

DETERMINACIÓN VOLTAMÉTRICA DE METILPARABENO EN PRODUCTOS COSMÉTICOS POLVOS COMPACTOS

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF METHYLPARABEN IN COSMETIC PRODUCTS COMPACT POWDERS

Vivas M. Rossi G., Ortiz R. Reynaldo L*

Laboratorio de Electroquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad de los Andes, Mérida. Edo. Mérida- Venezuela
reynaldo@ula.ve

Recibido: 05-06-19

Aceptado: 29-07-19

Resumen

Se desarrolló una metodología para la determinación electroquímica de metilparabeno en formulaciones cosméticas de polvos compactos, mediante la técnica de Voltametría de pulso diferencial, utilizando como electrodo de trabajo un disco de carbón vítreo de 1cm^2 de área geométrica y buffer fosfato $0,2\text{ M}$ ($\text{pH } 7$) como electrólito soporte. Se trabajó con tres formulaciones cosméticas de polvos compactos (a, b y c).

Se estudiaron las variables: velocidad de barrido, período de estabilidad, reproducibilidad e influencia de la concentración en la intensidad de picos anódicos a través de la técnica de Voltametría cíclica. Para la oxidación del metilparabeno, se observó un proceso de oxidación irreversible controlado por difusión, en el intervalo de concentración 1×10^{-4} - $1 \times 10^{-3}\text{ M}$; la sensibilidad fue $12,63 \times 10^{-3}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, el límite de detección $4,04 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y el límite de cuantificación $1,35 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Los resultados del análisis fueron correlacionados estadísticamente y por estudios de recuperación de cada uno de los polvos compactos obteniéndose $89,8\% \pm 0,8$; $76,0\% \pm 4,5$; $69,2\% \pm 3,1$ respectivamente. El método voltamétrico fue fácil de implementar, de bajo costo y preciso para la determinación del metilparabeno en productos cosméticos.

Palabras clave: Metilparabeno, Voltametría, Cosméticos, Recuperación analítica

Abstract

A methodology for the electrochemical determination of methylparaben was developed in cosmetic formulations of powder compacts, using the technique of voltammetry of pulse differential, using as a working electrode a glassy carbon plate (1 cm^2 geometric area) and buffer phosphate 0.2 M ($\text{pH } 7$) as electrolyte support. Three cosmetic formulations (a, b and c) of compact powders were evaluated. The variables studied were: scan speed, stability, reproducibility, and influence of the concentration upon the intensity of anodic peaks through the technique of cyclic voltammetry. For the oxidation of the methyl paraben, was an irreversible oxidation process controlled by diffusion, in the range of 1×10^{-4} concentration - $1 \times 10^{-3}\text{ M}$; the sensitivity was $12,63 \times 10^{-3}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, the limit of detection $4,04 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and the limit of quantification $1,35 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The results of the analysis were statistically correlated and, by studies of recovery of each of the compact powders, obtaining $89.8\% \pm 0,8$; $76,0\% \pm 4,5$; $69.2\% \pm 3,1$ respectively. The voltammetric method was easy to implement and low-cost, allowing an accurate determination of the methyl paraben in cosmetic products.

Keywords: Methylparaben, Voltammetry, Cosmetics, Analytical recovery.

Dr Reynaldo Ortiz: Dr en Electroquímica, Licenciado en Química (Universidad De Los Andes Mérida-Venezuela). Miembro del personal docente y de investigación de la Facultad de Ciencias.ULA e-mail: reynaldo@ula.ve

Introducción.

Para proponer conservantes sustitutivos del ácido salicílico y ácido benzoico, ya que ambos presentaban el inconveniente de ser eficaces únicamente a intervalos de pH altamente ácidos, Theodor Sabalitschka sintetizó en la década de 1920 diversos ésteres alquilo y arilo del ácido p-hidroxibenzoico, denominados parabenos, y los propuso como conservantes de alimentos y fármacos. Actualmente, se usan sobre todo en la conservación de productos farmacéuticos y preparaciones cosméticas, se ha reportado su uso en más de 13.200 formulaciones, campos en los cuales pueden explotarse las principales ventajas de estos productos; es decir, eficacia continuada en un intervalo de pH neutro a débilmente ácido ^[1].

Los parabenos, son ésteres de ácido 4-hidroxibenzoico, el grupo éster se localiza en la posición C-4 del ácido. Los ésteres más empleados son: metil-, etil-, propil-, butil-, y bencilparabeno (Figura 1) ^[2]. Son polvos cristalinos sin olor ni sabor, de naturaleza higroscópica, estables en el aire, eficaces en un amplio espectro de pH, de bajo costo; sus diferentes estructuras químicas permiten que cada parabeno tenga propiedades fisicoquímicas distintas, por ejemplo el aumento en la longitud de cadena de alquilo aumenta su resistencia a la hidrólisis.

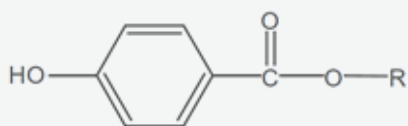


Figura 1. Estructura química general del Parabeno (donde R= grupo alquilo (CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , C_4H_9))

La reactividad REDOX de los compuestos fenólicos (ArOH), sigue al menos dos mecanismos que pueden ocurrir en paralelo, como se aprecia en la (Figura 2), una transferencia de átomo de hidrógeno de un solo paso, y una transferencia de un solo electrón y la transferencia de protones. ^[3,4]

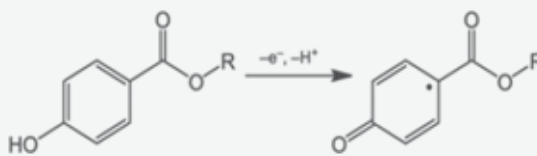


Figura 2. Mecanismo electroquímico de oxidación de los parabenos

Sin embargo, el uso de los conservantes en cosmética se ha discutido en todo el mundo, el uso de los parabenos a pesar de sus excelentes propiedades fisicoquímicas se encuentra en cuestionamiento debido a que tienen actividad estrogénica, pueden unirse a receptores estrógenos procedentes de distintas fuentes, algunos estudios realizados revelan la presencia de los mismos en tumores en la mama humana. Según la directiva de la Comunidad Económica Europea (CEE) ^[5], el uso de éste como conservante en productos cosméticos está permitido hasta una concentración máxima de 0,4% (m/m) y 0,8% (m/m) para mezclas de ésteres expresados como ácido p-hidroxibenzoico. Existen diferentes métodos para la determinación de Metilparabeno (MP) entre ellos los más comunes son: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ^[3,4,6-8], cromatografía líquida de ultra desempeño (UPLC) ^[9,10], cromatografía líquida de ultra rápido desempeño (UHPLC) ^[11], electroforesis capilar ^[12-14], extracción miscelar y cromatografía de gases ^[15], cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas ^[16,17], electrólisis ^[18], espectrofotometría ^[18], análisis multivariante ^[19], y determinaciones voltamétricas ^[19-25].

Para nuestro conocimiento, el metilparabeno (MP) en su estructura posee grupos funcionales electroquímicamente activos a la reacción de REDOX. Es por ello que el objetivo de este estudio es desarrollar una metodología para la

determinación electroquímica de MP mediante la técnica de Voltametría de pulso diferencial, utilizando como electrodo de trabajo un electrodo de carbón vítreo, en tres formulaciones cosméticas de polvos compactos, y correlacionar los resultados a través de la técnica de espectroscopia UV- visible.

Parte Experimental.

Reactivos.

El metilparabeno, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de sodio, y otros productos químicos se adquirieron de Merck, el metanol se obtuvo de Fluka y se utilizaron sin purificación previa. Se preparó una solución patrón de Metilparabeno 1 mM, las soluciones estándar se prepararon diariamente por dilución en agua ultrapura 18 M Ω a $20 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

Todas las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en una solución 0,2 M de buffer fosfato (PBS) pH 7, preparado previamente por el método de Purdy [26]. Los productos cosméticos con adición de metilparabeno fueron adquiridos en una casa de cosméticos de la ciudad de Mérida, Venezuela.

Materiales e Instrumentación.

La celda electroquímica fue diseñada con un sistema convencional de tres electrodos, como electrodo de trabajo se utilizó un disco de carbón vítreo (CV) empotrado en vidrio y con un área geométrica expuesta de 1 cm^2 , cuidadosamente pulido a espejo con alúmina $0,3 \mu\text{m}$, sometido a ultrasonido por 5 minutos y lavado con agua ultrapura de $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$. Se empleó un electrodo de Ag/AgCl (KCl sat) como referencia y un alambre de platino como el contraelectrodo, el cual fue previamente flameado para su limpieza. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron en un buffer fosfato 0,2 M (pH 7), usando un sistema electroquímico modular Potenciostato / Galvanostato (AutoLab-PGSTAT20).

Para el análisis por medio de la técnica de espectroscopia UV-Visible, se utilizó un espectrofotómetro Marca Perkin-Elmer modelo lambda 25 de doble haz, acoplado a un sistema computarizado y controlado mediante el software UV WinLab. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante OriginPro versión 8.0.

Diseño Experimental.

Con el fin de confirmar el funcionamiento adecuado y limpieza del electrodo de trabajo, para la determinación MP, se realizó un estudio de la respuesta voltamétrica del electrodo a una solución 0,5 M de ácido sulfúrico H_2SO_4 , usando voltametría cíclica, a una velocidad $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en una ventana de potencial de -1,2 a 1,6 V vs Ag/AgCl. Su respuesta concuerda con la reportada en la literatura para este electrodo en este medio [25].

Los factores óptimos en la Voltametría de pulso diferencial (VPD), como la velocidad de barrido (50 mV/s), ancho de pulso ($t = 20 \text{ ms}$), Altura de pulso ($E = 50 \text{ mV}$), fueron seleccionados en base a la literatura y los experimentos preliminares. Se preparó un conjunto de calibración de 5 muestras en 0,2 M (PBS).

Para las determinaciones del MP presente en las diferentes marcas de cosméticos analizados, se pesó $0,7266 \pm 0,0001 \text{ g}$ de cada polvo compacto de las diferentes marcas previamente pulverizados, para lo cual se disolvieron en 25 mL de agua, y fueron llevados a baño ultrasónico durante 1 hora, agitando ocasionalmente. Posteriormente, se centrifugó durante 25 min. El excipiente se separó por filtración, y se transfirió a un matraz aforado de 50 mL, enrazándose al volumen final con una solución buffer de fosfato 0,2 M (pH 7, electrolito soporte).

En cuanto a los análisis por espectroscopia UV-Visible, se procedió a preparar una curva de calibración sencilla a partir una solución patrón de $\text{MP} \times 10^{-4} \text{ M}$ en metanol, se midió la absorbancia en un intervalo de 300 a 200 nm de longitud de onda.

Resultados y discusión.

La oxidación de MP sobre la superficie electródica del carbón vítreo.

El comportamiento electroquímico de MP en carbón vítreo se estudió mediante Voltametría Cíclica (VC) en una solución 1mM de metilparabeno a una velocidad de barrido de 50 mV.s^{-1} . La Figura 3, exhibe un definido pico anódico irreversible alrededor de 0.9 V vs Ag/AgCl.

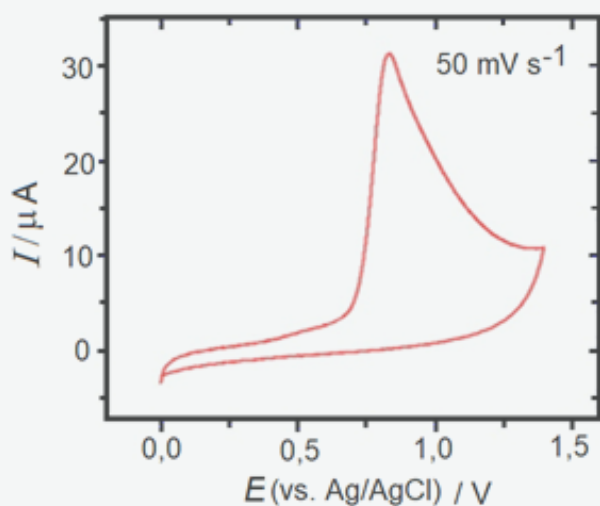


Figura 3. Respuesta de Voltametría cíclica del MP 1 mM en la superficie electródica. $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$

Elección del solvente apropiado para la extracción del MP en los polvos compactos.

Se estudió la influencia del solvente usado en la extracción sobre la intensidad de corriente de oxidación del sistema electroquímico por Voltametría cíclica, en una ventana de potencial $-0,2$ - $1,6 \text{ V}$, a una velocidad de barrido de 50 mV/s . Se prepararon soluciones patrones de MP, en diferentes solventes: metanol, etanol, acetonitrilo y agua; y se diluyeron hasta una concentración 1mM en el electrolito soporte, obteniéndose las diferentes respuestas mostradas en la Figura 4. En presencia de metanol y etanol, aparecen dos picos de oxidación irreversibles, el pico

más pequeño representa a la oxidación del MP, el cual no está bien definido y el otro pico se puede atribuir a la oxidación del alcohol, la respuesta en presencia de agua y acetonitrilo en las cuales se observa solamente un pico agudo bien definido, atribuible a la oxidación del MP, sin embargo, se observó que la máxima intensidad de corriente corresponde al agua pura como solvente.

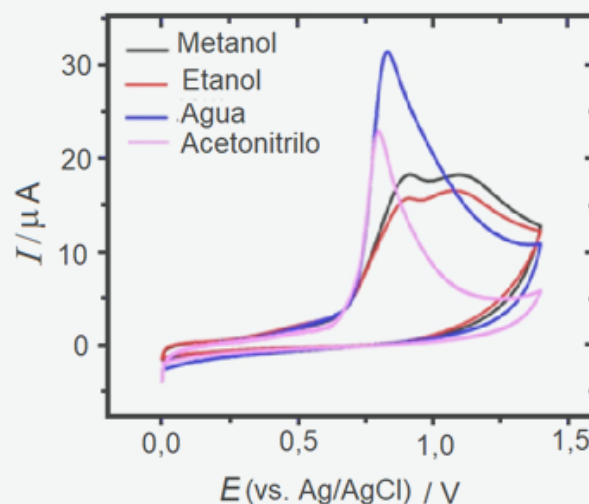


Figura 4. Respuesta voltamétrica de la influencia del solvente (metanol, etanol, agua y acetonitrilo) en la intensidad de oxidación del MP, en un buffer fosfato $0,2 \text{ M}$ ($\text{pH } 7$) para una solución 1mM de MP.

Influencia de la velocidad de barrido.

El efecto de la velocidad de barrido se investigó mediante la técnica de Voltametría Cíclica en una ventana de potencial desde $-0,2$ a $1,6 \text{ V}$, usando una solución de MP 1 mM, con velocidades de barrido entre 10 y 1500 mVs^{-1} ; sobre el electrodo de CV. En la figura 5.A se puede observar que no existe ningún pico de reducción en la exploración inversa del MP; por lo cual sugiere que se trata de un proceso de oxidación irreversible. Consecutivamente, la figura 5B, muestra la variación de la intensidad de pico en función de la velocidad de barrido: dicha variación no es lineal, se puede apreciar que alrededor de 50 mV.s^{-1} , comienza a incrementarse el error en la medida de intensidad de pico, por ende a mayores velocidades de barrido existe mayor incertidumbre en la medida

de las corrientes de pico y este error se puede proyectar a las determinaciones. La curva representada en la figura 5C, muestra como las corrientes de pico de oxidación

(I_p) del MP aumentan linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$). Esta dependencia es lineal según la ecuación:

$$I_p \text{ (mA)} = 1.99617 \times 10^{-4} v^{-1/2} - 9.358 \times 10^{-6} R^2 = 0.996 \quad (1)$$

La ecuación 1 sugiere que el proceso electroquímico que ocurrió sobre la superficie electródica está principalmente

controlado por difusión, siendo este un caso ideal para las medidas cuantitativas

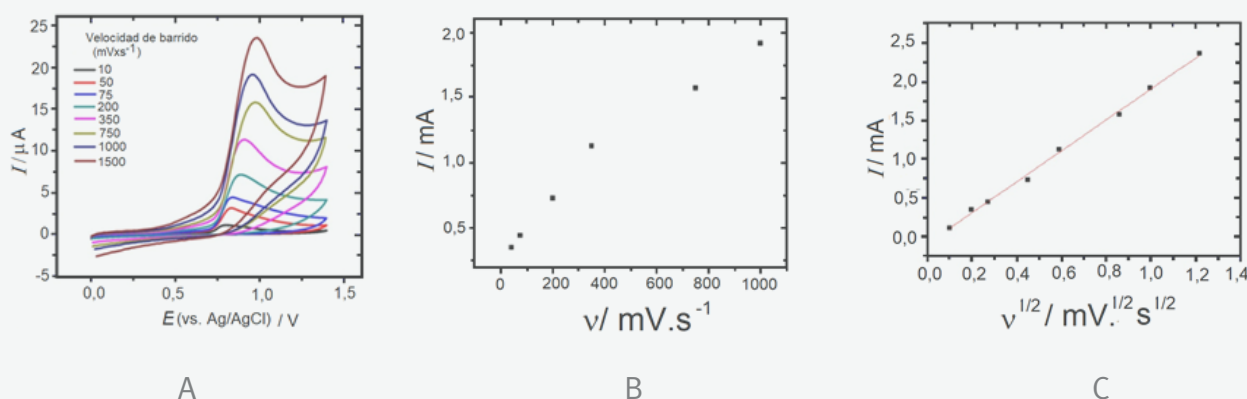


Figura 5.- (A) Voltagramas cíclicos de una solución 1×10^{-3} M de MP con variación de la velocidad de barrido entre $10 mV.s^{-1}$ hasta $1500 mV.s^{-1}$, entre $-0,2$ a $1,6$ V sobre el electrodo de CV, en solución reguladora de fosfato $0,2$ M (pH 7). **(B)** I_p vs v **(C)** I_p vs $v^{1/2}$.

Estabilidad y Reproducibilidad.

La estabilidad del electrodo de trabajo CV también fue seguida a través de Voltametría de Pulso Diferencial (VPD), después de almacenamiento a temperatura ambiente y al cabo de 3 semanas, observándose la misma respuesta del electrodo. Se obtuvo alta reproducibilidad en las intensidades de pico en distintos barridos.

Influencia de la concentración de MP en la intensidad de corriente.

Para estudiar la influencia de la concentración de MP sobre la intensidad de los picos anódicos se realizó experimentos de VPD bajo las condiciones anteriormente

definidas, y barridos en soluciones desde 5×10^{-6} a 1×10^{-3} M.

Los resultados correspondientes se presentan en la figura 6, las corrientes de oxidación del MP aumentan con el aumento de la concentración de MP; sin embargo se puede observar que a concentraciones 1×10^{-5} a 5×10^{-6} M, no se observan picos oxidación, debido a que estos valores de concentración no se pueden determinar mediante esta técnica. Por tal motivo se seleccionó para el desenvolvimiento de este trabajo una zona lineal en un intervalo de concentraciones que va desde 1×10^{-4} a 1×10^{-3} M, con el fin de poder determinar la concentración de MP en otros cosméticos.

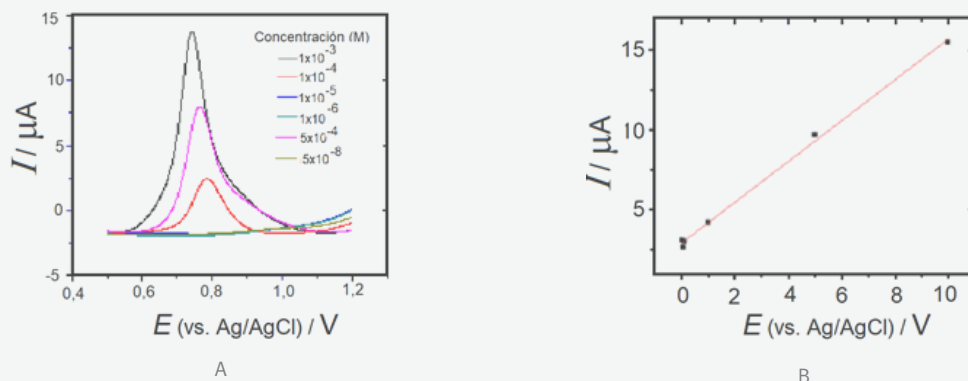


Figura 6. (A) VPD para diferentes concentraciones MP desde 5×10^{-6} a 1×10^{-3} M, en buffer de fosfato 0,2 M de pH=7. (B) curva de calibración para diferentes concentraciones de MP.

Determinación Voltamétrica del MP en los diferentes polvos compactos.

Una vez realizada la extracción del MP por la metodología anteriormente descrita, se procedió a determinar si existía interferencia de matriz en las condiciones analizadas, para ello se realizaron curvas de calibración de adición de estándar, con una solución de concentración nominal de 1mM tomando en cuenta que la cantidad

declarada por el fabricante es de 0,4% m/m, las concentraciones de estándar variaron entre 1×10^{-4} a 1×10^{-3} M. En la figura 7-A, se muestran los Voltagramas obtenidos para cada polvo, y en la figura 7-B, se muestra la curva de calibración de adición estándar CCAE, superpuesta por la curva de calibración sencilla CCS. Aunque se puede observar buena correlación lineal existe una diferencia apreciable en el valor de la pendiente de la recta con respecto a la curva de calibración sencilla.

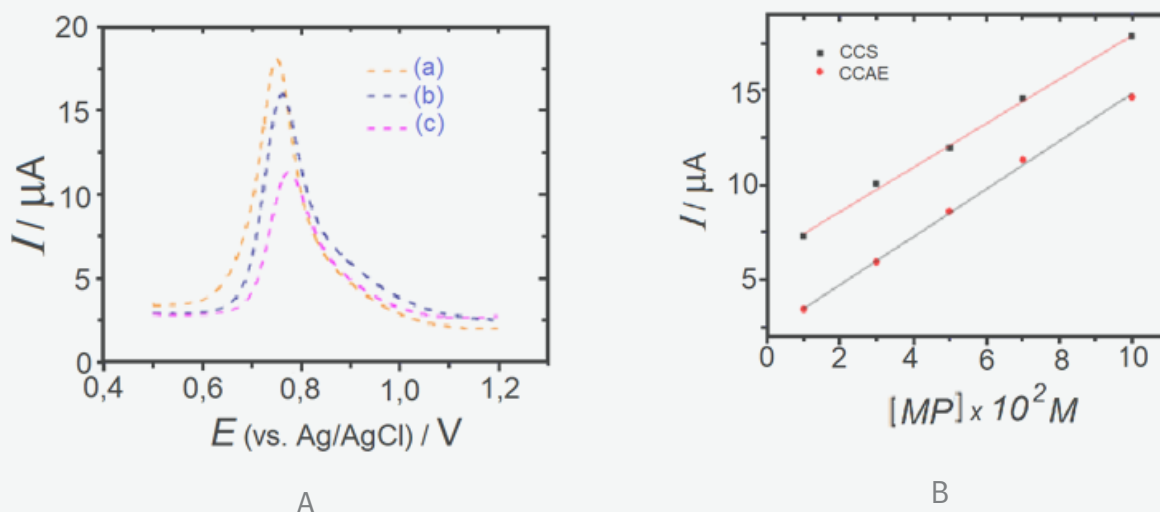


Figura 7. (A) Voltagramas de pulso diferencial de los diferentes polvos compactos. (B) curva comparativa entre CCS y CCAE para el MP.

Para la existencia de interferencias de la matriz en la determinación de CS, se realiza el análisis estadístico (t-student en un intervalo

de confianza del 95%), dicho resultado implica que bajo las condiciones de trabajo, si existe interferencias de matriz que afectan

las medidas, por lo tanto se debe aplicar solo la curva de calibración por adición de estándar para las determinaciones. Tomando en cuenta este precedente en la

tabla I, se representa cada una de las curvas CCAE realizadas por VPD para cada uno de los cosméticos.

Tabla I. Características analíticas de las curvas de calibrado obtenidas mediante VPD

Tipo de Curva	R	Sensibilidad (m)×10 ³ L.mol ⁻¹	Sm ×10 ⁴	Intercepto (b) ×10 ⁶ mol.L ⁻¹	Sb ×10 ⁷	LOD ×10 ⁵ mol.L ⁻¹	LOQ ×10 ⁴ mol.L ⁻¹
Sencilla	0,997	11,64	3,19	6,27	1,94	4,99	1,66
Adición Estándar	0,998	12,63	2,81	2,22	1,70	4,04	1,35

Con estos datos se procedió a encontrar la concentración de MP en las diversas formulaciones cosméticas de polvos compactos, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla II, donde se muestra la concentración extrapolada.

Correlación del método a través por espectroscopia UV-Visible.

Se procedió a preparar una curva de calibración sencilla a partir de una solución patrón de MP en metanol 1×10^{-4} M, en un intervalo de 1×10^{-6} - $2,1 \times 10^{-5}$ M y se midió la absorbancia en un intervalo de 300 a 200 nm de longitud de onda, usando como blanco metanol,

obteniéndose máximos de absorbancia a 256 nm. Cada espectro se midió tres (3) veces y con los promedios de los máximos se construyó la curva de calibración sencilla. Posteriormente se procedió a realizar la curva de calibración por adición estándar utilizando el mismo procedimiento descrito, pero utilizando como solvente metanol, y preparando una solución patrón de metilparabeno 1×10^{-4} M, se utilizaron volúmenes fijos de muestra de 0,25 mL variando volúmenes desde 2 hasta 5 mL en intervalos de 0,75 mL de patrón y llevados a un volumen de 25 mL. En la figura 8-A se muestra las absorciones obtenidas para cada una de los polvos compactos analizados, y en la 8-B las curvas de calibración respectivamente.

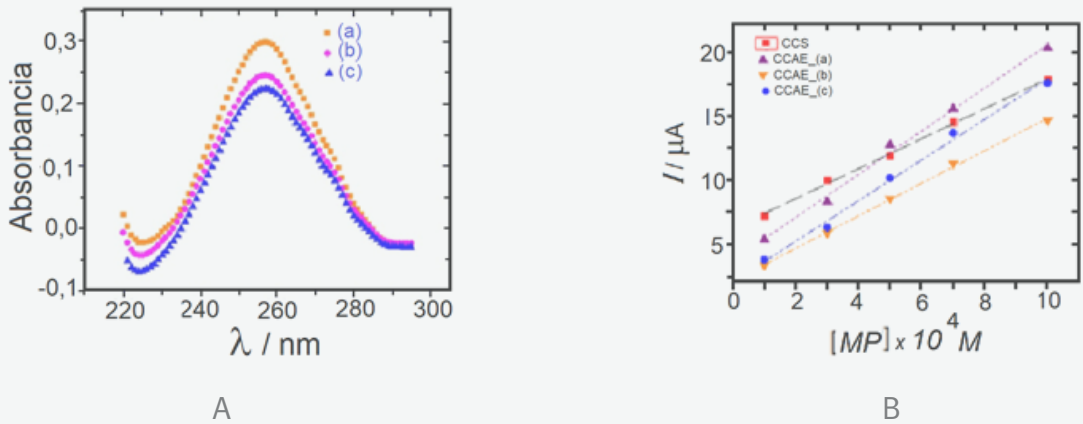


Figura 8. (A) Espectros de absorción de los polvos compactos analizados. (B) Curvas de adición estándar para los cosméticos analizados a través de UV-Visible.

Porcentaje de recuperación.

Se preparó una curva de adición de estandar al porcentaje de recuperación de ambos métodos (VPD y UV-Visible), añadiendo cantidades del analito fijo,

en la tabla II se muestra el promedio de tres medidas para cada una de las concentraciones estudiadas, y sus % de recuperación obtenidos.

Tabla II. Porcentajes de recuperación obtenidos para el MP en los diferentes polvos compactos analizados.

Parámetros del % de recuperación por VPD				
Cosmético	X_i $\times 10^{-4} \text{ M}$	X_o $\times 10^{-4} \text{ M}$	$Y_{(1)}$ $\times 10^{-3} \text{ M}$	% Recuperación
(a)	9,00	8,81	1,69	89,8±0,8
(b)	2,27	2,23	0,39	76,0±4,5
(c)	3,39	3,28	0,56	69,2±3,1
Parámetros del % de recuperación por UV-Visible				
(a)	9,14	8,81	1,67	92,2±0,9
(b)	2,87	2,23	0,46	78,7±3,7
(c)	2,66	3,28	0,49	69,8±3,6

Donde:

Y_1 : concentración de la muestra más el patrón añadido. X_i : concentración inicial de la muestra. X_o : concentración del patrón añadido.

Conclusiones.

Se logró desarrollar una metodología voltamétrica para la determinación de MP en productos cosméticos, polvos compactos. El método de análisis electroquímico propuesto es simple, rápido y de bajo costo, con un límite de detección de $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ para determinación de MP en cosméticos. Al llevar a cabo la correlación de ambos métodos se observó que no existe diferencia significativa para el intervalo de concentraciones analizadas. Por ende, el método podría ser propuesto para llevar a cabo el control de calidad de este tipo de conservante en los productos cosméticos, en particular de la marca (a), para otras marcas se debe realizar una validación más estricta. Sin embargo, al observar la alta cantidad de MP presente en los polvos compactos analizados, los cuales son bastantes comerciales en el mercado, se ve con gran preocupación la exposición prolongada a este conservantes por parte de la población femenina.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- Luck E & Pager, M. "Conservación química de los alimentos: Características, usos, efectos". Segunda edición. Editorial Acirbia, S.A Zaragoza, España (2000). págs. 66-69.
- 2- Cashman A, Warshaw E. "Parabens: A review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties". *Dermatitis*. 2005; 16:57-66.
- 3- Leopoldini M, Marino T, Russo N. "Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism". *J.Phys.Chem*. 2004; 108:4916-4922.
- 4- Wright J.S, Johnson E.R." Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method analysis of substituent effects and application to major families of antioxidants". *J.Am.Chem.Soc*. 2001; 123:1173-1183.
- 5- Bagher M, Shamsipur M, Dehdashtian S. "Development of a selective and sensitive voltammetric sensor for propylparaben based on a nonosized molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode". *Materials science and engineering*. 2014; 36:102-107.
- 6- Wade L.G, JR. "Química orgánica". Quinta edición. Pearson Educación, S. A., Madrid, 2004. Págs. 547-550.
- 7- Cabaleiro N, De la Calle I, Bendicho C." An overview of simple preparation for the determination of parabens in cosmetics". *Trends in Analytical Chemistry*. 2014; 7:34-46.
- 8- Droguería Cosmopolitan. "Conservadores cosméticos II" 2012. <http://cosblog.com/test/2012/01/09/conservador.com>. Fecha de revisión: 06 de junio del 2016.
- 9- Soni M, Carabin I.G. Burdock G.A. "Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) " *Food and Chemical Toxicology*. 2005; 47:985-1015.
- 10- Lorenzetti OJ, Wernet TC."Topical parabens: benefits and risks". *Dermatologic*. 1977; 154: 244-50.
- 11- Soni M, Taylor SL, Greenberg NA. "Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature ". *Food and Chemical Toxicology*. 2006; 40:1335-73.
- 12- Díaz B, Heras F, Conde L." Parabenos: ¿mito o realidad? ". Servicio de Dermatología. Escuela Nacional de Medicina del Trabajo. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España. *Piel*. 2006; 21(5):231-40.
- 13- Routledgea E., Parkera J., Odumb J. "Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic". *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1998; 153:12-19.
- 14- Makino T. "Female Reproductive Tract and Mammary Disorders Caused by Endocrine Disruptors". *Journal of the Japan Medical Association*. 2003; 46:93-96.
- 15- Oishi S. "Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats". *Food Chem Toxicol*. 2004; 42:1845-9.
- 16- Kang KS, Che JH, Lee YS. " Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxibenzoic acid (butyl paraben) ". *J Vet Med Sci*. 2002; 64:227-35.

- 17- Ishiwatari S, Suzuki T, Yoshino T. "Effects of methyl paraben on skin keratinocytes". J. Appl. Toxicol. 2007; 27: 1–9
- 18- Okamoto Y, Hayashi T, Matsunami S. "Combined Activation of Methyl Paraben by Light Irradiation and Esterase Metabolism toward Oxidative DNA Damage". Chem. Res. Toxicol. 2008; 21: 1594–1599.
- 19- Darbre Philippa. "Underarm Cosmetics and Breast Cancer". J. Appl. Toxicol. 2003; 23: 89–95.
- 20- Darbre P, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. "Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours". J Appl Toxicol. 2004; 24(1): 5-13.
- 21- Darbre P, Harvey P. "Paraben esters: review of recent studies of endocrinotoxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks". J. Appl. Toxicol. 2008; 28: 561–578.
- 22- Barr L, Metaxas G, Harbach J, Savoy L, Darbre P. "Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum". J. Appl. Toxicol. 2012; 32: 219–232.
- 23- Charles A, Darbre P. "Combinations of parabens at concentrations measured in human breast tissue can increase proliferation of MCF-7 human breast cancer cells". J. Appl. Toxicol. 2013; 33: 390–398.
- 24- Darbre P, Harvey. "Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status". J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 925–938.
- 25- Angeles L, Cydney N, Chanel P, Runke Stephanie R. "Methylparaben stimulates tumor initiating cells in ER+ breast cancer models". J. Appl. Toxicol. 2016.
- 26- GD cristiana, WC Purdy, de corriente residual en el medio ortofosfato, J. Electroanal. Chem. 1962; 3: 363 - 367.