



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**



HELENA DE MENEZES MINASSA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ABSORÇÃO DÉRMICA DE SUBPRODUTOS
DE DEGRADAÇÃO POR CLORAÇÃO DA OXIBENZONA**

**OURO PRETO - MG
2023**

HELENA DE MENEZES MINASSA
helenaminassa@aluno.ufop.edu.br

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ABSORÇÃO DÉRMICA DE SUBPRODUTOS
DE DEGRADAÇÃO POR CLORAÇÃO DA OXIBENZONA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Farmácia da
Universidade Federal de Ouro Preto – MG,
como requisito parcial para obtenção de
grau de bacharel em Indústria.

Orientadora: Prof^a Dra. Karina T. Santos Rúbio

Co-orientadora: Dra. Amanda de Vasconcelos Quaresma

OURO PRETO – MG
2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M663i Minassa, Helena de Menezes.
Identificação e avaliação de absorção dérmica de subprodutos de
degradação por cloração da oxibenzona. [manuscrito] / Helena de
Menezes Minassa. - 2023.
53 f.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Rúbio.
Coorientadora: Dra. Amanda Quaresma.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola
de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Toxicidade. 2. Filtros Ultravioletas. 3. Absorção dérmica. 4.
Cloração da Água. 5. Oxibenzona. I. Rúbio, Karina. II. Quaresma, Amanda.
III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.9

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Helena de Menezes Minassa

Identificação e avaliação de absorção dérmica de subprodutos de degradação por cloração da oxibenzona

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Farmácia

Aprovada em 29 de Agosto de 2023

Membros da banca

Dr^a - Karina Taciana Santos Rúbio - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr^a - Amanda de Vasconcelos Quaresma - Coorientadora - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr^a - Ananda Lima Sanson - Membro da Banca - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Me - Aniely dos Reis Teixeira - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Karina Taciana Santos Rúbio, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 31/08/2023



Documento assinado eletronicamente por **Karina Taciana Santos Rubio, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/08/2023, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0583868** e o código CRC **A634D24A**.

Dedico mais esta etapa vencida, aos meus pais e familiares, pelo apoio. A República Volúpia, lar de onde tirei sábias lições...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Vivian e Guilherme, pelo apoio nas minhas escolhas e educação que me deram. Agradeço às minhas irmãs, Bia e Marcela, pelo companheirismo. Aos meus tios, tias, avós, avôs (in memorian), cunhados, sobrinhos e primos, que compartilharam essa caminhada ao meu lado mesmo à distância.

Agradeço à tradicional Escola de Farmácia de Ouro Preto e a Universidade Federal de Ouro Preto pelo ensino público de qualidade. Agradeço também ao corpo docente desde o ICEB à EFAR pela competência ao ministrar as aulas e por conseguirem transmitir da melhor forma possível os conhecimentos necessários para nós, futuros profissionais farmacêuticos. Obrigada em especial, à minha professora orientadora, Prof^a Dsc. Karina T. Santos Rúbio, e à minha co-orientadora, Dra. Amanda de Vasconcelos Quaresma, que contribuíram grandemente para o meu crescimento.

Obrigada à Prof^a Dra. Melissa Soares Caetano pela oportunidade da experiência da minha primeira iniciação científica. Agradeço também ao Centro Acadêmico Livre de Farmácia José Badini (CALF) por me aproximar mais da universidade e me ajudar a entender mais ainda a importância da farmácia. Obrigada às empresas em que pude estagiar, Araújo Manipulação, Vet Fórmula e Pharlab, pelos ensinamentos.

Sou grata ao Dudu por trazer mais leveza e amor para minha vida. Aos meus amigos e amigas de BH, sobretudo Ágatha, Amanda, Anna Julia, Babi, Bruna Barra, Fina, Júlia, Lets, Luana, Malu, Mila, Rafa e Rapha. Sou muito grata aos “unidos”: Raio pelos anos de amizade, sintonia e ferração. Michel por todas as conversas, intervalos e risadas e André por toda ajuda, empatia e carinho. Sem vocês não teria conseguido. Por fim, obrigada ao meu período, 18.1, pela irmandade.

Viva a universidade pública!

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”

Winston Churchill

MINASSA, Helena de Menezes, Identificação e Avaliação de Absorção Dérmica de Subprodutos de Degradação por Cloração da Oxibenzona, 2023, Graduação em farmácia. Universidade Federal de Ouro Preto.

R E S U M O

Devido ao aumento da exposição aos raios ultravioleta, o uso do filtro solar se tornou indispensável para a proteção da pele. Os filtros solares podem ser orgânicos ou inorgânicos. Um dos filtros UV orgânicos mais utilizados atualmente é a oxibenzona. Este composto em contato com a água clorada de estações de tratamento pode formar subprodutos potencialmente tóxicos para a saúde humana. Além disso, estes subprodutos não são devidamente monitorados e não apresentam estudos suficientes sobre a avaliação de seus potenciais efeitos tóxicos. Assim, este trabalho buscou identificar subprodutos de degradação da oxibenzona por cloração e avaliar seu potencial de absorção dérmica para estimativa de seu potencial tóxico. Dessa forma, será possível auxiliar na tomada de decisão quanto ao monitoramento já regulamentado de substâncias em águas. Para tal, foi realizada a degradação da oxibenzona por cloro e os subprodutos formados foram detectados por espectrometria de massas de forma semi-quantitativa. Realizou-se também a avaliação de permeação dérmica da oxibenzona e seus subprodutos utilizando membrana da pele da orelha de porco em célula de Franz. O subproduto de degradação da oxibenzona monoclorado (263,10 m/z) foi formado. No estudo de permeação dérmica, 71,8% de oxibenzona e 87,2% de oxibenzona monoclorada ficaram retidos na membrana na pele do porco e não foram identificados compostos no compartimento receptor. Apesar dos compostos terem ficado retidos na pele e outros estudos serão feitos, é interessante incluir os compostos apresentados neste estudo na lista de substâncias monitoradas que apresentam risco à saúde, uma vez que outros autores já detectaram toxicidade dos subprodutos da oxibenzona.

Palavras-chaves: Oxibenzona; Cloração; Degradação; Permeação Dérmica.

MINASSA, Helena de Menezes, Identificação e Avaliação de Absorção Dérmica de Subprodutos de Degradação por Cloração da Oxibenzona, 2023, Graduação em farmácia. Universidade Federal de Ouro Preto.

A B S T R A C T

Due to the increased exposure to ultraviolet rays, the use of sunscreen has become essential for skin protection. Sunscreens can be organic or inorganic. One of the most commonly used organic UV filters is oxybenzone. This compound, when in contact with chlorinated water from treatment facilities, can generate potentially toxic byproducts for human health. Additionally, these byproducts are not adequately monitored, and there is insufficient research on evaluating their potential toxic effects. Thus, this study aimed to identify degradation byproducts of oxybenzone through chlorination and assess their potential dermal absorption for estimating their toxic potential. This will contribute to informed decisions regarding the regulated monitoring of substances in water. To achieve this, oxybenzone degradation through chlorine was performed. The formed byproducts were detected semi-quantitatively using mass spectrometry. Dermal permeation of oxybenzone and its byproducts was also evaluated using pig ear skin membrane in a Franz diffusion cell. The oxybenzone monochlorinated degradation byproduct (263 m/z) was formed. In the dermal permeation study, 71.8% of oxybenzone and 87.2% of oxybenzone monochlorinated were retained in the pig skin membrane and no compounds were identified in the receptor compartment. Based on the results, it is advisable to include the compounds presented in this study in the list of monitored substances posing a health risk.

Keywords: Oxybenzone; Chlorination; Degradation; Dermal Permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da Benzofenona 3.	15
Figura 2: Subprodutos da oxibenzona formados a partir de cloração.	22
Figura 3: Câmaras de difusão. Esquema de representação de câmaras de difusão contendo membrana para realização de estudos de absorção. (A) Câmara fluídica; (B) Célula de difusão de Franz.	24
Figura 4: Espectro adquirido por espectrometria de massas no modo de aquisição MRM (<i>multiple reaction mode</i>) evidenciando os íons positivos da oxibenzona sem degradação por cloração.	34
Figura 5: Gráfico degradação da oxibenzona por cloração, utilizando diferentes concentrações de NaOCl.	35
Figura 6: Estrutura da oxibenzona monoclorada.	38
Figura 7: Espectro de massas obtido após 30 minutos de tratamento.	39
Figura 8: Relação isotópica no espectro de massas obtido após 30 minutos de tratamento.	40
Figura 9: Corte transversal da organização lipídica da pele humana (a) Zoom no tecido. (b) Simulação de substâncias entrando na barreira mais externa da pele, o estrato córneo.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos que avaliaram a formação de subprodutos após a cloração da oxibenzona.	21
Tabela 2: Condições das reações de degradação da oxibenzona.	30
Tabela 3: Quantidades de oxibenzona e de seu subproduto na difusão de células. .	42

LISTA DE SIGLAS

UV - Ultravioleta

UVA - Ultravioleta A

UVB - Ultravioleta B

UVC Ultravioleta C

TiO₂ - Dióxido de titânio

ZnO - Óxidos de zinco

BP-3 - 2-hidroxi-4-metil-metilbenzofenona

EHMC - 3-(4-metoxifenil)-2- ácido propenóico 2-etil-hexilo ester

4-MBC 3-(4-metil-benzylidene) bornan-2-um

OC - 2-ciano-3,3-difenil-2-ácido propenóico 2-etil-hexilo ester

HAAs - Ácidos haloacéticos

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

TCAA - Ácido tricloroacético

MRM - Monitoramento de reações múltiplas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Filtros Solares.....	13
1.2	Benzofenonas.....	14
1.3	Contaminação Ambiental por Oxibenzona	16
1.4	Subprodutos de Cloração da Oxibenzona.....	19
1.5	Permeação Dérmica.....	23
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral.....	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Lavagem de Vidrarias.....	29
4.2	Experimento de Cloração	29
4.3	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas	31
4.4	Ensaio de Permeação Dérmica em Pele de Porco.....	32
4.4.1	Preparo da Pele.....	32
4.4.2	Ensaio de Permeação em Célula de Difusão	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Degradação da Oxibenzona	35
5.2	Identificação de Subproduto de Degradação	37
5.3	Experimento de Avaliação da Permeação Dérmica	40
5.3.1	Teste de Estabilidade	40
5.3.2	Difusão de Células.....	41
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Filtros Solares

No mundo atual, os filtros solares vêm sendo cada vez mais utilizados para proteção contra os raios ultravioleta (UV). Isso se deve ao expressivo aumento do aquecimento global e do buraco na camada de ozônio. Esses fenômenos aumentam a exposição dos seres vivos aos raios ultravioleta, os quais são capazes de causar eritema, escurecimento da pele, queimaduras e até mesmo câncer de pele (LIU et al., 2014). Os protetores solares são responsáveis por proteger a pele humana dos danos que os raios UV podem provocar (GASPARRO; MITCHNICK; NASH, 1998).

A radiação ultravioleta (UV) é dividida em três bandas: UVC, UVB e UVA com os comprimentos de onda da luz nas faixas de 200-290 nm, 290-320 nm e 320-400 nm, respectivamente (GLASER; TOMECKI, 2020). Aproximadamente 90-99% da radiação UVA atinge a superfície da terra. A radiação do tipo UVB tem grande potencial de causar danos no epitélio como eritema e queimaduras. Entretanto, aproximadamente 1–10% dessa radiação é capaz de atingir a superfície da terra. Já a radiação UVC é absorvida pela atmosfera. Portanto, a camada de ozônio filtra a radiação UVC, filtra parcialmente a radiação UVB e não é capaz de filtrar os raios UVA (DIAZ; NESBITT, 2013; NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010).

No estudo *in vivo* realizado por Strickland (1986) em ratos, o autor expôs os animais a radiação UV diariamente. As radiações UVB/UVA provocaram câncer de pele nas orelhas de 80% dos animais testados após 68 semanas. Além disso, a radiação UVA induziu tumores na dorsal de ratos. A combinação das radiações UVB e UVA é mais prejudicial à pele dos animais e os tumores identificados são resultado da exposição cumulativa a essas radiações.

Os filtros UV podem, basicamente, ser separados em duas classificações: filtros solares químicos ou orgânicos e filtros solares minerais, físicos ou inorgânicos. Tal classificação está relacionada ao mecanismo de ação da proteção UV (GASPARRO; MITCHNICK; NASH, 1998). Os filtros orgânicos

atuam principalmente por absorção de fótons no comprimento de onda UV. Já os inorgânicos são pigmentos quimicamente inertes que permanecem nas camadas superiores da epiderme e do estrato córneo e refletem ou dispersam a radiação (BENS, 2014).

Os protetores solares minerais, como dióxido de titânio (TiO_2) e óxidos de zinco (ZnO), há muito foram considerados seguros e eficazes. Eles são mais indicados para indivíduos com maior tendência à irritação da pele quando comparados com protetores solares orgânicos, como avobenzona e oxibenzona. Apesar das vantagens dos filtros UV inorgânicos, o uso deles vem reduzindo por causa da fraca elegância cosmética, uma vez que podem formar um filme branco na pele devido ao tamanho das partículas dos minerais. (BENS, 2014; WANG, TOOLEY, 2011).

Apesar de existirem diversos componentes de filtros solares orgânicos, os quatro mais comuns são BP-3 (2-hidroxi-4-metil-metilbenzofenona), EHMC (3-(4-metoxifenil)-2- ácido propenóico 2-etil-hexilo ester), 4-MBC (3-(4-metil-benzylidene) bornan-2-um), e OC (2-ciano-3,3-difenil-2-ácido propenóico 2-etil-hexilo ester) com base no estudo de Li e colaboradores (2007) que avaliou os componentes em 20 tipos de protetores solares. Apesar dos filtros solares orgânicos serem os mais utilizados, eles não são indicados para crianças e apresentam maior hipersensibilidade na pele do que filtros solares inorgânicos.

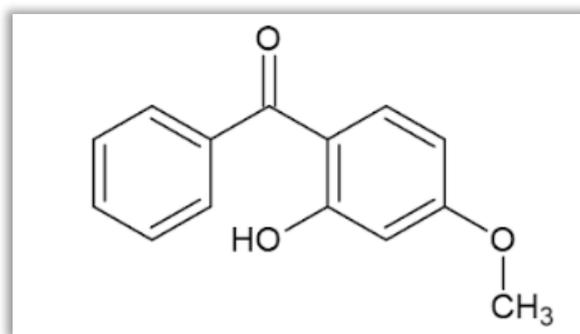
1.2 Benzofenonas

As benzofenonas tem como estrutura comum dois anéis benzênicos ligados por um grupo carbonil (IMAMOVIĆ et al., 2022). A ressonância de elétrons nas benzofenonas é facilitada pela presença de um elétron livre nas posições orto e para. Isso resulta em dois comprimentos de onda máximos de absorção, 286 (UVB) e 324 nm (UVA) (SHAATH, 2010).

O estudo de Liu e colaboradores (2014) identificou 14 benzofenonas por cromatografia líquida ou gasosa acopladas ao espectrômetro de massas, evidenciando a variedade de estruturas que podem ser utilizadas para proteção contra os raios ultravioleta. Dentre tais moléculas, destaca-se a benzofenona-3.

A benzofenona-3 (**Figura 1**), também conhecida como 2-hidroxi 4-metilbenzofenona, BP-3 ou oxibenzona, é um dos compostos mais comumente usados para proteção UVA e UVB. Ela apresenta peso molecular de 228.25 g/mol, coeficiente de partição octanol/água (log Kow) de 3,8 e pKa de 7,6 (BALMER et al., 2005; NEGREIRA et al., 2008; WNUK; KAJTA, 2021). Segundo outros autores, o log Kow é uma das variantes que têm influência direta na permeabilidade dérmica, além do volume molar de 163 cm³/mol (RAMOS et al., 2016)

Figura 1: Fórmula estrutural da Benzofenona 3.



Fonte: (AUTORA, 2023).

Altas concentrações de derivados de benzofenonas já foram encontradas em afluentes e efluentes de alguns países em que fizeram estudos em busca desses compostos. Ramos e colaboradores (2016) concluíram que tais concentrações estão relacionadas à baixa eficiência de remoção desses compostos pelas estações de tratamento de água e pela alta tendência destes em permanecer no meio ambiente uma vez que tem uma alta solubilidade em água e um Kow relativamente baixo (RAMOS et al., 2016).

A BP-3 apresenta uma solubilidade em água de 68,56 mg/L a 25°C (IMAMOVIĆ et al., 2022). Compostos com maiores Kow (Kow > 5) e menos solúveis em água tendem a ter uma facilidade maior de serem removidos pelas estações de tratamento de água. Isso se deve ao fato de seus sedimentos ficarem suspensos na água e isso faz com que estes fiquem retidos nas primeiras etapas das estações de tratamento.

A pesquisa de Gustavsson Gonzalez e colaboradores (2002) feita em voluntários homens e mulheres, demonstrou que a oxibenzona é absorvida pela pele e em média apenas 0,4% da BP-3 foi excretada na urina dos voluntários.

Além disso, o composto ainda foi detectado na urina após 48 horas de uma única aplicação de 40 gramas de protetor solar contendo 4% de BP3. Segundo Hayden, Roberts e Benson (1997), a oxibenzona e seus metabólitos (2,3,4-trihidroxi-benzofenona e 2,4-dihidroxibenzofenona) foram encontrados na urina de um grupo de voluntários após 48 horas de aplicação do filtro solar sendo constatado que 1-2% do composto foi absorvido após 10 horas de aplicação.

Liu e colaboradores (2012) testaram a benzofenona-3 em cinco diferentes condições: meio oxidante, redução de nitrato, redução de Fe(III), redução de sulfato e anóxico não alterado. Este estudo teve como objetivo avaliar a biodegradação da BP-3 durante 42 dias de incubação. O estudo indicou que o composto era estável em meio estéril e foi 100% consumido em todas as condições de oxi-redução aeróbicas e anaeróbicas. Além disso, provou que a meia-vida da BP-3 ficou entre 4,2 e 10,7 dias nas cinco condições apresentadas e que nas condições de sulfato-redutor e anóxica a BP-3 apresentou os menores tempos de meia-vida, de 4,3 e 4,2 dias, respectivamente (LIU et al., 2012).

Duirk e colaboradores(2013)observaram a degradação de filtros UV oxibenzona e dioxibenzona na concentração de 1 μ M no pH entre 6-10 na presença de excesso de cloro na concentração de 10 mM. O único produto de degradação estável dos compostos formado foi o clorofórmio.

1.3 Contaminação Ambiental por Oxibenzona

Os filtros UV podem contaminar o ambiente aquático por vias diretas e indiretas. As vias diretas de contaminação ocorrem quando esses produtos entram em contato com a água através de pessoas utilizando-os em piscinas e banheiras. Já as vias indiretas, ocorrem através da lavagem de roupas, banhos, resíduos industriais ou até mesmo através da urina devido à absorção e eliminação urinária de alguns desses produtos. Ou seja, as estações de tratamento de água são um dos meios da contaminação indireta do meio ambiente por captarem a água com esses produtos.

Ambas as vias são responsáveis por grandes níveis de contaminação de águas e o número de estudos para avaliar e investigar a contaminação do meio ambiente por esses poluentes vem crescendo. Devido à frequência e às

concentrações detectadas, estudos vêm sendo realizados para avaliação das possíveis consequências de tal contaminação para a saúde humana e para o meio ambiente.

Ekpeghere e colaboradores (2016) avaliaram a presença de diferentes tipos de filtros solares em cinco estações de tratamento de água e esgoto na Coreia, dentre eles a BP-3. Este composto foi o mais abundante entre os filtros solares avaliados. Foram registradas concentrações próximas a 6,000 ng/L, da benzofenona-3 em estações de tratamento de esgoto e de água. Segundo esse mesmo estudo, 82-100% da BP-3 foi removida nas estações. Entretanto, a quantidade que não foi removida de 1,000 ng/L é uma concentração considerável do composto que pode se acumular no ambiente e na água que chega para a população.

Na cidade de Tianjin, no norte da China, pesquisadores encontraram quatro tipos de filtros solares em diferentes pontos de estações de recuperação de águas residuais. As concentrações encontradas no efluente foram de 97-722 ng/L de BP-3 (LI et al., 2007).

Em Gales do Sul, Kasprzyk-Hordern e colaboradores (2009) monitoraram a presença de produtos farmacêuticos em dois pontos do rio Taff e na estação de tratamento de esgoto da região entre abril e agosto de 2007. Um dos pontos de monitoramento estava situado a 1 km antes da estação de tratamento de água (a montante), já o outro ponto se encontrava a 2 km após ela (a jusante). Os pesquisadores detectaram concentrações de BP-3 de 15–43 µg/L e de 15–44 µg/L, a montante e a jusante, respectivamente. No afluente da estação de tratamento foram detectadas concentrações de 104–1068 µg/L, já no efluente as concentrações encontradas foram de 80–2196 µg/L. O composto apresentou uma remoção de mais de 60%, porém, devido às altas concentrações, a quantidade do resíduo não removido é preocupante.

No estudo de Tsui e colaboradores (2014) foram coletadas 101 amostras de água durante um ano e dois meses em 8 cidades distintas com o objetivo de detectar filtros UV. Um dos filtros pesquisados foi a benzofenona-3 e a variação das concentrações desse composto nessas águas foi de 39-5429 ng/L em 20 pontos de Hong Kong sendo que esses pontos de coleta estavam situados em estações de tratamento de água, praias e outros locais com atividades aquáticas.

Na baía de Tóquio, as concentrações encontradas foram de 24-86 ng/L. Em Nova Iorque, detectaram 23-178 ng/L de BP-3 em duas baías e um rio próximo a estação de tratamento de água. Em praias e locais próximos de estações de tratamento de água de Los Angeles e nas duas cidades chinesas Shantou e Chaozhou, as concentrações detectadas foram de 227-601 ng/L, 55-188 ng/L e 37-49 ng/L, respectivamente. Em Bangkok, no rio que recebe o esgoto municipal, encontraram-se concentrações de 86-116 ng/L de BP-3. No oceano Ártico concentrações de 17-33 ng/L do composto foram detectadas (TSUI et al., 2014).

Em outro estudo realizado na China, foi avaliada a formação de ácidos haloacéticos (HAAs) em piscinas de águas salgadas a partir de diferentes precursores orgânicos por cloração. Dentre os precursores orgânicos avaliados, BP-3 teve o maior rendimento de formação de HAA, ou seja, quanto maior a concentração do cloro mais o subproduto era formado. Além disso, uma maior quantidade de bromo e acúmulo dos filtros solares na água e altas temperaturas também contribuíram para o aumento da concentração de HAAs (WANG; GONG; XIAN, 2020).

Na baía de Hanauma no Havaí, Downs e colaboradores (2022) (2022) avaliaram concentrações da oxibenzona na areia em dez diferentes pontos frequentados por banhistas. Em todas as amostras foram encontradas concentrações do composto de 136 a 27.880 ng/L. O estudo sugere que essas concentrações podem estar afetando o ecossistema na região, principalmente os corais, e indica que a principal fonte de contaminação pela oxibenzona são os banhistas.

Em estudos histopatológicos *in vivo*, foram utilizados biomarcadores teciduais em guelras de peixes expostos a concentrações de oxibenzona de 10, 100 e 1000 ng/L. A utilização das guelras é justificada pela sensibilidade dos biomarcadores quando se compara aos biomarcadores presentes no fígado. A exposição aguda à BP-3 causou distúrbios circulatórios principalmente neste órgão, mudanças regressivas e danos imunológicos às guelras (DOS et al., 2021).

Zhang e colaboradores (2021) expuseram embriões de *zebra fish* durante 96 horas à oxibenzona e estimaram que a dose letal seria de 4,74 mg/L sem exposição à luz UV. Já na presença da radiação, a concentração tóxica seria de

4,29 mg/L. Além disso, avaliaram doses sub-letais nos embriões sob radiação UV, e a oxibenzona na concentração de 1,5 mg/L causou diminuição do ritmo cardíaco dos embriões. A exposição à luz UV neste estudo é um ponto muito importante uma vez que mimetiza condições mais próximas da realidade do ambiente aquático.

Bilüthgen e colaboradores (2012) concluíram que baixas concentrações de BP-3 podem causar alterações nos esteroidogênes e nas vias hormonais em diferentes estágios de desenvolvimento de *zebra fish*. Foram identificadas alterações similares em machos adultos e embriões nas concentrações de 2,4–312 µg/L de BP-3. Maiores alterações ocorreram a partir da concentração de 84 µg/L. Além disso, os autores afirmam que é possível que essas concentrações causem também efeitos adversos no sistema imune dos peixes.

Considerando que as concentrações de BP-3 detectadas no ambiente foram avaliadas quanto ao potencial tóxico *in vivo* em diferentes modelos animais, e que diversos efeitos danosos foram observados em diferentes órgãos, cresce a preocupação com a possibilidade de danos à saúde humana.

1.4 Subprodutos de Cloração da Oxibenzona

Há uma grande preocupação de pesquisadores a respeito da ocorrência de filtros solares no mar e em efluentes. Entretanto, não há muita informação sobre a incidência, o comportamento e o destino de filtros solares em estações de tratamento de água (LI et al., 2007). Dessa maneira, é interessante a pesquisa desses compostos e seus subprodutos nesses locais e suas possíveis formas de toxicidade.

Segundo Da Silva, Emídio e De Marchi (2015) as etapas de tratamento convencional de água são coagulação, floculação, sedimentação, filtração, desinfecção e fluoretação. O processo de desinfecção mais usado mundialmente consiste na cloração da água.

Apesar da utilização do cloro ser necessária para o tratamento da água, Sherwood e colaboradores (2012) demonstraram que a dioxibenzona, oxibenzona, e sulisobenzona podem ser cloradas e resultar em uma menor capacidade de absorver os raios UV. Além deste comprometimento, os

subprodutos gerados pela reação entre cloro e oxibenzona, devido ao excesso do cloro três vezes a concentração do filtro solar, podem apresentar certo grau de toxicidade.

A toxicidade aguda das 14 benzofenonas selecionadas por Liu e colaboradores (2014) antes e depois da cloração foi avaliada utilizando bioensaios com bactérias bioluminescentes. Depois do tratamento com cloro, de acordo com os resultados do estudo, sugeriu-se que houve um aumento da toxicidade, frente ao ensaio a essas bactérias, de apenas uma das benzofenonas devido à substituição e à reatividade das delas (LIU et al., 2014).

A maior parte dos subprodutos de cloração da BP-3 é identificada por análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Entretanto, compostos voláteis, como clorofórmio, são usualmente quantificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (TAWK et al., 2015).

Alguns dos subprodutos derivados da cloração da benzofenona-3 e suas condições experimentais estão reportados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Estudos que avaliaram a formação de subprodutos após a cloração da oxibenzona.

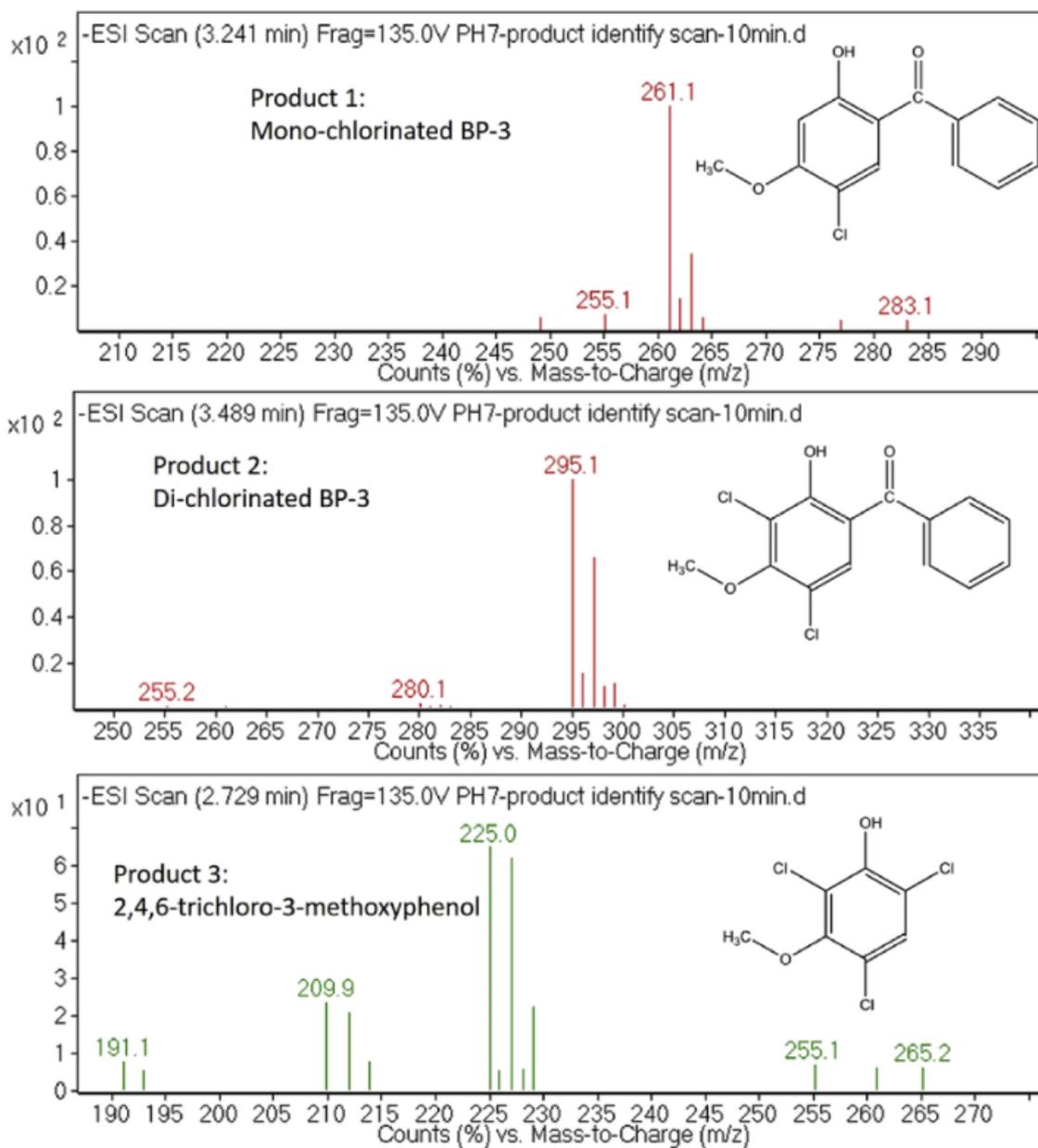
Subproduto	Método de análise	[Cl]	Condições	Referência
2,4,6-tricloro-3-metoxifenol, BP-3 mono e diclorada	LC-MS/MS	3 mg/ L	20 °C pH 7 8 horas, 5 e 10 minutos respectivamente	ZHANG et al., 2016
Clorofórmio, hidrato de cloral (CH), cloropropanóis, ácido cloroacético	LC-MS/MS	3 mg/ L	20 °C pH 7 24h de incubação	ZHANG et al., 2016
BP-3 mono- e di-cloro substituída	GC-MS	0,3 – 0,6 µg/mL	18 ± 2 °C pH 7,2 e 8,2 20 min Água ultra pura	NEGREIRA et al., 2008
Tricloro-metoxifenol	GC-MS	1 µg/mL	18 ± 2 °C pH 7,2 e 8,2 20 min Água da torneira	NEGREIRA et al., 2008
Clorofórmio	GC-MS	0,1 µg/mL	25 °C até 24 horas de formação pH 8	DUIRK; BRIDENSTINE; LESLIE, 2013
5Cl-BP3, 3Cl-BP3; 3,5-dicloro-2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (3,5-diCl-BP3)	HPLC-DAD e UV-Vis	1,4 mg/L	Ausência de luz Temperatura ambiente 24 h	(ZHUANG et al., 2013)

Fonte: (AUTORA, 2023).

Zhang e colaboradores (2016) avaliaram a degradação da BP-3 por cloro e constataram que essa reação ocorre rapidamente sob a influência da cinética da reação e do pH. Nesse trabalho, três subprodutos de degradação foram identificados (**Figura 2**), sendo o 2,4,6-tricloro-3-metoxifenol o mais estável. Ainda nesse estudo, conforme demonstrado pelo teste *in vitro* realizado, tal subproduto apresenta capacidade de promover genotoxicidade. Além disso, quantidades altas de clorofórmio e ácido tricloroacético (TCAA) foram identificadas após 24 horas de incubação e seus rendimentos molares

(subprodutos de desinfecção/BP-3) foram de 12,02% e 6,28%, respectivamente (ZHANG et al., 2016).

Figura 2: Subprodutos da oxibenzona formados a partir de cloração.



Fonte: (ZHANG et al., 2016)

Negreira e colaboradores (2008) também identificaram os três subprodutos de cloração da Benzofenona-3. A mono e di-cloro-BP3 são formadas por reações de substituição e o tricloro-metoxifenol pode ter sido derivado da clivagem do grupo carbonila entre os dois anéis aromáticos da molécula da BP3. Os subprodutos foram formados em quantidades significativas e foram estáveis diante de reações de oxidação. Considerando que o estudo

simulou condições reais de cloração, os autores sugeriram que os subprodutos podem ser gerados em piscinas e durante banhos, uma vez que a água clorada tenha contato com o filtro UV.

1.5 Permeação Dérmica

A pele é a barreira protetora do corpo que é responsável por regular e controlar o transporte de substâncias exógenas e endógenas (KARAN; ALIKHAN; MAIBACH, 2009). Dessa forma, torna-se importante entender se os subprodutos da oxibenzona presente nos filtros solares têm uma absorção dérmica.

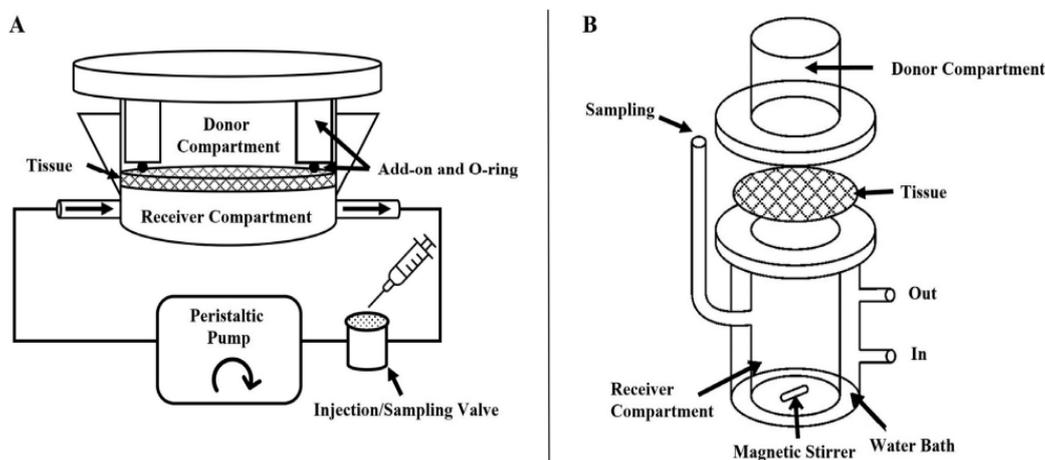
A pele de animais tem uma maior utilização do que a pele humana na condução de pesquisas de permeação dérmica, uma vez que as regulamentações de comitês de ética de estudos com animais, ou parte deles, são menos rígidas do que as regulamentações de estudos em humanos. Dessa forma, as membranas de animais são mais disponíveis para pesquisa. Esse tipo de ensaio é de extrema importância, uma vez que, através dele, é possível conhecer mais sobre a absorção de compostos (GODIN, TOUITOU, 2007).

O modelo de permeação nas células de Franz ou difusão de células é interessante para avaliar a capacidade de compostos em permear a pele. O método é relevante pois complementa estudos *in vitro* já estabelecidos, avaliando a permeação dos compostos que pode promover efeitos endógenos nas células (BAYNES, 2001). Além disso, este sistema *in vitro* pode avaliar o metabolismo dérmico e a biodisponibilidade sem a necessidade de utilizar métodos *in vivo* (BAYNES, 2001).

Experimentos de difusão de células (**Figura 3**) consistem na utilização de um fluido contendo um composto e uma membrana dividindo dois compartimentos chamados de doador e receptor. O teste é feito em função do tempo. O compartimento receptor é responsável por receber o fluido o qual é constantemente substituído para que as amostras do líquido sejam coletadas nos intervalos estabelecidos. As características do fluido devem estar de acordo com a membrana que será utilizada e os componentes os quais serão testados. Além disso, este fluido deve simular o fluido intercelular da pele. A partir dos

resultados desse experimento, é possível quantificar as concentrações no receptor em cada intervalo de tempo estabelecido (HOPF et al., 2020).

Figura 3: Câmaras de difusão. Esquema de representação de câmaras de difusão contendo membrana para realização de estudos de absorção. (A) Câmara fluídica; (B) Célula de difusão de Franz.



Fonte: (PULSONI et al., 2022).

Nesse tipo de experimento podem ser utilizadas peles de ratos, camundongos, primatas e humanos. Entretanto, a membrana da pele de porco é a mais utilizada. Isso se deve ao fato de que a pele do porco é semelhante à pele humana, tanto quanto à sua anatomia, quanto à fisiologia (BAYNES, 2001). A membrana da orelha do porco é mais adequada para estudos de permeação dérmica e apresenta resultados com maiores taxas de absorção quando se compara com a membrana da pele humana, ou seja, uma vez que o composto é passa pela membrana do porco, esse tem grandes chances de passar a pele humana também (GODIN, TOUITOU, 2007; SATO, SUGIBAYASHI, MORIMOTO, 1991).

Sato, Sugibayashi e Morimoto (1991) compararam a espessura da pele de alguns animais como ratos, porcos da Índia, cachorros e porcos com a pele humana. A espessura da pele do porco foi a mais próxima da espessura da pele humana. As espessuras apresentadas no estudo para porcos foram de um estrato córneo de $17,5 \pm 2,4 \mu\text{m}$ e da epiderme de $50,7 \pm 11,4 \mu\text{m}$, já para humanos o estrato córneo apresentou uma espessura de $18,2 \pm 3,3 \mu\text{m}$ e a epiderme, por sua vez, apresentou uma espessura de $51,2 \pm 12,2 \mu\text{m}$.

Esses pesquisadores também extraíram lipídios da pele desses animais e compararam com os lipídios da pele humana. A quantidade de lípidos por centímetro quadrado de porcos foi cerca de 130 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e, para a pele humana, cerca de 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Apesar da diferença entre a quantidade de lipídios dessas espécies, os porcos da Índia, os ratos e cachorros apresentaram mais de 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, demonstrando que a pele do porco tem propriedades mais próximas da pele humana do que os demais animais. Vale ressaltar que a pele é uma barreira composta também de lipídios e eles são um dos componentes que contribuem para a regulação de substâncias que atravessam essa barreira.

No trabalho de Barbero e Frasch (2009) foram comparados diversos estudos de absorção dérmica da pele humana e da pele de porcos para substâncias como medicamentos, hormônios, água, entre outras substâncias, dentre elas as benzofenonas. Os autores sugerem que há uma forte correlação entre a pele humana e de porco, uma vez que as membranas apresentam um coeficiente de correlação entre os estudos de permeação de 0,88 ($P < 0,0001$) e uma interseção próxima de zero. As principais variáveis para estabelecer este coeficiente são o coeficiente de variação, o fator de diferença e o coeficiente de permeação na membrana. A faixa de $0,88 \pm 0,06$ para o coeficiente de correção e a interseção de $0,30 \pm 0,22$ são os parâmetros para uma correlação linear indicando que a pele do porco foi eficaz ao substituir a pele humana nos estudos. Além disso, os estudos avaliados indicaram uma maior permeação dérmica da pele do porco quando comparada à pele humana. O autor também sugere que membranas com muito pêlo não são adequadas para estudos de permeação dérmica, isso pode indicar mais um ponto positivo para a utilização da pele de suínos.

2 JUSTIFICATIVA

O atual cenário de intenso crescimento da população demanda que as fontes potenciais de abastecimento público sejam utilizadas também como receptoras de esgotos domésticos, efluentes industriais e hospitalares, resíduos da agricultura, entre outros. Além disso, por consequência desse crescimento há a intensificação de atividades industriais e do agronegócio. Tal quadro tem levado a um aumento significativo dos níveis de contaminação de águas por substâncias químicas danosas e/ou potencialmente perigosas à saúde humana e ao meio ambiente.

Diante disso, a disponibilidade e qualidade hídrica vem chamando a atenção de órgãos internacionais e cientistas. No modelo tecnológico atual, o custo do acesso e da tratabilidade da água e o acelerado processo de degradação dos recursos naturais tornam imprescindível o estabelecimento de regulações e processos que visem garantir o abastecimento da população com um produto seguro.

O sistema de tratamento da água convencional utilizado no Brasil se baseia na pré-filtração, coagulação, floculação, decantação e desinfecção. Entretanto, essas etapas dificilmente garantem a remoção completa de contaminantes orgânicos. Ademais, a desinfecção por cloração pode levar a formação de subprodutos potencialmente mais tóxicos e mais persistentes no meio ambiente que o composto original. Alguns desses subprodutos vêm sendo identificados, porém, pouco se sabe acerca do seu potencial tóxico nos diferentes níveis tróficos. A partir disso, torna-se importante o desenvolvimento e adoção de novas políticas de proteção e monitoramento da qualidade dos mananciais e da água tratada.

Há um amplo esforço tanto a respeito da avaliação de toxicidade atrelada à oxibenzona, quanto na compreensão dos processos de formação de subprodutos de degradação desse composto presentes em estações de tratamento de água convencionais. Entretanto, como mostrado no Anexo 7 do Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, que trata do padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde, não são listados filtros ultravioletas e seus subprodutos. Assim, eles não são monitorados e

consequentemente não se sabe sobre a sua produção e remoção pelos processos de tratamento de água convencionais adotados nas estações de tratamento. Dessa maneira, o estudo chama atenção para que esse monitoramento seja regulamentado na portaria.

Além da detecção de subprodutos de cloração, os trabalhos científicos relatam também a possibilidade de os mesmos apresentarem potencial tóxico e capacidade de absorção iguais ou superiores ao do composto original. Assim, torna-se importante realizar a caracterização e avaliação da toxicidade das substâncias formadas nas estações de tratamento de água e que podem ser distribuídas ao consumidor final.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi identificar subprodutos de degradação da oxibenzona formados a partir da cloração e avaliar seu potencial de absorção dérmica para estimativa de seu potencial tóxico.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Padronizar no Laboratório de Toxicologia as condições experimentais de cloração que mimetizam as estações de tratamento de água para obtenção dos subprodutos da oxibenzona.
- Avaliar a capacidade de permeação dérmica dos subprodutos de degradação da oxibenzona.
- Auxiliar na tomada de decisão em relação à qualidade de águas no que diz respeito à inserção de seus subprodutos na lista de substâncias obrigatoriamente monitoradas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Lavagem de Vidrarias

As vidrarias utilizadas foram lavadas com detergente neutro Extran, o qual não contém surfactantes potencialmente interferentes na ionização para análise por espectrometria de massas, e colocadas em banho de ácido nítrico a 20%, com intuito de eliminar qualquer substância orgânica presente nelas, por 24 horas. Em seguida, as vidrarias foram enxaguadas com água ultrapura e colocadas na estufa, quando pertinente, também por 24 horas.

4.2 Experimento de Cloração

Para a padronização das condições ideais de cloração, foram testadas três proporções diferentes entre cloro e oxibenzona. Para tal, pipetou-se 1 ml da solução estoque de oxibenzona 1g/L em um balão volumétrico de 100 mL e diluiu-se com água ultrapura até completar o volume, resultando em uma concentração de 10 mg/L (solução estoque de oxibenzona). Em seguida, todo o conteúdo foi transferido para um béquer para realizar os experimentos de degradação.

Para o primeiro experimento, a partir da solução estoque de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 10% doada pela SANEOURO, empresa responsável pela prestação de serviços de água da cidade de Ouro Preto, pipetou-se 14 μ L para um béquer contendo 30 mL da solução de oxibenzona preparada anteriormente, obtendo assim 22,08 mg/L de cloro ou 46,34 mg/L de NaOCl. Isso resulta em uma proporção 3:1 de cloro livre por carbono de oxibenzona e relação molar de 14,30 mols de oxibenzona por mol de NaOCl.

Para o segundo experimento, as diluições foram feitas de modo que a proporção 3:1 entre as massas de NaOCl e oxibenzona fossem alcançadas para realizar os testes de degradação. A relação molar deste experimento foi de 9,23 mols de oxibenzona por mol de NaOCl. Já para o terceiro experimento, foi utilizada a solução trabalho de oxibenzona a 10 mg/L e a solução de NaOCl a 10% foi diluída obtendo uma relação mássica de 1:1 e relação molar de 3,07 mol de oxibenzona por mol de NaOCl.

Para cada um dos experimentos, utilizou-se 460 µg/L, 300 µg/L e 100 µg/L de solução de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) na concentração inicial de 100 g/L, a qual foi adicionada ao béquer com objetivo de parar a reação. Foi utilizada a mesma proporção do Na₂S₂O₃ e de NaOCl para os experimentos. Além disso, foi utilizada água ultrapura com as mesmas concentrações de NaOCl e Na₂S₂O₃ para o branco químico. As condições de cada uma das reações descritas constam na **Tabela 2**.

Tabela 2: Condições das reações de degradação da oxibenzona.

Condições das reações para obtenção de subprodutos da oxibenzona			
Compostos	Experimento degradação 1	Experimento degradação 2	Experimento degradação 3
Oxibenzona	10mg/L	10mg/L	10mg/L
NaOCl	3mg de Cl por 1mg de C (22,08mg de Cl = 46,3mg/L de NaOCl)	30mg/L	10mg/L
Na ₂ S ₂ O ₃	46,3 mg/L	30 mg/L	10 mg/L

Fonte: (AUTORA, 2023).

As soluções foram mantidas sob agitação constante, à temperatura ambiente. O experimento foi realizado em triplicata sendo coletadas alíquotas de 1 mL nos tempos de reação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 e 120 minutos. No segundo e terceiro experimentos, o mesmo procedimento foi repetido, porém com os tempos de coleta de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Nos últimos experimentos foram adotados tempos reduzidos para adequar melhor às condições de uma estação de tratamento de água. Nessas estações a água fica em contato com o cloro não mais que 60 minutos. Após a coleta da solução em cada um dos tempos nos devidos *vials*, a análise semi-quantitativa foi realizada.

4.3 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

As análises semi-quantitativas da oxibenzona e seus subprodutos de cloração foram realizadas por injeção direta em um cromatógrafo líquido UHPLC, modelo Nexera X2 (Shimadzu®), equipado com um amostrador automático (modelo SIL-30AC) e um sistema binário de bombas (modelo LC-30AD), acoplado à espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo, modelo LCMS-8040 (Shimadzu®). Nenhuma separação cromatográfica foi realizada. O sistema de bomba e um injetor automático foram utilizados para a ionização direta de amostra no electrospray (ESI) e análise por espectrometria de massa. Essa abordagem garante a injeção de volumes exatos de amostras.

Como fase móvel utilizou-se água ultrapura e acetonitrila (grau HPLC), ambos modificados com ácido fórmico 0,1% (v/v) com intuito de melhorar a visualização do sinal no equipamento, a um fluxo de 0,2 mL/min isocrático 50%. O tempo de análise foi de 5 minutos.

Foi feita a injeção de 10 µL de amostra para a análise semi-quantitativa da oxibenzona e uma segunda injeção de 50 µL para a identificação dos subprodutos formados.

O LCMS-8040 (Shimadzu®) possui três analisadores de massa em série: um quadrupolo que faz a seleção do íon precursor; uma célula de colisão que fragmenta o íon precursor selecionado no primeiro quadrupolo por dissociação induzida por colisão (CID); e um segundo quadrupolo que seleciona os fragmentos gerados na colisão para a posterior detecção. Foi utilizada fonte de ionização do tipo electrospray (ESI) com tensão da interface de 4,5 kV no modo de ionização positivo e de 3,5 kV no modo negativo.

A análise de degradação da oxibenzona foi realizada em método MRM (Monitoramento de reações múltiplas). As relações massa/carga (m/z) dos íons de transição foram: 229,20>150,90; 229,20>104,95; 229,20>77,05. As análises de identificação dos subprodutos foram feitas no modo SCAN nos dois modos de ionização. Foram monitorados íons com relação m/z de 50 a 350.

As condições de operação do espectrômetro de massas para cada busca (oxibenzona e subprodutos) foram: temperatura da linha de dessolvatação de

230 °C; temperatura do bloco de aquecimento de 400 °C. Nitrogênio (N₂) foi usado como gás nebulizador (2 L/min) e gás de secagem aquecido (12 L/min). Argônio 5.0 foi usado como gás de dissociação induzida por colisão (CID).

4.4 Ensaio de Permeação Dérmica em Pele de Porco

O ensaio de permeação dérmica foi realizado segundo o protocolo OECD nº 428 (*Skin Absorption: in vitro method*) com adaptações. Este protocolo permite a utilização de pele de porcos para esse tipo de estudo, uma vez que há grande similaridade dessa membrana com a pele humana (OECD, 2004).

4.4.1 Preparo da Pele

Para a realização do teste, a pele da região interna da orelha de três porcos foi utilizada. A pele foi obtida de animal sacrificado recentemente em abatedouro local e mantida resfriada a 4 °C até o momento do preparo no dia seguinte. Para tal, inicialmente as orelhas foram limpas com auxílio de água destilada e algodão. A pele foi separada da cartilagem e do tecido gorduroso com a ajuda de tesoura e bisturi, acondicionada em plástico filme e congelada a -20 °C para posterior utilização.

Na noite anterior à utilização, a pele foi retirada do freezer e mantida sob refrigeração a 4 °C até a manhã posterior para descongelamento. No momento do uso, a pele dos três animais foi mantida em água com pH 7,4 controlado por ácido clorídrico e hidróxido de sódio concentrados, a temperatura ambiente, por 30 minutos para reidratação. Os discos com área de 177 mm² foram então cortados e separados por animal para que cada réplica experimental utilizasse a pele oriunda de animais diferentes. A integridade de cada membrana foi verificada por inspeção visual.

4.4.2 Ensaio de Permeação em Célula de Difusão

O estudo da permeação dérmica da BP-3 e dos subprodutos formados após a cloração foi realizado no equipamento de célula de difusão vertical Hanson Research, modelo Phoenix RDS, composto por seis células individuais

em banho termostatzado à 32°C e sob agitação constante de 350 rpm. A área de difusão foi de 177 mm² e o volume do meio receptor foi de 22 mL. As células foram separadas em três grupos (duplicata) como se segue: Células 1 e 2 - Branco químico (Na₂S₂O₃ e NaOCl); Células 3 e 4 - Controle oxibenzona sem degradação; Células 5 e 6 - Subprodutos de degradação da oxibenzona após 30 minutos de tratamento.

Segundo o guia OECD, o qual preconiza a conduta dos estudos de permeação dérmica, a escolha da solução utilizada deve ser compatível com a preparação da pele e deve condizer com os parâmetros de solubilidade da substância em teste (OECD, 2004). Portanto, o meio receptor era composto de água a pH 7,4, uma vez que a solubilidade foi verificada.

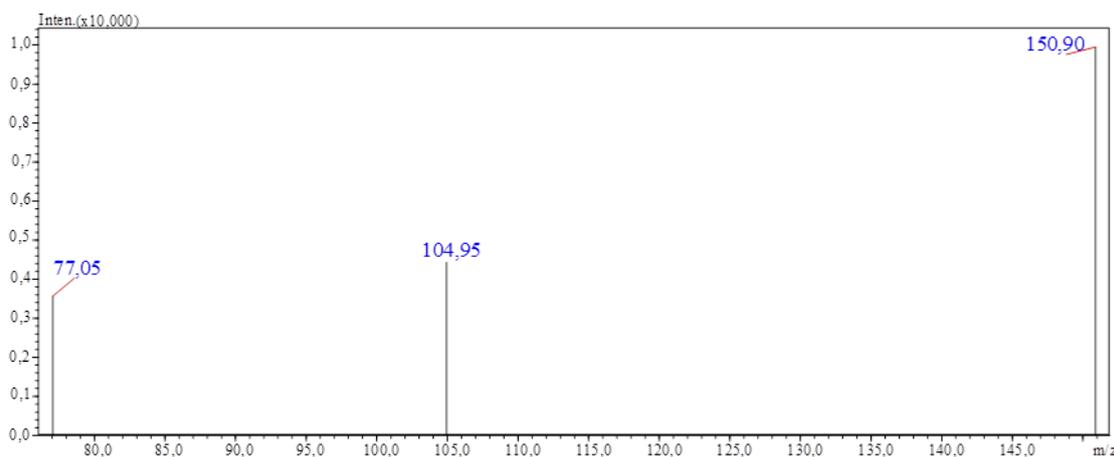
Para cada célula, 1 mL dos meios doadores foi colocado diretamente sobre a pele excisada. O experimento foi realizado em sistema estático com dose finita do meio doador. Os tempos de coleta foram de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 22, 23 e 24 horas e o volume coletado foi de 1 mL. Após cada coleta, houve a reposição com meio receptor para manutenção das condições do sistema. Após 24 horas, o meio doador restante em cada célula foi coletado, a pele foi lavada com 1 mL de água a pH 7,4. O meio doador e o lavado também foram analisados por espectrometria de massas para que se obtivesse uma estimativa da absorção conforme preconizado no protocolo OECD nº428.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da degradação da oxibenzona foi realizada após injeção direta das soluções sem e após o tratamento por cloração, utilizando a intensidade absoluta do íon 150,90 (Figura 4). Conforme a metodologia de Garcia e colaboradores (2011) que monitora a oxibenzona (m/z 229,0) por LC/MS utilizando o íon m/z 150,90. O íon m/z 150,90 foi selecionado por ser o mais intenso entre os analisados, sendo possível sua detecção até mesmo em menores concentrações, como demonstrado na Figura 4.

Para Pilli e colabores (2021) o composto analisado teve uma resposta proeminente no íon precursor protonado de 229,0 m/z. Este íon foi fragmentado e o íon 151,2 teve maior proeminência de fragmentação para a oxibenzona. No estudo de Meinerling e Daniels (2006) também foi utilizado o íon de fragmentação m/z 151,1 produto do íon m/z 229,0 por LC-MS/MS para quantificação da oxibenzona. Os íons m/z 77,05 e m/z 104,95 de intensidades maiores, além do 150,90, também foram selecionados para identificação da oxibenzona, **Figura 4**.

Figura 4: Espectro adquirido por espectrometria de massas no modo de aquisição MRM (*multiple reaction mode*) evidenciando os íons positivos da oxibenzona.



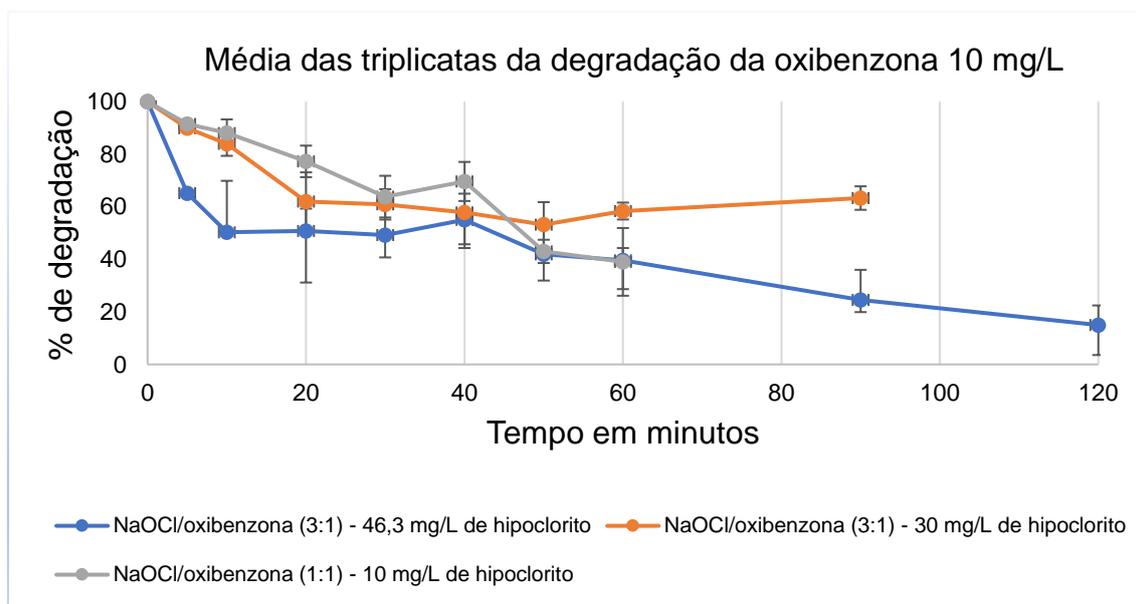
Fonte: (AUTORA, 2023).

5.1 Degradação da Oxibenzona

Com o intuito de obter uma melhor e mais concentrada formação de subprodutos de degradação a ser analisada por espectrometria de massas, as concentrações do NaOCl são diferentes em cada ensaio.

A degradação foi avaliada pela diferença de intensidade do íon 150,90 no tempo 0, sem adição de NaOCl, e os demais tempos, após o contato com o hipoclorito. A média da porcentagem dessa degradação para cada experimento durante os tempos coletados em triplicata em cada um dos meios reacionais é apresentada na Figura 5.

Figura 5: Gráfico degradação da oxibenzona por cloração, utilizando diferentes concentrações de NaOCl.



Fonte: (AUTORA, 2023).

No experimento de degradação a relação cloro livre por carbono de oxibenzona (3:1), foi possível observar, entre os tempos 0 e 20 minutos, uma maior degradação da oxibenzona pelo hipoclorito de sódio em relação aos demais tempos, uma vez que a quantidade da oxibenzona restante foi de 50%. Essa degradação mais efetiva pode ter ocorrido devido à maior concentração de NaOCl em relação aos demais experimentos de degradação.

Entre estes mesmos tempos de 0 a 20 minutos, a média de degradação NaOCl/oxibenzona (3:1), indica degradação da oxibenzona restando 61% do composto e a curva da relação 1:1 apresenta uma menor degradação restando

77% da oxibenzona. Este resultado pode ser consequência das concentrações de 30 mg/L e 10mg/L do hipoclorito de sódio. Além disso, estas doses menores foram adotadas na tentativa de uma visualização melhor da degradação da oxibenzona e da formação de seus subprodutos.

No estudo de Zhang e colaboradores (2016) foram aplicadas diferentes concentrações de cloro livre pelo menos 10 vezes maiores que a concentração de BP-3 (1 mg/L) para avaliação da influência das doses de cloro na cinética da reação. A BP-3 foi rapidamente degradada pelo cloro e observou-se uma meia-vida do composto entre 26 e 43 segundos com as doses de cloro aumentando entre 3 e 5 mg/L. A degradação mais rápida da oxibenzona do que a degradação apresentada no experimento deste trabalho, pode ter ocorrido devido às doses superiores utilizadas pelos autores.

Dessa maneira, tem-se um indicativo de que a oxibenzona ou BP-3 pode ser facilmente e rapidamente degradada pelo cloro. É possível observar no gráfico apresentado neste estudo que as concentrações mais elevadas de cloro degradam a oxibenzona com mais intensidade que concentrações mais baixas, assim como exemplificado na literatura.

Em relação aos outros tempos apresentados no gráfico, a curva cloro livre/carbono de oxibenzona (3:1) entre os tempos 20 e 60 min, não apresentou grande variação da porcentagem de oxibenzona não degradada. Já na degradação sob a condição de relação NaOCl/oxibenzona (3:1) até o tempo 50 min, ocorre um aumento considerável e esperado da degradação observado pelo decaimento da quantidade de oxibenzona de 62% para 53%. Entretanto, do tempo 50 para o tempo 60 minutos o gráfico apresenta um aumento do percentual do composto de 53% para 58%. Essa maior porcentagem do composto restante em relação ao tempo anterior, pode indicar que ainda há um consumo do subproduto pelo cloro residual. Na curva de degradação da relação 1:1, entre esse intervalo de tempo, a quantidade de oxibenzona restante caiu de 77% para 39%. Entretanto, no tempo de 40 minutos, é possível observar um aumento no percentual para 69%, esse aumento também pode indicar um consumo do subproduto pelo cloro residual.

Apenas no experimento de degradação, 3:1 cloro livre/carbono de oxibenzona, foi avaliada a degradação com tempos superiores a 60 minutos e, nesta, a quantidade restante do composto avaliado decaiu de 39% para 14%.

Em outras condições de degradação, a oxibenzona apresenta degradação mais intensa. No experimento de Zhuang e colaboradores (2013) com concentrações até mesmo superiores de BP-3 em ambiente protegido da luz, foi feita a reação da BP-3 a 5,0 mg/L com NaOCl a 1,4 mg/L. Os autores verificaram uma rápida reação entre os componentes, a BP-3 foi consumida em menos de 15 minutos. Já sob condições de ausência da luz e pH elevados, outro estudo sugere uma degradação mais intensa da BP-3 (DUIRK; BRIDENSTINE; LESLIE, 2013).

5.2 Identificação de Subproduto de Degradação

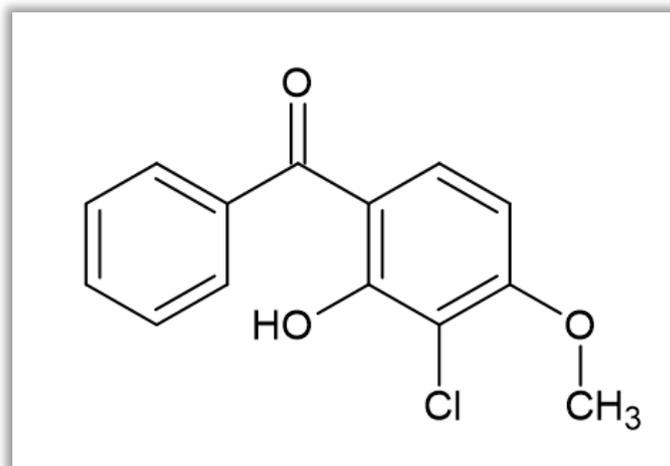
Na análise no modo SCAN da LC-MS/MS pelo monitoramento dos íons com relação m/z de 50 até 350 para os experimentos 1 e 2 de degradação, não foi possível a visualização de subprodutos de degradação no modo de ionização positivo e negativo. Dessa forma, há um indicativo de que os subprodutos realmente não foram formados. A ausência de subprodutos nos dois primeiros experimentos pode ter ocorrido porque o excesso de cloro pode ter degradado até mesmo os subprodutos possivelmente formados. Por outro lado, também é possível que ocorra pouca formação de subproduto e o espectrômetro de massas não foi capaz de detectar essa quantidade, pois a intensidade pode ter sido abaixo do limite do equipamento.

As concentrações de cloro em relação à oxibenzona utilizadas nos experimentos 1 e 2 foram superiores às concentrações do experimento 3, o qual foi utilizado para visualização do subproduto. Caso fossem feitos outros experimentos a respeito da degradação da oxibenzona, seria interessante utilizar uma concentração entre a concentração do primeiro experimento de 30 mg/L de hipoclorito de sódio e 10 mg/L para que fosse possível aproximar mais ainda mais das condições reais das estações de tratamento de água.

Na análise do experimento 3 feito com a relação 1:1 de massa de oxibenzona e NaOCl, no modo SCAN do LC-MS/MS, foi identificado subproduto

263 m/z no modo positivo de ionização que representa a oxibenzona monoclorada. O indicativo da adição do cloro na estrutura da oxibenzona é a relação da abundância isotópica de 3:1. Zhang e colaboradores (2016) utilizam essa mesma relação molar para justificar a adição do cloro na estrutura e os autores propõem que uma substituição eletrofílica de um dos átomos de hidrogênio pelo cloro formou o subproduto apresentado na **Figura 6**.

Figura 6: Estrutura da oxibenzona monoclorada.



Fonte: (AUTORA, 2023).

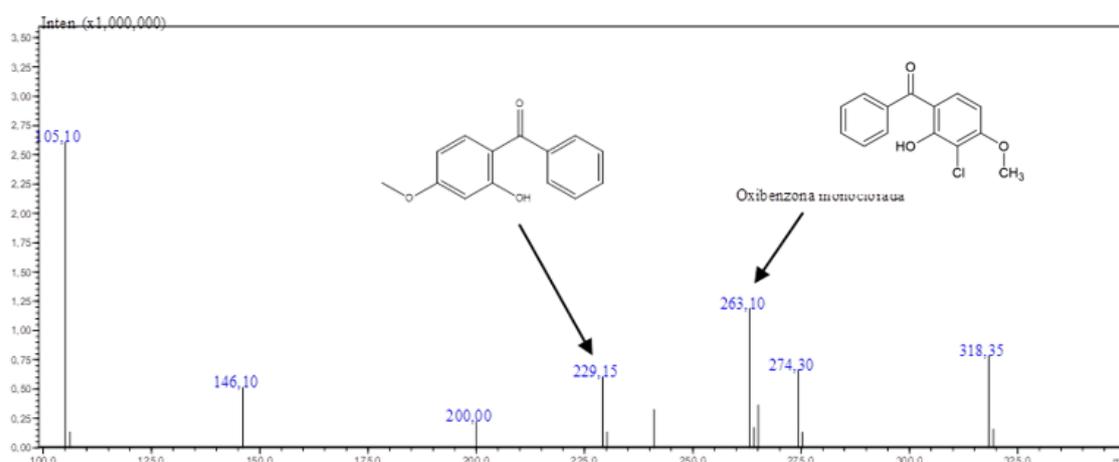
O subproduto m/z 261,1 foi caracterizado por Zhang e colaboradores (2016) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, porém, o autor identifica o composto no modo negativo de ionização. Além disso, não foram detectados subprodutos no modo positivo. Neste estudo, foi identificada a oxibenzona monoclorada de massa molar 262, a qual sua formação pode ser justificada pela abundância isotópica do cloro (Figura 8). O composto oxibenzona monoclorada (262 g/mol), no modo positivo o composto ioniza ganhando íons e no modo negativo, perde íons.

Neste mesmo estudo de Zhang e colaboradores (2016), os autores utilizaram a concentração inicial de BP-3 de 1 mg/L e diferentes doses de cloro livre para avaliar a cinética da reação. A BP3 monoclorada foi observada nos primeiros 5 minutos de tratamento e o experimento avaliou o composto até um pouco mais de 1000 minutos. Além disso, no estudo foram identificados outros dois subprodutos, a BP-3 diclorada (295,1 m/z) e o 2,4,6-tricloro-3-metoxifenol (225,0 m/z).

Com base no perfil de formação do subproduto 263,10 m/z deste experimento, o tempo zero não foi detectado, o composto aparece a partir do tempo 20 minutos e a intensidade absoluta mais alta no tempo de 30 minutos, dessa maneira, foi selecionado este tempo para análise. Após este tempo, é observado um decaimento e, no tempo de 60 minutos, não foi observado o íon m/z 263,10. Isso pode indicar que o subproduto foi degradado pelo cloro. Além disso, o subproduto em questão apresentou intensidades absolutas constantes nos tempos em que foi identificado.

Através do espectro de massas mostrado na **Figura 7**, é possível visualizar a intensidade do íon da oxibenzona monoclorada no pico 263,10 m/z. No tempo de 30 minutos ainda há 63% do composto de acordo com o gráfico de degradação (Figura 5), o pico 229,15 m/z representado no espectro de massas é a oxibenzona a qual ainda não foi totalmente degradada. Os demais picos são íons do branco químico e não representam subprodutos de degradação.

Figura 7: Espectro de massas obtido após 30 minutos de tratamento.



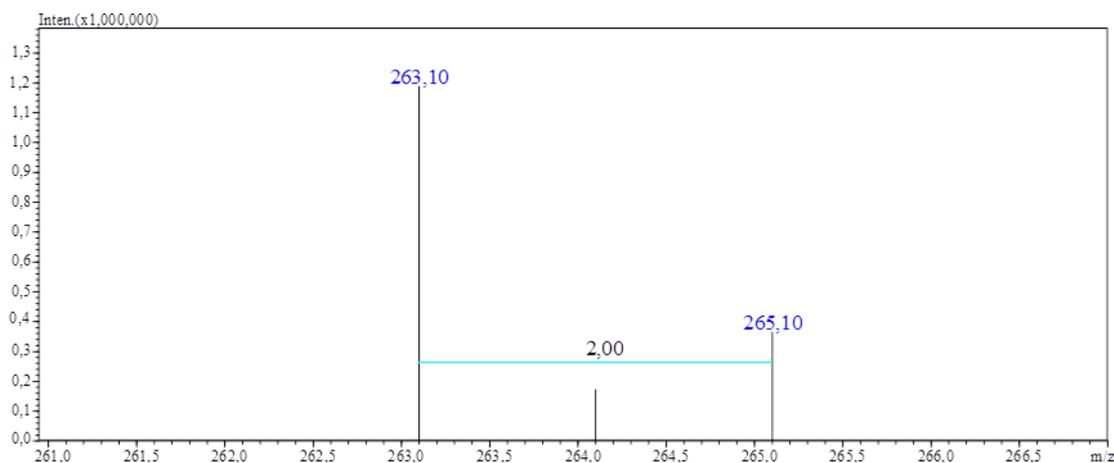
Fonte: (AUTORA, 2023).

Zhuang e colaboradores (2013) identificaram a BP-3 orto e para substituídas pelo cloro sob condições de concentrações mais elevadas de BP-3 em relação ao cloro. Entretanto, neste estudo e no estudo de Zhang e colaboradores (2016) foi proposta apenas a oxibenzona monoclorada na posição *orto* à hidroxila. O grupo hidroxila é um substituinte responsável por ativar fortemente nas posições *orto* e *para* de anéis benzênicos. Além disso, a metoxila é um ativante moderado e orienta na posição *orto*, uma vez que a posição *para* já está ocupada. Já a carbonila ligada ao anel benzênico não substituído da

oxibenzona é um desativante moderado e orienta substituições na posição *meta*. Portanto, a posição mais estável e favorecida para cloração no anel benzênico substituído da oxibenzona, é na posição *orto* à hidroxila. Entretanto, outros subprodutos clorados em outras posições podem ser formados em outras posições.

O espectro de massas da **Figura 7** apresenta a relação isotópica do cloro, entretanto, na **Figura 8**, tem-se uma melhor visualização desta relação através dos íons m/z 263,10 e m/z 265,10. O subproduto m/z 265,10 é o isótopo de cloro menos abundante de massa 37 g/mol. Já o íon m/z 263,10 representa o isótopo de cloro de massa 35 g/mol. Isso justifica a intensidade do íon m/z 265,10 ser $\frac{1}{3}$ da intensidade do íon m/z 263,10.

Figura 8: Relação isotópica no espectro de massas obtido após 30 minutos de tratamento.



Fonte: (AUTORA, 2023).

5.3 Experimento de Avaliação da Permeação Dérmica

5.3.1 Teste de Estabilidade

Anteriormente ao ensaio de permeação dérmica, foi verificada a estabilidade da oxibenzona e de seu subproduto de degradação (263,10 m/z) em água para garantir que esses seriam estáveis durante o tempo do ensaio. Na avaliação semi-quantitativa da intensidade absoluta dos dois compostos, identificou-se a variação de 3,4% para a oxibenzona e de 4,8% para o subproduto após as 48 horas do fim do experimento. Essa variação é menor que 10% e, de acordo com a OECD (2004), é aceitável, representando que os dois

compostos são estáveis em água. Dessa forma, é possível avaliar a permeação sem interferência de degradação do composto na solução.

5.3.2 Difusão de Células

Neste experimento não foi observada a oxibenzona e seu subproduto no compartimento receptor nas análises semi-quantitativas posteriores. Já no compartimento doador e na lavagem foram identificados os compostos.

A intensidade do íon m/z 229,15 inicial de oxibenzona sem tratamento (tempo 0) e após cloração (tempo 30) e do subproduto no tempo 30 minutos foi considerado como 100%. Este valor foi utilizado com intuito de comparação das intensidades dos íons nos compartimentos doador, receptor e na lavagem durante o experimento que foram representados como porcentagem relativa.

Uma vez que não foi observado o composto no compartimento receptor, é possível que os compostos tenham ficado retidos na pele do porco ou permanecido no compartimento doador. Deste modo, foram feitas as análises dos dois compartimentos e da lavagem para determinar essa quantidade em relação a injeção inicial.

Para calcular a quantidade de subproduto retida na própria membrana da pele do porco, subtraiu-se o valor da quantidade inicial do subproduto (100%) da soma das quantidades restantes do composto no compartimento doador e da lavagem. Conforme a equação 1.

$$\begin{aligned} \% \text{ inicial} - \% \text{ receptor} + (\% \text{ doador} + \% \text{ lavagem}) &= \% \text{ retida na pele} \\ 100\% - 0\% + (8,8\% + 4\%) &= 87,2\% \end{aligned} \quad (1)$$

O mesmo cálculo foi realizado para determinar a quantidade de oxibenzona sem tratamento retida na membrana do porco. Conforme a equação 2.

$$\begin{aligned} \% \text{ inicial} - \% \text{ receptor} + (\% \text{ doador} + \% \text{ lavagem}) &= \% \text{ retida na pele} \\ 100\% - 0\% + (11,4\% + 13,4\%) &= 71,8\% \end{aligned} \quad (2)$$

A equação 3 apresenta este cálculo para determinar a quantidade de oxibenzona após cloração retida na membrana do porco.

$$\% \text{ inicial} - \% \text{ receptor} + (\% \text{ doador} + \% \text{ lavagem}) = \% \text{ retida na pele} \quad (3)$$

$$100\% - 0\% + (14,8\% + 3,1\%) = 85,6 \%$$

Os valores das porcentagens da oxibenzona não degradada (tempo 0), oxibenzona degradada (tempo 30) e do subproduto detectado no tempo 30 minutos, estão descritas na Tabela 3 em cada um dos compartimentos da célula e da lavagem.

Tabela 3: Quantidades de oxibenzona e de seu subproduto na difusão de células.

	Tempo 0		Tempo 30	
	Oxibenzona sem tratamento	Oxibenzona após cloração	Oxibenzona	Subproduto
% Receptor	0	0	0	0
% Doador	11,4	14,8	14,8	8,8
% Lavagem	3,1	13,4	13,4	4
% Restante + lavagem	14,4	28,2	28,2	12,8
% Retida na pele	85,6	71,8	71,8	87,2

Fonte: (AUTORA, 2023).

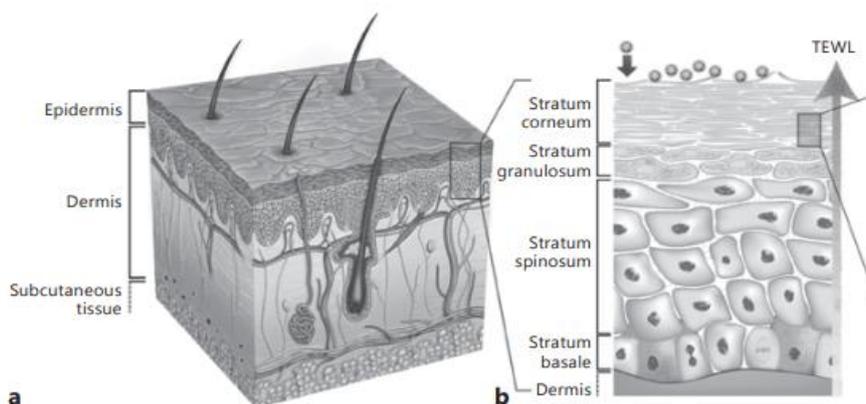
A retenção dos compostos na pele do porco pode ser explicada devido à sua lipossolubilidade. Segundo Balmer e colaboradores (2005), o baixo log Kow influencia no caráter lipofílico da BP-3 e, conseqüentemente, na interação com a membrana da pele.

Os logs de Kow foram calculados teoricamente para a oxibenzona e para a oxibenzona monoclorada pelo programa *Chemdraw*. Os valores encontrados para a oxibenzona foram de 2,73 e para o subproduto de 3,29. Esse aumento do log de Kow do subproduto em relação à oxibenzona, pode indicar um maior caráter lipofílico do subproduto e apresentar maior afinidade pelo estrato córneo da membrana da pele.

Dessa maneira, tem-se um indicativo da possibilidade de o composto também ficar retido na pele humana, uma vez que essa tem composição similar à pele de porcos. Rosenberg e colaboradores (2021) mostram no estudo de comparação da membrana do animal com a humana, uma variação baixa entre a espessura da derme e epiderme do porco e do ser humano. Ademais, os autores encontraram mais de 100 tipos de componentes em comum na pele humana e de porcos como fosfolipídeos, colesterol e diacilgliceróis.

Na Figura 9, é possível observar que na barreira mais externa da pele humana, o estrato córneo, o qual tem função de controle da perda de água do corpo, bem como, controle de substâncias que possam penetrar na pele. Esse é composto por lipídeos (VAN SMEDEN; BOUWSTRA, 2016), os quais tem composição similar aos lipídeos da pele de porcos (ROSENBERG et al., 2021). Uma vez que uma substância é capaz de passar pelo estrato córneo e chegar na derme, a qual é uma região vascularizada, esta substância pode chegar à circulação sanguínea e ter uma absorção sistêmica (HAZAMA et al., 2016). O compartimento receptor deste estudo simula a circulação sanguínea devido ao seu pH igual ao pH sanguíneo. Dessa maneira, como os compostos analisados não foram detectados no compartimento receptor, tem-se um indicativo de que esses ficaram no extrato córneo da membrana do porco e não chegaram aos capilares da derme e à circulação sanguínea.

Figura 9: Corte transversal da organização lipídica da pele humana (a) Zoom no tecido. (b) Simulação de substâncias entrando na barreira mais externa da pele, o estrato córneo.



Fonte: adaptado de (Van Smeden & Bouwstra, 2016).

Para uma análise com intuito de comprovação da retenção do subproduto na pele, deveria ser feita uma trituração e extração da pele para avaliação semi-quantitativa.

Embora, neste estudo a oxibenzona não tenha passado pela membrana da pele do porco, estudos de difusão de células utilizando a pele humana mostram uma quantidade de 0,4% a 1,6% no compartimento receptor (GU et al., 2005a). O estudo apresentado também utilizou um sistema automático de difusão transdérmica para o ensaio e avaliou o composto durante 6 horas.

Em outro estudo deste autor, os pesquisadores utilizaram surfactante no compartimento receptor, o que pode ter contribuído com melhores análises, pois o surfactante contribui com a melhor solubilidade do composto. O estudo indicou uma absorção de cerca de 0,3% da oxibenzona. Além disso, este estudo mostra que a combinação do filtro solar com outros produtos como repelentes pode aumentar a absorção da oxibenzona pela pele (GU et al., 2005b).

Pesquisadores compararam permeação com membrana de porco em veículos diferentes veículos utilizados em formulações de protetores solares como PEG-400, propileno glicol e etanol. O filtro solar veiculado ao PEG-400 apresentou menor absorção na membrana (GU et al., 2004). A avaliação dos veículos dos compostos também é interessante pois, como apresentado, a absorção pode variar com as diferentes formulações. Diante desses estudos, é possível verificar que existem mais estudos de permeação dérmica para avaliação da oxibenzona. Além dos apresentados, estudos mais antigos como de Hagedorn-Leweke; Lippold (1995) identificaram a absorção da oxibenzona em pele humana.

Entretanto, ainda são necessários mais estudos de permeação dérmica do subproduto sugerido neste estudo, pois a oxibenzona monoclorada pode ter propriedades físico-químicas similares ao precursor. Isso pode ser justificado pela mudança da molécula apenas da substituição do hidrogênio pelo cloro e da quantidade de retenção semelhante dos compostos na membrana da pele do porco.

Complementar a isso, mais estudos sobre a toxicidade desses compostos também são necessários. Uma vez que, Hayden, Roberts e Benson (1997), mostram em seu estudo absorção sistêmica da oxibenzona e alguns de seus metabólitos, uma vez que os detectaram na urina e no leite materno de voluntários. Alterações hepáticas em *zebra fish* causadas pela exposição à oxibenzona já foram detectadas (ZHANG et al., 2021). Disfunções em vias hormonais no mesmo modelo animal também já foram identificadas (BLÜTHGEN; ZUCCHI; FENT, 2012). Além de metabólitos da benzofenona-3 apresentarem genotoxicidade *in vitro* (ZHANG et al., 2021).

A toxicidade a longo prazo de compostos presentes em protetores solares ainda foi pouco estudada (GU et al., 2004). Ademais, a oxibenzona vem

impactando o meio ambiente como apresentado em estudos em diversos países (BALMER et al., 2005; DOWNS et al., 2022; KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2009; LI et al., 2007). Isso pode favorecer a formação de subprodutos do composto e impactar na saúde humana.

Dessa forma, este estudo sugere que a oxibenzona e seus subprodutos de cloração deveriam ser incluídos no Anexo 7 do Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, que trata do padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde.

6 CONCLUSÃO

A oxibenzona é degradada pelo cloro e pode formar subprodutos como a oxibenzona monoclorada detectada neste estudo. Concentrações mais baixas de cloro contribuíram para a melhor detecção do sinal do subproduto da oxibenzona por LC-MS/MS. Tanto a oxibenzona, quanto seu subproduto não ultrapassaram a membrana da pele do porco, mas ficaram retidos nela. Entretanto, para uma melhor avaliação deste acúmulo, são necessários mais estudos. No projeto que inclui esse trabalho ainda serão feitos estudos *in vivo* no modelo *zebra fish* para uma melhor avaliação do potencial tóxico crônico e agudo dos subprodutos de cloração da oxibenzona.

A partir dos experimentos de degradação pelo cloro que mostram que a oxibenzona não é totalmente degradada pelas concentrações utilizadas em estações de tratamento de água do desinfetante e do acúmulo dos compostos observados na membrana da pele do porco potencialmente tóxicos, se torna interessante incluir os compostos deste estudo na lista de substâncias monitoradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALMER, M. E. et al. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 4, p. 953–962, 15 fev. 2005.

BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 23, n. 1, p. 1–13, fev. 2009.

BAYNES, R. E. Porcine skin flow-through diffusion cell system. **Current protocols in toxicology**, v. Chapter 5, 2001.

BENS, G. Sunscreens. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 810, p. 429–463, 2014.

BLÜTHGEN, N.; ZUCCHI, S.; FENT, K. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 263, n. 2, p. 184–194, 1 set. 2012.

BRASIL. Anexo XX da Portaria de Consolidação no 5 do Ministério da Saúde de 03 de outubro de 2017.

DA SILVA, C. P.; EMÍDIO, E. S.; DE MARCHI, M. R. R. The occurrence of UV filters in natural and drinking water in São Paulo State (Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19706–19715, 1 dez. 2015.

DIAZ, J. H.; NESBITT, L. T. Sun exposure behavior and protection: recommendations for travelers. **Journal of travel medicine**, v. 20, n. 2, p. 108–118, mar. 2013.

DOS, S. et al. Environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induce differential histopathological responses in gills and liver of freshwater fish. [s.d.].

DOWNS, C. A. et al. Oxybenzone contamination from sunscreen pollution and its ecological threat to Hanauma Bay, Oahu, Hawaii, U.S.A. **Chemosphere**, v. 291, n. Pt 2, 1 mar. 2022.

DUIRK, S. E.; BRIDENSTINE, D. R.; LESLIE, D. C. Reaction of benzophenone UV filters in the presence of aqueous chlorine: Kinetics and chloroform formation. **Water Research**, v. 47, n. 2, p. 579–587, 1 fev. 2013.

EKPEGHERE, K. I. et al. Distribution and seasonal occurrence of UV filters in rivers and wastewater treatment plants in Korea. **The Science of the total environment**, v. 542, n. Pt A, p. 121–128, 15 jan. 2016.

GARCIA, H. A. et al. Laccase-catalyzed oxidation of oxybenzone in municipal wastewater primary effluent. **Water research**, v. 45, n. 5, p. 1921–1932, 2011.

GASPARRO, F. P.; MITCHNICK, M.; NASH, J. F. A Review of Sunscreen Safety and Efficacy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 3, p. 243–256, 1 set. 1998.

GLASER, K. S.; TOMECKI, K. J. Sunscreens in the United States: Current Status and Future Outlook. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1268, p. 355–379, 2020.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 11, p. 1152–1161, 30 set. 2007.

GU, X. et al. In-vitro permeation of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) and the sunscreen oxybenzone. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 621–628, 18 fev. 2004.

GU, X. et al. In vitro evaluation of concurrent use of commercially available insect repellent and sunscreen preparations. **The British journal of dermatology**, v. 152, n. 6, p. 1263–1267, jun. 2005a.

GU, X. et al. In vitro evaluation of concurrent use of commercially available insect repellent and sunscreen preparations. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 6, p. 1263–1267, jun. 2005b.

GUSTAVSSON GONZALEZ, H.; FARBROT, A.; LARKÖ, O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. **Clinical and experimental dermatology**, v. 27, n. 8, p. 691–694, 2002.

HAGEDORN-LEWEKE, U.; LIPPOLD, B. C. Absorption of sunscreens and other compounds through human skin in vivo: derivation of a method to predict maximum fluxes. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 9, p. 1354–1360, 1995.

HAYDEN, C. G. J.; ROBERTS, M. S.; BENSON, H. A. E. Systemic absorption of sunscreen after topical application. **Lancet (London, England)**, v. 350, n. 9081, p. 863–864, 20 set. 1997.

HAZAMA, Y. et al. Effect of Physiological Changes in the Skin on Systemic Absorption of Tacrolimus Following Topical Application in Rats. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 39, n. 3, p. 343–352, 1 mar. 2016.

HOPF, N. B. et al. Reflections on the OECD guidelines for in vitro skin absorption studies. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 117, 1 nov. 2020.

IMAMOVIĆ, B. et al. Stability and Removal of Benzophenone-Type UV Filters from Water Matrices by Advanced Oxidation Processes. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 6, 1 mar. 2022.

KARAN, A.; ALIKHAN, A.; MAIBACH, H. I. Toxicologic implications of cutaneous barriers: a molecular, cellular, and anatomical overview. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 29, n. 7, p. 551–559, out. 2009.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water research**, v. 43, n. 2, p. 363–380, 2009.

LI, W. et al. Occurrence and behavior of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant. **Water research**, v. 41, n. 15, p. 3506–3512, 2007.

LIU, Q. et al. Acute toxicity formation potential of benzophenone-type UV filters in chlorination disinfection process. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 26, n. 2, p. 440–447, 1 fev. 2014.

LIU, Y. S. et al. Biodegradation of the ultraviolet filter benzophenone-3 under different redox conditions. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 31, n. 2, p. 289–295, fev. 2012.

MEINERLING, M.; DANIELS, M. A validated method for the determination of traces of UV filters in fish using LC-MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 386, n. 5, p. 1465–1473, nov. 2006.

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International journal of dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978–986, set. 2010.

NEGREIRA, N. et al. Study of some UV filters stability in chlorinated water and identification of halogenated by-products by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1178, n. 1–2, p. 206–214, 18 jan. 2008.

OECD. GUIDANCE DOCUMENT FOR THE CONDUCT OF SKIN ABSORPTION STUDIES. p. 1–31, mar. 2004.

PILLI, N. R. et al. Novel simultaneous method for the determination of avobenzene and oxybenzone in human plasma by UHPLC-MS/MS with phospholipid removal pretreatment: An application to a sunscreen clinical trial. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 1169, 15 abr. 2021.

PULSONI, I. et al. Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models. **SLAS technology**, v. 27, n. 3, p. 161–171, 1 jun. 2022.

RAMOS, S. et al. A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. **Environment international**, v. 86, p. 24–44, 1 jan. 2016.

ROSENBERG, L. K. et al. A Comparison of Human and Porcine Skin in Laser-Assisted Drug Delivery of Chemotherapeutics. **Lasers in surgery and medicine**, v. 53, n. 1, p. 162–170, 1 jan. 2021.

SATO, K.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 80, n. 2, p. 104–107, 1991.

SHAATH, N. A. Ultraviolet filters. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 9, n. 4, p. 464–469, 2010.

SHERWOOD, V. F. et al. Altered UV absorbance and cytotoxicity of chlorinated sunscreen agents. **Cutaneous and ocular toxicology**, v. 31, n. 4, p. 273–279, dez. 2012.

STRICKLAND, P. T. Photocarcinogenesis by near-ultraviolet (UVA) radiation in Sencar mice. **The Journal of investigative dermatology**, v. 87, n. 2, p. 272–275, 1986.

TAWK, A. et al. Chlorination of the β -triketone herbicides tembotrione and sulcotrione: Kinetic and mechanistic study, transformation products identification and toxicity. **Water research**, v. 76, p. 132–142, 1 jun. 2015.

TSUI, M. M. P. et al. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. **Water research**, v. 67, p. 55–65, 18 set. 2014.

VAN SMEDEN, J.; BOUWSTRA, J. A. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. **Current problems in dermatology**, v. 49, p. 8–26, 2016.

WANG, J.; GONG, T.; XIAN, Q. Formation of haloacetic acids from different organic precursors in swimming pool water during chlorination. **Chemosphere**, v. 247, 1 maio 2020.

WANG, S. Q.; TOOLEY, I. R. Photoprotection in the era of nanotechnology. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 30, n. 4, p. 210–213, 2011.

WNUK, A.; KAJTA, M. Is the commonly used UV filter benzophenone-3 a risk factor for the nervous system? **Acta biochimica Polonica**, v. 68, n. 4, p. 557–563, 2021.

ZHANG, S. et al. Chlorination of oxybenzone: Kinetics, transformation, disinfection byproducts formation, and genotoxicity changes. **Chemosphere**, v. 154, p. 521–527, 1 jul. 2016.

ZHANG, Y. et al. Potentiation of lethal and sub-lethal effects of benzophenone and oxybenzone by UV light in zebrafish embryos. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 235, 1 jun. 2021.

ZHUANG, R. et al. Stability and Toxicity of Selected Chlorinated Benzophenone-type UV Filters in Waters. p. 1–8, 2013.