificado Eagle Dulbecco

DH – Do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose*

SFB- Soro fetal bovino

PBS – Solução de salina tamponada com fosfato

HCA - Análise Celular Multiparamétrica

HACAT – Linha celular queratinócitos humanos adultos

DMSO - Dimetilsulfóxido

MTT - Metiltiazolil tetrazólio (4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-Brometo de Difeniltetrazólio

LDH – Lactato desidrogenase

DNA - Do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*, Ácido desoxirribonucleico.

RNA – Do inglês, *Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

DHE - Dihydroethidium

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	1
1.1 Propriedades Químicas e Mecanismo de Ação dos Parabenos	2
1.2 Mecanismo De Ação Dos Parabenos em Microorganismos.....	5
1.3 Exposição Humana e Absorção dos Parabenos.....	6
1.4 Toxicidade Associada aos Parabenos	8
1.4.1 Alterações Endócrinas Associadas à Carcinogênese.....	8
1.4.2 Fatores De Influência e Outras Correlações.....	10
1.5 Regulamentações e Controvérsias	10
1.5.1 ANVISA.....	11
1.5.2 Comitê Científico de Segurança do Consumidor – SCCS	13
1.5.3 Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América	13
1.6 Concentrações de Parabenos em Produtos em Geral	14
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Cultivo de Células Epiteliais de Queratinócitos (HaCaT).....	19
4.2 Determinação da Curva de Crescimento	19
4.3 Análise e Preparo dos Compostos dos Parabenos	19
4.4 Viabilidade Celular.....	20
4.4.1 Determinação da Taxa de Crescimento e do Tempo de Duplicação da População Celular	21
4.5 Ensaio de Viabilidade por Redução de MTT	21
4.6 Ensaio de Atividade de Lactato Desidrogenase (LDH).....	22
4.7 Análise da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	22
4.8 Monitoramento Celular em Tempo Real por Impedância Elétrica.....	23
4.9 Análise Morfológica por Microscopia	24
4.10 Análises Estatísticas.....	24
5. RESULTADOS	25

5.1 Curva de Crescimento	25
5.1.1 Determinação da Taxa de Crescimento e Tempo de Duplicação (TDDP)	26
5.2 Viabilidade por HCA	29
5.3 MTT e LDH	35
5.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	37
5.5 Monitoramento Celular em Tempo Real por Impedância Elétrica	40
5.6 Análise Morfológica da Linhagem HACAT Após Exposição aos Parabenos por Microscopia Óptica	43
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmulas estruturais dos principais parabenos encontrados em formulações cosméticas.....	3
Figura 2 - Atividade estrogênica na pele	7
Figura 3- Mercado de beleza e cuidados pessoas.....	12
Figura 4 - Curva de Crescimento.....	25
Figura 5 – Taxa de crescimento da HACAT	27
Figura 7 - Imagens representativas do ensaio de viabilidade HCA das células HACAT..	35
Figura 8 – IC50 dos parabenos após 72h de cultivo.	Erro! Indicador não definido.
Figura 9 – Ensaio de redução de MTT..	35
Figura 10 – Os parabenos não alteraram a liberação de LDH nas células HACAT	37
Figura 11- Conjunto de microeletrodos de ouro.....	40
Figura 12 - Monitoramento em tempo real da adesão e proliferação da HACAT por impedância elétrica.....	43
Figura 13 – A morfologia da linhagem HACAT não é alterada após 24h de exposição aos parabenos..	45
Figura 14 - Morfologia dos queratinócitos após 48 horas de exposição aos parabenos...46	
Figura 15 - Morfologia da linhagem HACAT após 72 horas de interação com parabenos.	47

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1 - Formulações farmacêuticas	2
Tabela 2 - Propriedades dos principais parabenos para formulações cosméticas	4
Tabela 3 - Estimativa de exposição dérmica por cosméticos	16
Tabela 4- Taxa de crescimento em 48h da HACAT	27
Tabela 5 – Taxa de crescimento em 72h da HACAT	28
Tabela 6 – Tempo de duplicação da população (TDDP) da HACAT em 48 horas.	28
Tabela 7 – Tempo de duplicação da população (TDDP) da HACAT em 72 horas.	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Há registros do uso de cosméticos a mais de 30.000 anos. Seu uso era dividido entre tintas para pinturas em pedras e pinturas corporais para rituais. Ao longo do tempo esses produtos foram refinados e seu uso altamente difundido em todo o mundo, sendo dividido e especificado para cada necessidade de quem o usa, como produtos para cabelos, corporais, maquiagem, cuidados em geral (QUERINO; SILVA, 2018) (AUBERT *et al.*, 2012). Ao longo do tempo, a incorporação de minérios e outros ativos químicos buscando diferentes efeitos cosméticos entraram em conflito com a baixa durabilidade natural de tais materiais ainda mais sofrendo contaminação cruzada à microbiota natural da pele (QUERINO; SILVA, 2018). Viu-se então a necessidade de introduzir ativos conservantes a esses produtos com a finalidade de aumentar a durabilidade e a resistência a fungos e bactérias nestes produtos (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Os conservantes, além de proteger o produto contra a deterioração, são essenciais para assegurar a segurança do consumidor, evitando danos à saúde (HOPPE, 2017). E nas formulações cosméticas, as substâncias que mais causam dermatites de contato e alergias, estão os parabenos (JEWELL *et al.*, 2007).

Devido sua propriedade físico-química favorável, como pequenos cristais incolores, sem cheiro ou sabor, sua atividade sob uma ampla faixa de pH e boa compatibilidade após mistura com diversas matérias-primas, os parabenos são os ingredientes mais prevalentes, depois da água, nos cosméticos, produtos de cuidados pessoais e na formulação de diversos fármacos (JANJEA *et al.*, 2007). No passado, também faziam parte da composição de injeções e preparações oftalmológicas (PETRIC; RUZIC; ZUNTAR, 2021; JEWELL *et al.*, 2007). São encontrados em preparações tópicas comumente associados a cosméticos, entretanto, alguns parabenos são facilmente encontrados em diversas formulações medicamentosas atualmente (Tabela 1) (PETRIC *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Formulações farmacêuticas com o uso de metilparabeno e propilparabeno

Aplicações	Concentração (%)	
	Metilparabeno	Propilparabeno
Injeções (i.m.; i.v.; s.c.)	0,065-0,25	0,005-0,2
Soluções inalantes	0,025-0,07	0,015
Injeções intradérmicas	0,10	0,02-0,026
Soluções nasais	0,033	0,017
Preparações oftalmológicas	0,015-0,02	0,005-0,01
Soluções orais e suspensões	0,015-0,02	0,01-0,02
Preparações retais	0,1-0,18	0,02-0,1
Preparações tópicas	0,02-0,3	0,01-0,6
Preparações vaginais	0,1-0,18	0,02-0,1

i.m. - intramuscular; *i.v.* - intravenoso; *s.c.* - subcutâneo.

Fonte: PETRIC *et al.*, 2021

1.1 Propriedades Químicas e Mecanismo de Ação dos Parabenos

Como descrito por Darbre e colaboradores (2004), os parabenos são compostos usados amplamente em produtos farmacêuticos, alimentos e em beleza e higiene pessoal por sua ação conservante. Atuam inibindo a proliferação de bactérias, leveduras e fungos, e não exercem interação com outros compostos químicos da fórmula presente nos produtos por possuir uma alta estabilidade química, além de ser considerados biodegradáveis, ter baixo custo de comercialização e aceitação regulatória (BŁĘDZKA *et al.*, 2014). A obtenção dos compostos é devido a uma reação de esterificação do ácido p-hidroxibenzoico (pHBA) com álcool em meio ácido. São compostos de características incolor e inodoro, sendo resistentes a diferentes faixas de pH e variadas temperaturas (LAKERAM, 2007; TAVARES & PEDRIALI, 2011).

Os parabenos encontrados com mais frequência em produtos incluem o metilparabeno, no qual é o mais comum, com ampla atividade contra bactérias e fungos; o etilparabeno é muito eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; propilparabeno é o menos utilizado, mas possui boa atividade contra fungos e o butilparabeno é o menos eficaz em comparação aos parabenos anteriores, entretanto possuem boa solubilidade em óleos. O comprimento de sua cadeia alquila aumenta seu potencial antibacteriano e a dependência da quantidade de produtos químicos necessários para dissolver-se na água também o influenciam. Por outro lado, parabenos de cadeia curta, como butilparabeno (BuP), propilparabeno (PrP), etilparabeno (EtP)

e metilparabeno (MeP), são comumente usados na indústria (QUERINO & SILVA, 2018) (LU *et al.*, 2019). Na Figura 1 está ilustrando as estruturas químicas dos parabenos estudados neste trabalho. Seguindo seus nomes populares, respectivamente, ácido p-hidroxibenzóico (estrutura 1), metilparabeno (estrutura 2), etilparabeno (estrutura 3), propilparabeno (estrutura 4) e butilparabeno (estrutura 5).

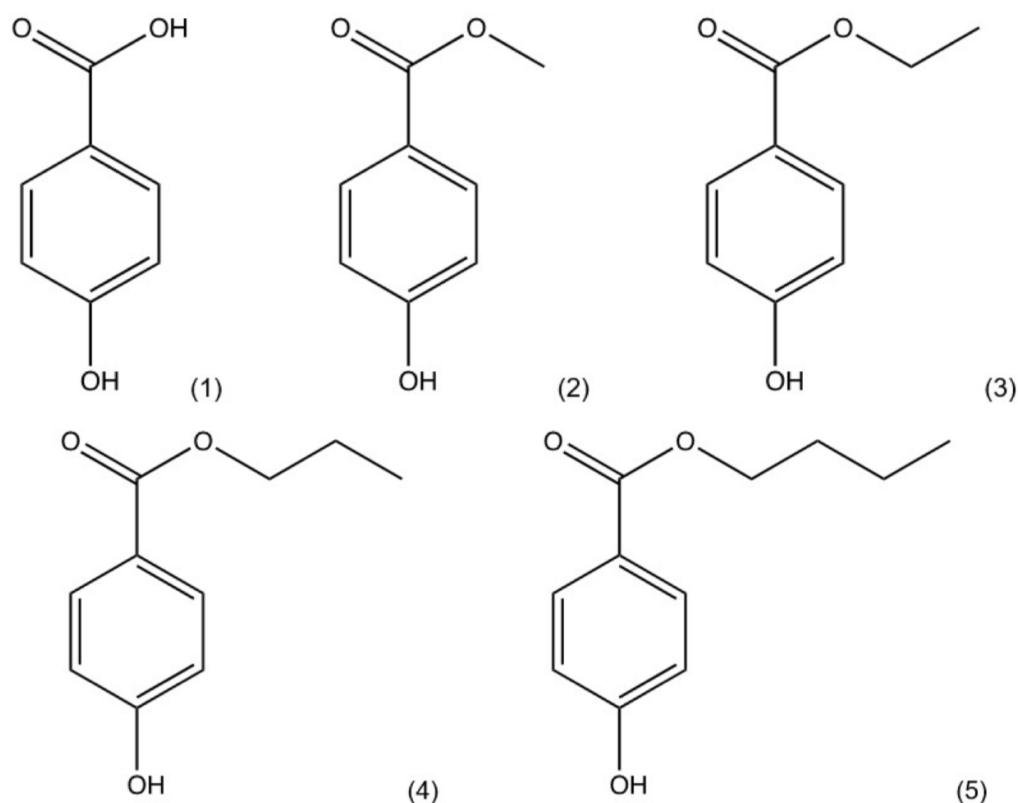


Figura 1 – Fórmulas estruturais dos principais parabenos encontrados em formulações cosméticas. (1) ácido 4-hidróxibenzóico; (2) 4-hidroxibenzoato de metila; (3) 4-hidroxibenzoato de etila; (4) 4-hidroxibenzoato de propila; (5) 4-hidroxibenzoato de burila. Fonte: Próprio autor, 2024.

Comercialmente os parabenos são encontrados em forma de cristais ou pós-cristalinos brancos, são compostos moleculares com características neutras, e apresentam ponto de ebulição de aproximadamente 270°C (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). Na tabela 2, exhibe as características físico-químicas dos parabenos e a solubilidade dos compostos em diferentes tipos de solvente.

Tabela 2 - Propriedades dos principais parabenos para formulações cosméticas.

	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Fórmula molecular	C8H8O3	C9H10O3	C10H12O3	C11H14O3
Peso molecular	152,15	166,17	180,20	194,23
Ponto de ebulição	270-280°C	297-298°C	-	-
Ponto de Fusão	131°C	116°C	96-97°C	68-69°C
Solubilidade	Metanol, etanol, propilenoglico, óleo de amendoim, acetona, benzeno, éter, tetracloreto de carbono, glicerol quente, água.	Metanol, etanol, propilenoglicol, óleo de amendoim, acetona, benzeno, éter, tetracloreto de carbono, glicerina, água.	Metanol, etanol, propilenoglicol, óleo de amendoim, acetona, benzeno, éter, tetracloreto de carbono, ligeiramente em água fervente, água.	Metanol, etanol, propilenoglicol, óleo de amendoim, acetona, benzeno, éter, tetracloreto de carbono, muito solúvel em clorofórmio, glicerina água.
Solubilidade em água	2,13 ± 0,12	1,16 ± 0,21	0,37 ± 0,03	0,158 ± 0,014

Fonte: TOXINET *et al.*, 2013.

Os parabenos já foram considerados seguros em humanos devido sua rápida metabolização e por não acumular no corpo humano. Contudo, é perceptível o aumento de estudos que relatam os efeitos prejudiciais tais como a disrupção endócrina, devido a um potencial interferência na produção de hormônios, como estrogênio e testosterona. Outros estudos também associaram a exposição a parabenos ao a elevação do risco de desenvolvimento de câncer de mama e próstata, além da toxicidade reprodutiva que podem

ocasionar em efeitos negativos na fertilidade feminina e masculina, como também no desenvolvimento do feto. Outro fator é o relato de alguns indivíduos apresentarem reações alérgicas tanto no local de aplicação quanto em outras regiões do corpo, identificados pelo surgimento de eritema, edemas e secreções (HOPPE; PAIS, 2017; Y. Zhao, Y. Liu, Y. Chen *et al.*, 2021).

1.2 Mecanismo De Ação Dos Parabenos em Microorganismos

Por possuir um mecanismo de ação antimicrobiana complexo, algumas partes ainda é desconhecido. Entretanto, é confirmado que microorganismos como bactérias e fungos quando expostos a presença dos parabenos podem sofrer algumas inibições dos processos celulares microbianos essenciais para sua sobrevivência. Uma delas é a inibição da síntese de DNA (INGOLF *et al.*, 1983; ZOUQI *et al.*, 2024), uma vez que os parabenos penetram na célula microbiana e se ligam a uma enzima importante para a replicação e transcrição do DNA, a DNA girase. Essa ligação interfere diretamente na síntese de RNA e proteínas, impedindo o crescimento e proliferação microbiana (NES & EKELUND, 1983).

Os parabenos também atuam na interrupção da função da membrana celular, alterando a permeabilidade da membrana (FREESE *et al.*, 1973; KAMARAJU *et al.*, 2008). O que leva ao influxo de íons e moléculas indesejáveis ao interior celular (MA & MARQUIS, 1996). Essa disfunção também pode fazer com que a célula microbiana perca compostos intracelular essenciais, como adenosina trifosfato e aminoácidos. Por suposto, também inibem a respiração celular inibindo as principais enzimas envolvidas na respiração como a piruvato oxidase e a ATP sintase. Logo, tem-se a redução da produção da principal fonte de energia, o ATP, comprometendo o metabolismo energético microbiano (FREESE *et al.*, 2008). Com a modulação da resposta ao estresse oxidativo induzido pelos parabenos resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), no qual o acúmulo de ROS pode danificar o DNA, proteínas e lipídios celulares, contribuindo para a morte celular microbiana (SALES *et al.*, 2022).

Contudo a atividade antimicrobiana pode ser influenciada por alguns fatores, como o tipo de parabeno usado na composição. O metilparabeno e propilparabeno geralmente possuem uma maior atividade antimicrobiana comparada aos demais. A espécie microbiana também é um fator, uma vez que a sensibilidade do microorganismo ao parabenos é uma variável considerável, já que Gram-positivas são mais sensíveis que Gram-negativas (FERNANDES *et*

al., 2013). O aumento da concentração do parabeno também está diretamente relacionada ao aumento da atividade microbiana tão quando as condições do pH que otimiza, em ambientes ácidos, a atividade dos parabenos (SALES *et al.*, 2022).

1.3 Exposição Humana e Absorção dos Parabenos

A saúde humana depende intrinsecamente da homeostase onde hormônios atuam como mensageiros químicos, regulam inúmeras funções fisiológicas e tal regulação é definida e organizada à nível molecular e bioquímico. Atualmente, grande parte das publicações tem reportado efeitos colaterais de diversos xenobióticos (PETRIC *et al.*, 2021). Trata-se de compostos químicos que podem modular diretamente a sinalização homeostática hormonal. O que levanta questionamentos sobre a segurança e a extensa exposição humana a compostos químicos que são classificados como disruptores endócrinos (EDCs) (PETRIC *et al.*, 2021; DARBRE, 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), do EDCs são substâncias que em sua maior parte são produzidas pelo homem e encontrados em diversos materiais como pesticidas, metais, aditivos em alimentos e produtos de cuidados pessoais. Estes são correlacionados a alterações na função reprodutiva masculina e feminina, pelo aumento da incidência de câncer de mama e até mesmo mudanças funcionais do sistema imune (WHO, 2013). O grupo éster dos parabenos está entre os EDCs após estudos científicos avaliarem seus efeitos e apontarem como disruptores endócrinos, após mais de 70 anos de uso em grande escala como preservativos (KAHN *et al.*, 2020).

No início foi considerado seguros por possuírem baixa toxicidade e sua rápida metabolização quando ingeridos, acreditava-se que não se acumulam no corpo (KANG *et al.*, 2016). Por outro lado, há diversos relatos em literatura afirmando que substâncias presentes em cosméticos, entre elas o parabeno, apresentam uma toxicidade significativa. Devemos entender que quando falamos sobre segurança de produtos cosméticos, não há 100% de segurança em nenhuma substância química (CHORILLI. M *et al.*, 2007). A exposição a agentes químicos está presente em todos os produtos na vida cotidiana moderna é diária. Há, também, uma estimativa quanto a exposição acumulativa por meio do uso dos produtos de cuidados pessoais juntos. Com isso, existem três métodos em ordem de complexidade crescente: soma simples; soma por padrão de uso e simulações de modelo probabilístico. Também é levando consideração o fator de retenção no qual a fração da quantidade de produto permanece na pele após a aplicação, dependendo do tipo de produto usado (PETRIC *et al.* 2021). A exposição humana a esses agentes pode ocorrer por inalação, ingestão dietética e absorção dérmica. Sendo a absorção dérmica a

cutâneo, por aplicação tópica em produtos cosméticos, penetram na pele e interagem com os tecidos. São absorvidos rapidamente pela camada córnea da pele onde a interação e metabolização são facilitados pelas propriedades físicoquímicas que possuem, como citado anteriormente. Em tecido subcutâneo, em injeções, por exemplo, evita-se o metabolismo de primeira passagem, causando um dano significativo (PRUSAKIEWICZ *et al.*, 2007). Tanto a exposição via oral quanto dérmica, ocorrem o processo de hidrolização do pHBA e ácido p-hidroxihipúrico (pHHA). O pHHA também é um produto de biotransformação de parabenos encontrados em animais e humanos, que por sua vez, também produzem pHHA endógeno, como um produto do metabolismo da tirosina (PETRIC *et al.*, 2021). Ainda é desconhecido até que ponto as concentrações micromolares de parabenos perturbam a atividade normal do estrogênio ou a função como mimetizador *in vivo* é desconhecido. Há uma hipótese que relaciona uma potencial atividade biológica à inibição da atividade enzimática da 17β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (enzima conversora de estrogênio e andrógeno), em concentrações micromolares que aumentariam a conversão do estradiol para a estrona mais fraca. Uma vez metabolizados, os parabenos podem ser encontrados no leite materno, placenta, fluido amniótico e tecido adiposo, indicando ampla exposição e seu efeito acumulativo (PARK *et al.*, 2019; POLLACK *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2020). Pesquisas em diversos países apontam que os parabenos e seus metabólitos são extensamente encontrados em águas mais superficiais, esgotos, sedimentos e mariscos, sendo frequentemente detectado em urina humana em amostras por todo o globo. (MA *et al.*, 2016; CZARCZYŃSKA-GOŚLIŃSKA *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2018; LIAO *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2019a).

Dados indicados em pesquisas relatam que a absorção dérmica *in vivo* de parabenos é mais efetiva do que se afirma, enquanto, no que diz respeito aos estudos de absorção dérmica *in vitro*, seguindo a avaliação do Comitê Científico de Segurança do Consumidor (SCCS) considera que a absorção dérmica dos parabenos possua baixa qualidade científica. Portanto, há absolutamente uma necessidade de mais estudos farmacocinéticos e toxicocinéticos, para dar uma resposta definitiva sobre esse assunto (EC, 2013; BERNAUER, 2023).

1.4 Toxicidade Associada aos Parabenos

1.4.1 Alterações Endócrinas Associadas à Carcinogênese

Estudo sugerem que devido a absorção de ésters alquímicos de ácido p-hidroxibenzóico, os parabenos, presentes em cosméticos, juntamente com o conceito de absorção via derme, é comumente associado ao seu potencial estímulo a atividade estrogênica e podem ser relacionados ao surgimento de câncer, além dos efeitos gemo tóxicos associados, e tem grande

suporte em muitos estudos publicados (DARBRE, 2003; DARBRE AND CHARLES, 2010; DARBRE & FERNANDEZ, 2013). Por apresentarem grupos que contém hidroxilas fenólicas, os estrógenos e parabenos possuem estruturas semelhantes, principalmente ao hormônio natural 17 β -estradiol, entrando nas células do tecido mamário e interagindo com o receptor estrogênico ocasionando a estimula ao da expressão genica e a proliferação descontrolada de células cancerígenas do tipo MCF7 (STRANGE, 2008; COELHO, 2013; MORAES *et al.*, 2008). Outro estudo descobriu que os parabenos inibem a aromatase, uma enzima envolvida em uma etapa limitante na taxa na esterodogênese, uma ordem de magnitude a menos do que a que induz a proliferação da linha celular de câncer de mama humana MCF-7, potencialmente indicando um efeito antiestrogênico mais potente. Também foi demonstrado que o butilparabeno e outros éters de parabenos são inibidores da aromatase, mas tal inibição exigiu a concentração micromolar de parabeno, entretanto foram encontradas anteriormente no tecido mamário humano concentrações em nanomolar. Portanto, a relevância toxicológica não pode ser determinada (PETRIC *et al.*, 2021).

O estudo dos efeitos dos parabenos nos níveis de mRNA e expressão de proteínas de ER- α (ESR1) e ER- β (ESR2) e do receptor de progesterona (PGR) concluem que, por meio desses efeitos na expressão e estimulação do receptor hormonal, o efeito estrogênico dos parabenos presumindo o início e a progressão do câncer de mama podem ser explicados (WRÓBEL & GREGORASZCZUK, 2014; PETRIC *et al.*, 2021). Importante ressaltar que a afinidade dos parabenos com os receptores irá depender do tamanho da cadeia lateral alquila e também das ramificações. E ainda assim, essa afinidade não se desfaz com a remoção do grupo alquila, uma vez que o ácido p-hidroxibenzoico é um metabólico comum de todos os parabenos e possui atividade estrogênica (STRANGE, 2008).

Em ratos, foi relatado a capacidade dos parabenos induzir o aumento das concentrações de 17 β -estradiol (E2), podendo prejudicar a implantação dos blastocistos sendo incompatível com o sucesso de uma gravidez. Células C3H10T1/2 que possuem morfologia fibroblástica, são funcionalmente semelhantes a células-trunco mesenquimais e foi relatado que podem diferenciar-se em adipócitos, osteócitos ou condrócitos, e na presença do butilparabeno promoveu a diferenciação adipogênica, inibindo a diferenciação osteocística e de cartilagem (ZHAO, LIU, CHEN *et al.*, 2021). Experimentos *in vivo* de linfócitos periféricos humanos cultivadores por Bayulken *et al.* (2019) revelou que parabenos são tóxicos e genotóxicos, o que pode indicar também genotoxicidade em potencial para humanos.

1.4.2 Fatores De Influência e Outras Correlações

Estudos associam a exposição a parabenos a sexo-dependência devido ao uso pessoal de produtos como cremes, loções, cleansers faciais e corporais que possuem parabenos em sua composição, especificamente metilparabeno e propilparabeno, que são encontrados em maiores concentrações. Como esperado, o consumo de cosmético em geral é maior entre as mulheres quando comparado aos homens, e por isso há uma probabilidade maior a exposição de parabenos ao longo da vida (GUO et al., 2014). Entretanto ainda podem ocorrer algumas alterações no metabolismo masculino devido a estrogênicidade dos parabenos, elevando o risco de uma incompleta masculinização na puberdade, o que resulta a diminuição da qualidade do esperma, e no sexo feminino, há risco de puberdade precoce, desenvolvimento mamário prematuro acentuando o risco de câncer de mama (COELHO, 20213).

Também segundo Guo e colaboradores (2014), associaram a diabetes gestacional e o encurtamento do ciclo menstrual em estudos epidemiológicos. E em estudos *in vitro* mostraram que os receptores hormonais foram afetados pela presença dos parabenos, levando ao desenvolvimento de processos carcinogênico os em células epiteliais mamarias. a exposição de longo prazo a parabenos aumentou a proliferação e migração de células de câncer de mama, e que até baixos níveis levaram a formação de tumores de câncer em modelos de xenotransplante.

Outro fator relacionado a alergias e dermatites, a metabolização dos parabenos à ácido p-hidroxibenzóico, do qual a estrutura química é análoga ao ácido acetilsalicílico. Mesmo com a reações anafiláticas incomuns aos parabenos, mas podem incitar urticária e angioedema em indivíduos com sensibilidade de intolerância aos salicilatos. O uso de outros conservantes também podem desencadear os mesmos sintomas (SONI; BURDOCK; TAYLOR, GREENBERG, 2000). Mesmo diante de todos esses estudos publicados ainda não são suficientes para determinar uma consequência entre a exposição dos parabenos em cosméticos e o câncer de mama. Tanto a distribuição dos parabenos nos tecidos, quanto os efeitos decorrentes a exposição a longo prazo não é totalmente esclarecida (NATIONAL CÂNCER INSTITUTE, 2016).

1.5 Regulamentações e Controvérsias

Parabenos são considerados compostos químicos de alto volume de produção na Europa, nos Estados Unidos da América e Ásia. Nos países nórdicos, o uso de parabenos registrados nas produtoras atingiu seu pico por volta de 2006/2007 e vem decaindo desde então devido a implementação de leis restritivas (WEI et al., 2020).

Apesar de a maior parte das agências reguladoras considerar os parabenos seguros de modo geral, alguns estudos publicados suscitam inquietações referente aos seus possíveis impactos negativos à saúde (HOPPE; PAIS, 2017). Com o surgimento de debates sobre regulamentações que englobam a segurança dos parabenos tendo como base os resultados científicos que ainda verificam resultados inconsistentes por ainda ser um tema que apresentam controvérsias. Com isso, agências regulatórias como a FDA dos Estados Unidos da América e a ANVISA no Brasil consideram os parabenos seguros quando usados dentro das concentrações recomendadas (Brasil, 2012; Brasil, 2013). Por outro lado, algumas organizações e consumidores defendem a utilização de conservantes naturais como uma alternativa ao uso dos parabenos na indústria atual.

Á vista disso, devido a tal rejeição pelo consumidor final, algumas indústrias farmacêuticas cosméticas optaram por substituírem os parabenos por novos compostos em suas formulações que conferiam as mesmas características conservantes (MORANDINI; GUEDES, 2021). O surgimento do termo Paraben Free, informa que o produto não contém este conservante em sua formulação, são destacadas em embalagens conferindo segurança ao consumidor (DEZA; GIMENEZ, 2017).

1.5.1 ANVISA

Segundo Milreau (2021), com o grande desenvolvimento industrial de cosméticos na segunda metade do século XX, o Brasil ocupou o 3º lugar entre os maiores mercados dos mundiais deste seguimento já no início do século XXI. Hoje, o Brasil é o quarto maior consumidor de cosmético do mundo, segundo dados da Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, publicado em julho de 2020 e ilustrado na figura 3. Com isso, visando a segurança dos consumidores tem-se intensificado ao longo do tempo (ABIHPEC, 2020).

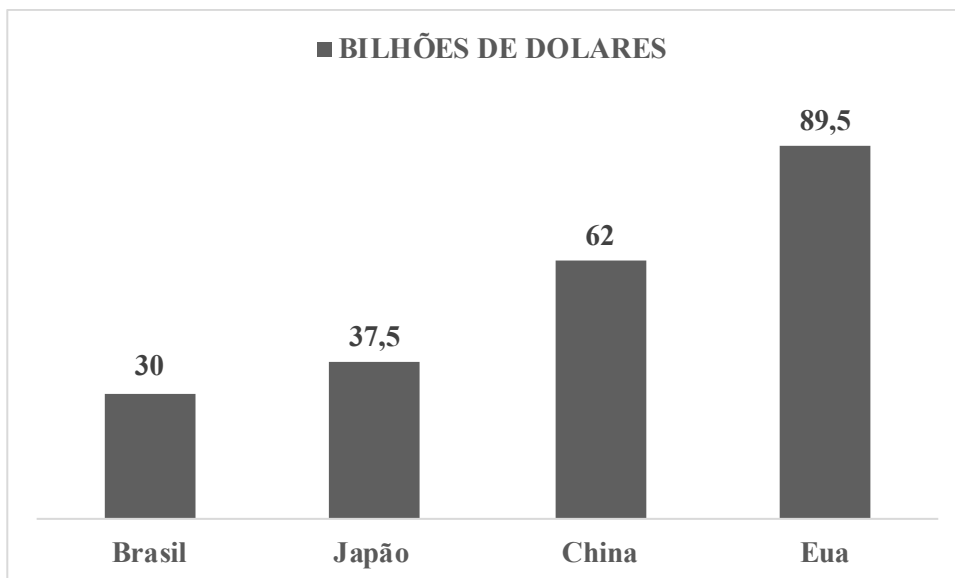


Figura 3- Mercado de beleza e cuidados pessoas. Valores de vendas do varejo ao consumidor no final de 2018. Fonte: ABIHPEC, 2020.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2001), os cosméticos são formulações que contêm substâncias como emolientes, propelentes, umectantes, antioxidantes, conservantes e emulsificantes, que podem ser de origem natural ou sintética. O uso de conservantes antimicrobianos foi introduzido nos anos de 1930, e o mais difundido industrialmente são os parabenos.

A ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – órgão governamental responsável por regulamentações no Brasil, publicou em setembro de 2001 a Resolução RDC nº 29, de 01 de junho de 2012 e republicada no Diário Oficial de 04/06/2012, no qual foi determinado a concentração máxima permitida de parabenos (ácido 4-hidroxibenzóico) e seus sais ésteres, para uso individual e para mistura em sais ou ésteres. A avaliação é baseada nos parâmetros de segurança em análise de risco de parâmetros toxicológicos dos ingredientes dos cosméticos (ANVISA, 2001).

Em 4 de agosto de 2021, foi publicado a RDC nº 528, que lista as substâncias de ação conservantes permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, incorporando a Resolução MC MERCOSUL no 35/20 e na União Europeia o Regulamento (EC) Nº 1223/2009, no qual limitam que seu uso máximo seja de 0,4% para cada parabeno e máximo de 0,8% totalizando todas suas categorias em Q.S.P 100% na formulação final do produto cosmético (BRASIL, 2020; União Europeia, 2009).

Quanto às exigências sobre a segurança do uso de cosméticos e eficácia dos produtos a legislação aplicável ao uso destes produtos são atualizados de acordo com o estágio de evolução dos cosméticos. Segundo dados divulgados pelo Sistema Nacional de Informação Tóxico Farmacológicas, foram relatados em 2009, 1.230 casos de intoxicação acometido por cosméticos no Brasil (RITO *et al.*, 2012).

1.5.2 Comitê Científico de Segurança do Consumidor – SCCS

Na União Europeia valem as diretrizes estabelecidas pelo Comitê Científico da Segurança do Consumidor (do inglês, *Scientific Committee on Consumer Safety - SCCS*), onde os parabenos são considerados seguros em uma concentração mínima de 0,4% para um único éster e de 0,8% para mistura de metilparabeno e etilparabeno assim como seus sais. Para os ésteres de propilparabeno e butilparabeno o limite da soma das concentrações individuais é de 0,14%. Entretanto, alguns cosméticos ainda usam butilparabeno e propilparabeno em concentrações <0,19% (SCCS, 2013; JANIGA-MACNELLY *et al.*, 2025). O SCCS vetou o uso de parabenos em produtos de cuidados pessoais designado a crianças menores de três anos. E confere a similaridade entre a legislação brasileira e europeia para as concentrações permitidas em produtos cosméticos (EUROPEAN UNION, 2014).

1.5.3 Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América

O FDA (US Food and Drug Administration) – Agência Governamental Reguladora de Comida e Medicamentos Americana – não possui diretrizes especiais no qual se aplicam apenas em conservantes em cosméticos. As leis tratam conservantes em cosméticos como outros ingredientes em cosméticos (FDA, 2020). A agência afirma que até o presente momento, segundo estudos sobre a segurança dos parabenos citados em publicações científicas, não há indicações sobre a ação nociva dos parabenos usados em cosméticos para a saúde humana. Entretanto, afirmam que continuaram avaliando dados nesta área e caso seja apontado algum risco para a saúde dos usuários, irão aconselhar o público e a indústria levando em conta as opções legais da agência para proteção da saúde e bem-estar dos consumidores (FDA, 2020).

Entretanto, o regulamento que se enquadra a cosméticos é a Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos de 1938, que é fórmula da pra a rotulagem e segurança dos produtos. Essa norma não etiqueta que os produtos e ingredientes presentes no cosmético seja aprovado pelo FDA, aplicado somente aos aditivos de cores (U.S CONGRESS, 1934; UNITED STATES OF AMERICA, 2018).

1.6 Concentrações de Parabenos em Produtos em Geral

Um estudo comparativo realizado em 2017 pela RIVM Report, com o propósito de revisar dados publicados e os reunindo em uma análise estimativa quantitativa da exposição aos éteres de parabenos em produtos de consumo diário como alimentos, medicamentos e produtos de cuidados pessoais em alguns países. Foi considerado a exposição agregada destes produtos, entretanto as suposições realizadas pelo estudo podem não ser completamente precisas. Foi assumido que todo alimento que poderia conter parabenos estava em sua concentração máxima permitida e a partir desta suposição, as estimativas de quanto as pessoas realmente consomem podem ser maiores do que as quantidades reais. A Ingestão Diária Aceitável (ADI, do inglês, *Acceptable Daily Intake*) usado como referência para a estimativa dos parabenos foi baseado no guia Diretrizes para Avaliação Simples da Ingestão de Aditivos Alimentares (tradução livre para *Guidelines for the Simple Evaluation of Food Additive Intake*) de 2014 pela JECFA no qual reporta o quanto de uma substância é seguro para o seu consumo diário sem que apresente riscos a saúde. Para o metilparabeno e etilparabeno o ADI é definido em 10.000 µg/kg de peso corporal por dia. A maior exposição estimada de parabenos foi encontrada em crianças francesas de 13 a 36 meses em que a ingestão é de 900 µg/kg por dia.

Em alimentos, a maior concentração média relatada de metilparabeno nos EUA foi de 14,1ng/g em grãos, na China, em vegetais foi de 81,1 ng/g. Em bebidas, a maior concentração média foi em etilparabeno em 8,53ng/g seguido do metilparabeno com uma concentração média de 4,74ng/g. Tais níveis encontram-se significativamente abaixo dos Níveis Máximos Permitidos da União Europeia (MPLs, do inglês, *Maximum Permitted Levels*) para alimentos. Entretanto a ingestão estimada dos parabenos para alimentos é considerada superestimada uma vez que não foram incluídos todos os alimentos na avaliação. Contudo o percentual para a exposição total de parabenos é inferior a 1% em alimentos comparados aos medicamentos e cuidados pessoais. A exposição geral de parabenos em medicamentos é substancial, representando 70-74% da exposição agregada estimada para o metilparabeno sendo de 3mg/kg peso corporal/dia. Seguindo as recomendações da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) para a estimação da exposição aos parabenos de forma oral, a maior concentração ao metilparabeno é de 2,3 mg/kg, levando a conclusão de que uma pessoa de 70 kg pode estar exposta a 161 mg de metilparabeno a depender do medicamento, por exemplo.

Quanto a exposição a produtos de cuidados pessoais, em adultos, é estimada que seja aproximadamente de 0,8 mg/kg para o metilparabeno, 0,2 mg/kg para o etilparabeno e de 0,3 mg/kg de peso corporal por dia. Para infantes e crianças os níveis estimados de exposição são

maiores, para o metilparabeno é de 1,01 mg/kg, já o valor estimado para o etilparabeno é de 0,20 mg/kg e do propilparabeno é de 0,40 mg/kg por peso corporal ao dia. Entretanto, estimar a exposição agregada de todos os produtos de cuidados pessoais é considerado complexo devido às variações de uso do produto e à presença dos parabenos, a frequência de uso destes produtos e a quantidade aplicada, os níveis de concentração dos parabenos em cada produto e a extensão da absorção através da pele. Em cosméticos, a exposição ao metilparabeno, etilparabeno e propilparabeno foram estimados em 2009 nos Estados Unidos e detalhados na tabela 3.

Tabela 3 - Estimativa de exposição dérmica por cosméticos

Produto	Cálculo (mg/kg peso corporal/dia)		
	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno
Blush	0,0006	0,0003	0,0002
Creme coporal	0,5367	0,5367	0,2683
Loção corporal	0,5367	0,5367	0,2683
Sabonete líquido	0,004	0,0004	0,0042
Condicionador	0,0043	0	0,0021
Lápis de olho	0,0002	0,0003	0,0007
Removedor de maquiagem para olhos	0,004	0	0,002
Sombras	0,0014	0,0007	0,0005
Pó facial	0,0033	0,0025	0,0017
Sérum facial	0,0084	0,0166	0,0083
Cleanser facial	0,0167	0	0,01
Máscara facial	0,1333	0	0
Creme hidratante facial	0,0533	0,0533	0,0267
Base líquida	0,07	0,4	0,05
Modelador capilar	0,042	0,0008	0,0005
Loção para mãos	0,12	0,1167	0,06
Spray fixador	0,0068	0	0
Batom	0,0289	0	0,027
Máscara de cílios	0,0013	0,0008	0,0005
Creme noturno	0,0267	0,0267	0,0133
Shampoo	0,0055	0	0,0055
Tônico	0,0007	0	0
Creme para olheiras	0,0067	0,005	0,0083
Exposição agregada resumida	1,6114	1,7047	0,7976

Fonte: COWAN-ELLSBERRY & ROBISON, 2009

2. JUSTIFICATIVA

Os parabenos são amplamente usados como conservantes em comida, medicamentos e principalmente cosméticos – incluindo desodorantes, cremes faciais e corporais, sprays corporais, protetores solares - usados mundialmente e diariamente, devido à sua eficácia antimicrobiana e estabilidade química. A crescente exposição humana aos parabenos tem levantado preocupações quanto aos seus possíveis efeitos ao metabolismo. Esses compostos podem atravessar barreiras biológicas e interagir com células epiteliais, potencialmente impactando sua viabilidade e funcionalidade. No entanto, estudos recentes indicam que esses compostos podem atuar como desreguladores endócrinos e afetar processos celulares essenciais, levantando preocupações quanto à segurança de sua exposição prolongada. Embora diversos estudos tenham avaliado os efeitos dos parabenos em diferentes modelos biológicos, ainda existem lacunas significativas no entendimento de seus impactos específicos sobre células da epiderme humana, especialmente em condições que mimetizam exposições repetidas e de longo prazo. Dentre as linhagens celulares utilizadas para avaliação toxicológica, os queratinócitos humanos imortalizados HACAT são um modelo adequado para investigar os efeitos dos parabenos na pele, pois reproduzem características fisiológicas e morfológicas da epiderme humana.

Diante disso, a presente pesquisa busca preencher essa lacuna ao investigar a viabilidade celular de queratinócitos humanos imortalizados (HACAT) expostos a diferentes tipos de parabenos, considerando variações na concentração e no tempo de exposição. O uso desse modelo *in vitro* é particularmente relevante, pois os queratinócitos desempenham um papel fundamental na integridade da barreira cutânea e estão diretamente expostos a produtos contendo parabenos. Dessa forma, a análise da toxicidade desses compostos nessas células pode fornecer dados essenciais para a compreensão de possíveis efeitos adversos decorrentes do uso contínuo de produtos cosméticos e farmacêuticos.

Além da importância científica, este estudo tem um caráter translacional, pois seus achados podem contribuir diretamente para a formulação de políticas regulatórias e estratégias de desenvolvimento de produtos mais seguros. Os dados obtidos podem subsidiar a reformulação de cosméticos e fármacos, incentivando a substituição ou a restrição do uso de determinados parabenos, caso sua toxicidade seja comprovada. Assim, a pesquisa não apenas avança o conhecimento sobre os efeitos celulares desses conservantes, mas também tem potencial para impactar a saúde pública ao embasar decisões regulatórias e promover alternativas mais seguras para a população.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Análise do efeito citotóxico em queratinócitos não tumorais diante a exposição de metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno, buscando compreender seus possíveis impacto na viabilidade celular e potenciais riscos associados ao uso tópico em produtos cosméticos.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a viabilidade celular em diferentes concentrações dos compostos testados (0,07 a 2,5 mM) após 24, 48 e 72 horas de exposição;
2. Analisar a atividade metabólica mitocondrial das células tratadas por meio do ensaio de MTT, como indicador de funcionalidade celular.
3. Determinar a integridade da membrana plasmática através do ensaio de liberação de LDH, identificando possíveis danos estruturais induzidos pelos parabenos.
4. Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como marcador de estresse oxidativo e relacioná-la aos efeitos citotóxicos observados.
5. Calcular o tempo de duplicação da população celular (TDDP) para avaliar alterações no padrão proliferativo em função do tipo e concentração do parabeno.
6. Comparar os efeitos induzidos pelos diferentes parabenos, correlacionando suas características físico-químicas (como lipofilicidade) com os resultados biológicos observados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo de Células Epiteliais de Queratinócitos (HaCaT)

As células foram gentilmente cedidas pelo banco de células do Laboratório de Biologia de Células Eucariontes - LABIO do Instituto Nacional de Metrologia (Inmetro). Foram usadas queratinócitos humanos, de linhagem HACAT não tumoral. A linhagem foi utilizada nos ensaios com limite de 10 passagens em cultivo. As células, foram cultivadas em meio DMEM *High Glucose* (Sigma-Aldrich) com 10% de soro fetal bovino (Gibco™) e 1% de antibiótico (Penicillin-Streptomycin 10000U/mL). Após o descongelamento, as células foram mantidas em garrafas de 25 ou 75 cm² (Corning® T-25 ou Corning® T-75) e mantidas em estufa com atmosfera a 5% de CO₂ a 37°C até atingir a confluência. Após a confluência, as células foram ressuspensas pela ação da solução enzimática tripsina-EDTA em 1% (Gibco™, ref.: 25300054), por 2 a 5 minutos a 37°C.

4.2 Determinação da Curva de Crescimento

Para determinar o número ideal de células para a realização dos ensaios de viabilidade celular, foi realizado a curva de crescimento da linhagem HaCat, utilizando o cristal violeta. Inicialmente, as células em suspensão foram previamente contadas utilizando 10µL do corante vital Azul de Tripán, contadas na câmara de Neubauer. Em seguida, foram semeadas em placas de 96 poços (Corning® 3628) nas seguintes concentrações: 1x10³, 2,5x10³, 5x10³, 1x10⁴ e 2x10⁴ células/poço. Posteriormente, as células foram incubadas em meio de cultura DMEM *High Glucose* (Sigma-Aldrich), 10% de SFB (Gibco™) e 1% de antibiótico (Penicillin-Streptomycin 10000U/mL). Após 24h foi realizada a troca do meio de cultura. As células foram fixadas em etanol 100%, coradas por 10 minutos com cristal violeta a 0,5% em 20% de etanol e secas ao ar. Ao final, adicionaram-se 100 µL de metanol/poço para a análise a uma densidade óptica (DO) de 595 nm. O procedimento foi realizado para os tempos de 0, 24, 48 e 72 horas após a troca do meio de cultura. A leitura de absorvância foi realizada no leitor de microplacas multimodal de absorvância Infinite® 200 PRO.

4.3 Análise e Preparo dos Compostos dos Parabenos

Os parabenos foram diluídos em solução de DMSO a 0,1% para a realização do solução estoque no qual todas as concentrações encontram-se diluídas de acordo com o peso molecular de cada parabeno, para que ao final resultem a concentração de 1M/mL. O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente orgânico amplamente utilizado em experimentos de cultura celular devido à sua capacidade de dissolver compostos hidrofóbicos e atravessar membranas celulares.

Entretanto, sua toxicidade é dose-dependente, sendo essencial utilizar concentrações que não comprometam a viabilidade celular. Estudos demonstram que concentrações de DMSO inferiores a 0,5% não apresentam efeitos citotóxicos significativos em diversas linhagens celulares (PICOLI *et al.*, 2015; FERNANDES LIMA *et al.*, 2024). Ainda, Shimabuko *et al.* (2021) investigaram os efeitos do DMSO em culturas de células da papila apical e constataram que concentrações de 0,1% não afetaram negativamente a atividade celular mesmo após 14 dias de exposição. Dessa forma, o uso de DMSO a 0,1% como solvente dos parabenos neste estudo é considerado seguro. Tal concentração é amplamente utilizada na literatura e não interfere nos parâmetros celulares analisados. Assim, os efeitos observados nas células HaCaT podem ser atribuídos aos parabenos testados, e não ao solvente.

Para a interação com o cultivo celular foram produzidos as soluções de trabalho em diferentes concentrações também de acordo com cada peso molecular para cada parabeno em uma faixa de trabalho de 0,07; 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5µg e em seguida diluídos em meio DMEM *High Glucose* para interação celular. A faixa de trabalho escolhida possui como base o guia da OECD TG 487 - *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test* (2016), no qual sugere um fator de diluição 2 para a definição das concentrações em testes de citotóxicos em células de mamíferos. Outras diretrizes como a OECD TG 473 - *In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test* e a OECD TG 129 - *Guidance on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses*, também foram utilizadas como referências.

4.4 Viabilidade Celular

A análise celular de alto conteúdo (HCA) foi utilizada para avaliar o efeito da citotoxicidade dos parabenos estudados. Para o plaqueamento, as células foram inoculadas em fase exponencial de crescimento em placas de fundo transparente de 96 poços (CLS4581-Corning®) a uma densidade de 5×10^3 células/poço. Após 24h, as células foram tratadas com os éteres de parabenos em concentrações que variaram de 0,07 a 2,5µg/mL. Nos tempos 24, 48 e 72h de tratamento com os parabenos (uma placa para cada tempo), as células foram coradas com 1µM Hoechst e 5µM do corante iodeto de propídeo (PI) em meio DMEM *High Glucose* por 15 minutos a 25°C. O sistema de análise celular de alto conteúdo GE IN Cell Analyzer 2000 (Cytiva) foi utilizado para gerar automaticamente imagens de fluorescência (objetiva de 10X, λ em Hoechst 461 nm, filtro DAPI, região espectral: 432 ± 48 nm e filtro Texas Red, região espectral: 620 ± 30 nm) de 9 campos aleatórios de cada poço. O controle negativo também foi incubado somente com o meio de cultura, e o controle positivo corresponderá às

células fixadas com Triton™ X-100 0,1%. Os seguintes parâmetros foram observados: (a) número de células Hoechst positivas, e (b) número de células PI positivas (mortas). Os gráficos dos resultados de HCA foram realizados utilizando as médias dos poços de cada condição experimental. Após a análise dos parâmetros pelo *software* In Cell Analyzer 1000 Workstation, foi adquirido através do *software* IN Cell Investigator microscopias por HCA. As análises estatísticas dos valores obtidos nos ensaios de viabilidade foram determinados através do *software* Graphpad Prism 8.

4.4.1 Determinação da Taxa de Crescimento e do Tempo de Duplicação da População Celular

A taxa de crescimento e o tempo de duplicação da população da HaCat foram estimados de acordo com SHERLEY *et al.* 1995. No qual, foi aplicado a fórmula a seguir para o cálculo da taxa de crescimento:

$$N_t = N_0 2^{ft}$$

Onde N_t = número total de células; N_0 = número inicial de células; f = taxa de crescimento e t = tempo de cultivo. A partir dos valores da taxa de crescimento, o tempo de duplicação da população foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$TDDP = \frac{\ln(2)}{f}$$

Onde TDDP = tempo de duplicação da população; \ln = logaritmo natural e f = taxa de crescimento.

4.5 Ensaio de Viabilidade por Redução de MTT

As células foram cultivadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços Millicell® EZ (Milipore Corp., Billerica, MA, USA) de fundo reto e, após adesão overnight, foram tratadas com os derivados de parabenos, nas concentrações de 0,07; 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,50 $\mu\text{g/mL}$, nos tempos de 24, 48 e 72h. Foi adicionado meio DMEM *High Glucose* (Sigma-Aldrich), suplementado a 10% de SFB (Gibco™) contendo 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) na concentração de 1,5 mg/mL em cada poço já tratado. O controle positivo de morte celular para o ensaio foi o procedido após incubação das células com Triton™ X-100 0,1% por 30 min em temperatura ambiente antes de iniciar o ensaio. As placas foram incubadas em estufa úmida por um período de três horas a 37°C e 5%

de CO₂. Após o período de três horas o sobrenadante foi retirado e utilizado para o teste de LDH, conforme descrito no item 4.6, e foi utilizado 100µL de dimetilsulfóxido a 0,1% (DMSO) para eluir os cristais de formazana. Para as leituras de absorvância utilizou-se o leitor de microplacas multimodal de absorvância Synergy™ HTX em comprimento de onda de 490 nm. Os dados obtidos foram normalizados em relação ao controle onde não houve tratamento e analisados através do programa GraphPad Prism 8 (San Diego, California, EUA).

4.6 Ensaio de Atividade de Lactato Desidrogenase (LDH)

A atividade de LDH foi analisada através de um kit comercial colorimétrico não radioativo, CytoTox 96® (Promega, Madison, WI, USA). Foi utilizado uma placa de 96 poços Millicell® EZ (Milipore Corp., Billerica, MA, USA) de fundo transparente onde foi depositado 30µL do sobrenadante do teste de MTT, e incubados com 30µL do substrato do LDH por 20 minutos na ausência de luz e em temperatura ambiente. O controle positivo de morte celular foi realizado através da incubação das células com Triton™ X-100 0,1% por 30 min em temperatura ambiente antes de iniciar o ensaio. Após esse período, foram adicionados 30µL da solução de parada (solução responsável por parar a reação) indicado no kit. O resultado colorimétrico foi obtido através do leitor de microplaca multimodal de absorvância Synergy™ HTX em comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram normalizados em relação ao controle positivo de morte celular e analisados através do software GraphPad Prism 8 (San Diego, California, EUA).

4.7 Análise da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Para avaliar se a interação com os parabens induz a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), a linhagem HACAT foi cultivada na concentração de 5×10^3 células/poço em 100 µL de meio DMEM *High Glucose*, em placa de poliestireno de 96 poços por 48 horas. Após esse período e antes do início do ensaio, a integridade da monocamada celular foi verificada em um microscópio óptico invertido. Em seguida, o meio de cultivo foi removido e as células foram lavadas com 200µL de PBS estéril. Foi acrescentado 200µL de solução com o corante fluorescentes Dihydroethidium (DHE) a 5µM em cada poço, e em seguida, a placa foi incubada em atmosfera com 5% de CO₂ e saturação de umidade a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas novamente com 200µL de PBS estéril, e adicionado 200µL de formaldeído a 4%. Após 20 minutos em temperatura ambiente, foi realizada outra lavagem com PBS, e as amostras foram armazenadas em igual volume da mesma solução-tampão a 4°C com proteção a luz até a análise de fluorescência. As amostras foram analisadas,

e as imagens digitais das células marcadas com os corantes foram obtidas utilizando o sistema de análise celular de alto conteúdo GE IN Cell Analyzer 2000 (Cytiva), utilizando o filtro Texas Red (Regiões espectrais: 597 ± 45 nm), para a obtenção de imagens do corante DHE. A partir de imagens de fluorescência obtidas, foram feitas as análises no software IN Cell Analyzer 1000 workstation (GE Healthcare Life Sciences), utilizando algoritmos de detecção automática de objetos e medição da intensidade de fluorescência para estimar modificações na produção de ROS pelas células tratadas. Foram analisadas cinco imagens por exposição, e em cada uma foi obtido o valor determinado e expresso como unidades relativas de fluorescência (RFU, do inglês *Relative Fluorescent Units*), expresso então como média e desvio-padrão.

4.8 Monitoramento Celular em Tempo Real por Impedância Elétrica

A HACAT foi plaqueada a uma densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços do tipo E-Plate View xCELLigence RTCA SP contendo microelétrodos de ouro fundidos com a superfície inferior da placa (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA), com potencial elétrico aplicado de 22 mV. O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, o qual instrui calibrar o sistema utilizando meio de cultura puro, e, em seguida, programar o instrumento para monitorar proliferação e citotoxicidade das células em tempo real e gerar valores de impedância elétrica a cada hora, por um período total de 96 horas. A exposição aos parabenos ocorreu após 24 horas após adesão overnight. As concentrações usadas de todos os parabenos foram na faixa de 0,07, 0,15, 0,31, 0,62, 1,25 e 2,50 $\mu\text{g/mL}$. A exposição permanecerá nas 72h subsequentes de monitoramento. Este método utiliza a impedância celular para avaliar pequenas diferenças de resposta das células frente a variados estímulos.

A impedância celular é representada pelo índice celular (IC), o qual é obtido pelo equipamento da seguinte forma: $IC = (\text{Impedância em um ponto } n \text{ de tempo} - \text{impedância na ausência de células}) / \text{valor nominal da impedância}$. O cálculo estatístico é obtido pela seguinte fórmula:

$$(CI) = (Z_i - Z_0) [\text{Ohm}] / 15[\text{Ohm}]$$

Onde:

- CI = Impedância celular

- Z_i = A resistência em um ponto de tempo individual

- Z0 = A resistência do branco

O índice celular normalizado foi determinado como índice celular em um ponto de tempo específico (CI_{ti}). Este, foi dividido pelo índice celular no ponto de tempo de normalização (CI_{nm_l_time}). Os dados obtidos foram gerados automaticamente e processados pelo programa xCELLigence RTCA Software Pro instalado no computador acoplado ao equipamento, para subsequente análise estatística, utilizando o software GraphPad Prism 8 (San Diego, California, EUA).

4.9 Análise Morfológica por Microscopia

4.9.1 Microscopia Óptica Invertida de Contraste de Fase

A avaliação morfológica da linhagem celular HACAT após o tratamento com diferentes concentrações de parabenos foi realizada através de obtenção de imagens por um software (ZEN Lite) acoplado ao Microscópio Óptico Invertido de Contraste de Fase (ZEISSTM Primo VertTM), nos períodos de 24, 48 e 72h após o tratamento. As imagens foram obtidas e os poços tratados nas concentrações de 0,07; 0,15; 0,31; 0,62; 1,25 e 2,5µg/mL com células cultivadas com DMEM *High Glucose* e SFB, para o controle negativo em ausência de parabenos com células viáveis e controle positivo para morte celular com células tratadas com TritonTM X-100 0,1% por 30 min.

4.10 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando intervalo de confiança de 95% no software GraphPad Prism 8. Os dados dos ensaios foram expressos como média ± desvio padrão. Os testes estatísticos utilizados foram: Anova one-way (ensaio de proliferação; LDH) ou Anova Two-way com pós-teste de Tukey (ensaio MTT). A significância estatística foi considerada quando $p \leq 0,05$. Os experimentos com células foram realizados em triplicatas independentes.

5. RESULTADOS

5.1 Curva de Crescimento

As análises por HCA foram utilizadas com a finalidade de determinar a densidade celular para as condições de tratamento dos ensaios a serem realizados. Em placas de 96 poços (Corning®) de fundo chato, foram feitas curvas de crescimento das linhagens HACAT em fase exponencial de crescimento. Cinco diferentes densidades foram analisadas 1×10^3 , $2,5 \times 10^3$, 5×10^3 , 1×10^4 e 2×10^4 células/poço.

Como resultado, as células HACAT apresentaram um crescimento baixo nas densidades 1×10^3 e $2,5 \times 10^3$. Por outro lado, o número de células na densidade 5×10^3 chegou à condição de confluência em 48h mantendo-se estável, sendo assim a densidade usada nos ensaios. ALVES & GUIMARAES (2019), descrevem que caso a quantidade de células na placa de cultivo exceda o limite de confluência adequado, não haverá o crescimento normal da monocamada e como consequência, as células entrarão em fase de morte, devido a falta de nutrientes e condições de vida necessários. Nas demais concentrações foram observados confluência dos poços após 48h mas a densidade celular era elevada impossibilitando testes de viabilidade.

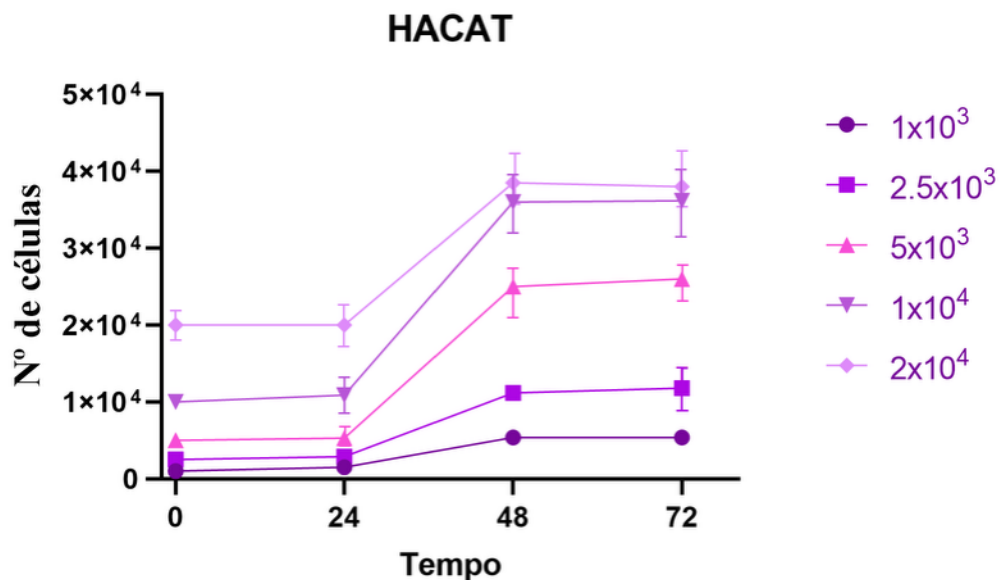


Figura 4 - Curva de Crescimento. A densidade de 5×10^3 demonstrou uma melhor confluência ao longo do tempo.

5.1.1 Determinação da Taxa de Crescimento e Tempo de Duplicação (TDDP)

Com o intuito de detalhar os efeitos dos diferentes tratamentos na viabilidade celular da HACAT, a taxa de crescimento e o tempo de duplicação foram estimados. As taxas de crescimento representam o número de vezes que as células se duplicam em um dia e o tempo de duplicação revela o tempo em que a população de células dobra, ambos estabelecidos após 48 e 72 horas de incubação. O cálculo do TDDP foi utilizado como uma métrica complementar para a avaliação da proliferação celular, considerando o número de células viáveis ao longo do tempo. Essa abordagem, embora menos comum em estudos com compostos cosméticos, é reconhecida na literatura como um indicador fisiológico relevante da dinâmica proliferativa celular (FINKEL & HOLBROOK, 2000; FREYTAG, 2020).

Os resultados demonstraram que a HACAT quando tratado com os éteres de parabenos não apresentaram diminuição na taxa de crescimento, inicialmente. Indicando uma estabilidade, e sugerindo que as concentrações testadas não interferiram de forma significativa o crescimento celular como demonstrado na figura 5 e detalhado na tabela 4 e 5. Entretanto, após 72h de exposição aos parabenos, pode ser notado reduções quando comparado aos valores obtidos em 48h, exceto pelo etilparabeno na concentração de 2,5 µg/mL, onde após 72h apresentou aumento da taxa de crescimento da HaCat.

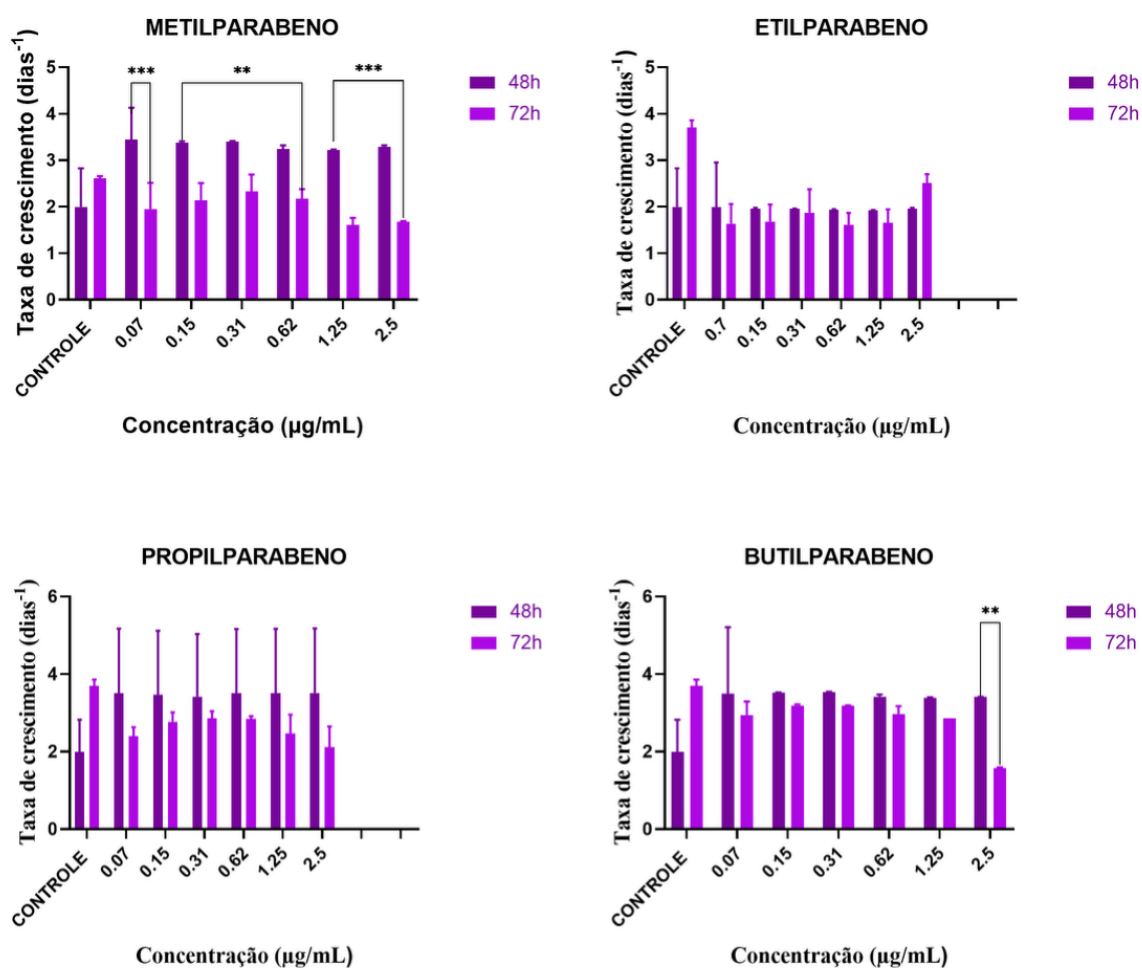


Figura 5 – Taxa de crescimento da HACAT após 48h de tratamento com parabenos com concentrações entre 0,07 à 2,5 µg/mL. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações, onde * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 (Anova One-way).

Tabela 4– Taxa de crescimento em 48h da HACAT

Tratamento (µg/mL)	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Controle	1.99	1.99	1.99	1.99
0,07	3.44	1.99	3.51	3.49
0,15	3.37	1.96	3.47	3.52
0,31	3.40	1.95	3.42	3.53
0,62	3.24	1.93	3.50	3.42
1,25	3.21	1.92	3.50	3.39

2,5	3.28	1.95	3.51	3.41
-----	------	------	------	------

Tabela 5 – Taxa de crescimento em 72h da HACAT

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Controle	3.70	3.70	3.70	3.70
0,07	1.95	1.63	2.40	2.94
0,15	2.14	1.68	2.77	3.19
0,31	2.32	1.87	2.85	3.19
0,62	2.17	1.61	2.84	2.97
1,25	1.65	1.65	2.47	2.85
2,5	1.65	2.50	2.11	1.57

O tempo de duplicação revela o tempo em que a população de células dobra em 48 e 72 horas. Foi estimado para a HACAT como apresentados na tabela 6 e 7, o menor tempo para duplicação em 48h, foi obtido o butilparabeno seguido do propilparabeno levando 4,7 horas para a duplicação da população celular. Em seguida, no tempo de 78h, os menores tempos seguem com o butilparabeno.

Tabela 6 – Tempo de duplicação da população (TDDP) da HACAT em horas após 48 horas.

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Controle	8,32	8,32	8,32	8,32
0,07	4,83	8,35	4,73	4,76
0,15	4,93	8,47	4,79	4,73
0,31	4,89	8,51	4,86	4,70
0,62	5,13	8,58	4,74	4,86
1,25	5,17	8,63	4,74	4,90
2,5	5,06	8,49	4,73	4,88

Tabela 7 – Tempo de duplicação da população (TDDP) da HACAT em horas após 72 horas.

Tratamento ($\mu\text{g/ml}$)	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Controle	4,49	4,49	4,49	4,49
0,07	8,89	10,53	6,95	5,68
0,15	7,88	10,14	6,02	5,21
0,31	7,22	9,21	5,83	5,20
0,62	7,68	10,44	5,84	5,54
1,25	10,37	10,20	6,86	5,82
2,5	9,91	6,65	8,13	10,54

O resultado do tempo de duplicação da população de HaCat entre os tempo de 48 e 72 horas revelou um comportamento tempo-dependente para todos os parabenos. Em geral, observou-se um aumento do TDDP após 72 horas de exposição. O metilparabeno apresentou um aumento progressivo do TDDP com o tempo, tendo destaque nas concentrações de 1,25 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$, com elevações de +5,20 e +4,85 horas, respectivamente assim como o propilparabeno que manteve a elevação gradual do TDDP em todas as concentrações. O butilparabeno promoveu o maior impacto negativo no TDDP, com um acréscimo de +5,66 horas na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. O etilparabeno também apresentou aumento do TDDP ente 48 e 72 horas, porém de forma sutil. No entanto, na concentração mais elevada (2,5 $\mu\text{g/mL}$), houve uma redução de -1,84 horas.

5.2 Viabilidade por HCA

A viabilidade celular foi determinada por HCA com a utilização do iodeto de propídio (PI) e Hoechst 33342. Para determinar a viabilidade celular da linhagem HACAT foram tratadas com os compostos de parabenos em diferentes concentrações, que variam de 0,07 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, nos tempos de 24, 48 e 72h.

Observou-se a redução da viabilidade ao longo do tempo e dependendo das concentrações e do tipo de parabeno apresentam-se mais significativas. Como observado na figura 6, todos os parabenos apresentam um aumento da toxicidade com o tempo em que a viabilidade celular geralmente diminui no tempo de 72h. Principalmente, quando tratado com propilparabeno e butilparabeno a partir da concentração de 0,62µg/mL, tendo uma redução de 71,59 e 85,72% respectivamente.

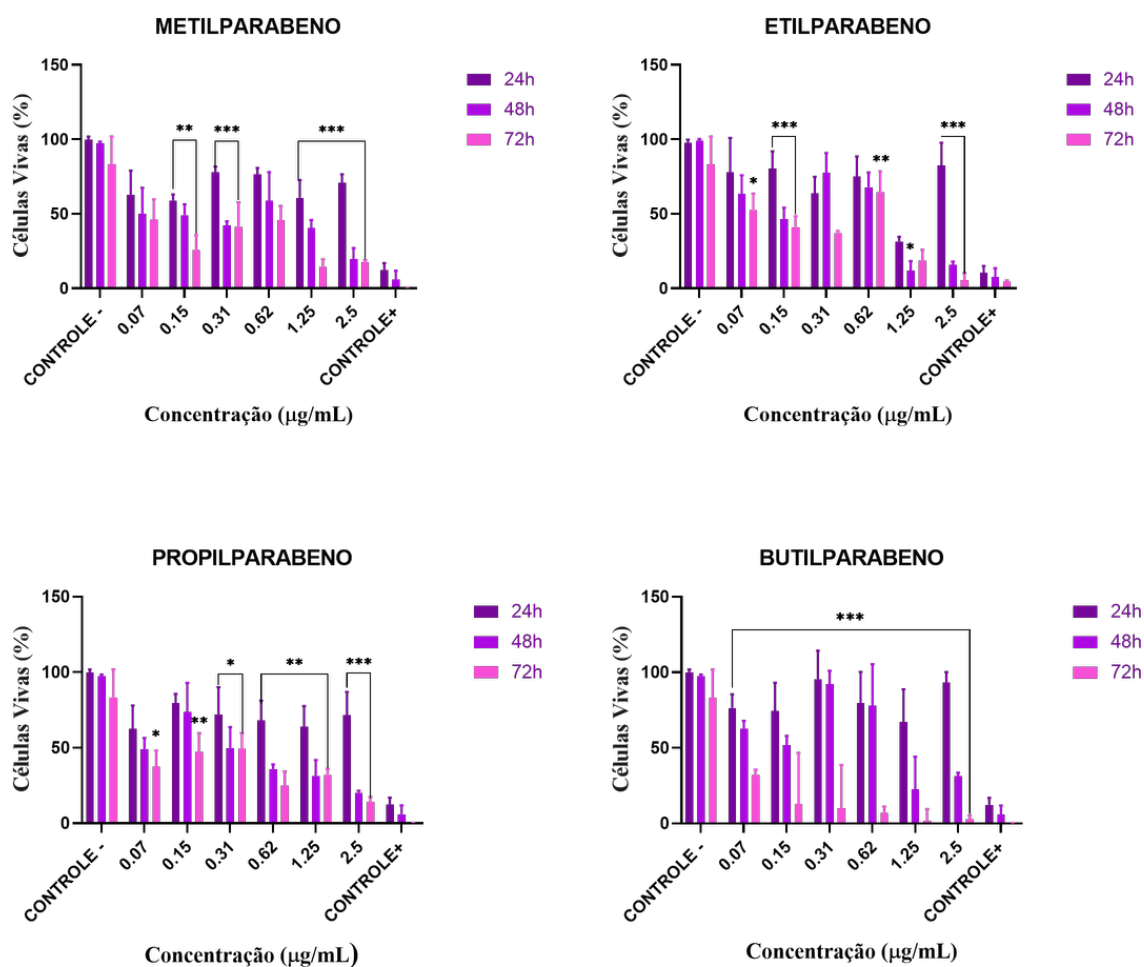


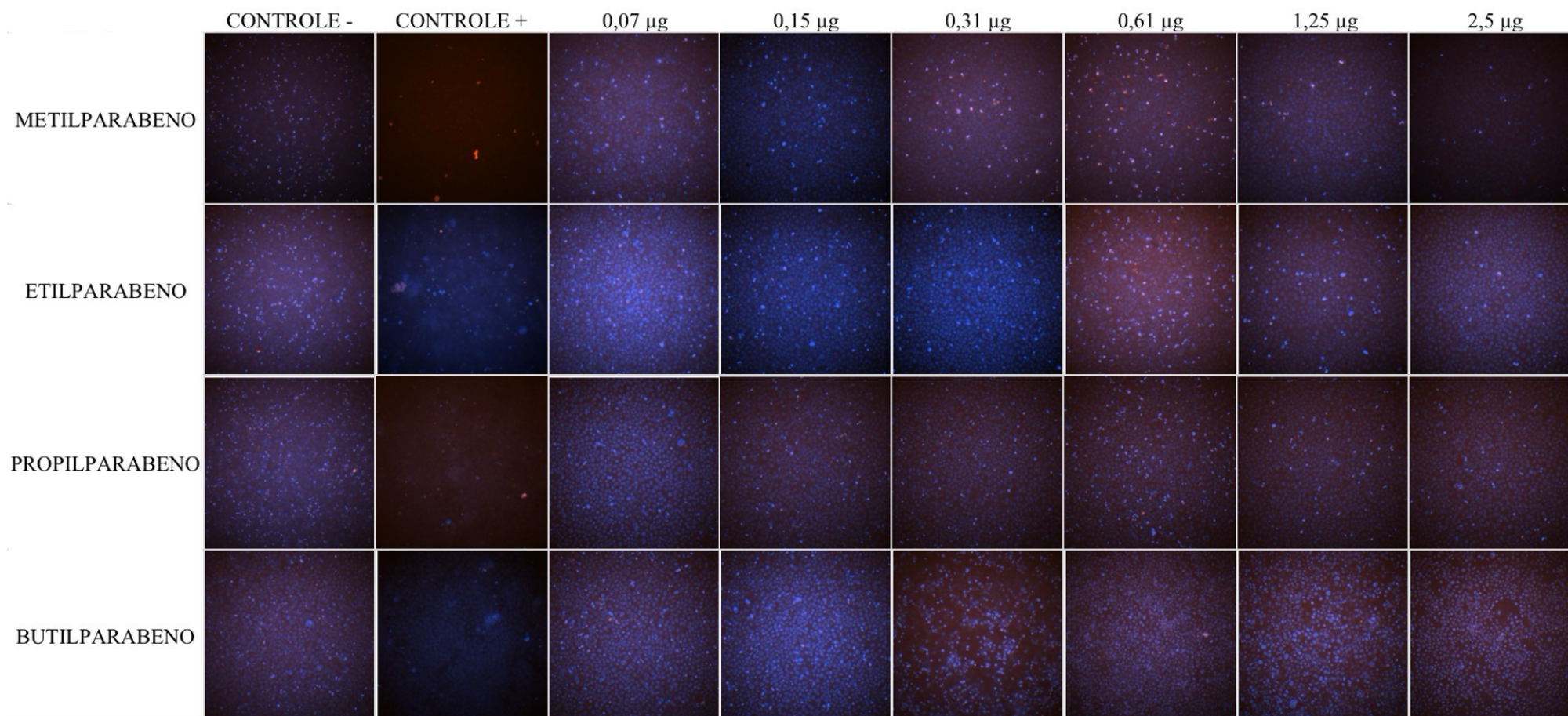
Figura 6- Viabilidade da HACAT. As células foram cultivadas em DMEM High Glucose e 10% de SFB. Foram cultivadas por até 72h e foi usado o Hoechst e PI para leitura no INcell Analyse 2000. A realização da análise de variância feita através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações, onde * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 (Anova One-way).

É notável o comportamento irregular da viabilidade em todos os tempos analisados, o que sugere que inicialmente as células podem tolerar ou até se adaptar aos parabenos nas concentrações apresentadas, mas a exposição prolongada reduz a viabilidade, indicando um

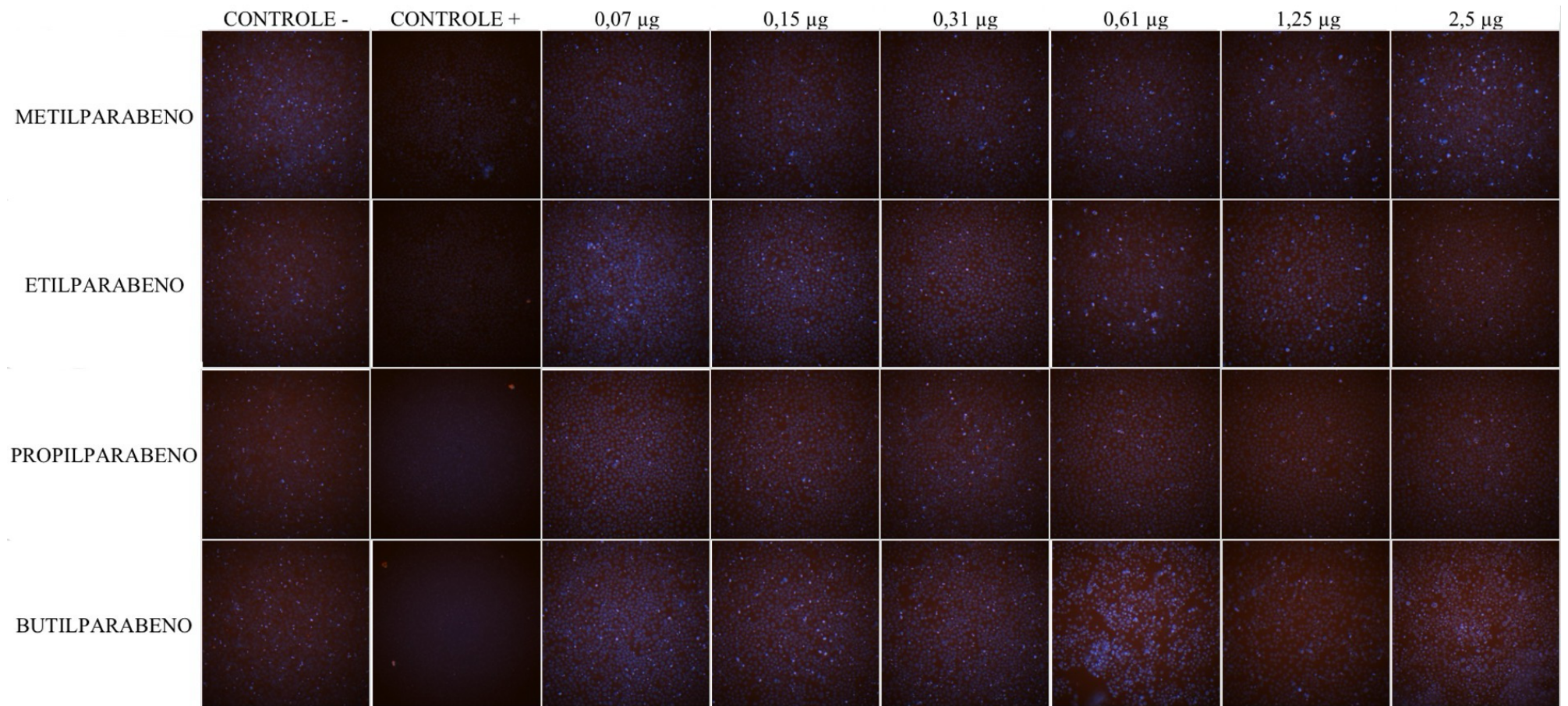
possível efeito acumulativo ou prorrogação da toxicidade. Quando analisados individualmente, observa-se que o metilparabeno apresentou um efeito citotóxico mais atenuado, com queda discreta na viabilidade celular apenas nas maiores concentrações e nos tempos mais prolongados. O etilparabeno, mostrou um efeito mais efetivo, quando relacionado ao metilparabeno, a partir de 48h, sendo mais evidente em 72h, principalmente nas concentrações acima de 0,62 µg/mL. Em contrapartida, o propilparabeno apresentou um padrão de toxicidade mais evidente a partir de 48h, com redução significativa da viabilidade em concentrações intermediárias, intensificando-se em 72h. Por fim, o butilparabeno foi o éter que causou maior impacto sobre a viabilidade celular, apresentando uma resposta tempo- e dose-dependente aguda. Em 72h, as maiores concentrações resultam em uma quase completa perda de viabilidade celular.

Em seguida foi obtido as imagens geradas por HCA, em sobre posição a fluorescência por Hoechst (em azul) e PI (em vermelho). Vale ressaltar que as imagens representativas geradas por HCA não foram processadas, logo elas estão na mesma forma que foram geradas pelo *software* do GE INCellAnalyser 2000 (GE Health-Care Life Sciences).

A



B



C

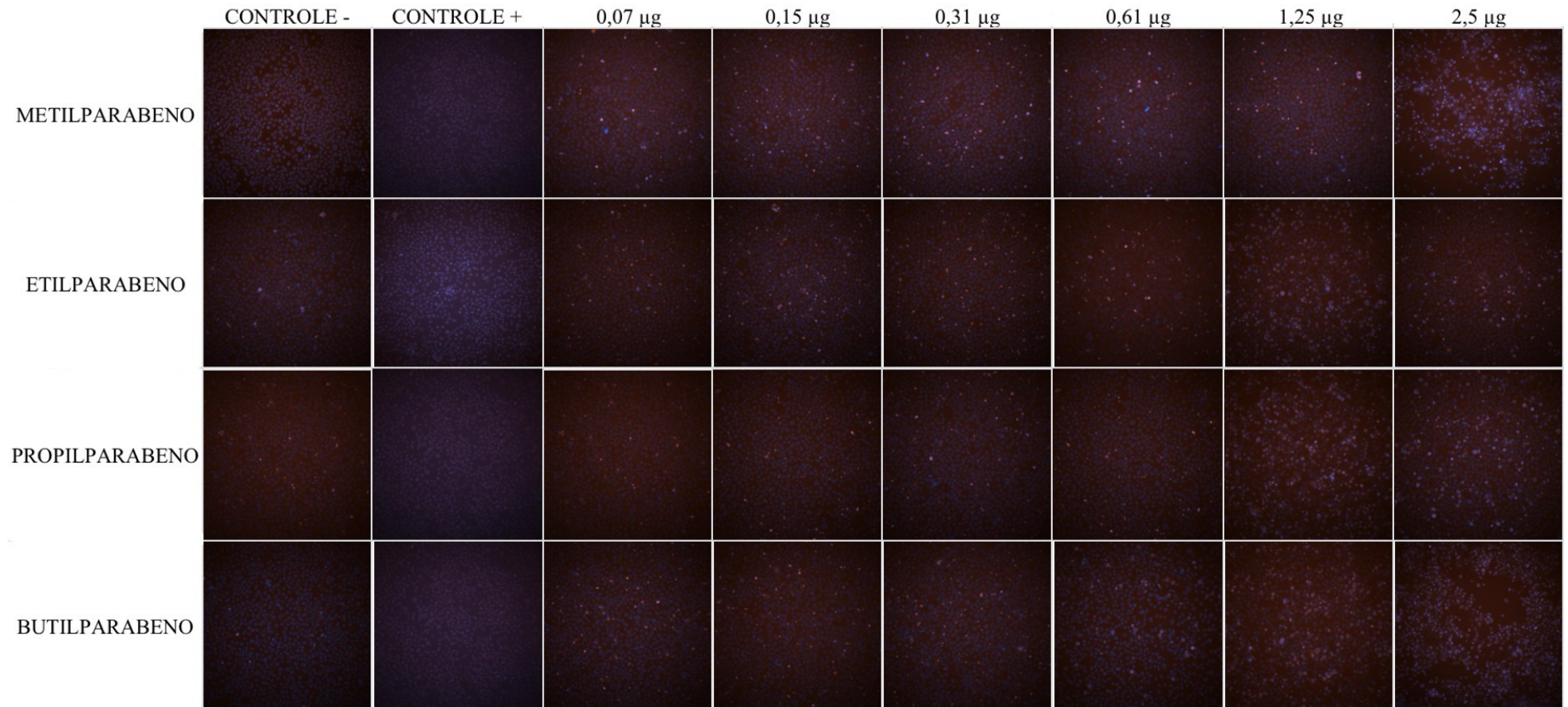


Figura 7 - Imagens representativas do ensaio de viabilidade HCA das células HACAT. Linhagem HACAT cultivadas por (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h com parabenos. Em todos os tempos os queratinócitos foram tratadas com concentrações entre 0,07 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$. O controle positivo para morte celular foi tratado com Triton™ X-100 0,1% (dados não mostrados). A imagem apresenta células coradas com PI (em vermelho) e Hoechst 33342 (em azul). As barras de escala equivalem a 70 μm .

5.3 MTT e LDH

Para a verificação do potencial citotóxico dos compostos de parabenos à linhagem celular HACAT em diferentes concentrações (0,07; 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e tempos (24, 48 e 72h) foi realizado por meio do ensaio de MTT e LDH. Os resultados do ensaio do MTT seguem apresentados na figura 9.

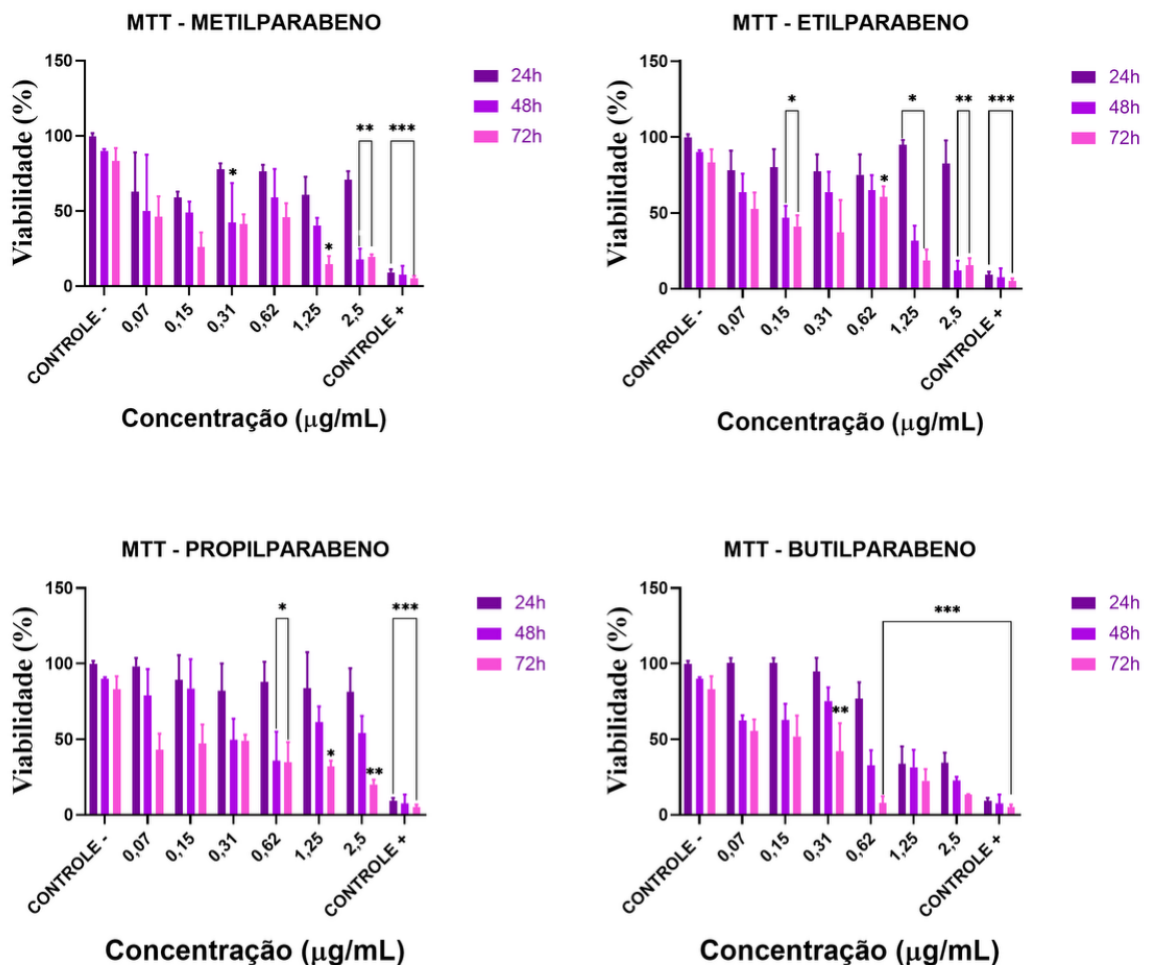


Figura 9 – Ensaio de redução de MTT. A exposição da linhagem HACAT aos parabenos, nas concentrações de 0,07; 0,15; 0,62; 1,25; 2,5 $\mu\text{g/mL}$, nos tempos de 24, 48 e 72h. A condição

CONTROLE - representa o controle de células viáveis, apenas cultivadas em DMEM High Glucose. O controle de morte celular foi realizado através de lise pelo uso de solução de Triton™ X-100 0,1% (dados não mostrados). Foram realizados três experimentos independentes. Não houve troca de meio de cultura nos diferentes dias de análise. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações, onde * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (Anova One-way).

No controle negativo, com células tratadas apenas com meio *DMEM High Glucose* suplementado com Soro Fetal Bovino a 10% e demonstra-se células saudáveis com alta viabilidade celular. Segundo os resultados apresentados na figura 9, todas as concentrações apresentam um padrão dose-dependente e tempo-dependente devido as diminuições da viabilidade das células com o aumento das concentrações e do passar do tempo de exposição. Comparando os resultados dos parabenos, a viabilidade do metilparabeno tem sua maior redução da viabilidade nas concentrações mais altas em tempos de exposição mais longos, sugerido que requer altas concentrações e tempo de exposição prolongados para que possa exercer um efeito citotóxico significativo. O etilparabeno apresentou-se um perfil citotóxico maior comparado ao metilparabeno. O propilparabeno obteve redução da viabilidade das células HACAT em todos os tempos, por outro lado, o butilparabeno apresenta maior toxicidade comparado aos outros parabenos testados.

Em seguida, após verificação da queda de viabilidade das células HACAT pelo ensaio de redução de MTT, foi realizado o ensaio de atividade de LDH, como mostra a figura 10, nas mesmas concentrações usadas anteriormente ao ensaio de MTT. Os resultados observados mostram o aumento dos níveis de LDH sobrenadante comparado ao controle de células saudáveis. Pode-se perceber, ao compararmos as concentrações testadas com o controle positivo de morte celular, tratados com Triton™ X-100 0,1%.

Pode-se observar um aumento progressivo da liberação de LDH, a partir das concentrações intermediárias, em células expostas ao metilparabeno e uma redução gradual da viabilidade celular por MTT, indicando o comprometimento gradual da célula, sendo mais expressivo em altas concentrações após 72h, sugerindo que, embora possua menor cadeia química, exerce ação tóxica. O etilparabeno demonstra um padrão mais discreto de liberação de LDH com significância estatística apenas em algumas concentrações. A redução drástica na atividade mitocondrial e o aumento expressivo na liberação de LDH indicam que o

propilparabeno e butilparabeno exercem um comprometimento celular extensivo de forma eficiente, indicando uma ação altamente tóxica e rápida.

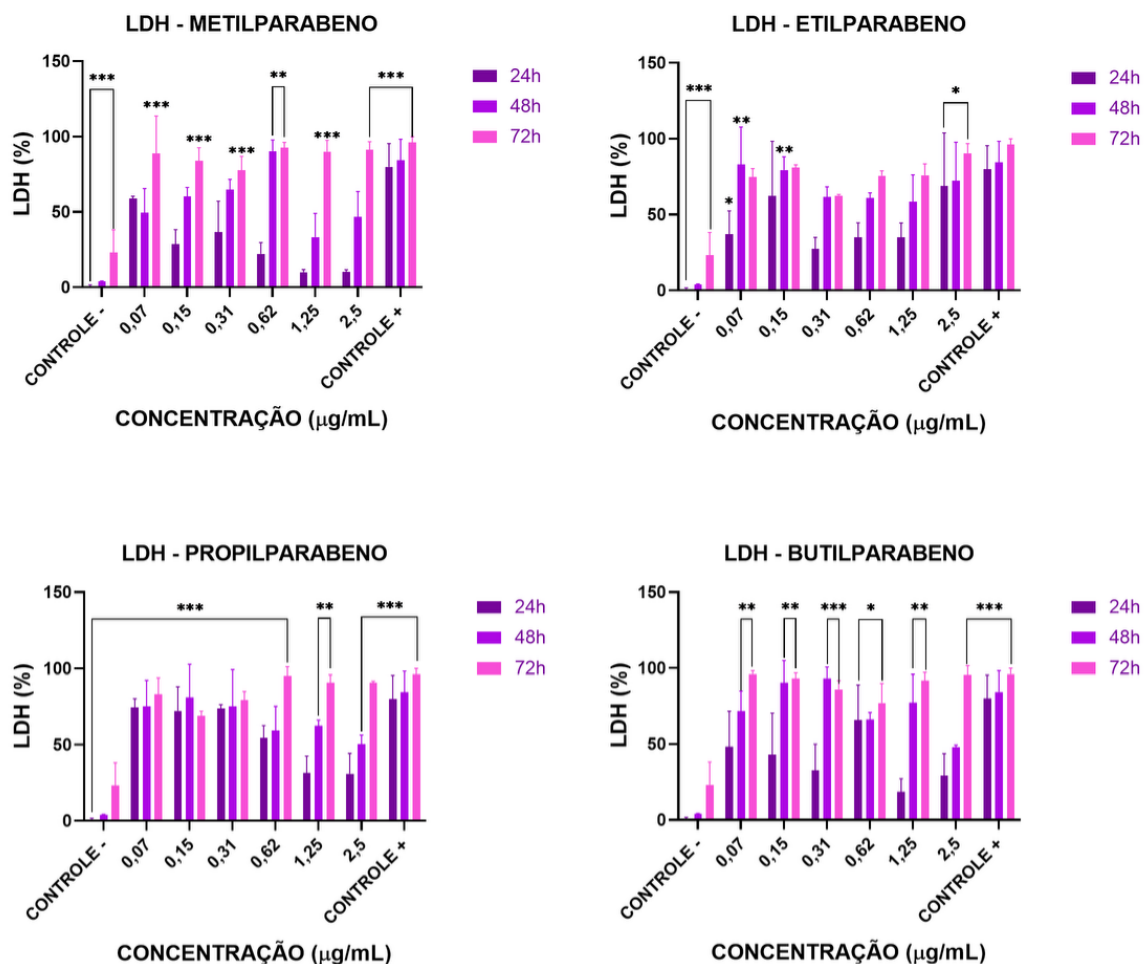


Figura 10 – Liberação de LDH nas células HACAT. Ensaio de redução de LDH realizado em exposição da linhagem HACAT aos parabenos, nas concentrações de 0,07; 0,15; 0,62; 1,25; 2,5 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72h. A condição CONTROLE - representa o controle de células viáveis, apenas cultivadas em DMEM High Glucose. O controle de morte celular (CONTROLE +) foi realizado através de lise pelo uso de solução de Triton™ X-100 0,1%. Não houve troca de meio de cultura nos diferentes dias de análise. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações onde, * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 (Anova One-way).

5.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio pela HACAT durante a exposição com os éteres de parabeno, foi escolhido o tempo de 24 e 48 horas de interação. O

fluorocromo utilizado neste ensaio, o dihidroetidio (DHE), sofre oxidação por moléculas de espécies reativas de oxigênio, sendo então reconvertido a EthD-1, que possui afinidade química com moléculas de DNA, às quais se liga e marca o núcleo das células, emitindo fluorescência no segmento vermelho do espectro da luz visível. A intensidade da marcação fluorescente é diretamente proporcional à produção de espécies reativas de oxigênio na célula. As concentrações utilizadas na exposição ao parabeno para todas as linhagens foram de 0,07 a 2,5µg/mL. Na figura 11 e 12 podem ser observado a produção de espécies reativas de oxigênio pela linhas HACAT na condição CONTROLE - sem qualquer exposição aos parabenos e na condição CONTROLE + foram expostos ao Triton™ X-100 0,1%. Em geral, os resultados obtidos apontam um aumento crescente dos níveis de ROS de forma dependente à concentração do parabeno. Uma elevação moderada é observada no tempo de 24h, enquanto em 48h esse aumento torna-se mais expressivo como observado nas figuras 11 e 12.

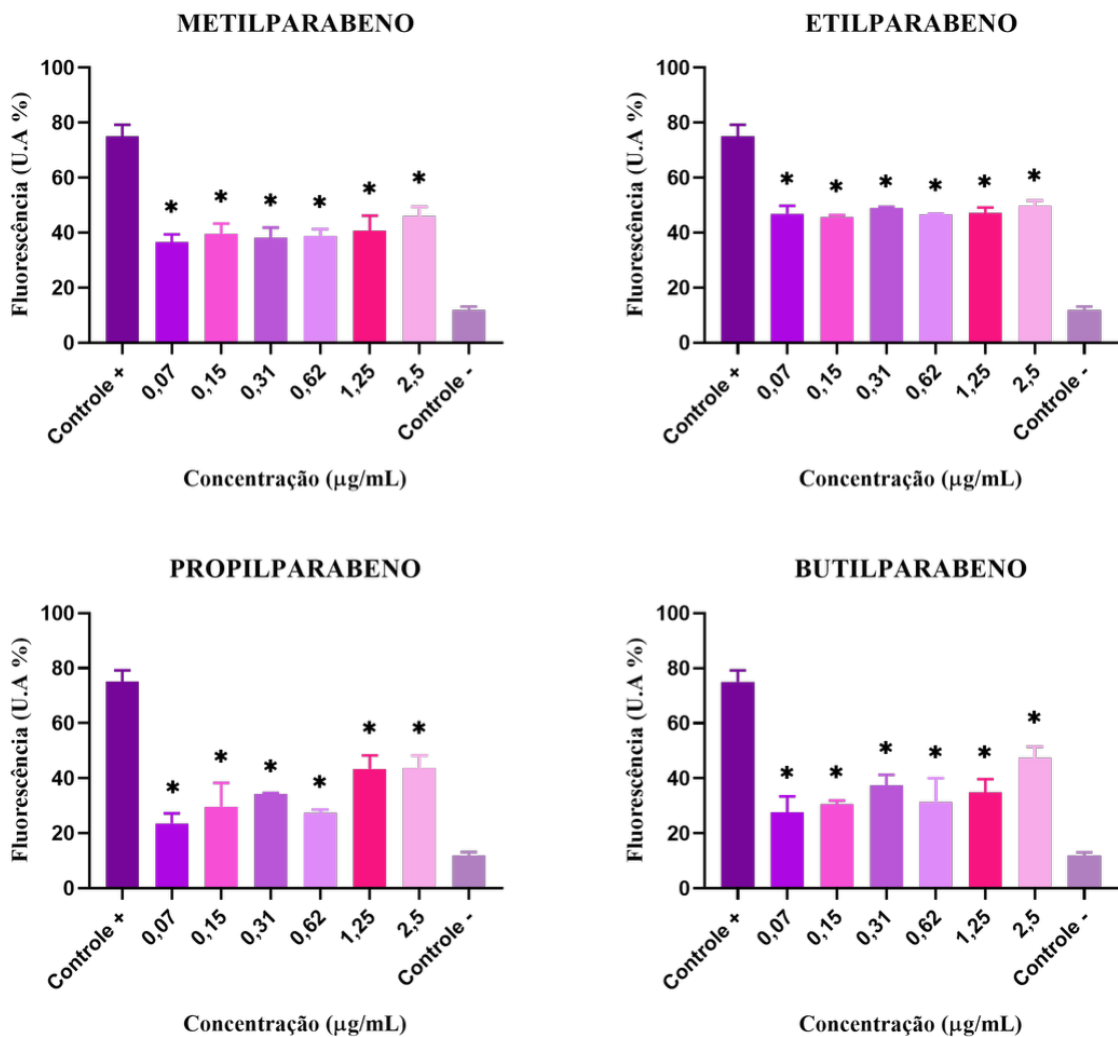


Figura 11 – Análise da produção de espécies reativas de oxigênio em células HACAT após interação com diferentes concentrações de parabenos por 24 horas. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey comparado ao respectivo grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

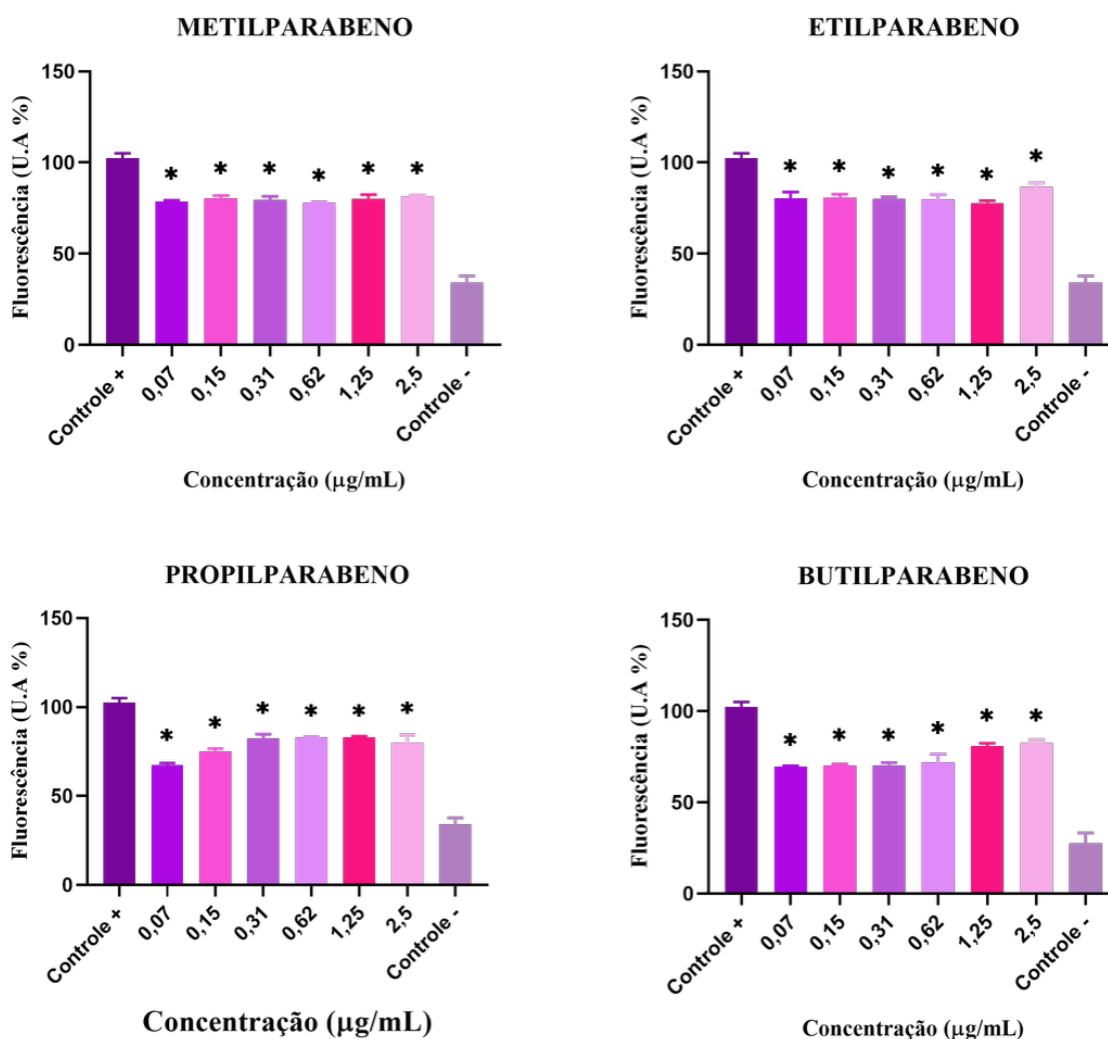


Figura 12- Análise da produção de espécies reativas de oxigênio em células HACAT após interação com diferentes concentrações de parabenos por 48 horas. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey comparado ao respectivo grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Nós ensaios de viabilidade observou-se uma redução significativa na viabilidade para concentrações mis altas. Valores que coincidem com o aumento dos níveis de ROS, sugerindo

que o estresse oxidativo pode ser um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade nas células quando expostas aos parabenos. Em concentrações baixas e intermediárias, os níveis de ROS parecem aumentar sem causar uma redução imediata a viabilidade, indicando que a célula ativa mecanismos antioxidantes compensatórios, inicialmente. Em concentrações mais elevadas, confere-se dano oxidativo levando à morte celular.

5.5 Monitoramento Celular em Tempo Real por Impedância Elétrica

Com o monitoramento em tempo real da HACAT, foi analisado a proliferação celular pelo período de 0 a 96 horas. Após 24h de plaqueamento, as células foram expostas as diferentes concentrações de parabenos (0,07 - 2,5µg/mL) e submetido a análise da proliferação e a adesão da HACAT. A figura 13 mostra o conjunto de microeletrodos de ouro presentes na superfície do interior da placa de 96 poços. É possível notar um total de 9 linhas no gráfico, sendo seis condições de exposição e três controles (DMEM *High Glucose* e 10% SFB, representando células viáveis em ausência dos parabenos; TRITON™ X-100 0,1% para o controle de morte celular e TRITON™ X-100 0,1% e DMEM *High Glucose* 10% de SFB).

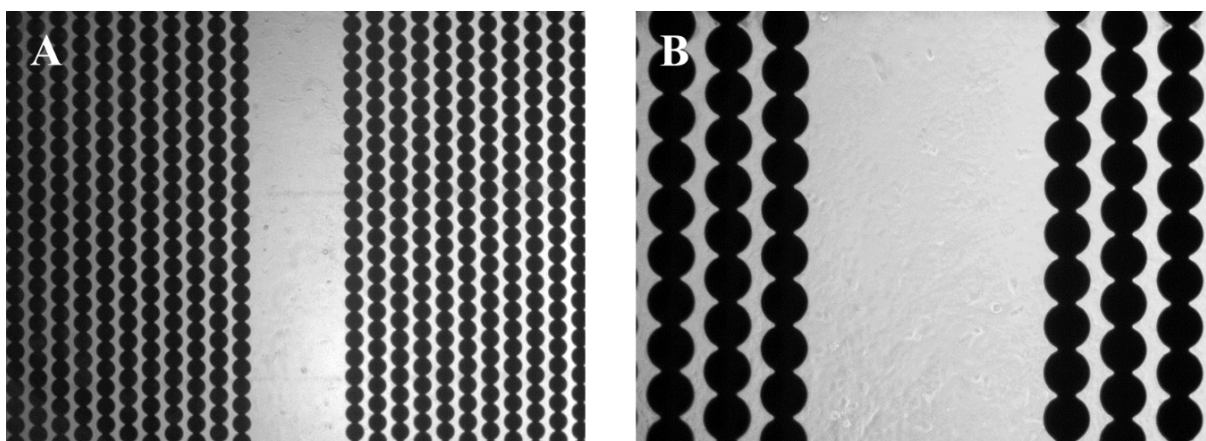
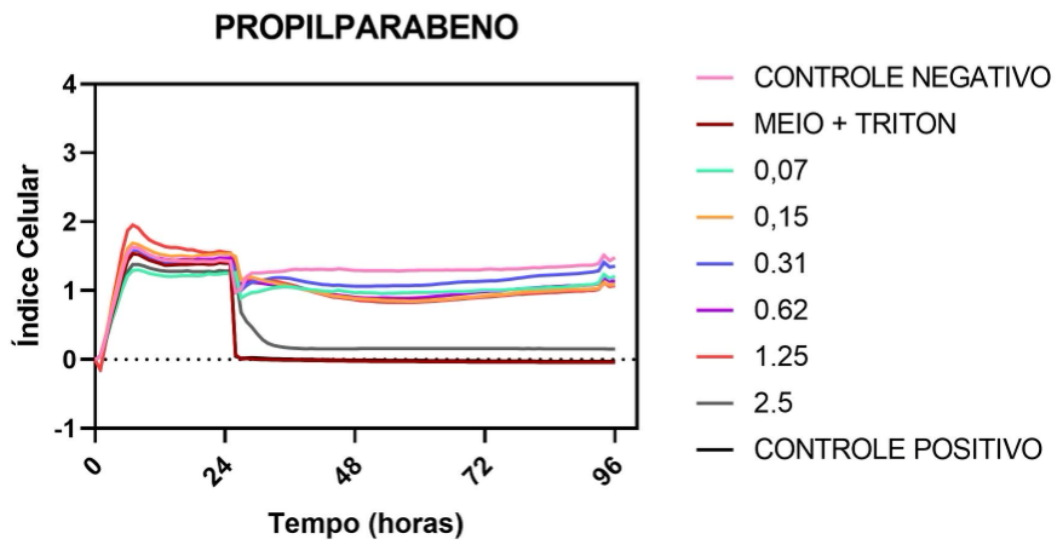
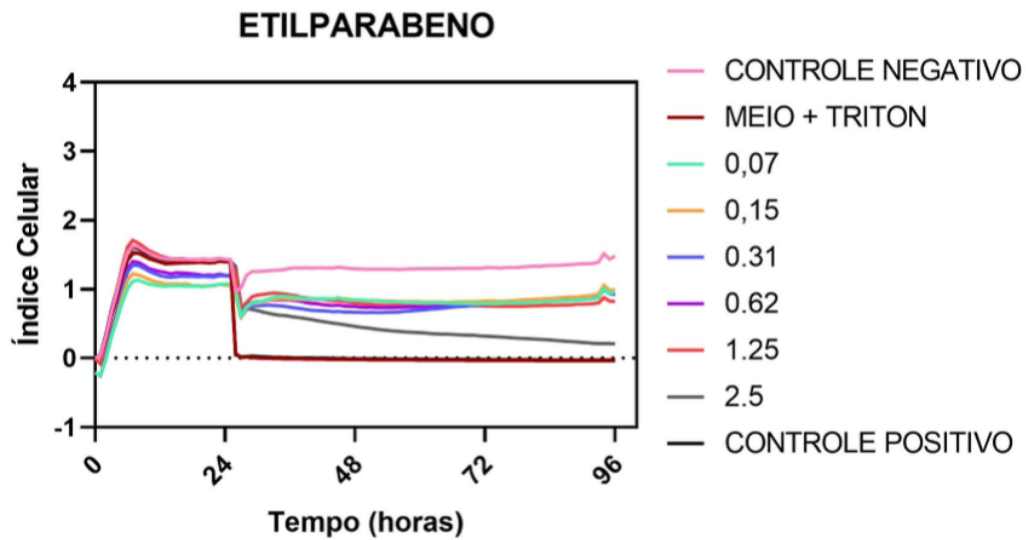
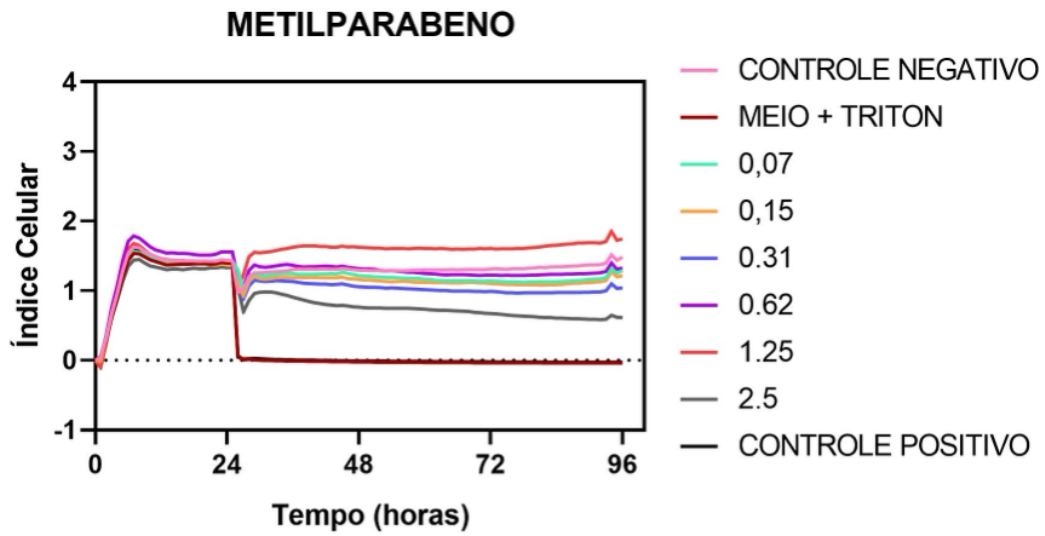


Figura 13- Conjunto de microeletrodos de ouro. Imagens de microscopia óptica invertida de contraste de fase obtidas de um poço aleatório da placa de 96 poços utilizada no ensaio de monitoramento em tempo real por impedância elétrica, realizado no xCELLigence. Ambas as imagens foram obtidas ao final do experimento. Em A observa-se os microeletrodos de ouro através de uma objetiva de 4X de aumento, enquanto em B a visualização ocorreu por uma objetiva de 10X. Fonte: DAL-CHERI, 2021.

Inicialmente, no tempo zero foram adicionadas 5×10^3 células por poço. Nas primeiras horas, constatou-se a formação dos focos de adesão celular, evidenciada pelo aumento progressivo da impedância elétrica. Esse aumento está associado à deposição e ao espalhamento das células sobre os eletrodos. Em seguida, a curva de impedância atinge um platô, indicando

a estabilização da adesão celular e confirmando a formação de um índice celular (IC) estável. No tempo de 24h observou-se uma queda do índice celular com a exposição dos parabenos, seguido de uma queda drástica dos controles para morte celular em função do TRITON™ X-100 0,1%. A figura 14 apresenta o ensaio de impedância elétrica das células HACAT, onde o metilparabeno apresentou alterações graduais e sutis ao longo do tempo. Em baixas concentrações o IC manteve-se relativamente estável, indicando que as células não sofreram alterações significativas. Mas em concentrações mais elevadas observou-se uma diminuição gradual do IC. Novamente, o etilparabeno induz alterações mais notáveis quando comparado aos resultados do metilparabeno, observando-se uma diminuição do IC mais acentuado, mesmo em baixas concentrações. O resultado do propilparabeno corrobora com os resultados dos testes de MTT e LDH demonstrando uma toxicidade crescente quando correlacionado aos parabenos anteriores. O butilparabeno segue com um notório padrão de toxicidade, onde é observado uma diminuição acentuada e imediata no IC, mesmo em baixas concentrações o que indica que o butilparabeno induz alterações drásticas nas primeiras horas de exposição celular.



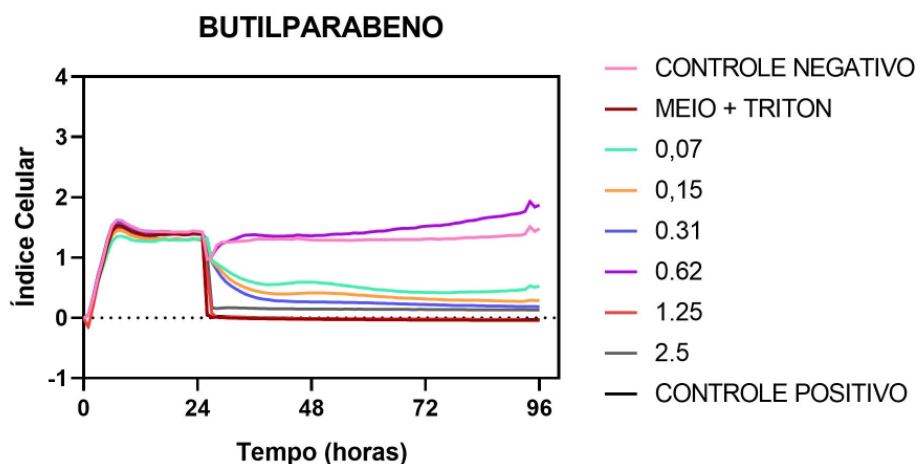


Figura 14 - Monitoramento em tempo real da adesão e proliferação da HACAT por impedância elétrica. O índice celular (eixo y) é calculado em relação ao tempo (eixo x). A análise foi realizada desde o plaqueamento até o fim do experimento, totalizando 96h. A condição CONTROLE NEGATIVO representa células cultivadas DMEM *High Glucose* e 10% SFB sem nenhum parabeno, representando células viáveis. A condição CONTROLE POSITIVO representa células tratadas com TRITON™ X-100 0,1% para o controle de morte celular e a condição MEIO + TRITON representa células tratadas com TRITON™ X-100 0,1% e DMEM *High Glucose* 10% de SFB. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey comparado ao respectivo grupo controle (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

5.6 Análise Morfológica da Linhagem HACAT Após Exposição aos Parabenos por Microscopia Óptica

As análises morfológicas foram observadas em microscópio óptico em contraste de fase em comparação da linhagem celular HACAT após a exposição aos parabenos (metil-, etil-, propil- e butilparabeno), diante as seis concentrações distintas, comparadas as células viáveis, Controle DMEM HIGH (condições sem a presença dos compostos de parabenos) e células expostas ao Triton (como controle positivo para morte celular) nos tempos de 24, 48 e 72h. Para cada condição foram analisados 10 campos aleatórios. Contudo, é possível observar na figura 15, 24h após o tratamento, que há semelhanças na morfologia celular em todas as condições tratadas, onde as células se encontram aderidas. Exceto pela condição Triton, todas as condições apresentam células integras, preservando seu contorno celular e com pouca confluência. No tempo de 48h, na figura 14, é notável a perda da delimitação celular característica da linhagem

HACAT nas condições tratadas com parabenos. A condição Controle DMEM HIGH, onde não houve exposição aos parabenos, apresentam morfologia características da linhagem e confluência. Na condição Triton, apresentam-se células com a morfologia típica de sofrimento celular, com a perda total da sua morfologia característica e diminuição do diâmetro celular. Também é possível notar a presença de vacúolos, que podem ser pequenas gotículas, possivelmente lipídicas, provavelmente relacionadas a desordens metabólicas ocasionadas pelo tratamento com os parabenos, indicando possível esteatose.

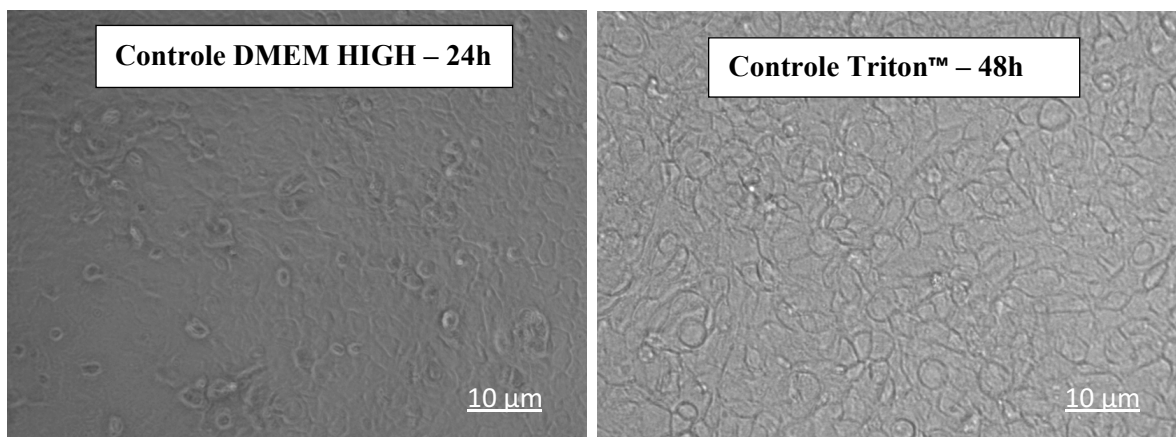
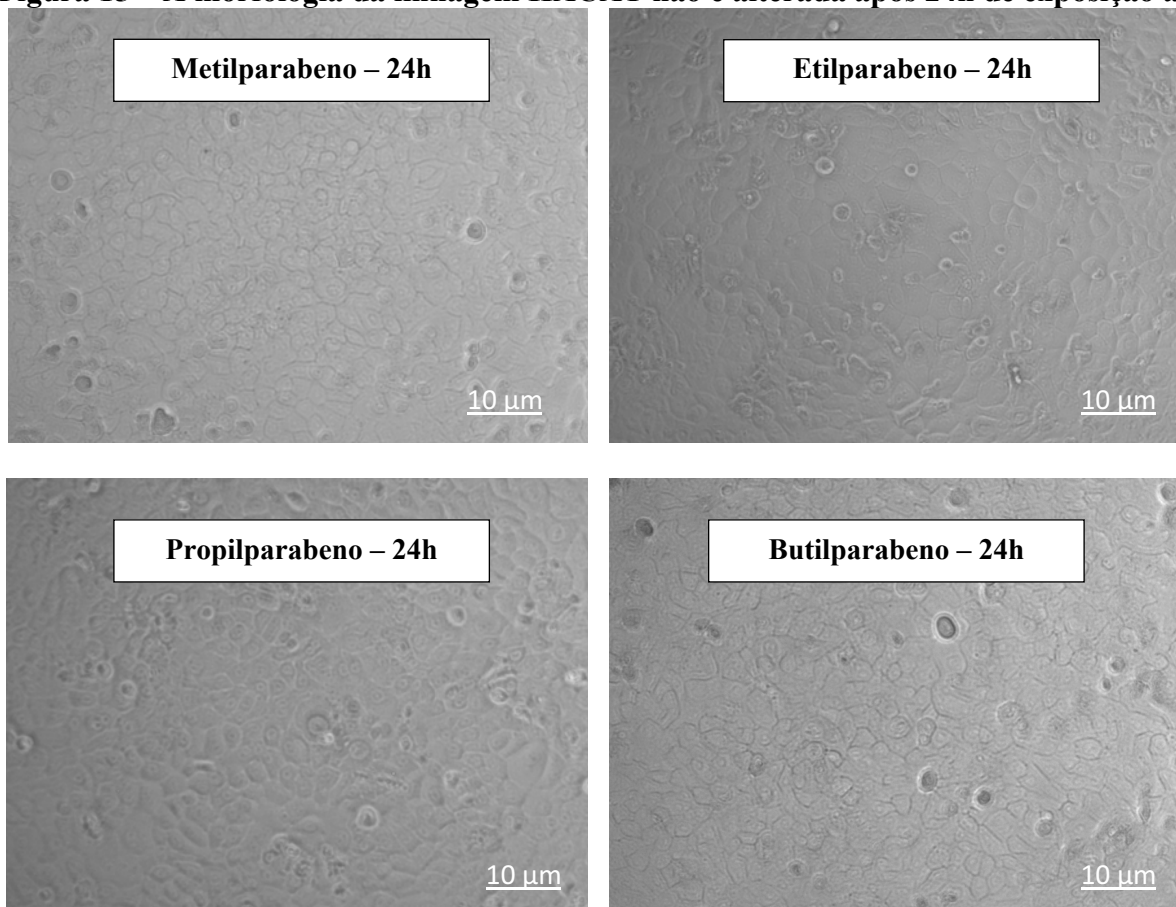


Figura 15 – A morfologia da linhagem HACAT não é alterada após 24h de exposição aos



parabenos. Análise morfológica da linhagem HACAT após 24h de exposição a diferentes concentrações de parabenos. Não houve alteração morfológica nas células tratadas com parabenos. O controle representa células viáveis, apenas cultivadas em DMEM High Glucose. As imagens foram obtidas por software acoplado ao microscópio óptico invertido de contraste de fase. Escala: 10 μ m. Foram analisados 10 campos aleatórios para cada condição.

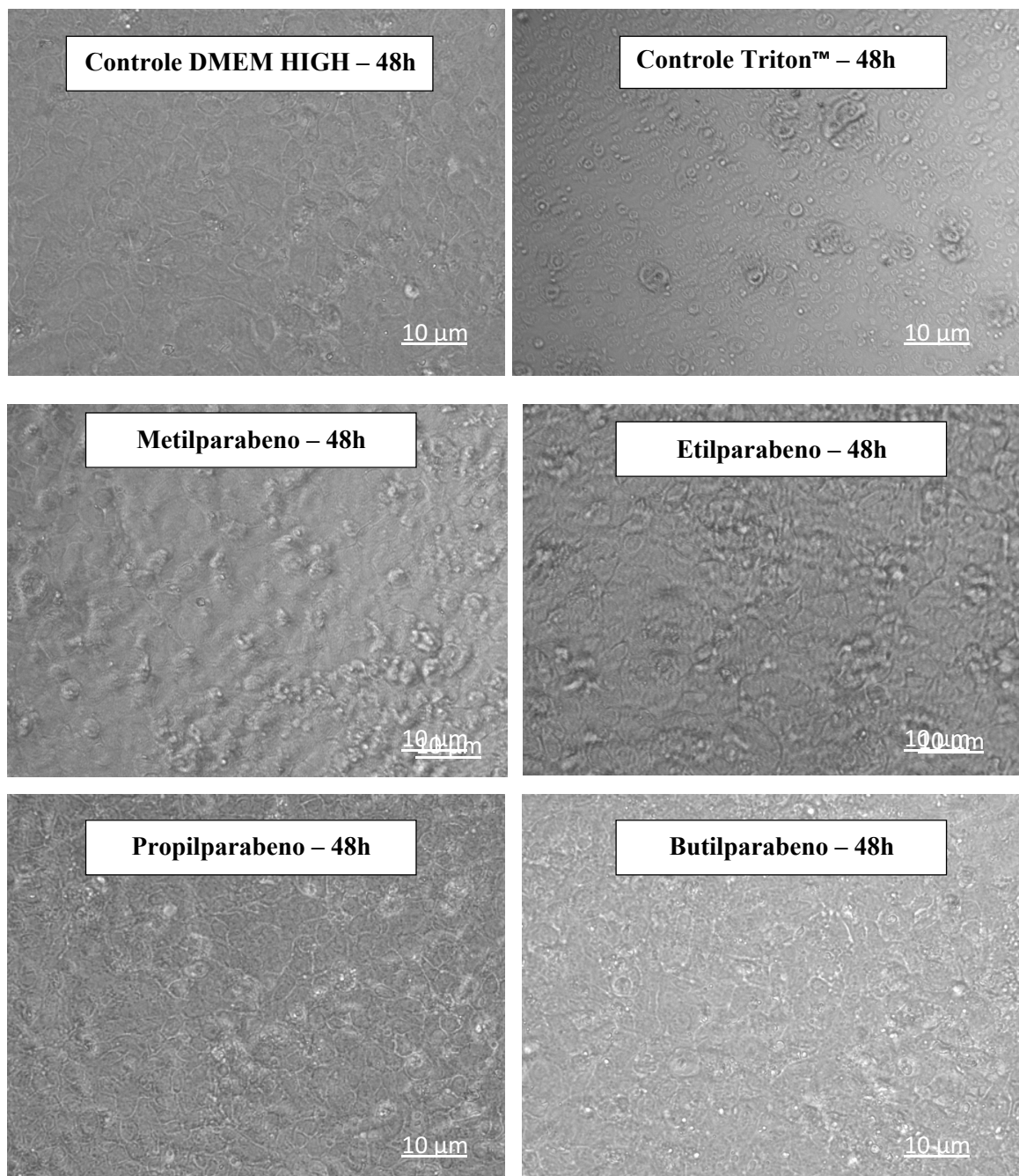


Figura 16 - Morfologia dos queratinócitos após 48 horas de exposição aos parabenos. Verifica-se também, a possível presença de parabenos no sobrenadante celular (parabenos não internalizados pelas células) e vacúolos celulares. O controle que representa células viáveis foi cultivado com *DMEM High Glucose*. O controle negativo com Triton. As imagens foram obtidas por software acoplado ao microscópio óptico invertido de contraste de fase. Escala: 10 µm. Foram analisados 10 campos aleatórios para cada condição.

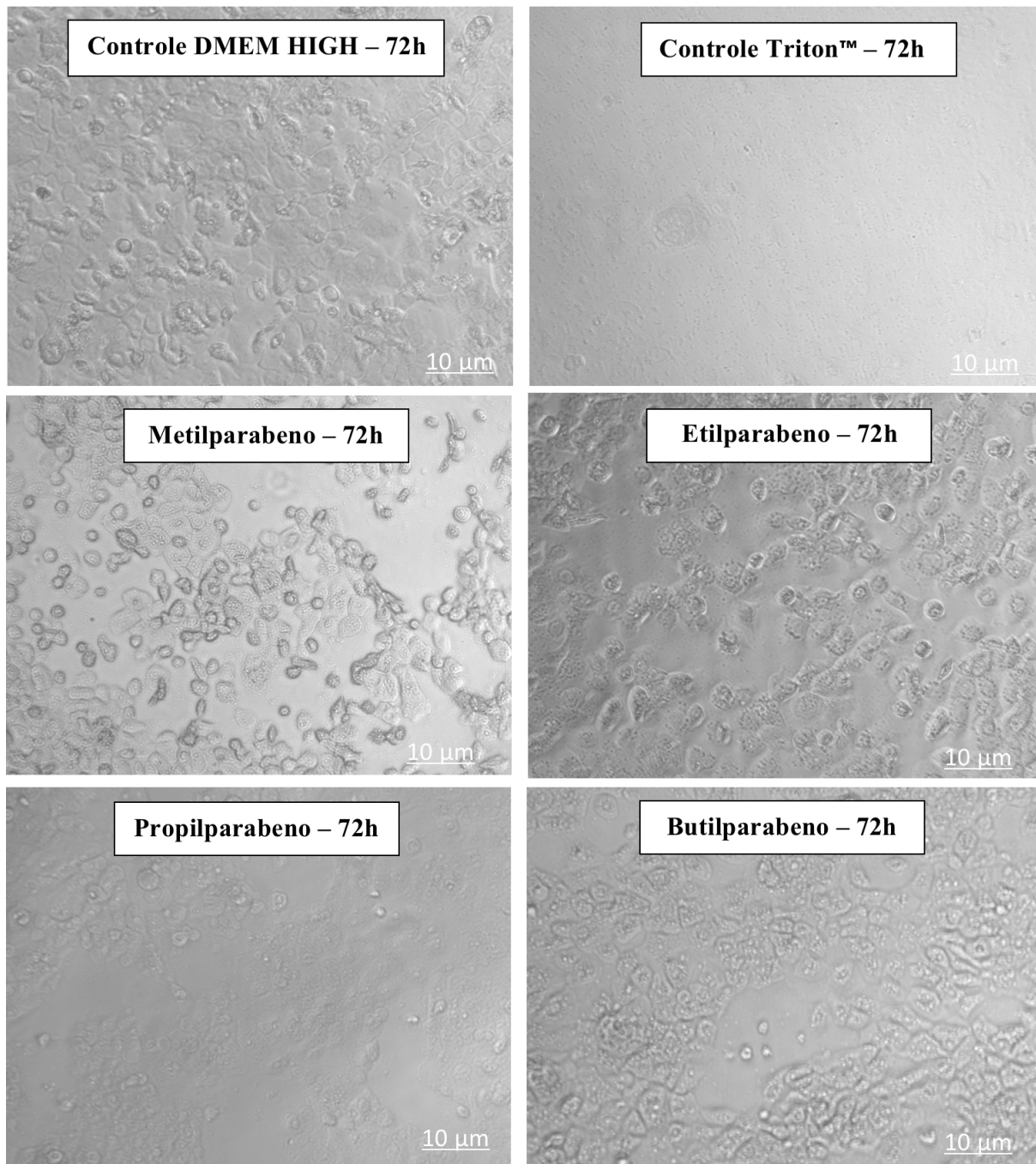


Figura 17 - Morfologia da linhagem HACAT após 72 horas de interação com parabenos. É possível notar a diminuição da concentração celular comparado aos tempos de 24 e 48 horas. Também é visível os sinais de sofrimento celular e pouca presença de parabenos no meio extracelular. As condições são as mesmas descritas nas concentrações de 24 e 48 horas. As imagens foram obtidas por software acoplado ao microscópio óptico invertido de contraste de fase. Escala: 10 µm. Foram analisadas 10 campos aleatórios para cada condição.

Em 72h após o tratamento das células HACAT, encontrou-se menos aderidas e com características de sofrimento celular, redução significativa da população celular e perda total da morfologia característica da linhagem HACAT e também a presença de mais grânulos citoplasmático, como observado na figura 17. Além disso, é possível notar algumas diferenças morfológicas no Controle DMEM HIGH, entretanto mantém a confluência. A condição Controle Triton apresenta debri celulares, no qual trata-se de resíduos celulares indicando morte ou dano celular devido a exposição prolongada ao agente positivo para morte celular.

6. DISCUSSÃO

A linhagem celular HACAT referem-se a queratinócitos epiteliais humanos adultos, que quando cultivados são do tipo aderente. As células HACAT possuem um formato predominantemente poligonal ou fusiforme, dependendo da fase de crescimento e confluência da cultura. Em culturas subconfluentes (quando as células ainda não cobriram toda a superfície do frasco de cultura), é comum observar células com formato mais alongado e fusiforme. No entanto, à medida que a confluência aumenta, as células tendem a se organizar em monocamadas mais compactas, assumindo um formato poligonal com bordas bem definidas, característica típica de epitélios escamosos estratificados. O citoplasma das células HACAT é abundante e levemente granular, indicando uma atividade metabólica significativa. O núcleo é ovalado e apresenta cromatina distribuída de maneira homogênea, com nucléolos evidentes, o que sugere uma atividade transcricional ativa. Além disso, a linhagem HACAT possui um alto grau de aderência ao substrato, mantendo conexões intercelulares por meio de desmossomos e junções de adesão, fundamentais para a estabilidade estrutural do epitélio permitindo que formem monocamadas organizadas semelhantes ao epitélio estratificado *in vitro* (BOUKAMP *et al.*, 1988; VASVANI *et al.*, 2020). Além disso, a linhagem HACAT é conhecida por sua resistência a agentes químicos e físicos, sendo um modelo eficiente para estudos de toxicidade cutânea e carcinogênese (WANG *et al.*, 2020). Também possui um tempo de duplicação, consideravelmente rápido, de cerca de 22h, de acordo com a ATCC.

Os objetivos deste estudo foram alcançados, evidenciando os efeitos citotóxicos dos parabenos sobre queratinócitos humanos (HACAT) de maneira dependente da concentração e do tempo de exposição. Observou-se que, nas primeiras 48 horas, não houve diferenças significativas na taxa de crescimento celular entre os grupos tratados e o controle. Entretanto, após 72 horas, constatou-se uma diminuição notável no crescimento celular, sugerindo que, em exposições mais curtas, as células conseguem resistir aos efeitos do estresse induzido pelos parabenos. Monteiro (2017) destaca que os parabenos, embora amplamente utilizados como conservantes devido às suas propriedades fungicidas e bactericidas, podem ser hidrolisados a ácido para-hidroxibenzóico por carboxilesterases de queratinócitos quando aplicados topicamente. Essa biotransformação pode influenciar a resposta celular aos parabenos, sugerindo que, em tempos de exposição mais curtos, as células conseguem metabolizar e resistir aos efeitos adversos desses compostos. No entanto, exposições prolongadas podem sobrecarregar os mecanismos de defesa celular, levando à diminuição da viabilidade observada em nosso estudo.

A viabilidade celular e a produção de espécies reativas de oxigênio, foram avaliadas através do método de análise de alto conteúdo (HCA). Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, os queratinócitos expostos aos quatro tipos de parabenos, ao longo de 72 horas mostram padrões de resposta distintos, evidenciando tanto um efeito dose-dependente quanto as variações na citotoxicidade entre os éteres testados. Inicialmente, a exposição a concentrações mais baixas apresentou variações na viabilidade, sugerindo que, em algumas amostras, as células poderiam estar apresentando um mecanismo de adaptação ou mesmo uma resposta proliferativa. No entanto, à medida que o tempo de exposição foi aumentando, tornou-se evidente que as concentrações mais elevadas resultaram em uma redução significativa da viabilidade celular, reforçando a hipótese de que os parabenos exercem um efeito tóxico sobre os queratinócitos. Concentrações mais elevadas ($\geq 1,25$ mM) resultaram em uma redução significativa da viabilidade celular, especialmente para os parabenos de cadeia mais longa, como o butilparabeno e o propilparabeno. Franchini et al. (2021) associou o aumento da cadeia alquílica dos parabenos com a lipofilicidade - uma maior capacidade de penetração na membrana celular e, conseqüentemente, maior capacidade de toxicidade.

A toxicidade também foi determinada através do ensaio de MTT sobre a linhagem de queratinócito humano, no qual seguiram o mesmo padrão observado no ensaio de viabilidade. Reforçando, mais uma vez que os parabenos exercem efeitos de maneira dependente da concentração e do tempo de exposição. O ensaio de MTT indicou uma redução progressiva na atividade metabólica das células expostas a concentrações mais elevadas, especialmente em 72 horas. Esse efeito também foi confirmado pelo ensaio de liberação de LDH, que demonstrou um aumento na permeabilidade da membrana celular, indicando possível dano estrutural. Esses achados são consistentes com estudos que relatam que a exposição a conservantes cosméticos pode afetar distintamente a citotoxicidade nas células da pele, influenciando a viabilidade celular em fibroblastos e queratinócitos (Glaz *et al.*, 2023).

Entre os parabenos avaliados, o butilparabeno e o propilparabeno mostraram-se mais citotóxicos, levando a uma queda notável na viabilidade celular, principalmente nas concentrações mais altas e em tempos prolongados. Esse comportamento pode estar relacionado à maior lipofilicidade destes parabenos, que facilitam sua penetração na membrana celular e potencializam seus efeitos adversos sobre os processos intracelulares, como a disfunção mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo (CASHMAN & WARSHAW, 2005), evidenciado pelo ensaio de ROS. O estresse oxidativo ocorre quando a geração de ROS excede

a capacidade do mecanismo de defesa antioxidante, levando a peroxidação lipídica e dano na membrana celular, além de danos no DNA, morte celular apoptótica, redução da geração de ATP, e eventualmente à morte celular (POON *et al.*, 2020; NAKVASINA *et al.*, 2021). A avaliação em dois tempos demonstrou o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, onde o butilparabeno induziu maiores níveis de ROS, seguido pelo propilparabeno. Esses resultados apontam que a geração de ROS é um dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade dos parabenos, podendo levar a danos oxidativos em componentes celulares essenciais, como lipídios, proteínas e DNA (KIM; XUE, 2020). Em contrapartida, o metilparabeno e o etilparabeno demonstraram uma ação menos agressiva, com menos variações na viabilidade ao longo do tempo, sugerindo que sua toxicidade pode ser relativamente menor em comparação com os parabenos de cadeia mais longa.

Como citado anteriormente, a influência do tempo de exposição também foi um fator determinante nos resultados obtidos. a exposição aos parabenos também afetou o tempo de duplicação e a taxa de crescimento das células HACAT. Nos tempos iniciais (as primeiras 24 horas) algumas concentrações não apresentaram reduções expressivas na viabilidade, e em certos casos foi observada até uma leve elevação, que pode estar associada a um efeito proliferativo transitório das células. Entretanto, após 48 e 72 horas, foi observado a tendência predominante da redução da viabilidade celular, especialmente para as maiores concentrações, confirmando que a exposição prolongada intensifica os danos celulares e pode levar a processos de morte celular (SANTOS; SIPERT, 2021). Também é importante ressaltar que a presença dos controles reforça a confiabilidade dos dados, já que o controle negativo, contendo apenas meio de cultura, manteve a viabilidade celular elevada ao longo de todo o experimento, enquanto o controle positivo, composto por Triton, levou a uma viabilidade celular reduzida a 0% em 72 horas, evidenciando que o ensaio foi capaz de detectar a toxicidade conforme esperado. Esses achados sustentam a ideia de que os efeitos observados nas células foram, de fato, decorrentes da exposição aos parabenos e não de interferências experimentais.

Através do monitoramento celular em tempo real por impedância elétrica pelo sistema xCELLigence®, onde ocorre o monitoramento de alterações nas propriedades de impedância das células após a exposição a agentes bioativos (ISO/TS - 21633, 2021). As células tratadas com parabenos, revelou alterações significativas na integridade e adesão celular. Em concentrações mais elevadas, foi constatado, o comprometimento da integridade da membrana e das junções intercelulares. O que corroboram com os resultados obtidos nos ensaios de LDH e ROS, sugerindo que os parabenos afetam não apenas a viabilidade celular, mas também a integridade estrutural e funcional das células (HOFMANN; PRIEM, 2020).

A observação da morfologia da linhagem HACAT por microscopia óptica exposta a diferentes parabenos ao longo dos tempo experimentais (24, 48 e 72 horas), permitiu a avaliação das células. No controle negativo (DMEM *High Glucose*), as células apresentaram morfologia epitelial característica, com contornos definidos, adesão celular e confluência preservada em todos os tempos, indicando ausência de toxicidade. Em contrapartida, o controle positivo (TRITON™ X-100) induziu efeitos como a perda da monocamada, principalmente em 48 e 72 horas. As células expostas ao metilparabeno apresentaram alterações discretas em 24 horas, como uma leve retração celular e espaçamento intercelular, sugerindo o início da toxicidade. Com 48 horas, observou-se maior desorganização da monocamada e presença de células arredondadas e após 72 horas, a perda de adesão e o encolhimento celular tornaram-se mais acentuados, compatíveis com acúmulo de dano celular. A exposição ao etilparabeno resultou em alterações mais evidentes quando comparadas com o metilparabeno nas primeiras 24 horas, com o aumento do espaçamento entre as células e perda da confluência. No tempo de 48 horas a alteração morfológica tornou-se mais pronunciada com células retraídas e início de fragmentação. Após 72 horas, nota-se o aumento de células flutuantes. As células tratadas com propilparabeno e butilparabeno demonstraram efeitos citotóxicos mais intensos. Em 24 horas, podem ser notadas células arredondadas e retraídas, com perda da monocamada, aumento de corpos celulares fragmentados e rarefação das células aderidas, especialmente nas células tratadas com butilparabeno.

Por fim, sobre o efeito citotóxico dos parabenos, os resultados obtidos indicam que é um efeito dose e tempo-dependente, principalmente em parabenos de cadeia mais longa, que apresentaram um impacto mais expressivo. Esses achados reforçam a necessidade de uma análise criteriosa sobre a segurança do uso contínuo desses compostos em produtos cosméticos e de cuidados pessoais, especialmente considerando a exposição cutânea prolongada. A relação entre lipofilicidade e toxicidade sugerindo que o acúmulo dessas substâncias pode representar um risco para a integridade celular (YAMAMOTO *et al.*, 2023; SINGH *et al.*, 2021), podendo desencadear processos inflamatórios ou de morte celular. O que questiona estudos anteriores sobre a segurança do uso dos para anos, reforçando que possuem um efeito estrogênico na pele humana (DEBRAE, 2004). Segundo Monteiro (2017), embora os parabenos sejam considerados seguros para a maioria da população, a sensibilização pode ocorrer, especialmente em peles danificadas, e que a atividade estrogênica dos parabenos de cadeia mais longa levanta preocupações sobre sua segurança em uso prolongado.

Em suma, os resultados obtidos em nosso estudo não apenas contribuem para um melhor entendimento da toxicidade dos parabenos sobre células da pele, mas também fornecem materiais para discussões futuras sobre a regulação, dosagem e o desenvolvimento de alternativas menos agressivas para formulações cosméticas. A consideração de compostos naturais, como óleos essenciais, tem sido sugerida como uma alternativa promissora aos conservantes sintéticos, devido às suas propriedades antimicrobianas e menor potencial de toxicidade (Carvalho; Estevinho; Santos, 2016; Cheng et al., 2020). No entanto, é fundamental que estudos adicionais sejam conduzidos para avaliar a eficácia e segurança desses substitutos naturais em comparação aos parabenos tradicionais.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram, de maneira inequívoca, que a exposição dos queratinócitos humanos (HaCaT) aos diferentes tipos de parabenos promove efeitos citotóxicos dependentes da concentração e do tempo de exposição. Embora a viabilidade celular tenha se mantido relativamente estável nas primeiras 48 horas de exposição, a análise em 72 horas revelou uma redução significativa na proliferação celular, especialmente para os parabenos de cadeia mais longa, como o propilparabeno e o butilparabeno. Esse comportamento sugere que a toxicidade desses compostos pode estar diretamente associada à sua maior lipofilicidade, favorecendo sua penetração na membrana celular e intensificando seus efeitos adversos, como danos mitocondriais e aumento do estresse oxidativo. A análise do tempo de duplicação celular reforça essa observação, uma vez que, enquanto o crescimento celular permaneceu próximo ao controle em concentrações baixas de etilparabeno, os demais compostos apresentaram uma desaceleração significativa na taxa de proliferação, evidenciando que a exposição prolongada compromete a homeostase celular.

Do ponto de vista toxicológico, os achados deste estudo reforçam a necessidade de uma avaliação mais criteriosa sobre o uso de parabenos em formulações cosméticas e dermatológicas. Apesar de sua ampla aceitação como conservantes eficazes, as evidências crescentes de seus efeitos deletérios sobre células epiteliais humanas sugerem que seu uso contínuo pode representar riscos à saúde, particularmente em indivíduos com predisposição a disfunções cutâneas ou que fazem uso prolongado desses produtos. Além disso, a relação entre lipofilicidade e toxicidade observada no presente estudo levanta questionamentos sobre a bioacumulação desses compostos na pele e seus possíveis efeitos a longo prazo, como a indução de processos inflamatórios crônicos ou mesmo o comprometimento da regeneração tecidual. Em vista disso, torna-se essencial a busca por alternativas seguras e eficazes para substituição dos parabenos, especialmente na indústria cosmética. O desenvolvimento de conservantes naturais, como compostos fenólicos derivados de plantas e óleos essenciais, tem sido explorado como uma alternativa promissora devido às suas propriedades antimicrobianas e menor potencial citotóxico (CARVALHO, ESTEVINHO & SANTOS, 2016; CHENG *et al.*, 2020). No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a segurança e a estabilidade desses compostos em formulações comerciais, garantindo que sua eficácia se mantenha comparável à dos parabenos tradicionais sem comprometer a viabilidade celular.

Tais resultados obtidos, este estudo não apenas contribui para o entendimento dos efeitos citotóxicos dos parabenos em células da pele, mas também fornece subsídios científicos para futuras discussões sobre regulamentação e formulação de produtos cosméticos. A evidência de que a toxicidade dos parabenos é dependente da estrutura química e da duração da exposição reforça a importância da aplicação de abordagens mais rigorosas na avaliação da segurança desses compostos. Além disso, nossos achados podem estimular novas investigações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade dos parabenos e suas potenciais implicações para a saúde humana, especialmente no contexto de exposições repetidas ao longo da vida. Portanto, a adoção de medidas preventivas e a contínua busca por alternativas mais seguras são essenciais para minimizar os riscos potenciais associados ao uso prolongado de parabenos. Estudos adicionais envolvendo modelos tridimensionais de pele e ensaios clínicos poderão aprofundar a compreensão sobre os impactos dessas substâncias em condições mais próximas da exposição real, auxiliando na formulação de diretrizes mais seguras para a indústria cosmética e farmacêutica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, Bruce et al. **Molecular biology of the cell: seventh international student edition with registration card**. WW Norton & Company, 2022.
- ABBAS, S., GREIGE-GERGES, H., KARAM, N., PIET, M. H., NETTER, P., & MAGDALOU, J. (2010). **Metabolism of parabens (4-hydroxybenzoic acid esters) by hepatic esterases and UDP-glucuronosyltransferases in man**. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 25(6), 568-577.
- ABIHPEC – Associação Brasileira da Indústria da Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Disponível em: <<http://www.abihpec.org.br/>>. Acesso em: 21 de abril de 2021.
- A. M. WRÓBEL AND E. Ł. GREGORASZCZUK, **Actions of methyl-, propyl- and butylparaben on estrogen receptor- α and - β and the progesterone receptor in MCF-7 cancer cells and non-cancerous MCF-10^a cells**, *Toxicol. Lett.* 230 (2014) 375–381; <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.08.012>
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Farmacopeia Brasileira 6a Edição*, 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: **RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001, republicada no D.O. de 02/10/2001**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 19 de abril de 2021.
- AUBERT N, AMELLER T, LEGRAND J.: **Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration**. *Food Chem Toxicol.* 2012 Mar; 50(3-4): 445-54.
- AZULAY, RUBEM D. **Dermatologia**. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- BERNAUER, U. et al. **SCCS OPINION on Butylparaben (CAS No. 94-26-8, EC No. 202-318-7)-SCCS/1651/23–Final Opinion**. 2023.
- BOBERG, J., TAXVIG, C., CHRISTIANSEN, S., HASS, U., 2010. **Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites**. *Reprod. Toxicol.* 30, 301–312.
- BŁĘDZKA, D., GROMADZIŃSKA, J., AND WĄSOWICZ, W. (2014). **Parabens. From environmental studies to human health**. *Environ. Int.* 67, 27–42.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC No 4, de 30 janeiro de 2014. Requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução

BOUKAMP, Petra et al. **Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.** *Journal of Cell Biology*, v. 106, n. 3, p. 761-771, 1988.

RDC No 29, 1o de junho de 2012. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmninnibpcajpcgclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fantigo.anvisa.gov.br%2Fdocuments%2F10181%2F3285739%2FRDC_29_2012_COMP.pdf%2F2c1f99a1-f815-4063-ba15-94908bb70145&clen=463024. Acessado em: 30/09/2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 07, de 11 de fevereiro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 15, de 26 de março de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 29, de 01 de junho de 2012.

COELHO, C.S. Parabenos: Convergências e divergências científicas e regulatórias. Dissertação (Mestrado em Toxicologia aplicada à Vigilância Sanitária) Universidade Estadual de Londrina, 2013

CZARCZYNSKA-GOSLINSKA, B., ZGOLA-GRZESKOWIAK, A., JESZKA-SKOWRON, M., FRANKOWSKI, R., GRZESKOWIAK, T., 2017. **Detection of bisphenol A, cumylphenol and parabens in surface waters of Greater Poland Voivodeship.** *J. Environ. Manag.* 204, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.034>.

DARBRE, PD. **Underarm Cosmetics and Breast Cancer.** *J Appl Toxicol.* 2003;23(2):89–95.

DARBRE, P.D; HARVEY, P.W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure and discussion of potencial human health risks. *J. Appl. Toxicol.* 28: 561- 78, 2008.

DARBRE PD, EVERETT DJ. Significance of the Detection of Esters of p-Hydroxybenzoic Acid (Parabens) in Human Breast Tumours. *J. Appl. Toxicol.* 24: 1-5, 200

DARBRE, Philippa D.; CHARLES, Amelia K. **Environmental oestrogens and breast cancer: evidence for combined involvement of dietary, household and cosmetic xenoestrogens.** *Anticancer Research*, v. 30, n. 3, p. 815-827, 2010.

DARBRE, Philippa D.; FERNANDEZ, Mariana F. **Environmental oestrogens and breast cancer: long-term low-dose effects of mixtures of various chemical combinations.** *J Epidemiol Community Health*, v. 67, n. 3, p. 203-205, 2013.

DEZA, G. E GIMENEZ-ARNAU, A. M. 2017. **Allergic contact dermatitis in preservatives: current standing and future options.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 17, pp. 263-268.

D. G. Bayülken and B. A. Tüylü, **In vitro genotoxic and cytotoxic effects of some paraben esters on human peripheral lymphocytes**, *Drug Chem. Toxicol.* 42 (2019) 386–393; <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1457049>

European Commission (EC), Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), **Opinion on Parabens. Updated Request for a Scientific Opinion on Propyl- and Butylparaben;** SCCS/1514/13, SCCS, Luxembourg, May 3, 2013; https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_132.pdf; Acesso em março de 2025.

EU ROPEAN UNION. Commission Regulation (EU) No 1004/2014 of 18 September 2014. **Amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009** of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. *Official Journal of the European Union*, L282, p. 5-14.

FDA – Food and Drugs Administration. Disponível em: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredients/parabens-cosmetics>. Acesso em: 09/07/202.

FRACHINI, E. C. G. et al. Ensaios colorimétricos para determinação da viabilidade celular e citotoxicidade in vitro. In: **Workshop do Programa de Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica da USP. São Paulo:** Blucher, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5151/9786555501407>. Acesso em: 22 mar. 2025.

FRANCO, Gisela Navarrete. **Histología de la piel.** *G Rev Fac Med UNAM* Vol.46 No.4 Julho-Agosto, 2003.

FERNANDES, J. P. S.; SAVINO, G; AMARANTE, A. C. G.; SOUSA, M. R.; SILVA, G. R; CIANCIULLI, M. E.; CORREA, M. F.; FERRARINI, M.: **Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática.** *Química Nova*, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 831-835, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600026>.

FERNANDES LIMA, E. F. et al. Avaliação da citotoxicidade e do índice mitótico de linfócitos humanos expostos a sistemas adesivos modificados com DMSO. **Revista da Associação Brasileira de Odontologia** – Seção Minas Gerais, v. 24, n. 2, p. 39–45, 2024.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, 2000.

FREYTAG, S. P. et al. Methods for assessing cell proliferation: a guide for the perplexed. **BioTechniques**, 2020.

FRANSWAY, Anthony F. et al. **Parabens**. *Dermatitis*, v. 30, n. 1, p. 3-31, 2019.

FRANSWAY, ANTHONY F.; FRANSWAY, PAULINA J.; BELSITO, DONALD V.; WARSHAW, ERIN M.; SASSEVILLE, DENIS; FOWLER, JOSEPH F. JR; DEKOVEN, JOEL G.; PRATT, MELANIE D.; MAIBACH, HOWARD I.; TAYLOR, JAMES S.; MARKS, JAMES G.; MATHIAS, C. G. TOBY; DELEO, VINCENT A.; FREESE, E.; SHEU, C. W.; GALLIERS, E.; **Parabens**. *Nature* 1973, 241, 321; Kamaraju, K.; Sukharev, S.; *Biochemistry* 2008, 47, 10540.

GONZÁLEZ-MUÑOZ P, CONDE-SALAZAR L, VAÑÓ-GALVÁN S. Allergic contact dermatitis caused by cosmetic products. *Actas Dermosifiliogr*. 2014 Nov; 105 (9):822-32. English, Spanish. DOI: 10.1016/j. ad.2013.12.018. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24656778.

HOPPE AC, PAIS MCN. **Avaliação da toxicidade de parabenos em cosméticos**. *Revinter*, v. 10, n. 03, p. 49-70, 2017.

HOFMANN, U.; PRIEM, M. A Sensitive Sensor Cell Line for the Detection of Oxidative Stress Responses in Cultured Human Keratinocytes. *PLoS ONE*, v. 15, n. 9, p. e0238474, 2020.

HU, P., OVERBY, H., HEAL, E., WANG, S., CHEN, J., SHEN, C.L., ZHAO, L., 2017. **Methylparaben and butylparaben alter multipotent mesenchymal stem cell fates towards adipocyte line- age**. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 329, 48–57.

JANIGA-MACNELLY, Alisha et al. **Assessment of the toxic effects of parabens, commonly used preservatives in cosmetics, and their halogenated by-products on human skin and endothelial cells**. *NAM Journal*, p. 100011, 2025.

JANJUA, N.R et al., **Systemic Uptake of Diethyl Phthalate, Dibutyl Phthalate, and Butyl Paraben Following Whole-Body Topical Application and Reproductive and Thyroid**

Hormone Levels in Humans. *Environmental Science & Technology* 2007 41 (15), 5564-5570.
DOI: 10.1021/es0628755.

JEWELL C, BENNETT P, MUTCH E, ACKERMANN C, WILLIAMS FM. Inter-individual variability in esterases in human liver. *Biochem.Pharmac.* 74 (6): 932–9, 2007.

KAHN, Linda G. et al. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *The lancet Diabetes & endocrinology*, v. 8, n. 8, p. 703-718, 2020.

KANG, H.S., KYUNG, M.S., KO, A., PARK, J.H., HWANG, M.S., KWON, J.E., SUH, J.H., LEE, H.S., MOON, G.I., HONG, J.H., HWANG, I.G., 2016. **Urinary concentrations of parabens and their association with demographic factors: a population-based cross-sectional study.** *Environ. Res.* 146, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.032>.

KIM, H.; XUE, X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. **Journal of Visualized Experiments**, n. 160, p. e60682, 2020.

LAKERAM M, LOCKLEY DJ, SANDERS DJ., PENDLINGTON R, FORBES B. **Paraben transport and metabolism in the biomimetic artificial membrane permeability assay (BAMPA) and 3-day and 21-day Caco-2 cell systems.** *J. Biomol. Screen.* 12 (1): 84–9, 2007.

LI, Chun et al. **Exposure of Chinese adult females to parabens from personal care products: Estimation of intake via dermal contact and health risks.** *Environmental Pollution*, v. 272, p. 116043, 2021.

Liao, C., Chen, L., Kannan, K., 2013a. **Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure.** *Environ. Int.* 57-58, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.04.00>.

Lu, J., Li, H., Luo, Z., Lin, H., Yang, Z., 2018. **Occurrence, distribution, and environmental risk of four categories of personal care products in the Xiangjiang River, China.** *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 27524–27534. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2686-7>.

Ma, Q., Bai, H., Li, W., Wang, C., Li, X., Cooks, R.G., Ouyang, Z., 2016a. **Direct identification of prohibited substances in cosmetics and foodstuffs using ambient**

ionization on a miniature mass spectrometry system. *Anal. Chim. Acta* 912, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.031>.

Ma, W.L., Zhao, X., Lin, Z.Y., Mohammed, M.O., Zhang, Z.F., Liu, L.Y., Song, W.W., Li, Y.F., 2016b. **A survey of parabens in commercial pharmaceuticals from China and its implications for human exposure.** *Environ. Int.* 95, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.07.013>.

Ma, W.L., Zhao, X., Zhang, Z.F., Xu, T.F., Zhu, F.J., Li, Y.F., 2018. **Concentrations and fate of parabens and their metabolites in two typical wastewater treatment plants in northeastern China.** *Sci. Total Environ.* 644, 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.358>.

MA, Y.; MARQUIS, R. E.; *Lett. Appl. Microbiol.* 1996, 23, 329.

MILREU, Poliana Falindo de Almeida. **Cosmetologia.** São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2012. Disponível em: < https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/49097830/978-85-8143-125-3_-_COSMETOLOGIA.pdf?1474780682=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DCosmetologia_Avaliacao_e_acao_docente.pdf&Expires=1633469981&Signature=QeuUTc3r3whwGuAgYhLomhIVhpglP11JCGeTunwNuCvJUxKiBbmSXimJaafth1beED0~Y2V1xsBWFVfeh~gBwm9tjNXuaf6230cAM7ELVtMJhp8ieKV-Jo7MFc5-7Y4xiuy6H1AWFUMYEoyHNgkWycjeVYD~KJBqv0lqoj5925fs90x-H-GsCy2PUuXnRvg4~nf2bRnZvOf4yBXs5YIR52~6sK8BRAEIOi4fBQLyJrLOGBTfa9IYDpo5nEbyUgQ3h9yRI15wHXRvw3O19ODIZIVyIWV2l0aruSfCaGeCZE0PXoDM7wFI0opZYISwWxWR117m9MZ6yG9BhS1biPw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA>. Acesso em: 23 de maio. 2023.

MORAES, NATÁLIA V. ET AL. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. *Rev. brasileira de toxicologia*, p. 1-8, 2008.

MORANDINI, M. C. L & GUEDES, M. C. S. **Parabenos em formulações cosméticas: toxicidade e novas tendencias em conservantes.** *Centro Universitário Campo Limpo Paulista*, 2021.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Antiperspirants/Deodorants and Breast Cancer. Disponível em:

<<https://www.cancer.gov/aboutcancer/causesprevention/risk/myths/antiperspirants-fact-sheet>> Acessado em: 20/04/2022.

NES, I. F.; EKLUND, T.; *J. Appl. Bacteriol.* 1983, 54, 237.

PARK, Na-Youn et al. **Parabens in breast milk and possible sources of exposure among lactating women in Korea.** *Environmental Pollution*, v. 255, p. 113142, 2019.

PRUSAKIEWICZ, Jeffery J. et al. **Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects.** *Toxicology*, v. 232, n. 3, p. 248-256, 2007.

POLLACK, Anna Z. et al. **Urinary levels of environmental phenols and parabens and antioxidant enzyme activity in the blood of women.** *Environmental research*, v. 186, p. 109507, 2020.

PICOLI, L. C. A. et al. Avaliação da toxicidade do dimetilsulfóxido (DMSO) em células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney). **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 18, n. 2, p. 40–45, 2015.

RITO, Priscila da Nobrega et al. **Avaliação dos aspectos do controle da qualidade de produtos cosméticos comercializados no Brasil analisados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.** *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, vol. 71(3),

557-565, 2012. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/32464> COSMETOVIGILÂNCIA: PREVENÇÃO E CONTROLE DE REAÇÕES ADVERSAS DE PRODUTOS COSMÉTICOS. Acesso em: 20 abr. 2022.

RIVM Report, **Exposure to and toxicity of methyl-, ethyl- and propylparaben. A literature review with a focus on endocrine-disrupting properties.** *National Institute for Public Health and the Environment*. DOI 10.21945/RIVM-2017-0028.

SANTOS, L. M.; SIPERT, C. R. Viabilidade celular por MTT para padronização da concentração de soro bovino fetal em células de papila apical in vitro. **Brazilian Oral Research**, v. 35, supl. 3, p. 279, 2021.

SCCS – SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY. Opinion on parabens – Update request for scientific opinion on propyl and butylparaben. SCCS/1514/13, 2013. Disponível em Acesso em 23 de agosto de 2015.

SHERLEY, J.L., STADLER, P.B., STADLER, J.S., 1995. A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. *Cell Proliferation*, 28(3):137-44. **SHERLEY, J.L., STADLER, P.B., STADLER, J.S., 1995.** A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. *Cell Proliferation*, 28(3):137-44.

SHIMABUKO, D. M. et al. Avaliação da citotoxicidade do DMSO em células da papila apical humana: estudo in vitro. **Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia**, 2021.

SONI MG, TAYLOR SL, GREENBERG N, BURDOCK GA. **Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature.** *Food Chem Toxicol.* 2002 Oct; 40(10): 1335-73.

SONI; BURDOCK; TAYLOR, GREENBERG, 2000. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691500001629>. Acessado em 20 de março de 2022.

STRANGE, P.G. Agonist binding, agonist affinity and agonist efficacy at G proteincoupled receptors. *Brit. J. Pharmac.*153: 1353-63, 2008

OLIVEIRA TA, PAIXÃO FG, PRESTES PS, CAMPOS MP, POLACOW MLO, LEONARDI GR, et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana de sistemas nanoestruturados.** *Lat Am J Pharm.* 2007 Out; 26(6): 878-82.

TAVARES, A. T.; PEDRIALI, C. A. **Relação do uso de parabenos em cosméticos e a sua ação estrogênica na indução do câncer no tecido mamário.** *Revista Multidisciplinar da Saúde, São Paulo*, ano III, n. 06, 2011.

THORPE, J.B., BURGESS, P.S., SADKOWSKI, M., DECATANZARO, D., 2013. **Estrogen-progesterone balance in the context of blastocyst implantation failure induced by predator stress.** *Psychoneuroendocrinology* 38, 3048–3056.

TOXNET – TOXICOLOGY DATA NETWORK. BUTYLPARABEN. Disponível em <<http://toxnet.nlm.nih.gov>> Acessado em junho de 2023.

UNIÃO EUROPEIA. REGULAMENTO (CE) N.º 1223/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 30 de novembro de 2009.

US. CONGRESS. United States Code: Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, 21 U.S.C. §§ 301-392 Suppl. 4 1934. Periodical. Disponível em: <https://loc.gov/item/uscode1934-005021009/>.

UNITED STATES OF AMERICA - Amended safety Assessment of Parabens as Used in Cosmetics. Aug, 2018. Disponível em: <https://www.cir-safety.org/sites/default/files/Parabens.pdf>.

YANG, Liuqing et al. **The role of oxidative stress and natural antioxidants in ovarian aging**. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 617843, 2021.

YANG ZHAO, YANLIN LIU, YINING CHEN, XIAOLING WU, QINRU XIAO, CHUN LI, MINHUI LI, WANTING HU, HUIQIAO GU, SHAOYOU LU. **Exposure to parabens and associations with oxidative stress in adults from South China**. *Science of The Total Environment*, Volume 774, 2021, 144917, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144917>.

WANG, S., JIANG, X., LIU, Y., & LIU, Y. (2020). **Advances in toxicological research of HaCaT cell line**. *Toxicology in Vitro*, 65, 104850.

Z. PETRIC et al.: **The controversies of parabens – an overview nowadays**, *Acta Pharm.* 71 (2021) 17–32.

ZIRWAS, J. MATTHEW; ZUG, KATHRYN A.; ATWATER, AMBER R.; SILVERBERG, JONATHAN; REEDER, MARGO J. **Parabens**. *Dermatitis*. 30(1):3-31, January/February 2019.