

Mestrado Integrado em Bioengenharia

A areia e o mexilhão como indicadores do impacto dos siloxanos nas zonas costeiras

Tese de mestrado

de

Sofia Helena Rodrigues Ferreira

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

LEPABE

Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia

Orientadores: **Nuno Ratola e Vera Homem**

Departamento de Engenharia Química

5 de julho de 2021

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e ao LEPABE – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia – por garantirem as condições e instalações necessárias para este trabalho. Este trabalho foi financiado por: i) Financiamento Base - UIDB/00511/2020 da Unidade de Investigação - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia – LEPABE – financiada por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC); ii) Projeto “*HealthyWaters – Identification, Elimination, Social Awareness and Education of Water Chemical and Biological Micropollutants with Health and Environmental Implications*”, com referência NORTE-01-0145-FEDER-000069, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Expresso o meu profundo agradecimento aos meus orientadores, Dr. Nuno Ratola e Dr. Vera Homem, por todos os conhecimentos transmitidos, pela paciência e pela constante disponibilidade. A vossa ajuda foi fundamental para a escrita desta dissertação e crescimento pessoal.

A toda a equipa do laboratório E201, obrigada por me terem recebido tão bem e pelo bom ambiente de trabalho que proporcionaram, em especial ao Francisco, Filipe e Fábio, pela forma amiga como me ajudaram.

A todos os meus alunos, por me permitirem realizar o meu sonho de ensinar e por alegrarem os meus dias com a sua energia contagiante.

À Bia, à Cat e à M, por serem as melhores amigas em todos os momentos e por me terem acompanhado tão de perto ao longo destes 5 anos. Adoro-vos a todas! Bia, por teres sido a minha companheira de estudo e das aulas, por todas as infundáveis chamadas, por todos os Kinder bueno e idas às compras, sem ti a faculdade não teria sido a mesma coisa, obrigada.

Ao Luís, por ser a minha força e inspiração, por todo o carinho e amor e por me mostrar o lado mais bonito da vida.

Por último, quero agradecer à minha família, nomeadamente aos meus pais, por me acompanharem ao longo deste percurso, à minha noquinha, por ser a minha melhor amiga para a vida toda, ao Blacky, por ser o meu fiel companheiro e à minha abuelita, por ser a minha inspiração e ensinar-me que “querer é poder, e tu podes!”.

Abstract

Volatile methylsiloxanes (VMSs) have unique physicochemical properties that lead to their use in numerous domestic and industrial applications, highlighting their intensive use in personal care products (PCPs). This is one of the main reasons for the presence of these compounds in the environment, particularly in coastal areas. The analysis of beach sand and mussels can provide important information regarding the distribution of these pollutants in these delicate ecosystems.

Thus, the objective of this work was to analyze the presence of seven VMSs (D3-D6 and L3-L5) in two environmental matrices of coastal zones: sand and mussels. In the first case, sand collected from 20 different beaches in Europe and 26 beaches of the coast of Galicia (Spain) were analyzed using the QuEChERS extraction method, a dispersive solid-phase (d-SPE) extraction technique: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, followed by analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), to establish any geographic concentration profiles. In the second case, a method for extracting VMSs in mussels was developed and validated, based on QuEChERS, with the subsequent analysis of 10 samples collected in the Aveiro estuary (Portugal) and of the coast of Galicia, and the evaluation of the effect of mussel depuration on the siloxane levels found in the samples.

For the development of the extraction method, several tests were performed, using different extraction solvents, sample preparations (lyophilized vs. non-lyophilized) and with or without filtration of the resulting extracts. The protocol in which *n*-hexane was used as an extraction solvent, without lyophilizing the sample and without filtering the respective extracts, obtained the best results. This method was validated, having obtained a linearity of responses in the range of 1 to 1000 µg/L for each VMS studied, with an *r* of 0.999 for all compounds under study. The limits of detection (LOD) were low (between 0.018 and 0.36 pg/g_{wet weight}), allowing the analysis of VMSs at trace levels. The recoveries obtained were good, with an overall mean of 86 ± 6%. The precision (repeatability and intermediate precision) was evaluated through the analysis of the coefficient of variation (CV), and provided very satisfactory results, with mean CVs of 11%. Hence, the method was considered valid for its intended purpose.

As for the levels of VMSs obtained in the sand and mussel samples analyzed, the cyclic VMSs were detected more frequently and in higher concentrations than the linear VMSs, as described in the literature. In sand samples, VMSs concentrations ranged from <LOQ to 115 ng/g_{dry weight}, while in mussels the range was between <LOQ and 30 ng/g_{dry weight}. The effect of mussel depuration was also evaluated, which allowed to reduce the levels of VMSs by approximately one order of magnitude compared to non-depurated mussels.

Therefore, the use of the QuEChERS technique followed by the GC-MS analysis was successful for the analysis of VMSs in both sand and mussels, allowing the distinction between different types of urban pressure (sands) and treatments for consumption (mussels).

Key Words: Volatile Methylsiloxanes (VMSs); Coastal areas; Sand; Mussels; QuEChERS; GC-MS.

Resumo

Os metilsiloxanos voláteis (VMSs) possuem propriedades físico-químicas únicas que levam à sua utilização em inúmeras aplicações domésticas e industriais, destacando-se o seu uso intensivo em produtos de cuidado pessoal (PCPs). Este constitui um dos principais motivos para a presença destes compostos no meio ambiente, nomeadamente nas zonas costeiras. A análise de areia de praias e mexilhão pode fornecer informações importantes quanto à distribuição destes poluentes nestes ecossistemas delicados.

Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em analisar a presença de sete VMSs (D3-D6 e L3-L5) em duas matrizes ambientais de zonas costeiras: areias e mexilhão. No primeiro caso, areias recolhidas em 20 praias diferentes da Europa e em 26 praias da costa da Galiza (Espanha) foram analisadas pelo método de extração QuEChERS, uma técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE): rápida (*Quick*), fácil (*Easy*), barata (*Cheap*), eficaz (*Effective*), robusta (*Rugged*) e segura (*Safe*), seguido da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), de modo a estabelecer eventuais perfis de concentração geográficos. No segundo caso, desenvolveu-se e validou-se um método de extração de VMSs em mexilhão, baseado em QuEChERS, com a posterior análise de 10 amostras recolhidas na ria de Aveiro (Portugal) e na costa da Galiza, avaliando-se ainda o efeito da depuração dos mexilhões nos níveis de siloxanos encontrados nas amostras.

Para o desenvolvimento do método de extração, foram realizados vários testes, utilizando diferentes solventes de extração, preparações de amostra (liofilizada vs. não liofilizada) e com ou sem filtração dos extratos resultantes. O protocolo em que se utilizou *n*-hexano como solvente de extração, não liofilizando a amostra e sem filtração dos respetivos extratos foi o que obteve melhores resultados. Este método foi validado, tendo-se obtido uma linearidade das respostas na gama de 1 a 1000 µg/L para cada VMS estudado, com um *r* de 0,999 para todos os compostos em estudo. Os limites de deteção (LOD) foram baixos (entre 0,018 e 0,36 pg/g_{peso húmido}), permitindo a análise dos VMSs em níveis vestigiais. As recuperações obtidas foram adequadas, com uma média global de 86 ± 6%. A precisão (repetibilidade e precisão intermédia) foi avaliada através da análise do coeficiente de variação (CV), tendo-se obtido resultados bastante satisfatórios, com CVs médios de 11%. Por estes motivos, o método foi considerado válido para o fim a que se destina.

Quanto aos níveis de VMSs obtidos nas amostras de areia e mexilhão analisadas, os VMSs cíclicos foram detetados com maior frequência e em concentrações mais elevadas do que os lineares, tal como descrito na literatura. Nas areias, as concentrações de VMSs variaram entre <LOQ e 115 ng/g_{peso húmido}, enquanto nos mexilhões a gama foi entre <LOQ e 30 ng/g_{peso húmido}. Foi ainda avaliado o efeito da depuração do mexilhão, que permitiu reduzir os níveis de VMSs quase uma ordem de grandeza face aos mexilhões não depurados.

Assim, a utilização da técnica de QuEChERS seguida da análise por GC-MS foi bem-sucedida para a análise de VMSs tanto nas areias como no mexilhão, permitindo a distinção entre diversos tipos de pressão urbana (areias) e de tratamentos para consumo (mexilhões).

Índice

Glossário	VI
1. Enquadramento do projeto	1
2. Introdução	2
2.1 Siloxanos	2
2.1.1 Propriedades físico-químicas	3
2.2 Aplicações dos siloxanos	5
2.3 Distribuição ambiental dos siloxanos e impacte associado	7
2.3.1 Libertação para o meio ambiente	7
2.3.2 Riscos para a saúde humana	8
2.3.3. Efeitos dos VMSs em biota	9
2.4 Metodologias analíticas para a determinação de VMSs em areia e mexilhão.....	11
2.4.1 Técnicas de extração	11
2.4.1.1 Extração sólido-líquido (SLE)	12
2.4.1.2 Extração por ultrassons (USE).....	12
2.4.1.3 Extração em fase sólida (SPE).....	12
2.4.1.4 QuEChERS - <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>	13
2.4.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)	13
3. Estado da Arte	15
4. Metodologia	24
4.1 Reagentes	24
4.2 Preparação de padrões.....	24
4.3 Amostragem	25
4.3.1 Amostragem de areias.....	25
4.3.2 Amostragem dos mexilhões	25
4.4 Métodos de extração.....	28
4.4.1 Extração nas areias	28
4.4.2 Extração em mexilhões.....	29
4.5 Análise instrumental.....	30
4.6 Medidas de controlo da qualidade e gestão de resíduos.....	30
5. Resultados e Discussão.....	31
5.1 Validação do método analítico para a determinação de VMSs em areias.....	31
5.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de VMSs em mexilhões	32
5.3 Estudo dos VMSs em areias.....	36

5.3.1 Areias recolhidas em várias praias europeias.....	36
5.3.2 Areias recolhidas na costa da Galiza, Espanha	41
5.4 Estudo dos VMSs em mexilhões	44
6. Conclusões.....	48
7. Limitações e Trabalho Futuro	49
8. Referências Bibliográficas.....	50
Anexo 1	i
Anexo 2	ii

Índice de tabelas

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos VMSs cíclicos em estudo.	4
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos VMSs lineares em estudo.	5
Tabela 3 - Estudos sobre a determinação de siloxanos em mexilhão, sedimentos e areia.	21
Tabela 4 - Limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada siloxano em estudo, nas areias.....	31
Tabela 5 - Avaliação da exatidão (n=3), da repetibilidade (n=5) e da precisão intermédia (n=3).	35
Tabela 6 - Limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada siloxano em estudo, nos mexilhões..	36
Tabela 7 - Concentrações médias (ng/g _{peso húmido}) de VMSs nas areias dos locais em estudo da Europa (n=2).	37
Tabela 8 - Concentrações médias (ng/g _{peso húmido}) de VMSs nas areias da costa da Galiza (n=2).	41
Tabela 9 - Concentrações médias (ng/g _{peso húmido}) de VMSs em mexilhões da costa da Galiza (Espanha) e da ria de Aveiro (Portugal) (n=2).	44
Tabela A 1 - Equações das retas de calibração e coeficiente de correlação para cada VMS, no estudo das areias.	i
Tabela A 2 - Equações das retas de calibração e coeficiente de correlação para cada VMS, no estudo dos mexilhões.....	i

Índice de figuras

Figura 1 - a) Estrutura de um siloxano linear; b) Estrutura de um siloxano cíclico. R – Grupo funcional, n – número de vezes que a unidade representada é repetida.	2
Figura 2 - Estrutura de um exemplo de: a) metilsiloxano volátil linear (IVMS); b) polidimetilsiloxano (PDMS); c) polietermetilsiloxano (PEMS); d) siloxano funcionalizado.	3
Figura 3 - Esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrómetro de massa.	14
Figura 4 - Localização geográfica dos diferentes locais de amostragem das praias europeias.	26
Figura 5 - Localização geográfica dos diferentes pontos de amostragem na costa da Galiza, Espanha.	27

Figura 6 - Passos de extração com a técnica QuEChERS. a) peneiração; b) tubo com as 5 gramas de areia; c) adição do solvente e do padrão interno; d) vórtex; e) banho de ultrassons; f) adição do conteúdo de QuEChERS; g) vórtex; h) centrifugação; i) recolha do sobrenadante; j) adição do sobrenadante ao tubo contendo o conteúdo do QuEChERS 2; k) vórtex; l) centrifugação; m) recolha do sobrenadante; n) vial com o extrato para análise.....	29
Figura 7 - Recuperação (%) nos ensaios com 3 solventes diferentes (n=2): a) Hex; b) Hex:AE e c) Hex:DCM. Nível de fortificação: 150 ng/g _{peso seco}	33
Figura 8 - Repetição dos 2 melhores ensaios selecionados (n=2). Nível de adição de padrão: 150 ng/g _{peso seco}	34
Figura 9 - Concentração total de VMSs para cada praia da Europa (n=2).....	38
Figura 10 - Variação de cada VMS para o estudo dos VMSs nas areias da Europa (n=2).	39
Figura 11 - Concentração total de VMSs para cada praia da costa da Galiza (n=2).	42
Figura 12 – Variação de cada VMS para o estudo das praias da Galiza (n=2).	43
Figura 13 - Concentração total de VMSs nos mexilhões das praias da Galiza (n=2).	45
Figura 14 - Concentração total de cada VMSs nos mexilhões da ria de Aveiro, depurados e não depurados (n=2).	46
Figura A 1 – Comparação dos níveis de VMSs totais da areia e do mexilhão, para cada praia da Galiza em estudo (n=2).	ii

Glossário

(Ordenado alfabeticamente)

AE – Acetato de etilo

C₁₈ – Octadecilsilano

CTD – *Characteristic Travel Distance* (Distância característica de deslocamento)

CV – *Coefficient of Variation* (Coeficiente de variação)

cVMSs – *Cyclic volatile methylsiloxanes* (Metilsiloxanos voláteis cíclicos)

D3 – Hexametilciclotrisiloxano

D4 – Octametilciclotetrasiloxano

D5 – Decametilciclopentasiloxano

D6 – Dodecametilciclohexasiloxano

DCM – Diclorometano

dp – Diâmetro de partícula

d-SPE – *Dispersive solid-phase extraction* (Extração em fase sólida dispersiva)

ECHA - *European Chemicals Agency*

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

FDA – *Food and Drug Administration*

GCB – *Graphitized Carbon Black*

GC-MS – *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa)

Hex – *n*-hexano

INCI – *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

L2 – Hexametildisiloxano

L3 – Octametiltrisiloxano

L4 – Decametiltetrasiloxano

L5 – Dodecametilpentasiloxano

LB – *Lab Blank* (Branco laboratorial)

LOD – *Limit of detection* (Limite de detecção)

log K_{AW} – *Air-water partition coefficient* (Coeficiente de partição ar-água)

log K_{ow} – *Octanol-water partition coefficient* (Coeficiente de partição octanol-água)

LOQ – *Limit of quantification* (Limite de quantificação)

LRAT – *Long-Range Atmospheric Transport* (Transporte atmosférico a longa distância)

lVMSs – *Linear volatile methylsiloxanes* (Metilsiloxanos voláteis lineares)

M4Q – Tetrakis(trimetilsiloxi)silano

PAHs – *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)
PBT – *Persistent Bioaccumulative Toxic substances* (Persistência, Bioacumulação e Toxicidade)
PCPs – *Personal Care Products* (Produtos de Cuidado Pessoal)
PDMS – Polidimetilsiloxanos
PEMS – Polietermetsiloxanos
POPs – *Persistent Organic Pollutants* (Poluentes Orgânicos Persistentes)
PSA – *Primary and Secondary Amine*
QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
 r – *Correlation coefficient* (Coeficiente de correlação)
Rec – Recuperação
S – *Sample* (amostra)
SIS - *Selected Ion Storage*
SLE – *Solid-liquid extraction* (Extração sólido-líquido)
S/N – *Signal-to-Noise* (Razão sinal-ruído)
SPE – *Solid-phase extraction* (Extração em fase sólida)
TMF – *Trophic Magnification Factors* (Fatores de magnificação trófica)
USE – *Ultrasonic extraction* (Extração por ultrassons)
VMSs – *Volatile methylsiloxanes* (Metilsiloxanos voláteis)

1. Enquadramento do projeto

Devido às suas propriedades únicas, os siloxanos – moléculas com átomos de silício alternados com átomos de oxigénio (Si-O-Si) e com grupos orgânicos ligados ao Si – são amplamente utilizados em diversas áreas, quer em processos industriais, quer em dispositivos médicos, quer, em grande parte, em cosméticos e produtos de cuidado pessoal. Como consequência desse uso, e com os primeiros estudos a revelarem potenciais efeitos nocivos para o ambiente e a saúde humana, surgiu a necessidade de averiguar o comportamento destes compostos com maior profundidade. Segundo alguns estudos presentes na literatura, embora não haja ainda consenso, supõe-se que os siloxanos sofrem transporte atmosférico de longa distância (LRAT), e que apresentem potencial de bioacumulação e biomagnificação em cadeias tróficas, demonstrando possíveis efeitos toxicológicos (Mackay *et al.*, 2015), o que incentivou o estudo do impacto dos siloxanos em diversas matrizes ambientais.

Tendo em consideração a potencialidade para a presença destes compostos nas zonas costeiras, devida ao seu amplo uso nos produtos de cuidado pessoal, decorrentes da elevada urbanização e desenvolvimento industrial ao seu redor e do impacto sazonal da afluência de turistas como ocorre nas costas de climas mais temperados, a análise de areias pode melhorar a compreensão da distribuição destes poluentes nesses ecossistemas delicados e complementar o estado da arte. O mexilhão, presente em zonas costeiras com uma ampla distribuição geográfica, é um bom bioindicador global de poluentes orgânicos persistentes (POPs) (Beyer *et al.*, 2017; Zhi *et al.*, 2018), pelo que a análise desta matriz permitirá também compreender melhor o impacto destes contaminantes diretamente em seres vivos.

Partindo destes princípios, este trabalho teve como objetivo analisar a presença de sete metilsiloxanos voláteis, quatro cíclicos (D3, D4, D5, D6) e três lineares (L3, L4, L5), em areias recolhidas em vinte e seis praias na costa da Galiza (Espanha) e, para uma análise mais global, em vinte praias de diferentes países da Europa, de modo a estabelecer perfis de concentração geográficos. Para isso foi utilizado um método de extração rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro (QuEChERS), seguido da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). No sentido de permitir a análise expedita e fiável de VMSs em mexilhão, foi ainda objeto desta dissertação o desenvolvimento e validação de um método de extração baseado em QuEChERS, com a posterior análise dos VMSs em dez amostras recolhidas na ria de Aveiro (Portugal) e na costa da Galiza.

2. Introdução

Depois do oxigênio, o silício (Si) é o elemento mais abundante na crosta terrestre. As formas elementares de silício são extremamente raras na natureza, pelo que este se encontra geralmente ligado a dois átomos de oxigênio, originando a sílica (SiO₂), um constituinte principal da poeira e da areia, ou combinado com oxigênio e vários metais, dando origem a silicatos (O'Lenick, 2000). Em 1863 foi sintetizado o primeiro composto orgânico de silício, surgindo uma nova classe de compostos, os siloxanos (McNaught e Wilkinson, 1997).

2.1 Siloxanos

Os siloxanos, comumente conhecidos por silicones, são um dos grupos mais valorizados de compostos químicos para a indústria (Mojsiewicz-Pienkowska *et al.*, 2015), caracterizados por serem moléculas com átomos alternados de silício e oxigênio (Si-O-Si), com grupos orgânicos ligados ao átomo de silício (McNaught e Wilkinson, 1997). Normalmente, são grupos metil, etil ou fenil, dando origem a diferentes tipos de siloxanos, consoante o grupo substituinte ligado como, por exemplo, etilsiloxano (Fromme, 2018). Quanto à sua classificação, estes podem ser caracterizados como lineares ou cíclicos, de acordo com a sua estrutura química (Gaj e Pakuluk, 2015), tal como representado na Figura 1.

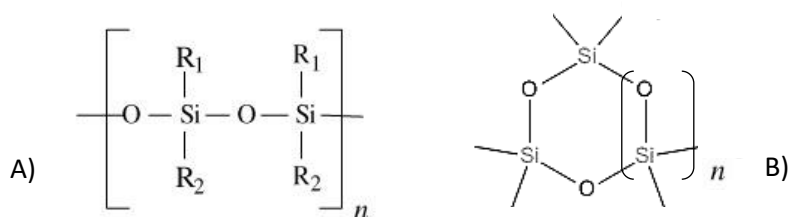


Figura 1 - a) Estrutura de um siloxano linear (Licari, 2004); b) Estrutura de um siloxano cíclico (Arespachoga *et al.*, 2015). R – Grupo funcional, n – número de vezes que a unidade representada é repetida.

Podem, ainda, distinguir-se em metilsiloxanos voláteis (VMSs), polidimetilsiloxanos (PDMS), polietermetilsiloxanos (PEMS) (Fromme, 2018) e siloxanos funcionalizados (Wang *et al.*, 2013), sendo estas as principais classes. Os siloxanos funcionalizados podem apresentar diferentes grupos substituintes (hidroxilo, fenil, metil, etil, etc.), assim como diferentes propriedades físico-químicas, que variam conforme o grupo presente (Rocha *et al.*, 2019). A Figura 2 representa um exemplo da estrutura química das classes suprarreferidas.

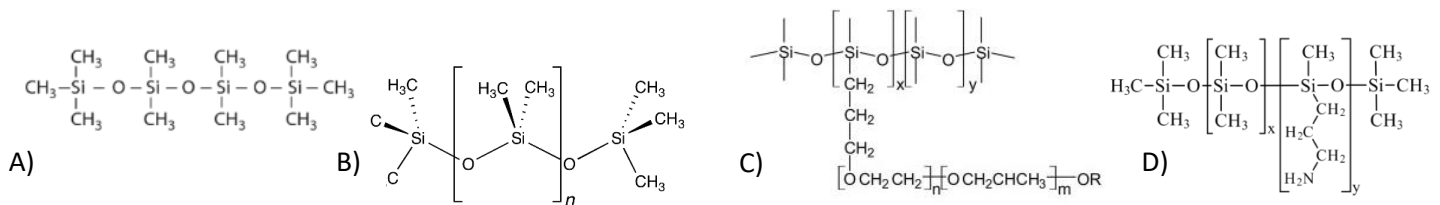


Figura 2 - Estrutura de um exemplo de: a) metilsiloxano volátil linear (IVMS) (Kanegsberg and Kanegsberg, 2017); b) polidimetilsiloxano (PDMS) (Elveflow,2020); c) polietermetilsiloxano (PEMS) (Michel *et al.*, 2014); d) siloxano funcionalizado (Genesee Polymers Corporation, 2020).

Em termos comerciais, o sistema *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* (INCI) divide ainda os siloxanos em 2 grupos principais: os dimeticones (representam os polidimetilsiloxanos (PDMS) e os metilsiloxanos voláteis lineares de menor peso molecular) e os ciclometicones (metilsiloxanos voláteis cíclicos) (Nikitakis e Lange, 2016).

O presente trabalho foca-se no estudo dos metilsiloxanos voláteis (VMSs), tanto dos cíclicos (cVMSs), como dos lineares (IVMSs).

2.1.1 Propriedades físico-químicas

O silício (Si), apesar de não existir na natureza no seu estado elementar, na sua forma combinada – apenas com oxigénio (sílica) ou oxigénio e outros elementos (silicatos) – é responsável por cerca de 25% da crosta terrestre, pelo que naturalmente forma compostos de longa duração e estáveis (O’Lenick, 2000).

Embora no mesmo grupo da tabela periódica (grupo 14), o silício tem uma maior afinidade química com o oxigénio do que o carbono. Essa diferença é evidenciada pelas ligações mais fortes (energias de ligação mais altas, ângulos de ligação mais elevados e comprimentos de ligação mais curtos) associados à ligação silício-oxigénio em comparação à ligação carbono-oxigénio. O ângulo da ligação silício-oxigénio confere uma geometria específica, que permite a rotação em torno da ligação e conduz a um arranjo mais linear do sistema silício-oxigénio-silício, o que torna as moléculas de siloxanos flexíveis. Estas são caracterizadas pela menor tensão superficial, viscosidade e maior pressão de vapor em comparação com os hidrocarbonetos de peso molecular semelhante. Destacam-se ainda outras propriedades como a capacidade moderada do silício para formar ligações com o hidrogénio, com o qual o carbono forma ligações muito mais fortes e estáveis. Por outro lado, o maior raio atómico do silício (111 pm) em relação ao do carbono (70 pm), torna a ligação silício-silício fraca, enquanto a ligação carbono-carbono é bastante conhecida pela sua resistência (grafite e diamante) (O’Lenick, 2000).

Estas particularidades da química do silício permitem compreender várias propriedades dos siloxanos, tais como a sua elevada estabilidade térmica, a resistência à oxidação e à exposição aos raios UV, baixa tensão superficial, boas propriedades dielétricas, hidrofobicidade, baixa inflamabilidade, alta permeabilidade aos gases, elevada compressibilidade e resistência ao cisalhamento e, como foi mencionado,

elevada flexibilidade (O’Lenick, 2000; Global Silicones Council, 2020). Devido a esta variedade de propriedades químicas e físicas, os polímeros de siloxanos podem ser fabricados de várias formas, incluindo: sólidos, líquidos, pastas, óleos e borracha (Global Silicones Council, 2020).

No que diz respeito aos VMSs, as Tabelas 1 e 2 apresentam propriedades físico-químicas como a massa molar, temperatura de ebulição, pressão de vapor, solubilidade em água e o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$), para os quatro cVMSs (D3, D4, D5 e D6) e para os três lVMSs (L3, L4 e L5) que serão estudados neste trabalho, respetivamente, bem como as suas estruturas químicas, e o número CAS (número de um composto químico/polímero registado no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*) (CAS, 2020).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos VMSs cíclicos em estudo (Greve, 2014).

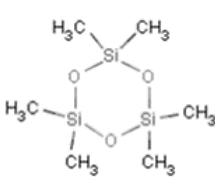
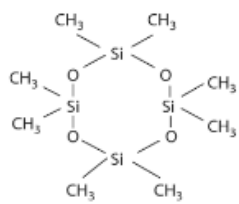
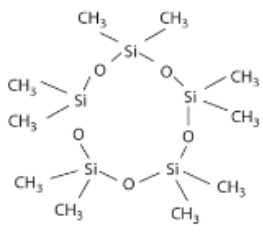
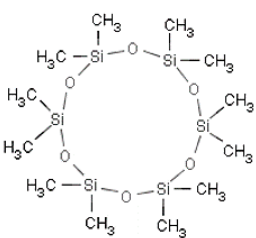
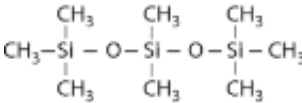
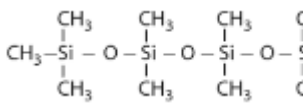
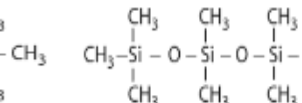
Composto	Hexametilciclotri-siloxano D3	Octametilciclotetra-siloxano D4	Decametilciclopenta-siloxano D5	Dodecametilciclohexa-siloxano D6
Estrutura química				
Número CAS	541-05-9	556-67-2	541-02-6	540-97-6
Massa molar (g/mol)	222,5	296,6	370,8	444,9
Temperatura de ebulição (°C)	134	175	210	245
Pressão de vapor (Pa) a 25 °C	470,6	173,3	26,7	3,0
Solubilidade em água (mg/L) a 25 °C	1,6	$9,0 \times 10^{-1}$	$2,4 \times 10^{-1}$	$5,1 \times 10^{-3}$
Log K_{ow}	4,5	5,1	5,2	6,3

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos VMSs lineares em estudo.

Composto	Octametiltrisiloxano L3	Decametiltetrasiloxano L4	Dodecametilpentasiloxano L5
Estrutura química ^a			
Número CAS ^a	107-51-7	141-62-8	141-63-8
Massa molar (g/mol) ^b	236,5	310,7	384,8
Temperatura de ebulição (°C) ^c	153	194	232
Pressão de vapor (Pa) a 25 °C ^d	520,0	57,3	13,6
Solubilidade em água (mg/L) a 25 °C ^c	3,4 x 10 ⁻²	6,7 x 10 ⁻³	3,1 x 10 ⁻⁴
Log K _{ow} ^e	4,8	5,4	6,0

^a (Kanegsberg e Kanegsberg, 2017). ^b (Sanchís *et al.*, 2015). ^c (Schmitt, 2014). ^d (Hay *et al.*, 2015). ^e (Kim *et al.*, 2013).

Analisando os valores da temperatura de ebulição dos compostos apresentados, verifica-se que são todos inferiores a 250 °C, pelo que são considerados semi-voláteis, sendo o D3 o mais volátil e o D6 o menos volátil. De facto, as elevadas pressões de vapor do L3 e D3 indicam que deverão volatilizar mais rapidamente do que os restantes. Conclui-se que estes siloxanos têm baixa solubilidade em água, diminuindo esta à medida que o tamanho da cadeia aumenta. Tal deve-se aos grupos metil (-CH₃) ligados aos átomos de silício, que repelem as moléculas de água, conferindo-lhes hidrofobicidade. Esta propriedade pode ainda ser observada analisando os valores do logaritmo do coeficiente de partição octanol-água (log K_{ow}) que, pelas razões suprarreferidas, também aumenta com o aumento do tamanho da cadeia, apresentando o D3 o menor valor e o D6 o maior. Assim, estes compostos são mais solúveis em solventes orgânicos não polares. Devido à sua elevada pressão de vapor e compatibilidade com inúmeros ingredientes usados nas formulações, são amplamente usados em produtos de cuidado pessoal, como os cosméticos, produtos de limpeza doméstica e agentes de revestimento (Gallego *et al.*, 2017). Na secção seguinte são apresentadas em mais detalhe as suas diversas aplicações.

2.2 Aplicações dos siloxanos

Os siloxanos conferem as suas características aos produtos onde são aplicados, permitindo que os produtos sejam mais duradouros, se espalhem melhor, permaneçam flexíveis ou rígidos e suportem

temperaturas ou humidade extremas, reduzindo assim o consumo de recursos e energia dos produtos nos quais são usados (Global Silicones Council, 2020).

Segundo Fromme (2018), a nível mundial, os siloxanos tiveram um volume de produção superior a 2 milhões de toneladas anuais em 2013. Foi observada uma produção média anual de 470 000 toneladas nos Estados Unidos (EUA) e 800 000 toneladas somente na China. Em 2006, os volumes de produção nos EUA de D4, D5 e D6 estavam nas gamas de 45 000 a 225 000, 22 500 a 45 000 e 450 a 4 500 toneladas, respetivamente. Já na União Europeia, as quantidades totais de cVMSs usadas foram de aproximadamente 9 500 toneladas de D4, 19 000 toneladas de D5 e 2 000 toneladas de D6, em 2004. Os siloxanos são usados principalmente como matérias-primas na produção de PDMS e copolímeros, bem como em processos industriais e produtos de consumo, em formulações farmacêuticas, em alimentos, agentes anti-espuma e em dispositivos médicos, como implantes mamários e tubos. Estima-se ainda que, até 2022, ocorra um aumento de 6% por ano do volume de produção de siloxanos (Arespacochaga *et al.*, 2015).

De acordo com o Global Silicones Council, globalmente estima-se que cerca de 788 000 toneladas de produtos contendo siloxanos sejam comprados anualmente para o uso no setor de energia em fontes de energia renováveis, como painéis solares e turbinas eólicas, bem como em fontes de energia tradicionais, como petróleo, gás e eletricidade. Por outro lado, o mercado global de eletrónica compra mais de 60 000 toneladas destes produtos por ano, uma vez que estes são usados em diversos artigos eletrónicos, incluindo semicondutores, dispositivos de LED e tecnologias de comunicação da informação, incluindo *smartphones*, computadores e relógios desportivos. Outro setor onde são aplicados é o dos transportes, incluindo automóvel, marítimo, aviação e aeroespacial. Borracha de silicone, elastómeros de resina, selantes, lubrificantes e aditivos plásticos são amplamente utilizados em naves espaciais, automóveis, aviação e embarcações, devido à sua resistência, aderência e durabilidade (Global Silicones Council, 2020).

Aproximadamente 21 000 a 23 000 toneladas por ano foram consumidas exclusivamente no setor de cosméticos (Fromme, 2018), devido à sua baixa tensão superficial, transparência e lipofilicidade, sendo que quase 50% dos novos produtos para cuidados com a pele contêm pelo menos um tipo de siloxano (Schalau e Ulman, 2009). Estes são usados nos PCPs como emolientes, agentes emulsificantes, anti-espuma, controladores de viscosidade e anti-estáticos, humectantes e, ainda, como aditivos (Lassen *et al.*, 2005). De acordo com um estudo realizado a 123 produtos de cuidado pessoal, divididos em várias categorias (hidratantes, pasta de dentes, sabonetes, produtos para lavar o corpo e o cabelo, desodorizantes, produtos de barbear e protetores solares) foram detetados VMSs em 96% das amostras, sendo que os cVMSs foram os mais detetados (94% das amostras), enquanto os IVMSs estavam presentes em 52% das amostras. Dos siloxanos cíclicos, os compostos D4 e D6 foram os mais detetados e dos lineares foi o L2 (hexametildisiloxano) (Capela *et al.*, 2016).

Por último, prevê-se ainda que o uso generalizado de produtos à base de silicone facilitará o crescimento do mercado dos siloxanos, que globalmente deverá ultrapassar uma valorização superior a 25 mil milhões de dólares em 2027, atingindo cerca de 3 milhões de toneladas de produção. É de realçar ainda

que, anteriormente, a utilização de produtos à base de siloxanos se limitava em grande parte aos países desenvolvidos. No entanto, o desenvolvimento económico, o aumento dos níveis de rendimento e a melhoria do nível de vida aumentaram o mercado destes produtos também nos países emergentes (Fact.MR, 2019).

2.3 Distribuição ambiental dos siloxanos e impacte associado

2.3.1 Libertação para o meio ambiente

Como consequência do amplo uso dos siloxanos, surgiu a necessidade de estudar a presença destes compostos nos ecossistemas ambientais. Os VMSs são principalmente libertados para a atmosfera, por volatilização, durante os processos industriais de fabrico de formulações contendo siloxanos (Sanchís *et al.*, 2015). Os metilsiloxanos voláteis degradam-se na atmosfera reagindo com radicais OH^{*} para formar silanóis. À medida que os silanóis se tornam cada vez mais substituídos com -OH, é cada vez mais provável que sejam removidos da atmosfera por deposição húmida ou seca (Whelan *et al.*, 2004).

Segundo alguns artigos, prevê-se que os cVMSs sofram transporte atmosférico de longa distância (LRAT). A distância característica de deslocamento (CTD - *Characteristic Travel Distance*) foi sugerida como uma medida de quão longe as substâncias podem viajar na atmosfera. O CTD previsto é maior para o D4 do que para o D5 e do que para o D6. Descobriu-se que este depende principalmente do tempo de meia vida de foto-transformação e do coeficiente de partição ar-água ($\log K_{AW}$), sendo que os tempos de meia vida atmosférica são, segundo Krogseth *et al.* (2013), 20,0 dias para D3, 10,3 dias para D4, 6,7 dias para D5 e 5,8 dias para D6. Um número crescente de publicações tem relatado a presença de VMSs em regiões remotas (Sanchís *et al.*, 2015; Magali *et al.*, 2016). No entanto, alguns autores argumentam que, apesar do potencial para LRAT, as propriedades físico-químicas inerentes aos VMSs não favorecem o seu transporte e deposição em regiões longínquas das fontes de emissão (Xu e Wania, 2013; Schweigkofler e Niessner, 1999), pelo que a sua presença seria devida a fontes antropogénicas locais e contaminação da amostra (Bridges e Solomon, 2016).

Por outro lado, são também libertados para o meio ambiente através dos aterros sanitários e estações de tratamento de águas residuais (ETARs) (Sanchís *et al.*, 2015). Na verdade, estima-se que 90% dos VMSs presentes nas formulações de PCPs volatilizam durante o uso, enquanto a parte restante é descartada pelos sistemas de esgotos, chegando até às ETARs, nomeadamente os VMSs presentes em produtos enxaguáveis como sabonetes e produtos para o cabelo (Mackay *et al.*, 2015; Capela *et al.*, 2016). Devido à baixa solubilidade em água dos VMSs, estes são removidos parcialmente nos tratamentos de águas residuais por adsorção nas lamas de depuração, podendo a parte restante ser descarregada no meio ambiente através dos efluentes finais, especialmente adsorvidos a sólidos em suspensão (Capela *et al.*, 2019).

É ainda de realçar que, uma vez que os siloxanos são amplamente utilizados nas formulações dos PCPs, particularmente no verão, devido à maior utilização dos protetores solares e outro tipo de cosméticos,

as zonas costeiras são alvos potenciais para a presença de VMSs. Tal é intensificado pelos fluxos de turistas, que podem ter um enorme impacto ambiental nos ecossistemas e na sua funcionalidade. Por exemplo, mais de um terço da população mediterrânica da atualidade vive em áreas costeiras, com impactos crescentes nas últimas décadas (Coll *et al.*, 2012; UNEP/MAP, 2012). De facto, estudos realizados nas áreas costeiras detetaram a sua presença em matrizes como o ar (Ratola *et al.*, 2016), vegetação marinha (Rocha *et al.*, 2019), amostras de água do mar e de peixes (Hong *et al.*, 2014), mexilhões (Sanchís *et al.*, 2016), sedimentos marinhos (Hong *et al.*, 2014) e, ainda, em areias de praia (Capela *et al.*, 2019).

2.3.2 Riscos para a saúde humana

Desde a década de 1940 até hoje que, como consequência do seu amplo uso, os seres humanos são frequentemente expostos a siloxanos por meio do uso de PCPs, como também através de processos industriais (Richardson e Ternes, 2014), contacto com o meio ambiente (Hong *et al.*, 2014, Kaj *et al.*, 2005), e até mesmo pela atmosfera (Ratola *et al.*, 2016). Assim, a exposição crónica aos siloxanos tornou-se uma preocupação de saúde pública.

No que diz respeito ao setor da saúde, um grupo de pessoas que apresenta um elevado risco de exposição são as que recebem implantes mamários de silicone. Após a sua introdução, relatos de um aumento na ocorrência de distúrbios do tecido conjuntivo e doenças autoimunes em pacientes com estes implantes levaram a *Food and Drug Administration* (FDA) a emitir, em 1992, uma moratória aos implantes de silicone. Devido à falta de evidências conclusivas de uma relação causal entre estes implantes e esses efeitos adversos à saúde, a moratória foi revogada em 2006, embora relatórios controversos sobre os riscos dos implantes de silicone continuem a ser produzidos. Por exemplo, alguns estudos concluíram que uma inflamação fibroproliferativa ocorreu definitivamente em resposta a implantes de silicone (Hajdu *et al.*, 2011), enquanto outros afirmaram que não havia associação entre implantes mamários de silicone e doença do tecido conjuntivo (Tilley e Fry, 2015).

Por outro lado, uma avaliação de risco realizada no Reino Unido mostrou que o D4 atendia aos critérios de triagem para persistência, bioacumulação e toxicidade (PBT), enquanto o D5 foi considerado uma substância persistente e muito bioacumulativa. Já o D6 não cumpriu com critérios de PBT (Tran *et al.*, 2019). Além disso, a União Europeia classifica o D4 como um desregulador endócrino, com base em evidências de que este interfere na função hormonal humana e como pode ser considerado um possível tóxico reprodutivo, prejudicando a fertilidade humana (DHI Water and Environment, 2007). Em experiências laboratoriais com ratos, a exposição a altas doses de D5 demonstrou causar tumores no útero e prejudicar os sistemas reprodutivo e imunológico, podendo também influenciar os neurotransmissores no sistema nervoso, pelo que seria interessante estudar se o mesmo ocorre nos seres humanos (California Office of Environmental Health Hazard Assessment, 2008).

Outro estudo sobre o impacto dos siloxanos para a saúde humana permitiu concluir que os VMSs de baixo peso molecular podem alterar a estrutura da bicamada lipídica, pela fluidização ou até extração dos lípidos, o que pode enfraquecer a barreira natural das membranas celulares, podendo ainda acumular-se no organismo e afetar os órgãos a longo prazo (Wang *et al.*, 2013). Por outro lado, a sua volatilidade representa uma ameaça de entrada no organismo através do sistema respiratório (Mojsiewicz-Pieńkowska, 2016).

Por fim, uma vez que os VMSs são bastante utilizados nas formulações dos PCPs, avaliar o impacto dos siloxanos na pele humana é bastante relevante. Assim, muito recentemente, um estudo realizado por Krenczkowska *et al.* (2020) permitiu demonstrar que a pele humana não é uma barreira aos cVMSs. Os siloxanos D4, D5 e D6 têm uma afinidade específica para o estrato córneo (especialmente o D6), e podem até mesmo difundir-se nas camadas mais profundas da pele (epiderme e derme). Os resultados revelaram um maior risco de absorção de D4 e D5 nos sistemas sanguíneo e linfático, enquanto o D6 demonstrou o risco mais baixo. Assim, conseguiram concluir que, de entre os três compostos testados, o D6 é o mais seguro para o uso em produtos dermatológicos, cosméticos e de higiene pessoal. Este estudo demonstra também que o estrato córneo, a epiderme e a derme também podem ser considerados reservatórios de metilsiloxanos cíclicos, pelo que esses compostos podem demonstrar potencial bioacumulação de longo prazo e podem ser absorvidos pela corrente sanguínea num processo de longo prazo e não controlado.

Dada a libertação destes contaminantes para o meio ambiente e as consequências associadas, os VMSs D4, D5 e D6 foram classificados, pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 2007) e pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), como produtos químicos de alto volume de produção (OECD, 2007), pelo que foram submetidos a várias revisões regulatórias no Reino Unido (Brooke *et al.*, 2009 a,b,c), Canadá (EC & HC, 2008 a,b,c) e países nórdicos (Ministerråd, 2005), bem como a uma revisão judicial (Giesy *et al.*, 2016) e uma avaliação para a Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA - *European Chemicals Agency*) (Brooke *et al.*, 2009 a,b,c). Para além disso, surgiu muito recentemente uma legislação que limita, a partir de 31 de janeiro de 2020, a concentração dos compostos D4 e D5 nos produtos cosméticos do tipo *wash-off* para um valor de 0,1% em massa, sendo que se entende que estes produtos são aqueles que, em condições normais de uso, são descarregados com as águas de lavagem após a sua aplicação (European Chemicals Agency, 2020).

2.3.3. Efeitos dos VMSs em biota

Como resultado do aumento exponencial do seu uso, os VMSs foram detetados também em biota como, por exemplo, algas, moluscos, crustáceos, peixes, mamíferos, vegetação, musgo e líquenes (Hong *et al.*, 2014; Borgå *et al.*, 2012; Borgå *et al.*, 2013; McGoldrick *et al.*, 2014; Ratola *et al.*, 2016; Sanchís *et al.*, 2015). Tal situação levantou preocupações sobre a propensão destes compostos para se concentrarem na vida aquática e terrestre a níveis mais elevados do que aqueles encontrados no ambiente, isto é, para bioacumular e afetar o ecossistema.

A bioacumulação é uma função da bioconcentração e biomagnificação, onde a bioconcentração é a absorção não trófica e a acumulação de uma substância química num organismo específico a partir de meios abióticos (principalmente água, mas também sedimentos e ar) e a biomagnificação é o aumento na concentração entre os organismos numa cadeia alimentar, relacionada com a mudança no nível trófico dos organismos (Huckins *et al.*, 1997). A capacidade de um produto químico para bioacumular depende de vários fatores, incluindo as suas propriedades físico-químicas, as condições ambientais que afetarão a biodisponibilidade do composto químico para o organismo, as características do organismo exposto e a sua cadeia alimentar (Augusto, 2019). De facto, a quantidade de composto químico em contato com as membranas de absorção de um organismo depende não só da sua concentração ambiental no meio abiótico, mas também da fração disponível para absorção (Huckins *et al.*, 1997), sendo que, em ambientes aquáticos, geralmente corresponde à fração do composto que está realmente dissolvido na água. No caso dos VMSs, as concentrações máximas de VMSs biodisponíveis na água são restringidas pela sua baixa solubilidade, pelo que a maior parte dos VMSs em meio aquático geralmente se encontra absorvida em carbono orgânico particulado (matéria orgânica). Assim, as concentrações máximas de VMSs na matéria orgânica dissolvida ou suspensa na água, sedimentos e solos dependem da quantidade de carbono orgânico destas matrizes e, conseqüentemente, afetará a extensão da exposição do organismo aos VMSs biodisponíveis (Bridges e Solomon, 2016).

Outro fator que afeta o potencial de bioacumulação de um composto químico é a sua estabilidade ou persistência ambiental. Os efeitos dos processos de degradação (por exemplo, hidrólise, fotólise e degradação microbiana) em contaminantes normalmente resultam em compostos mais hidrofílicos ou polares, que têm menor potencial de bioacumulação do que os originais. Assim, descobriu-se que os VMSs se degradam no ambiente em dias, meses, ou até anos, dependendo do composto (a degradação diminui com o aumento do número de átomos de silício) e da matriz. Normalmente, para um mesmo composto, as taxas de degradação seguem a seguinte tendência: Ar (dias) → Solo → Água → Sedimentos (meses/anos) (Huckins *et al.*, 1997). Por outro lado, é mais provável que a biomagnificação ocorra em compostos lipossolúveis, bem absorvidos e pouco metabolizados, limitando assim a excreção, uma vez que para que ocorra a biomagnificação, a taxa de ingestão tem de superar a taxa de depuração. Deste modo, no ambiente aquático, assumindo que os VMSs permanecem biodisponíveis, pode ocorrer bioacumulação nos organismos que se alimentam em sedimentos contaminados. Assim, outra biota que se alimente de organismos sedimentares pode então bioacumular VMSs se a taxa de ingestão for maior do que a taxa de eliminação e, neste caso, ocorre a biomagnificação (Augusto, 2019).

Devido ao facto de alguns VMSs apresentarem potencial para a bioacumulação e biomagnificação (Fromme *et al.*, 2015), foram realizados estudos para avaliar o potencial tóxico dos siloxanos. No caso específico dos ambientes marinhos, segundo Arespachaga *et al.* (2015), os siloxanos são geralmente não tóxicos para os organismos devido aos seus valores baixos de solubilidade em meio aquoso. No entanto, foi relatado que os metilsiloxanos têm o potencial de se acumular na biota aquática. Por exemplo, Jia *et al.*

(2015) investigaram a transferência trófica de quatro metilsiloxanos cíclicos (D3-D6) e descobriram que estes sofrem magnificação na cadeia alimentar marinha. Controvérsias sobre a bioacumulação de metilsiloxanos ainda permanecem devido à falta de dados experimentais relevantes, pelo que, atualmente, diversos estudos estão a ser desenvolvidos, com o objetivo de apoiar o conhecimento científico e tecnológico sobre a avaliação de risco da presença destas substâncias no meio ambiente, bem como um melhor entendimento dos efeitos toxicológicos para os animais e humanos.

Face à preocupação existente com estes compostos, por serem uma fonte de exposição humana e de contaminação ambiental, surge a necessidade de estudar o impacto dos siloxanos nas diversas matrizes ambientais e ecossistemas. Neste trabalho, será estudado o impacto dos siloxanos em zonas costeiras, mais concretamente nas areias e mexilhões. Para isso, será necessário extrair e quantificar os siloxanos, sendo que as metodologias analíticas a usar são apresentadas no tópico seguinte.

2.4 Metodologias analíticas para a determinação de VMSs em areia e mexilhão

Para entender melhor os níveis de contaminação e o comportamento dos siloxanos no ambiente é fundamental ter protocolos analíticos adequados para identificá-los e quantificá-los. Embora não sejam extremamente complicados de identificar usando técnicas cromatográficas avançadas, a presença de materiais à base de silicone em praticamente todos os locais e em muitos materiais acrescenta uma forte complexidade devido à possibilidade de contaminações externas das amostras. Não apenas através das pessoas que manipulam as amostras durante a recolha ou no laboratório, devido ao uso de produtos de cuidado pessoal, mas também pela presença de siloxanos orgânicos em várias partes do equipamento e consumíveis cromatográficos, incluindo colunas capilares e até solventes. Por isso, é necessário um cuidado extra para minimizar ou eliminar essas fontes de contaminação, particularmente ao lidar com matrizes difíceis de analisar por si só e com níveis dos compostos-alvo próximos dos limites de deteção – análise vestigial (Ramos *et al.*, 2016).

Assim, para evitar a contaminação de fundo, algumas ações preventivas são comumente descritas na literatura, como por exemplo a limitação ou proibição de PCPs no laboratório, o uso de luvas de nitrilo, cuidado extra na limpeza do material (lavagem com solvente e descontaminação de material não calibrado a elevadas temperaturas) e frequente análise de brancos laboratoriais (Warner *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013).

2.4.1 Técnicas de extração

Tendo como objetivo realizar a análise dos VMSs, as amostras são submetidas inicialmente a procedimentos de extração. Tendo em consideração as propriedades dos compostos e a natureza das amostras, várias técnicas estão disponíveis para extrair e concentrar os compostos em estudo, ou mesmo

para remover contaminantes (interferentes) que possam influenciar a sua deteção e quantificação (*clean-up*). Neste contexto, dado o elevado risco de contaminação das amostras, na análise de VMSs os protocolos devem ser otimizados para o menor número de passos possível. Entre as várias técnicas descritas na literatura, como a extração sólido-líquido (SLE), extração em fase sólida (SPE) e extração por ultrassons (USE), a técnica QuEChERS destaca-se, e será aquela utilizada neste trabalho.

2.4.1.1 Extração sólido-líquido (SLE)

Na extração sólido-líquido, o analito é extraído de uma fase sólida através de um solvente. Os aspetos mais importantes a ter em conta neste processo são, não só a área superficial, uma vez que quanto mais pequenas forem as partículas maior é a área de contacto com o solvente, como também a escolha do solvente, dado que o composto que se pretende extrair deve apresentar uma elevada solubilidade neste (Berk, 2009), pelo que, tendo em consideração a baixa polaridade dos siloxanos, devem ser escolhidos solventes orgânicos afins (apolares ou com baixa polaridade). O sistema deve ainda ser agitado para promover a transferência de massa dos analitos para a fase líquida, sendo realizada uma filtração ou centrifugação para recuperar o solvente (Warner *et al.*, 2010).

2.4.1.2 Extração por ultrassons (USE)

A extração ultrassónica é uma técnica em que um solvente é adicionado à matriz líquida ou sólida, sendo submetida ao efeito de ondas ultrassónicas de alta potência e de baixa frequência. Altamente energéticas, estas atravessam o líquido criando ciclos alternados de alta e baixa pressão, o que resulta no fenómeno da cavitação ultrassónica, que conduz localmente a temperaturas extremas, taxas de aquecimento/arrefecimento e altas tensões de corte no meio, promovendo a formação de bolhas. Consequentemente, grandes quantidades de energia são libertadas para o meio, promovendo uma maior penetração do solvente na amostra, melhorando a transferência de massa do analito para o solvente. Esta técnica geralmente reduz os tempos de trabalho e aumenta os rendimentos de extração (Hielscher Ultrasound Technology, 2020).

2.4.1.3 Extração em fase sólida (SPE)

O princípio da SPE envolve a partição de solutos entre duas fases diferentes, geralmente uma fase líquida (comumente a matriz da amostra ou o solvente já contendo os analitos alvo) e uma fase sólida (sorbente). Com base na afinidade dos solutos dissolvidos ou suspensos na fase líquida pelos sorbentes, esta técnica permite a extração, a limpeza de amostras e extratos e a pré-concentração dos analitos-alvo antes da análise instrumental. É uma técnica muito comum, pois é de fácil execução, eficiente e com recuperações elevadas do analito (Andrade-Eiroa *et al.*, 2016).

2.4.1.4 QuEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

QuEChERS é uma técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE): rápida (*quick*), fácil (*easy*), barata (*cheap*), eficaz (*effective*), robusta (*rugged*) e segura (*safe*), desenvolvida originalmente em 2003 por Anastassiades *et al.* (2003), para a determinação de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais. Esta permite a preparação de amostras e é caracterizada por alta versatilidade, pelo que pode, portanto, ser adaptada a várias aplicações, incluindo a análise de fluídos biológicos e matrizes ambientais como água, sedimentos e solos (Bruzzoniti *et al.*, 2014).

Na abordagem por QuEChERS, ocorre uma primeira etapa de extração da amostra com solvente. De modo a promover a extração dos analitos para a fase orgânica, são utilizados não só sais tampão (p. ex. acetato de sódio, citrato de sódio), para controlar o pH do meio, como também agentes exsiccantes como o MgSO_4 , para remover a água presente na amostra, permitindo não só controlar a polaridade do meio de extração e promover a partição dos compostos para a fase orgânica, mas também melhorar a forma dos picos de vários compostos nos cromatogramas (Lehotay, 2011; Mayor *et al.*, 2019). Subsequentemente ocorre um processo de *clean-up*, recorrendo a uma extração dispersiva em fase sólida, na qual os componentes indesejados da matriz são retidos pelos sorbentes e os analitos de interesse permanecem no extrato. Vários sorbentes já foram testados de modo a melhorar a seletividade da fase de *clean-up* e, conseqüentemente, reduzir a quantidade de componentes que tinham sido co-extraídos, como por exemplo PSA (*Primary and Secondary Amine*), aminopropil, GCB (*Graphitized Carbon Black*), cianopropil e octadecilsilano (C_{18}). Destaca-se a combinação de PSA com C_{18} , uma vez que o primeiro permite a remoção de impurezas polares e o segundo a adsorção de interferentes não polares (Lehotay, 2011; Mayor *et al.*, 2019).

2.4.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) é a escolha preferencial para a quantificação de siloxanos nas diversas matrizes ambientais. É uma técnica que permite a análise qualitativa e quantitativa de contaminantes, sendo que a preparação da amostra realizada antes da análise por cromatografia gasosa é uma etapa bastante importante (Lorenzo e Pico, 2017).

Na cromatografia gasosa, a amostra extraída é introduzida no injetor que se encontra a uma temperatura elevada através de uma microseringa e é vaporizada. A amostra é então transportada por um gás inerte (fase móvel designada por gás de arraste) através de uma coluna cromatográfica capilar contendo a fase estacionária, a qual se encontra dentro de um forno. A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente ou, mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte. Assim, os constituintes da amostra, transportados pelo gás, interagirão de forma diferente com a fase estacionária, eluindo em diferentes momentos (tempos de retenção). No caso da utilização de colunas cromatográficas apolares, a temperatura à qual a coluna está sujeita é fundamental para definir a ordem de eluição de cada

composto, sendo esta determinada pelo ponto de ebulição dos compostos-alvo. Assim, as substâncias presentes na amostra, depois de separadas, chegam ao detetor, que gera um sinal para um sistema de registo e tratamento dos dados. O registo deste sinal em função do tempo é denominado cromatograma (Stauffer *et al.*, 2008).

Existem vários tipos de detetores para identificar e/ou quantificar as moléculas que eluem da coluna cromatográfica, entre os quais se destaca o espectrómetro de massa. Este é um detetor sofisticado que “bombardeia” o composto com eletrões, fragmentando o composto. A intensidade registada de cada grupo de fragmentos é classificada de acordo com a sua relação massa/carga, resultando num espectro de massa, normalmente normalizado a 100% para o ião mais abundante formado, sendo o espectro de massa uma característica única de cada composto. Trata-se de uma técnica de elevada seletividade e sensibilidade, sendo a mais utilizada em laboratórios ambientais (Lebedev, 2012). A Figura 3 representa um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

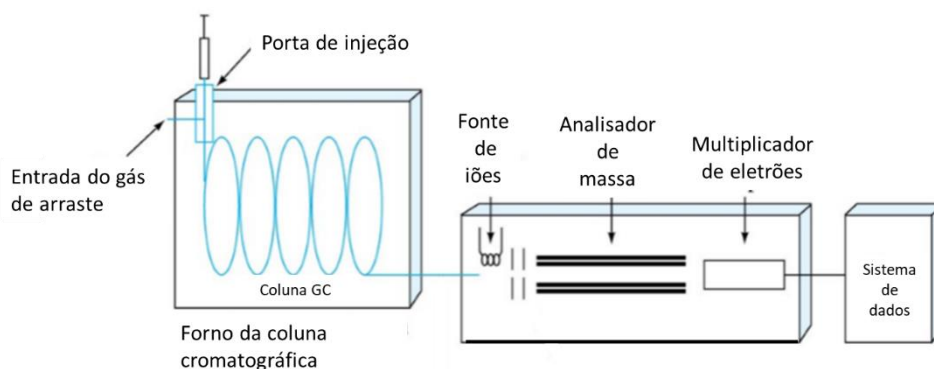


Figura 3 - Esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrómetro de massa. Adaptado de Hübschmann (2015).

Tendo por base todos estes conceitos teóricos, foi realizada uma revisão dos estudos disponíveis sobre a determinação de VMSs em areia e mexilhão, constituindo o terceiro capítulo do presente trabalho.

3. Estado da Arte

Tendo em consideração a potencialidade para a presença de VMSs nas zonas costeiras devido ao seu amplo uso nos produtos de cuidado pessoal, e a incerteza dos riscos associados a tal incidência, a comunidade científica tem-se preocupado com este tema, pelo que têm sido realizados vários estudos sobre o impacto dos siloxanos nestes ecossistemas particulares. Neste trabalho, as matrizes-alvo serão a areia, onde a informação existente na literatura se resume a um só estudo, e o mexilhão. Como tal, tendo como objetivo compreender o impacto dos siloxanos no ambiente marinho, serão apresentados os trabalhos científicos existentes que foram realizados com estas matrizes e ainda com sedimentos marinhos referentes a diferentes áreas geográficas: Portugal (Capela *et al.*, 2019), Espanha (Sanchís *et al.*, 2013, 2016), Noruega (Powell *et al.*, 2018) e China, nomeadamente a Baía de Dalian (Hong *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2015), ao longo do mar de Bohai (Zhi *et al.*, 2018) e no rio Songhua (Zhang *et al.*, 2011).

Na Tabela 3 encontram-se resumidos os resultados obtidos nestes estudos, nomeadamente, os métodos de extração e instrumental utilizados, a percentagem de recuperação, os limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) dos métodos aplicados e a gama de concentração dos VMSs detetados em cada matriz.

O estudo em moluscos como o mexilhão é particularmente interessante, pois estão presentes em ecossistemas marinhos diversificados e com uma ampla distribuição geográfica. Além disso, têm uma boa tolerância a uma ampla gama de poluentes, com fatores de bioconcentração semelhantes em toda a área marítima monitorizada e com a capacidade de refletir as mudanças na concentração de contaminantes no ambiente circundante. Assim, estes funcionam como bons bioindicadores globais de poluentes orgânicos persistentes (POPs) – compostos orgânicos resistentes a processos de degradação químicos, biológicos e fotolíticos sendo, por isso, substâncias que tendem a sofrer acumulação – tais como os siloxanos (Beyer *et al.*, 2017). Os mexilhões são organismos filtradores, ou seja, alimentam-se filtrando as pequenas algas e material orgânico da água que os rodeia e geralmente coexistem com água poluída e sedimentos (Zhi *et al.*, 2018). São também de realçar outras características biológicas e ecológicas que os tornam ideais para a monitorização da poluição: são de tamanho médio, pelo que um indivíduo pode fornecer material de tecido suficiente para análise química; formam camas de mexilhão, muitas vezes grandes, em águas rasas de onde podem ser facilmente coletados e, como são muito resistentes, são fáceis de manter em cultura, tornando-os adequados para estudos de exposição em laboratórios ecotoxicológicos, bem como para análises *in situ*. Além disso, os mexilhões são ecologicamente importantes, pois servem de alimento e habitat para uma infinidade de outras espécies e, como consumidores primários, atuam como veículos para a transferência de poluentes antropogénicos da fase abiótica e do nível de produção primário para os níveis tróficos superiores na cadeia alimentar marinha costeira (Beyer *et al.*, 2017).

Zhi *et al.* (2018) estudaram a distribuição de VMS em moluscos, tendo feito a recolha em sete cidades ao longo do mar de Bohai (China). A bacia hidrográfica do Mar de Bohai é uma das regiões mais populosas e

industrializadas da China, que tem sido fortemente afetada por contaminações de descargas de produtos químicos tóxicos, juntamente com o rápido desenvolvimento econômico e urbanização nas últimas décadas. É de destacar que moluscos recolhidos nesta região foram usados anteriormente como potenciais bioindicadores/biomonitores de vários POPs (Zhao *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2010). Assim, neste estudo foram recolhidas um total de 205 amostras, incluindo o mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), amêijoas (*Cyclina sinensis*) e ostras (*Crassostrea talienwhanensis*). Neste estudo, foi pesado 1 g de amostra, que foi extraído com uma mistura de solventes, *n*-hexano/acetato de etilo (1:1, v/v), tendo sido o processo de extração repetido 3 vezes. Por fim, os extratos foram combinados e concentrados a 1 mL através de uma corrente de azoto, antes da análise em GC-MS. Relativamente aos resultados obtidos, a média de concentrações de VMSs (D4-D6, L8-L16) em todas as amostras analisadas variou entre $2,17 \pm 3,36$ ng/g_{peso húmido} e $34,0 \pm 23,0$ ng/g_{peso húmido}. É de destacar a predominância dos VMSs cíclicos nos moluscos, representando entre 74,2% a 80,7% do total de siloxanos analisados, com as concentrações médias de $15,7 \pm 12,3$ ng/g_{peso húmido} para o D4, $24,6 \pm 15,8$ ng/g_{peso húmido} para o D5 e $34,0 \pm 23,0$ ng/g_{peso húmido} para o D6. As concentrações dos VMSs lineares L8-L16 ($2,17 \pm 3,36$ a $2,79 \pm 3,75$ ng/g_{peso húmido}) em moluscos foram aproximadamente uma ordem de magnitude menor do que as de D4-D6. Em termos de valores médios, as concentrações de L8-L16 em moluscos estavam presentes na seguinte ordem decrescente: L13 ($2,79 \pm 3,75$ ng/g_{peso húmido}) > L11 ($2,60 \pm 3,75$ ng/g_{peso húmido}) > L10 ($2,59 \pm 3,55$ ng/g_{peso húmido}) > L14 ($2,45 \pm 3,67$ ng/g_{peso húmido}) > L8 ($2,44 \pm 3,82$ ng/g_{peso húmido}) > L12 ($2,36 \pm 3,68$ ng/g_{peso húmido}) > L16 ($2,30 \pm 3,61$ ng/g_{peso húmido}) > L9 ($2,24 \pm 3,58$ ng/g_{peso húmido}) > L15 ($2,17 \pm 3,36$ ng/g_{peso húmido}). Estas concentrações mais baixas de metilsiloxanos lineares em moluscos podem estar associadas a concentrações relativamente mais baixas desses compostos no ambiente marinho, sendo que o padrão de distribuição dos metilsiloxanos lineares entre as sete cidades foi semelhante ao dos metilsiloxanos cíclicos. Esse padrão foi observado ao longo da costa, com as maiores concentrações nos locais de amostragem localizados onde existe um foco de indústrias relacionadas à petroquímica (Tianjin e Dongying), e as menores concentrações em cidades localizadas na parte oriental do Mar de Bohai, o que pode sustentar a ideia de que a industrialização contribui para a libertação de metilsiloxanos para o meio marinho.

Powell *et al.* (2018), estudaram a bioacumulação e transferência trófica de cVMS, nomeadamente de D4, D5 e D6 nas cadeias alimentares marinhas de Oslofjord, uma profunda baía com 150 km, situada no sudeste da Noruega, que se considera estar dividida em duas partes, uma interna e uma externa. Devido à sua natureza semifechada, as substâncias químicas nas águas residuais municipais que são descarregadas ficam retidas na parte interna, resultando em níveis mais elevados em comparação com os encontrados na parte externa. Assim, as concentrações de cVMS foram medidas em biota, através de um método de extração por solvente, usando tetrahidrofurano (THF) como solvente de extração. Posteriormente, as concentrações nos extratos foram quantificadas através de GC-MS. Na Tabela 3 encontram-se os resultados referentes apenas ao estudo em mexilhões. O composto que se destaca é o D5, onde foi possível registar uma concentração máxima de $251,8$ ng/g_{peso húmido}, enquanto as concentrações do D4 e do D6 apresentavam uma gama, em ng/g_{peso húmido}, de <LOQ – 3,77 e <LOQ – 8,69, respetivamente. Ou seja, a concentração máxima

para estes compostos foi da magnitude da mínima obtida para o D5 (4,14 ng/g_{peso húmido}). Por outro lado, comparando os resultados obtidos neste estudo com o de Zhi *et al.* (2018), constata-se que a concentração de D5 em moluscos coletados no Mar de Bohai é aproximadamente uma ordem de grandeza inferior ao valor de Powell *et al.* (2018), enquanto a concentração de D4 é várias vezes superior, demonstrando que os perfis de composição de metilsiloxanos são diferentes nas duas áreas. Este estudo permitiu ainda concluir que os fatores de magnificação trófica (TMF - *Trophic Magnification Factors*) para o D4, D5 e D6 foram consistentes entre o Oslofjord interno e externo, indicando que a exposição não impactou o TMF em toda a cadeia alimentar marinha. Assim, não houve evidências que sugiram biomagnificação de cVMS em Oslofjord. Em vez disso, os resultados indicaram que a diluição trófica de cVMS ocorreu ao longo das cadeias alimentares amostradas, comprovando a controvérsia ainda existente sobre esta temática.

Por outro lado, Jia *et al.* (2015) estudou a transferência trófica dos VMSs (D4-D7 e L4-L17) na cadeia alimentar marinha da Baía de Dalian (China), na região norte do Mar Amarelo chinês, tendo para isso realizado a extração também em mexilhão. O procedimento consistiu em colocar amostras de 1 g de biota (peso húmido) e extração com uma mistura de *n*-hexano/acetato de etilo (1:1, v/v) por 30 min. Depois de centrifugados os extratos por 5 min (1000 g), a camada de solvente foi então recolhida e o processo de extração repetido três vezes. As camadas de solvente foram combinadas e evaporadas até 1 mL. O extrato foi então passado através de uma coluna de sílica gel de 5,5 g (ativada a 130 °C por 7 horas e desativada com 3,3% de água ultrapura) após uma pré-lavagem com 25 mL de *n*-hexano e eluído com 50 mL de mistura de *n*-hexano/DCM (1:1, v/v). O extrato foi evaporado a 1 mL e, de seguida, efetuou-se a troca de solvente (isooctano), tendo sido o extrato final reduzido a 1 mL sob azoto antes da análise de GC-MS. No que diz respeito aos resultados obtidos, o D4, D5, D6 e D7 foram quantificados acima dos LOQ em 77%, 93%, 94% e 79% das amostras totais, respetivamente, enquanto o L9, L10 e L11 foram detetados em menos de 30% das amostras totais (sendo que nos mexilhões não foram detetados) e outros metilsiloxanos (L4-L8 e L12-L17) não foram detetados em nenhuma amostra. Os valores médios de concentração de cVMSs no mexilhão foram de $5,76 \pm 1,69$ ng/g_{peso húmido} para o D4, $6,18 \pm 3,70$ ng/g_{peso húmido} para o D5, $8,33 \pm 6,62$ ng/g_{peso húmido} para o D6 e $3,13 \pm 1,86$ ng/g_{peso húmido} para o D7. Comparando os resultados dos mexilhões com os 2 estudos suprarreferidos, verifica-se que o D4 foi detetado na mesma ordem de grandeza (<LOQ – 7,88 ng/g_{peso húmido}) que o de Powell *et al.* (2018), enquanto o D5 foi detetado na mesma magnitude do estudo de Zhi *et al.* (2018) (<LOQ – 12,3 ng/g_{peso húmido}). Já o D6 (<LOQ – 23,9 ng/g_{peso húmido}) apresenta níveis semelhantes com ambos os estudos. Tal pode indicar uma diferença na composição de VMSs nos 3 locais analisados, possivelmente sujeitos a diferentes vias de contaminação.

Por fim, Sanchís *et al.* (2016) avaliaram a presença de VMSs em mexilhões por extração assistida por ultrassom. No entanto, as amostras foram recolhidas de quatro mercados diferentes na área metropolitana de Barcelona (Catalunha, Espanha), isto é, mexilhão pronto a ser cozinhado, ao contrário das amostras dos trabalhos anteriormente mencionados. Para a otimização do procedimento de extração foram testados diferentes solventes, puros ou misturados em diferentes proporções: *n*-hexano, pentano, tolueno e acetato

de etilo, e foram ainda realizados testes com diferentes tempos de extração, sendo que o solvente que obteve melhores resultados foi o *n*-hexano, com um tempo de extração de 25 minutos. Resumidamente, foram pesados aproximadamente 3 g de amostra homogeneizada (peso húmido), aos quais foram adicionados 3 mL de *n*-hexano, sendo a mistura sujeita a ultrassons, seguida de centrifugação. Em seguida, 990 µL do sobrenadante foram transferidos para um frasco e foram adicionados 10 µL de padrão interno (M4Q). Os frascos foram armazenados a 20 °C até a análise GC-MS. No que diz respeito aos resultados obtidos, apenas são fornecidas as concentrações médias - 1,13 ng/g_{peso húmido} para o D3, 5,63 ng/g_{peso húmido} para o D4, 3,94 ng/g_{peso húmido} para o D5 e 2,15 ng/g_{peso húmido} para o D6. Neste caso, as amostras do mercado foram expostas a fontes adicionais de siloxanos durante o seu transporte e armazenamento, onde se inclui a exposição ao ar interno em mercados públicos fechados, em que as concentrações de cVMS no ar podem favorecer a migração ar-amostra desses compostos, também devido à eventual manipulação das amostras por parte das pessoas que utilizam produtos de cuidado pessoal contendo siloxanos. No entanto, não são verificados níveis superiores nestas amostras quando comparados com os outros estudos no mexilhão, pelo que seria interessante a investigação em amostras prontas para consumo, para poder comparar os resultados e perceber até que ponto há uma exposição dos seres humanos aos VMSs a partir da alimentação de mexilhão ou peixe. Na verdade, o consumo diário de moluscos é baixo - 7,00 g/dia *per capita* na União Europeia (FAO, 2015) - sendo uma pequena fração da quantidade total de peixes e frutos do mar que se estima ser ingerida diariamente (63 g/pessoa na União Europeia). Portanto, a contribuição dos moluscos para a ingestão diária de siloxanos é baixa. Mesmo supondo que, antes de sua ingestão, essas concentrações possam eventualmente ser aumentadas devido à migração de VMSs das embalagens de alimentos (Lund e Petersen, 2002), é improvável que representem qualquer ameaça real à saúde humana, uma vez que se considera a sua eliminação durante o cozimento. No entanto, a sua acumulação potencial após a exposição de longo prazo por vias diferentes deve continuar a ser explorada.

No que diz respeito à presença de VMSs em areias, até à data não há muita informação disponível, existindo na literatura somente um estudo de Capela *et al.* (2019), realizado em 23 praias da zona costeira do Norte de Portugal, recolhidas no final do verão e no inverno. A metodologia de extração consistiu na pesagem de 5 g de areia e extração com 3 mL de solvente de extração (*n*-hexano) por agitação por vórtex (3 min), seguida de uma etapa de ultrassons (10 min). De seguida, o primeiro QuEChERS (2400 mg de MgSO₄ anidro e 750 mg de NaCH₃COO) foi adicionado à amostra e a mistura foi submetida a vórtex por 3 min e centrifugada por 10 min a 3700 rpm (2280 g). O sobrenadante foi recolhido do primeiro QuEChERS e transferido para um tubo contendo o segundo QuEChERS (180 mg de MgSO₄ anidro, 60 mg de PSA e 30 mg C₁₈). A mistura foi agitada no vórtex e centrifugada novamente sob as mesmas condições, e o sobrenadante foi reduzido para 50 µL sob uma corrente de azoto e analisado por GC-MS. Os resultados revelaram a presença de VMSs em todas as amostras analisadas numa gama entre 0,007 ± 0,001 ng/g_{peso seco} e 17,8 ± 0,9 ng/g_{peso seco} (média: 1,00 ng/g_{peso seco}), sendo os cíclicos os mais detetados, em particular o D6 (99%; média: 3,28 ng/g_{peso seco}) e o D5 (93%; média: 0,92 ng/g_{peso seco}). É de salientar que foram detetadas concentrações

mais elevadas no verão do que no inverno, com concentrações totais médias de $133 \pm 4 \text{ ng/g}_{\text{peso seco}}$ e $115 \pm 4 \text{ ng/g}_{\text{peso seco}}$, respectivamente, sendo que os níveis mais baixos durante o inverno podem ser explicados por fatores de diluição relacionados às chuvas ou diferenças nas marés que podem afetar a dispersão dos poluentes alvo. É ainda importante realçar que, dada a proximidade de todos os pontos de amostragem a áreas urbanas, não foi possível definir tendências específicas entre as concentrações individuais e/ou totais de VMSs e as características de cada praia – uma vez que todas tinham o mesmo nível de exposição ao impacto antropogénico que, como já foi referido, potencia o aumento dos níveis de VMSs nas matrizes ambientais.

Para além dos siloxanos, as areias têm contribuído como indicadores de outros contaminantes, incluindo emergentes como, por exemplo, os microplásticos. Num estudo realizado na China, foi detetada a presença de microplásticos e de fibras de celulose sintéticas, tendo sido avaliado o efeito do turismo e da profundidade onde as amostras foram recolhidas. Assim, amostras de superfície continham mais microplásticos do que as recolhidas em maior profundidade e as amostras de praias balneares apresentavam maiores concentrações do que as de praias remotas, sugerindo assim um impacto do turismo no aumento dos níveis dos contaminantes (Yu *et al.*, 2016). Mais recentemente, foi estudada a ocorrência e composição microplástica ao longo da costa polaca (sul do Mar Báltico) em 12 praias que diferiam em termos de intensidade da sua exploração turística e urbanização. Os tipos de microplásticos dominantes foram as microfibras e fragmentos de plástico. Por outro lado, as maiores concentrações de microplásticos foram registadas em algumas praias urbanas, indicando que a densidade populacional e o nível de desenvolvimento da zona costeira são fatores importantes que afetam o nível de poluição de microplásticos nas praias (Urban-Malinga *et al.*, 2020). Tal constitui um problema ambiental por si só, mas também porque os microplásticos têm o potencial de interagir com poluentes químicos, por exemplo, no ambiente aquático (Baztan *et al.*, 2018). Os VMS poderão ser um exemplo, aderindo à superfície dos microplásticos ou penetrando-os, onde têm tendência para se concentrarem muito mais do que na água ao redor (Crawford e Quinn, 2017), pelo que os microplásticos podem ser uma das origens dos VMSs nas areias.

Dado que o estudo dos VMSs em areias é escasso, são apresentados alguns estudos dos siloxanos em sedimentos marinhos e de rio, por ser a matriz que mais se assemelha à areia. Quando libertados no ambiente aquático, os VMSs tendem a adsorver às partículas que se depositam nos sedimentos (Powell *et al.*, 2018), indicando que o sedimento pode ser uma fonte direta de exposição para os organismos aquáticos. Tal levou Zhi *et al.* (2018) a investigar os níveis de concentração de VMSs não só em moluscos, como suprarreferido, mas também em sedimentos. Assim, a distribuição espacial de metilsiloxanos nos sedimentos entre as sete cidades foi semelhante à das amostras de moluscos discutidas acima, indicando que o sedimento deve ser uma das fontes importantes de metilsiloxanos para os moluscos na área de estudo. De um modo geral, os níveis foram mais altos nos sedimentos (concentrações variando de <LOQ a $18460 \text{ ng/g}_{\text{peso seco}}$) do que aqueles detetados no estudo nas areias de praia (concentrações variando entre <LOQ – $5,4 \text{ ng/g}_{\text{peso seco}}$). Na verdade, comparando esses resultados com as concentrações de VMSs na areia, as últimas

estavam mais próximas da concentração mínima das gamas de concentração dos sedimentos. Isso pode ser explicado pelo facto de a maioria dos referidos sedimentos terem sido recolhidos próximo a descargas de ETARs (Sanchís *et al.*, 2013 e Zhang *et al.*, 2011), ou de zonas bastante industrializadas (Lee *et al.*, 2018), e pelo alto conteúdo orgânico desses sedimentos quando comparados à areia. Zhi *et al.* (2018) e Hong *et al.* (2014), foram os que obtiveram níveis mais baixos entre os vários estudos apresentados. No entanto, no primeiro estudo as gamas de concentrações foram um pouco mais elevadas, o que provavelmente se deve à influência de indústrias relacionadas com a petroquímica, que contribuem para a libertação de metilsiloxanos para o meio marinho, destacando-se Tianjin, que é a maior cidade da região do Mar de Bohai e uma importante base da indústria química na China.

Em suma, de acordo com a bibliografia existente, é de salientar a notória prevalência global dos VMSs cíclicos em relação aos lineares e que os dois compostos presentes em maiores concentrações nas matrizes estudadas são, em geral, o D5 e o D6. Por outro lado, é também sugerida uma provável influência do turismo durante a época balnear e, ainda, da urbanização e industrialização, pelo que, provavelmente há de facto um impacte antropogénico associado.

Relativamente às tecnologias de extração disponíveis, a técnica QuEChERS, utilizada por Capela *et al.* (2019), tem-se revelado vantajosa, nomeadamente mais rápida, bastante precisa e, ainda, permite reduzir o manuseio dos extratos quando comparada com outras técnicas tradicionais (Homem *et al.*, 2013). É ainda de realçar as elevadas recuperações que esta técnica permite obter, quando comparadas com as outras metodologias apresentadas, todas elas bastante próximas dos 100%, como desejável, à exceção do L3, onde a recuperação foi de apenas 56%, fruto da maior volatilidade deste composto. A principal desvantagem deste método está relacionada com o baixo fator de pré-concentração, quando comparado com os obtidos com outros métodos. Porém, a alta sensibilidade das técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, nomeadamente a GC-MS (utilizada em todos os trabalhos apresentados), permite a adequada utilização deste método (Prestes *et al.*, 2009).

Portanto, dada a preocupação do impacte dos VMSs nas zonas costeiras, e com vista a alargar e aprofundar o estudo destes compostos nestes ecossistemas, este trabalho focar-se-á no estudo de sete VMSs, dos quais quatro cíclicos (D3-D6) e três lineares (L3-L5) em vinte e seis amostras de areia da Galiza e em vinte outras praias espalhadas pela Europa, bem como na validação de um método de extração de VMSs de mexilhão e respetiva análise em dez amostras, recorrendo à técnica QuEChERS.

Tabela 3 - Estudos sobre a determinação de siloxanos em mexilhão, sedimentos e areia.

Matriz (Local de estudo)	Analitos	Método de extração	Método instrumental	Recuperação (%)	LOD	LOQ	Gama de Concentração	Referência bibliográfica	
Moluscos: mexilhão, bivalve, ostra (Mar de Bohai, China)	D4	SLE 30 min (<i>n</i> - hexano/acetato de etilo (1:1)) x 3	GC-MS	87-89	Não disponível	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	Zhi <i>et al.</i> , 2018	
	D5					3,5	<LOQ – 47,6		
	D6					2,9	<LOQ – 77,3		
	L8					3,0	<LOQ – 90,4		
	L9					2,4	<LOQ – 16,3		
	L10					2,3	<LOQ – 17,5		
	L11					2,9	<LOQ – 12,6		
	L12					2,1	<LOQ – 15,8		
	L13					1,9	<LOQ – 17,3		
	L14					2,1	<LOQ – 13,6		
L15	2,7	<LOQ – 15,4							
L16	3,3	<LOQ – 13,4							
						3,1	<LOQ – 14,7		
Mexilhão (Oslofjord, Noruega)	D4	SLE 30 min (Tetraidrofurano) x 2	GC-MS	Não disponível	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	Powell <i>et al.</i> , 2018
	D5					0,33	0,83	<LOQ – 3,77	
	D6					0,66	1,6	4,14 – 251,80	
						0,40	<LOQ – 8,69		
Mexilhão (Baía de Dalian, China)	D4	SLE 30 min (<i>n</i> - hexano/acetato de etilo (1:1)) x 3	GC-MS	71-103	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	Jia <i>et al.</i> , 2015
	D5					2,60	5,07	<LOQ – 7,88	
	D6					2,12	3,86	<LOQ – 12,3	
	D7					1,68	3,39	<LOQ – 23,9	
	L4 – L17					1,08	1,95	<LOQ – 6,36	
						0,12 - 1,32	0,07- 3,96	<LOQ	
Mexilhão (Catalunha, Espanha)	D3	USE 25 min (<i>n</i> - hexano)	GC-MS	71-92	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	(ng/g _{peso húmido})	Sanchís <i>et al.</i> , 2016
	D4					0,05	0,2	1,13*	
	D5					0,1	0,3	5,63*	
	D6					0,05	0,15	3,94*	
						0,2	0,5	2,15*	

* Concentração média

Tabela 3 - Estudos sobre a determinação de siloxanos em mexilhão, sedimentos e areia (Cont.).

Matriz (Local de estudo)	Analitos	Método de extração	Método instrumental	Recuperação (%)	LOD (pg/g)	LOQ	Gama de Concentração (ng/g _{peso seco})	Referência bibliográfica
Areia de praia (Portugal)	D3	d-SPE QuEChERS 3 min vórtex + 10 min USE (<i>n</i> -hexano)	GC-MS	56 – 111	0,002 – 1,01	Não disponível	<LOQ – 2,4	Capela <i>et al.</i> , 2019
	D4						<LOQ – 3,35	
	D5						<LOQ – 5,4	
	D6						0,06 – 18	
	L3						<LOQ – 0,32	
	L4						<LOQ – 0,323	
	L5						<LOQ – 0,3	
Sedimentos marinhos (Baía de Dalian, China)	D4	SLE 30 min (<i>n</i> - hexano/acetato de etilo (1:1)) x 3	GC-MS	107 ± 11	0,99	1,43	<LOQ – 1,81	Hong <i>et al.</i> , 2014
	D5						<LOQ – 22,7	
	D6						<LOQ – 5,10	
	D7						<LOQ – 3,88	
Sedimentos marinhos (China)	D4	SLE 5 min vórtex + 15 min USE (<i>n</i> -hexano/acetato de etilo (1:1)) x 3	GC-MS	92-96	Não disponível	(ng/g _{peso seco}) 1,8	14,4 – 39,8	Zhi <i>et al.</i> , 2018
	D5						18,4 – 49,2	
	D6						28,3 – 80,6	
	L8						6,54 – 15,4	
	L9						8,61 – 15,8	
	L10						<LOQ – 14,6	
	L11						9,24 – 16,1	
	L12						<LOQ – 18,3	
	L13						10,3 – 20,3	
	L14						<LOQ – 10,8	
	L15						<LOQ – 15,1	
	L16						<LOQ – 19,9	

Tabela 3 - Estudos sobre a determinação de siloxanos em mexilhão, sedimentos e areia (Cont.).

Matriz (Local de estudo)	Analitos	Método de extração	Método instrumental	Recuperação (%)	LOD (ng/g _{peso seco})	LOQ (ng/g _{peso seco})	Gama de Concentração (ng/g _{peso seco})	Referência bibliográfica
Sedimentos de rio (Catalunha, Espanha)	D3	USE 25 min (<i>n</i> - hexano/acetato de etilo (1:1))	GC-MS	92-100	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	<LOQ – 121	Sanchís <i>et al.</i> , 2013
	D4			91-92	0,9 ± 0,1	1,8 ± 0,3	<LOQ – 679	
	D5			80-82	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	3,39 – 1270	
Sedimentos das baías de Ulsan e Onsan (Coreia)	D5	SLE 60 min (<i>n</i> -hexano, <i>n</i> -hexano/dicloro- metano (1:1), <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (1:1))	GC-MS-MS	97 ± 5	Não disponível	0,08	8,29 – 1000	Lee <i>et al.</i> , 2018
	D6			98 ± 8		0,04	<LOQ – 601	
	D7			74 ± 7		0,05	<LOQ – 202	
	L4			99 ± 4		0,06	<LOQ – 2,00	
	L5			76 ± 10		0,07	<LOQ – 89,1	
	L6			87 ± 10		0,02	<LOQ – 330	
	L7			82 ± 10		0,04	<LOQ – 863	
	L8			86 ± 12		0,03	0,16 – 1640	
	L9			89 ± 10		0,07	0,46 – 1846	
	L10			98 ± 10		0,10	0,56 – 1601	
	L11			97 ± 12		0,07	<LOQ – 1295	
	L12			105 ± 14		0,06	0,34 – 954	
	L13			114 ± 14		0,08	0,17 – 535	
	L14			121 ± 15		0,24	<LOQ – 249	
	L15			132 ± 16		0,14	<LOQ – 96,6	
	L16			134 ± 12		0,20	<LOQ – 80,4	
	L17			144 ± 10		0,29	<LOQ – 69,4	
Sedimentos do rio Songhua (China)	D4	SLE 30 min (<i>n</i> - hexano/acetato de etilo (1:1))	GC-MS	79 ± 11	Não disponível	0,5	0,98 – 33,0	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	D5					1,0	3,40 – 155	
	D6					0,6	1,52–527	
	D7					1,0	1,85–1350	
	L4-L16					0,28 – 2,0	1,14–79,9	

4. Metodologia

4.1 Reagentes

No que concerne aos compostos químicos utilizados, foram adquiridos na Sigma-Aldrich os padrões dos VMSs selecionados para análise: octametiltrisiloxano (L3), decametiltetrasiloxano (L4), dodecametilpentasiloxano (L5), hexametilciclotrisiloxano (D3), octametilciclotetrasiloxano (D4), decametilciclopentasiloxano (D5) e dodecametilciclohexasiloxano (D6), com níveis de pureza superiores a 97%, bem como tetrakis(trimetilsililoxi)silano (M4Q), usado como padrão interno. Sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) e acetato de sódio (CH_3COONa) obtidos pela Panreac AppliChem (Barcelona, Espanha), PSA e C_{18} da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) foram utilizados na preparação do QuEChERS. Foram também utilizados como solventes de extração o *n*-hexano, diclorometano e acetato de etilo, adquiridos à VWR (Fontenay-sous-Bois, França). Azoto (99,995%), para evaporação da amostra, e hélio (99,9999%), usado como gás de arraste no sistema GC-MS, foram fornecidos pela Air Liquide (Maia, Portugal). Os filtros de seringa, com um poro de 0,2 μm , utilizados na filtração dos extratos nos ensaios com o mexilhão, foram adquiridos à VWR. Foi ainda utilizada acetona técnica adquirida na VWR na lavagem das microseringas e no material de vidro.

4.2 Preparação de padrões

Todas as soluções e diluições foram preparadas em *n*-hexano e protegidas da luz com papel de alumínio e armazenadas a uma temperatura de -20 °C. Foi preparada, a partir de cada solução comercial, um padrão individual de concentração de 1 g/L e, a partir deste, uma solução *stock* de concentração 5 mg/L, contendo todos os compostos-alvo (D3-D6 e L3-L5). Foi ainda preparada uma solução *stock* individual de M4Q a 5,0 mg/L. A partir destas soluções *stock* foram preparados padrões de calibração através de diluições adequadas. Para a análise das areias, foram preparados oito padrões de calibração (5, 50, 100, 200, 350, 500, 600 e 750 $\mu g/L$), com uma concentração de padrão interno (M4Q) de 500 $\mu g/L$. Já para a análise das amostras de mexilhão, utilizaram-se dez padrões de calibração (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 $\mu g/L$), com concentração de M4Q de 250 $\mu g/L$. Foi ainda preparada uma solução de M4Q com uma concentração de 500 $\mu g/L$, para ser utilizada como padrão interno na extração das amostras.

4.3 Amostragem

4.3.1 Amostragem de areias

Amostras de areia seca foram recolhidas à superfície (profundidade até de cerca de 5 cm), combinando sub-amostras de vários pontos em cada praia, em vinte praias europeias entre 2017 e 2019 (Figura 4) - Formosa (Madeira, Portugal, 05/09/2019), Fluvial do Faial (Vila do Prado, Portugal, 28/06/2019), Fluvial do Pego Fundo (Alcoutim, Portugal, 03/11/2018), Fluvial de Crestuma (Crestuma, Portugal, 01/07/2019), Fluvial do Choupal (Pedorido, Portugal, 02/06/2019), Jandía (Fuerteventura, Espanha, 03/08/2017), Juan Gomez (Fuerteventura, Espanha, 05/08/2019), Ajuy (Fuerteventura, Espanha, 05/08/2019), Chica (Fuerteventura, Espanha, 06/08/2019), de la Concha (Fuerteventura, Espanha, 06/08/2019), Las Clavellinas (Fuerteventura, Espanha, 06/08/2019), Plage Concurrance (La Rochelle, França, 17/05/2019), Plage des Minimes (La Rochelle, França, 17/05/2019), Plage de la Loge (Ilha de Ré, França, 17/05/2019), Motala (Suécia, 11/09/2019), Helsinki South Harbour (Finlândia, 29/05/2019), Helsinki Sandudd (Finlândia, 27/05/2019), Lahti (Finlândia, 29/05/2019), Portokali (Sithonia, Grécia, 19/06/2019) e Sarti (Sithonia, Grécia, 19/06/2019) – e em 26 praias da costa da Galiza, Espanha, entre 10 e 14 de junho de 2019 (Figura 5).

Todas as amostras foram armazenadas envoltas em papel de alumínio muflado e passado por acetona e dentro de sacos de polipropileno, de modo a estarem protegidas da luz, a -20 °C, até ao momento da extração.

4.3.2 Amostragem dos mexilhões

Os mexilhões utilizados nos ensaios de validação do método de extração foram comprados num supermercado local. Para além disso, foram analisados mexilhões recolhidos em 6 das praias da Galiza - Area da Secada (Ilha Arousa), Concha (Vilagarcía de Arousa), Ladeira (Corrubedo), Testal (Nóia), Concha (Cee) e Sabón (Arteixo) – e também 4 amostras de mexilhão depurado e não depurado, recolhidas numas salinas abandonadas e no canal Espinheiro, ambos na Ria de Aveiro (Portugal), no dia 10 de maio de 2019.

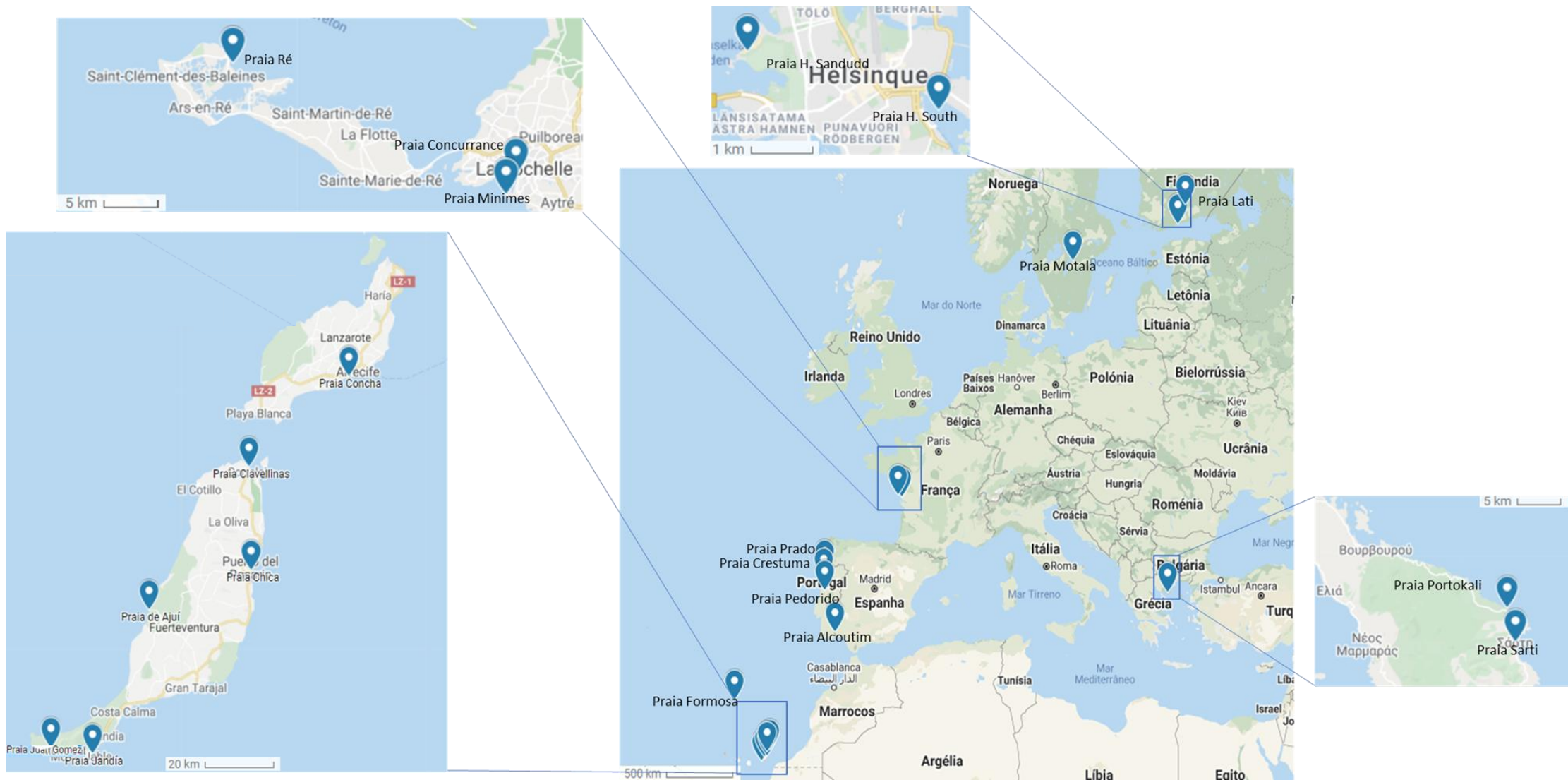


Figura 4 - Localização geográfica dos diferentes locais de amostragem das praias europeias.

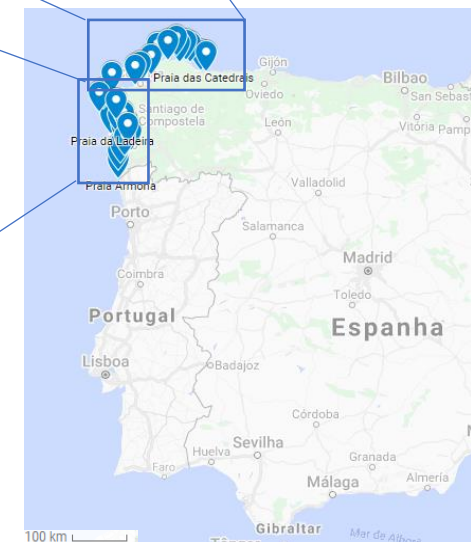
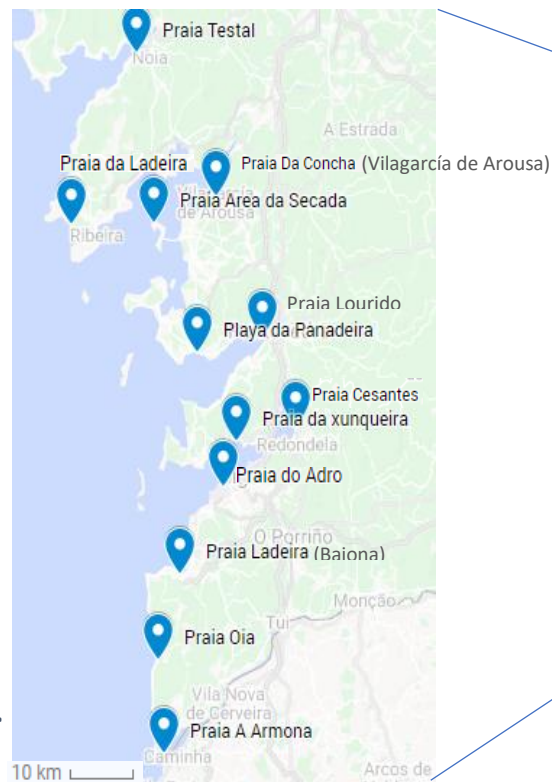
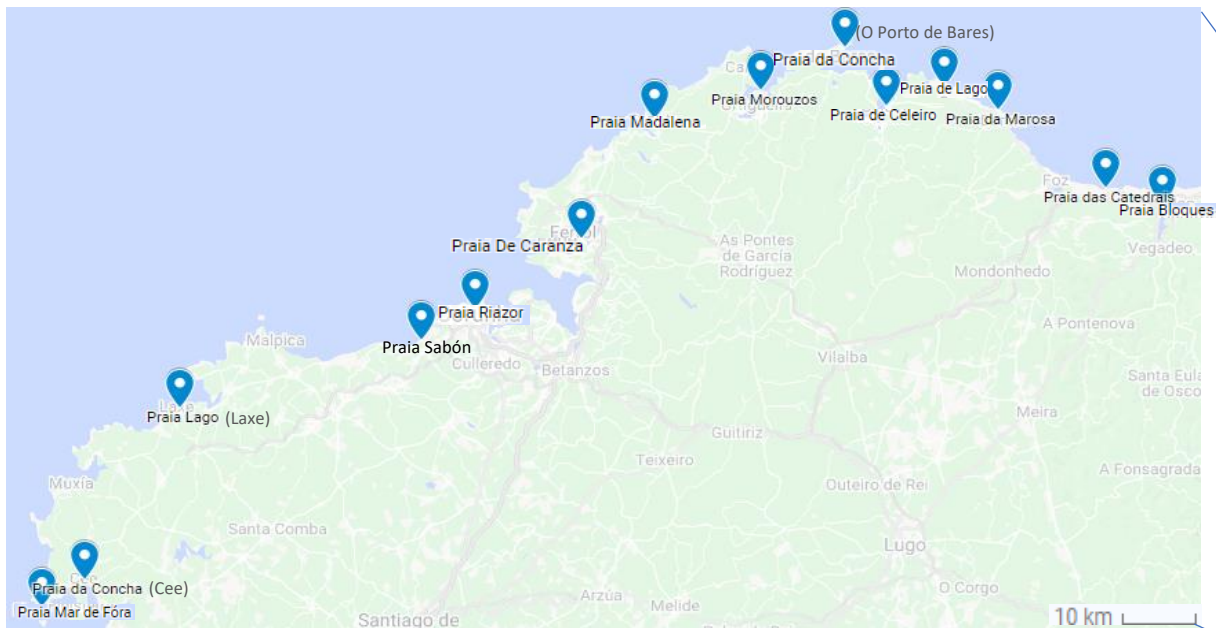


Figura 5 - Localização geográfica dos diferentes pontos de amostragem na costa da Galiza, Espanha.

4.4 Métodos de extração

4.4.1 Extração nas areias

Inicialmente, prepararam-se dois tubos com diferente conteúdo de sais e sorbentes para serem utilizados no processo de extração, os quais foram denominados por QuEChERS 1 e 2. Embora existam QuEChERS já preparados comercialmente disponíveis, ambos os QuEChERS 1 e 2 foram preparados no laboratório, uma vez que este procedimento foi considerado economicamente favorável e igualmente bom no desempenho. O QuEChERS 1 foi preparado com 2400 mg de $MgSO_4$ e 750 mg de CH_3COONa e a sua utilização teve como objetivo promover a separação de fases: o sulfato de magnésio é higroscópico, permitindo a absorção de água presente na amostra, já o acetato de sódio garante a manutenção do pH e da polaridade na fase aquosa, promovendo a migração dos analitos para a fase orgânica. O QuEChERS 2 consistiu em 180 mg de $MgSO_4$, juntamente com 60 mg de PSA e de 30 mg C_{18} e foi utilizado para remover compostos indesejados, o PSA e o C_{18} permitem, tal como anteriormente explicado, a remoção de impurezas polares e apolares, respetivamente.

A metodologia analítica utilizada para a extração e quantificação dos VMSs nas areias de praias foi baseada na metodologia validada pela equipa de investigação do laboratório E201 do LEPABE (Capela *et al.*, 2019). Relativamente ao procedimento de extração de VMSs de areias, estas foram primeiro peneiradas, das quais apenas as partículas da gama $dp = 300 - 1000 \mu m$ foram analisadas. 5 g de areia foram colocadas num tubo tipo Falcon de 50 mL de polipropileno ao qual foram adicionadas 25 ng do padrão interno M4Q e 3 mL de *n*-hexano, sendo a mistura homogeneizada no vórtex (IKA VORTEX 3) durante 3 minutos. De seguida, o tubo Falcon foi colocado num banho de ultrassons JP Selecta (Barcelona, Espanha) com uma potência de 420 W, durante 10 minutos. Posteriormente foi adicionado o conteúdo do QuEChERS 1 ao tubo que continha a amostra, agitando-se 3 minutos no vórtex e centrifugando, na centrífuga Hettich KG D-78532 (Tuttlingen, Alemanha), durante 10 minutos a 3700 rpm (2760 g). Depois de remover o sobrenadante, este foi adicionado ao tubo contendo os sorbentes de *clean-up* (QuEChERS 2). Foi novamente levado ao vórtex durante 3 minutos e centrifugado nas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante foi transferido para um vial âmbar de 1,5 mL e o volume foi reduzido para cerca de 200 μL sob corrente de azoto. Por fim, transferiu-se o extrato para um vial âmbar de 1,5 mL contendo um *insert* e reduziu-se o volume sob corrente de azoto para 50 μL , seguindo-se depois a análise em GC-MS. As etapas do procedimento de extração realizado encontram-se ilustradas na Figura 6.

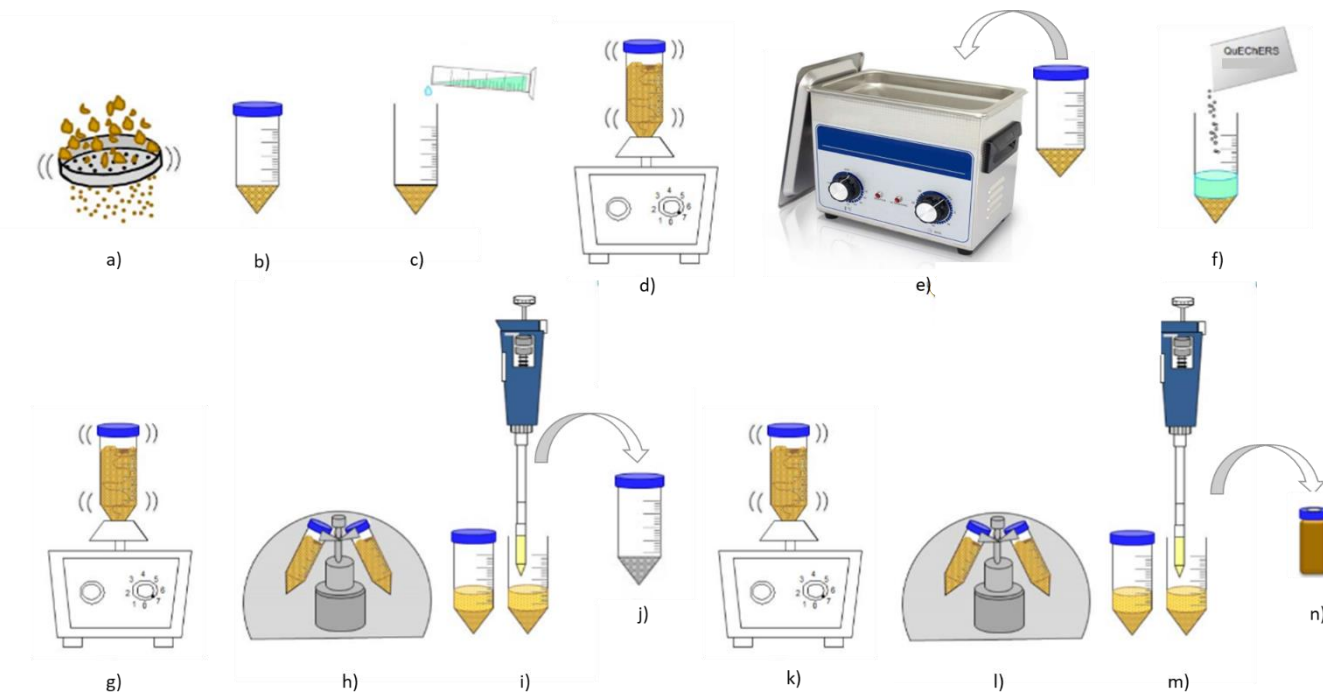


Figura 6 - Passos de extração com a técnica QuEChERS. a) peneiração; b) tubo com as 5 gramas de areia; c) adição do solvente e do padrão interno; d) vórtex; e) banho de ultrassons; f) adição do conteúdo de QuEChERS; g) vórtex; h) centrifugação; i) recolha do sobrenadante; j) adição do sobrenadante ao tubo contendo o conteúdo do QuEChERS 2; k) vórtex; l) centrifugação; m) recolha do sobrenadante; n) vial com o extrato para análise. Adaptado de Vera *et al.* (2013).

4.4.2 Extração em mexilhões

No que diz respeito às extrações dos VMSs nos mexilhões, o procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente para as areias. Contudo, neste caso a composição dos QuEChERS foi diferente (QuEChERS 1: 6 g de $MgSO_4$ + 1,5 g de CH_3COONa ; QuEChERS 2: 0,9 g de $MgSO_4$ + 0,3 g de PSA + 0,15 g C_{18}).

Foram ainda realizados previamente testes com 3 solventes de extração, com amostra liofilizada e não liofilizada e, ainda, com e sem filtração dos extratos resultantes. O protocolo que obteve os melhores resultados consistiu no *n*-hexano como solvente, a amostra sem liofilizar e o extrato sem filtrar. Assim, a 2,5 g de mexilhão, previamente triturado, foram adicionados 37,5 ng de M4Q e 10 mL de *n*-hexano, sendo a mistura homogeneizada no vórtex durante 3 minutos. De seguida, o procedimento foi semelhante ao realizado com as areias, com a exceção da duração do banho de ultrassons, que ao invés de 10 minutos foi de 15 minutos e da velocidade rotacional da centrífuga, sendo esta de 4000 rpm e não 3700 rpm. O sobrenadante final foi transferido para um vial âmbar de 12 mL e o volume foi reduzido para cerca de 500 μ L sob corrente de azoto. Transferiu-se o volume para um vial âmbar de 1,5 mL com lavagens com *n*-hexano e reduziu-se em azoto o volume. Por fim, transferiu-se o extrato para um vial âmbar de 1,5 mL contendo um *insert* e reduziu-se o volume sob corrente de azoto para 150 μ L, seguindo-se depois a análise em GC-MS.

4.5 Análise instrumental

A análise instrumental foi realizada por um investigador do LEPABE, usando um sistema *Varian Ion Trap GC-MS* (Walnut Creek, CA, EUA), equipado com um cromatógrafo gasoso 4000-GC, um espectrómetro de massa com ionização eletrónica 240-MS, um injetor CP-1177 *split/splitless* adaptado com um sistema *Merlin Microseal* (uma válvula alternativa aos septos de borracha de silicone convencionais) e um injetor automático modelo CP-8410. Para minimizar contaminações de fundo de siloxanos, a separação dos compostos foi obtida através de uma coluna ultra-inerte Agilent DB-5ms (30 m comprimento × 0,25 mm diâmetro, espessura de filme de 0,12 µm) com um fluxo constante de hélio (99,999%) a 1,0 mL/min, e um tempo total de análise de 30 minutos. O programa de temperatura do forno foi o seguinte: 35 °C mantido por 5 min, aumentado em 10 °C/min até 95 °C, 140 °C a uma taxa de 5 °C/min e finalmente 300 °C a 35 °C/min (temperatura mantida durante 5,5 min). A injeção de um volume de 1 µL, foi em modo *split*, com rácio de 100. As temperaturas do injetor e do *ion trap* foram ambas de 200 °C e a corrente de emissão do filamento foi de 10 µA. O espectrómetro de massa foi operado no modo de ionização de eletrões (EI) (70 eV) e, para a análise quantitativa de compostos alvo, o modo SIS - *Selected Ion Storage* - foi aplicado.

4.6 Medidas de controlo da qualidade e gestão de resíduos

Face à complexidade de quantificar os VMSs, devido à sua ubiquidade, foram tomadas algumas medidas preventivas para evitar a contaminação de fundo. De entre essas medidas destaca-se a proibição de detergentes não específicos e do uso de PCPs – como cremes, perfumes ou maquilhagem – por parte dos investigadores do laboratório e a utilização de luvas de nitrilo durante todo o trabalho laboratorial. No que diz respeito ao material utilizado, este foi lavado com água destilada e acetona e o material não calibrado foi muflado a uma temperatura de 400 °C durante 2 horas para descontaminação. Foram também analisados brancos laboratoriais, para uma posterior correção dos resultados, se necessário.

Os resíduos gerados neste trabalho experimental foram recolhidos e armazenados em embalagens devidamente etiquetadas e armazenados protegidos da luz e de fontes de ignição para posterior tratamento pelo Sistema de Gestão Ambiental da FEUP – EcoFEUP. Os principais resíduos obtidos foram solventes orgânicos, nomeadamente o *n*-hexano utilizado como solvente de extração tanto para a areia como para o mexilhão, e materiais sólidos resultantes desse procedimento de extração. A acetona usada na lavagem do material foi também recolhida, para ser reutilizada após destilação.

5. Resultados e Discussão

5.1 Validação do método analítico para a determinação de VMSs em areias

Apesar do método de extração das areias já ter sido validado pela equipa de investigação do laboratório E201 do LEPABE, foi realizada uma verificação das condições de validação, através da determinação de parâmetros de quantificação, como a linearidade, bem como os limites de deteção e quantificação, tal como descrito abaixo.

A linearidade da resposta foi avaliada por injeção direta no GC-MS de oito padrões de calibração com concentrações que variaram entre 5 e 750 µg/L. As curvas de calibração foram obtidas representando a razão $\text{área}/\text{área}_{\text{padrão interno}}$ em função da razão $\text{massa}/\text{massa}_{\text{padrão interno}}$ e foram avaliadas de acordo com os critérios propostos por Harris (2003). Foi obtida linearidade nas respostas em toda a gama estudada, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,995 para todos os siloxanos. As retas de calibração obtidas e os respetivos coeficientes de correlação encontram-se na Tabela A1 em Anexo 1. Os limites de deteção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) para cada VMS (Tabela 4) foram determinados com base nas razões sinal-ruído (S/N) dos analitos. Um S/N de 3 foi utilizado para calcular o LOD, enquanto um S/N de 10 foi usado para determinar o LOQ.

Tabela 4 - Limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada siloxano em estudo, nas areias.

Composto	LOD (pg/g_{peso húmido})	LOQ (pg/g_{peso húmido})
D3	1,3	4,5
D4	1,7	5,6
D5	0,032	0,11
D6	0,91	3,0
L3	1,6	5,3
L4	0,059	0,20
L5	0,095	0,32

A análise da Tabela 4, permite concluir que os valores obtidos do LOD (0,059 – 1,7) pg/g_{peso húmido} foram semelhantes aos indicados por Capela *et al.* (2019) (0,002 – 1,01) pg/g_{peso seco}, o que seria expectável uma vez que o procedimento analítico utilizado foi baseado no método por eles desenvolvido.

5.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de VMSs em mexilhões

O desenvolvimento do procedimento de extração foi inicialmente baseado no protocolo QuEChERS utilizado para as areias, bem como em testes anteriormente realizados pela equipa de investigação sobre as quantidades dos sorbentes a utilizar no passo de *clean-up*. Assim, nos ensaios preliminares para a extração dos VMSs nos mexilhões foram testados 3 solventes: *n*-hexano (Hex) e as combinações *n*-hexano:diclorometano (1:1 v/v) (Hex:DCM) e *n*-hexano:acetato de etilo (1:1 v/v) (Hex:AE), bem como duas pré-preparações de amostra: liofilizada (onde a água é removida através da sublimação sob vácuo) vs não liofilizada. A massa de amostra não liofilizada foi de 2,5 g e, de modo a estimar a massa proporcional necessária de mexilhão liofilizado, foram pesados mexilhões (n=3) antes e após a liofilização, o que permitiu concluir que $80 \pm 1\%$ da massa do mexilhão correspondia a água. Deste modo a massa de mexilhão liofilizado utilizada nos ensaios de recuperação foi de 500 mg ($20\% \times 2,5$ g de mexilhão).

Para os ensaios de recuperação foram adicionados 37,5 ng de M4Q e 10 mL de solvente e, à exceção dos brancos de laboratório (LB - *lab blank*) e das amostras (S - *sample*), foram adicionados 75 ng da solução *stock mix* de siloxanos, sendo o restante procedimento igual ao explicado na secção 4.4.2. Foi também avaliado o efeito da filtração dos extratos para todos os solventes e pré-preparações de amostras testadas, antes de os colocar nos *vials* âmbar de 12 mL. Para calcular as percentagens de recuperação recorreu-se à Equação 1. R1, R2 e R3 correspondem aos três replicados (n=3) efetuados, com amostras enriquecidas com os analitos alvo a um nível de 150 ng/g_{peso seco}. No final foi realizada uma média das 3 percentagens de recuperação (%Rec).

$$\%Rec = \frac{A/Api_{R1-3} - A/Api_S}{A/Api_{500ppb}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde A/Api_{R1-3} – Razão área/área_{padrão interno} do R1 a R3; A/Api_S – Razão área/área_{padrão interno} do S; A/Api_{500ppb} – Razão área/área_{padrão interno} de um padrão de concentração 500 ppb (igual à concentração esperada no extrato final).

No que diz respeito aos solventes selecionados, o *n*-hexano é um solvente apolar, muito utilizado, segundo a literatura, para a extração de VMSs, tendo sido utilizado com sucesso em várias matrizes, incluindo o mexilhão (Sanchís *et al.*, 2016), mas também em sedimentos e peixe (Warner *et al.*, 2010), fitoplâncton e krill (Sanchís *et al.*, 2015), e outras amostras de biota, como mamíferos marinhos (Kaj *et al.*, 2005). Os siloxanos são compostos com baixa polaridade, pelo que foram também escolhidas as duas misturas de solventes referidas com o objetivo de aumentar a gama de polaridade do solvente de extração de duas formas diferentes e, eventualmente, aumentar a extração dos analitos de interesse (polaridade: HEX < DCM < AE) (Razali *et al.*, 2017). A combinação Hex:AE foi utilizada com sucesso em dois dos estudos realizados para extração de VMSs de mexilhão (Zhi *et al.*, 2018; Jia *et al.*, 2015). O Hex:DCM, embora não tenha sido o

solvente utilizado em nenhum dos trabalhos com o mexilhão, já foi utilizado para a extração de VMSs, como por exemplo por Lee *et al.* (2018) em sedimentos marinhos provenientes da Coreia.

Na Figura 7 encontram-se as recuperações médias dos testes efetuados, divididos por solvente utilizado.

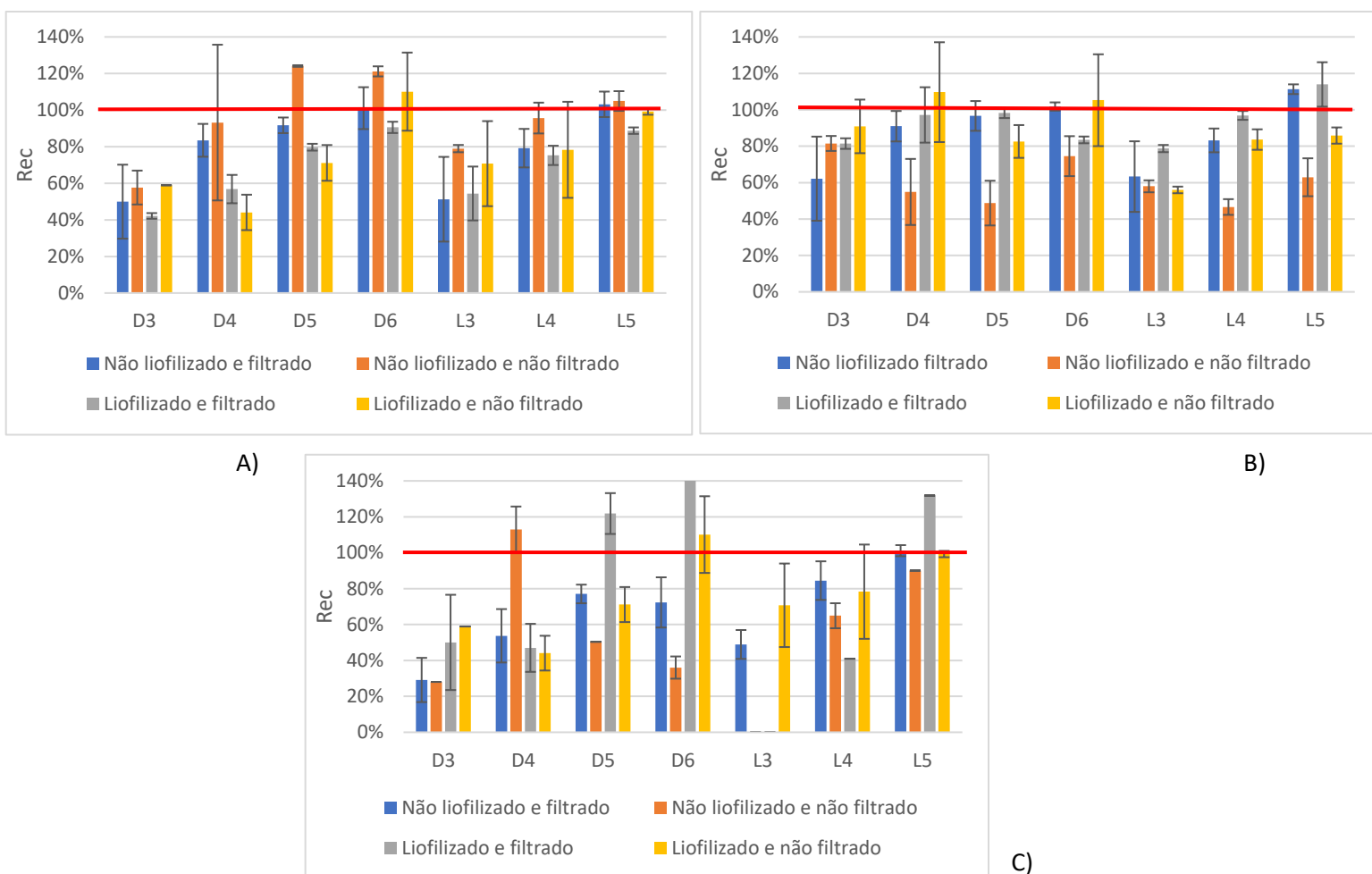


Figura 7 - Recuperação (%) nos ensaios com 3 solventes diferentes (n=2): a) Hex; b) Hex:AE e c) Hex:DCM. Nível de fortificação: 150 ng/g_{peso seco}.

Analisando os resultados, é possível observar que a liofilização não permitiu obter melhorias nas recuperações (barras cinzas e amarelas da Figura 7), pelo que a opção “liofilizar” foi descartada, reduzindo também o tempo do processo, os custos energéticos e a manipulação das amostras. Comparando então os métodos “não liofilizado e filtrado” (barras azuis) e “não liofilizado e não filtrado” (barras laranjas) para cada solvente, é notória a pior prestação, em termos de percentagem de recuperação, do Hex:DCM, com recuperações médias de $67 \pm 10\%$ e $55 \pm 4\%$, respetivamente, pelo que a utilização deste solvente de extração foi descartada. No caso do Hex, a filtração não produziu muita diferença nas recuperações dos compostos – $80 \pm 12\%$ face a $97 \pm 10\%$ sem filtração. No entanto, no caso do Hex:AE a filtração parece ser mais vantajosa $87 \pm 10\%$ vs $61 \pm 9\%$, provavelmente porque durante a extração são co-extraídos outros compostos que ficam em solução, fruto da maior polaridade desta combinação de solventes, mas que são retidos no filtro. Desta forma, após a análise dos resultados, conclui-se que dois protocolos – amostra não

liofilizada, extraída com Hex e sem filtração e amostra não liofilizada, extraída com Hex:AE e com filtração do extrato – obtiveram as melhores performances, mas com resultados bastantes idênticos, o que conduziu à repetição de ambos os testes, estando os resultados presentes na Figura 8.

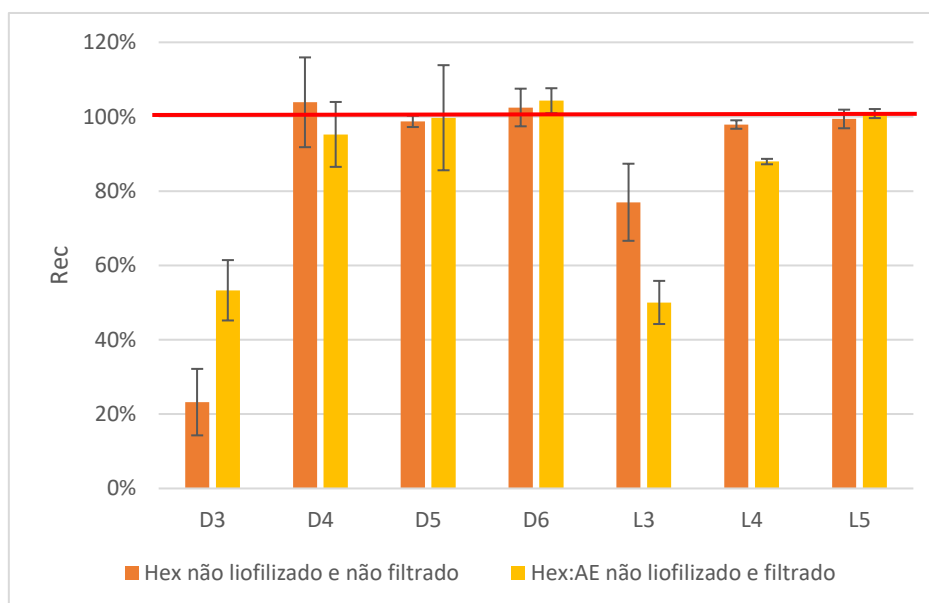


Figura 8 - Repetição dos 2 melhores ensaios selecionados (n=2). Nível de adição de padrão: 150 ng/g_{peso seco}.

Como se pode analisar pelos resultados, as duas condições apresentaram resultados semelhantes, com uma média das taxas de recuperação de $86 \pm 6\%$ – Hex, não filtrado – versus $84 \pm 6\%$ – Hex:AE, filtrado – pelo que, para a escolha do protocolo a adotar, foram tidas em consideração não só as taxas de recuperação dos compostos, mas também outros fatores importantes como, por exemplo, a resolução cromatográfica e a aparência dos extratos, uma vez que, para a análise instrumental GC-MS, a limpeza dos extratos é muito importante para evitar a introdução de compostos interferentes na coluna cromatográfica, que podem comprometer o seu desempenho ou influenciar na qualidade da separação. Neste caso, os extratos de Hex apresentavam um aspeto transparente, em comparação com os extratos de Hex:AE, mais amarelados/alaranjados. Por outro lado, tendo em conta que a etapa final da extração é a redução do volume do extrato sob uma corrente de azoto, a menor volatilidade do acetato de etilo torna este processo mais demorado, aumentando o tempo global do processo e o risco de contaminação externa dos extratos. Tendo em consideração os resultados obtidos e as justificações apresentadas, foi escolhido o protocolo com Hex como solvente de extração, com a amostra não liofilizada e sem a filtração final dos extratos.

Uma vez escolhido o método, foi então avaliada a sua exatidão, que mede o grau de proximidade entre os resultados obtidos e os esperados, através de ensaios de recuperação (Tabela 5). Assim, as recuperações médias para cada VMSs variaram entre $23 \pm 9\%$ (D3) a $104 \pm 12\%$ (D4), com uma taxa de recuperação média global de $86 \pm 6\%$ alcançada. Para este tipo de análise, os resultados dos ensaios de recuperação são considerados bons quanto mais próximos de 100%, sendo a gama de 80 a 120%

comumente aceite em análises de micropoluentes. Tal foi obtido para todos os siloxanos, exceto para D3 e L3 (provavelmente pela maior volatilidade destes analitos, uma vez que os seus pontos de ebulição são os mais baixos dos siloxanos estudados, bem como as suas pressões de vapor as mais altas). É possível observar que as %Rec são semelhantes ou até ligeiramente melhores às obtidas por Zhi *et al.* (2018) na extração de VMSs em mexilhões, para os compostos D4 (87-89)%, D5 (90-92)% e D6 (88-90)%. Portanto, os resultados da exatidão são em geral adequados, com elevadas taxas de recuperação e baixos desvios padrão.

Foi ainda avaliada a precisão do método, que mede o grau de proximidade entre os resultados obtidos para a mesma amostra. Para tal, foram calculados os coeficientes de variação (CV) de cinco (n=5) extrações realizadas no mesmo dia - repetibilidade (Tabela 5). A repetibilidade foi considerada aceitável, já que os valores de CV obtidos são em geral abaixo de 15%, com uma média de 11%. Na Tabela 5 constam ainda os CV respeitantes à precisão intermédia. Para a obtenção destes resultados, os ensaios foram realizados em três dias diferentes. Os valores variaram entre 3% (L3) e 20% (D3), com uma média de 11%, o que é bastante aceitável tendo em conta as dificuldades inerentes à extração destes compostos vestigiais.

Assim, considerando a complexidade da matriz selecionada e os desafios associados às análises destes compostos voláteis e em níveis vestigiais, os resultados demonstraram que a metodologia proposta é precisa.

Tabela 5 - Avaliação da exatidão (n=3), da repetibilidade (n=5) e da precisão intermédia (n=3).

Composto	Exatidão (%Rec)	Repetibilidade (%CV)	Precisão Intermédia (%CV)
D3	23 ± 9	11	20
D4	104 ± 12	25	17
D5	99 ± 2	2	16
D6	102 ± 5	8	11
L3	77 ± 10	21	3
L4	98 ± 1	6	5
L5	99 ± 2	4	8
Média	86 ± 6	11	11

Por último, foi avaliada a linearidade das respostas por injeção direta no GC-MS de dez padrões de calibração com concentrações variando de 1 a 1000 µg/L dos VMSs em estudo. Logo pode concluir-se que a resposta foi linear em toda a gama estudada, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,995 para todos os siloxanos. As retas de calibração obtidas e os respetivos coeficientes de correlação encontram-se na Tabela A2 em Anexo. O LOD e LOQ foram obtidos da mesma forma que anteriormente explicado para as areias, estando os resultados presentes na Tabela 6.

Tabela 6 - Limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada siloxano em estudo, nos mexilhões.

Composto	LOD (pg/g_{peso húmido})	LOQ (pg/g_{peso húmido})
D3	0,018	0,059
D4	0,025	0,084
D5	0,044	0,15
D6	0,035	0,12
L3	0,19	0,62
L4	0,12	0,40
L5	0,36	1,2

Comparando os valores destes limites com os da literatura, facilmente se constata que este método é o que permite detetar e quantificar os siloxanos em menores concentrações no mexilhão, na ordem dos pg/g_{peso húmido}, ao invés dos ng/g_{peso húmido} obtidos por Zhi *et al.* (2018), Powell *et al.* (2018), Jia *et al.* (2015) e Sanchís *et al.* (2016), permitindo assim a análise de VMSs a níveis vestigiais.

Por todos os motivos suprarreferidos, o método foi considerado válido para o fim a que se destina: a posterior quantificação de VMSs em amostras naturalmente contaminadas de mexilhão.

5.3 Estudo dos VMSs em areias

5.3.1 Areias recolhidas em várias praias europeias

No que diz respeito ao estudo dos metilsiloxanos nas areias, foram estudados os siloxanos D3-D6 e L3-L5 em areias recolhidas de 20 praias europeias, sendo que foram detetados VMSs em todas elas. Na Tabela 7 encontram-se representadas as concentrações obtidas para cada VMS em cada praia e o respetivo desvio-padrão associado.

Tabela 7 - Concentrações médias (ng/g_{peso húmido}) de VMSs nas areias dos locais em estudo da Europa (n=2).

País	Praia	D3	D4	D5	D6	L3	L4	L5
Espanha	Ajuy	<LOQ	10 ± 6	9,3 ± 0,2	16 ± 7	<LOQ	0,149 ± 0,001	0,251 ± 0,008
	Chica	1,1 ± 0,2	4 ± 2	4,3 ± 0,7	5,5 ± 0,4	0,3 ± 0,2	0,05 ± 0,01	0,51 ± 0,02
	Clavellinas	16 ± 4	33 ± 7	33 ± 3	31 ± 4	0,5 ± 0,1	0,430 ± 0,004	2,41 ± 0,06
	Concha	nd	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,4	3,9 ± 0,4	<LOQ	<LOQ	0,210 ± 0,006
	Jandía	0,19 ± 0,01	3,3 ± 0,4	3,6 ± 0,1	3,9 ± 0,3	<LOQ	<LOQ	0,24 ± 0,02
	Juan Gomez	nd	7,6 ± 0,1	5 ± 1	9 ± 3	0,21 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,32 ± 0,02
Finlândia	H. Sandudd	nd	<LOQ	0,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	H. South	0,3 ± 0,2	1,9 ± 0,3	0,4 ± 0,2	1,5 ± 0,6	<LOQ	<LOQ	nd
	Lahti	nd	<LOQ	0,2 ± 0,2	1,1 ± 0,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ
França	Concurrance	nd	8,6 ± 0,1	4,19 ± 0,01	3,2 ± 0,2	0,91 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,359 ± 0,001
	Minimes	<LOQ	3,6 ± 0,1	2,1 ± 0,5	2,49 ± 0,01	0,09 ± 0,04	<LOQ	0,152 ± 0,003
	Ré	<LOQ	4,7 ± 0,7	2,4 ± 0,8	1,6 ± 0,4	0,32 ± 0,03	0,07 ± 0,01	<LOQ
Grécia	Portokali	nd	2,3 ± 0,1	0,98 ± 0,02	2,9 ± 0,4	<LOQ	<LOQ	0,13 ± 0,02
	Sarti	<LOQ	1,7 ± 0,5	6 ± 3	6,8 ± 0,6	nd	<LOQ	0,071 ± 0,004
Portugal	Alcoutim	<LOQ	8 ± 6	3,0 ± 0,4	4 ± 2	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Crestuma	<LOQ	2 ± 1	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Formosa	nd	<LOQ	1,397 ± 0,004	0,3 ± 0,1	nd	<LOQ	<LOQ
	Pedorido	<LOQ	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,3	0,5 ± 0,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Prado	<LOQ	2,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Suécia	Motala	<LOQ	<LOQ	0,8 ± 0,2	2 ± 1	<LOQ	<LOQ	<LOQ

nd – Não detetado. <LOQ – Abaixo do limite de quantificação

Foram também representadas as concentrações médias totais de VMSs, divididas entre os cVMSs e IVMSs para cada praia na Figura 9.

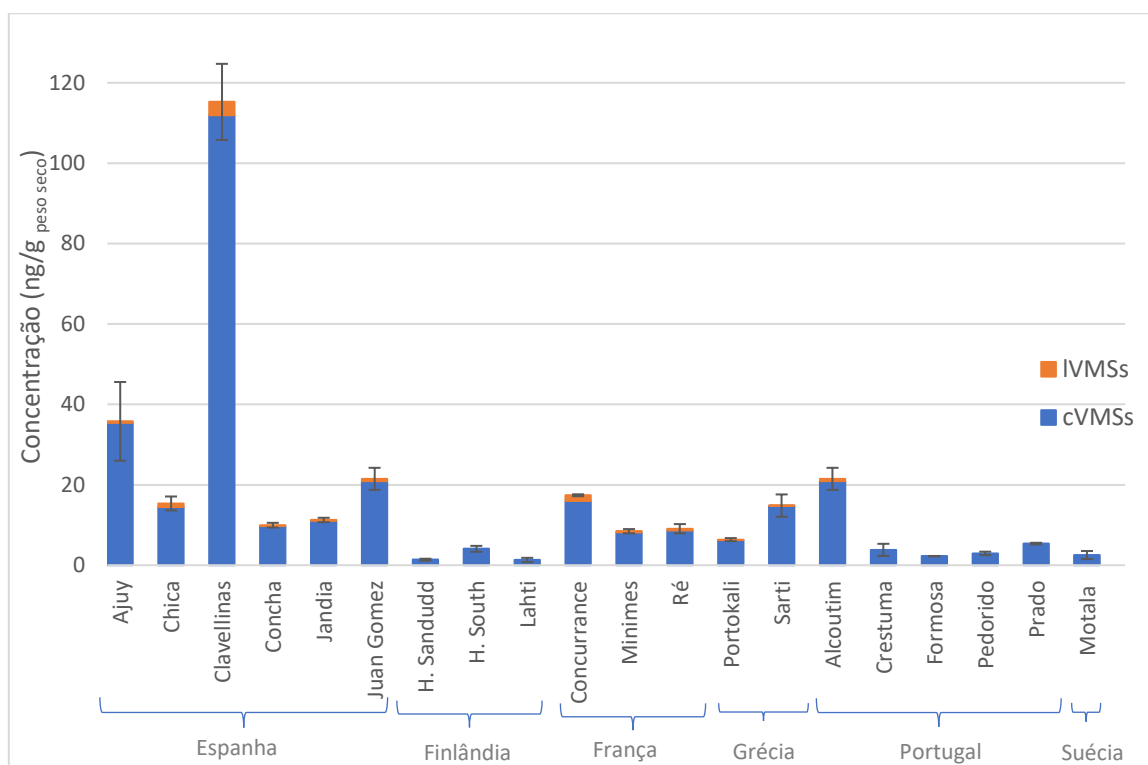


Figura 9 - Concentração total de VMSs para cada praia da Europa (n=2).

Analisando a distribuição total de VMSs nas praias e as concentrações médias totais obtidas anteriormente referidas, facilmente se constata que é na praia Clavellinas (Espanha) que foram detetados mais siloxanos, 115 ± 9 ng/g. De facto, trata-se de uma pequena praia de cidade, com pouca areia e que estava com um grande aglomerado de pessoas no dia em que foi realizada a amostragem, o que pode justificar os resultados obtidos. A areia é um material praticamente mineral, pelo que teoricamente não terá uma capacidade muito elevada de reter os VMSs, o que sugere que a presença de VMSs nesta matriz esteja fortemente ligada a fontes antropogénicas, tal como a utilização de cosméticos e produtos de cuidado pessoal. Assim, é expectável que nas praias onde haja uma maior concentração de pessoas, nomeadamente na época balnear em que há uma grande utilização de protetores solares, as concentrações obtidas sejam mais elevadas. Concentrações maiores, embora bastante diferentes em comparação com a praia de Clavellinas (Espanha), foram obtidas nas praias Ajuy e Juan Gomez (Espanha), nas quais as amostras foram também recolhidas durante a atividade balnear, sendo que a amostragem em Juan Gomez foi realizada numa zona com um grande aglomerado de pessoas, uma vez que nesse local existia uma barreira de rochas a proteger os banhistas do vento. Já em Alcouthim (Portugal) a amostra foi recolhida em novembro, sem atividade balnear, no entanto, trata-se de uma praia artificial, pelo que a areia que foi transportada para o local poderia estar contaminada das suas diversas origens.

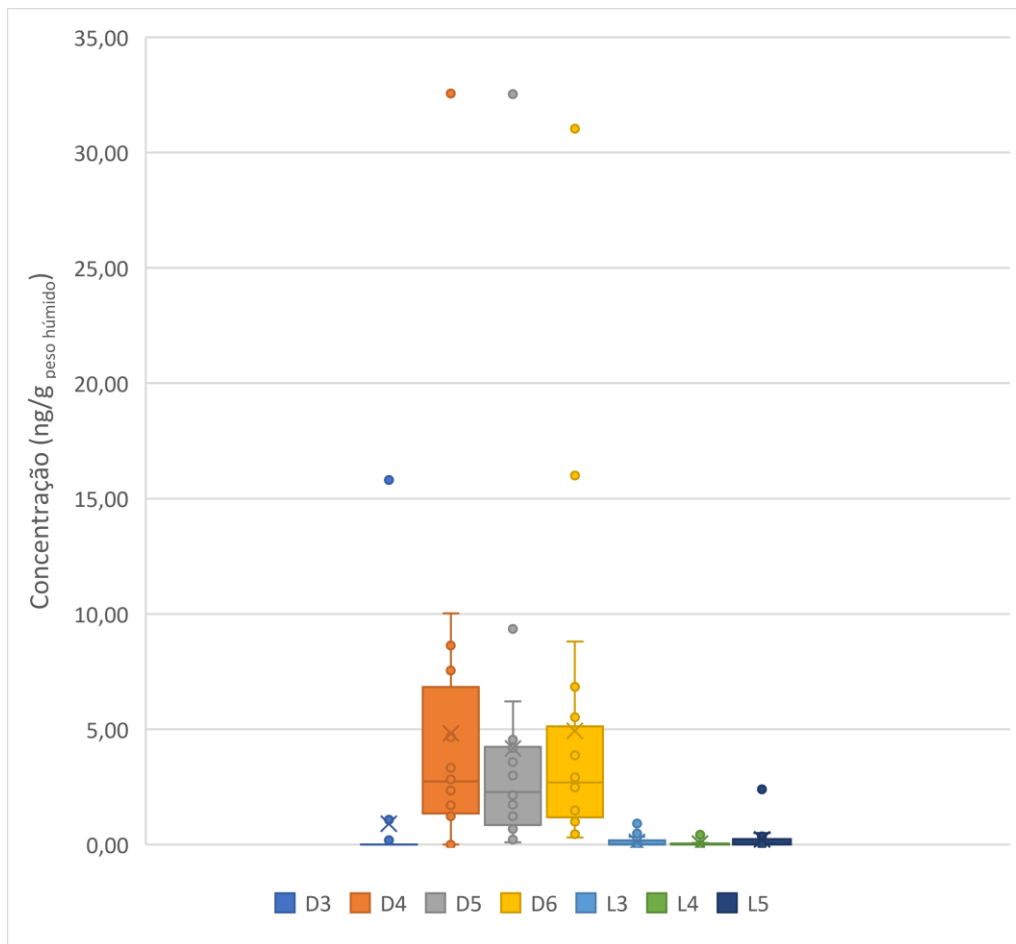


Figura 10 - Variação de cada VMS para o estudo dos VMSs nas areias da Europa (n=2).

Na Figura 10 está representado um diagrama de extremos e quartis (tipo *boxplot*), que identifica onde estão localizados 50% dos valores mais prováveis, a mediana, os valores extremos e os *outliers*, para cada VMS estudado.

Pela análise da Figura 10 e dos dados presentes na Tabela 7, verificou-se que os VMSs cíclicos foram detetados com maior frequência e concentração do que os lineares, com predominância do D5 (100%; gama de concentração: 0,1 – 33 ng/g; média: 4 ± 7 ng/g) e do D6 (100%; gama de concentração: 0,32 – 31 ng/g; média: 5 ± 7 ng/g), seguido do D4 (80%; gama de concentração: <LOQ – 33 ng/g; média: 5 ± 7 ng/g) e, por último, do D3 (25%; gama de concentração: nd – 16 ng/g; média: 1 ± 3 ng/g). Em relação aos VMSs lineares, o mais detetado foi o L5 (50%; gama de concentração: nd – 2,4 ng/g; média: $0,2 \pm 0,5$ ng/g), seguido do L4 (30%; gama de concentração: <LOQ – 0,430 ng/g; média: $0,04 \pm 0,10$ ng/g), e do L3 (30%; gama de concentração: nd – 0,91 ng/g; média: $0,1 \pm 0,2$ ng/g). Os valores dos desvios-padrão são elevados, o que reflete a ampla gama de concentrações de cada VMS nas diferentes praias.

É possível então verificar uma maior presença e frequência de deteção sobretudo dos compostos menos voláteis dos VMSs estudados, o D5 e o D6, que provavelmente terão uma tendência para permanecer mais tempo depositados na areia. Segundo Rocha *et al.* (2019) e Capela *et al.* (2019), os compostos D5 (44% e 93%, respetivamente) e D6 (38% e 99%, respetivamente) também foram os mais detetados. A diferença observada na percentagem de deteção nos dois estudos pode estar relacionada com a matriz em análise,

pois o primeiro é relativo aos VMSs em vegetação marinha e o segundo aos VMSs em areia de praia. O presente estudo é concordante com o das areias, pois foram detetados estes compostos em todas as amostras. O D4 também apresenta uma média elevada, no entanto com uma maior dispersão dos valores.

A tendência observada nas Figuras 9 e 10, de maior deteção e maiores concentrações dos cVMSs em comparação com os lVMSs, está também relacionada com o facto dos siloxanos cíclicos terem sido os mais detetados nas amostras de PCPs (94% vs. 52% para lineares), de acordo com Capela *et al.* (2016), o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho e coincidente com o verificado noutras matrizes ambientais (Rocha *et al.*, 2019, Hong *et al.*, 2014 e Capela *et al.*, 2019). É ainda de realçar que não foi verificada nenhuma tendência clara relacionada com a localização geográfica das praias. O mesmo foi verificado no outro estudo de VMSs em areias, disponível na literatura, em que os autores também afirmam que não é uma tarefa fácil definir tendências específicas entre as concentrações individuais e/ou totais de VMSs e as propriedades de cada praia (Capela *et al.*, 2019).

5.3.2 Areias recolhidas na costa da Galiza, Espanha

Em relação ao estudo dos VMSs nas areias da costa da Galiza, foram estudados os mesmos siloxanos (D3 -D6 e L3-L5) em areias recolhidas de 26 praias. Na Tabela 8 encontram-se representados os níveis obtidos para cada VMS em cada praia estudada e o respetivo desvio-padrão associado.

Tabela 8 - Concentrações médias (ng/g_{peso húmido}) de VMSs nas areias da costa da Galiza (n=2).

Praia	D3	D4	D5	D6	L3	L4	L5
Armona	3 ± 1	15 ± 3	4,4 ± 0,9	2,1 ± 0,8	nd	nd	0,23 ± 0,02
Oia	0,5 ± 0,3	7 ± 4	2 ± 1	1,2 ± 0,4	nd	nd	nd
Ladeira	nd	13 ± 1	4 ± 1	1,5 ± 0,4	nd	nd	nd
Adro	nd	11 ± 5	3 ± 1	2,45 ± 0,09	0,081 ± 0,002	nd	0,19 ± 0,01
Cesantes	nd	8 ± 1	3,2 ± 0,2	0,9 ± 0,3	nd	nd	nd
Xunqueira	nd	8 ± 2	2,3 ± 0,8	3 ± 1	nd	nd	0,26 ± 0,02
Lourido	nd	8 ± 2	3,1 ± 0,5	2,20 ± 0,09	nd	nd	nd
Panadeira	nd	7 ± 1	4,6 ± 0,1	7 ± 2	nd	nd	nd
Area da Secada	nd	27 ± 2	5,9 ± 0,2	7,0 ± 0,9	nd	nd	0,43 ± 0,03
Vilagarcía de Arousa	nd	8 ± 3	2,9 ± 0,8	1,7 ± 0,5	0,08 ± 0,01	nd	nd
Ladeira	nd	6 ± 2	3 ± 1	1,2 ± 0,2	0,08 ± 0,01	nd	0,18 ± 0,01
Testal	nd	5,7 ± 0,2	4,0 ± 0,6	3,2 ± 0,8	nd	nd	nd
Cee	nd	4 ± 2	2,3 ± 0,6	0,9 ± 0,2	0,08 ± 0,03	0,11 ± 0,03	nd
Mar de Fóra	nd	7,2 ± 0,6	2,7 ± 0,4	1,18 ± 0,08	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,03
Bloques	1,08 ± 0,06	6,0 ± 0,6	2,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	0,062 ± 0,001	0,11 ± 0,01	0,56 ± 0,08
Catedrales	nd	16,7 ± 0,8	3 ± 2	4,8 ± 0,5	0,10 ± 0,01	0,28 ± 0,03	1,2 ± 0,2
Marosa	nd	5 ± 2	2 ± 1	2 ± 1	nd	nd	nd
Lago	0,9 ± 0,2	12 ± 2	5 ± 2	8 ± 5	nd	nd	nd
Celeiro	nd	12,7 ± 0,1	7 ± 1	7 ± 3	nd	nd	nd
O Porto de Bares	nd	19 ± 3	7 ± 1	4,5 ± 0,9	0,13 ± 0,02	nd	nd
Mourozos	2,9 ± 0,2	24 ± 1	12,5 ± 0,7	5,7 ± 0,5	1,20 ± 0,07	0,79 ± 0,07	nd
Madalena	5,4 ± 0,5	22 ± 2	8 ± 1	3,5 ± 0,2	nd	nd	nd
Caranza	2 ± 1	20 ± 3	3,9 ± 0,8	11,0 ± 0,3	0,28 ± 0,05	0,34 ± 0,05	nd
Riazor	nd	5,4 ± 0,5	3,1 ± 0,4	3,38 ± 0,03	0,07 ± 0,03	nd	0,92 ± 0,03
Sabóm	nd	29 ± 2	10,1 ± 0,6	4 ± 1	0,5 ± 0,1	0,35 ± 0,03	nd
Laxe	nd	11 ± 4	6 ± 2	3 ± 2	0,09 ± 0,05	0,2 ± 0,1	nd

nd – Não detetado.

Com o objetivo de facilitar a interpretação dos resultados, foram representadas as concentrações de VMSs na Figura 11, divididas nos cVMSs (azul) e lVMSs (laranja).

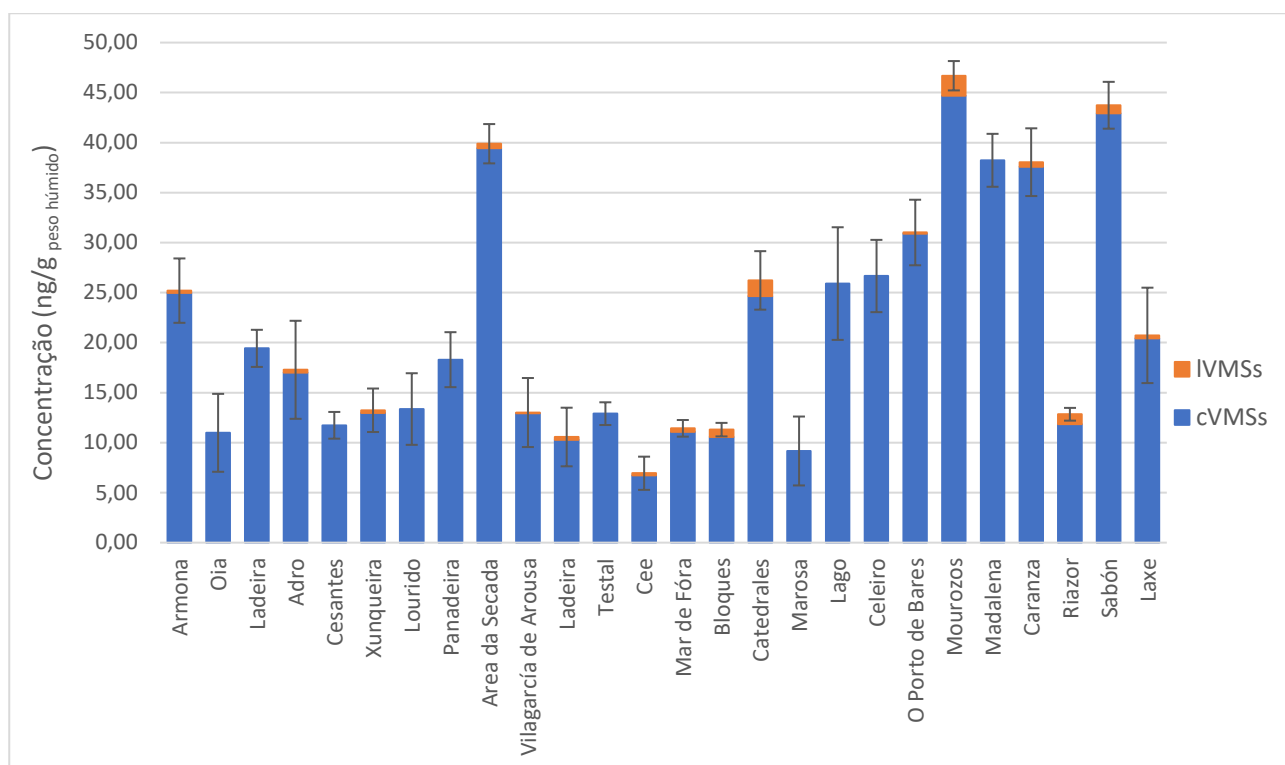


Figura 11 - Concentração total de VMSs para cada praia da costa da Galiza (n=2).

Através da análise da Figura 11, facilmente se constata a tendência já explicada de concentrações bastante superiores de VMSs cíclicos face aos lineares. No entanto, não é possível observar uma tendência geográfica clara, nem nenhuma praia que se destaque notoriamente com maiores concentrações como aconteceu anteriormente com a praia de Clavellinas. Podemos sim verificar que a média de concentrações de VMSs totais foi superior neste estudo (20 ± 11 ng/g) do que no estudo global das praias da Europa (10 ± 9 ng/g), excluindo Clavellinas por ser um caso particular de presença massiva de banhistas em época balnear. Tal poderá estar relacionado com a grande procura das praias da Galiza por parte dos turistas. Por exemplo, de acordo com o jornal Publituris, dados recolhidos de janeiro a agosto de 2018 revelaram que 392 282 turistas portugueses visitaram a Galiza, o que representa 24,3% do total de turistas portugueses que visitaram Espanha neste período. Este número teve um aumento de 95,7% face ao mesmo período em 2017, o que significa uma tendência de subida (Publituris, 2018). No entanto, à data da recolha das amostras (mês de junho) não era grande a afluência de banhistas, pelo que os níveis mais elevados em algumas localidades podem dever-se a outras origens, como por exemplo à industrialização existente em Arteixo e Alto de Lago, onde se localizam as praias Sabón e Lago, respetivamente, ou à atividade portuária em Ferrol (Praia Caranza) e em Celeiro, ou por exemplo à localização em rias bastante recortadas e protegidas do Oceano Atlântico como em Ortigueira (Praia Mouruzos) ou em Cedeira (Praia Madalena).

Foi também representado um diagrama de extremos e quartis (Figura 12) para cada VMS estudado.

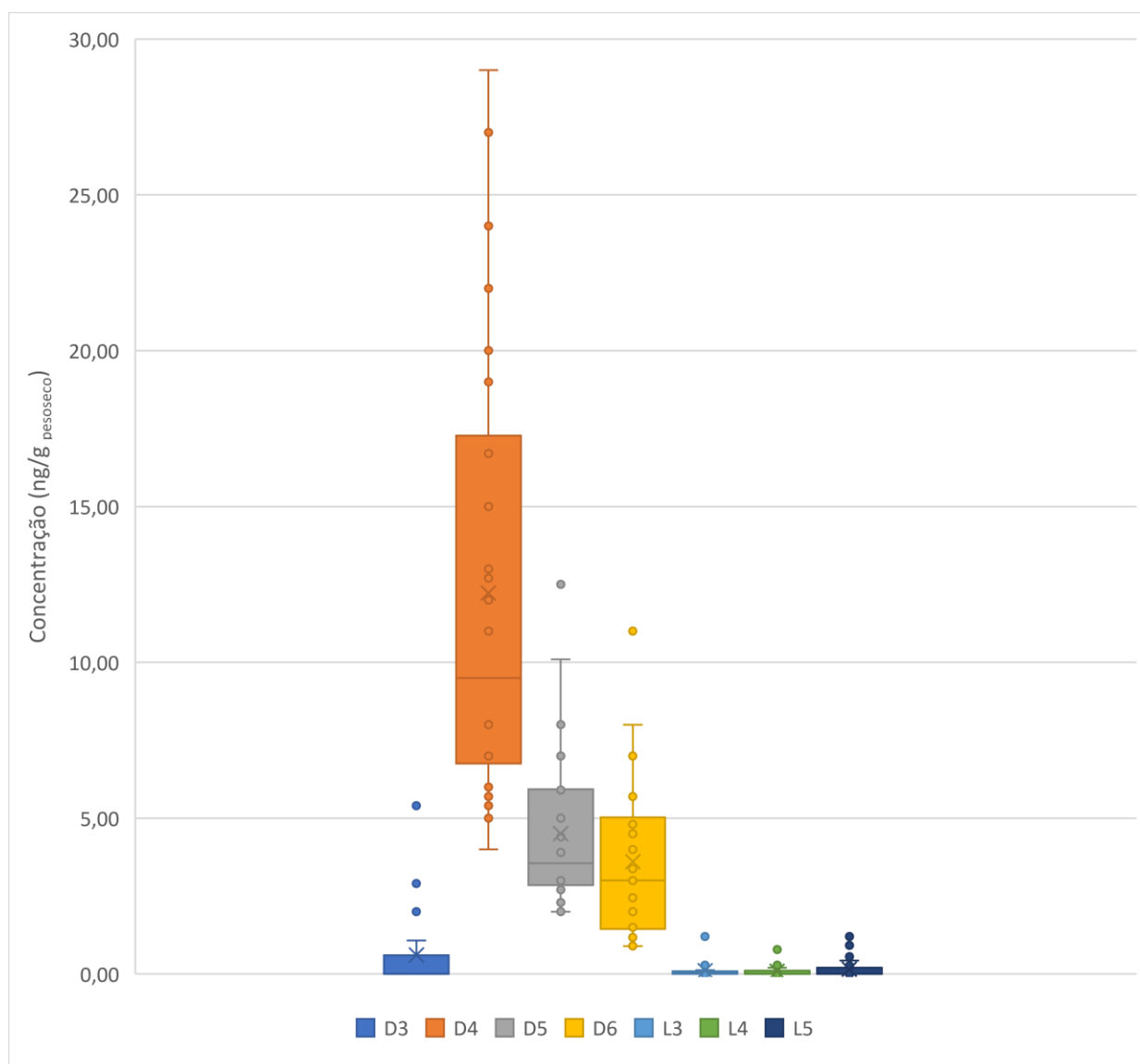


Figura 12 – Variação de cada VMS para o estudo das praias da Galiza (n=2).

Como se pode observar na Figura 12, são novamente os compostos D4, D5 e D6 que se destacam, com maiores concentrações médias, em $\text{ng/g}_{\text{peso húmido}}$ (12 ± 7 , 5 ± 3 e 4 ± 3 , respetivamente) e com 100% de deteção em todas as amostras. Neste caso, os valores dos desvios-padrão são inferiores ao valor médio das concentrações, o que reflete a menor variabilidade do perfil de concentrações de cada um destes compostos ao longo da costa da Galiza. Tal é expectável, uma vez que neste estudo a amostragem foi realizada numa só região, enquanto no outro estudo a amostragem foi realizada em diversos países, em locais bastante distantes uns dos outros, isto é, com maior dispersão e possibilidade de fontes distintas. Os restantes compostos foram menos detetados (27%, 50%, 35%, 35% para D3, L3, L4 e L5, respetivamente) e com médias mais baixas ($0,6 \pm 1,3 \text{ ng/g}$; $0,1 \pm 0,2 \text{ ng/g}$; $0,09 \pm 0,18 \text{ ng/g}$ e $0,2 \pm 0,3 \text{ ng/g}$, respetivamente), sendo que a maior volatilidade destes VMSs pode ser a causa da maior variabilidade dos resultados e dos níveis mais baixos. Comparando com as gamas de concentração de Capela *et al.* (2019), é de realçar as diferenças obtidas para os compostos D4 (4 – 29) ng/g , D5 (2 – 12,5) ng/g , onde as concentrações mínimas obtidas foram da

ordem de grandeza das mais altas encontradas no estudo por eles realizado (<LOQ – 3,4 e <LOQ – 5,4 ng/g), podendo estar novamente relacionado com a natureza mais industrial, portuária ou protegida de algumas das praias, como referido anteriormente.

5.4 Estudo dos VMSs em mexilhões

Uma vez validado o método de extração de VMSs em mexilhões, realizou-se a quantificação em 6 amostras provenientes de praias da costa da Galiza (Espanha) e de 2 praias da Ria de Aveiro (Portugal), onde metade das amostras foram depuradas, de modo a avaliar o efeito da depuração. Os resultados encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentrações médias (ng/g_{peso húmido}) de VMSs em mexilhões da costa da Galiza (Espanha) e da ria de Aveiro (Portugal) (n=2).

Localidade	Praia	D3	D4	D5	D6	L3	L4	L5
Costa da Galiza (Espanha)	Sabón		0,7 ± 0,2	5 ± 2	4 ± 1			0,15 ± 0,07
	Cee		0,4 ± 0,2	4 ± 2	5 ± 1			0,9 ± 0,3
	Ladeira	nd	nd	0,4 ± 0,3	3,1 ± 0,6			0,08 ± 0,05
	Area da Secada		0,4 ± 0,3	2 ± 1	4 ± 1			0,8 ± 0,6
	Testal		0,99 ± 0,04	4,6 ± 0,8	6,7 ± 0,8			0,39 ± 0,09
	Vilagarcía de Arousa		0,53 ± 0,06	2,8 ± 0,9	8,3 ± 0,8			1,4 ± 0,9
Ria de Aveiro (Portugal)	Espinhoiro (não depurado)	1,7 ± 0,9	1,3 ± 0,2	30 ± 3	4,1 ± 0,9	nd	nd	
	Espinhoiro (depurado)	nd	0,9 ± 0,6	5 ± 2	1,4 ± 0,8			nd
	Salinas (não depurado)	2,3 ± 0,4	0,8 ± 0,4	19 ± 4	3,7 ± 0,1			
	Salinas (depurado)	nd	0,5 ± 0,1	4 ± 1	2,4 ± 0,3			

Analisando os dados da Tabela 9, facilmente se constata o padrão que se tem verificado, de maior deteção e em maiores concentrações dos cVMSs face aos IVMSs. Destaca-se ainda que o L3 e o L4 não foram detetados em nenhuma das praias estudadas. Para uma melhor interpretação dos resultados, serão analisados em primeiro lugar os que dizem respeito aos mexilhões da costa da Galiza (Figura 13) e de seguida as amostras depuradas e não depuradas da ria de Aveiro (Figura 14).

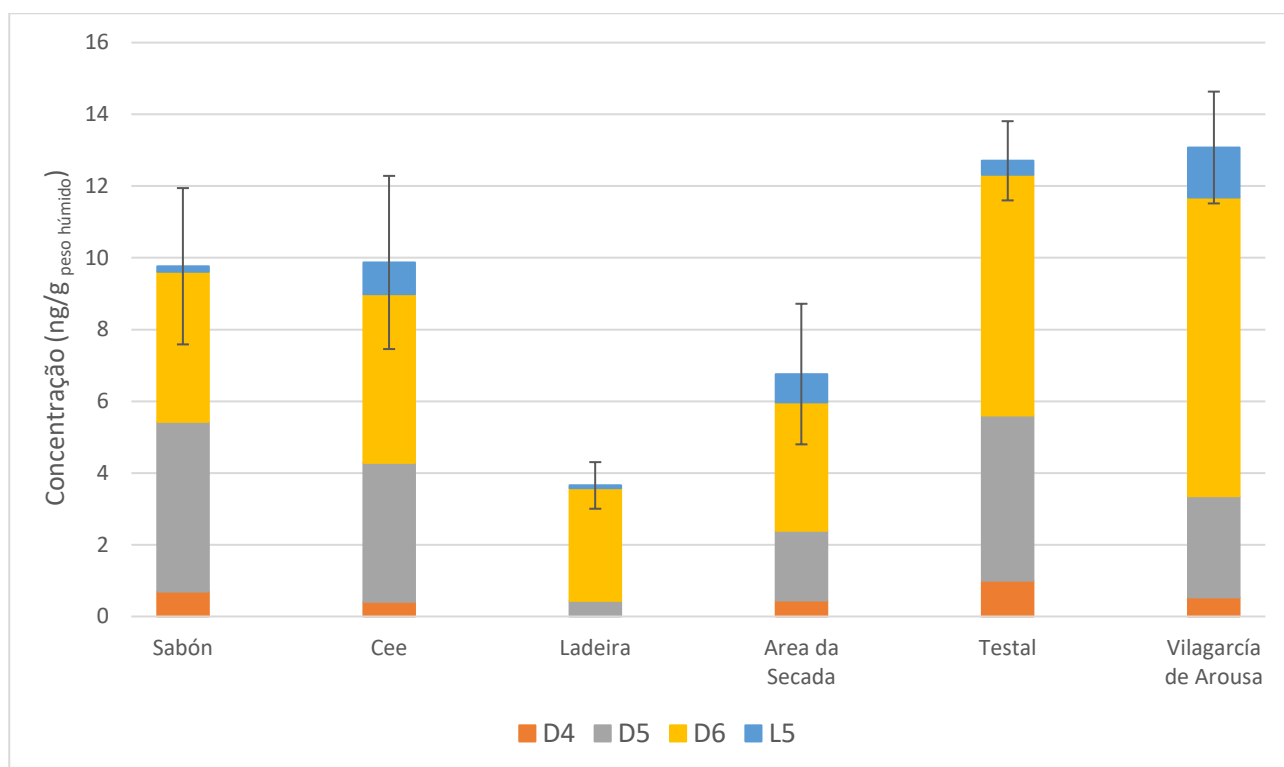


Figura 13 - Concentração total de VMSs nos mexilhões das praias da Galiza (n=2).

Analisando a Figura 13 e os dados da Tabela 9, é de destacar a não deteção dos compostos D3, L3 e L4. Tal como na literatura (Zhi *et al.*, 2018; Powell *et al.*, 2018; Jia *et al.*, 2015) o D5 e o D6 foram os compostos que apresentaram níveis mais elevados, com gamas em $\text{ng/g}_{\text{peso húmido}}$ de (0,4 – 5) e (3,1 – 8,3), respetivamente. Por outro lado, é relevante comparar os resultados obtidos do mexilhão e da areia (Figura A1 no Anexo 2), onde, em ambos os casos, não é observável um padrão geográfico. No entanto, é de destacar a maior gama de concentração de VMSs nas areias ($\text{nd} - 29 \text{ ng/g}_{\text{peso húmido}}$) do que no mexilhão ($\text{nd} - 8,3 \text{ ng/g}_{\text{peso húmido}}$). Tal evidência pode estar relacionada, pelo facto de o mexilhão se encontrar maioritariamente dentro de água, onde sabemos que a solubilidade dos VMSs é baixa, estando assim menos expostos aos siloxanos do que a areia, que está em contacto direto com as pessoas, com a atmosfera, com detritos de plástico e outro tipo de lixo. Este maior desfasamento é particularmente visível nas praias de Sabón (perto do núcleo industrial de Arteixo) e Area da Secada, podendo indicar um incremento de outras fontes nos níveis encontrados nas areias, por exemplo através da deposição atmosférica. Em termos dos locais propriamente ditos, a praia Ladeira encontra-se numa zona menos povoada e mais protegida, no Parque das Dunas de Corrubedo; e Area da Secada localiza-se na ponta norte da Ilha de Arousa, também área protegida e com presença urbana mais residual. É, portanto, esperado que os mexilhões, que vão acumulando os poluentes pouco a pouco, revelem menores concentrações de VMSs, ao contrário de locais como a Cidade de Vilagarcía de Arousa ou a praia de Testal (na cidade de Nóia) ou a praia Cee, que revelam níveis mais elevados.

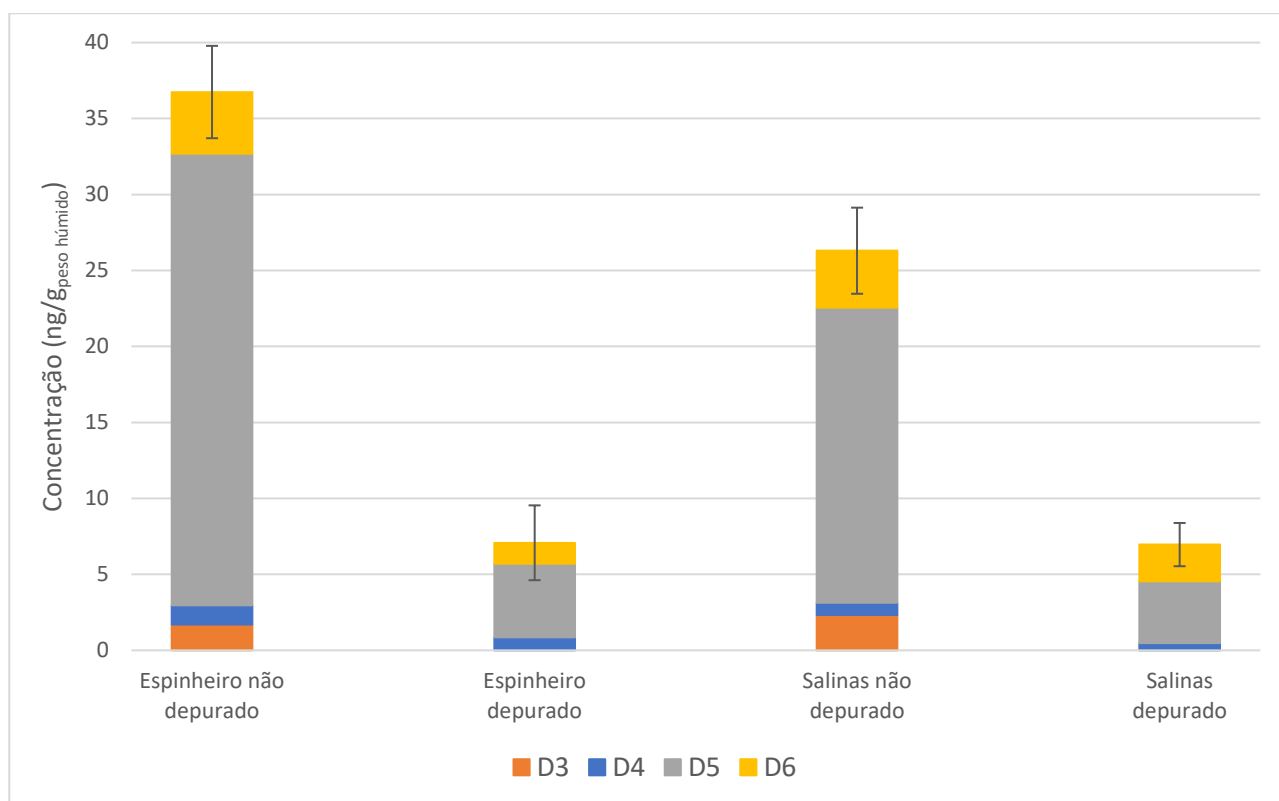


Figura 14 - Concentração total de cada VMSs nos mexilhões da ria de Aveiro, depurados e não depurados (n=2).

No que diz respeito ao efeito da depuração dos mexilhões, foram estudados os níveis nas amostras de 2 locais (ver Figura 14). Os IVMSs não foram detetados em nenhuma das amostras. Relativamente ao efeito da depuração, as amostras depuradas apresentam níveis consideravelmente mais baixos do que as não depuradas, com uma redução de quase uma ordem de grandeza (concentrações médias totais em $\text{ng/g}_{\text{peso húmido}}$ – Espinheiro: 37 ± 3 vs 7 ± 2 ; Salinas: 26 ± 3 vs 8 ± 1). Uma vez que os moluscos se alimentam por meio da filtração de matéria orgânica da água do mar, estão expostos ao risco de acumulação de contaminantes biológicos e químicos. Para colmatar este problema, o marisco é obrigatoriamente purificado de contaminantes por um processo de depuração em água do mar limpa, antes de poder ser comercializado (Çağlak *et al.*, 2017). Assim, os resultados obtidos indicam um efeito benéfico deste processo na eliminação de VMSs em mexilhões, reduzindo assim a exposição humana a estes contaminantes através do consumo destes moluscos. De facto, os resultados do D5 e do D6 (média, $\text{ng/g}_{\text{peso húmido}}$: $4,4 \pm 0,4$ e $1,9 \pm 0,5$, respetivamente) são bastante semelhantes aos obtidos por Sanchís *et al.* (2016), onde o mexilhão analisado estava pronto para consumo (média de 3,94 e 2,15 $\text{ng/g}_{\text{peso húmido}}$, respetivamente).

É ainda interessante observar que os níveis obtidos na costa da Galiza são da magnitude dos níveis do mexilhão depurado da Ria de Aveiro. Tal é relevante, uma vez que os da costa da Galiza não foram depurados. No entanto, os mexilhões da Ria de Aveiro são provenientes de uma zona mais fechada e sujeita à acumulação de poluentes por diversas vias: agropecuária, aquacultura, descargas de esgotos, barcos, etc. Ao longo de décadas, os efluentes do Complexo Químico de Estarreja eram descarregados diretamente na

Ria de Aveiro (Cachada *et al.*, 2019), pelo que apesar de os estuários apresentarem alta produtividade biológica, por estarem próximos a áreas povoadas, estão expostos a atividades potencialmente poluidoras, que podem impactar negativamente essas áreas e afetar o seu importante papel ecológico (Granek *et al.*, 2016). Tal incentivou o estudo de contaminantes neste local (Pereira *et al.*, 2009; Jonkers *et al.*, 2010; Gadelha *et al.*, 2019; Cachada *et al.*, 2019). Por exemplo, de acordo com Gadelha *et al.* (2019), num estudo realizado com ostras (matriz semelhante ao mexilhão), apesar da deteção de alguns contaminantes nas amostras, como alguns PAHs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e alguns produtos de higiene pessoal, as concentrações foram baixas, pelo que não representam um risco significativo para a saúde humana devido ao consumo destes frutos do mar. No entanto, algumas variações sazonais foram observadas e, em algumas situações, uma ligação direta com os níveis ambientais de poluentes pode ser estabelecida. Assim, em ambientes estuarinos, a exposição das ostras aos poluentes pode representar um risco à sua produção nos sistemas de aquicultura e, potencialmente, à saúde dos consumidores.

Mais recentemente, em março de 2021, a apanha de bivalves, como a amêijoia e o mexilhão, foi proibida na ria de Aveiro devido a uma contaminação de esgotos, sendo que o Movimento dos Amigos da Ria de Aveiro afirmou que a ausência de estações adequadas de tratamento de efluentes provenientes das agropecuárias, conjugada com uma deficiente fiscalização das direções gerais de Alimentação e Veterinária e Agricultura e Desenvolvimento, do Ministério da Agricultura, e das autarquias, entre outras entidades, conduz a estas constantes agressões ao meio ambiente, com consequências indesejáveis para a comunidade de pescadores (País Ao Minuto, 2021). Já as amostras da Galiza foram recolhidas no mar aberto, onde os poluentes se encontram mais diluídos.

Assim, a gestão de atividades humanas com impacte no meio marinho, integrando os conceitos de proteção ambiental e utilização sustentável dos recursos, é necessária para prevenir qualquer risco para a saúde humana. Por este motivo, mais estudos como este são relevantes para a gestão futura de recursos, contribuindo para um ambiente seguro e saudável.

6. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo analisar a presença de VMSs, D3-D6 e L3-L5, em areias recolhidas em vinte praias diferentes da Europa e em outras vinte e seis praias da costa da Galiza (Espanha), onde foi utilizado o método de extração QuEChERS, seguido da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), de modo a estabelecer eventuais perfis de concentração geográficos. Foi também desenvolvido um método de extração baseado em QuEChERS, com a posterior análise dos VMSs em amostras de mexilhão recolhidas na costa da Galiza e na Ria de Aveiro (Portugal), onde foi ainda avaliado o efeito da depuração nos níveis de siloxanos contidos nesses moluscos.

O método de extração em mexilhão foi desenvolvido após a realização de vários testes, sendo o *n*-hexano o solvente escolhido para realizar a extração, bem como a condição de amostra sem liofilização e sem filtrar o extrato final. A linearidade das respostas foi boa, na gama de 1 a 1000 µg/L, para cada VMS estudado, com um coeficiente de correlação de 0,999 para todos os compostos. Os LOD e LOQ foram baixos, variando entre 0,018 e 0,36 pg/g_{peso húmido} (LOD) e 0,059 e 1,2 pg/g_{peso húmido} (LOQ), permitindo a análise dos VMSs em níveis vestigiais. As recuperações foram elevadas, com uma média global considerando todos os siloxanos de 86 ± 6%. A repetibilidade e precisão intermédia conduziram também a bons resultados, com um CV médio de 11% em ambos os testes.

No que diz respeito às amostras de areia e mexilhão analisadas, foram detetados VMSs individuais em todas elas e, tal como na literatura, os cVMSs foram detetados com maior frequência e concentração do que os IVMSs. Nas areias, as concentrações variaram entre <LOQ e 115 ng/g_{peso húmido}, enquanto nos mexilhões a gama foi entre <LOQ e 30 ng/g_{peso húmido}. Tal diferença pode dever-se ao facto de o mexilhão permanecer dentro de água, onde a solubilidade dos VMSs é baixa, estando assim menos exposto aos siloxanos do que a areia, que está em contacto com pessoas, com a deposição atmosférica, com detritos de vária ordem. Foi ainda avaliado o efeito da depuração do mexilhão, que se verificou permitir reduzir os níveis de VMSs em aproximadamente uma ordem de grandeza.

Apesar de não se ter verificado uma tendência geográfica clara, a utilização da técnica de extração QuEChERS seguida da análise por GC-MS foi bem-sucedida para a análise de siloxanos tanto nas areias como no mexilhão, pelo que estas matrizes se revelaram adequadas para a determinação dos níveis de contaminação e distribuição dos VMSs em ambientes costeiros, com potencial para serem utilizados como indicadores desses contaminantes nesses ecossistemas.

7. Limitações e Trabalho Futuro

A análise de siloxanos a um nível vestigial é uma tarefa complexa. Por outro lado, devido à situação pandémica, o acesso ao laboratório e a outras amostras esteve condicionado, limitando o trabalho. Por esses motivos, apesar dos resultados interessantes obtidos neste trabalho, existem algumas melhorias que podem ser consideradas para um trabalho futuro.

Para além de todas as limitações impostas no laboratório para reduzir as contaminações das amostras, seria interessante manipular as amostras e realizar o processo de extração numa sala onde os níveis de VMSs fossem mais controlados.

Em relação aos resultados obtidos neste trabalho, seria importante analisar amostras recolhidas em várias estações do ano, de modo a verificar uma tendência temporal e comprovar o efeito do turismo e dos banhistas nos níveis de siloxanos mais elevados no verão.

Por outro lado, com o objetivo de verificar tendências geográficas e o impacto antropogénico na presença de VMSs nos ambientes costeiros, poderia realizar-se a amostragem em zonas remotas e com pouca afluência de pessoas.

Poderia ser também fruto de estudo avaliar a capacidade de acumulação e libertação de VMSs dos microplásticos, de modo a estabelecer uma eventual correlação dos níveis de VMSs presentes nas amostras de areia das praias e esta causa.

Uma vez que os resultados deste trabalho sugerem uma diminuição significativa das concentrações de siloxanos nas amostras de mexilhão depurado, poderiam ser analisadas mais amostras de mexilhão depurado e não depurado, para comprovar o efeito da redução dos níveis de VMSs através deste processo.

Por último, o estudo poderia ser alargado a outra biota marinha, de modo a verificar se ocorre biomagnificação e, deste modo, complementar o estado da arte e minimizar a controvérsia ainda existente sobre este problema. Em particular, o estudo de peixe consumido pelos seres humanos, para compreender o nível de exposição humana aos siloxanos a partir destas matrizes.

8. Referências Bibliográficas

- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck F.J. *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce*. Journal of AOAC International, 86(2), 412–431, (2003).
- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., Cerdà, V. *Solid phase extraction of organic compounds: a critical review, part ii*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 80, 641-654, (2015).
- Arespachoga, N., Valderrama, C., Raich-Montiu, J., Crest, M., Mehta, S., Cortina, J. L. *Understanding the effects of the origin, occurrence, monitoring, control, fate and removal of siloxanes on the energetic valorization of sewage biogas—A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 52, 366–381, (2015).
- Augusto, S. *Volatile Methylsiloxanes in the Environment - Bioconcentration, Bioaccumulation, and Biomagnification of Volatile Methylsiloxanes in Biota*. Springer, 247-277, (2019).
- Baztan J., Bergmann, M., Carrasco, A., Fossi, M., Jorgensen, B., Miguelez, A., Pahl, S., Thompson, R. Vanderlinden, J. *MICRO 2018 Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions.*, (2018)
- Berk, Z. *Food Process Engineering and Technology*. Academic Press, 259-277, (2009).
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, N., Schøyen, M. *Blue mussels (Mytilus edulis spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review*. Marine Environmental Research, 338-365, (2017).
- Borgå K., Fjeld E., Kierkegaard A., McLachlan, M. *Food web accumulation of cyclic siloxanes in Lake Mjøsa, Norway*. Environmental Science & Technology, 46, 6347–6354, (2012).
- Borgå, K., Fjeld, E., Kierkegaard, A., McLachlan, M. *Consistency in Trophic Magnification Factors of Cyclic Methyl Siloxanes in Pelagic Freshwater Food Webs Leading to Brown Trout*. Environmental Science & Technology, 47(24), 14394–14402, (2013).
- Bridges, J., Solomon, K. *Quantitative Weight-of-Evidence Analysis of the Persistence, Bioaccumulation, Toxicity, and Potential for Long-Range Transport of the Cyclic Volatile Methyl Siloxanes*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 1–35, (2016).
- Brooke, D.N., Crookes, M.J., Gray, D., Robertson, S. *Environmental Risk Assessment Report: decamethylcyclopentasiloxane*. Environment Agency, Bristol, U.K., (2009 a).
- Brooke, D.N., Crookes, M.J., Gray, D., Robertson, S. *Environmental Risk Assessment Report: Dodecamethylcyclohexasiloxane*. Environment Agency, Bristol, U.K., (2009 b).
- Brooke, D.N., Crookes, M.J., Gray, D., Robertson, S. *Environmental Risk Assessment Report: octamethylcyclotetrasiloxane*. Environment Agency, Bristol, U.K., (2009 c).

- Bruzzoniti, M., Checchini, L., Carlo, R., Orlandini, S., Rivoira, L., Bubba, M. *QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, 4089–4116, (2014).
- Cachada, A., Pato, P., Ferreira, E., Patinha, C., Carreira, R., Pardal, M., Duarte, A. *Spatial distribution of organic and inorganic contaminants in Ria de Aveiro Lagoon: a fundamental baseline dataset*. Data in Brief, (), 104285, (2019).
- Çağlak, E., Karsli, B., Koral, S. *Effects of the Depuration Process on Microbiological Quality and Nutritional Composition of Mediterranean Mussel*. Journal of Aquatic Food Product Technology, 1–12, (2017).
- California Office of Environmental Health Hazard Assessment. *Cyloxanes*. Materials for the December 4-5, Meeting of the California Environmental Contaminant Biomonitoring Program Scientific Guidance Panel. (2008). Disponível em: <http://oehha.ca.gov/multimedia/biomon/pdf/1208cyclosiloxanes.pdf>. Consultado em: 30/03/2021.
- Capela, D., Alves, A., Homem, V., Santos, L. *From the shop to the drain — Volatile methylsiloxanes in cosmetics and personal care products*. Environment International, 92-93, 50–62, (2016).
- Capela, D., Vila, M., Llompart, M., Dagnac, T., García-Jares, C., Alves, A., Homem, V. *Footprints in the sand – Assessing the seasonal trends of volatile methylsiloxanes and UV-filters*. Marine Pollution Bulletin, 140, 9-16, (2019).
- CAS. *What is a CAS Registry Number?* Disponível em: <https://www.cas.org/support/documentation/chemical-substances/fags#2>. Consultado em: 20/04/2021.
- Coll, M., Piroddi, C., Albouy, C., Ben Rais Lasram, F., Cheung, W.W., Christensen, V., Palomares, M.L., Steenbeek, J., Trujillo, P., Watson, R., Pauly, D. *The Mediterranean Sea under siege: spatial overlap between marine biodiversity, cumulative threats and marine reserves*. Global Ecology and Biogeography, 21 (4), 465–480, (2012).
- Crawford, C., Quinn, B. *Microplastic Pollutants || The interactions of microplastics and chemical pollutants*. (6), 131–157, (2017).
- DHI Water and Environment. *Study on Enhancing the Endocrine Disrupter Priority List with a Focus on Low Production Volume Chemicals*. Revised Report to DG Environment. Hershholm, Denmark: DHI, (2007). Disponível em: http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/final_report_2007.pdf. Consultado em: 18/05/2021.
- EC & HC. *Screening assessment for the challenge: decamethylcyclopentasiloxane (D5) chemical abstracts service registry number 541-02-6*. Technical report, Health Canada and Environment Canada, Ottawa, (2008 a).
- EC & HC. *Screening assessment for the challenge: dodecamethylcyclohexasiloxane (D6) chemical abstracts service registry number 540-97-6*. Technical report, Health Canada and Environment Canada, Ottawa, (2008 b).

- EC & HC. *Screening assessment for the challenge: octamethylcyclotetrasiloxane (D4) chemical abstracts service registry number 556-67-2*. Technical report. Health Canada and Environment Canada, Ottawa, (2008 c).
- Elveflow. Polydimethylsiloxane (PDMS). Disponível em: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/the-poly-di-methyl-siloxane-pdms-and-microfluidics-2/>. Consultado em: 03/02/2021.
- European Chemicals Agency. *Restrictions on the manufacture, placing on the market and use of certain dangerous substances, mixtures and articles*. Disponível em: <https://echa.europa.eu/pt/substances-restricted-under-reach/-/dislist/details/0b0236e182463cd3> . Consultado em: 18/05/2021.
- Fact.MR. *Siloxane Market Forecast, Trend Analysis & Competition Tracking - Global Market Insights 2019 to 2027*. Disponível em: <https://www.factmr.com/report/4281/siloxane-market>. Publicado em: Outubro 2019. Consultado em: 24/05/2021.
- Fromme, H., Cequier, E., Kim, J., Hanssen, L., Hilger, B., Thomsen, C., Chang, Y., Völkel, W. *Persistent and emerging pollutants in the blood of German adults: Occurrence of dechloranes, polychlorinated naphthalenes, and siloxanes*. *Environment International*, 85(), 292–298, (2015).
- Fromme, H. *Cyclic Volatile Methylsiloxanes: Occurrence and Exposure*. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, (2018).
- Gadelha, J., Rocha, A., Camacho, C., Eljarrat, E., Peris, A., Aminot, Y., Readman, J., Boti, V., Nannou, C., Kapsi, M., Albanis, T., Rocha, F., Machado, A., Bordalo, A., Valente, L., Nunes, M., Marques, A., Almeida, C., Marisa, R. *Persistent and emerging pollutants assessment on aquaculture oysters (Crassostrea gigas) from NW Portuguese coast (Ria De Aveiro)*. *Science of The Total Environment*, 666(), 731–742, (2019).
- Gaj, K., Pakuluk, A. *Volatile Methyl Siloxanes as potential hazardous air pollutants*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24, 937-943, (2015).
- Gallego, E., Perales, J. F., Roca, F. J., Guardino, X., Gadea, E. *Volatile methyl siloxanes (VMS) concentrations in outdoor air of several Catalan urban areas*. *Atmospheric Environment*, 155, 108–118, (2017).
- Genesee Polymers Corporation. *Amine Functional Silicone Fluids*. Disponível em: <https://www.gpcsilicones.com/products/silicone-fluids/amine-functional> . Consultado em: 01/02/2021.
- Giesy, J., Solomon, K., Kacew, S. Mackay, D., Stobo, G., Kennedy, S. *The case for establishing a board of review for resolving environmental issues: the science court in Canada*. *Integrated Environmental Assessment Management*, 12(3), 572–579, (2016).
- Global Silicones Council. *The unique physico-chemical properties of siloxanes*. Disponível em: <https://sehsc.americanchemistry.com/Resources/Siloxane-Fact-Sheet.pdf> . Consultado em: 19/03/2021.
- Global Silicones Council. *What are silicones*. Disponível em: <https://globalsilicones.org/what-are-silicones> . Consultado em: 19/02/2021.

- Granek, E. F., Conn, K. E., Nilsen, E. B., Pillsbury, L., Strecker, A. L., Rumrill, S.S., Fish, W. *Spatial and temporal variability of contaminants within estuarine sediments and native Olympia oysters: a contrast between a developed and an undeveloped estuary*. Science of the Total Environment, 557–558, 869–879, 2016.
- Greve, K., Nielsen, E., Ladefoged, O. *Siloxanes (D3, D4, D5, D6, HMDS)*. The Danish Environmental Protection Agency, (2014).
- Hajdu S.D., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. *Silicone and autoimmunity*. European Journal of Clinical Investigation, 41(2), 203–11, (2011).
- Harris, D., *Quantitative Chemical Analysis*, W.H Freeman & Company, New York, (2003).
- Hay, S., Obee, T., Luo, Z., Jiang, T., Meng, Y., He, J., Suib, S. *The Viability of Photocatalysis for Air Purification*. Molecules, 20(1), 1319–1356, (2015).
- Hielscher Ultrasound Technology. *Ultrasonic Extraction and its Working Principle*. Disponível em: <https://www.hielscher.com/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm>. Consultado em: 23/05/2021.
- Homem, V., Silva, J.A., Cunha, C., Alves, A., Santos, L., *New analytical method for the determination of musks in personal care products by quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction followed by GC-MS*. Journal of Separation Science, 36, 2176-2184, (2013).
- Homem, V., Capela, D., Silva, J. A., Cincinelli, A., Santos, L., Alves, A., Ratola, N. *An approach to the environmental prioritisation of volatile methylsiloxanes in several matrices*. Science of The Total Environment, 579, 506–513, (2016).
- Hong, W.J., Jia, H., Liu, C., Zhang, Z., Sun, Y., Li, Y.F., *Distribution, source, fate and bioaccumulation of methyl siloxanes in marine environment*. Environmental Pollution, 191, 175-181, (2014).
- Hübschmann, H., *Handbook of GC-MS, Fundamentals and Applications*, Wiley-vch, (2015).
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Thomas, J. *Bioaccumulation: how chemicals move from the water into fish and other aquatic organisms*. American Petroleum Institute publication number 4656, Midwest Science Center, Columbia, (1997).
- Jia, H., Zhang, Z., Wang, C., Hong, W., Sun, Y., Li, Y. *Trophic Transfer of Methyl Siloxanes in the Marine Food Web from Coastal Area of Northern China*. Environmental Science & Technology, 49(5), 2833–2840, (2015).
- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C., Kohler, E., Giger, W. *Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal*. Environmental Science and Pollution Research, 17(4), 834–843, (2010).
- Kaj, L., Schlabach, M., Andersson, J., Palm Cousins, A., Schmidbauer, N., Brorström-Lunden, E., *Siloxanes in the Nordic Environment*. TemaNord, 593, (2005).
- Kanegsberg, B., Kanegsberg, E. *Handbook for Critical Cleaning: Cleaning agents and systems*. Second Edition. CRC Press, (2017).

- Kim, N., Chun, S., Cha, D., Kim, C., *Determination of siloxanes in biogas by solid-phase adsorption on active carbon*. Korean Chemistry Society, 34, 2353-2357, (2013).
- Krenczkowska, D., Mojsiewicz-Pieńkowska, K., Wielgomas, B., Bazar, D., Zbigniew, J. *Ex Vivo Human Skin is not a Barrier for Cyclic Siloxanes (Cyclic Silicones): Evidence of Diffusion, Bioaccumulation, and Risk of Dermal Absorption Using a New Validated GC-FID Procedure*. *Pharmaceutics*, 12(6), 586, (2020).
- Krogseth, I.S., Kierkegaard, A., McLachlan, M.S., Breivik, K., Hansen, K.M., Schlabach, M. *Occurrence and Seasonality of Cyclic Volatile Methyl Siloxanes in Arctic Air*. *Environmental Science & Technology*, 47(1), 502–509, (2012).
- Lassen, C., Hansen, C.L., Mikkelsen, S.H., Maag, J. *Siloxanes - Consumption, Toxicity and Alternatives*. COWI A/S, Denmark, (2005).
- Lebedev, A.T., *Comprehensive environmental mass spectrometry*. ILM Publications, (2012).
- Lee, S., Lee, S., Choi, M., Kannan, K., Moon, H. *An optimized method for the analysis of cyclic and linear siloxanes and their distribution in surface and core sediments from industrialized bays in Korea*. *Environmental Pollution*, 236(), 111–118, (2018).
- Lehotay, S.J. *QuEChERS Sample Preparation Approach for Mass Spectrometric Analysis of Pesticide Residues in Foods*. *Mass Spectrometry in Food Safety*, 65–91, (2011).
- Licari, J. *Coating Materials for Electronic Applications. Polymers, Processes, Reliability, Testing*. Noyes Publications, (2004).
- Lorenzo, M., Pico, Y. *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy Techniques for the Detection of Chemical Contaminants and Residues in Foods*. *Chemical Contaminants and Residues in Food*, 15–50, (2017).
- Lund, K., Petersen, J. *Safety of food contact silicone rubber: liberation of volatile compounds from soothers and teats*. *European Food Research and Technology*. 214 (5), 429–434, (2002).
- Mackay, D., Powell, D.E., Woodburn, K.B. *Bioconcentration and aquatic toxicity of superhydrophobic chemicals: a modelling case study of cyclic volatile methyl siloxanes*. *Environmental Science & Technology*, 49, 11913-11922, (2015).
- Magali L., Geir, G., Dorte, H., Christensen, G. *Screening of UV chemicals bisphenols and siloxanes in the Arctic*. Norsk Polarinstitutt, Norwegian Polar Institute, Fram Centre, Tromso, (2016).
- Mayor, A., Rodríguez, B., Herrera, A., Delgado, M. *Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 214-235, (2019).
- McGoldrick, D. Chan, C., Drouillard, K., Keir, M.; Clark, M.; Backus, S. *Concentrations and trophic magnification of cyclic siloxanes in aquatic biota from the Western Basin of Lake Erie, Canada*. *Environmental Pollution*, 186, 141–148, (2014).
- McNaught, A.D., Wilkinson, A. *Compendium of Chemical Terminology*. IUPAC. Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1997).

- Merck. *Octametilciclotetrasiloxano*. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/Octamethylcyclotetrasiloxane,MDA_CHEM-814750?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.pt%2F . Consultado em: 01/03/2021.
- Michel, A., Brauch, H.J., Worch, E., Lange, F.T. *Homologue specific analysis of a polyether trisiloxane surfactant in German surface waters and study on its hydrolysis*. Environmental Pollution, 186, 126–135, (2014).
- Ministerråd N. *Siloxanes in the Nordic environment*. Technical report 593, TemaNord, Copenhagen, (2005).
- Mojsiewicz-Pieńkowska, K., Jamrógiewicz, M., Szymkowska, K., Krenczkowska, D. *Direct Human Contact with Siloxanes (Silicones) – Safety or Risk Part 1. Characteristics of Siloxanes (Silicones)*. Frontiers in Pharmacology, 7, (2016).
- Mojsiewicz-Pienkowska, K., Szymkowska, K., Glamowska, D., Cal, K., Jankowski, Z., Jamrogiewicz, M. *Consequences of overcoming the skin barrier by low molecular cyclic and linear methyl siloxanes (silicones), 5th International Conference on Clinical & Experimental Dermatology, New Orleans, USA, July 13-15*. Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research, 6, 60, (2015).
- Nikitakis J., Lange B. *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*. Sixteenth Edition (2016).
- OECD, *Manual for investigation of HPV chemicals*. Disponível em: [Manual for the Assessment of Chemicals - OECD](#). Consultado em: 12/02/2021. (2007).
- O’Lenick, A.J. *Silicones—Basic chemistry and selected applications*. Journal of Surfactants and Detergents, 3(2), 229–236, (2000).
- País ao minuto. *Amigos da ria de Aveiro apontam pecuárias na contaminação da água*. Disponível em: <https://www.noticiasao minuto.com/pais/1707463/amigos-da-ria-de-aveiro-apontam-pecuarias-na-contaminacao-da-agua>. Consultado em 17/06/2021.
- Pan, Y.Y., Shi, Y.L., Wang, Y.W., Cai, Y.Q., Jiang, G.B. *Investigation of perfluorinated compounds (PFCs) in mollusks from coastal waters in the Bohai Sea of China*. Journal of Environmental Monitoring, 12, 508 – 513, (2010).
- Pereira, M. E., Lillebø A. I., Pato, P., Válega, M., Coelho, J. P., Lopes, C. B., Rodrigues, S., Cachada, A., Otero, M., Pardal, M. A, Duarte, A. C. *Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment*. Environmental Monitoring and Assessment, 155(1-4), 39–49, (2009).
- Powell, D., Schøyen, M., Øxnevad, S., Gerhards, R., Böhmer, T., Koerner, M., Durham, J., Huff, D. *Bioaccumulation and trophic transfer of cyclic volatile methylsiloxanes (cVMS) in the aquatic marine food webs of the Oslofjord, Norway*. Science of The Total Environment, 622-623(), 127–139, (2018).
- Prestes, O., Friggi, C., Adaime, M., Zanella, R. *QuEChERS - A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry*. Química Nova, 32, 1620-1634, (2009).

- Publituris. *Número de turistas portuguesas na Galiza quase duplicou até agosto*, (2018). Disponível em: <https://www.publituris.pt/2018/10/03/numero-de-turistas-portuguesas-na-galiza-quase-duplicou-ate-agosto/>. Consultado em: 09/06/2021.
- Ramos, S., Silva, J.A., Homem, V., Cincinelli, A., Santos, L., Alves, A., Ratola, N. *Solvent-saving approaches for the extraction of siloxanes from pine needles, soils and passive air samplers*. *Analytical Methods*, 8(27), 5378–5387, (2016).
- Ratola, N., Ramos, S., Homem, V., Silva, J.A., Jimenez-Guerrero, P., Amigo, J.M., Santos, L., Alves, A. *Using air, soil and vegetation to assess the environmental behaviour of siloxanes*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (4), 3273–3284, (2016).
- Razali, M., Didaskalou, C., Kim, J. F., Babaei, M., Drioli, E., Lee, Y. M., Szekely, G. *Exploring and Exploiting the Effect of Solvent Treatment in Membrane Separations*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(12), 11279–11289, (2017).
- Richardson, S.D., Ternes, T.A. *Water analysis: emerging contaminants and current issues*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 86(6), 2813–48, (2014).
- Rocha, F., Homem, V., Castro-Jiménez, J., Ratola, N. *Marine vegetation analysis for the determination of volatile methylsiloxanes in coastal areas*. *Science of The Total Environment*, 650, 2364–2373, (2019).
- Sanchís, J., Martínez, E., Ginebreda, A., Farré, M., Barceló, D. *Occurrence of linear and cyclic volatile methylsiloxanes in wastewater, surface water and sediments from Catalonia*. *Science of The Total Environment*, 443(), 530–538, (2013).
- Sanchís, J., Cabrerizo, A., Galbán-Malagón, C., Barceló, D., Farré, M., Dachs, J., *Unexpected occurrence of volatile dimethylsiloxanes in Antarctic soils, vegetation, phytoplankton, and krill*. *Environmental Science & Technology*, 49, 4415-4424, (2015).
- Sanchís, J., Llorca, M., Pico, Y., Farré, M., Barceló, D. *Volatile dimethylsiloxanes in market seafood and freshwater fish from the Xuquer River, Spain*. *Science of the Total Environment*, 545-546, 236–243, (2016).
- Schalau, G.K., Ulman, K.L. *Silicone Excipients in Drug Development*. *Contrapharma*, (2009).
- Schmitt, M., *Analysis of silanes and of siloxanes formation by Raman spectroscopy*. *Royal Society of Chemistry Advances* 2014, 4, 1907-1917, (2014).
- Schweigkofler, M., Niessner, R. *Determination of Siloxanes and VOC in Landfill Gas and Sewage Gas by Canister Sampling and GC-MS/AES Analysis*. *Environmental Science & Technology*, (1999).
- Shoeib, M., Schuster, J., Rauert, C., Su, K., Smyth, S.A., Harner, T. *Emission of poly and perfluoroalkyl substances, UV-filters and siloxanes to air from wastewater treatment plants*. *Environmental Pollution*, 218, 595–604, (2016).
- Stauffer, E., Dolan, J.A., Newman, R. *Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry*. *Fire Debris Analysis*, 235–293, (2008).
- Tilley, S.K., Fry, R.C. *Priority Environmental Contaminants. Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*. Academic Press, 117–169, (2015).

- Tran, T.M., Hoang, A.Q., Le, S.T., Minh, T.B., Kannan, K. *A review of contamination status, emission sources, and human exposure to volatile methyl siloxanes (VMSs) in indoor environments*. Science of The Total Environment, (2019).
- UNEP/MAP. *State of the Mediterranean marine and coastal environment*. UNEP/MAP – Barcelona Convention. Athens, (2012).
- Urban-Malinga, B., Zalewski, M., Jakubowska, A., Wodzinowski, T., Malinga, M., Palys, B., Dabrowska, A. *Microplastics on sandy beaches of the southern Baltic Sea*. Marine Pollution Bulletin, 155(), 111170, (2020).
- USEPA. *High production volume (HPV) challenge program*. Disponível em: <https://www.chemportal.org/chemportal/>. Consultado em: 12/02/2021, (2007).
- Vera, J., Correia-Sá, L., Paíga, P., Bragança, I., Fernandes, V., Domingues, V., Delerue-Matos, C., *QuEChERS and soil analysis. An Overview*. Versita, 1, 54-77, (2013).
- Wang, D.G., Norwood, W., Alaei, M., Byer, J.D., Brimble, S. *Review of recent advances in research on the toxicity, detection, occurrence, and fate of cyclic volatile methyl siloxanes in the environment*. Chemosphere, 93, 711-725, (2013).
- Warner, N. A., Krogseth, I. S., Whelan, M. J. *Comment on “Unexpected occurrence of volatile dimethylsiloxanes in Antarctic soils, vegetation, phytoplankton, and krill”*. Environmental Science & Technology, 49, 7504-7506, (2015).
- Warner, N., Evenst, A., Christensen, G., Gabrielsen, G., Borga, K., Leknes, H. *Volatile siloxanes in European Arctic: assessment of sources and spatial distribution*. Environmental Science & Technology. 44, 7705-7710, (2010).
- Whelan, M.J., Estrada, E., van Egmond, R. *A modelling assessment of the atmospheric fate of volatile methyl siloxanes and their reaction products*. Chemosphere, 57(10), 1427–1437, (2004).
- Xu, S., Wania, F. *Chemical fate, latitudinal distribution and long-range transport of cyclic volatile methylsiloxanes in the global environment: A modeling assessment*. Chemosphere, 93(5), 835–843, (2013).
- Yu, X., Peng, J., Wang, J., Wang, K., Bao, S. *Occurrence of microplastics in the beach sand of the Chinese inner sea: the Bohai Sea*. Environmental Pollution, 214, 722–730, (2016).
- Zhang, Z., Qi, H., Ren, N., Li, Y., Gao, D., Kannan, K. *Survey of Cyclic and Linear Siloxanes in Sediment from the Songhua River and in Sewage Sludge from Wastewater Treatment Plants, Northeastern China*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 60(2), 204–211, (2011).
- Zhao, X., Zheng, M., Liang, L., Zhang, Q., Jiang, G. *Assessment of PCBs and PCDD/Fs along the Chinese Bohai Sea coastline using mollusks as bioindicators*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 49, 178–185, (2005).
- Zhi, L., Xu, L., He, X., Zhang, C., Cai, Y. *Distribution of methylsiloxanes in benthic mollusks from the Chinese Bohai Sea*. Journal of Environmental Sciences, (2018).

Anexo 1

Na Tabela A1, encontram-se representadas as retas de calibração para os diferentes siloxanos, bem como os coeficientes de correlação, respeitantes ao estudo em areias.

Tabela A 1 - Equações das retas de calibração e coeficiente de correlação para cada VMS, no estudo das areias.

Composto	Equação da reta de calibração $y = a x$	r (> 0,995)
D3	$A/A_{pi} = 1,411 m/m_{pi}$	0,998 ✓
D4	$A/A_{pi} = 1,215 m/m_{pi}$	0,997 ✓
D5	$A/A_{pi} = 0,698 m/m_{pi}$	0,995 ✓
D6	$A/A_{pi} = 0,674 m/m_{pi}$	0,997 ✓
L3	$A/A_{pi} = 0,705 m/m_{pi}$	0,997 ✓
L4	$A/A_{pi} = 1,184 m/m_{pi}$	0,997 ✓
L5	$A/A_{pi} = 0,958 m/m_{pi}$	0,996 ✓

Onde A/A_{pi} – Razão área/área_{padrão interno}; m/m_{pi} – Razão massa/massa_{padrão interno}.

Na Tabela A2, encontram-se representadas as retas de calibração para os diferentes VMSs, assim como os coeficientes de correlação, relativos ao estudo em mexilhões.

Tabela A 2 - Equações das retas de calibração e coeficiente de correlação para cada VMS, no estudo dos mexilhões.

Composto	Equação da reta de calibração $y = a x$	r (> 0,995)
D3	$A/A_{pi} = 0,730 m/m_{pi}$	0,999 ✓
D4	$A/A_{pi} = 0,835 m/m_{pi}$	0,999 ✓
D5	$A/A_{pi} = 0,486 m/m_{pi}$	0,999 ✓
D6	$A/A_{pi} = 0,468 m/m_{pi}$	0,999 ✓
L3	$A/A_{pi} = 0,479 m/m_{pi}$	0,999 ✓
L4	$A/A_{pi} = 0,812 m/m_{pi}$	0,999 ✓
L5	$A/A_{pi} = 0,639 m/m_{pi}$	0,999 ✓

Onde A/A_{pi} – Razão área/área_{padrão interno}; m/m_{pi} – Razão massa/massa_{padrão interno}.

Anexo 2

Na Figura A1 encontram-se representadas as concentrações de VMSs ($\text{ng/g}_{\text{peso húmido}}$) para a areia e para o mexilhão de cada praia em estudo da costa da Galiza.

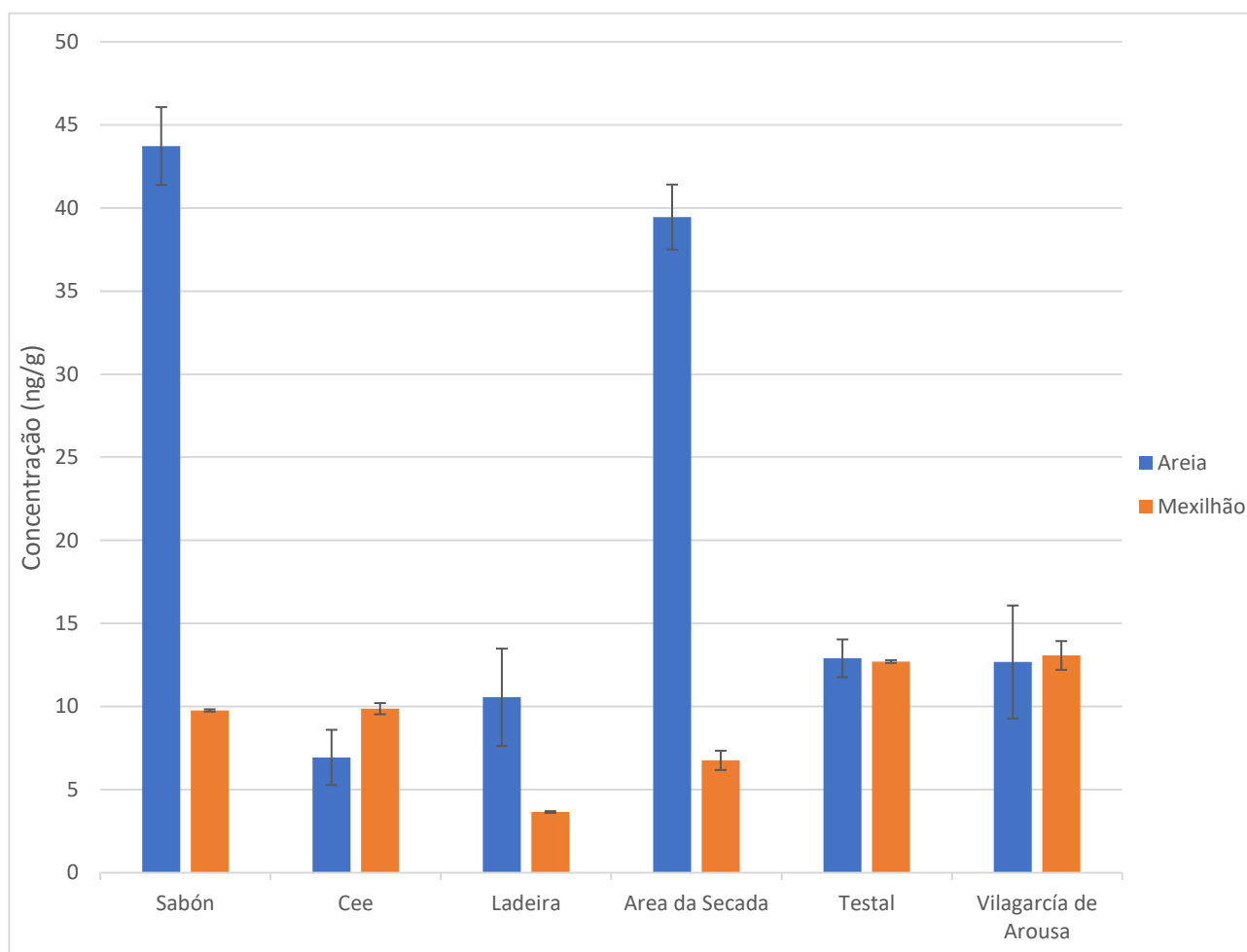


Figura A 1 – Comparação dos níveis de VMSs totais da areia e do mexilhão, para cada praia da Galiza em estudo (n=2).