

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**JOÃO VICTOR NUNES NICOLA**

**ECOTOXICIDADE DO METILPARABENO E DE SEUS DERIVADOS CLORADOS  
EM *Allium cepa* L.**

**CAMPO MOURÃO**

**2022**

**JOÃO VICTOR NUNES NICOLA**

**ECOTOXICIDADE DO METILPARABENO E DE SEUS DERIVADOS CLORADOS  
EM *Allium cepa* L.**

**Ecotoxicity of methylparaben and its chlorinated derivatives on *Allium cepa* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentada como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia Ambiental da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).  
Orientador(a): Ana Paula Peron

**CAMPO MOURÃO**

**2022**



Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**JOÃO VICTOR NUNES NICOLA**

**ECOTOXICIDADE DO METILPARABENO E DE SEUS DERIVADOS CLORADOS  
EM *Allium cepa* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia Ambiental da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 23/Novembro/2022

---

Ana Paula Peron  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campo Mourão

---

Elizabete Satsuki Sekine  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campo Mourão

---

Maria Cristina Rodrigues Halmeman  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campo Mourão

**CAMPO MOURÃO**

**2022**

Dedico este trabalho à minha família, aos meus  
amigos e todos aqueles que me apoiaram nessa  
etapa.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero, primeiramente, agradecer a Deus pois sem a permissão Dele nada disso teria acontecido. Sem Ele, eu não conseguiria superar todas as dificuldades que topei na minha e na vida acadêmica. Muito obrigado meu Pai!

Agradeço ao meu pai Ercio Nicola (Bibi), minha mãe Tereza Nunes Benedito (Terezinha), ao meu irmão Danilo Nunes Nicola que sempre me apoiaram e me ajudaram nos momentos mais difíceis, sempre estiveram comigo nos momentos de luta e também nos momentos de alegria. Agradeço minha irmã, que está no céu, Uiara Nunes Nicola, que sempre me vigiou e me auxiliou com intuições, boas energias, amor e carinho.

Quero agradecer aos meus amigos de faculdade, que se tornaram amigos para a vida toda. Agradeço por todos os momentos em que estivemos juntos nas aulas, nos laboratórios, nas festas, nos jogos, nas conversas do dia a dia, no desespero dos trabalhos e nos estudos agoniantes para as provas. Sem o apoio de vocês, nada disso estaria acontecendo. Vocês moram no meu coração.

Agradeço a todos os alunos e trabalhadores do laboratório C101 da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campo Mourão por toda ajuda nos momentos de dificuldade na elaboração dos experimentos, por altas risadas e uma harmonia que deixou o ambiente de pesquisa mais leve e agradável.

Quero agradecer a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron, por todo o auxílio, indicações, conselhos, correções, puxões de orelha, todo o carinho e paciência para comigo. Sua participação neste trabalho foi essencial e sou eternamente grato pela oportunidade de trabalhar e redigir um trabalho com uma grande pesquisadora do mundo científico.

Muito obrigado a todos vocês!

## RESUMO

Os parabenos são antimicrobianos utilizados em produtos farmacêuticos, em cosméticos e em alimentos. Dentre os parabenos, o mais utilizado é o metilparabeno. Esse composto quando em contato com água clorada dá origem ao metilparabeno monoclorado e ao metilparabeno biclorado. O metilparabeno e seus derivados clorados são classificados como poluentes emergentes. Nesse estudo o metilparabeno, o cloro-metilparabeno e o dicloro-metilparabeno foram avaliados em *Allium cepa* L. nas concentrações 5, 10, 50 e 100 µg/L. A concentração 100 µg/L do metilparabeno e as concentrações 50 e 100 µg/L de seus derivados clorados reduziram a proliferação celular, causaram alterações celulares e reduziram a viabilidade celular em meristemas radiculares, o que causou uma redução no crescimento das raízes. Além disso, causaram uma inibição drástica das enzimas CAT, APX e SOD, ativaram a enzima GPOX e promoveram peroxidação lipídica em raízes. Com base nesses resultados, infere-se que a contaminação recorrente dos solos com esses metilparabenos, com destaque para os clorados, pode impactar negativamente diferentes espécies vegetais.

Palavras-chave: parabeno; citotoxicidade; genotoxicidade; estresse oxidativo; *Allium cepa* L.

## ABSTRACT

Parabens are antimicrobials used in pharmaceuticals, cosmetics and food. Among the parabens, the most common use is for methylparaben. This compound when in contact with chlorinated water gives rise to monochlorinated methylparaben and bichlorinated methylparaben. Methylparaben and its chlorinated derivatives are classified as emerging pollutants. In this study methylparaben, chloro-methylparaben and dichloro-methylparaben were evaluated in *Allium cepa* L. at concentrations 5, 10, 50 and 100 µg/L. The 100 µg/L concentration of methylparaben and the 50 and 100 µg/L concentrations of its chlorinated derivatives reduced cell proliferation, caused cellular changes, and reduced cell viability in root meristems, which caused a reduction in root growth. In addition, they caused drastic inhibition of CAT, APX and SOD enzymes, activated GPOX enzyme and promoted lipid peroxidation in roots. Based on these results, it is inferred that recurrent contamination of soils with these methylparabens, particularly chlorinated ones, may negatively impact different plant species.

Keywords: paraben; cytotoxicity; genotoxicity; oxidative stress; *Allium cepa* L.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do metilparabeno .....	16
Figura 2 - Alterações celulares observadas em células meristemáticas de raízes de <i>Allium cepa</i> L.....	26
Figura 3 - Efeito do metilparabeno (MPB), cloro-metilparabeno (CIMPB) e dicloro-metilparabeno (DiCIMPB) .....	27
Figura 4 - Peroxidação lipídica em meristemas radiculares de <i>Allium cepa</i> L. .	28
Figura 5 - Atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e superóxido dismutase (SOD) em raízes de <i>Allium cepa</i> L.....	30



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Índice de crescimento radicular e índice mitótico dos meristemas radiculares dos bulbos <i>Allium cepa</i> L. expostos a diferentes concentrações de metilparabeno, cloro-metilparabeno e dicloro-metilparabeno durante 120 horas.</b> .....	<b>24</b>
<b>Tabela 2 - Número, tipos e índices de alterações celulares nos meristemas radiculares dos bulbos de <i>Allium cepa</i> L. expostos a diferentes concentrações de metilparabeno, cloro-metilparabeno e dicloro-metilparabeno, durante 120 horas.</b> .....	<b>25</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
APX	Ascorbato Peroxidase
ButP	Butilparabeno
CIMPB	Metilparabeno Monoclorado
Co	Controle
DiCIMPB	Metilparabeno Diclorado
DP	Desvio Padrão
DTPA	Ácido diethylenetriamino-penta acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EtilP	Etilparabeno
GOPX	Glutathione Peroxidase
IAC	Índice de Alteração Celular
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis
ICR	Índice de Crescimento Relativo
IM	Índice Mitótico
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MPB	Metilparabeno
ProP	Propilparabeno
SOD	Superóxido Dismutase
TR	Tratamento

## LISTA DE SÍMBOLOS

ng/L	Nanogramas por Litro
µg/L	Microgramas por Litro
C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	4-hidroxibenzoato de metila ou Metilparabeno
g/mol	Gramas por Mol
g/L	Gramas por Litro
°C	Graus Celsius
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
mL	Mililitros
mM	Milimols
µL	Microlitro
nm	Nanometro
<	Menor
>	Maior
n°	Número
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos geral.....</b>	<b>14</b>
2.1.1	Objetivos específicos.....	14
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1</b>	<b>Composição química do metilparabeno.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2</b>	<b>Uso do metilparabeno e classificação como poluente emergente ..</b>	<b>17</b>
<b>4.3</b>	<b>Teste de toxicidade em <i>Allium cepa</i> L.....</b>	<b>18</b>
<b>4.4</b>	<b>Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes.....</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>5.1</b>	<b>Obtenção, cloração do MPB, preparo de soluções e definição de concentrações para análise de toxicidade.....</b>	<b>19</b>
<b>5.2</b>	<b>Medição de raízes .....</b>	<b>20</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise de citotoxicidade e genotoxicidade em <i>Allium cepa</i> L.....</b>	<b>20</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise de estresse oxidativo em <i>Allium cepa</i> L.....</b>	<b>21</b>
5.4.1	Preparo das amostras .....	21
5.4.2	Análise enzimática.....	22
<u>5.4.2.1</u>	<u>Atividade enzimática da catalase (CAT).....</u>	<u>22</u>
<u>5.4.2.2</u>	<u>Atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX).....</u>	<u>22</u>
<u>5.4.2.3</u>	<u>Atividade enzimática de guaiacol peroxidase (GOPX) .....</u>	<u>22</u>
<u>5.4.2.4</u>	<u>Atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD).....</u>	<u>23</u>
<b>5.5</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e industrial está acelerado, porém de forma desorganizada e sem planejamento. Este crescimento leva um aumento na demanda de consumo de produtos farmacêuticos e outros produtos químicos, como conservantes, cosméticos e produtos de higiene pessoal (VEDANA, 2019).

O Brasil é o quarto maior consumidor de produtos de higiene pessoal e cosméticos. A indústria brasileira tem cerca de 2613 empresas regulamentadas no setor, com número alto de químicos, o que leva ao surgimento de uma nova classe de poluentes, chamados de poluentes emergentes (VEDANA, 2019; ABIHPEC, 2016). Com isso, os problemas ambientais acontecem com cada vez mais frequência, se observando alterações no solo, na água e no ar (KUNZ, 2002).

Essas alterações promovidas por algumas classes de poluentes emergentes são detectados no ambiente há um tempo, porém com o avanço da tecnologia e das metodologias analíticas de detecção, foi possível separar e quantificar com maior facilidade quais desses poluentes estão mais frequentes no ambiente (KLEYWEGT et al., 2007). Entre os poluentes emergentes, estão inseridos os parabenos (SONI et al., 2005).

Os parabenos são os compostos químicos com maior utilização na indústria de cosmética, farmacêutica e de alimentos, por serem antimicrobianos e conservantes potentes (QIAN et al., 2008). Sua ação está voltada principalmente no combate de leveduras e bolores, bactérias gram-positivas, e não há efeitos significativos contra vírus (HAMAN et al., 2015). Dentre a classe dos parabenos, o metilparabeno (MPB) é o composto com a maior utilidade na indústria de alimentos e cosméticos, onde a estimativa é que o MPB esteja em 48% dos produtos de higiene pessoal e cosméticos (TAHAN, 2016; BLEDZKA et al., 2014). Nas indústrias brasileiras de produtos farmacêuticos, não existe uma lei que autoriza e regulamenta o uso de parabenos, onde é empregado concentrações de 0,18% de MPB e 0,02% de um outro parabeno, o propilparabeno (ProP), ou combinações entre outros parabenos de 0,1% a 0,2%, peso/peso (OLIVEIRA, M.A; LIMA, E.M., 2006).

O uso constante do MPB nas indústrias explica sua detecção frequente no ambiente, principalmente nos ambientes aquáticos (GONZALES-MARIÑO et al., 2011). As águas residuais urbanas são a principal fonte deste composto no ambiente, tornando o local a ser mais investigado para obter níveis do MPB que são despejados

no ambiente (CANOSA, 2006). O MPB foi encontrado em concentrações na escala de ng/L a µg/L em ambientes aquáticos e no solo. Em ambientes aquáticos, o MPB foi encontrado com a concentração máxima de 8 µg/L. Em contrapartida, no solo sedimentar de rio, encontrou-se o MPB com uma concentração de 435 ng/g (HAMAN et al., 2015; GALINARO et al., 2015; GORGA et al., 2015).

Os testes de ecotoxicidade são de suma importância para avaliação de exposição e contaminação dos produtos químicos nos componentes ambientais, sendo eles hídricos, sedimentos, solos e ar. Com a utilização de organismos chaves para os testes, é possível identificar quais compostos químicos afetam os organismos biológicos, com contribuição na avaliação de riscos ambientais decorrentes desses contaminantes (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008; COSTA et al., 2008).

Diferentes vegetais são usados para o teste de toxicidade por compostos químicos, mas as espécies do gênero *Allium* são as mais usadas para a determinação de efeitos tóxicos dos compostos químicos (FISKEJÖ, 1985). Os ensaios com *Allium cepa* L. as anomalias nos cromossomos são bioindicadores de efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos compostos em raízes de cebolas (PARVAN, L. G., 2020).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivos geral

Analisar a toxicidade do metilparabeno e de seus derivados clorados em *Allium cepa* L.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Analisar a citotoxicidade, a genotoxicidade e estresse oxidativo do metilparabeno não clorado em raízes de *Allium cepa* L.;
- Analisar a citotoxicidade, a genotoxicidade e estresse oxidativo do metilparabeno monoclorado e diclorado em raízes de *Allium cepa* L.;
- Analisar nas concentrações de 5, 10, 50 e 100 µg/L;
- Analisar o desempenho das enzimas CAT, APX, GOPX e SOD.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Com o crescimento populacional, os centros urbanos estão sujeitos a maiores consumos de produtos farmacêuticos e industrializados. Esses produtos são ricos em substâncias antimicrobianas e conservantes, e os parabenos estão entre os mais presentes em suas fórmulas. O uso dos produtos químicos, estéticos e farmacêuticos geram resíduos sólidos e líquidos. O despejo desses efluentes e dos resíduos sólidos crescem junto a este consumo de produtos químicos industrializados. Muitos desses efluentes e resíduos são direcionados a estações de tratamento e aterros sanitários, porém sua eficiência, quando se trata de compostos como os parabenos não clorados e clorados, é reduzida.

Grande parte dos parabenos são encontrados na natureza em baixas concentrações e, por conta da sua estrutura e composição química, são diluídos e ativados com maior eficiência em água com condições ideais, condições essas encontradas na maioria dos corpos hídricos brasileiros. Essa eficiência em água junto a uma falta de legislação para seu uso faz com que os parabenos se classifiquem na categoria de poluente emergente, pois dependendo da concentração podem causar danos ao ambiente e também à saúde dos seres humanos a longo prazo.

É de suma importância realizar um estudo de toxicidade desses compostos, em específico o metilparabeno (MPB) não clorado e metilparabeno monoclorado (CIMPB), pois dentre os parabenos, são os mais comuns encontrados nos produtos de origem química.

### **4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

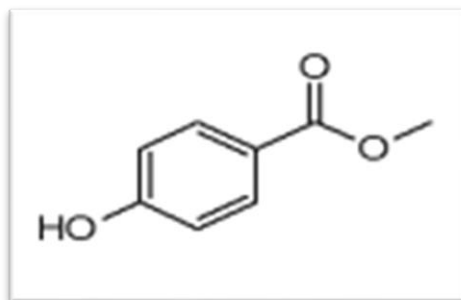
#### **4.1 Composição química do metilparabeno**

Os parabenos são alquilesteres à partir do ácido 4-para-hidroxibenzóico, onde o grupo funcional éster está localizado no carbono número 4 do anel benzóico (PETRUCI et al., 2011; HAMAN et al., 2015). Sua classificação é determinada de acordo com o tamanho da cadeia carbônica ligada ao grupo funcional éster (SONI et al., 2005). Em sua forma mais pura, são encontrados como cristais, sem emissão de odor e nem sabor perceptíveis, assim possui uma estabilidade no ar (SONI et al., 2005).

Os parabenos possuem várias características importantes para o seu uso, como o pH de 4,5 – 7,5 ser sua faixa de maior atividade e com estabilidade, de forma mais elevada, quando diluídos em água, com maior eficácia no uso como antimicrobianos (ELDER, 1984; WADE e WELLER, 1994; SONI et al., 2001). Segundo Giordano et al. (1999), conforme a cadeia do grupo alquil aumenta, sua atividade antimicrobiana também é aumentada, porém a solubilidade em água se torna reduzida, aumentando a dificuldade de solução do composto. Dentre os principais parabenos utilizados em indústrias estão o MPB e o ProP (SONI et al., 2005).

O MPB, 4-hidroxibenzoato de metila, com fórmula  $C_8H_8O_3$ , estrutura química na Figura 1, possui um peso molecular de 152,15 g/mol, uma solubilidade de 2,5 g/L a 25°C, ponto de fusão à 131°C, ponto de ebulição entre 270°C e 280°C e pH neutro (PETERSEN et al., 2007; SONI et al., 2005). O MPB é um conservante usado por indústrias com ação antimicrobiana em cosméticos relacionados à pele e também em shampoos. São utilizados em bebidas e alimentos processados industrialmente, como gorduras e óleos, temperos, adoçantes, refrigerantes, derivados do leite e estão presentes em produtos farmacêuticos. Esta ação antimicrobiana se dá através da interrupção do transporte de substâncias para o interior da membrana celular, onde também há a interferência na ação das mitocôndrias (SONI et al., 2005).

**Figura 1 - Estrutura química do metilparabeno**



Fonte: SONI et al., 2005, p. 513-532.



## 4.2 Uso do metilparabeno e classificação como poluente emergente

Os parabenos são os compostos químicos com maior utilização na indústria de cosmética, farmacêutica e de alimentos, por serem antimicrobianos e conservantes potentes (QIAN et al., 2008). Sua ação está voltada principalmente no combate de leveduras e bolores, bactérias gram-positivas, e não se obtém efeitos significativos contra vírus (HAMAN et al., 2015).

A Resolução RDC n° 29, de 1 de junho de 2012, determina quais as substâncias e concentrações podem ser usadas de forma segura como conservantes. No Brasil, atualmente são permitidas 60 substâncias e grande parte delas são usadas associadas entre si (ANVISA, 2012).

Segundo Spadoto 2017, O Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) em conjunto com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA), classificaram os compostos com base no risco ambiental, como altamente perigosos (classe I); muito perigosos (classe II); perigosos (classe III) e os pouco perigosos (classe IV). Essa classificação está baseada em alguns critérios, como a persistência no ambiente, características físico-químicas, toxicidade em diferentes organismos e a capacidade de locomoção no ambiente (MAPA, 2013). Assim, o MPB foi classificado como Classe IV, onde se considera um composto de baixo risco ambiental (MAPA, 2013).

Por ser um composto muito usado, o MPB encontra-se entre os poluentes emergentes ou micropoluentes, por serem introduzidos de forma constante no ambiente em concentrações que variam de ng/L a µg/L (LEE et al., 2005; KASPRZYK-HORDERN et al., 2008), além de os seus derivados clorados serem considerados mais tóxicos para os organismos no meio aquático (TERASAKI et al., 2009). Segundo Galinaro et al. (2015), o MPB foi encontrado no rio Mogiguaçu, em São Paulo, com uma concentração que variava de 8µg/L a 27,5µg/L. Estudos de Terasaki et al., (2009), demonstra uma toxicidade aguda e crônica em todos os organismos aquáticos expostos ao MPB.

No ambiente terrestre, a maioria das contaminações por MPB é devido ao uso de lodo de esgoto provindos das estações de tratamento como fertilizantes em lavouras ou pelo uso de água residuais de mananciais para irrigação de plantações (DIONISIO et al., 2019). Sua forma clorada é mais perceptível nesses lodos pois o cloro tem uma grande afinidade com o grupo fenol contido no MPB e, essa interação ocorre devido ao despejo do MPB em águas provindas das estações de tratamentos por haver grandes quantidades de cloro em sua composição (YOOM et al., 2018).

#### **4.3 Teste de toxicidade em *Allium cepa* L.**

Inúmeros testes toxicológicos são utilizados para avaliar as concentrações e o tempo de exposição necessário para que os agentes tóxicos possam produzir efeitos adversos sobre os organismos (BRAGA et al., 2015). É comumente utilizado o teste *Allium cepa* L. em ensaios toxicológicos, como em estudos realizados com extratos vegetais, para avaliação dos aspectos macroscópicos como alteração da cor, formato, tamanho da raiz e ainda características microscópicas como alterações na divisão das células meristemáticas de cebola (LONGHIN, 2008).

Além de ser um ensaio com resultados rápidos e eficientes, contém outras vantagens, como o baixo custo, fácil manipulação, mantém a integridade dos cromossomos para os futuros estudos de danos ou distúrbios na divisão celular, onde se inclui a avaliação de riscos de aneuploidia (BELCAVELLO et al., 2012).

#### **4.4 Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes**

O estresse oxidativo é a produção elevada e também a retirada de moléculas com alta reatividade, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) (MORRIS et al., 2012). ERO são íons, moléculas ou átomos que, em sua composição, apresentam o oxigênio com um elétron não localizado na sua órbita externa, onde acarreta grandes instabilidades e uma reatividade alta. (CIRCU; AW, 2010). Para evitar a ação das ERO, o organismo vivo utiliza as enzimas oxidantes, como por exemplo a catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPOx) e a superóxido dismutase (SOD) (STROBEL et al., 2011).

A CAT é uma enzima que está presente em grande parte dos organismos aeróbicos, onde ajudam a célula no combate às ERO. Ela atua na transformação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água e oxigênio (SWITALA; LOEWEN, 2002). A

APX é a enzima antioxidante principal em organismos vegetais e fotossintetizantes, onde é utilizado o ácido ascórbico como o principal doador de elétrons para realizar a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  água (CAVERZAN et al., 2012). É a principal enzima no combate às ERO (FOYER; NOCTOR, 2005).

A enzima GPOx é uma importante enzima antioxidante de substâncias geradas pelos xenobióticos, dois deles são o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou peróxidos orgânicos (TEKMAN et al., 2008). Essa enzima tem sido utilizada como bioindicadora de contaminação de corpos hídricos (DANTAS, 2010). A enzima SOD faz a conversão do oxigênio danoso em peróxido de hidrogênio menos reativo, realizando a catalização da dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio. É uma enzima de importante papel na defesa antioxidante em grande parte das células que são expostas ao oxigênio, com presença em todos os organismos aeróbicos (SUN et al., 1988).

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Obtenção, cloração do MPB, preparo de soluções e definição de concentrações para análise de toxicidade**

O MPB (metil 4-hidroxibenzoato), CAS 99-76-3, foi adquirido da Sigma–Aldrich em grau analítico, assim como os outros reagentes usados nos experimentos *in vivo* e *ex vivo*.

A cloração do MPB foi realizada de acordo com Mao et al. (2016). Para obter o CIMPB, MPB foi adicionado a uma solução tamponada (PBS/20 mM) de hipoclorito de sódio a 2,5% (m/V). A mistura foi mantida por 30 minutos à temperatura ambiente (25°C) e sob agitação magnética constante. A cloração foi extinta pela adição de solução de tiosulfato de sódio 1:3 0,1 M. A solução foi armazenada sob refrigeração a 10°C por 24 horas e filtrada. O sólido obtido foi seco à temperatura ambiente e armazenado a 10°C.

Para obter o DiCIMPB, o mesmo procedimento foi realizado para obter o CIMPB, porém, uma solução saturada de cloro orgânico (dicloroisocianurato de sódio 30%) em PBS (20 mM) foi utilizada como reagente de cloração. A confirmação do teor de cloração do MPB foi obtida por crioscopia utilizando PEG 6000 como solvente e ponto de fusão PF 1500 Farma.

As concentrações de MPB foram preparadas em água destilada. As concentrações de CIMPB e DiCIMPB foram preparadas em meio aquoso usando a mesma concentração de Tween 80 como surfactante.

As concentrações de MPB, CIMPB e DiCIMPB avaliadas em *A. cepa* neste estudo - 5, 10, 50 e 100 µg/L - foram estabelecidas com base em estudos de quantificação de MPB em lodo de esgoto.

## 5.2 Medição de raízes

Os bulbos foram expostos por 120h a soluções com concentrações crescentes dos compostos de teste. A partir daí, o comprimento de todo o feixe radicular dos conjuntos controle e experimental foi medido conforme descrito por Fiskesjo

A fitotoxicidade foi avaliada com base no comprimento da raiz. Dez raízes do feixe radicular de cada bulbo foram medidas com um paquímetro digital para determinar o comprimento das raízes em centímetros, onde foram somadas e divididas pelo número de tratamento (ICR) (Equação 1). Foram também considerados outros sinais de toxicidade, tais como alterações na consistência e cor das raízes, presença de tumores, raízes em formas de gancho e raízes torcidas.

$$ICM = \frac{\text{Soma dos comprimentos das raízes dos feixes radiculares}}{3} \quad (1)$$

## 5.3 Análise de citotoxicidade e genotoxicidade em *Allium cepa* L.

O ensaio de toxicidade em *A. cepa* foi desenvolvido conforme protocolo de Fiskesjo (1985), com algumas modificações. Para avaliação das concentrações dos poluentes metilparabeno e metilparabeno clorado, bulbos de cebola (variedade beta cristal, obtidos de horta orgânica que não utiliza agrotóxicos) foram colocados em beckeres com água destilada para o controle e para as soluções de metilparabeno e metilparabeno mono e diclorado, com reposições de produtos constantes, até a obtenção de raízes. Para a análise de cada tratamento (grupo controle e desenvolvimento de MPB, CIMPB e DiCIMPB), estabeleceu-se um grupo experimental com três bulbos de cebola.

Após as 120h de exposição no produto, as raízes foram coletadas e colocadas em tubos de ensaio com solução fixadora 3: 1 de Carnoy (etanol: ácido acético) por até 24 horas. Passadas as 24 horas, as raízes foram lavadas 5 vezes em água destilada e, em seguida da lavagem, as raízes foram submetidas a uma solução de 3: 1 de água destilada e ácido clorídrico (HCl) por 15 minutos. Após os 15 minutos, as raízes foram novamente lavadas 5 vezes em água destilada e levadas para a preparação das lâminas.

As lâminas de vidro foram preparadas de acordo com o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002) e analisadas em microscópio óptico com lente objetiva de 40x. Para cada bulbo foram analisadas 1.000 células, com um total de 3.000 células para cada grupo controle e cada concentração das soluções de metilparabeno, com um total 12.000 células analisadas. As células foram contadas em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, e o índice mitótico (IM) foi calculado, de acordo com a Equação 2:

$$IM: \frac{\text{Número total de células em divisão}}{\text{Número total de células analisadas}} \times 100 \quad (2)$$

#### **5.4 Análise de estresse oxidativo em *Allium cepa* L.**

Para as análises enzimáticas em *A. cepa* utilizou-se raízes obtidas em bulbos e considerou-se o mesmo número de repetições para cada tratamento, conforme o teste citogenético. As enzimas avaliadas foram a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX), a guaiacol peroxidase (GOPX) e a superóxido dismutase (SOD).

##### **5.4.1 Preparo das amostras**

Para cada amostra, foi macerado a frio 50 mg de raízes em solução de 1 mL de HCl a 0,38% e 1 mL de ácido diethylenetriamino-penta acético (DTPA) a 5 mM. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 30 minutos. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi coletada e mantida congelada a -26 °C até a realização das análises.

## 5.4.2 Análise enzimática

### 5.4.2.1 Atividade enzimática da catalase (CAT)

Do extrato enzimático, foi utilizado 200  $\mu\text{L}$  em solução de 2 mL de tampão fosfato de potássio (0,5 mM, pH 7,5), e 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,0mM) adicionado no momento da leitura por espectrofotometria a 240 nm, por um minuto. A atividade foi determinada de acordo com a decomposição do peróxido de hidrogênio e calculada pelo coeficiente de extinção de  $2,8 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ , com resultados expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína, método de Kraus et al. (1995) com contribuições de Azevedo et al. (1998).

### 5.4.2.2 Atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX)

Foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático em 2 mL de solução tampão de fosfato de sódio (25 mM, pH 7,0, com 0,1 mM de EDTA), 0,5 mL de ascorbato (0,25 mM) e acrescentado no momento da leitura 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,0mM). A atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria durante um minuto, com intervalo de dois segundos a 290 nm, e calculado com o coeficiente de extinção de  $2,8 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ , com resultados em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína (ZHU et al., 2004).

### 5.4.2.3 Atividade enzimática de guaiacol peroxidase (GOPX)

Em solução tampão de 250  $\mu\text{L}$  de fosfato-citrato (fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M, com pH 5,0) adicionou-se 200 $\mu\text{L}$  de extrato enzimático e 25  $\mu\text{L}$  de guaiacol (0,5%), misturados em vórtex com 25  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). A solução foi levada à estufa a 30°C por 15 minutos, adicionados 25  $\mu\text{L}$  de solução de meta bissulfito de sódio a 2%, e novamente agitado em vórtex, seguido por repouso de 10 minutos, determinado em espectrofotômetro a 450 nm, por um minuto com intervalo de dois segundos. O coeficiente de extinção utilizado para os cálculos foi de 26,6M (MATSUNO e URITANI, 1972). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína.

#### 5.4.2.4 Atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD)

Em solução tampão de 250 µL de fosfato de potássio, 200 µL de NBT, 250 µL de EDTA, 200µL de metionina e 200µL de riboflavina para o controle e para o branco da amostra e a amostra, adicionou-se 200µL de extrato enzimático e foi levada para centrifugação por 30 minutos a 14.000 rpm. Para cada amostra foram usados dois tubos de ensaio identificados como amostra e o outro como branco da amostra e um terceiro tubo como controle. O procedimento foi realizado no escuro para não haver perda de atividade enzimática. Antes da pipetagem, os tubos foram cobertos com papel kraft e, ao serem colocados sob a ação da luz, retirou-se o papel dos tubos controle e amostra e foram expostas por 10 minutos sob a ação da luz. A atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria durante um minuto, com intervalo de dois segundos a 560 nm. Os resultados foram expressos em µmol/min/µg de proteína.

### 5.5 Análise estatística

Os dados obtidos nos testes de alongamento de raízes, citotoxicidade, genotoxicidade foram analisados por ANOVA seguido do teste Kruskal-Wallis H com Dunn pós teste ( $p < 0,05$ ) e o estresse oxidativo foi analisado por Kruskal-Wallis H ( $p < 0,05$ ) através do *software* BioEstat® versão 5.3.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na Tabela 1, o MPB nas três concentrações mais baixas e o CIMPB e DiCIMPB nas concentrações 5 e 10 µg/L não inibiram o crescimento das raízes. A concentração de 5 µg/L do MPB causou um estímulo significativo ao alongamento radicular. Diferentemente, a concentração de 100 µg/L do MPB e as concentrações de 50 e 100 µg/L do composto clorado causaram uma redução significativa do crescimento radicular quando comparadas com Co, revelando-se fitotóxicas. Os três compostos avaliados não provocaram outras alterações macroscópicas nas raízes.

**Tabela 1 - Índice de crescimento radicular e índice mitótico dos meristemas radiculares dos bulbos *Allium cepa* L. expostos a diferentes concentrações de metilparabeno, cloro-metilparabeno e dicloro-metilparabeno durante 120 horas.**

Compostos	TR	ICR/DP	IM/DP
	Co	100.00 ±0.50	100.00 ± 0.85
MPB	5 µg/L	147.00 ± 0.85*	90.70 ±0.97
	10 µg/L	116.70 ± 0.95	88.45 ±0.80
	50 µg/L	86.37 ± 0.72	70.25 ±0.79
	100 µg/L	54.85 ± 0.75*	55.90 ± 0.90*
CIMPB	5 µg/L	105.75 ± 0.98	108.50 ±0.78
	10 µg/L	85.75 ± 0.93	89.45 ± 0.94
	50 µg/L	53.33 ± 0.95*	64.50 ± 0.64*
	100 µg/L	40.30 ±1.00*	50.15 ± 0.55*
DiCIMPB	5 µg/L	104.41 ± 0.69	93.50 ± 0.97
	10 µg/L	76.48 ± 0.55	88.10 ± 1.00
	50 µg/L	54.63 ± 0.76	65.35 ± 0.95*
	100 µg/L	42.65 ± 0.85*	50.45 ± 1.15*

**MPB: metilparabeno; CIMPB: cloro-metilparabeno; DiCIMPB: dicloro-metilparabeno; TR: Tratamento; ICR: Índice de crescimento relativo; IM: Índice mitótico, DP: Desvio padrão, Co: Controle (água destilada). Os dados são expressos em percentagem dos valores de controle. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre concentrações e controle, de acordo com Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn ( $p \leq 0.05$ ).**

Em um estudo de avaliação da fitotoxicidade realizado por Kim et al. (2018), a germinação das sementes de *Oriza sativa* L. e *Vigna radiata* L. foi significativamente inibida quando expostas a concentrações de 100 a 400 e 200 a 400 mg MPB por kg de solo, respectivamente. Além disso, as plantas resultantes de sementes germinadas tiveram uma redução drástica na área foliar quando comparadas com o grupo controle, onde se observou elevada fitotoxicidade do MPB para ambas as espécies. O alongamento radicular não foi considerado neste estudo.

Na Tabela 1, ao contrário das concentrações mais baixas, o MPB em 100 µg/L, e o CIMPB e DiCIMPB em 50 e 100 µg/L reduziram significativamente a proliferação das células meristemáticas quando comparadas com o controle, onde a citotoxicidade foi corroborada. A interrupção da mitose é geralmente devida à ação de agentes citotóxicos com potencial aneugênico e/ou clastogênico, onde a divisão



celular reduzida caracteriza a parada do ciclo celular (Leme e Marin-Morales 2009). Esta pausa deve-se geralmente à inibição da síntese de DNA, que retarda a entrada das células na mitose e as permitem repararem deficiências no material genético a fim de se preservarem da morte (PRAJITHA e THOPPIL 2016; BATISTA et al., 2022).

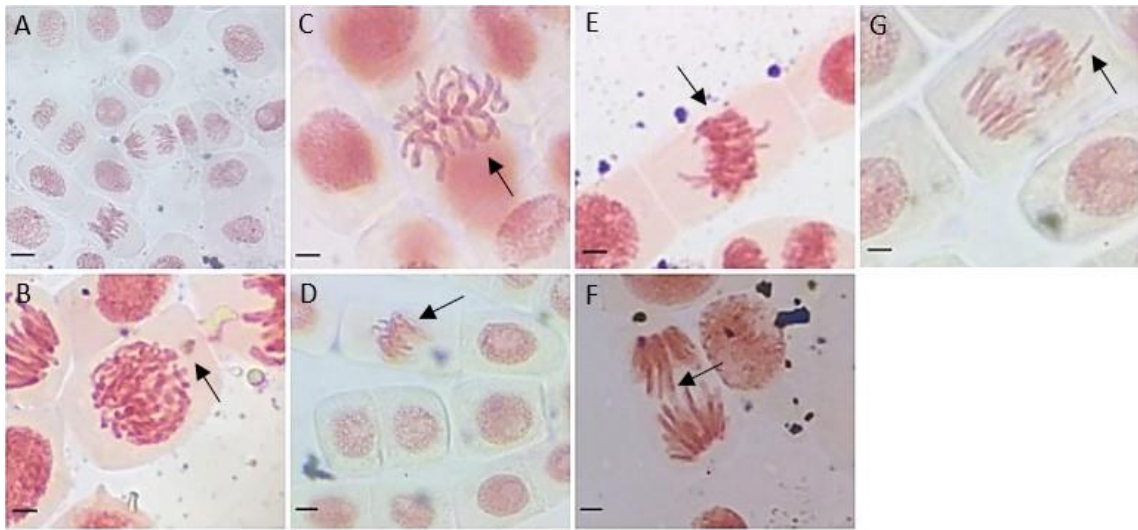
De acordo com Rank e Nielsen (1997), o índice mitótico não deve ser inferior a 50% do valor de controle para se obter uma análise de confiabilidade das alterações celulares. Os valores dos índices mitóticos observados para a concentração 100 µg/L de MPB e as concentrações 50 e 100 µg/L de CIMPB e DiCIMPB atenderam a este critério (Tabela 1). Concomitantemente a redução da divisão celular (Tabela 1), os dois compostos nestas concentrações induziram alterações celulares nos meristemas radiculares em frequência significativa, mostrando-se genotóxicos. As alterações celulares observadas foram micronúcleos, desarranjos cromossômicos em metáfase, metáfase e anáfase pegajosas, ponte e perda cromossômica em anáfase (Figura 2).

**Tabela 2 - Número, tipos e índices de alterações celulares nos meristemas radiculares dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos a diferentes concentrações de metilparabeno, cloro-metilparabeno e dicloro-metilparabeno, durante 120 horas.**

TR	Conc. (µg/L)	Número e tipos de mudanças celulares				IAC±DP (%)
		Micronúcleo	Desarranjo em metáfase	Pegajosos	Ponte/perda cromossômica anáfase	
Co		02	n.d.	n.d.	n.d.	0.20 ± 0.78
MPB	5	01	n.d.	n.d.	02	0.10 ± 0.90
	10	02	n.d.	n.d.	00	0.20 ± 0.99
	50	00	n.d.	09	n.d.	0.90 ± 1.32
	100	18	09	48	19	9.40 ± 1.21*
CIMPB	5	01	n.d.	01	01	0.30 ± 0.82
	10	01	n.d.	04	01	0.60 ± 0.94
	50	11	24	41	18	12.00 ± 1.20*
	100	19	26	60	25	13.00 ± 1.35*
DiCIMPB	5	03	n.d.	02	n.d.	0.50 ± 1.23
	10	01	02	03	n.d.	0.60 ± 0.97
	50	17	17	67	37	13.80 ± 1.23*
	100	22	20	62	43	14.70 ± 1.29*

**MPB: metilparabeno; CIMPB: cloro-metilparabeno; DiCIMPB: dicloro-metilparabeno; TR: Tratamento; Co: controle negativo, Conc: concentração; IAC: índice de alteração celular, DP: desvio padrão, n.d.: não detectado. \*Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre concentrações e controle, de acordo com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (p≤0.05).**

**Figura 2 - Alterações celulares observadas em meristema de raízes de *Allium cepa* L. expostos à concentração 100 µg/L de metilparabeno e as concentrações 50 e 100 µg/L de cloro-**



**Metilparabeno e dicloro-metilparabeno, por 120 horas.**

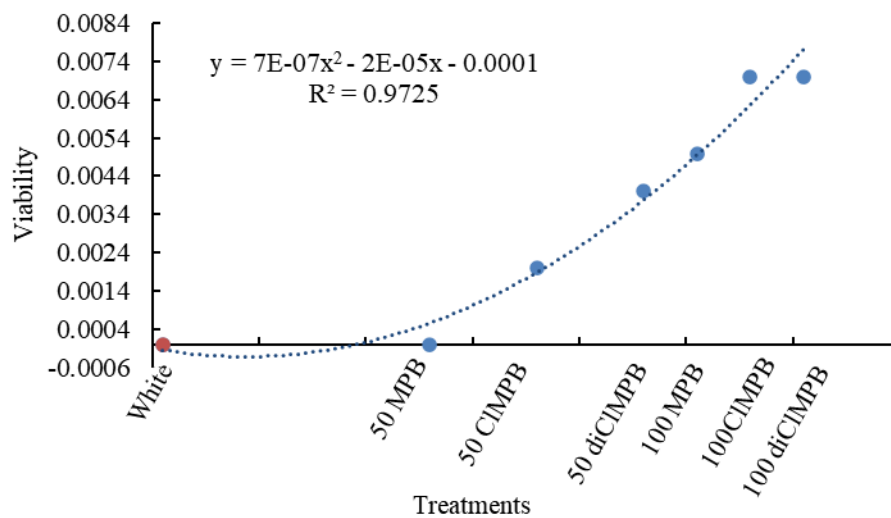
**A) células normais em interfase e divisão celular, B) micronúcleo, C) desarranjo cromossômico em metáfase, D) metáfase pegajosa, E) anáfase pegajosa, F) ponte de anáfase e G) perda cromossômica em anáfase. Células observadas sob um microscópio óptico com uma ampliação de 400x. Barra: 10 µm.**

Desarranjo cromossômico em metáfase (Figura 2 C), bem como as pontes e a perda cromossômica em anáfase (Figura 2 F e G) indicam perturbações no fuso mitótico que levam à perda de material genético e formação de micronúcleos (Figura 2 B) (Leme e Marin-Morales 2009). Metáfases e anáfase pegajosas (Figura 2 D e E) ocorrem em razão do dobramento inadequado das fibras cromossômicas e da despolimerização do DNA devido à desnaturação parcial das proteínas nucleares. (PING et al. 2012; KHANA e SHARMA, 2013). Cromossomos pegajosos indicam efeito altamente tóxico dos compostos a que os tecidos meristemáticos foram expostos, e são irreversíveis, culminando com a morte da célula (FISKESJO, 1985). Além disso, a frequência expressiva de pontes em anáfase representa um efeito clastogênico, enquanto a frequência significativa de desarranjos cromossômicos, viscosidades e perdas cromossômicas caracterizam um efeito aneugênico, do MPB 100 µg/L e do CIMPB e DiCIMPB 50 e 100 µg/L às células meristemáticas de raiz de *A. cepa*.

A fim de confirmar o potencial em causar a morte celular, a integridade celular dos meristemas expostos a concentrações 50 e 100 µg/L de MPB, CIMPB e DiCIMPB foi avaliada pelo método de coloração azul de Evans. Esta coloração baseia-se na integridade física da membrana, onde as células viáveis não absorvem o corante. Na Figura 3, a morte celular nos meristemas iniciou-se na concentração 50 µg/L do CIMPB, aumentando nas concentrações 100 µg/L do MPB e 50µg/L DiCIMPB, e

acentuando-se para concentrações 100 µg/L do MPB e do DiCIMPB. O resultado de viabilidade celular valida os resultados de fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade, e demonstra que a MPB a 100 µg/L e o CIMPB e o DiCIMPB a 50 e 100 µg/L, além de reduzir a proliferação celular, causou a morte celular nos tecidos meristemáticos das raízes.

**Figura 3 - Efeito do metilparabeno (MPB), cloro-metilparabeno (CIMPB) e dicloro-metilparabeno (DiCIMPB)**

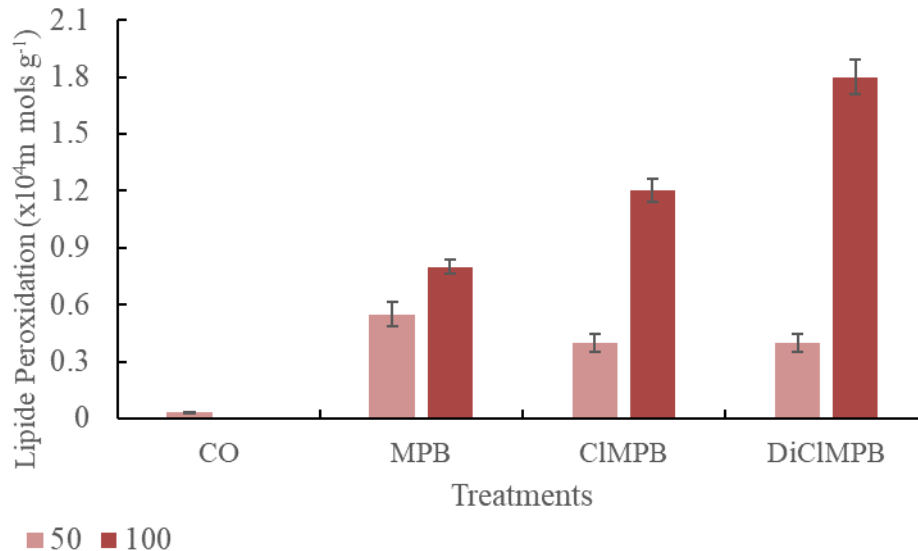


**Efeitos em concentrações de 50 e 100 µg/L, na viabilidade celular em meristemas radiculares de bolbos de *Allium cepa* L. expostos a estes compostos durante 120 horas.**

Kim et al. (2020) obtiveram resultados com MPB que corroboram os distúrbios celulares observados nos meristemas radiculares, onde se evidencia a toxicidade celular relevante deste composto. Ao avaliar a toxicidade da MPB em concentrações de 1 a 10 mM para a cultura de células da placenta humana (BeWo), com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos da MPB no feto, verificaram o potencial citotóxico deste composto, uma vez que causou uma redução na divisão celular, induzindo as células a permanecerem em G0. Perturbações celulares significativas observadas em meristemas tratados com MPB a 100 µg/L e CIMPB e o DiCIMPB a 50 e 100 µg/L podem ser explicadas pela quantidade de ERO's (Espécies Reativas de Oxigênio) produzida e pelo comportamento das enzimas anti ERO's SOD, CAT, APX e GOPX,

nestes tecidos. O MPB, o CIMPB e o DiCIMPB em concentrações de 50 e 100 µg/L causaram peroxidação lipídica nos tecidos do meristema, com ênfase na concentração de 100 µg/L dos compostos clorados.

**Figura 4 - Peroxidação lipídica em meristemas radiculares de *Allium cepa* L.**



**Raízes expostas ao controle (CO), metilparabeno (MPB), cloro-metilparabeno (CIMPB) e dicloro-metilparabeno (DiCIMPB) em concentrações de 50 e 100 µg/L.**

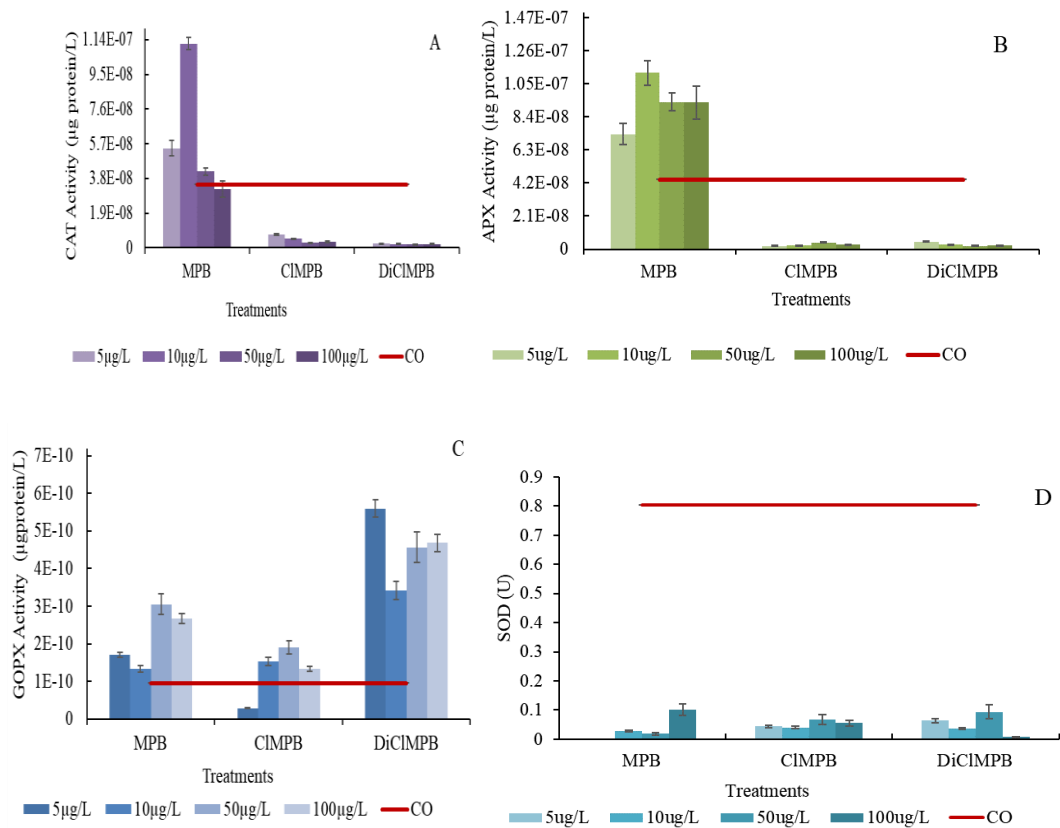
A peroxidação lipídica ocorre pela formação de ERO's, formados em organelas de alto metabolismo, tais como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas. Entre as ERO's, o radical OH<sup>•</sup> é o mais oxidante e reage com todas as moléculas biológicas (POLIDOROS et al. 2004). O excesso de OH<sup>•</sup> causa perturbações celulares, tais como paragem do ciclo celular através da inibição da duplicação do DNA, perturbações no fuso mitótico e rupturas cromossômicas, bem como desnaturação de proteínas e remoção de átomos de hidrogénio de ácidos graxos poli-insaturados (Sing et al. 2015).

As enzimas CAT, APX e SOD são as mais importantes no sistema de proteção das plantas, responsáveis, entre outras coisas, pela homeostase do ciclo celular. A SOD é a enzima mais importante na proteção celular dos organismos, com atuação diretamente sobre o radical superóxido <sup>-</sup>O<sub>2</sub>, com a manutenção do equilíbrio da produção de energia nas mitocôndrias, peroxissomas e cloroplastos.

De acordo com a Figura 5, o elevado potencial agressivo da MPB ao metabolismo celular é evidenciado pela atividade enzimática da concentração 50 µg/L. Embora nesta concentração não tenha ocorrido perturbações celulares significativas, o desempenho da CAT foi alterado (Figura 5 A). A enzima APX, por outro lado, permaneceu ativa nos tecidos sob exposição a todas as concentrações de MPB (Figura 5 B). A concentração de 100 µg/L de MPB inibiu a atividade de CAT, APX e SOD (Figura 5), devido à acumulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na célula, o que levou a um excesso de OH<sup>-</sup> e promoveu a fitotoxicidade e a toxicidade celular nas raízes (Tabelas 1 e 2, e Figura 2). A SOD foi ineficiente na proteção das células contra o MPB, com forte inibição em todas as concentrações (Figura 5 D). O potencial nocivo do MPB é aumentado quando combinado com cloro, onde se induz à inativação das enzimas CAT, APX e SOD, mesmo nas concentrações mais baixas de CIMPB e no DiCIMPB (Figura 5 A, B e C).

Contudo, verificou-se que a enzima GOPX esteve ativa no meristema exposto a concentrações de MPB e seus derivados clorados, e ainda mais ativa quanto mais fitotóxicos, citotóxicos e genotóxicos foram estes compostos (Figura 5 C). Observou-se peroxidação lipídica para as concentrações 100 µg/L de MPB, e 50 e 100 µg/L de CIMPB e DiCIMPB (Figura 4), que foi responsável pelas desordens celulares e a morte celular nos meristemas, e a GOPX foi mais ativa nos tecidos expostos a estas concentrações (Figura 5 C). A ativação de GPOX está associada à ocorrência de danos na membrana plasmática, tais como os observados nos meristemas radiculares, especialmente quando o OH<sup>-</sup> está em excesso.

**Figura 5 - Atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e superóxido dismutase (SOD) em raízes de *Allium cepa* L.**



**Bulbos expostos a diferentes concentrações de metilparabeno (MPB), cloro-metilparabeno (CIMPB) e dicloro-metilparabeno (DiCIMPB), durante 120 horas.**

## 7 CONCLUSÃO

O MPB a partir de 100  $\mu\text{g/L}$  e seus derivados clorados a partir de 50  $\mu\text{g/L}$  foram citogenotóxicos, causando peroxidação lipídica e estresse oxidativo em raízes de *A. cepa*, sugerindo serem um risco ambiental para as plantas.

Se faz necessário novos estudos com outras concentrações e com outros organismos para a obtenção de um catálogo maior de informações sobre o uso e os efeitos do MPB e seus derivados clorados no ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. Associação Brasileira da indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. 2016. **Panorama do Setor 2016**. Publicado em 22/06/2016. Disponível em: <https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/PANORAMA-DO-SETOR-2016.pdf> Acesso em 23/05/2022.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012<sup>a</sup>. **Resolução – RDC nº 29 de 1 de junho de 2012: Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfume**. Diário Oficial da União 04 jun 2012. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/37577013/dou-secao-1-04-06-2012-pg-81>
- BATISTA, D.; LUZ, J.D.L.; SENES-LOPES, T.F.; ARAÚJO, O.G.; SILVA, S.S.; ALMEIDA, M.G. (2022) *Licania rigida* leaf extract: Protective effect on oxidative stress, associated with cytotoxic, mutagenic and preclinical aspects. **J Toxicol Environ Health Part A** 85:276-290.  
<https://doi.org.10.1080/15287394.2021.2002744>.
- BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. D. C. P. **Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de Zornia diphylla, uma planta medicinal**. Natureza on line, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.
- BLEDZKA, D.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. **Parabens. From environmental studies to human health**. Environment international 67, 27-42, 2014.
- BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. **Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador**. Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science, v. 10, n. 1, p. 130- 140, 2015.
- CAVERZAN, A., PASSAIA, G., ROSA, S. B., RIBEIRO, C. W., LAZZAROTTO, F., & MARGIS-PINHEIRO, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology**, 35(4 suppl 1), 1011–1019. doi:10.1590/s1415-
- CIRCU M. L., AW T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, ad apoptosis. **Free Radic Biology & Medicine**. Nova Iorque, v. 48, n. 6, p-749-762, 2010.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31(7), p. 1820-1830, 2008.
- DANTAS, R. F. **Glutationa peroxidase e estresse oxidante em pacu, *Piaractus mesopotamicus*** (Holmberg, 1887) Rio de Janeiro, UERJ, Doutorado (2010).

DIONISIO, D.; MOTHEO, A.; SÁEZ, C.; RODRIGO, M.A. (2019) Effect of the electrolyte on the electrolysis and photoelectrolysis of synthetic methyl paraben polluted wastewater. **Separat Purificat Technol** 208:201-207.  
<https://doi.org/10.1016/j.seppu.2018.03.009>

ELDER, R.L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. **J. Am. Coll of Toxicol.**, v.3, p.147-209, 1984.

FERNANDES, T.C.C.; VENTURA, B.C.; MARIN-MORALES, M.A. O uso do teste de micronúcleo na detecção de genotoxicidade do herbicida Trifluralina, utilizando células meristemáticas de *Allium cepa* L. In: **Relação de trabalhos do Congresso Nacional de Genética**, 48, 2002.

FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985 Mar;102(1):99-112.

FOYER CH, NOCTOR G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-75.

GALINARO, C.A.; PEREIRA, F.M.; VIEIRA, E.M. Determination of Parabens in Surface Water from Mogi Guaçu River (São Paulo, Brazil) Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Low Density Solvent and LC-DAD. **J. Brazilian Chem. Soc.**, v.26(II), p.1-9,2015.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; QUINTANA, J.B.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R., 2011. Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate mass liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). **Water Res.** 45, 6770–6780.

GORGA, M.; INSA, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in Waters and sediments of Iberian river. **Sci. Total Environ.**, p.503-504, v.69-86, 2015.

HAMAN, C., DAUCHY, X., ROSIN, C., MUNOZ, J. F. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review. **Water Research**, v. 68, p. 1-11, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.018>.

HAMAN, C.; DAUCHY, X.; ROSIN, C.; MUNOZ, J.F. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. **Water Res.**, v.68 (1), p.1-11, 2015.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M.; GUWY, A.J. 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, v.42, p.3498-3518, 2008.

KIM, D.; CUI, R.; MOON, J.; KWAK, J.I.; KIM, S.W.; KIM, D.; AN, Y.J. (2018) Estimation of the soil hazardous concentration of methylparaben using a species sensitivity approach. **Environ Pollut** 242:1002-1009.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.053>.



KLEYWEGT, S., SMYTH, S-A., PARROTT, J., SCHAEFER, K., LAGACÉ, E., PAYNE, M., TOPP, E., BECK, A., MCLAUGHLIN, A. AND K. OSTAPYK (eds). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Canadian Environment: Research and Policy Directions. **Workshop Proceedings**; Queen's Landing Inn, Niagara-on-the-Lake, Ontario, Canada. Environment Canada, 2007.

KUNZ, A. et al. *Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis*. **Quím. Nova**, São Paulo, v.25, n.1, 2002.

LEE, H.B.; PEART, T.E.; SVOBODA, M.L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1094, p.122-129, 2005.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. (2009) *Allium cepa* L. test in environmental monitoring: a review on its application. *Mut Res/Rer Mut Res* 682:71-81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>.

LONGHIN, S. R.; **Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos**. Tese (Programa de Doutorado em Química); Instituto de Química da Universidade de Brasília. Brasília, 2008.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. **Instrução normativa Conjunta MAPA, Anvisa e IBAMA sobre alteração de formulação de agrotóxicos e afins, No – 1, de 18 de abril**. ISSN 1677-704, 2013.

MORRIS, A. A. et al. Differences in systemic oxidative stress based on race and the metabolic syndrome: the morehouse and emory team up to eliminate health disparities (meta-health) study. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**. New Rochelle, v. 10, n. 4, p. 252-259, 2012.

OLIVEIRA, M. A.; LIMA, E. M. Identificação e Quantificação de Parabenos em Matérias-Primas Farmacêuticas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Ln: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG – CONPEEX, 3,2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do III Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação/ III CONPEEX [CD-ROM]**, Goiânia: UFG, 2006.

PARVAN, L. G.; LEITE T. G.; FREITAS T. B.; PEDROSA, P. A. A.; CALIXTO, J. S.; AGOSTINHO, L. A. Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Rev Pan Amaz Saude**. 2020;11:e202000544. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-6223202000544>.

PETRUCI, J. F. S.; CARDOSO, A. A.; PEREIRA, E. A. **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de benzoato, sorbato, metil e propilparabenos em produtos alimentícios utilizando a eletroforese capilar**. *Quim. Nova*, v. 34, n. 7, 2011.

PING, K.Y.; DARAH, I.; YUSUF, U.K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. (2012) **Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay**. *Molecules* 17:7782-7791. <https://doi.org/10.3390/molecules17077782>.

Prajitha V, Thoppil JE (2016) **Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay.** S Afr J Bot 102:18-25. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.06.018>.

QIAN, L.; GUAN, Y.; XIAO, H. Preparation and characterization of inclusion complexes of a cationic  $\beta$ cyclodextrin polymer with butylparaben or Triclosan. *Pharmaceutical Nanotechnology. International Journal of Pharmaceutics*, v. 357, n. 1/2, p. 244-251, jun. 2008.

RANK, J.; NIELSEN, M. (1997) *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide and ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* 390:121-127. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00008-6](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00008-6).

SANTANA, G. M.; DEUS, M. S. M.; SOUSA, J. M. C.; FERREIRA, P. M. P.; FERNANDES, H. B.; PERON, A. P. An  $\Theta$  mito  $\Theta$  c and an  $\Theta$  mutagenic ac  $\Theta$  on of the *Hymenaea s  $\Theta$  gonocarpa* bark on dividing cells. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, SP, v. 76, n. 2, p. 520-525, abr./jun. 2016. DOI: 10.1590/1519-6984.23014.

SILVA, Daniele Caetano da. **Análise de parabenos em amostras de água de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e efeitos em biomarcadores bioquímicos.** 2015. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. Doi:10.11606/T.75.2015.tde-09092015-145934. Acesso em: 12-10-2022.

SONI, M.G.; BURDOCK, G.A.; TAYLOR, S.L.; GREENBERG, N.A. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food Chemistry Toxicology*, v.39,p.513-532, 2005.

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

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

STROBEL, N. A. et al. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *International Journal of Cardiology*. Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 191- 201, 2011.

SUN, Y. I.; OBERLEY, Larry W.; LI, Ying. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.

SWITALA, J.; LOEWEN, P.C. **Diversity of properties among catalases.** Arch. Biochem. Biophys. 2002 401:145–154.

Tahan GP, Santos NKS, Martins ACAI. Determination of parabens in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Correlation with lipstick use. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016 Aug; 79: 42-48.

TEKMAN, B. E OZDEMIR, H., et al. **Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and Inhibition effects of metal ions on enzyme activity.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 148:117 – 121, 2008.

TERASAKI, M.; MAKINO, M.; TATARAZAKO, N., 2009. Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays. *J. Appl. Toxicol.* 29, 242– 247.

VEDANA, J.; ALVES, T.; BEAUMORD, A. (2019). Quem emergirá? o País ou os contaminantes: um estudo sobre a presença de parabenos em ambientes lacustres costeiros. *Metodologias E Aprendizado*, 2, 63–71.  
<https://doi.org/10.21166/metapre.v2i0.1319>.

WADE, A.; WELLER, P. J. Eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd ed.; **American Pharmaceutical Association**: Washington, DC, 1994; p.49-51, 191-193,310-313, 411-414.

YOOM, H.; SHIN, J.; RA, J.; SON, H.; RYU, D.; KIM, C.; LEE, Y. (2018) Transformation of methylparaben during water chlorination: effects of bromide and dissolved organic matter on reaction kinetics and transformation pathways. *Sci Total Environ.* 634:677-686. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.330>

ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2ª Edição, São Carlos: Editora Rima, 486 p, 2008.