

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – Unifal-MG

GABRIELLA PADOVANI TAHAN

**CORRELAÇÃO ENTRE O USO DE BATOM E A CONCENTRAÇÃO DE
PARABENOS EM MULHERES EXPOSTAS AO COSMÉTICO**

Alfenas

2015

GABRIELLA PADOVANI TAHAN

**CORRELAÇÃO ENTRE O USO DE BATOM E A CONCENTRAÇÃO DE
PARABENOS EM MULHERES EXPOSTAS AO COSMÉTICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas,
como requisito para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Orientador: Profa. Dra. Isarita Martins

Alfenas

2015

:

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Tahan, Gabriella Padovani.

Correlação entre o uso de batom e a concentração de parabenos em mulheres expostas ao cosmético. / Gabriella Padovani Tahan – Alfenas - MG, 2015.

65 f.

Orientador: Isarita Martins.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Parabenos. 2. Toxicologia. 3. Aditivos em Cosméticos.
I. Martins, Isarita. II. Título.

CDD-615.9

GABRIELLA PADOVANI TAHAN

**CORRELAÇÃO ENTRE O USO DE BATOM E A CONCENTRAÇÃO DE
PARABENOS EM MULHERES EXPOSTAS AO COSMÉTICO**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Defesa de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais.

Aprovada em:

Profº: **DERNEVAL DE CAZU ALW**

Instituição: **FCFRP-USP**

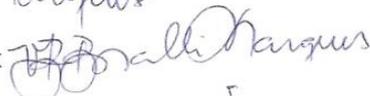
Assinatura:



Profº: **Vanessa Eugênia Boralli Marques**

Instituição: **UNIFAL-MG**

Assinatura:

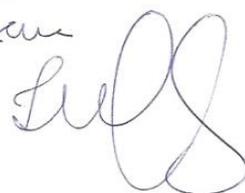


Profº: **Isabela Martins**

Instituição: **UNIFAL-MG**

Assinatura:

(orientadora)



Dedico a Deus, meu amado esposo, minha amada mãe e irmã, meus amados Tio Mauro e avôs, familiares e amigos: pelas bênçãos, apoio e incentivos que me levaram conquista deste desafio.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por iluminar meus passos, me dar forças e abençoar essa trajetória.

Agradeço a minha mãe amada, minha inspiração e meu maior exemplo de determinação, força e ousadia, e por estar sempre ao meu lado apoiando e incentivando.

Ao meu esposo, por todo o companheirismo, apoio, dedicação e carinho durante toda a trajetória. Pelas palavras que souberam me consolar, apoiar e incentivar em todos os momentos que precisei. E por compartilhar comigo todas as alegrias e conquistas vividas.

À minha irmã querida Fernanda que com seu amor incondicional e sua alegria de viver tornou esses anos mais floridos. E ao Gustavo, meu cunhado, sempre amigo, piadista e incentivador.

Ao meu amado Tio Mauro, que mesmo longe, sempre foi um pai presente que me encorajou durante os desafios e celebrou junto comigo as conquistas.

À aqueles que são anjos em minha vida, meus avôs Sílvio, Orlando, Maria Cecília e Cecília, obrigada pelo abraço gostoso em todos os retornos para casa, pelas orações, palavras de carinho e otimismo que tudo sempre daria certo, e deu.

Ao querido Vandeir, que sempre esteve presente também, dando apoio, incentivo e carinho.

A titia quase mãe Cacá, aos tios que tanto amo Amauri e Isilda, Maurício e Edésia, Madrinha e Tio Jubran, Padrinho e Tia Suellen, Tia Cris e Tio Luiz, e aos primos irmãos que cresceram comigo Danilo, Dênis, Eduardo e Thaís, e também aos meus priminhos que alegam minha vida Breno, Rodrigo, Eduardo, Sofia, Heloísa, Ana Laura, Isabela e Pedro. Obrigada a todos por essa família maravilhosa, sempre presente, sempre otimista, sempre acolhedora e incentivadora.

À segunda família, Beto, Nancy, Guilherme e Juliana, por me acolherem em Alfenas e me apoiarem durante todo o caminho percorrido.

À minha orientadora, Profa Dra. Isarita, pelos dois anos de ensinamentos e por compartilhar seus conhecimentos e estimular sempre a atingir o melhor desempenho.

Às minhas queridas voluntárias Nayara, Fabiana, Fernanda e Ana Carolina que me ajudaram, que passaram dias e fim de semana comigo no laboratório, alegraram minha rotina, e me proporcionaram grandes amizades.

À amada família farmacêutica, meus amigos de profissão da 2007/01, que mesmo cada um para um lado, sempre esteve presente, torcendo pelo sucesso.

À minha vizinha Marcela, que foi uma grande amiga que o mestrado me proporcionou, pelas palavras motivantes e carinho de amiga.

À minha amiga Patrícia Penido, sempre a disposição para nos ajudar no que for preciso, e pelas altas risadas no laboratório.

À minha amiga Tânia, companheira durante essa jornada. E à Alessandra por tornar tudo mais simples.

Aos amigos e companheiros de trabalho do LATF, Lailah, Juliana, Aline, Carla, Taila, Mariane, Alberto, Lidiane, Giovana, Nayna, Alessandra.

Aos professores Eduardo e Vanessa.

A Unifal e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigado!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Os parabenos são conservantes largamente utilizados na indústria cosmética, em produtos farmacêuticos e como aditivos alimentares. Têm uma longa história de utilização, uma vez que são economicamente muito rentáveis e pensa-se que são relativamente atóxicos para o homem. No entanto, recentes estudos apontam que os parabenos podem ter atividade estrogênica. O batom é um cosmético amplamente utilizado pelas mulheres e os componentes dele podem ser absorvidos tanto pela mucosa oral, quanto pelo trato digestório. A Cosmetotoxicologia é uma nova especialidade, dentro da Toxicologia, que surgiu graças às demandas do setor produtivo e do regulatório, e visa contribuir para a obtenção e/ou liberação para a população de produtos seguros e normatizados. Nesse contexto, é crescente a demanda para o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de quantificar os parabenos nos cosméticos com confiabilidade, para fins de fiscalização e controle de qualidade. Além disso, como não são conhecidos os dados cinéticos dessas substâncias, faz-se necessário também desenvolver métodos para quantificar esses analitos em matrizes biológicas. Desse modo esse trabalho propõe, pela primeira vez, estudar a correlação entre o uso do batom e a concentração de parabenos no soro de mulheres que fazem uso desse cosmético labial. As metodologias de análise de parabenos tanto em batom quanto em sangue foram desenvolvidas e validadas seguindo protocolos de validação e os resultados foram satisfatórios para todos os parâmetros avaliados, tais como seletividade, detectabilidade, linearidade, precisão e exatidão. Foram analisadas amostras de 18 voluntárias em 3 fases, nas quais, em uma delas, as mulheres usaram batom contendo uma concentração conhecida de parabenos. Após tratamento estatístico dos dados, com aplicação de testes não-paramétricos, foi possível concluir que há absorção de parabenos por meio do uso de batom, uma vez que foi demonstrada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, no teste de Friedman) entre as concentrações de parabenos no soro de mulheres que utilizaram batom, contendo essas substâncias, em relação ao não uso do cosmético labial, e foi demonstrada forte correlação (coeficiente de Spearman com $r = 0,7205$) entre a quantidade usada desse batom e a concentração de parabenos no soro.

Palavras chave: Parabenos. Toxicologia. Aditivos em Cosméticos.

ABSTRACT

Parabens preservatives are widely used in the cosmetic, pharmaceuticals and food industry as additives. They have a long history of use since they are economically very advantageous and it is thought that they are relatively nontoxic to humans. However, recent studies indicate that parabens may have estrogenic activity. Lipstick is a cosmetic widely used by women and the components of it can be absorbed by both the oral mucosa, as the digestive tract. The Cosmetotoxicology is a new specialty within the Toxicology, which came about thanks to the demands of the productive and the regulatory sector, and aims to obtain and release of safe and standardized products to the public. In this context, there is a growing demand for the development of analytical methods to quantify parabens in cosmetics with reliability for inspection and quality control. Furthermore, since the kinetic data of these substances are not known, it is also necessary to develop methods to quantify these analytes in biological matrices. Thus this paper proposes, for the first time a correlation between the use of lipstick and the amount of parabens in women who make use of this cosmetic. Methodologies of parabens analysis both in lipstick and in blood were developed and validated following validation protocols and the results were satisfactory for all parameters such as selectivity, detectability, linearity, precision and accuracy. Samples of 18 volunteers were analyzed in three stages, which in one of these stages, they made use of lipstick with parabens in a known concentration. After statistical processing of data, using a non-parametric test, it was concluded that there is absorption of parabens through the use of lipstick, as was demonstrated statistically significant difference ($p < 0.05$, the Friedman test) between the concentrations of parabens in the serum of women who used lipstick containing these substances, in relation to the non-use of cosmetic lip and was demonstrated strong correlation (Spearman coefficient $r = 0.7205$) between the used amount of lipstick and the concentration of parabens in serum.

Keywords: Parabens. Toxicology. Additives in Cosmetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química dos parabenos.	18
Figura 2 – Fluxograma da técnica de preparo de amostras de batom para a determinação de parabenos.	28
Figura 3 - Fluxograma da técnica otimizada para a extração de parabenos em amostras de soro.	31
Figura 4 - Cromatograma obtido com injeção solução de padrão na concentração $800 \mu\text{g mL}^{-1}$	34
Figura 5 - Cromatograma obtido na injeção de um batom fortificado.	37
Figura 6 - Cromatograma obtido com injeção de um batom isento de parabenos.	38
Figura 7 - Cromatograma obtido nas condições cromatográficas otimizadas.	44
Figura 8 - Cromatograma obtido para uma amostra branco fortificada na concentração 1 ng mL^{-1}	47
Figura 9 - Cromatograma obtido para uma amostra branco fortificada na concentração 20 ng mL^{-1}	48
Figura 10 - Cromatograma obtido pela injeção da amostra da voluntária 10, coletada na fase 1 do experimento.	51
Figura 11 - Cromatograma obtido pela injeção da amostra da voluntária 10, coletada na fase 2 do experimento.	51
Figura 12 - Cromatograma obtido pela injeção da amostra da voluntária 10, coletada na fase 3 do experimento.	52
Figura 13 - Dispersão de dados obtida pela correlação entre a quantidade de parabenos totais, em relação à quantidade de batom M usada por cada voluntária em 5 dias, e a concentração de parabenos totais em soro (coeficiente de correlação de Spearman= 0,7202).	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa molar, pKa, log K _{OW} e solubilidade em água dos parabenos: metil, etil, propil, butil e benzil.....	18
Tabela 2 - Parâmetros analisados no teste de Youden para avaliação da robustez e fórmula para cálculo das variações na metodologia empregada.....	30
Tabela 3 - Parâmetros de conformidade do sistema em uma solução padrão de concentração 800 µg mL ⁻¹ de parabenos, nas condições cromatográficas otimizadas.....	35
Tabela 4 - Resultados obtidos com a alteração do solvente orgânico na extração de parabenos em batom.....	36
Tabela 5 - Resultados obtidos com a alteração do pH do solvente de extração de parabenos em batom.....	36
Tabela 6 - Parâmetros de conformidade do sistema obtidos de um cromatograma de parabenos (800 µg mL ⁻¹) em batom, nas condições otimizadas.....	37
Tabela 7 - Linearidade, limite de detecção e quantificação do método de determinação de parabenos em batom nas condições otimizadas, no intervalo de 50 a 800 µg mL ⁻¹ (n=6).....	39
Tabela 8 - Precisão, expressa pelo desvio padrão relativos, do método de determinação de parabenos em batom (n=6).....	40
Tabela 9 - Concentração de parabenos, expressa em m/m (%), encontrada nos batom (n=6/batom).....	41
Tabela 10 - Transições de massa e energia de colisão encontrada para os parabenos em ESI modo negativo, no LC-MS-MS.....	42
Tabela 11 - Transições de massa e energia de colisão encontrada por Jiménez-Díaz et al (2011) na análise de parabenos no LC-MS-MS.....	43
Tabela 12 - Concentrações de parabenos em soro e plasma com o método de extração testado.....	45
Tabela 13 - Linearidade do método de determinação de parabenos em soro nas condições otimizadas, no intervalo de 1 a 20 ng mL ⁻¹ (n=6).....	47
Tabela 14 - Precisão, expressa pelo desvio padrão relativo, do método determinação de parabenos em soro (n=6).....	49
Tabela 15 - Exatidão, expressa pelo erro padrão relativo, do método determinação de	

parabenos em soro (n=6).	49
Tabela 16 - Estabilidade, expressa pelo desvio padrão relativo, do método determinação de parabenos em soro (n=3).	50
Tabela 17 - Concentração de parabenos (ng/mL) encontrado na análise de soro das voluntárias nas 3 fases do estudo.....	53
Tabela 18 - Estatística descritiva para os resultados obtidos de concentração de parabenos totais em soro (n=18), nas três fases do estudo.	53
Tabela 19 - Valores de p obtidos na comparação entre as médias encontradas para a concentração de parabenos totais em soro, nas três fases do estudo (para um nível de 95% de confiança, $p=0,05$), pelo teste de Friedman.	54

LISTA DE ABREVIACÕES

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	- Atmospheric-pressure chemical ionization
BePa	- Benzilparabeno
BHT	- Butilhidroxitolueno
BuPa	- Butilparabeno
CV	- Coeficiente de variação
DAD	- Detector de arranjo de diodos
EPR	- Erro Padrão Relativo
ELL	- Extração líquido-líquido
ESI	- fonte de ionização electrospray
EtPa	- Etilparabeno
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LC-MS-MS	- Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas
LD	- Limite de detecção
LIQ	- Limite Inferior de Quantificação
log k_{OW}	- Coeficiente de partição água – octanol
LQ	- Limite de quantificação
LSQ	- Limite superior de quantificação
MePa	- Metilparabeno
MRM	- <i>multiple reaction monitoring</i>
PHBA	- ácido p-hidroxibenzóico
pK_a	- pH no qual a molécula encontra-se 50% na forma ionizada e 50% na forma não ionizada
PrPa	- Propilparabeno
RSD	- Desvio Padrão Relativo
SIM	- <i>selected ion monitoring</i>
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	23
4	EXPERIMENTAL	25
4.1	REAGENTES, SOLVENTES E APARELHAGEM.....	25
4.2	DESENHO DO ESTUDO	26
4.3	MÉTODOS	27
4.3.1	Análise de parabenos em batom	27
4.3.2	Análise de parabenos em soro	30
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	ANÁLISE DE PARABENOS EM BATOM.....	34
5.2	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA ANÁLISE DE PARABENOS EM SORO	41
5.3	OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE PARABENOS EM SORO	44
5.4	VALIDAÇÃO DA ANÁLISE DE PARABENOS EM SORO	46
5.5	ANÁLISE DE PARABENOS NAS AMOSTRAS DE VOLUNTÁRIAS.....	50
6	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A - QUESTIONÁRIO	62
	ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO	64

1 INTRODUÇÃO

O uso de cosméticos tem aumentado gradativamente nos últimos anos devido a maior vaidade de homens e mulheres, estimulados pelo fenótipo ideal que a mídia estabelece. Estados Unidos, Brasil e Japão representam o maior mercado de cosméticos ao redor do mundo. Visando este mercado ascendente as indústrias investem cada vez mais em tecnologia e melhoria da qualidade de seus produtos.

Para aumentar a vida útil de um produto são utilizados conservantes sintéticos que inibem o crescimento microbiano, que pode ocorrer durante a fabricação e na utilização de uma formulação. Os parabenos são conservantes largamente utilizados na indústria cosmética, em produtos farmacêuticos e como aditivos alimentares. No entanto, em alguns países, o uso deste conservante vêm sendo restringido. Na Europa, parabenos foram proibidos em produtos de uso infantil. Estas substâncias podem ter múltiplos efeitos biológicos, mas geralmente predominam os seus efeitos inibidores sobre transporte da membrana e os processos da função mitocondrial (SONI et al, 2002). Têm uma longa história de utilização, uma vez que são economicamente muito rentáveis e pensa-se que são relativamente não-tóxicos para o homem.

Desde meados de 2004, os consumidores são constantemente bombardeados por informações nos meios de comunicação e pela comunidade científica que o induzem a evitar o uso dos produtos que utilizem várias substâncias químicas, tais como os parabenos, que são os conservantes mais empregados, em vista de suas vantagens, dentre elas o grande aumento de vida útil de um produto, por seu amplo espectro de ação contra os microrganismos. Grande parte dessa rejeição, por alguns grupos, ao uso dos parabenos, se deve a dois estudos científicos: um deles, de 1998, publicado por Routledge et al., que demonstra a atividade estrogênica dos parabenos e, um outro estudo, de 2004, desenvolvido por Darbre et al., que descreve a presença de parabenos, em tecido canceroso de seio humano.

Apesar dos estudos serem controversos, em relação à toxicidade dos parabenos e de sua concentração nas formulações ser baixa, é de suma importância considerar o risco dessa exposição, uma vez que a população consome vários produtos, tais como alimentos, medicamentos e muitos cosméticos. O batom é um cosmético amplamente utilizado pelas mulheres e os componentes dele podem ser absorvidos tanto pela mucosa oral, quanto pelo trato digestório.

A Cosmetotoxicologia é uma nova especialidade, dentro da Toxicologia, que surgiu graças às demandas do setor produtivo e do regulatório, e visa contribuir para a obtenção e/ou

liberação para a população de produtos seguros e normatizados (CARVALHO et al., 2010). Nesse contexto, é crescente a demanda para o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de quantificar os parabenos nos cosméticos, alimentos e medicamentos com confiabilidade, para fins de fiscalização e controle de qualidade. Além disso, como não são conhecidos os dados cinéticos dessas substâncias, faz-se necessário também desenvolver métodos para quantificar esses analitos em matrizes biológicas, tais como sangue e urina, a fim de elucidar o seu comportamento e estabelecer correlações entre o consumo dos produtos, contendo tais substâncias, e a concentração dessas no organismo, complementando assim a avaliação de risco, em relação a essa exposição.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cremes, loções, xampus, maquiagem e uma vasta gama de produtos cosméticos fazem parte da rotina de higiene e beleza de milhões de pessoas. A história dos cosméticos acompanhou, através dos tempos, a própria história do homem e esteve sempre ligada à sua evolução científica e cultural (QUIROGA; GUILLOT, 1955).

Atualmente, diante do sucesso crescente dos cosméticos e da multiplicidade dos produtos oferecidos, a maioria dos países editaram leis para garantir a inocuidade desses produtos, deixando sob responsabilidade dos pesquisadores a avaliação científica de sua eficácia e segurança (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

A classificação desses produtos enquadra-os em quatro categorias: produtos de higiene, cosmético, perfume e produto de uso infantil e são classificados quanto ao grau de risco que oferecem: grau 1 – produtos com risco mínimo e grau 2 – produtos com risco potencial. Os critérios para essa classificação foram definidos em função da finalidade de uso do produto, áreas do corpo que são abrangidas, modo de usar e cuidados a serem observados, quando de sua utilização (ANVISA, 2000).

De acordo com a definição conferida pela legislação vigente, os cosméticos, produtos de higiene e perfumes (também chamados de produtos cosméticos) são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2000).

Os batons são classificados na categoria de cosméticos e tem como objetivo modificar o aspecto natural dos lábios dando-lhe uma tez diferente, conferindo reflexo e brilho. Todos os produtos referido como batom apresentam grau de risco 1 (risco mínimo) (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998; ANVISA, 2000).

Foi estimado que uma mulher ingere cerca de 1,8 kg de batom durante toda sua vida (SAFE COSMETICS, 2007). Quando uma mulher, que está usando batom, passa a língua pelos lábios, come ou bebe algo, ela poderá ingerir os componentes presentes nesse cosmético, além de absorvê-los pela mucosa labial (SOARES; NASCENTES, 2013; LORETZ, 2005). Cientistas americanos consideraram que a ingestão média de batom é de 24

miligramas por dia. Mulheres que costumam retocar a cor dos lábios durante o dia podem ingerir até 87 miligramas do produto (BERKELEY HEALTH ONLINE, 2013).

Um batom é essencialmente composto de uma pasta gordurosa na qual estão presentes vários ingredientes, cujo equilíbrio resulta na sua textura. Os componentes mais utilizados são a cera, que confere o brilho e a consistência; os compostos graxos pastosos para suavidade e aderência aos lábios; e os óleos que fornecem untuosidade. Os corantes têm tendência a colorir a mucosa labial e podem desencadear reações alérgicas, por esse motivo, as indústrias optam, muitas vezes, por pigmentos e lacas, como o óxido de ferro (amarelo, vermelho e marrom) e lacas de fluoresceína. Os antioxidantes são indispensáveis na formulação de um batom, pois são responsáveis pela estabilidade e conservação. Os perfumes estão presentes, muitas vezes, para mascarar eventuais odores residuais dos corpos gordurosos. Podem ser adicionados, ainda, alguns compostos com propriedades específicas, tais como os cicatrizantes e os filtros solares de baixa concentração (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998). Em uma formulação de batom, os conservantes têm o objetivo de impedir o crescimento excessivo de microrganismos e proteger contra oxidações indesejáveis, assegurando, dessa forma, seu prazo de validade e segurança de uso (REBELLO, 2008). A eficiência de um agente antimicrobiano, ou conservante, está relacionada a três fatores: efeito do pH, efeito do grau de dissociação do ácido (pKa) e ação específica do agente antimicrobiano (ANTUNES; CANHOS, 1983). Esta prevenção é importante, pois um cosmético entra em contato repetitivamente com o ambiente e com a pele humana (ORTON; WILKINSON, 2004).

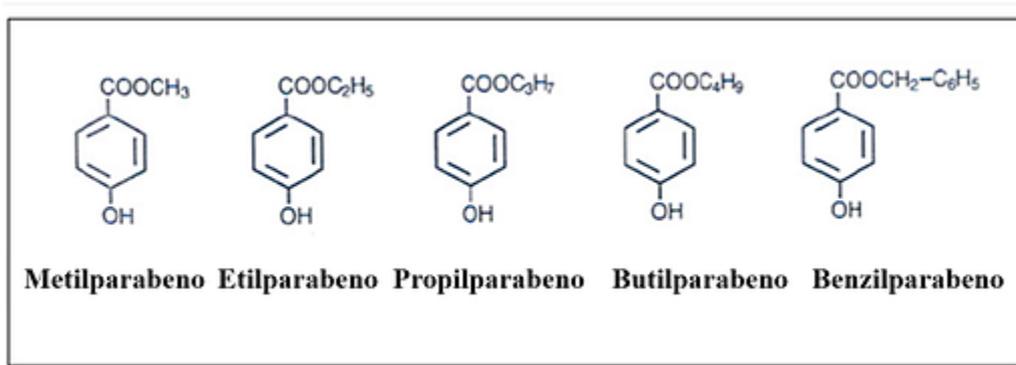
Os parabenos são os conservantes mais comumente usados em produtos cosméticos. As várias propriedades que predispõem seu amplo uso são (BŁĘDZKA et al., 2014):

- a) o amplo espectro de atividade contra leveduras, bolores e bactérias;
- b) a estabilidade química (por um intervalo amplo de temperaturas e valores de pH que variam entre 4,5-7,5);
- c) inércia;
- d) baixo grau de toxicidade sistêmica;
- e) baixa frequência de sensibilização;
- f) solubilidade suficiente em água (permitindo obter concentração efetiva);
- g) uso relativamente seguro;
- h) baixos custos de síntese;
- i) nenhum odor perceptível ou gosto;
- j) não causar mudanças na consistência ou coloração dos produtos.

Sendo que a combinação destas propriedades torna relativamente difícil encontrar um conservante, que seja tão satisfatório quanto os parabenos. São classificados como "geralmente considerados como seguros" e aprovados para uso em alimentos pela Food and Drug Administration (FDA) nos EUA e pelos Regulamentos da União Europeia (SONI et al., 2001).

Esses compostos são ésteres do ácido p-hidroxibenzoico (PHBA) e incluem o metil (MePa), etil (EtPa), propil (PrPa), butil (BtPa), benzil (BePa) (FIGURA 1) (CAO et al, 2013). Os valores de massa molar, pKa, coeficiente de partição água-octanol, e a solubilidade em água do metil, etil, propil, butil e bezilparabenos estão representados na Tabela 1 (BŁĘDZKA et al., 2014).

Figura 1 - Estrutura química dos parabenos.



Fonte: CAO et al (2013).

Tabela 1 - Massa molar, pKa, log kOW e solubilidade em água dos parabenos: metil, etil, propil, butil e benzil.

Analito	Massa Molar	pKa	Coefficiente de partição água – octanol (log kOW)	Solubilidade em água a 25°C (g/100mL)
Metilparabeno	152	8,17	1,66	2,00
Etilparabeno	166	8,22	2,19	0,86
Propilparabeno	180	8,35	2,71	0,30
Butilparabeno	194	8,37	3,24	0,15
Benzilparabeno	228		3,56	0,05

Fonte: Do autor.

Individualmente ou em combinação, essas substâncias são utilizadas em quase todos os tipos de cosméticos. Na indústria farmacêutica desde meados de 1920, os parabenos

também estão presentes em uma grande variedade de formulações farmacêuticas, habitualmente nas concentrações inferiores a 1%. A atividade antimicrobiana dos parabenos aumenta, mas a solubilidade em água diminui com o comprimento da cadeia de alquil (ORTH, 1980; ELDER, 1984). O metilparabeno e propilparabeno são os mais amplamente utilizados em cosméticos e alimentos, uma vez que associados possuem efeito sinérgico quanto à ação antimicrobiana (JACKSON, 1992).

Como ocorre com o ácido benzóico, os parabenos parecem apresentar maior atividade antimicrobiana na forma não dissociada. A redução de pH de um produto cosmético, por exemplo, acarreta um aumento na proporção de moléculas não-dissociadas do ácido orgânico, que é responsável pela ação antimicrobiana dos conservantes. A não dissociação destes compostos lipofílicos facilita a penetração das membranas celulares dos microorganismos, sobre os quais vai ser exercida ação inibitória do agente conservante. Sugere-se que estes ácidos lipofílicos inibam ou levam a morte os microorganismos, tanto pela alteração da permeabilidade das membranas celulares, quanto pela interferência em reações metabólicas essenciais para o crescimento e atividade celular (ANTUNES et al., 1983).

A exposição humana aos parabenos foi estimada, em média, de 76 mg/dia, sendo 1mg/dia, aproximadamente, através dos alimentos, 50 mg/dia, através de uso de cosméticos e produtos de higiene pessoal e 25 mg/dia, através do uso medicamentos (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005).

No Brasil, a lista de conservantes permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, é regulamentada pela ANVISA através da Resolução RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001, republicada no Diário Oficial de 02/10/2001, que estabelece que a concentração máxima permitida para o ácido 4-hidroxibenzóico, seus sais e ésteres (parabenos) de 0,4 % (expresso como ácido), no uso individual, e 0,8 % (expresso como ácido), para misturas dos sais ou ésteres (ANVISA, 2001).

Há poucos dados na literatura, sobre a toxicocinética dos parabenos. DARBRE et al (2004), discutem que, os experimentos em animais têm demonstrado que os parabenos são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e são distribuídos, pela corrente sanguínea, para órgãos perfundidos, dentre eles o fígado. São rapidamente hidrolisados a ácido *p*-hidroxibenzóico, que na forma conjugada é excretado pela urina. Quando esses compostos estão presentes em cosméticos, podem sofrer hidrólise na própria derme, devido à presença das esterases. No entanto, quando estão presentes em altas concentrações, a hidrólise poderá ser incompleta e eles também permanecem inalterados no organismo sendo, assim,

acumulados nos tecidos (BORREMANS et al, 2004). Todavia, a Associação Européia de Cosméticos e Perfumaria, COLIPA (The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association), enfatizou que, uma vez que os parabenos são hidrolisados na superfície dérmica, não atingem a corrente sanguínea (GOLDEN; GANDY; VOLLMER, 2005).

A segurança de ingredientes e produtos cosméticos tem sido objeto de sucessivas avaliações toxicológicas. A riqueza dos trabalhos disponíveis na literatura científica e regulatória já credencia o registro de uma nova especialidade a Cosmetotoxicologia, graças ao crescimento exigido pelo setor produtivo e regulatório, os quais exigem produtos seguros e normatizados.

Vários estudos em animais e humanos estão reportados na literatura questionando a segurança desses conservantes. Todavia, as conclusões muitas vezes são contraditórias.

Oishi et al (2002) avaliaram o efeito de diferentes concentrações (0 a 1 %) de propilparabeno em animais e concluíram que esse conservante altera a função reprodutiva em ratos machos, incluindo redução da quantidade de esperma, diminuição da cauda do espermatozóide e dos níveis de testosterona e que a sua atividade estrogênica é semelhante a do composto 4-nonilfenol. Aos conservantes etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno atribuiu atividade estrogênica 150.000, 30.000 e 10.000 vezes, respectivamente, inferior ao composto 17 β -estradiol. Estudos “in vitro” sugerem que essa atividade induz o crescimento de células do câncer de mama (MCF-7) e influência a expressão de genes dependentes de estrogênio (YE et al, 2006).

A atividade estrogênica dos parabenos aumenta com o aumento do comprimento da cadeia lateral, com ramificações no grupo alquil éster, e a ordem de atividade no receptor estrogênico é benzil > butil > propil = etil > metil. Em vista da lipossolubilidade dos compostos de maior cadeia lateral, esses conservantes podem ser acumulados nos tecidos de maneira similar a outros xenobióticos lipofílicos (DARBRE et al, 2004).

Por outro lado, um grande número de ensaios “in vitro” ou em estudos “in vivo” sobre a estrogenicidade dos parabenos foi revisado pelo *US Cosmetic Ingredient* e os testes “in vitro” sugerem que os parabenos de cadeia longa apresentam uma fraca potência e afinidade para os receptores de estrogênio, enquanto que por via oral, em estudos “in vivo” (ensaio uterotrópico em roedores), não apresentaram estrogenicidade. Avaliando os efeitos da exposição do útero (humano e animal) a quantidades suficientes de parabenos e potentes compostos estrogênicos, tais como 17 β -estradiol, foi possível concluir que, devido aos diferentes potenciais estrogênicos destes compostos, não há base científica para afirmar que os parabenos podem causar efeitos adversos no desenvolvimento fetal. Não foi relatada

atividade estrogênica, “in vivo” ou “in vitro” para o metabólito dos parabenos, o ácido *p*-hidroxibenzóico (PHBA) (GOLDEN; GANDY; VOLLMER, 2005; AUBERT; AMELLER; LEGRAND, 2012).

Em face aos numerosos apontamentos a respeito dos efeitos que os parabenos podem causar no organismo humano, uma grande variedade de métodos foram desenvolvidos para análise desses compostos em cosméticos (MARTINS et al, 2011; FEI et al, 2011; CHENG et al, 2012), medicamentos (KAMBLE; SINGH; SINGH, 2011), alimentos (HE et al, 2012; CAO et al, 2013), plasma (AUBERT; AMELLER; LEGRAND, 2012) e urina (YE et al, 2006). Entre as principais técnicas analíticas empregadas destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector de UV (TZANAVARAS et al, 2012), com detector de arranjo de diodos (FEI et al, 2011), com detector de espectrometria de massas (CAO et al, 2013). Ainda, podem ser empregadas as técnicas de cromatografia gasosa, após derivatização da amostra (PRICHODKO et al, 2012) e de eletroforese capilar (CHENG et al, 2012).

Com a grande expansão dos trabalhos com parabenos e diversos métodos publicados, Gonzales et al (2015) e Piao et al (2014) lançaram diferentes revisões sobre os métodos de extração e análise. Enquanto os primeiros autores focaram em cosméticos e amostras ambientais, Piao et al (2014) discutiram a análise de parabenos em diversas matrizes, além de cosméticos e amostras ambientais, também em alimentos, medicamentos, água, saliva humana, e soro. Os autores apresentaram os diversos métodos de extração incluindo extração líquido-líquido, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, microextração em fase líquida, microextração líquido-líquido dispersiva, extração em barra sortiva, entre outras. Piao et al (2014) concluíram que a extração em fase sólida (SPE) é o método de extração mais popular para análise de parabenos, e a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa são os métodos de quantificação mais utilizados. Durante a análise por cromatografia líquida as colunas octadecilsilano (C18) e octilsilano (C8) são as mais utilizadas para separação cromatográfica. Os autores ressaltaram que o detector de espectrometria de massas vem se tornando cada vez mais popular, pois oferece limites de detectabilidade da ordem de ppt.

Nos últimos anos, a demanda por trabalhos que correlacionam os parabenos em matrizes biológicas aumentou significativamente. Jiménez-Díaz et al (2011) propuseram um novo método cromatográfico com detector por espectrometria de massas (LC-MS-MS) para avaliar a presença de parabenos em amostras de tecido placentário humano. O método envolvia uma extração da amostra utilizando acetato de etila e quantificação por LC-MS-MS, utilizando a ionização química a pressão atmosférica (APCI) em modo negativo. A faixa de limite de detecção encontrada foi de 0,03 a 0,06 ng g⁻¹ e de 0,1 a 0,2 ng g⁻¹ para o limite de

quantificação. O método foi aplicado em 50 amostras de tecido placentário de mulheres na Espanha. O metilparabeno foi detectado em 96% das amostras e quantificado em 94%, já o etilparabeno foi detectado em 66% e quantificado em 40%. O propilparabeno foi detectado e quantificado em 90% das amostras, enquanto o butilparabeno foi detectado em 16% e quantificado em 8% das amostras analisadas.

Lee et al (2013), desenvolveram um método analítico quantitativo parabenos em urina. Os autores empregaram a extração em fase sólida e análise foi realizada por LC-MS-MS, obtendo limites de quantificação de 1,0, 0,5, 0,2 e 0,5 ng mL⁻¹ para o metil, etil, propil e butilparabeno, respectivamente. Shirai et al (2013), desenvolveram um método para verificar a excreção urinária de parabenos em mulheres grávidas do Japão. As amostras foram obtidas em 111 japonesas grávidas. Os autores concluíram que os parabenos foram frequentemente encontrados e quantificados nas amostras analisadas, sugerindo uma grande exposição nas voluntárias. Os parabenos em sua forma livre foram frequentemente detectados, o que sugere uma exposição dérmica, proveniente de produtos de higiene pessoal. Os autores relatam que o propilparabeno foi o mais abundante encontrado e apresenta uma potência estrogênica 20 vezes maior que dos outros parabenos.

Vela-Soria et al (2013), sugeriram um método de extração baseado em uma microextração líquido-líquido dispersiva com posterior análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS-MS), para determinação de parabenos em amostras de soro. Os limites de quantificação obtidos no método foram na faixa de 0.2 a 0.7 ng mL⁻¹. O método foi aplicado em amostras de 20 voluntários, homens e mulheres da Espanha.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os produtos cosméticos fazem parte da rotina de higiene e beleza de milhões de pessoas. Atualmente, diante do sucesso crescente dos cosméticos e da multiplicidade dos produtos oferecidos, há várias leis que visam garantir a segurança e eficácia desses produtos, deixando sob a responsabilidade dos pesquisadores a avaliação científica de sua eficácia e segurança. Assim, surge uma nova especialidade, dentro da Toxicologia, que é a Cosmetotoxicologia.

A ANVISA classifica os batons na categoria de cosméticos e apresentam grau de risco 1 (risco mínimo). Todavia, cientistas americanos consideraram que a ingestão média de batons é de 24 a 87 miligramas por dia e, como esse cosmético contém inúmeras substâncias, dentre elas os parabenos, é de suma importância que se controle a sua presença nas formulações. A exposição humana foi estimada, em média, de 76 mg de parabenos/dia e pode ser considerada múltipla, uma vez que ocorre através da utilização de produtos cosméticos e de higiene pessoal, incluindo, produtos de maquiagem, desodorantes, filtros solares, e loções para o corpo, produtos alimentícios e medicamentos. Apesar de serem compostos considerados seguros, até o presente momento, estudos indicam que eles podem ter atividade estrogênica e seu uso generalizado e seus riscos potenciais para a saúde despertam o interesse da comunidade científica (ANVISA, 2000; BERKELEY HEALTH ONLINE, 2013; SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005; YE et al, 2006).

Face ao exposto, esse trabalho teve como objetivo estudar a correlação entre o uso de batom e a concentração de parabenos no soro de mulheres expostas ao cosmético labial.

Para tanto, mais especificamente, objetivou-se:

- a) otimizar as condições cromatográficas para análise de parabenos, em amostras de batom, por cromatografia líquida de alta eficiência;
- b) otimizar a técnica de extração líquido-líquido (ELL) para o preparo dessas amostras;
- c) validar o método para análise de parabenos em batom, estabelecendo os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez;
- d) analisar as amostras de batom obtidas no comércio de Alfenas, através do método desenvolvido;

- e) otimizar as condições cromatográficas para análise de parabenos, em amostras de sangue, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas;
- f) otimizar a técnica de extração líquido-líquido (ELL) para o preparo da amostra biológica;
- g) validar o método, estabelecendo os seguintes parâmetros: efeito residual, estabilidade, linearidade, precisão e exatidão;
- h) determinar as concentrações de parabenos em soro de mulheres que utilizaram batom contendo parabenos, através do método desenvolvido;
- i) correlacionar estatisticamente os dados obtidos, em relação ao uso desse batom e a concentração de parabenos no soro.

4 EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES, SOLVENTES E APARELHAGEM

- a) Padrões: metilparabeno (lote: 039K0129), etilparabeno (lote: S67958-099), propilparabeno (lote: S76394-179), benzilparabeno (lote: 10304AJ), todos são fabricados pela Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha);
- b) Reagentes: metanol e acetonitrila (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), etanol (Merck®, Rio de Janeiro, Brasil), acetato de etila e acetona (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil), hexano (Dinâmica®, Diadema-Brasil), ácido fórmico (Biotec®, Pinhais, Brasil), hidróxido de amônio (Isofar®, Jacaré, Brasil), ácido clorídrico (Êxodo Científica®, Hortolândia, Brasil), diclorometano (Merck®, Rio de Janeiro, Brasil), todos de grau analítico;
- c) Equipamentos e acessórios para análise de parabenos em batom: coluna C18, THERMO BDS HYPERSIL (150 x 4,6 mm; 5 µm) e pré-coluna SHIM-PACK G-ODS (10 x 4,0 mm; 5 µm) ; cromatógrafo a líquido, Shimadzu®, com controlador SCL-10A, injetor SIL 10 AF, bomba LC-10AT, forno da coluna CTO-10AS e detector de DAD SPD-M10A; sistema Milli-Q, Millipore®, para a purificação de água;
- d) Fase móvel para análise de parabenos em batom: água: acetonitrila, 60:40, v/v, medidos em provetas separadamente e, então, misturados em um béquer, com posterior degaseificação em ultrassom (UNIQUE®);
- e) Padrões para análise de parabenos em batom: foi preparado um solução padrão estoque na concentração de 1 g L⁻¹ contendo os 4 parabenos em estudo (metil, etil, propil e benzil) em acetonitrila. Essa solução foi armazenada em freezer a -4°C durante o desenvolvimento e validação do método analítico;
- f) Equipamentos e acessórios para análise de parabenos em sangue: coluna C18 SHIM-PACK XR-ODS (100 x 3 mm; 2,2 µm), pré-coluna SHIM-PACK G-ODS (10 x 4,0 mm; 5 µm), Ultra Cromatógrafo a Líquido, Shimadzu®, com bomba LC-20AD, injetor automático SIL-20AHT, forno CTO-20A e detector

MS/MS triplo quadrupolo LCMS- 8030; Ultrafreezer Glacier® – 86°C (ultralow temperature freezer);

- g) Fase móvel para análise de parabenos em sangue: as fases foram preparadas separadamente e misturadas na bomba do aparelho, da seguinte forma: a bomba B continha metanol com 0,1% de hidróxido de amônio e a bomba A continha água purificada com 0,1% de hidróxido de amônio. As fases foram filtradas e a mistura, na proporção 65:35, v/v, foi realizada na bomba do equipamento (LC-MS-MS);
- h) Padrões para análise de parabenos em soro: foi preparado um solução padrão estoque na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo os 4 parabenos em estudo (metil, etil, propil e benzil) em metanol. Essa solução foi armazenada em freezer a -4°C durante o desenvolvimento e validação do método analítico.

4.2 DESENHO DO ESTUDO

Os batons utilizados para desenvolvimento do método foram manipulados no laboratório de Cosmetologia da UNIFAL-MG, seguindo Boas Práticas de Fabricação. Os componentes utilizados no seu preparo foram: cera de abelha, cera de carnaúba, BHT, lanolina, óleo de rícino, óleo vegetal, óleo mineral e essência. Foram preparadas formulações contendo 0,4% (m/m) de cada um dos parabenos, metil e propilparabeno e o batom isento de parabenos, para serem utilizados na otimização e validação do método.

Ainda, foram comprados, no comércio da região de Alfenas, amostras de batom, a fim de verificar a presença de parabenos. As marcas adquiridas foram codificadas A, J, M, F, V e Z, segundo as iniciais da marca. O batom que contivesse parabenos em níveis abaixo daqueles estabelecidos pela ANVISA, seria fornecido para as mulheres fazerem uso dele durante 5 dias. Cada batom foi pesado antes de ser entregue às voluntárias e após o período de utilização, a fim de calcular a quantidade de parabenos a qual cada mulher estaria exposta com base na quantidade de batom usada. Cada voluntária preencheu um questionário (ANEXO I) com informações sobre os hábitos alimentares, hábitos de higiene e beleza e, ainda, assinaram um termo de esclarecimento e participação no presente estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (processo nº 353.930), da UNIFAL-MG (ANEXO II). Assim, delineou-se o seguinte experimento:

- 1ª FASE: das voluntárias, entre 20 e 50 anos, as quais usam produtos cosméticos, alimentícios e medicamentos, conforme sua rotina, foi coletada uma amostra de sangue para análise de parabenos;

- 2ª FASE: das mesmas voluntárias, que participaram da fase 1, foi coletada uma nova amostra de sangue, para análise de parabenos, no entanto, nessa fase, elas usaram o batom que receberam, contendo uma concentração conhecida de parabenos, por 5 dias. Ressalta-se que a amostra foi coletada no final desse período de utilização do batom;

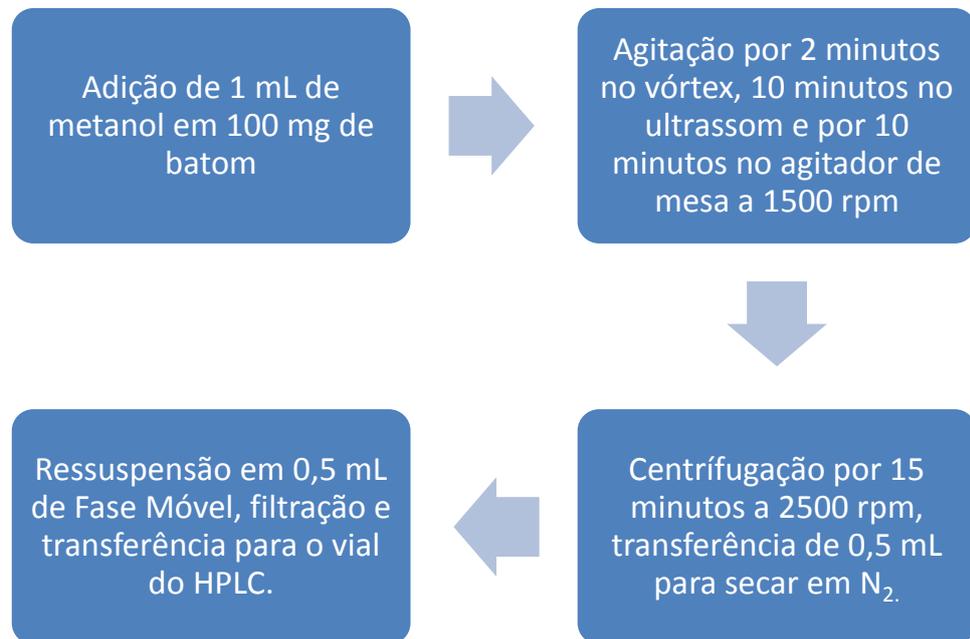
- 3ª FASE: das mesmas voluntárias, que participaram das fases 1 e 2, foi coletada uma nova amostra de sangue, para análise de parabenos, no entanto, nessa fase as voluntárias não usaram qualquer tipo de batom, continuando com uso de produtos cosméticos, alimentícios e medicamentos conforme sua rotina. A coleta foi realizada 5 dias após esse período.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Análise de parabenos em batom

A análise de parabenos em batom foi realizada com um prévio preparo de amostras por extração líquido-líquido (FIGURA 2), com uso do metanol, como solvente extrator.

Figura 2 – Fluxograma da técnica de preparo de amostras de batom para a determinação de parabenos.



Fonte: Do autor.

O método de quantificação utilizado foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com uma coluna C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) e pré-coluna com o mesmo recheio, com bases no estudo desenvolvido por Martins et al (2011). As condições de análise são descritas abaixo:

- a) Comprimento de onda: 254 nm;
- b) Fase móvel: acetonitrila: água (40:60, v/v);
- c) Volume de injeção: 10 μ L;
- d) Vazão da fase móvel: 1,0 mL minuto^{-1} até 10 minutos, aumentando para 1,5 mL minuto^{-1} até 15 minutos, retornando para 1,0 mL minuto^{-1} até 16 minutos;
- e) Temperatura do forno: 25°C;
- f) Tempo de corrida: 16 minutos.

O método foi validado de acordo com procedimentos preconizados pelo INMETRO (INMETRO, 2011) e pela revisão realizada por RIBANI et al., 2004, e foi aplicado em amostras de batom, de origem nacional. Os parâmetros validados foram linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez.

Na análise de linearidade, foram avaliados seis níveis de concentração, para construir a curva analítica, em sextuplicata, em cada nível de concentração. A linearidade foi observada

pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

A seletividade foi avaliada, com a análise em sextuplicata de um batom isento de parabenos. O método pode ser considerado seletivo, uma vez que não há picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

O limite de detecção do procedimento analítico foi calculado através dos valores encontrados na equação da reta da curva de calibração, onde multiplicou o desvio padrão de b por 3 e dividiu pela média de a ($3DPb/a$) e o limite de quantificação correspondendo ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco), foi definido pela mínima concentração quantificada com precisão aceitável ($<15\%$).

A recuperação e a exatidão dos analitos foram estimadas pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo ("spike") e foram comparadas as áreas obtidas frente às áreas obtidas pela injeção de solução padrão, nas mesmas concentrações. No teste de exatidão, foram comparados os resultados de concentração obtidos frente à concentração nominal. Esses 2 testes foram realizados com o batom contendo 0,4% m/m, de metil- e propilparabeno, preparado o laboratório de Cosmetologia, da UNIFAL-MG.

A precisão foi expressa em termos de repetitividade e de precisão intermediária. A repetitividade envolveu 6 medições da mesma amostra, no mesmo dia pelo mesmo analista. E a precisão intermediária indicou o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como três dias diferentes e três analistas diferentes. Ambas foram expressas pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

Para determinar a robustez do método, segundo o INMETRO (2011), foi aplicado o teste de Youden. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Por este teste, são realizados oito ensaios com uma combinação fatorial dos efeitos e verifica-se qual o efeito ou combinação de efeitos que apresentam variações (TABELA 2).

Tabela 2 - Parâmetros analisados no teste de Youden para avaliação da robustez e fórmula para cálculo das variações na metodologia empregada.

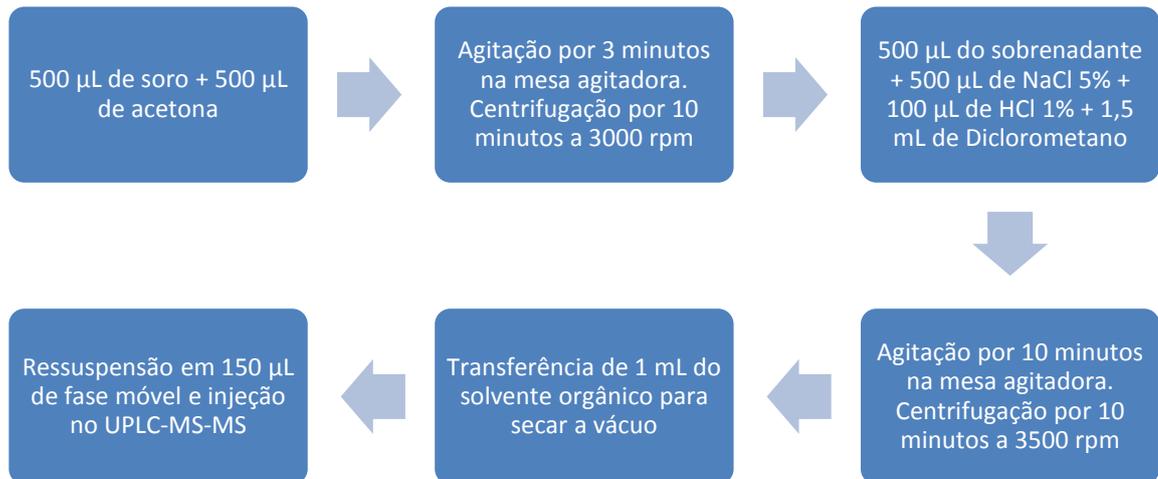
Parâmetros Analíticos	Nominal (+)	Variação (-)	Fatorial para ensaio								Fórmula do efeito de variação
			1	2	3	4	5	6	7	8	
Solvente extrator	1,0 mL	1,2 mL	+	+	+	+	-	-	-	-	$(a+b+c+d)/4-(e+f+g+h)/4$
Agitação	10 min	8 min	+	+	-	-	+	+	-	-	$(a+b+e+f)/4-(c+d+g+h)/4$
Centrifugação	15 min	17 min	+	-	+	-	+	-	+	-	$(a+c+e+g)/4-(b+d+f+h)/4$
Fase Móvel	40:60	38:62	+	+	-	-	-	-	+	+	$(a+b+g+h)/4-(c+d+e+f)/4$
Temperatura do Forno	25°C	27°C	+	-	+	-	-	+	-	+	$(a+c+f+h)/4-(b+d+e+g)/4$
Vazão da fase móvel	1,0 mL	0,9 mL	+	-	-	+	+	-	-	+	$(a+d+e+h)/4-(b+c+f+g)/4$
Comprimento de onda	254 nm	256 nm	+	-	-	+	-	+	+	-	$(a+d+f+g)/4-(b+c+e+h)/4$
			a	B	c	d	e	f	g	h	

Fonte: Do autor.

4.3.2 Análise de parabenos em soro

O método para análise de parabenos em amostra de sangue foi realizado com prévio preparo de amostras por precipitação e extração líquido-líquido (FIGURA 3), com modificações no estudo conduzido por Vela-Soria et al (2013), no qual os autores descrevem uma microextração líquido-líquido dispersiva, na qual precipitou 1 mL de soro com 1 mL de acetona, o sobrenadante foi transferido para um balão de 10 mL e diluído com NaCl 5% e o pH ajustado para 2 com HCl 0,1 mol L⁻¹. A solução foi transferida para um tubo de ensaio de 15 mL onde foi adicionado 0,5 mL de acetona como solvente dispersivo e 0,75 mL de triclorometano como solvente extrator. No presente estudo foi utilizado acetona, para precipitação e diclorometano, com a adição de NaCl 5% (efeito *salting out*), e acidificação do pH para 2 com HCl 1%, para a extração.

Figura 3 - Fluxograma da técnica otimizada para a extração de parabenos em amostras de soro.



Fonte: Do autor.

A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada com detector de espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (UPLC-MS-MS), seguindo os estudos de Jiménez-díaz et al (2011).

As condições cromatográficas otimizadas foram:

- a) Fonte de Ionização: electrospray (ESI);
- b) Modo: Negativo;
- c) Fase móvel: metanol + 0,1% de hidróxido de amônio: água + 0,1% de hidróxido de amônio (65:35, v/v);
- d) Volume de injeção: 25 µL;
- e) Vazão da fase móvel: 0,3 mL minuto⁻¹;
- f) Temperatura do forno: 35°C;
- g) Tempo de corrida: 8 minutos.

O método foi validado de acordo com procedimentos preconizados pela RDC 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012) e foi aplicado na análise das amostras das voluntárias nas 3 fases do estudo. Os parâmetros validados foram: efeito residual, estabilidade, linearidade, precisão e exatidão.

O efeito residual foi realizado através de 3 (três) injeções de uma mesma amostra branco antes da curva de calibração e logo após a injeção do limite superior de quantificação. Os resultados foram avaliados pela diferença entre as respostas do branco antes da curva de calibração e após a injeção do LSQ, onde essa diferença deve ser inferior a 20% (vinte por cento).

A linearidade foi construída e avaliada com três curvas de calibração, em três dias diferentes, que incluíram a análise da amostra branco e 6 (seis) amostras de diferentes concentrações do padrão do analito em sextuplicata. As amostras da curva analítica foram inicialmente adicionadas do padrão do analito e depois submetidas ao mesmo procedimento de preparação a que foram submetidas às amostras em estudo. Os padrões de calibração atenderam aos seguintes critérios: desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para os padrões do limite inferior de quantificação, e desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.

A precisão e a exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intracorrída) e em 3 (três) corridas diferentes (intercorrídas). A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento). A exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal.

Os estudos de estabilidade foram feitos com condições que reproduziram as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo. Foram empregadas 3 (três) amostras fortificadas de concentrações baixa, média e alta, as quais foram analisadas imediatamente após sua preparação e após serem congeladas a -70°C durante 7 dias. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software BioStat, versão 2009 para Windows (AnalystSoft®). Para avaliar a distribuição dos dados, foi aplicado o teste de D'Agostino, com nível de 95% de confiança. Após esse, assumindo que os dados analisados não seguiram um padrão de distribuição normal ($p=0,05$), para a comparação da concentração de parabenos em soro, obtida nas 3 fases do estudo, foi aplicado o teste de Friedman e para o estudo da correlação entre o uso de batom e a concentração de parabenos totais em soro, na fase em que as voluntárias usaram o batom doado, com concentração conhecida de parabenos, foi aplicado o teste de correlação de Spearman (NORMANDO, 2010).

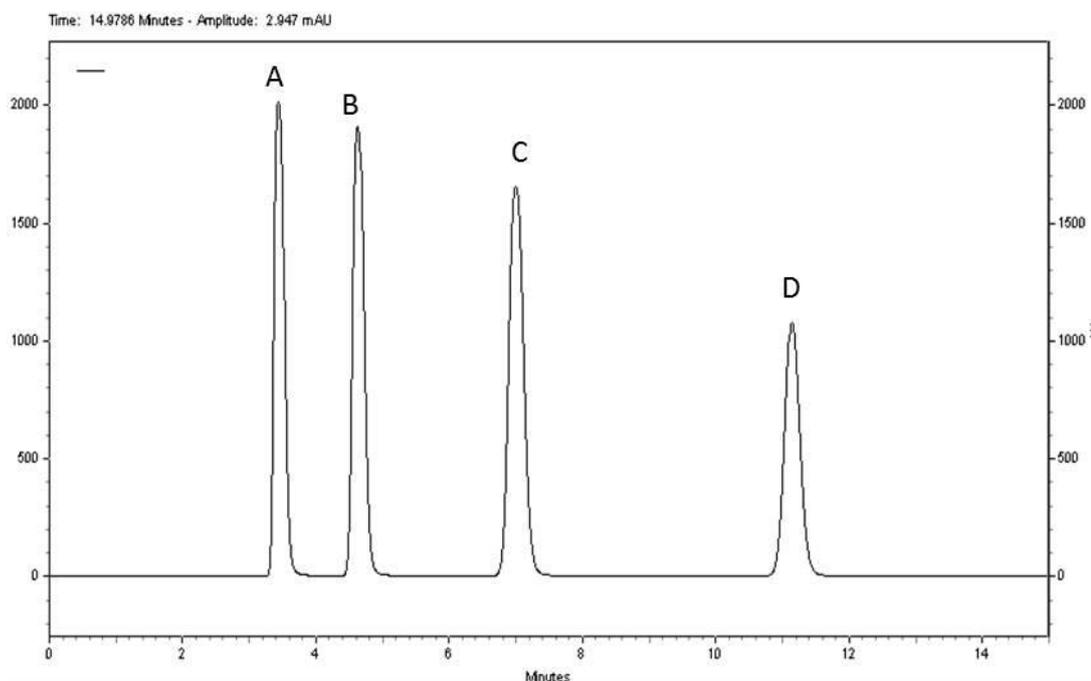
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE PARABENOS EM BATOM

A técnica para análise de parabenos em batom foi desenvolvida, otimizada e validada empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com a coluna C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) e pré-coluna com o mesmo recheio. Ressalta-se que, a otimização das condições cromatográficas, foi feita com base no estudo conduzido por MARTINS et al, 2011.

A partir desse estudo, foram realizadas algumas modificações e na Figura 4 pode-se observar o cromatograma obtido para um padrão de parabenos na concentração de 800 μ g mL⁻¹.

Figura 4 - Cromatograma obtido com injeção solução de padrão na concentração 800 μ g mL⁻¹.



Fonte: Do autor.

Nota: (A) MePa; (B) EtPa; (C) PrPa; (D) BePa.

Condições otimizadas: fase móvel acetonitrila:água (40:60, v/v); comprimento de onda 254 nm; volume de injeção de 10 μ L, temperatura do forno de 25°C e vazão em gradiente.

Os parâmetros de conformidade do sistema, apresentados na Tabela 3, foram calculados com base em um cromatograma de uma solução padrão na concentração de 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De acordo com RIBANI et al, 2004, os limites recomendados para pratos teóricos e resolução são maior que 2000 e maior que 2, respectivamente. E os limites recomendados para fator de capacidade é > 2 e a assimetria é < 2 , segundo MARTINS, 2008. Sendo assim, o sistema analítico pode ser considerado em conformidade para as condições otimizadas.

Tabela 3 - Parâmetros de conformidade do sistema em uma solução padrão de concentração 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de parabenos, nas condições cromatográficas otimizadas.

Analito	Pratos Teóricos	Fator de Capacidade	Resolução	Assimetria (10%)
Metilparabeno	3334	2,72		1,13
Etilparabeno	5133	3,87	4,35	1,21
Propilparabeno	7395	6,15	6,15	1,16
Benzilparabeno	19803	9,84	9,84	1,09

Fonte: Do autor.

O preparo de amostras de batom foi realizado por extração líquido-líquido. Primeiramente, foram testados alguns solventes, como metanol, acetonitrila, acetona, hexano, etanol e acetato de etila. Na Tabela 4 podem ser observados os resultados obtidos com esses solventes, para o metilparabeno e propilparabeno, que foram os compostos encontrados nas formulações de batom. Em estudos anteriores, que analisaram parabenos em medicamentos também foram encontrados apenas o metil e propilparabeno (KAMBLE; SINGH; SINGH, 2011). Já, um estudo realizado com shampoos demonstrou a presença do metil e propilparabeno em maior concentração em todas as amostras analisadas, e em algumas delas foi detectado pequenas concentrações do etilparabeno (MARTINS et al, 2011). Em alimentos, segundo HE et al, 2012, há sempre a associação de 2 ou mais parabenos, sendo os mais frequentes, o metil, o etil e o propilparabeno.

Tabela 4 - Resultados obtidos com a alteração do solvente orgânico na extração de parabenos em batom.

Solvente testado	Área média metilparabeno (± DP)	Área média propilparabeno (± DP)
Metanol	7841033 (± 82754)	2431862 (± 89311)
Acetonitrila	6426480 (± 195042)	2256891 (± 38402)
Acetona	7986370 (± 66209)	2484381 (± 17161)
Etanol	4301970 (± 77025)	1644797 (± 4712)
Hexano	457005 (± 8011)	151976 (± 19152)
Acetato de Etila	Pico sem resolução, em relação aos interferentes	Pico sem resolução, em relação aos interferentes

Fonte: Do autor.

Como pode ser observado na Tabela 4, embora tanto o metanol quanto a acetona tenham apresentado resultados satisfatórios (maiores áreas), optou-se pelo metanol como solvente de extração, para o batom, por proporcionar um extrato mais limpo e picos com maior resolução.

Foi avaliada a mudança de pH do solvente extrator, acidificando e alcalizando o pH, dois pontos abaixo e dois pontos acima do pKa das moléculas, respectivamente, a fim de aumentar a eficiência de extração dos parabenos do batom. O pKa dos analitos é em torno de 8,0 (ANGELOV; VLASENKO; TASHKOV, 2008), portanto alcalinizou o pH para 10,0 com hidróxido de sódio e acidificou para 6,0 com ácido fosfórico. Os resultados para o metil e propilparabeno são demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados obtidos com a alteração do pH do solvente de extração de parabenos em batom.

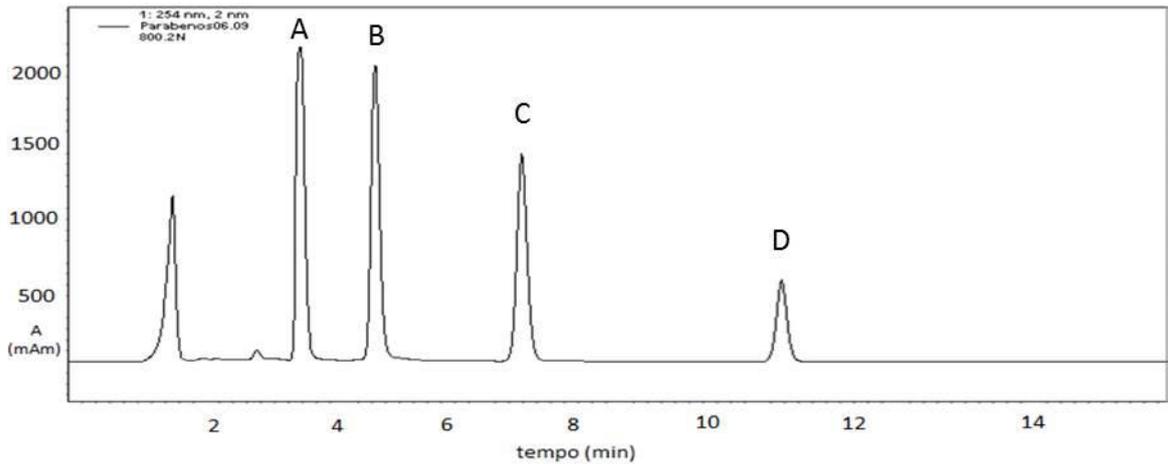
	Área média metilparabeno (± DP)	Área média propilparabeno (± DP)
Metanol	15558101 (±128427)	8752397 (±55335)
Metanol + ácido	12152214 (±141099)	7672877 (±83096)
Metanol + base	11044134 (±182106)	7290526 (±49218)

Fonte: Do autor.

Como não houve melhora dos resultados, conforme a Tabela 4, com a mudança de pH, optou-se por não fazer esse ajuste. Assim, foi desenvolvido um método simples e

rápido, para determinar a concentração de parabenos em batom (FIGURA 2). Na Figura 5 pode-se observar o cromatograma obtido, com as condições cromatográficas e de extração otimizadas.

Figura 5 - Cromatograma obtido na injeção de um batom fortificado.



Fonte: Do autor.

Nota: (A) MePa; (B) EtPa; (C) PrPa; (D) BePa na concentração de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$

Condições otimizadas: fase móvel acetonitrila:água (40:60, v/v); comprimento de onda 254 nm; volume de injeção de $10 \mu\text{L}$, temperatura do forno de 25°C e vazão em gradiente.

Na Tabela 6 são observados os parâmetros de conformidade do sistema calculados com base em um cromatograma de um batom contendo (MePa), (EtPa), (PrPa) e (BePa) na concentração de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 6 - Parâmetros de conformidade do sistema obtidos de um cromatograma de parabenos ($800 \mu\text{g mL}^{-1}$) em batom, nas condições otimizadas.

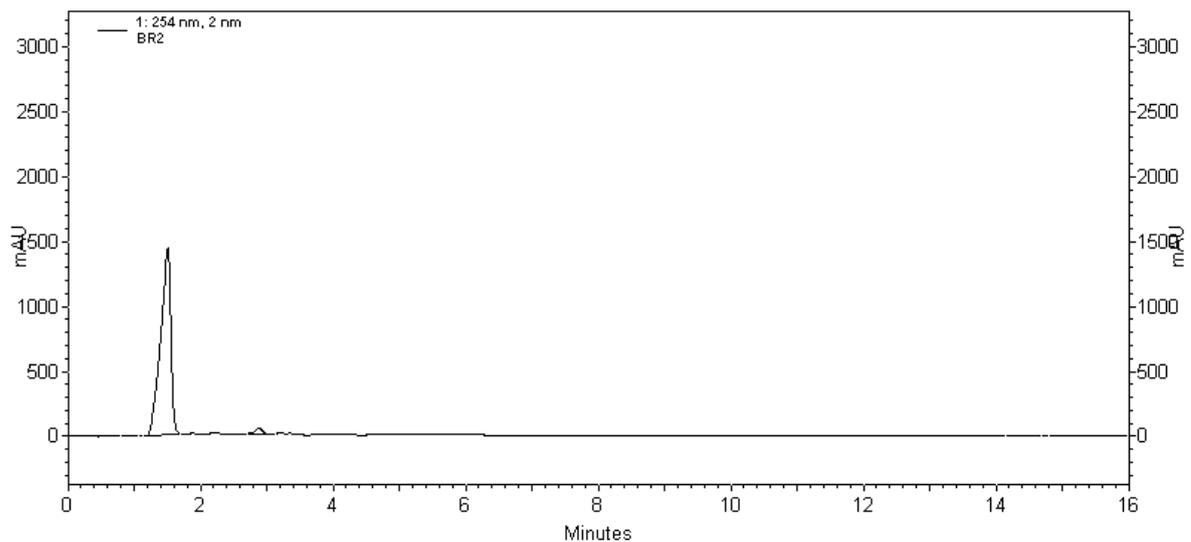
Analito	Pratos Teóricos	Fator de Capacidade	Resolução	Assimetria (10%)
Metilparabeno	3437	2,81		1,15
Etilparabeno	5643	3,89	4,41	1,19
Propilparabeno	7965	6,23	6,25	1,14
Benzilparabeno	19754	9,96	9,97	1,03

Fonte: Do autor.

Após otimizadas as condições de extração e as condições cromatográficas, procedeu-se a validação do método. O procedimento de validação foi realizado de acordo com a Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2011) e com a revisão realizada por RIBANI, 2004. Para tanto, os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, faixa analítica, linearidade (expressa pelo r^2) limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Para os testes de seletividade, foi preparado no Laboratório de Cosmetologia da UNIFAL-MG um batom sem a adição de parabeno, ou seja, um “branco”, cuja análise foi realizada em sextuplicata, sob as condições demonstradas na Figura 2. O cromatograma pode ser observado na Figura 6 e demonstra que o método pode ser considerado seletivo, uma vez que não há picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

Figura 6 - Cromatograma obtido com injeção de um batom isento de parabenos.



Fonte: Do autor.

Nota: Condições otimizadas: fase móvel acetonitrila:água (40:60, v/v); comprimento de onda 254 nm; volume de injeção de 10 μL , temperatura do forno de 25°C e vazão em gradiente.

Para avaliar a linearidade e a precisão, o batom (isento dos analitos) foi fortificado com uma concentração conhecida de cada um dos parabenos, e procedeu-se com a extração. A partir de uma solução estoque de 1g L^{-1} , em metanol, as sucessivas diluições foram preparadas para os calibradores da curva analítica, em batom. As concentrações utilizadas foram de 50, 100, 200, 400, 600 e 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em sextuplicata. A faixa analítica foi definida com base na concentração máxima permitida para o ácido 4-hidroxibenzóico, seus sais e

ésteres (parabenos) de 0,4 % (expresso como ácido) individual para um éster (ANVISA, 2001). Assim, pela técnica de extração, apresentada na Figura 4, uma concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ equivale a 0,4% m/m. Os resultados de linearidade e limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos estão apresentados na Tabela 7. O LD foi calculado com base na fórmula $3DPb/a$ e o LQ foi a mínima concentração quantificada com precisão aceitável (RIBANI, 2004; INMETRO, 2011).

Tabela 7 - Linearidade, limite de detecção e quantificação do método de determinação de parabenos em batom nas condições otimizadas, no intervalo de 50 a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=6).

Analitos	Média de a (\pm DP)	Média de b (\pm DP)	r²	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Metil	31502 (\pm 274)	1580580 (\pm 60877)	0,993	5,65	18,86
Etil	27339 (\pm 563)	1005262 (\pm 91641)	0,994	10,05	33,52
Propil	20753 (\pm 883)	449649 (\pm 74272)	0,997	10,83	36,12
Benzil	7053 (\pm 178)	203628 (\pm 30337)	0,993	12,90	43,01

Fonte: Do autor.

Os testes de precisão foram realizados utilizando-se os calibradores baixo, médio e alto da curva analítica, que correspondem as concentrações de 50, 400 e 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As soluções foram preparadas em sextuplicata, por concentração, e para cada analito, por três diferentes analistas, em três dias diferentes (precisão intra-ensaio e interensaio). A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (RIBANI, 2004; INMETRO, 2011). Os resultados para cada analito encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Precisão, expressa pelo desvio padrão relativos, do método de determinação de parabenos em batom (n=6).

Concentração estudada	50 µg mL ⁻¹		400 µg mL ⁻¹		800 µg mL ⁻¹	
	intra-ensaio	interensaio	intra-ensaio	Interensaio	intra-ensaio	interensaio
Desvio padrão relativo (%)						
Metilparabeno	11,3	13,6	5,5	2,9	0,8	1,7
Etilparabeno	10,2	6,0	5,0	3,0	1,8	2,5
Propilparabeno	3,3	4,5	5,9	3,7	3,4	2,3
Benzilparabeno	5,3	6,7	7,8	3,6	0,4	2,0

Fonte: Do autor.

Foi preparado no laboratório de Cosmetologia da UNIFAL-MG um batom com uma concentração conhecida de 0,4% de metilparabeno e propilparabeno para o teste de exatidão (comparando-se os resultados de concentração obtidos frente à concentração nominal) e de recuperação (comparando-se as áreas obtidas frente às áreas obtidas pela injeção de solução padrão, nas mesmas concentrações). As análises foram realizadas em sextuplicata. Os valores obtidos foram 111% e 96% para o metil e para o propilparabeno, respectivamente, para o teste de exatidão. Para o teste de recuperação, os resultados obtidos foram 68% e 47%, para os mesmos analitos, respectivamente. Aceitam-se resultados de recuperação baixos, desde que o método seja preciso e exato.

Um método robusto é capaz de permanecer inalterado, ou seja, fornecendo os mesmos resultados, frente a pequenas variações de seus parâmetros. Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de Youden. Para esse teste, um batom sem parabeno (manipulado no laboratório de Cosmetologia da UNIFAL-MG) foi fortificado com concentração conhecida (0,4 %) e em seguida foram testados os seguintes parâmetros conforme a Tabela 2 (INMETRO, 2011).

A partir dos resultados obtidos, o efeito de cada variável foi estimado pela diferença entre a média dos resultados das 4 análises com as condições nominais (+) e a média dos resultados das 4 análises com as condições alteradas (-). Considerando o desvio padrão entre os 8 resultados, os valores de efeito maior do que o desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de dois ($s\sqrt{2}$) são considerados significantes e, portanto, alteram a resposta a resposta analítica (INMETRO, 2011). Assim, o método desenvolvido foi considerado robusto,

para os parâmetros avaliados, uma vez que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com os parâmetros nominais e àqueles obtidos quando pequenas variações foram aplicadas, tanto à técnica de extração quanto à técnica de quantificação.

Após a validação do método, foi realizada a determinação das concentrações de parabenos em batons, disponíveis no comércio da cidade de Alfenas. Foram adquiridos 6 batons que continham parabenos em sua formulação e apenas o metilparabeno e propilparabeno foram identificados e quantificados (TABELA 9).

Tabela 9 - Concentração de parabenos, expressa em m/m (%), encontrada nos batom (n=6/batom).

Marca do batom	Metilparabeno (% m/m) (± DP)	Propilparabeno (% m/m) (± DP)	Soma Parabenos (% m/m)
Batom A	< LQ	0,08 (± 0,011)	0,08
Batom J	0,10 (± 0,011)	0,20 (± 0,010)	0,30
Batom M	0,20 (± 0,007)	0,15 (± 0,004)	0,35
Batom F	< LQ	0,15 (± 0,015)	0,15
Batom V	0,35 (± 0,009)	0,11 (± 0,010)	0,46
Batom Z	< LQ	0,09 (± 0,004)	0,09

Fonte: Do autor.

Nota: < LQ: abaixo do limite de quantificação do método

Todas as marcas de batom analisadas apresentaram concentração de parabenos dentro dos limites especificados pela ANVISA, que corresponde a 0,4% para parabenos individualmente e 0,8% no somatório (ANVISA, 2001). Então, o batom da marca M, foi escolhido para ser fornecido às voluntárias, por apresentar maiores concentrações de parabenos.

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA ANÁLISE DE PARABENOS EM SORO

O método para a análise de parabenos em sangue foi desenvolvido no cromatógrafo líquido com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-MS/MS), da Shimadzu®, LC-MS 8030. A fonte de ionização utilizada foi Electrospray (ESI). Esse equipamento apresenta uma alta detectabilidade, o que faz com que baixas concentrações sejam detectadas,

importante na análise de traços, o que é requerido para análise de parabenos em amostras biológicas.

No desenvolvimento do método foi necessário otimizar os parâmetros de massa para cada parabeno. Os analitos apresentam características ácidas, então a fase móvel utilizada apresenta caráter básico, para ocorrer a desprotonação. Assim, o equipamento operou em ESI no modo negativo, uma vez que a primeiro passo para uma análise por espectrometria de massas é transferir o analito para forma ionizada. Para isso, foi preparado um padrão em metanol, de cada analito separadamente, na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1 ppm). A otimização dos parâmetros de massa foi realizada pela infusão direta do padrão no espectrômetro de massas e constituiu-se das seguintes etapas:

- a) SCAN: varredura da amostra injetada em um intervalo de massa determinado (100 a 400 m/z), para identificar a massa exata de cada analito;
- b) SIM (*selected ion monitoring*): monitoramento especificando a transição m/z encontrada no SCAN para o determinado analito;
- c) MRM (*multiple reaction monitoring*): desenvolvimento de uma reação de fragmentação em que, no primeiro quadrupolo seleciona-se o íon precursor (analito) o qual sofrerá uma fragmentação no segundo quadrupolo, gerando especificamente um íon produto que será selecionado no terceiro quadrupolo.

Na Tabela 10 seguem as transições m/z e as energias de colisão necessárias para análise dos parabenos.

Tabela 10 - Transições de massa e energia de colisão encontrada para os parabenos em ESI modo negativo, no LC-MS-MS.

Analito	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
Metilparabeno	151	92,20	25
	151	136,15	25
Etilparabeno	165	92,20	25
	165	137,10	25
Propilparabeno	179	92,20	25
	179	136,10	25
	227	92,15	25
Benzilparabeno	227	136,05	25
	227	113,10	25

Fonte: Do autor.

Devido aos parabenos apresentarem um anel aromático em sua estrutura, o que dificulta a quebra (TABELA 1), foram encontradas apenas duas transições. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Jiménez-Díaz et al (2011), que utilizando uma fase móvel composta de hidróxido de amônio 0,1% em solução aquosa: hidróxido de amônio 0,1% em metanol (40:60, v/v), obtiveram resultados semelhantes em relação as transições de massa e energia de colisão encontrados (TABELA 11).

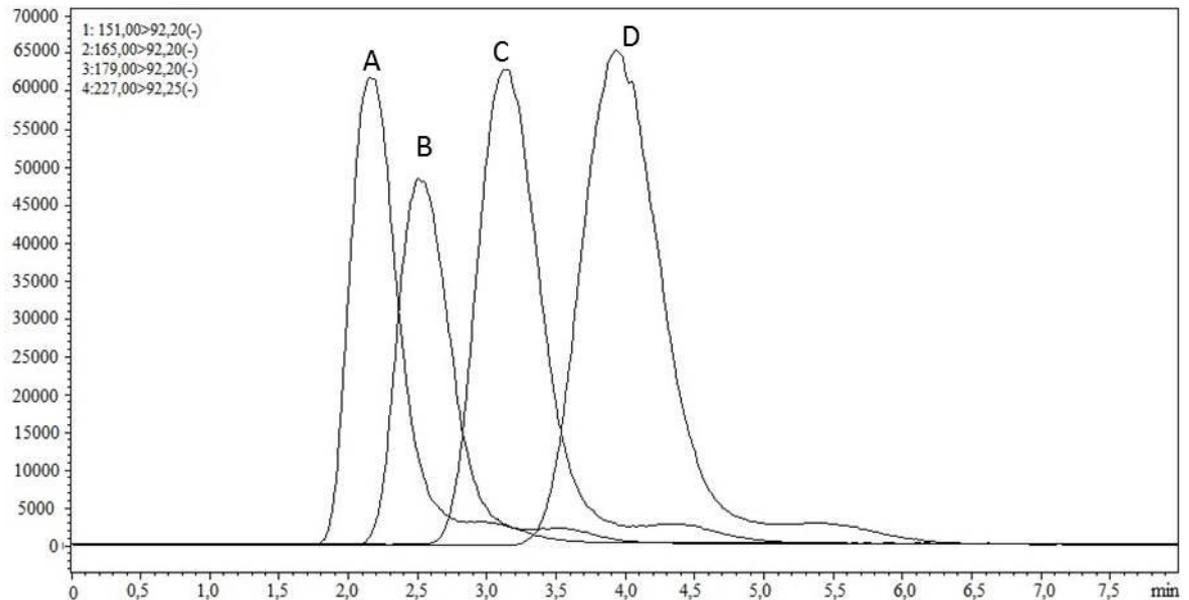
Tabela 11 - Transições de massa e energia de colisão encontrada por Jiménez-Díaz et al (2011) na análise de parabenos no LC-MS-MS.

Analito	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão
Metilparabeno	151,1	91,9	25
	151,1	136,1	25
Etilparabeno	165,1	91,9	30
	165,1	137,0	30
Propilparabeno	179,1	92,0	33
	179,1	135,9	33

Fonte: Do autor.

Na etapa seguinte, foram otimizadas as condições cromatográficas. Com base nos dados de Jiménez-Díaz et al (2011), a fase móvel escolhida foi metanol com 0,1% de hidróxido de amônio: água com 0,1% de hidróxido de amônio. Para uma melhor eficiência cromatográfica, a proporção de fase móvel foi 65:35 (v/v). Diferentes volumes de injeção da amostra foram testados, 10, 25, 50, 75 e 100 μL . Os maiores volumes de 50 a 100 μL apresentaram picos largos, com baixa eficiência. Já, o volume de 10 μL apresentou eficiência e resolução dos picos satisfatórios, no entanto não foi possível detectar baixas concentrações. O volume de injeção otimizado foi então de 25 μL , o qual apresentou picos estreitos e detectabilidade suficiente para analitos em amostras biológicas. Na Figura 7, podem ser observados os cromatogramas obtidos nas condições otimizadas.

Figura 7 - Cromatograma obtido nas condições cromatográficas otimizadas.



Fonte: Do autor.

Nota: Fase móvel metanol (0,1% hidróxido de amônio): água (0,1% hidróxido de amônio), 65:35 (v/v); vazão 0,3 mL/minuto; volume de injeção 25 μ L; temperatura do forno 35°C.

Solução contendo (A) MePa; (B) EtPa; (C) PrPa; (D) BePa; obtido para uma solução padrão na concentração de 1 μ g mL⁻¹.

Foi feita uma curva em padrão nas concentrações de 1 μ g mL⁻¹ até 1 pg mL⁻¹ a fim de avaliar a concentração mínima quantificada e definir a faixa linear do método, que foi de 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 e 100 ng mL⁻¹. São escassos os dados cinéticos de parabenos e os estudos dessas substâncias em amostras biológicas. Todavia, foi possível observar, no estudo desenvolvido por Jiménez-Díaz et al (2011), que analisaram metil, etil, propil e butilparabenos em tecidos placentários, que a faixa analítica teve uma amplitude de 0,1 a 10,0 ng mL⁻¹.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE PARABENOS EM SORO

Uma vez que não existem estudos publicados na literatura sobre a cinética dos parabenos e sua ligação as proteínas plasmáticas, foi necessário testar tanto o soro como o plasma para escolher a amostra biológica a ser utilizada. Foram coletadas amostras de soro e de plasma para serem analisados quanto à presença de parabenos nas amostras e para um *pool* do branco para os testes sequenciais. A primeira condição de extração

testada foi com o solvente metanol, visto que foi o solvente que melhor extraiu os parabenos em batom.

Analisado o *pool* de soro e plasma, foi encontrada concentração maior de parabenos nas amostras extraídas de soro. As concentrações foram calculadas com base na curva obtida com os padrões e estão representadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentrações de parabenos em soro e plasma com o método de extração testado.

Analito	Soro (ng mL ⁻¹)	Plasma (ng mL ⁻¹)
Metilparabeno	8,37	2,11
Etilparabeno	1,25	Não encontrado
Propilparabeno	3,34	2,40
BenzilParabeno	2,91	2,08

Fonte: Do autor.

Quanto aos efeitos farmacológicos e a distribuição, a literatura reporta que os parabenos se ligam nos sítios 1 e 2 da albumina, sendo essa interação aumentada também com o aumento da cadeia carbônica ligada ao grupo éster (JUN et al, 1971). Com base nos resultados obtidos que demonstram maior concentração de parabenos em soro, optou-se por determinar os analitos nessa matriz.

Com base na técnica de extração, demonstrada na Figura 8, foi preparada uma curva analítica fortificando o soro com os analitos metil, etil, propil e benzilparabeno. Os resultados deste teste não demonstraram linearidade e precisão aceitáveis pela ANVISA (BRASIL, 2012) e também o extrato permaneceu sujo, o que demandava a limpeza da fonte de ionização durante as injeções.

Vela-Soria et al (2013) empregaram uma microextração líquido-líquida dispersiva, utilizando acetona como agente precipitador, triclorometano como solvente extrator, NaCl 5% para promover o efeito *salting out*, e HCl 1% para acidificar o pH da amostra e promover uma melhor migração dos analitos para o solvente extrator, uma vez que eles são analitos ácidos (pKa em torno de 8). Com base nesses dados foi proposto o método de extração para parabenos em amostras de soro (FIGURA 3).

Algumas alterações foram feitas em relação ao método usado como referência. O diclorometano foi utilizado como solvente extrator e foi adicionado em uma maior quantidade (1,5 mL), uma vez que a extração líquido-líquido dispersiva (750 µL em 10

mL de amostra, soro com NaCl 5%) proposta na literatura não forneceu resultados adequados. A quantidade de NaCl 5% adicionada foi ajustada proporcionalmente ao volume de amostra extraído e o volume de HCl 1% foi otimizado em quantidade suficiente para ajustar o pH da amostra em 2.

5.4 VALIDAÇÃO DA ANÁLISE DE PARABENOS EM SORO

A validação foi realizada de acordo com a RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012, da ANVISA (BRASIL, 2012). Os parâmetros validados foram: linearidade, precisão intracorridas e intercorridas, exatidão, efeito residual e estabilidade. Os testes da validação foram realizados em um pool de soro. Tais amostras foram fortificadas com uma concentração conhecida dos parabenos, para serem realizados os testes de validação.

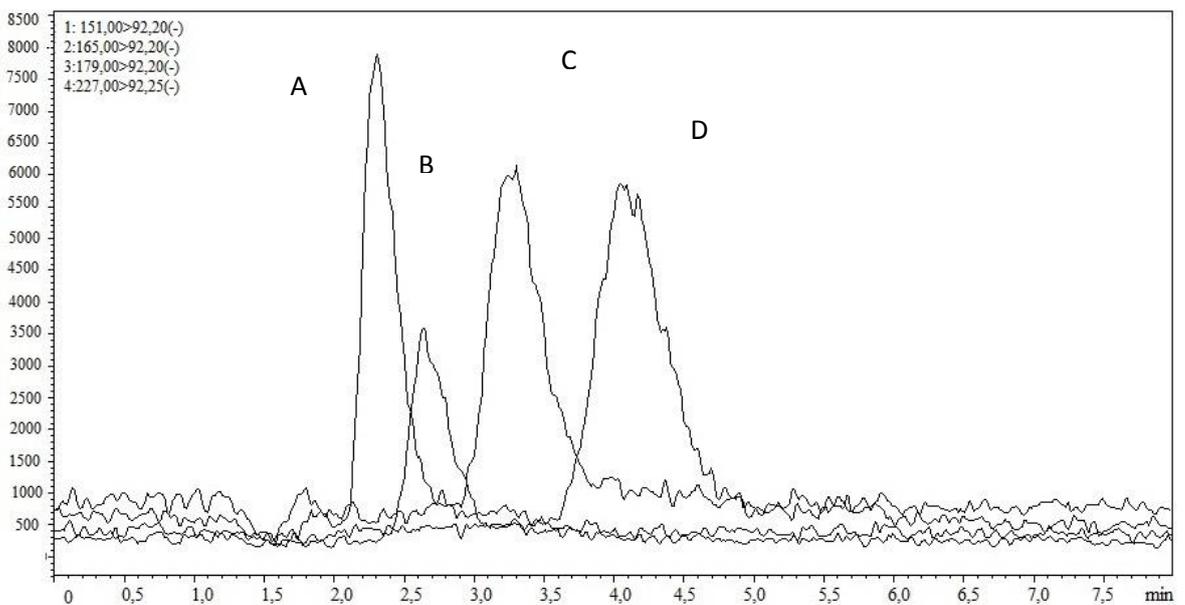
Para definir o limite superior de quantificação (LSQ) da curva analítica foram realizadas injeções de amostras de voluntárias onde foi verificado que não era necessário uma concentração superior a 20 ng mL^{-1} . Já o limite inferior de quantificação (LIQ), 1 ng mL^{-1} , foi definido pela menor concentração que o método foi capaz de quantificar com precisão e exatidão. Sendo assim, a faixa linear do método foi definida pelos calibradores 1, 5, 7,5, 10, 15 e 20 ng mL^{-1} . O teste de linearidade foi realizado pela análise de três curvas de calibração, em sextuplicata, em três dias diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13. Nas Figuras 8 e 9 podem ser observados os cromatogramas obtidos na injeções de amostras branco fortificadas nas concentrações de 1 e 20 ng mL^{-1} , respectivamente.

Tabela 13 - Linearidade do método de determinação de parabenos em soro nas condições otimizadas, no intervalo de 1 a 20 ng mL⁻¹ (n=6).

Analitos	Média de a (± DP)	Média de b (± DP)	Média R ² (± DP)
Metil	18379 (± 624)	47453 (± 2739)	0,991 (± 0,003)
Etil	16729 (± 1514)	24401 (± 4967)	0,991 (± 0,005)
Propil	33376 (± 1343)	56544 (± 8458)	0,987 (± 0,003)
Benzil	41024 (± 3380)	77136 (± 2479)	0,989 (± 0,005)

Fonte: Do autor.

Figura 8 - Cromatograma obtido para uma amostra branco fortificada na concentração 1 ng mL⁻¹.

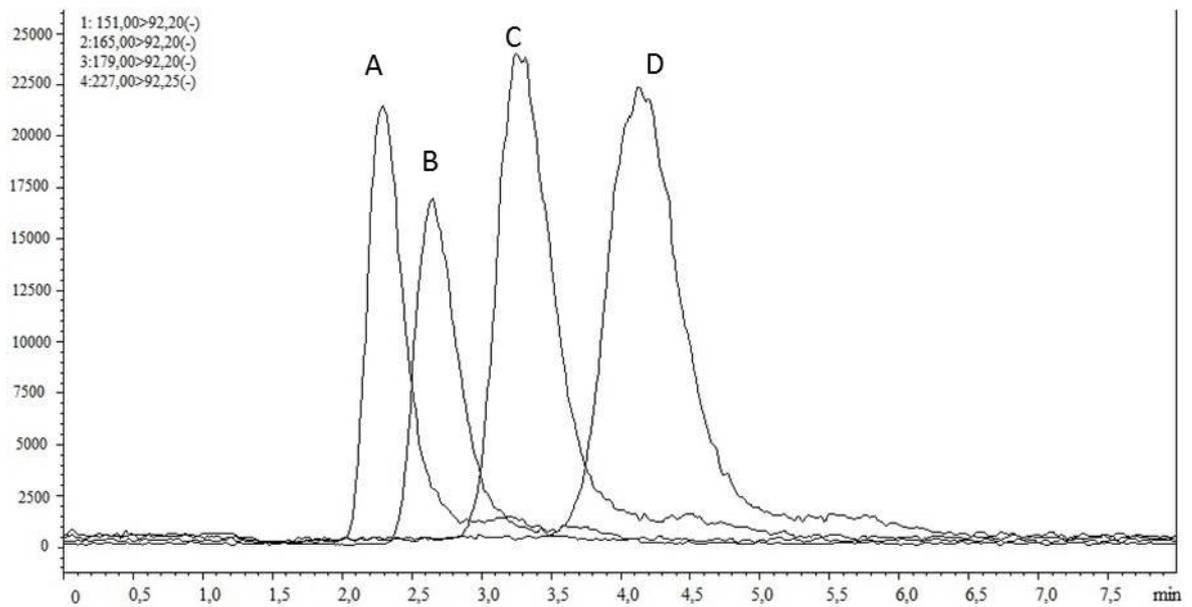


Fonte: Do autor.

Nota: Condições cromatográficas otimizadas: fase móvel metanol (0,1% hidróxido de amônio):água (0,1% hidróxido de amônio) 65:35 (v/v); vazão 0,3 mL/minuto; volume de injeção 25 µL; temperatura do forno 35°C.

Solução contendo (A) MePa; (B) EtPa; (C) PrPa; (D) BePa;

Figura 9 - Cromatograma obtido para uma amostra branco fortificada na concentração 20 ng mL⁻¹.



Fonte: Do autor.

Nota: Condições cromatográficas otimizadas: fase móvel metanol (0,1% hidróxido de amônio):água (0,1% hidróxido de amônio) 65:35 (v/v); vazão 0,3 mL/minuto; volume de injeção 25 µL; temperatura do forno 35°C.

Solução contendo (A) MePa; (B) EtPa; (C) PrPa; (D) BePa;

A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. E a exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal (BRASIL, 2012). Os valores de precisão são observados na Tabela 14, e os valores de exatidão na Tabela 15.

Tabela 14 - Precisão, expressa pelo desvio padrão relativo, do método determinação de parabenos em soro (n=6).

Concentração estudada	1 ng mL ⁻¹		10 ng mL ⁻¹		20 ng mL ⁻¹	
	intra-ensaio	interensaio	intra-ensaio	interensaio	intra-ensaio	Interensaio
Desvio padrão relativo (%)						
Metilparabeno	16,6	17,4	8,7	7,9	9,7	13,6
Etilparabeno	13,0	17,1	9,4	12,2	7,0	8,9
Propilparabeno	15,2	17,1	7,6	14,7	10,8	12,2
Benzilparabeno	13,3	17,5	10,3	12,8	14,4	9,4

Fonte: Do autor.

Tabela 15 - Exatidão, expressa pelo erro padrão relativo, do método determinação de parabenos em soro (n=6).

Concentração estudada	1 ng mL ⁻¹		10 ng mL ⁻¹		20 ng mL ⁻¹	
	intra-ensaio	interensaio	intra-ensaio	interensaio	intra-ensaio	Interensaio
Erro padrão relativo (%)						
Metilparabeno	14,8	- 16,1	- 4,1	- 9,6	- 3,3	- 3,1
Etilparabeno	11,6	19,7	- 4,1	7,2	- 4,4	1,5
Propilparabeno	14,9	17,5	- 5,0	8,0	- 4,6	3,0
Benzilparabeno	19,7	16,8	- 4,2	13,9	- 3,6	1,8

Fonte: Do autor.

A análise de efeito residual foi realizada com 3 injeções de uma mesma amostra branco antes da curva analítica e logo após a injeção do LSQ da curva. A amostra branco não é isenta de analitos, portanto, o efeito residual foi avaliado pela diferença entre a resposta do branco antes da curva analítica e após a injeção do LSQ. As diferenças foram inferiores a 20%.

O teste de estabilidade foi realizado empregando 3 amostras fortificadas para os calibradores baixo, médio e alto da curva analítica, correspondente as concentrações 1, 10 e 20 ng mL⁻¹, as quais foram analisadas imediatamente após seu preparo e após serem congeladas a -70°C, durante o período de 7 dias. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. Os resultados são observados na Tabela 16.

Tabela 16 - Estabilidade, expressa pelo desvio padrão relativo, do método de determinação de parabenos em soro (n=3).

Concentração estudada	1 ng mL ⁻¹ (DPR %)	10 ng mL ⁻¹ (DPR %)	20 ng mL ⁻¹ (DPR %)
Metilparabeno	8,9	7,3	5,3
Etilparabeno	4,0	12,5	14,6
Propilparabeno	6,3	3,2	0,08
Benzilparabeno	14,3	9,9	11,0

Fonte: Do autor.

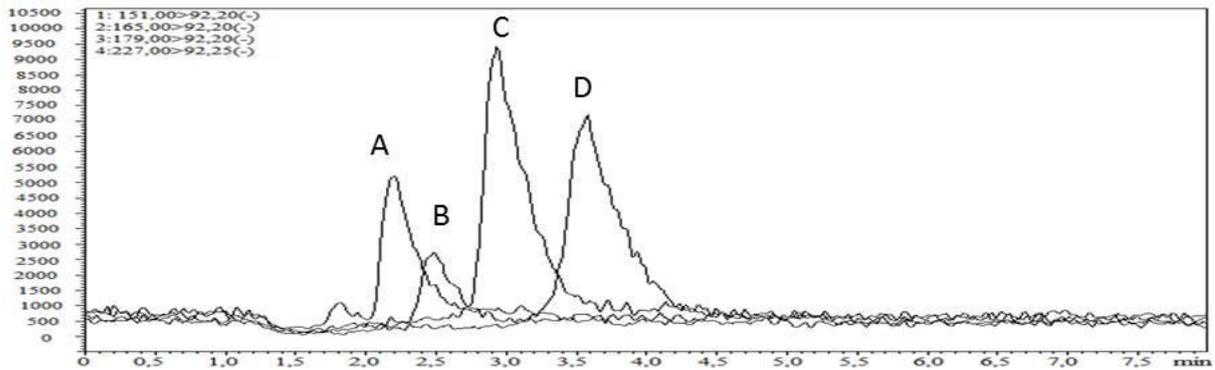
5.5 ANÁLISE DE PARABENOS NAS AMOSTRAS DE VOLUNTÁRIAS

As amostras desse estudo foram obtidas de 18 voluntárias, entre 20 e 50 anos de idade, que receberam o batom da marca M, cuja concentração de parabenos totais foi de 0,35% m/m. Cada batom foi pesado antes de ser entregue à voluntária e, novamente, pesado após 5 dias de uso, na 2ª fase, conforme descrito na seção experimental. A partir dessas pesagens foi possível determinar a quantidade de batom usada nos 5 dias e, conseqüentemente, a quantidade de parabenos que cada voluntária estava exposta e poderia ser absorvida. Após as 3 fases, tais amostras foram submetidas ao preparo prévio da amostra através da técnica de extração otimizado, e em seguida analisadas pelo UPLC-MS-MS.

Como os analitos estão presentes em baixas concentrações e não foi possível obter amostras isentas deles, foram realizadas, para 3 voluntárias, curvas analíticas por sobreposição de matriz, conforme descrito na seção experimental, e por adição de padrão, nas 3 fases, avaliando-se os calibradores, em triplicata, nas concentrações 1, 10 e 20 ng mL⁻¹. Aplicando-se o teste *t* de Student ($p > 0,05$), foi possível observar que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com as curvas analíticas, obtidas das 2 formas. Assim, e levando-se em consideração a baixa quantidade de soro disponível de cada voluntária, em cada uma das fases, optou por analisar as amostras por curva obtida por sobreposição de matriz. Apesar de o método ter sido desenvolvido para 4 parabenos, os resultados foram calculados apenas para o metil- e propil-, uma vez que o batom apresentou em sua composição apenas esses dois parabenos. Por conseguinte, para fins de análise estatística, todos os dados foram utilizados como somatória dos 2 analitos e denominada de

parabenos totais. Nas Figuras 10, 11 e 12, é possível observar os cromatogramas obtidos para a análise das amostras da voluntária 10, nas 3 fases.

Figura 10 - Cromatograma obtido pela injeção da amostra da voluntária 10, coletada na fase 1 do experimento.



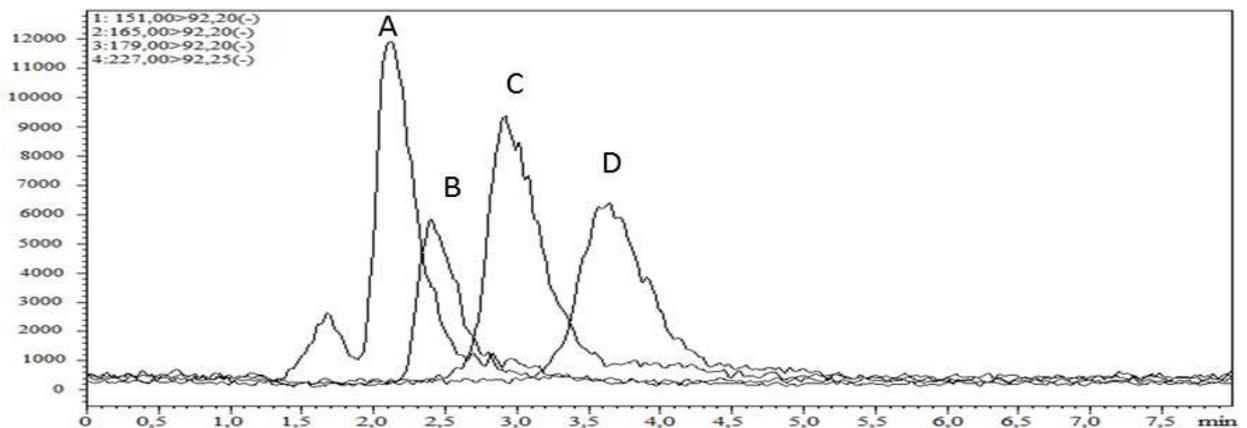
Fonte: Do autor.

Nota: Condições cromatográfica otimizadas: fase móvel metanol (0,1% hidróxido de amônio):água (0,1% hidróxido de amônio), 65:35 (v/v); vazão 0,3 mL/minuto; volume de injeção 25 μ L; temperatura do forno 35°C.

MePa; (B) EtPa; (C) PrPa; (D) BePa;

Concentração metilparabeno 1,97 ng mL⁻¹ e concentração propilparabeno 2,01 ng mL⁻¹.

Figura 11 - Cromatograma obtido pela injeção da amostra da voluntária 10, coletada na fase 2 do experimento.



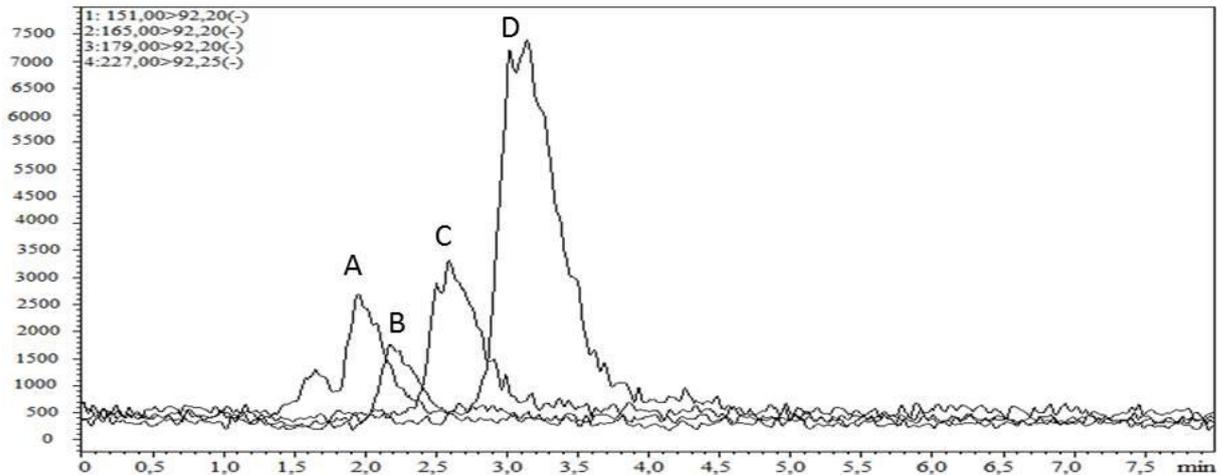
Fonte: Do autor.

Nota: Condições cromatográfica otimizadas: fase móvel mtanol (0,1% hidróxido de amônio):água (0,1% hidróxido de amônio) 65:35 (v/v); vazão 0,3 mL/minuto; volume de injeção 25 μ L; temperatura do forno 35°C.

MePa; (B) EtPa; (C) PrPa; (D) BePa;

Concentração metilparabeno 3,44 ng mL⁻¹ e concentração propilparabeno 2,72 ng mL⁻¹.

Figura 12 - Cromatograma obtido pela injeção da amostra da voluntária 10, coletada na fase 3 do experimento.



Fonte: Do autor.

Nota: Condições cromatográfica otimizadas: fase móvel metanol (0,1% hidróxido de amônio):água (0,1% hidróxido de amônio) 65:35 (v/v); vazão 0,3 mL/minuto; volume de injeção 25 μ L; temperatura do forno 35°C.

MePa; (B) EtPa; (C) PrPa; (D) BePa;.

Metilparabeno não foi quantificado pelo método e concentração propilparabeno 0,9 ng mL^{-1} .

A fim de verificar o tipo de distribuição que os dados seguiam, foi aplicado o teste de D'Agostino, com nível de 95% de confiança, e nas 3 fases o valor de p foi menor que 0,05, rejeitando, portanto, a hipótese de normalidade para a distribuição do conjunto de dados em questão. Essa aleatoriedade dos dados pode ser explicada com a presença de 3 *outliers*, cujos resultados, tanto em relação à concentração de parabeno totais em soro quanto à quantidade de batom utilizada, foram discrepantes em relação à média e à mediana. Uma das voluntárias utilizou uma quantidade de batom muito maior do que todas as outras, uma segunda utilizou uma pequena quantidade de batom, todavia a concentração em soro foi muito maior do que a média. Por meio da análise do questionário, foi possível observar que ela usou grande quantidade de produtos alimentícios processados, cujo rótulo destaca a presença de parabeno, até 1 dia antes da coleta da amostra. Assim, provavelmente, a sua concentração se correlacionou mais com a ingestão de alimentos do que com o uso de batom. E, finalmente, uma terceira voluntária, usou grande quantidade de batom, contudo apresentou baixa concentração de parabeno no soro, na segunda fase, menor que limite de quantificação do método. A Tabela 17 apresenta as concentrações de metil e propilparabeno encontradas no soro das voluntárias em cada uma das fases do estudo e a Tabela 18 apresenta a estatística descritiva para os resultados encontrados no presente estudo, em um total de 18 voluntárias.

Tabela 17 - Concentração de parabenos (ng/mL) encontrado na análise de soro das voluntárias nas 3 fases do estudo.

Analitos	Metilparabeno (ng/mL)			Quantidade de metilparabeno ingerido (mg)	Propilparabeno			Quantidade de propilparabeno ingerido (mg)
	Voluntárias	1º Fase	2º Fase		3º Fase	1º Fase	2º Fase	
1	5,72	11,37	4,38	0,71	< LQ	8,55	0,03	0,43
3	0,63	0,90	0,34	0,21	< LQ	0,67	< LQ	0,13
4	< LQ	6,43	2,94	0,33	< LQ	0,71	0,12	0,20
5	0,47	1,54	0,86	0,12	< LQ	< LQ	< LQ	0,07
6	1,33	1,50	0,71	0,39	4,34	0,16	< LQ	0,24
7	< LQ	0,86	0,16	0,27	< LQ	< LQ	< LQ	0,16
8	1,33	1,74	1,37	0,30	0,38	0,34	< LQ	0,19
9	< LQ	1,14	0,70	0,18	< LQ	0,75	< LQ	0,11
10	1,97	3,44	< LQ	0,43	2,01	2,72	< LQ	0,27
11	0,51	2,47	< LQ	0,35	< LQ	9,96	< LQ	0,21
12	0,51	2,91	0,75	0,32	< LQ	< LQ	< LQ	0,17
13	0,49	1,08	1,76	0,08	< LQ	< LQ	< LQ	0,05
14	0,44	2,18	2,01	0,29	< LQ	< LQ	< LQ	0,18
15	1,04	1,66	0,40	0,20	< LQ	1,20	< LQ	0,12
16	0,61	1,11	0,28	0,42	< LQ	< LQ	< LQ	0,26
17	1,13	0,45	0,79	0,18	< LQ	< LQ	< LQ	0,11
18	1,29	2,32	2,12	0,70	< LQ	1,65	0,38	0,43
19	0,79	0,79	0,64	0,17	< LQ	0,27	< LQ	0,10

Fonte: Do autor.

Nota: < LQ: abaixo de limite de quantificação do método

Tabela 18 - Estatística descritiva para os resultados obtidos de concentração de parabenos totais em soro (n=18), nas três fases do estudo.

	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Média (ng mL ⁻¹)	1,65	4,12	1,74
Desvio- padrão	1,35	4,87	1,06
Erro- padrão	0,32	1,15	0,25
Mediana (ng mL ⁻¹)	1,06	2,14	1,27
Desvio médio	0,80	3,24	0,79
Erro mediano	0,09	0,34	0,07
Valor mínimo (ng mL ⁻¹)	1,01	1,01	1,01
Valor máximo (ng mL ⁻¹)	6,22	19,92	4,88

Fonte: Do autor.

Após o teste de normalidade e a análise do questionário, assumindo que os dados analisados não seguiram um padrão de distribuição normal ($p=0,05$), foi aplicado o teste de Friedman, não-paramétrico, para a comparação de múltiplas amostras relacionadas, ou seja, retiradas da mesma população, para a comparação da concentração de parabenos nas 3 fases do estudo. A análise dos dados demonstrou diferença estatisticamente significativa somente na fase em que as voluntárias usaram batom com uma concentração conhecida de parabenos, em relação às outras 2 fases. Constatou-se ainda que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos na fase 1 e na fase 3 (Tabela 19).

Tabela 19 - Valores de p obtidos na comparação entre as médias encontradas para a concentração de parabenos totais em soro, nas três fases do estudo (para um nível de 95% de confiança, $p=0,05$), pelo teste de Friedman.

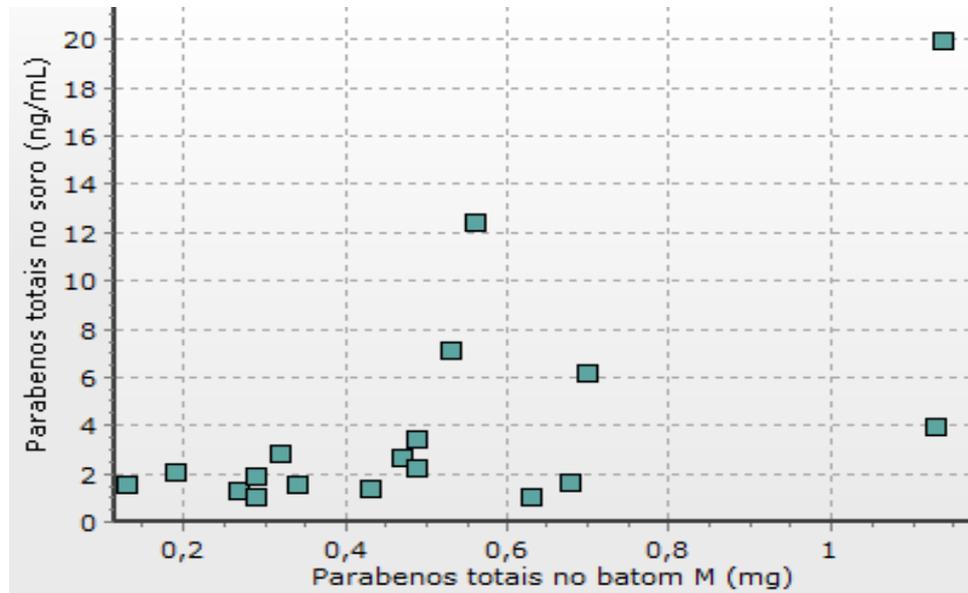
	Comparação entre as fases		
	1 e 2	2 e 3	1 e 3
Valor de p	0,0005	0,0016	0,7963

Fonte: Do autor.

Um estudo publicado em 2005, relatou que a exposição humana aos parabenos foi estimada, em média, de 50 mg/dia, através de uso de cosméticos e produtos de higiene pessoal (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005), todavia, não destacou quais cosméticos e o qual o nível de contribuição do uso de cada um deles. Já, com os inéditos achados do presente trabalho, foi possível verificar que as voluntárias se expuseram, em média, a uma quantidade de parabenos totais igual a 0,5 mg (com desvio padrão de $\pm 0,2806$), calculada através da quantidade média usada de batom M, que foi pesado antes e após o período do estudo, na fase 2.

Para estudar a inter-relação entre a concentração de parabenos totais em soro, obtida na fase em que as voluntárias usaram o batom M, e a quantidade de parabenos totais presente nesse cosmético, ou seja, 2 variáveis cuja distribuição não seguiu o modelo gaussiano, foi aplicado o teste de correlação de Spearman, cujo valor foi igual a 0,7202 e a dispersão dos dados pode ser visualizada na Figura 13.

Figura 13 - Dispersão de dados obtida pela correlação entre a quantidade de parabenos totais, em relação à quantidade de batom M usada por cada voluntária em 5 dias, e a concentração de parabenos totais em soro (coeficiente de correlação de Spearman= 0,7202).



Fonte: Do autor.

O coeficiente de correlação Spearman é um substituto não-paramétrico para o coeficiente de correlação de Pearson (r), que varia de -1 a 1. E uma correlação perfeita (-1 ou 1) indica que o escore de uma variável pode ser determinado exatamente ao se saber o escore da outra. No outro oposito, uma correlação de valor zero indica que não há relação linear entre as variáveis. Todavia, como valores extremos (0 ou 1) dificilmente são encontrados na prática é importante discutir como interpretar a magnitude dos coeficientes. Segundo, Dancey e Reidy (2005), citado por Figueiredo-Filho e Silva-Júnior (2009), valores de $r= 0,10$ até $0,30$, apontam fraca correlação, valores de $r= 0,40$ até $0,6$, apontam moderada correlação e valores de r superiores a $0,70$, indicam forte correlação. Seja como for, o certo é que quanto mais perto de 1 (independente do sinal) maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis. Nesse estudo, o coeficiente de correlação obtido demonstrou que há uma forte correlação entre a exposição aos parabenos, através do uso de batom, e a concentração deles no soro e reforçou a hipótese que tais substâncias químicas são absorvidas pelo uso de cosmético labial.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente estudo foi possível concluir que:

- a) O método analítico desenvolvido para a determinação de parabenos em batom, constituído por preparo de amostras, com extração líquido-líquido, e por detecção/quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos, é rápido, simples, linear, exato, preciso, robusto e apresenta limites de detectabilidade suficientes para ser aplicado no controle de qualidade de batons, na indústria cosmética e em laboratórios de Toxicologia Analítica;
- b) Nas amostras adquiridas comercialmente e analisadas pelo método proposto, os parabenos encontrados, metil e propil, apresentaram concentrações dentro do limite máximo permitido pela ANVISA (ANVISA, 2001), que é 0,4% m/m (isolado) e 0,8% m/m (em misturas);
- c) O método analítico desenvolvido para a determinação de parabenos em soro, constituído por preparo de amostras, com extração líquido-líquido, e por detecção/quantificação por cromatografia líquida com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo, é rápido, simples, linear, exato e preciso. O preparo de amostras foi suficiente para não produzir efeito residual e os limites de detectabilidade foram suficientes para a quantificação dos analitos em amostras de soro, em níveis de ng mL⁻¹. A sensibilidade do método, avaliada pelos coeficientes angulares das retas, foi suficiente para distinguir as concentrações de parabenos no soro, com e sem uso de batom pelas voluntárias;
- d) Há absorção de parabenos por meio do uso de batom, uma vez que foi demonstrada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de parabenos no soro de mulheres que utilizaram batom, contendo essas substâncias, em relação ao não uso do cosmético labial e foi demonstrada forte correlação entre a quantidade usada desse batom e a concentração de parabenos no soro.

REFERÊNCIAS

ANGELOV, T; VLASENKO, A.; TASHKOV, W. HPLC Determination of pKa of parabens and investigation on their lipophilicity parameters. **J. Liquid Chromatogr. & Rel. Technol.**, v. 31 p. 188-197, 2008

ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. P. **Aditivos em alimentos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA - UNICAMP), 1983.

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: 2 maio. 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 79 de 28 de agosto de 2000, republicada no D.O. de 02/10/2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 2 maio. 2013.

AUBERT, N.; AMELLER, T.; LEGRAND, J. 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 and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 445–454, 2012.

BERKELEY HEALTH ONLINE. **Berkeley School of Public Health**, University of California, 2013. Disponível em <<http://sph-publications.berkeley.edu/bho/2013/05/troubling-levels-of-toxic-metals-found-in-cosmetics>>. Acesso em: 15 maio. 2013.

BŁĘDZKA, D., GROMADZIŃSKA, J., and WĄSOWICZ, W. Parabens. From environmental studies to human health. **Environ. Int.**, v. 67 p. 27–42, 2014.

BORREMANS, M. et al. Validation of HPLC analysis of 2-phenoxyethanol, 1-phenoxypropan-2-ol, methyl, ethyl, propyl, butyl and benzyl 4-hydroxybenzoate (parabens) in cosmetic products, with emphasis on decision limit and detection capability. **Chromatographia**, v. 59 p. 47-53, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, 22 maio. 2012.

CAO, S. et al. Development of an HPLC–MS/MS method for the simultaneous analysis of six kinds of parabens in food. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1016, 2013.

CARVALHO, D. et al. Cosmetotoxicology: has arrived to stay. 26th Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists. Innovation & Responsibility: Cosmetics Forever. **Association Argentina de Químicos Cosméticos**, Buenos Aires, n. 0112, p.421, 2010.

CHENG, Y. et al. Large volume sample stacking with EOF and sweeping in CE for determination of common preservatives in cosmetic products by chemometric experimental design. **Electrophoresis**, v. 33, p. 1443–1448, 2012.

DARBRE, P.D. et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of applied Toxicology**, v. 24, p. 5-13, 2004.

ELDER, R. L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, and butylparaben. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 3, p. 147, 1984.

FEI, T. et al. Determination of parabens in cosmetic products by solid-phase microextraction of poly(ethylene glycol) diacrylate thin film on fibers and ultra high-speed liquid chromatography with diode array detector. **Journal of Separation Science.**, v. 34, p. 1599–1606, 2011.

FIGUEIREDO-FILHO, D. B.; SILVA-JUNIOR, J. A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (R). **Revista Política Hoje**, v.18, 2009.

GOLDEN, R.; GANDY, J.; VOLLMER, G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks for human health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, p. 435–458, 2005.

GONZALEZ, J. A. O. et al. New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. **Analytica Chimica Acta**. V. 858, p. 1-15, 2015.

HE, J. et al. Preparation and selective recognition of a novel solid-phase microextraction fiber combined with molecularly imprinted polymers for the extraction of parabens in soy sample. **Journal of Separation Science.**, v. 35, p. 308–314, 2012.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008 Revisão 04. Jul. 2011. Disponível em:
<http://http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf> Acesso em: 03 junho 2014.

JACKSON, E. M. Moisturizers of today. **Journal of Toxicology – Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 11, p. 173, 1992.

JIMÉZ-ÉZ-DÍAZ, I. et al. A new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of parabens in human placental tissue samples. **Talanta**, v. 84, p. 702-709, 2011.

JUN, H. W. et al. Binding Study of Para Hydroxybenzoic Acid Esters to Bovine Serum Albumin by Fluorescent Probe Technique. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60(12), p. 1821-1825, 1971.

KAMBLE, R. M.; SINGH, S. G.; SINGH, S. Simultaneous Determination of Preservatives (Methyl Paraben and Propyl Paraben) in Sucralfate Suspension Using High Performance Liquid Chromatography. **E-Journal of Chemistry**, v. 8, p. 340-346, 2011.

LEE, S. et al. Development of a quantitative analytical method for determining the concentration of human urinary paraben by LC-MS/MS. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v.34, p.1131, 2013.

LORETZ, L. J. et al. Exposure data for cosmetic products: lipstick, body lotion and face cream. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 279-291, 2005.

MARTINS, I. et al. Determination of parabens in shampoo using high performance liquid chromatography with amperometric detection on a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v.85, p. 1-7, 2011.

MARTINS, I. Validação Analítica in MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia analítica**. 1 ed. Guanabara, 2008

NORMANDO, D.; TJADERHANE, L.; QUINTÃO, C. C. A. A escolha do teste estatístico – um tutorial em forma de apresentação em PowerPoint. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v.15, p.101-106, 2010.

OISHI, S. et al., Effects of propylparaben on the male reproductive system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1807-1813, 2002.

ORTH, D.S. Use of parabens as cosmetic preservatives. **International Journal of Dermatology**, v. 19, p. 504, 1980.

ORTON. D. I.; WILKINSON. J. D. Contact allergy: incidence, diagnosis and management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 5, p. 327-37, 2004.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, Biologia Geral, Biologia da Pele**. Organização Andrei Editora LTDA, 1998.

PIAO, C.; CHEN, L.; WANG, Y. A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens. **Journal of Chromatography B**, v.969, p. 139-148, 2014.

PRICHODKO, A. et al. Gas chromatographic Determination of Parabens after *In-situ* Derivatization and Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. **Acta Chromatographica**, v. 24, p. 589–601, 2012.

QUIROGA, M. I.; GUILLOT, C. F. **Dermatologia Cosmética, Clínica y Terapêutica**. Buenos Aires: El Ateneo, 1955.

REBELLO, T. **Guia de produtos cosméticos**. 7 ed. São Paulo: Senac, 2008.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, São Paulo, 2004.

ROUTLEDGE E. J. et al. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 53, p. 9-12, 1998.

SAFE COSMETICS. **Campaign for safe cosmetics, A Poison Kiss: The Problem of Lead in Lipstick**, 2007. Disponível em <www.safecosmetics.org/about/reports.cfmS>. Acesso em: 15 maio. 2013.

SHIRAI, S. et al. Urinary excretion of parabens in pregnant Japanese women. **Reproductive Toxicology**, v.35, p. 96-101, 2013.

SOARES, A. R.; NASCENTES, C. C. Development of a simple method for the determination of lead in lipstick using alkaline solubilization and graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.105, p. 272–277, 2013.

SONI, M. G. et al. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39 p. 513–532, 2001.

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 985–1015, 2005.

TZANAVARAS, P. D. et al. Isocratic liquid chromatographic determination of three paraben preservatives in hygiene wipes using a reversed phase core-shell narrow-bore column. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10 , p. 1459-1463, 2012.

VELA-SORIA, F. et al. A new treatment by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of parabens in human serum samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7259-7267, 2013.

YE, X. et al. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 844, p. 53–59, 2006.

ANEXO A - QUESTIONÁRIO

Nº da AMOSTRA:

Data da coleta:

Hora da coleta da urina:

Volume, aspecto e densidade da urina:

Horários da coleta do sangue:

Volume e aspecto do sangue:

1. INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome:

Data de nascimento:

Sexo:

Peso:

Altura:

Endereço:

2. HÁBITOS ALIMENTARES

2.1 Tipo de dieta (última semana)

() rica em gorduras

() rica em proteínas (carnes, ovos, soja.....)

() rica em carboidratos

() dieta de emagrecimento

() vegetais. Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

() frutas. Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

() adoçantes. Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

() conservas em lata ou em vidro. Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

() molho de tomate ou pimenta ou soja. Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

() condimentos (catchup, maionese, mostarda). Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

() margarina/ manteiga. Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

() queijo. Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

() doces. Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

() sucos. Tipo/ Freqüência/ Data da última ingestão:

Alimentação no dia anterior à coleta da amostra:

Café da manhã:

Almoço:

Jantar:

Alimentos e bebidas nos intervalos das três principais refeições acima:

Tempo decorrido entre a última refeição e a coleta da amostra:

2.2 Consumo de bebidas alcoólicas (última semana):

Tipo/ Freqüência/ Quantidade

2.3 Consumo de bebidas não alcoólicas (última semana):

Tipo/ Freqüência/ Quantidade

2.4 Outras bebidas e freqüência da ingestão (última semana):

Café:

Chá:

Outras (especificar):

3. HÁBITOS DE HIGIENE PESSOAL

Tipos de produtos (última semana)

() sabonete. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:

() shampoo. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:

- () condicionador. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () pasta de dente. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () enxaguante bucal. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () desodorante. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () desodorante para os pés. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () produtos de higiene íntima. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:

4. USO DE PRODUTOS COSMÉTICOS

Tipos de produtos (última semana)

- () base. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () protetor solar facial. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () hidratante facial. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () *primer*. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () pó compacto. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () *blush*. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () sombra. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () rímel. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () lápis. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () delineador. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () batom. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () *gloss*. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () manteiga de cacau. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () hidratante corporal. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () protetor solar corporal. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () creme para as mãos. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () creme para os pés. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () perfume. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () esmalte. Tipo/ Freqüência/ Data do último uso:
- () creme/ cera depilatório. Tipo/ Freqüência/ Data do último uso:
- () lenço umedecido. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () creme para as unhas. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () creme rejuvenescedor. Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:
- () produtos para cabelo (ex. gel, mousse, pomada, reparador de pontas etc). Tipo/ Freqüência/ Horário do último uso:

5. INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE

5.1 Tipos de medicamentos, formulação farmacêutica e freqüência:

5.2 Queixas relativas ao estado de saúde (último mês):

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL-MG

Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome :.....

Documento de Identidade Nº :.....Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1.Título do Protocolo de Pesquisa: **CORRELAÇÃO ENTRE O USO DE BATOM E A CONCENTRAÇÃO DE PARABENOS E CHUMBO EM MULHERES EXPOSTAS AO COSMÉTICO**

2.Pesquisador: Isarita Martins

Cargo/Função: Professor Adjunto

Inscrição Conselho Regional Nº 23279- SP

Departamento: Análises Clínicas e Toxicológicas

3.Avaliação do risco da pesquisa:

Sem Risco (x) Risco Mínimo () Risco Médio ()

Risco Baixo () Risco Maior ()

4.Duração da Pesquisa: 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Este é um convite para você participar de um projeto de pesquisa voluntariamente. Por favor leia atentamente as informações aqui contidas antes de dar o seu consentimento para participar ou não do estudo.

1. Este estudo visa correlacionar o uso de batom e a concentração de parabenos e de chumbo em mulheres expostas a esse cosmético

2. Aceitando participar deste estudo, será coletado de sua pessoa uma amostra de urina, em torno de 100 mL e em torno de 5 mL de sangue, em 3 etapas, antes e após o uso de batom, de marca que contenha parabenos e

chumbo e, após o uso de batom, de marca rotineiramente. Todas as determinações serão realizadas, gratuitamente, nas suas amostras.

3. No dia da coleta de suas amostras, você preencherá um questionário que tem por objetivo conhecer um pouco de seus hábitos pessoais de higiene e uso de cosméticos, de seus hábitos alimentares e uso de medicamentos que possam interferir nos exames.

4. Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar deste projeto, e eu Isarita Martins, pesquisadora responsável, me coloco a disposição no sentido de oferecer as informações relacionadas à saúde, aos seus direitos, bem como os riscos e benefícios relacionados a sua participação neste estudo. O telefone para contato é (35) 3299-1342.

5. A sua identidade será mantida como confidencial. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar sua identidade, entretanto estarão disponíveis para consulta pela equipe envolvida no projeto e pelo Comitê de Ética.

IV – ESCLARECIMENTOS DADO PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:

Pesquisadora responsável: Prof^a. Dr^a. Isarita Martins

Endereço: Universidade Federal de Alfenas-MG

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Alfenas M.G

CEP: 37130-000.

Fone: 3292-1342

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Alfenas, _____ de _____ de _____.

 Assinatura do sujeito de pesquisa
 ou responsável legal

 Assinatura do pesquisador
 (carimbo ou nome legível)