

SUZANA DE MOURA PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE BAIXO CUSTO PARA A
EXTRAÇÃO DE BISFENOL-A NO MEXILHÃO DOURADO (*Limnoperna fortunei*)**

**Pelotas
2021**

SUZANA DE MOURA PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE BAIXO CUSTO PARA A
EXTRAÇÃO DE BISFENOL-A NO MEXILHÃO DOURADO (*Limnoperna fortunei*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharias e Ciências Ambientais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-grandense, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo dos Santos Vaz

**Pelotas
2021**

Ficha Catalográfica

P436d Pereira, Suzana de Moura.
Desenvolvimento de Metodologia de Baixo Custo para Extração de Bisfenol - A no Mexilhão Dourado (*Limnoperna fortunei*) / Suzana de Moura Pereira. – 2021.
54 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo dos Santos Vaz.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-rio-grandense, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais, Mestrado em Engenharia e Ciências Ambientais, Pelotas, 2021.

1. Cromatografia. 2. Desreguladores Endócrinos. 3. CLAE. 4. Mexilhão. I. Vaz, Bernardo dos Santos. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-rio-grandense – IFSul. III. Título.

CDD 628

Catálogo na publicação:

Bibliotecária Silvia Regina de Lima Veleda CRB 10/2038
Biblioteca IFSul - Câmpus Pelotas

SUZANA DE MOURA PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE BAIXO CUSTO PARA A
EXTRAÇÃO DE BISFENOL-A NO MEXILHÃO DOURADO (*Limnoperna fortunei*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharias e Ciências Ambientais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-grandense, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Dissertação defendida e aprovada em: dia, mês e ano.

Banca examinadora:

Prof. Prof. Dr. Bernardo dos Santos Vaz
Orientador
IFSUL

Prof. Dr. Pablo Elías Martínez
FURG

Prof. Dr. Pedro José Sanches Filho
IFSUL

Prof. Dr. Daniel Ricardo Arsand
IFSUL

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar agradeço a minha família por todo o apoio em todos os momentos da minha vida, em especial aos meus pais por todo amor e dedicação, pois toda minha jornada acadêmica foi sempre incentivada por eles.

Agradeço ao Cássio, uma pessoa muito especial que sempre esteve comigo nos meus piores momentos.

Agradeço a instituição (IFSUL) pelo apoio e pela oportunidade proporcionada.

Agradeço a todos professores PPGECA e do curso de gestão ambiental pelos ensinamentos e amizade.

Agradeço aos colegas e amigos de turma por todos os momentos de aprendizagem, compartilhamento de angústias e momentos de confraternização.

Agradeço aos colegas amigos de curso Janaina, Matheus e Fabiane pela amizade, discussões, trabalhos conturbados e apoio.

Agradeço as meninas do laboratório que contribuíram para a execução destes e pelos momentos de descontração.

Agradeço aos professores componentes da banca examinadora pelo seu tempo e contribuição.

Agradeço ao meu orientador por toda paciência, às vezes até demais, pela amizade, ensinamentos e experiência.

RESUMO

O bisfenol-A (BPA) é um composto sintético plastificante amplamente produzido e utilizado em todo o mundo. Tem-se investigado a capacidade de ação do BPA no organismo como desregulador endócrino mimetizando hormônios estrógenos. Além dos efeitos desreguladores endócrinos, estudos sugerem que o BPA também pode atuar através de uma variedade de mecanismos, como transferência de elétrons, geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo. Devido aos altos volumes de produção e descarte de produtos sintetizados a partir de BPA como, plástico de policarbonato, resinas epóxi, retardante de chamas e outros produtos, tem sido amplamente detectado em ambientes terrestres e aquáticos. O mexilhão dourado possui hábito alimentar filtrante, comportamento gregário, grande densidade populacional e pode ser utilizado como sentinela ambiental na detecção de poluentes. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia analítica de baixo custo para identificar e quantificar o BPA em tecidos de mexilhão dourado. Foi utilizado um método de pré-concentração por liofilização, seguido de extração por solvente (metanol 80% + água 20%) sob sonicação. Os extratos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Diferentes métodos de secagem de amostras foram testados: fluxo de nitrogênio, forno de laboratório a 40° C e dessecador de vidro com sílica gel. O objetivo das diferentes metodologias de secagem foi a redução de custos, sendo que o dessecador de vidro foi escolhido por apresentar uma recuperação eficiente com menor custo de manutenção. Os limites de detecção e quantificação foram 0,0023 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,0465 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente para o BPA. O BPA detectado nas amostras de mexilhão dourado foi de 0,8365 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O método desenvolvido é uma extração sólido-líquido ecologicamente correta e de baixo custo. Em decorrência da pandemia não foi possível concluir todos os parâmetros de validação e as diferentes extrações por solvente propostas.

Palavras-Chave: Cromatografia; Desreguladores endócrinos; CLAE; Mexilhão.

ABSTRACT

Bisphenol-A is a synthetic plasticizer compound distributed worldwide.

Bisphenol-A (BPA) has been investigated due to the ability to act in the body as an endocrine disruptor. In addition to the endocrine disrupting effects, studies suggest that BPA can also act through a variety of mechanisms, such as electron transfer, producing reactive oxygen species and oxidative stress. Due to the high production volumes and disposal of products synthesized from BPA such as polycarbonate plastic, epoxy resins, flame retardants and other products, it has been widely detected in terrestrial and aquatic environments. The golden mussel has filter habit, gregarious behavior, high population density and it can be used as an environmental sentinel to detect pollutants. The objective of this study was to develop a low-cost analytical methodology to identify and quantify BPA in golden mussel tissues. A method for pre-concentration using lyophilization, followed by a solvent extraction (methanol 80% + water 20%) under sonication was used. The extracts were quantified using a high performance liquid chromatography (HPLC). Different drying sample methods were tested: nitrogen flow, laboratory oven at 40° C and glass desiccator with silica gel. The objective for different drying methodologies was to reduce costs; the glass desiccator was chosen because it showed an efficient recovery with lower maintenance costs. The detection and quantification limits were 0,0023 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0,0465 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively for the BPA. The BPA detected in the golden mussel samples was 0,8365 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The method developed is an environmentally friendly solid-liquid extraction with low cost. As a result of the pandemic, it was not possible to complete all the validation parameters and the different proposed solvent extractions.

Keywords: Chromatography; Endocrine disruptors; HPLC; Mussel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do BPA.	1
Figura 2: Espécimes de mexilhão-dourado adulto incrustados no substrato e isoladamente.	2
Figura 3: Estruturas químicas dos análogos do bisfenol-A.	8

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do bisfenol-A e seus principais análogos 5

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPA - Bisfenol-A (BPA; 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano)

BPA-DGE - Bisfenol-A éter diglicidílico

BPAF - Bisfenol-AF (4,4'-hexafluoro isopropilideno) difenol)

BPAP - Bisfenol-AP (4,4' - (1-feniletilideno) bisfenol)

BPB - BPB (2,2-bis (4-hidroxifenil) butano)

BPBP - Bisfenol-BP (bis (4-hidroxifenil) difenilmetano)

BPC - Bisfenol-C (2,2-bis (4-hidroxi-3-metil-fenil) propano)

BPC-dichloride -Bisfenol-C dicloreto (1,1-dicloro-2,2-bis (4-hidroxifenil) etileno)

BPE - Bisfenol- E (4,4'-etilidenebisfenol)

BPF- Bisfenol-F (4,4'-metilenodifenol)

BPG - Bisfenol-G (2,2-bis (4-hidroxi-3-isopropil fenil) propano)

BPP - Bisfenol-P (4,4' - (1,4-fenileno-di-isopropilideno) bisfenol)

BPPH - Bisfenol-PH (2,2-bis (2-hidroxi-5-bifenilil) propano)

BPM - Bisfenol-M (4,4' - (1,3-fenileno di isopropilideno) bisfenol)

BPS - Bisfenol-S (4-hidroxifenilsulfona)

BP-TMC - Bisfenol-TMC (4,4' - (3,3,5-trimetil ciclo-hexilideno) bisfenol)

CG-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

GC-MS - Gas chromatography–mass spectrometry

HPLC - High performance liquid chromatography

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massa

RSD - Relative Standard Deviation - Desvio Padrão Relativo

SPE - Solid Phase Extraction - Extração em fase sólida

USEPA - United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Justificativa	3
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo Geral	4
1.2.1 Objetivos Específicos	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Desreguladores endócrinos	6
2.2 O Bisfenol-A	6
2.3 Bisfenol-A no ambiente	9
2.4 Metodologias analíticas para determinação de bisfenol-A	11
2.5 Parâmetros avaliados na validação da metodologia	12
2.5.1 Seletividade	12
2.5.2 Linearidade	13
2.5.3 Efeito da matriz	13
2.5.4 Faixa de trabalho	13
2.5.5 Precisão	14
2.5.6 Exatidão	14
2.5.7 Limite de detecção	15
2.5.8 Limite de Quantificação	15
3 REFERÊNCIAS	16
4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E/OU TECNOLÓGICA	21
6 ANEXOS	38

1 INTRODUÇÃO

O Bisfenol-A 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano ou BPA é um composto orgânico sintético plastificante com propriedades de atuar no sistema endócrino, este composto pode ser encontrado em todo o mundo, com grande produção desde a década de 1960 (STAPLES *et al.*, 1998). O mercado global de bisfenol-A foi responsável pela movimentação de US \$ 17 bilhões em 2016 e deve chegar a US \$ 31 bilhões em 2026 devido aumento na demanda de plásticos policarbonato e resinas epóxi (Research and Markets, 2018) e deverá atingir produção superior a 10 milhões de toneladas para a década de 2020 (Research and Markets, 2016), sendo um dos compostos mais produzidos no mundo.

Tem-se investigado a capacidade de ação do BPA no organismo devido sua estrutura química (figura 1), com dois anéis fenólicos insaturados, que mimetiza alguns hormônios (JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 2010).

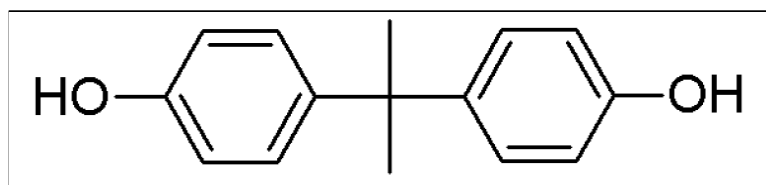


Figura 1: Estrutura molecular do BPA. **Fonte:** (DAI *et al.*, 2016).

Em estudos *In vitro* foi observado que O BPA possui atividade estrogênicas fracas, mais de 1.000 -15.000 vezes menos potente do que o estradiol ou o estriol (MILLIGAN; BALASUBRAMANIAN; KALITA, 1998). Além dos efeitos desreguladores endócrinos, estudos sugerem que o BPA também pode atuar através de uma variedade de mecanismos, como transferência de elétrons, geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (KOVACIC, 2010).

No ambiente é encontrado em concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou ng.L^{-1} (OEHLMANN *et al.*, 2009). Devido aos altos volumes de produção e descarte de produtos sintetizados a partir de BPA como, plástico de policarbonato, resinas epóxi, retardante de chamas e outros produtos, tem sido amplamente detectado em ambientes terrestres e aquáticos (BOLZ; HAGENMAIER; KÖRNER, 2001). As descargas de águas residuais representam a principal via de contaminação destes ambientes (IM; LÖFFLER, 2016).

Em ambientes aquáticos, o BPA apresenta maior degradabilidade em temperaturas (25°C) quando comparada a temperaturas inferiores e na água doce

quando comparadas à água do mar, o composto começa a degradar no ambiente após 50 dias, dada a sinergia entre luz e temperatura (KOCAMAN; OZHAN, 2019). Rios apresentam maiores aportes quando comparados aos mares (OZHAN; KOCAMAN, 2019), no entanto, às condições bióticas e abióticas de cada região pode influenciar na degradação do BPA (IM; LÖFFLER, 2016).

No ambiente natural, O BPA foi detectado em 100% de amostras de peixes (*Liza aurata* e *Platichthys flesus*) e bivalves (*Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus spp.*, *Chamalea gallina* e *Crassostrea gigas*) da costa de Portugal, Espanha, Itália, Holanda e Noruega (ÁLVAREZ-MUÑOZ *et al.*, 2015).

Mexilhões marinhos *Mytilus galloprovincialis* demonstraram capacidade de biocumular BPA em seus tecidos, sendo que o composto apresentou meia vida de 26 dias (CERKVENIK-FLAJS *et al.*, 2018; SALGUEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016); (GATIDOU; VASSALOU; THOMAIDIS, 2010). A exposição a concentrações de BPA ambientais resultou em efeitos imunomoduladores, genotóxicos e disruptivos evidentes em mexilhões marinhos *Perna viridis* (JUHEL *et al.*, 2017). No bivalve de água doce *Unio tumidus* o BPA causou o efeito oxidativo através da depleção nos níveis de glutathiona (GSH) aumentando a sua oxidação, aumento substancial nos níveis de piruvato, desintegração lisossomal, e diminuição no nível da enzima apoptótica caspase-3 (GNATYSHYNA *et al.*, 2019).

Os bivalves são amplamente utilizados como sentinelas ambientais para detectar poluentes ambientais, podendo ser utilizados como biomonitores de contaminantes nas comunidades bentônicas (KING *et al.*, 2004). Devido a estes organismos terem ampla distribuição, grande densidade populacional e características morfológicas e fisiológicas peculiares, como por exemplo o hábito filtrante, permite remover poluentes como metais pesados, agrotóxicos e toxinas presentes nas águas e bioacumular em seus tecidos (ROCHA *et al.*, 2009; VIDAL-LIÑÁN *et al.*, 2016). O metabolismo complexo dos mexilhões combinado com a maturidade sexual precoce, alto índice de fecundidade e ampla tolerância ambiental permite a estes organismos adaptar-se a diferentes condições ambientais (NAMIESNIK *et al.*, 2008).

O molusco bivalve mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) é um espécie invasora nativa dos rios e riachos do sudeste asiático. Seu primeiro registro no Brasil foi no lago Guaíba no início dos anos 90, provavelmente oriundo da água de lastro de navios cargueiros (MANSUR; RICHINITTI; SANTOS, 1999).

Desde de então o mexilhão-dourado se dispersou por centenas de quilômetros nos ambientes límnicos brasileiros (KARATAYEV *et al.*, 2007).



Figura 2: Espécimes de mexilhão-dourado adulto incrustados no substrato (à esquerda) e isoladamente (à direita). **Fonte:** (ÁVILA-SIMAS *et al.*, 2019).

Espécies de mexilhões invasores apresentam sensibilidade, capacidade de adaptação e bioacumulação de diferentes tipos de poluentes (DO AMARAL *et al.*, 2019; EL HAJ; BOHN; SOUZA, 2019; NAMIESNIK *et al.*, 2008). O mexilhão-dourado é uma espécie com tais características e, portanto, um potencial modelo biológico de sentinela ambiental e ideal para a detecção do BPA, uma vez que a presença deste composto em água pode ser difícil de quantificar devido a baixas concentrações no ambiente.

Existe a necessidade de impulsionar a pesquisa e inovação para tecnologias de tratamento novas e econômicas, de acordo com a absorção, modo de ação e consequências de cada contaminante emergente (EMERGING POLLUTANTS IN THE ENVIRONMENT: PRESENT AND FUTURE CHALLENGES IN BIOMONITORING, ECOLOGICAL RISKS AND BIOREMEDIATION, 2015).

Um desafio no monitoramento de poluentes como o BPA em matriz biológica é a dificuldade de encontrar métodos analíticos confiáveis devido às baixas concentrações presentes no ambiente e nas matrizes. Os métodos cromatográficos atualmente estão entre os mais utilizados na separação, identificação e quantificação, devido a sua alta seletividade e sensibilidade.

1.1 Justificativa

Bisfenol-A é uma das substâncias mais produzidas no mundo, mas é

considerada micropolvente devido à baixa concentração necessária para produzir um efeito nocivo em organismos. Esta substância apresenta ação fisiológica em animais como desregulador endócrino que possui capacidade estrogênica. Para que estudos de toxicologia ambiental, ensaios fisiológicos, dentre outros, possam ser realizados faz-se necessário quantificar a concentração de BPA em diferentes matrizes, grande parte em água e tecidos biológicos. Existe uma dificuldade metodológica em quantificar BPA devido à baixa concentração presente no ambiente e a complexidade de tecidos biológicos. Desta forma, este trabalho propõe o desenvolvimento de um processo capaz de extrair BPA de matrizes biológicas, através de uma inovação metodológica, capaz de detectar e quantificar esta substância.

Neste contexto buscou-se desenvolver uma metodologia capaz de detectar e quantificar o BPA em uma matriz complexa, sendo o mexilhão-dourado um modelo ideal pois a espécie encontra-se abundante no ambiente natural, de fácil coleta e manuseio.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia analítica combinando etapas de extração sob ultrassom e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do bisfenol-A a partir da matriz biológica *Limnoperna fortunei*.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver metodologia de extração sólido-líquido para bisfenol-A em matriz biológica.
- Testar a eficiência de diferentes solventes na extração do bisfenol-a
- Avaliar diferentes condições cromatográficas para determinação de bisfenol-A.
- Verificar os parâmetros de validação: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.
- Determinar e quantificar bisfenol-A no mexilhão-dourado coletado no Arroio

Pelotas-RS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desreguladores endócrinos

A poluição ambiental é um grave problema que influencia a saúde humana e do ambiente. Produtos químicos prejudiciais que afetam adversamente os processos ambientais são considerados poluentes quando se acumulam acima dos níveis naturais ou quando exercem toxicidade (LANDRIGAN *et al.*, 2018). Estes poluentes podem afetar gradativamente o organismo, e este pode ser exposto a concentrações potencialmente prejudiciais à saúde (GBD 2015 RISK FACTORS COLLABORATORS, 2016; LANDRIGAN *et al.*, 2018).

Produtos químicos que atuam como desreguladores do sistema endócrino, são compostos xenoestrogênicos capazes de interferir nas vias de sinalização de hormônios por meio de atividades estrogênicas ou androgênicas, são praticamente onipresentes no ambiente com constantes aportes em decorrência da sua importância econômica, tornam os desreguladores endócrinos uma questão incerta para a saúde humana e ambiental (MCLACHLAN, 2001; MOLINE *et al.*, 2000).

Contaminantes emergentes são poluentes presentes no ambiente que ainda não foram regulamentados pelos órgãos ambientais, mas com potencial de causar alterações no ambiente e trazer risco para a saúde humana e ambiental (USEPA - United States Environmental Protection Agency). Dentre os poluentes emergentes estão uma ampla gama de produtos químicos sintéticos, como pesticidas, cosméticos, produtos de higiene pessoal e domésticos, produtos farmacêuticos, plastificantes entre outros (ASIMAKOPOULOS; BLETSOU; THOMAIDIS, 2012). Sendo o BPA um produto de alta incidência de uso e grande ocorrência nas águas, este composto deve ser priorizado em estudo de monitoramento (MATTA *et al.*, 2012).

2.2 O Bisfenol-A

O Bisfenol-A (2,2 bis(4-hydroxyphenyl)propane) ou BPA é um composto químico sintético, comercialmente importante para a produção de polímeros, que apresentam excelentes propriedades mecânicas, baixa adsorção de umidade e estabilidade térmica (MICHAŁOWICZ, 2014)

Em condições ambientais normais de temperatura e pressão, o BPA é encontrado no estado sólido apresenta coloração branca e é comercializado na

forma de pó ou cristais. As propriedades físico-químicas do BPA e seus análogos estão presentes na tabela 1 e as suas estruturas moleculares estão representados na figura 3. O coeficiente de partição octanol-água (log Kow) de 3,32 permite que o composto tenha solubilidade moderada em água e possui baixos fatores de bioconcentração e bioacumulação 172,7 e 172,8, respectivamente (CHEN *et al.*, 2016).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do bisfenol-A e seus principais análogos

Bisfenóis	CAS	Peso molecular g/mol	Log Kow	Log Ka	Meia-vida (dias)				Fbc	Fba
					Atmosfera	Água	Solo	Sedimento		
BPA	1980-05-07	228,29	3,32	-9,427	0,067	37,5	75	337,5	172,7	172,8
BPA-DGE	1675-54-3	340,41	3,84	-8,746	0,08	60	120	541,7	399,9	400,5
BPAF	1478-61-1	336,23	4,47	-7,634	0,067	180	360	1620,8	639,3	643
BPAP	1571-75-1	290,36	4,86	-10,643	0,063	37,5	75	337,5	249,7	250,1
BPB	77-40-7	242,31	4,13	-9,302	0,066	37,5	75	337,5	170,2	170,3
BPBP	1844-01-05	352,43	6,08	-11,858	0,06	37,5	75	337,5	385,1	416,4
BPC	79-97-0	256,34	4,74	-9,339	0,054	37,5	75	337,5	112,6	112,6
BPC-Dichloride	14868-03-0 2	281,13	3,75	-10,548	0,079	37,5	75	337,5	227,5	227,6
BPE	2081-08-05	214,26	3,19	-9,55	0,065	15	30	135	45,61	45,61
BPF	620-92-8	200,23	3,06	-9,672	0,065	15	30	135	28,02	28,02
BPG	127-54-8	312,45	6,55	-8,849	0,053	37,5	75	337,5	284,2	354,7
BPM	13595-25-0	346,46	6,25	-10,23	0,059	60	120	541,7	1970	9079
BPP	2167-51-3	346,46	6,25	-10,23	0,062	60	120	541,7	1970	9079
BPPH	24038-68-4	380,48	7,17	-11,656	0,083	37,5	75	337,5	192,8	585,9
BPS	1980-09-01	250,27	1,65	-12,957	0,368	15	30	135	3535	3535
BP-TMC	129188-99- 4	310,43	6,29	-9,044	0,061	60	120	541,7	684,2	1042
BPZ	843-55-0	268,35	5	-9,413	0,062	37,5	75	337,5	271,4	272,1

Log Kow- Log do coeficiente de partição octanol-água; Log Ka - Log do coeficiente de partição ar-água;

Fbc - Fator de bioconcentração (L/Kg peso úmido); Fba - Fator de bioacumulação (L/Kg peso úmido)

Adaptado de: (CHEN *et al.*, 2016)

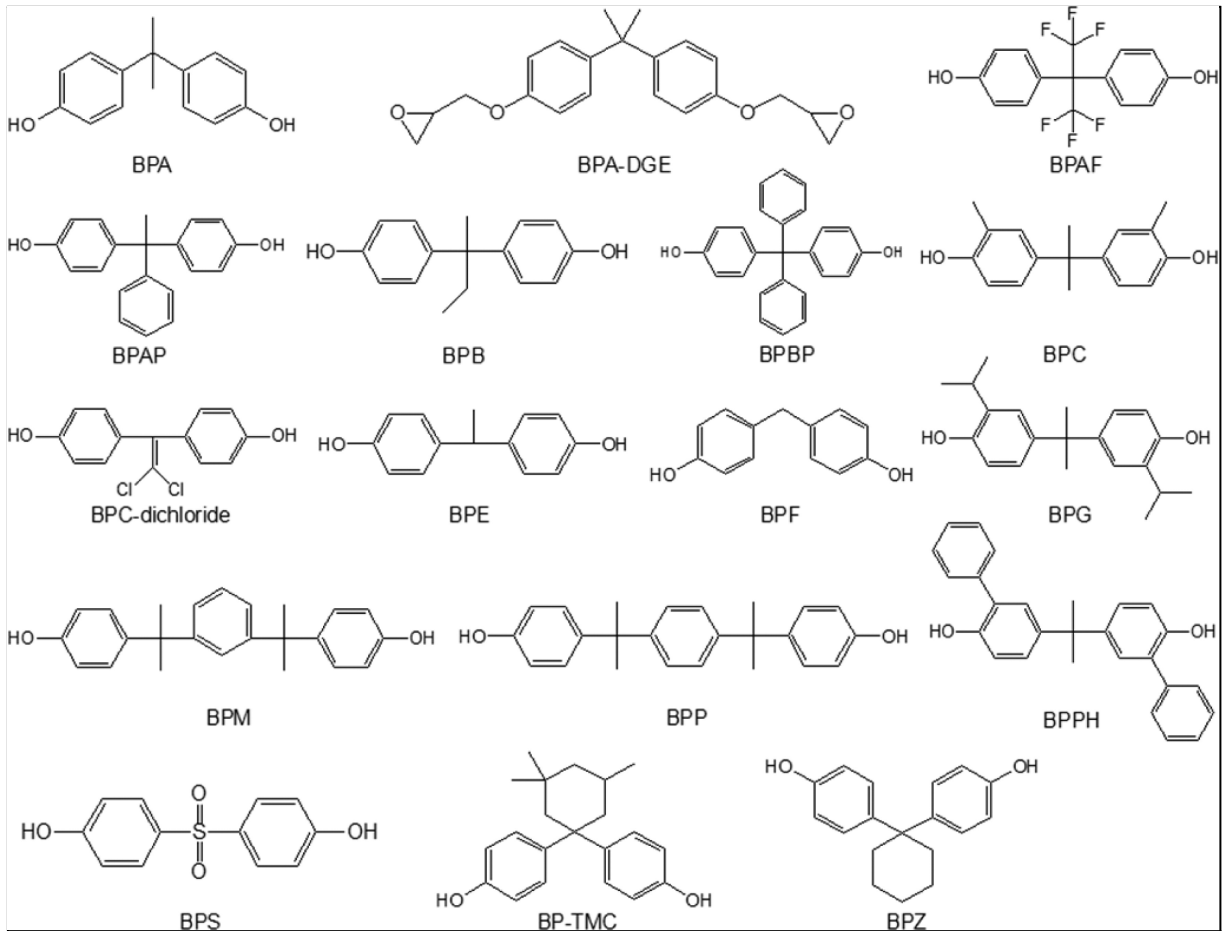


Figura 3: Estruturas químicas dos análogos do bisfenol-A. **Fonte:** (CHEN *et al.*, 2016)

Bioacumulação é um processo pelo qual uma substância química ou compostos químicos, são absorvidos no organismo por todas suas vias de exposição de forma direta, como ocorre no ambiente, ou seja, fontes ambientais e alimentares (BURKHARD, 2021). A bioacumulação é o resultado líquido de processos concorrentes de absorção química no organismo na superfície respiratória e da dieta e eliminação química do organismo, incluindo trocas respiratórias, egestão fecal, biotransformação metabólica do composto original e diluição do crescimento. O grau em que ocorre a bioacumulação pode ser expresso como um fator de bioacumulação (FBA) determinado através da equação [1] (ARNOT; GOBAS, 2006).

$$[1] \quad FBA = \frac{\text{concentração no organismo (g.kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentração livre dissolvida na água (g} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}}$$

Bioconcentração é o processo pelo qual uma substância química é absorvida

por um organismo do meio ambiente apenas através de suas superfícies respiratórias e dérmicas, ou seja, a exposição química na dieta não está incluída (BURKHARD, 2021). É o resultado líquido de taxas concorrentes de absorção química na superfície respiratória e eliminação química, incluindo troca respiratória, egestão fecal, biotransformação metabólica do composto original e diluição do crescimento. A diluição do crescimento é considerada um processo de “pseudo-eliminação”, uma vez que o produto químico não é realmente eliminado pelo organismo, mas a concentração pode ser diluída por um aumento no volume do tecido. O grau em que ocorre a bioconcentração é expresso como o fator de bioconcentração (FBC) determinado através da equação [2] (ARNOT; GOBAS, 2006).

$$[2] \quad FBC = \frac{\text{concentração no organismo (g.kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentração livre dissolvida na água (g} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}}$$

Ambos FBC e FBA são geralmente calculados como a razão, em equilíbrio, entre a concentração na biota e a concentração de exposição. Embora os cálculos de FBA e FBC sejam geralmente os mesmos, as interpretações são ligeiramente diferentes, com o acúmulo em organismos originando-se da água apenas para o FBC e de fontes de água e dieta para o FBA. Portanto, em geral, o FBA é derivado de medições em ambientes naturais e o FBC é mais facilmente medido em condições de laboratório (BURKHARD, 2021; MCGEER *et al.*, 2003).

2.3 Bisfenol-A no ambiente

O bisfenol-A é um produto amplamente documentado como uma substância prejudicial à saúde humana e animal, apresentando potencial genotóxico, toxicidade reprodutiva, efeitos de desregulação endócrina, citotoxicidade e neurotoxicidade (Y. Chen *et al.* 2016; Pelch *et al.* 2019).

O BPA e seus produtos de degradação são liberados durante a produção, uso, envelhecimento e descarte de produtos, e entram nos corpos hídricos por meio de deposição atmosférica, descarte de efluentes, escoamento e esgoto urbano (USMAN; AHMAD, 2016).

O BPA apresenta maior degradabilidade em ambientes aquáticos em temperaturas de aproximadamente 25°C quando comparada a temperaturas

inferiores e na água doce quando comparadas à água do mar. Rios apresentam maiores aportes quando comparados aos mares (OZHAN; KOCAMAN, 2019), no entanto, as condições bióticas e abióticas de cada região podem influenciar na degradação do BPA (IM; LÖFFLER, 2016). O foco em produtos químicos persistentes e de bioacumulação pode levar a ignorar produtos químicos polares e instáveis, contudo, esses produtos químicos são tóxicos e sempre presentes devido à pseudo-persistência (JOHNSON *et al.*, 2017).

A Agência Europeia de Produtos Químicos (ECHA) colocou em 2018 o BPA na lista de substâncias de grande preocupação devido a propriedade de atuar no sistema endócrino (SEVEN NEW SUBSTANCES ADDED TO THE CANDIDATE LIST, ENTRY FOR BISPHENOL-A UPDATED - ALL NEWS - ECHA, 2018). No entanto, a simples substituição do BPA que é legalmente regulamentada para outros bisfenóis pode resultar em maior contaminação do meio ambiente (FRANKOWSKI *et al.*, 2020). Já foram documentados um total de 16 análogos de bisfenol para aplicações industriais (Tabela1) (CHEN *et al.*, 2016). Além disso, essas substituições vêm ocorrendo com maior frequência por bisfenol-F (BPF) e bisfenol-S (BPS) podem não ser alternativas seguras (MENDY *et al.*, 2020).

O BPS é o substituinte mais utilizado em produtos livres de BPA e sua concentração vem aumentando continuamente com a proibição do BPA, o que se reflete na sua presença no ambiente (QIU *et al.*, 2019).

Para os microrganismos do solo, dentre os bisfenóis A, F e S, o BPF é considerado o mais tóxico, seguido por BPS e BPA (ZABOROWSKA; WYSZKOWSKA; BOROWIK, 2020). Assim como o BPA, o bisfenol-S (4,4'-Sulfonyldiphenol) vem sendo amplamente utilizado na fabricação de resinas de policarbonato, resina epóxi retardante de chamas e outros produtos, vem sendo amplamente detectado em ambientes terrestres e aquáticos (BOLZ; HAGENMAIER; KÖRNER, 2001). O BPS também apresenta propriedades de desregulador endócrino, no entanto seus efeitos são estrogênicos e anti-androgênicos fracos (ROCHESTER; BOLDEN, 2015). O BPS mostra efeitos moleculares e biológicos diferentes do BPA, indicando um mecanismo específico do composto. Assim como o BPA, o BPS possui efeitos não monotônicos, pode participar de desregulações metabólicas que podem contribuir para processos envolvidos em sobrepeso, obesidade, síndrome metabólica (HÉLIÈS-TOUSSAINT *et al.*, 2014).

Portanto, a detecção e monitoramento destes compostos no ambiente deve

ser exaustiva para que possam ser desenvolvidas legislações específicas capazes de especificar o uso de compostos nocivos.

2.4 Metodologias analíticas para determinação de bisfenol-A

A demanda por métodos analíticos sensíveis, precisos e modernos para determinar compostos orgânicos em matrizes complexas com baixos níveis de concentração do analito de interesse são cada vez mais requisitadas. As principais etapas nos processos analíticos são amostragem, preparação da amostra, análise instrumental e processamento de dados, e qualquer uma delas pode afetar efetivamente o desempenho da análise (ZAMBONIN; ARESTA, 2021).

Vários procedimentos analíticos vêm sendo aplicados para a determinação de compostos orgânicos em amostras biológicas, desde técnicas convencionais de extração, até técnicas automatizadas. O principal desafio para a determinação de compostos orgânicos na biota é a complexidade das matrizes, que têm alto teor orgânico e lipídico, e conter vários interferentes para as análises cromatográficas (OMAR; ARIS; YUSOFF, 2021).

A cromatografia é uma das técnicas mais empregadas para a determinação de plastificante em diferentes amostras. Atualmente para determinar BPA nas matrizes ambientais, alimentos, plasma humano e amostras de urina são utilizados diferentes métodos cromatográficos com diversos métodos de extração. Os métodos clássicos de extração comuns adotados para a determinação de BPA incluem métodos de extração à base de solvente, como extração em fase sólida do inglês Polid phase Extraction (SPE), extração por soxhlet e extração auxiliada por micro-ondas (ABRAHAM; CHAKRABORTY, 2020).

Dentre as técnicas mais modernas estão SPME (Microextração em Fase Sólida, do inglês Solid-Phase Microextraction), a SBSE (Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês Stir-Bar Sorptive Extraction), a BA μ E (Microextração em Barra Adsorptiva, do inglês Bar Adsorptive Microextraction), a DPX e a LPME (Microextração em Fase Líquida, do inglês Liquid-Phase Microextraction).

Os extratos das amostras são analisados por meio de instrumentos altamente sensíveis como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa do inglês Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa do inglês Gas Chromatography Mass Spectrometry

(GC-MS) (GHAZALI; JOHARI, 2015).

2.5 Parâmetros avaliados na validação da metodologia

Os parâmetros avaliados em um método analítico, fazem parte do desenvolvimento do método onde as figuras de mérito são utilizadas para confirmar o método desenvolvido.

Muitos estudos já foram desenvolvidos para a determinação de compostos orgânicos em matrizes complexas, no entanto boas técnicas analíticas não são suficientes para garantir a confiabilidade dos dados. Existe a necessidade de comparar a qualidade das determinações químicas de forma rastreável e confiável. Para assegurar a confiabilidade do método analítico e gerar dados interpretáveis da amostra, a metodologia deve passar por uma série de validações. Segundo a ANVISA (2017) a validação de uma metodologia analítica deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, é necessário a validação do método através dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito da matriz, faixa de trabalho, precisão, exatidão (recuperação), limites de detecção e quantificação.

2.5.1 Seletividade

A seletividade é o primeiro parâmetro a ser considerado durante a validação da metodologia analítica, ela permite a execução de demais parâmetros como, a linearidade, a precisão e a exatidão. Seletividade é a capacidade de medir com precisão o analito na presença de outros componentes, como produtos de degradação, impureza e composição da matriz. Seletividade demonstra que o pico de resposta é exclusivamente do composto de interesse (LANÇAS, 2004). Deve ser demonstrada por meio da capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra (AVISA, 2017). A seletividade é avaliada examinando os brancos cromatográficos (de uma amostra que não contém analito) na janela de tempo esperada do pico do analito e medir exatamente o componente de interesse na presença de interferentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (STAUFFER, 2018).

2.5.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de trabalho (LANÇAS, 2004). A linearidade deve demonstrar a capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2017). Sendo obtida através do padronização interno ou externo, onde por meio de expressão matemática (STAUFFER, 2018). A linearidade do método pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração da espécie do analito de interesse (ANVISA, 2017). O gráfico de linearidade deverá ser traçado (Concentração vs. Resposta da Área do Pico) geralmente obtida por uma equação de reta $y = ax + b$, chamada de curva analítica (STAUFFER, 2018).

A linearidade é determinada pela injeção de uma série de padrões de solução estoque/solução estoque diluída usando o solvente/fase móvel, em um mínimo de cinco concentrações diferentes faixas de trabalho esperada. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo 5 concentrações diferentes (Lanças 2004).

2.5.3 Efeito da matriz

Matrizes complexas podem ter elevado efeito de matriz, com efeitos que podem diminuir ou aumentar o sinal do analito, que pode ser resolvido através da utilização de um padrão interno com estrutura semelhante à do composto a ser analisado ou composto isotopicamente marcado, onde a área será comparada nas soluções padrão e na matriz para verificar se houve alguma variação nas áreas dos compostos devido ao efeito de matriz (HERNÁNDEZ *et al.*, 2007). O efeito da matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com o padrão do analito em solvente e com a amostra fortificada com o padrão do analito (ANVISA, 2017).

2.5.4 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho de um método analítico é o intervalo entre os níveis superior e inferior que demonstraram ser determinados com precisão, exatidão e linearidade usando o método definido. Este intervalo será o intervalo de

concentração em que o teste de Linearidade é feito (RAO, 2018).

A faixa de trabalho deve ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão (ANVISA, 2017).

2.5.5 Precisão

A precisão é determinada a partir da análise de dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Sendo denominada de precisão intermediária o feito das variações dentro do laboratório de acordo com eventos como diferentes dias ou analistas ou equipamentos e/ou a combinação destes fatores (RIBEIRO *et al.*, 2008).

A precisão do método é o grau de concordância entre os resultados do teste individual quando o processo é repetidamente aplicado a várias amostras. A precisão é obtida através da medida de uma série de injeções do padrão ou analisando uma série de amostras de várias amostras homogêneas. De acordo com o desvio padrão medido (SD) e o valor médio, a precisão como o desvio padrão relativo (% rsd) é calculada (RAO, 2018).

A precisão indica o grau de consistência entre uma série de medições feitas sob condições específicas. Pode ser calculada através da determinação do desvio padrão, o intervalo de confiança da média ou o desvio padrão relativo (WEST *et al.*, 2006). Deve-se avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade dos dados (ANVISA, 2017).

2.5.6 Exatidão

A exatidão pode ser definida como a concordância ou aproximação entre a média do valor observado ou estimado e o valor teórico considerado verdadeiro. Expresso em erro relativo ou absoluto, tendo como métodos mais utilizados, materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (WEST *et al.*, 2006). Devido à impossibilidade de se trabalhar com amostras certificadas do analito na matriz estudada, as amostras padrão são realizadas através da adição do analito em amostra branco. Sendo assim, a exatidão é determinada para cada concentração dos controles de qualidade através da concordância das concentrações medidas e nominais do analito na amostra

adicionada (RIBEIRO *et al.*, 2008) Para matrizes complexas utiliza-se adição de substância de pureza conhecida, no qual quantidades conhecidas do analito são adicionadas na amostra (ANVISA, 2017).

2.5.7 Limite de detecção

O limite de detecção é definido como a concentração mais baixa na qual o instrumento é capaz de detectar, mas não quantificar, e a relação ruído-sinal para o limite de detecção deve ser 1:3 (STAUFFER, 2018).

O Limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado (ANVISA, 2017).

2.5.8 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é definido como a concentração mais baixa na qual o instrumento é capaz de detectar e quantificar. A relação ruído-sinal para o limite de quantificação deve ser 1:10 (STAUFFER, 2018).

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017).

3 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, Anna; CHAKRABORTY, Paromita. A review on sources and health impacts of bisphenol A. **Reviews on environmental health**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 201–210, 2020.

ÁLVAREZ-MUÑOZ, D; RODRIGUEZ-MOZAZ, S; MAULVAULT, A. L; TEDIOSI, A; FERNÁNDEZ-TEJEDOR, M; VAN DEN HEUVEL, F; KOTTERAN, M; MARQUES, A; BARCELÓ, D. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. **Environmental research**, [s. l.], v. 143, n. Pt B, p. 56–64, 2015.

ARNOT, Jon A.; GOBAS, Frank Apc. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. **Environmental Reviews**. [S. l.: s. n.], v. 14 n. 4, p. 257–297, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/a06-005>

ASIMAKOPOULOS, Alexandros G; BLETSOU, Anna A; THOMAIDIS, Nikolaos S. Emerging contaminants: A tutorial mini-review. **Global Nest Journal**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 72–79, 2012.

ÁVILA-SIMAS, Sunshine; MORATO, Marcelo, M; REYNALTE-TATAJE, David, A; SILVEIRA, Hector, B; ZANIBONI-FILHO, Evoy; NORMEY-RICO, Julio, E. Model-based predictive control for the regulation of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). **Ecological Modelling**. [S. l.], v. 406, p. 84-97, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2019.05.010>

BOLZ, U.; HAGENMAIER, H.; KÖRNER, W. Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany. **Environmental Pollution**. v. 115, n. 2, p. 291-301, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(01\)00100-2](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(01)00100-2)

BURKHARD, Lawrence P. Evaluation of published bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) data for per- and polyfluoroalkyl substances across aquatic species. **Environmental Toxicology and Chemistry**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.5010>

CERKVENIK-FLAJS, V; VAHL, Volmajer, J; GOMBAC, M; SVARA, T. Analysis and testing of bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether and their derivatives in canned dog foods. **European Food Research and Technology**. [S. l.: s. n.] v. 244, p. 43-56, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2930-2>

CHEN, Da; KANNAN, Kurunthachalam; TAN, Hongli; ZHENG; Zhengui; FENG, Yong-Lai; WO, Yan; WIDELKA, Margaret. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. **Environmental science & technology**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 5438–5453, 2016.

DAI, Fei; STRATTON, Gunnar, R; BELLONA, Christopher, L; HOLSEN, Thomas, M; CRIMMINS, Bernard, S; XIA, Xiaoyan; THAGARD, Selma, M. Experimental and density functional theoretical study of the effects of Fenton's reaction on the degradation of Bisphenol A in a high voltage plasma reactor. **Journal of Hazardous Materials** [S. l.: s. n.], v. 308; p. 419-429, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.068>

DO AMARAL, Queila, D, F; ROSA, Emanoeli; WRONSKI, Julia, G; ZURAVSKI, L; QUEROL, Marcus, V. M; ANJOS, Bruno; ANDRADE, Carlos, F, F; MACHADO, Michel, M; OLIVEIRA, Luis, F, S. Golden mussel (*Limnoperna fortunei*) as a bioindicator in aquatic environments contaminated with mercury: Cytotoxic and genotoxic aspects. **The Science of the total**

environment, [s. l.], v. 675, p. 343–353, 2019.

EL HAJ, Yasmin; BOHN, Sofia; SOUZA, Marta Marques. Tolerance of native and invasive bivalves under herbicide and metal contamination: an ex vivo approach. **Environmental science and pollution research international**, [s. l.], v. 26, n. 30, p. 31198–31206, 2019.

FRANKOWSKI, Robert ZGOLA-GRZESKOWIAK, Agnieszka; SMULEK, Wojciech; GRZESKOWIAK, Tomasz. Removal of Bisphenol A and Its Potential Substitutes by Biodegradation. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s. l.], v. 191, n. 3, p. 1100–1110, 2020.

GATIDOU, Georgia; VASSALOU, Eleftheria; THOMAIDIS, Nikolaos S. Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. **Marine pollution bulletin**, [s. l.], v. 60, n. 11, p. 2111–2116, 2010.

GBD 2015 RISK FACTORS COLLABORATORS. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10053, p. 1659–1724, 2016.

GHAZALI, Farhana Mohamed; JOHARI, Wan Lutfi Wan. The occurrence and analysis of bisphenol A (BPA) in environmental samples – a review. **Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 30–38, 2015.

GNATYSHYNA, Lesya; FALFUSHYNSKA, Halina; HORYN, Oksana; KHOMA, Vira; MARTINYUK, Viktoria; MISHCHUK, Olena; MISHCHUK, Natalia; STOLIAR, Oksana. Biochemical responses of freshwater mussel *Unio tumidus* to titanium oxide nanoparticles, Bisphenol A, and their combination. **Ecotoxicology**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 923–937, 2019.

GAVRILESCU, Maria; DEMNEVORÁ, Keterina; AAMAND, Jens; AGATHOS, Spiro; FAVA, Fabio. EMERGING POLLUTANTS IN THE ENVIRONMENT: PRESENT AND FUTURE CHALLENGES IN BIOMONITORING, ECOLOGICAL RISKS AND BIOREMEDIATION. **New biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 147–156, 2015.

HÉLIÈS-TOUSSAINT, Cécile; PEYRE, Ludovic; COSTANZO, Claudia; CHAGNON, Marie-Christine; RAHMANI, Roger. Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? An in vitro study. **Toxicology and Applied Pharmacology**. [S. l.: s. n.], v. 208, p. 224-223, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.025>

HERNÁNDEZ, Félix; SANCHO, Juan, V. IBÁÑEZ, María; GUERRERO, Carlos. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**[S. l.: s. n.], v. 26, n. 6. p 466-485, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.012>

IM, Jeongdae; LÖFFLER, Frank E. Fate of Bisphenol A in Terrestrial and Aquatic Environments. **Environmental science & technology**, [s. l.], v. 50, n. 16, p. 8403–8416, 2016.

JIMÉNEZ-DÍAZ, I; ZAFRA-GÓMEZ, A; NAVEA, N; NAVALÓN, A; FERNANDEZ, M, F; OLEA, N; VÍLCHEZ, J, L. Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, [s. l.], v. 878, n. 32, p. 3363–3369, 2010.

JOHNSON, Andrew C.DONNACHIE, Rachel; SUMPTER, John, P; JÜRGES, Monika; MOECKEL, Claudia; PEREIRA, Gloria, M. An alternative approach to risk rank chemicals on

the threat they pose to the aquatic environment. **The Science of the total environment**, [s. l.], v. 599-600, p. 1372–1381, 2017.

JUHEL, Guillaume, BAYEN, Stephane; GOH, Christine; LEE, Wei, K; KELLY, Barry, C. Use of a suite of biomarkers to assess the effects of carbamazepine, bisphenol A, atrazine, and their mixtures on green mussels, *Perna viridis*. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 429–441, 2017.

KARATAYEV, Alexander Y; PADILLA, Dianna, K; MINCHIN, Dan; BOLTOVSKY, Demetrio; BURLAKOVA; Lyubov E..Changes in Global Economies and Trade: the Potential Spread of Exotic Freshwater Bivalves. **Biological Invasions**. [S. l.: s. n.], V. 9, p. 161–180, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10530-006-9013-9>

KING, C. K; DOWSE, M, C; SIMPSON, S, L; JOLLEY, D, F. An assessment of five Australian polychaetes and bivalves for use in whole-sediment toxicity tests: toxicity and accumulation of copper and zinc from water and sediment. **Archives of environmental contamination and toxicology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 314–323, 2004.

KOCAMAN, Emel; OZHAN, Koray. Degradation of Bisphenol A in Natural and Artificial Marine and Freshwaters in Turkey. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**[S. l.: s. n.], V. 103, p. 496–500, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02680-4>

KOVACIC, Peter. How safe is bisphenol A? Fundamentals of toxicity: Metabolism, electron transfer and oxidative stress. **Medical Hypotheses**. [S. l.: s. n.], V. 75, n. 1, p1-4, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2010.03.002>

LANÇAS, Fernando Mauro. Validação de métodos cromatográficos de análise. **Química Nova** [S. l.: s. n.], v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2004.

LANDRIGAN, Philip J. FULLER, Richard, ACOSTA, Nereus, J, R; ADEYI, Olusoji; ARNOLD, Robert, BASU, Niladri (Nil); BALDÉ, Abdoulaye, B; BERTOLLINI, Roberto; BOSE-O'REILLY, Stephan; BOUFFORD, Jo, I; BREYSSE, Patrick, N; CHILES, Thomas; MAHIDOL, Chulabhorn; COLL-SECK, Awa, M; CROPPER, Maureen, L; FIBIL, Julius; FUSTER, Valentin; GREENSTONE, Michael; HAINES, Andy; HANRAHAN, David; HUNTER, David; KHARE, Mukesh; KRUPNICK, Alan; LANPHEAR, Bruce; LOHANI, Bindu; MARTIN, Keith; MATHIASSEN, Karen, V; MC TEER, Maureen, A; MURRAY, Christopher, J, L; NDAHIMANANJARA, Johanita, D; PEREIRA, Frederica; POTOČNIK, Janez; PREKER, Alexander, S; RAMESH, Jairam; ROCKSTRÖM, Johan; SALINAS, Carlos; SAMSON, Leona, D; SANDILYA, Karti; SLY, Peter, D; SMITH, Kirk, R; STEINER, Achim; STEWART, Richard, B; SUK, William, A; VAN SCHAYCK, Onno, C, P; YADAMA, Gautam, N; YUMKELLA, Kandeh; ZHONG, Ma. The Lancet Commission on pollution and health. **The Lancet**, [s. l.], v. 391, n. 10119, p. 462–512, 2018.

MANSUR, Mcd; RICHINITTI, Lmz; SANTOS, C. P. dos. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 147–149, 1999.

MATTA, Marcia, H, R; PEREIRA, Alecsandra, L; MONTAGNER, Émerson; FORTUNATO, Guilherme, v. Determinação de bisfenol A (BFA) em água mineral por meio de CG/DCE - uma nova proposta de metodologia para análise. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 624–629, 2012.

MCGEER, James C; BRIX, Kevin, V; SKEAFF, James, M; DEFOREST, David, K; BRIGHAM, Sarah, I; ADAMS, William, J; GREEN, Andrew. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for

hazard assessment of metals in the aquatic environment. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 1017–1037, 2003.

MCLACHLAN, J. A. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. **Endocrine reviews**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 319–341, 2001.

MENDY, Angelico; SALO, Päivi, M; WILKERSON, Jesse; FEINSTEIN, Lydia; FERGUSON, Kelly, K; PETER, Thorne, S; ZELDIN, Darryl, C. Association of urinary levels of bisphenols F and S used as bisphenol A substitutes with asthma and hay fever outcomes. **Environmental research**, [s. l.], v. 183, p. 108944, 2020.

MICHAŁOWICZ, Jaromir. Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. **Environmental toxicology and pharmacology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 738–758, 2014.

MILLIGAN, S. R.; BALASUBRAMANIAN, A. V.; KALITA, J. C. **Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute in vivo mammalian assay**. [S. l.: s. n.], 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.9810623>

MOLINE, Jacqueline. M; GOLDEN, Anne, L; BAR-CHAMA, Natan; SMITH, Ernest; RAUCH, Molly, E; CHAPIN, Robert, E; PERREAULT, Sally, D; SCHRADER, Steven, M; SUK, William, A; LANDRIGAN, Philip J. Exposure to hazardous substances and male reproductive health: a research framework. **Environmental health perspectives**, [s. l.], v. 108, n. 9, p. 803–813, 2000.

NAMIESNIK, Jacek; MOCHEVA, Snejana; PARK, Yong-Seo; HAM, Kyung-Sik; HEO, Buk-Gu; TASHMA, Zeev; KATRICH, Elena; GORINSTEIN, Shela. Concentration of bioactive compounds in mussels *Mytilus galloprovincialis* as an indicator of pollution. **Chemosphere**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 938–944, 2008.

OEHLMANN, Jörg; SCHULTE-OEHLMANN, Ulrike; KLOAS, Werner; JAGNYTSCH, Oana; LUTZ, Ilka; KUSK, Kresten, O; WOLLENBERGER, Leah; SANTOS, Eduarda, M; PAULL, Gregory, C; VAN LOOK, Katrien, J, W; TYLER, Charles, R. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, [s. l.], v. 364, n. 1526, p. 2047–2062, 2009.

OMAR, Tuan Fauzan Tuan; ARIS, Ahmad Zaharin; YUSOFF, Fatimah Md. Multiclass analysis of emerging organic contaminants in tropical marine biota using improved QuEChERS extraction followed by LC MS/MS. **Microchemical Journal**. [S. l.: s. n.], V. 164, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106063>

OZHAN, Koray; KOCAMAN, Emel. Temporal and Spatial Distributions of Bisphenol A in Marine and Freshwaters in Turkey. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. [S. l.: s. n.], v. 76, p. 246-254, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00244-018-00594-6>

QIU, Wenhui *et al.* The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. **Ecotoxicology and environmental safety**, [s. l.], v. 173, p. 192–202, 2019.

RAO, Tentu Nageswara. Validation of Analytical Methods. **Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.72087>

RIBEIRO, Fabiana A, L; FERREIRA, Márcia, M, C; MORANO, Sandra, C; SILVA, Lucimara, R; SCHNEIDER, René, P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**. [S. l.: s. n.], v. 31,

n. 1; 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000100029>

ROCHA, Carlos, A, M; SANTOS, Raquel, A; BAHIA, Marcelo, O; CUNHA, Lorena, A; RIBEIRO, Helem, F; BURBANO, Mario, R. The Micronucleus Assay in Fish Species as an Important Tool for Xenobiotic Exposure Risk Assessment—A Brief Review and an Example Using Neotropical Fish Exposed To Methylmercury. **Reviews in Fisheries Science**. [S. l.: s. n.], v. 17, n. 4, p. 478–484, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10641260903067852>

ROCHESTER, Johanna R.; BOLDEN, Ashley L. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. **Environ Health Perspect**. [S. l.: s. n.], v. 123, n. 7, p. 643–650, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N; TURNES-CAROU, I; VIÑAS, L; BESADA, V; MUNIATEHUI-LORENZO, S; LÓPEZ-MAHÍA, P; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Occurrence of alkylphenols and bisphenol A in wild mussel samples from the Spanish Atlantic coast and Bay of Biscay. **Marine Pollution Bulletin**. [S. l.: s. n.], v. 106, n. 1, p. 360-365, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.003>

STAPLES, Charles A; DORN, P, B; KLECKA, G, M; O'BLOCK, S, T; HARRIS, L, R. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. **Chemosphere**. [S. l.: s. n.], V. 36, N. 10, P.2149-2173, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(97\)10133-3](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(97)10133-3)

STAUFFER, Mark. **Calibration and Validation of Analytical Methods: A Sampling of Current Approaches**. [S. l.]: BoD – Books on Demand, 2018.

USMAN, Afia; AHMAD, Masood. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? **Chemosphere**, [s. l.], v. 158, p. 131–142, 2016.

VIDAL-LIÑÁN, Leticia; BELLAS, Juan; SORIANO, José, A; CONCHA-GRAÑA, Estefanía; MUNIATEGUI, Soledad; BEIRAS, Ricardo. Bioaccumulation of PCB-153 and effects on molecular biomarkers acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase in *Mytilus galloprovincialis* mussels. **Environmental pollution**, [s. l.], v. 214, p. 885–891, 2016.

WEST, Donald M. SKOOG, Douglas, A; JAMES, Holler, F. **Fundamentos de química analítica**. [S. l.: s. n.], 2006.

ZABOROWSKA, Magdalena; WYSZKOWSKA, Jadwiga; BOROWIK, Agata. Soil Microbiome Response to Contamination with Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21103529>

ZAMBONIN, Carlo; ARESTA, Antonella. Recent Applications of Solid Phase Microextraction Coupled to Liquid Chromatography. **Separations Technology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 34, 2021.

4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E/OU TECNOLÓGICA

Engenharia Sanitária e Ambiental

engenharia sanitária e ambiental


Método de baixo custo para extração de Bisfenol-A no mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) para análise ambiental

Journal:	<i>Engenharia Sanitária e Ambiental</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Technical Article
Keyword:	environmental analysis, chromatography, HPLC, mussel

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/esa-scielo>

ScholarOne Manuscripts™ Bernardo Vaz ▾ English (US) ▾ Instructions & Forms Help

 Engenharia Sanitária e Ambiental

[# Home](#) [/ Author](#)

[Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to	Engenharia Sanitária e Ambiental
Manuscript ID	ESA-2021-0064
Title	Método de baixo custo para extração de Bisteno-A no mexilhão dourado (<i>Limnoperna fortunei</i>) para análise ambiental
Authors	Pereira, Suzana Vaz, Bernardo
Date Submitted	05-Mar-2021

[Author ID](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Método de baixo custo para extração de Bisfenol-A no mexilhão
2 dourado (*Limnoperna fortunei*) para análise ambiental

4 Low-cost method for the extraction of Bisphenol-A in golden
5 mussel (*Limnoperna fortunei*) for environmental analysis

7 **Resumo**

8 O Bisfenol-A (BPA) é um desregulador endócrino de fraca atividade estrogênica, utilizado
9 em inúmeros produtos de consumo. Classificado em micropoluinte, pode ser encontrado
10 em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia analítica de
11 baixo custo para identificar e quantificar o BPA em tecidos de mexilhão dourado. Foi
12 utilizado um método de pré-concentração por liofilização, seguido de extração por
13 solvente (metanol 80% + água 20%) sob sonicação. Os extratos foram quantificados por
14 cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Diferentes métodos de secagem de
15 amostra foram testados: fluxo de nitrogênio, forno de laboratório a 40° C e dessecador de
16 vidro com sílica gel. O objetivo das diferentes metodologias de secagem foi a redução de
17 custos, sendo que o dessecador de vidro foi escolhido por apresentar uma recuperação
18 eficiente com menores custos de manutenção. Os limites de detecção e quantificação
19 foram 0,0023 µg / mL e 0,0465 µg / mL respectivamente para o BPA. O BPA detectado
20 nas amostras de mexilhão dourado foi de 0,8365 µg / mL. O método desenvolvido é uma
21 extração sólido-líquido ecologicamente correta e de baixo custo.

23 **Abstract**

24 Bisphenol-A (BPA) is an endocrine disruptor that has weak estrogenic activity, used in
25 countless consumer products. Classified in micropollutant, it can be found all over the
26 world. The objective of this study was to develop a low-cost analytical methodology to
27 identify and quantify BPA in golden mussel tissues. A method for pre-concentration using
28 lyophilization, followed by a solvent extraction (methanol 80% + water 20%) under
29 sonication was used. The extracts was quantification using a high performance liquid
30 chromatography (HPLC). Different drying sample methods were tested: nitrogen flow,
31 laboratory oven at 40° C and glass desiccator with silica gel. The objective for different

1
2
3
4
5 32 drying methodologies was to reduce costs; the glass desiccator was chosen because it
6 33 showed an efficient recovery with lower maintenance costs. The detection and
7
8 34 quantification limits were 0,0023 µg/mL and 0,0465 µg/mL respectively for the BPA. The
9
10 35 BPA detected in the golden mussel samples was 0,8365 µg/mL. The method developed is
11
12 36 an environmentally friendly solid-liquid extraction with low cost.
13

14
15 38 **Palavras-chave:** análise ambiental, cromatografia, HPLC, desreguladores endócrinos,
16
17 39 mexilhão, poluentes orgânicos

18
19 40 **Keywords:** environmental analysis, chromatography, HPLC, endocrine disruptors, mussel,
20
21 41 organic pollutants

22
23 42 **Título resumido:** Método de extração de BPA no mexilhão dourado
24

25 44 **Introdução**

26
27 45 O Bisfenol-A (2,2 bis(4-hydroxyphenyl)propane) ou BPA é um composto químico
28
29 46 plastificante com propriedades de desregulação endócrina que pode ser encontrado em
30
31 47 todo o mundo, é um dos produtos sintético mais importantes com produção em larga escala
32
33 48 desde a década de 1960 (STAPLES et al., 1998). Devido à sua estrutura molecular
34
35 49 fenólica, o BPA é capaz de interagir com os receptores de estrogênio e, portanto, pode
36
37 50 exercer ações estrogênicas (KONIECZNA; RUTKOWSKA; RACHOŃ, 2015).

38
39 51 As implicações perigosas da presença do BPA não se limitam apenas aos humanos.
40
41 52 Especialmente, a homeostase dos ecossistemas aquáticos pode ser interrompida de várias
42
43 53 maneiras, como feminilização de muitas espécies de vida selvagem ou alternâncias de
44
45 54 desenvolvimento e comportamentais (BHANDARI et al., 2015).

46
47 55 Devido aos altos volumes de produção e descarte de produtos sintetizados a partir
48
49 56 de BPA como, plástico de policarbonato, resinas epóxi, retardante de chamas e outros
50
51 57 produtos, este tem sido amplamente detectado no ambiente (BOLZ; HAGENMAIER;
52
53 58 KÖRNER, 2001). As descargas de águas residuais e detritos plásticos representam as
54
55 59 principais vias de contaminação dos ambientes aquáticos (PHILBERT et al., 2008; IM;
56
57 60 LÖFFLER, 2016; ARAKAWA, 2020).

58
59 61 A incorporação nas teias alimentares e a contaminação dos ecossistemas por BPA
60
61 62 vem chamando a atenção da comunidade científica devido à sua capacidade de provocar
62
63 63 interferência na fisiologia do crescimento, acúmulo de lipídeos, reprodução, no sistema
64
65 64 endócrino, induzindo o hipotireoidismo em mamíferos (ZAFRA-GÓMEZ et al., 2008;

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

65 AHMED; WALAA; ASMAA, 2018). O BPA possui propriedades estrogênicas fracas,
66 presente em concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou ng.L^{-1} , sendo considerado
67 micropolvente (OEHLMANN et al., 2009).

68 Uma desafio no monitoramento de poluentes como o BPA em matriz biológica é a
69 dificuldade de encontrar métodos analíticos confiáveis devido às baixas concentrações
70 presentes no ambiente e nas matrizes. Existem muitos métodos analíticos sensíveis e
71 seletivos para a determinação de micropoluentes orgânicos, como a cromatografia gasosa
72 ou a cromatografia líquida, estes métodos estão entre os mais utilizados na separação,
73 identificação e quantificação (GIBSON et al., 2007). No entanto, existem dificuldades
74 particulares no caso dos plastificantes pois muitos insumos são constituídos destes
75 materiais como seringas, filtros, pipetas etc. Não obstante, especialmente devido aos níveis
76 traços desses poluentes no meio ambiente, um grande número de procedimentos de
77 extração são necessários para a sua determinação.

78 Nesse contexto, neste estudo é proposto procedimentos analíticos para desenvolver
79 uma metodologia simples e de baixo custo e ambientalmente amigável para a extração e
80 determinação do BPA no mexilhão dourado *Limnoperna fortunei*. Esse método foi
81 baseado na aplicação de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um sistema
82 composto por Detector de Arranjo de Diodo (DAD) e extração sólido-líquido assistida por
83 ultrassom na determinação do BPA na matriz biológica.

84 85 **Metodologia**

86 **Materiais e padrões**

87 O padrão analítico de BPA 99% (C₁₅H₁₆O₂) (CAS 80-05-7) adquirido da Sigma-
88 Aldrich (St. Louis, MO, USA). O metanol foi previamente destilado (CH₃OH) (CAS
89 6756-1) grau HPLC. Acetonitrila grau HPLC (CH₃CN), MERCK (CAS 75-05-8). Todos
90 os reagentes utilizados eram de qualidade analítica e todas as soluções aquosas e água para
91 lavagem dos materiais foram preparadas usando água desionizada e duplamente destilada
92 em aparato de vidro.

93 **Limpeza do material e preparo de amostra isenta de contaminação por BPA**

94 O material utilizado foi lavado com solução contendo extran 1% (MA-02-neutro,
95 Merck) e enxaguado com água [água ultrapura (sistema Milli-Q, Micropore) destilada em
96 vidro. A secagem foi realizada em estufa a 100°C (vidraria não volumétrica) e mufla a
97 250°C (material de cerâmica e metal), o material foi novamente enxaguado com metanol

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

98 destilado para remoção de possíveis traços de matéria orgânica e BPA e secos novamente
99 nas mesmas temperaturas. Todos os plásticos utilizados (ependorfs, tubos cônicos,
100 ponteiros de pipetas) eram de polipropileno de alta qualidade para evitar a contaminação
101 das amostras por BPA. Anteriormente ao processo de limpeza a água e os solventes
102 continham resquícios de BPA e após o processo a água e todos os solventes foram testados
103 no HPLC para assegurar a ausência de BPA.

104 **Coleta e armazenamento do mexilhão dourado**

105 Os mexilhões foram coletados no arroio Pelotas (31°45'37.9"S 52°16'29.9"W)
106 localizado na zona urbana do município de Pelotas, estado do Rio Grande do Sul, Brasil,
107 no mês de outubro de 2017. Todos os procedimentos realizados nas coletas foram
108 realizados com precauções destinadas a minimizar o risco de contaminação da amostra
109 com BPA. As amostras foram acondicionadas e transportadas em frascos de vidros com
110 tampa de alumínio, abrigadas da luz. No laboratório as amostras foram congeladas para
111 armazenamento.

112 Os mexilhões congelados inteiros foram colocados em frascos descontaminados e
113 estes colocados no liofilizador por 24h e após foram armazenados em frascos de vidros
114 cobertos com papel alumínio para serem abrigados da luz e armazenados a -10°C.

115 **Preparação das amostras**

116 A etapa de preparação das amostras foi conduzida com precauções para não ocorrer
117 a contaminação. Para extrair os analitos das amostras de mexilhão, o seguinte método de
118 extração líquido-líquido foi usado. Foram separados 100 mg de tecidos moles e macerados
119 para a extração do analito de interesse. Após a maceração foram adicionados 5 ml do
120 solvente de extração (80% metanol com 20% de água). Amostras foram transferidas para
121 tubos cônicos de 15mL, que foram agitados em vortex por 2 minutos e foram sonicados
122 em temperatura ambiente por 60 minutos.

123 Após sair do banho ultrassônico as amostras foram filtradas com funil de Buchner
124 (50ml) com placa porosa e membrana de acetato de celulose (diâmetro 47mm, poro
125 0,45µm), com auxílio de uma bomba de vácuo (Pro-Tools modelo 131) e kitasato.
126 Posteriormente as amostras foram transferidas para microtubos de 2mL e secas. Em
127 seguida adicionou-se 500 µL de metanol e então as amostras foram para a centrifuga mini
128 spin por 10 minutos, após 100 µL do sobrenadante foi transferido para vials de âmbar para
129 a leitura no HPLC.

130 **Testes de secagem para a concentração**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

131 Foi preparado uma solução estoque de BPA $2,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o preparo de uma
132 solução padrão de $9 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para serem realizados testes de secagem e serem observadas
133 possíveis perdas do analito durante a secagem. O solvente utilizado foi metanol e água
134 (80:20%). Foram colocados em vials âmbar 1,5 ml da solução e posteriormente foram
135 secos através dos seguintes métodos: 1 - dessecador de vidro com sílica submetido a
136 vácuo; 2 - estufa a 40°C ; 3 - sob fluxo de nitrogênio. Após a secagem foi adicionado $500 \text{ } \mu\text{L}$
137 de metanol para serem realizadas às análises no HPLC. Cada teste de secagem foi
138 realizado em triplicata.

139 Instrumentação e condições do HPLC

140 As análises de HPLC foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta
141 Eficiência Agilent 1260 Infinity, sistema composto por Detector de Arranjo de Diodo
142 (DAD) [modelo G1315D]; speaker housing [modelo G1316A]; injetor automático [modelo
143 G1329B]; bomba quaternária [modelo G1311C]. A coluna analítica usada foi Phenomenex
144 Kinetex Core-Shell C18 100A ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$). A fase móvel foi composta por água
145 (A) e acetonitrila (B) em modo gradiente (15 minutos A:B 80:20%, 10 minutos A:B
146 50:50%, 10 minutos B 100%, 10 minutos A:B 80:20%). O tempo total de corrida foi de 45
147 minutos para cada amostra, com um fluxo de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$, a temperatura da
148 coluna foi de 24°C e o volume de injeção foi de $10 \text{ } \mu\text{L}$. A detecção foi feita utilizando o
149 comprimento de onda de 220 nm .

150 O coeficiente de correlação linear (r) foi construído através da curva de
151 calibração do BPA ($0,5, 1, 2, 4$ e $8 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi preparada, a partir do padrão que foi
152 pesado em balança analítica e diluído em metanol para o preparo de soluções estoque de 5
153 mg.mL^{-1} . O limite de detecção e quantificação do BPA foram obtidos pela relação sinal
154 /ruído 3:1 e 10:1, respectivamente.

155 A identificação do BPA foi realizada através da identificação, mais convincente,
156 do espectro do analito e pelo tempo de retenção. A quantificação foi realizada pelo método
157 da curva de calibração padrão, construída por regressão linear da razão das áreas do pico
158 do padrão e do padrão interno em relação à concentração do padrão. Foram feitas
159 triplicatas do padrão de calibração e amostras de BPA extraído dos mexilhões.

160 Teste de controle em branco

161 O teste de controle do branco foi realizado em todas etapas experimentais para
162 excluir as interferências do processo de amostragem para detecção do analito. Para o
163 branco, houve o processamento dos solventes, seguindo exatamente os procedimentos de

1
2
3
4 164 preparação da amostra. Não foi detectado analito no procedimento.
5
6 165

166 **Resultados e Discussões**

167 **Estudos preliminares: Resultado do teste de limpeza**

168 Um dos maiores problemas enfrentados quando se trabalha com um composto de
169 distribuição universal, com o BPA, é obter uma amostra padronizada e isenta de
170 contaminação (CERKVENIK-FLAJS, 2020). Existe uma escassez de metodologias
171 padronizadas detalhadas sobre a rotina de limpeza de vidrarias para análise de BPA, sendo
172 o composto frequentemente afetado pela contaminação do branco (SALGUEIRO-
173 GONZÁLEZ et al., 2012). Para o preparo dos padrões e das amostras, vários métodos e
174 materiais isentos de BPA foram utilizados, a saber:

175 Materiais: optou-se por utilizar materiais de vidro, cerâmica e de inox por serem
176 naturalmente isentos de BPA e por serem resistentes à altas temperaturas e à solventes
177 orgânicos, que foram utilizados para limpeza de material. No entanto, parte da técnica de
178 extração desenvolvida neste trabalho necessita de centrifugação. Foi realizada uma
179 pesquisa de mercado para descobrir se algum fabricante de tubos cônicos era isento de
180 BPA. Apenas a Eppendorf®, marca alemã de produtos de laboratório, possuía tais produtos
181 à venda no Brasil e comprovado cientificamente que são isentos de BPA ([CSL STYLE
182 ERROR: reference with no printed form.]), (GATIMEL et al., 2016).

183 A análise dos brancos indica que os protocolos de limpeza de material e destilação
184 de água e reagentes foram eficientes para o BPA.

185 Vários autores relatam as dificuldades metodológicas na obtenção de amostras
186 isentas de BPA (SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al., 2012; CERKVENIK-FLAJS, 2020). O
187 problema com septos de frasco de HPLC contaminados foi corrigido com o uso adicional
188 de materiais de septos quimicamente inertes, por exemplo, silicone/PTFE (CERKVENIK-
189 FLAJS, 2020).

190 Protocolos, pré-teste e triagem regular dos consumíveis de laboratório usados é, portanto,
191 aconselhável para confirmar a ausência de BPA (CERKVENIK-FLAJS, 2020).

192 **Resultado da liofilização: quanto de material úmido virou seco**

193 O uso dos mexilhões frescos necessita de uma maior demanda de trabalho quando
194 comparado aos mexilhões liofilizados. Os mexilhões frescos precisam ser limpos
195 externamente, a abertura das valvas e remoção dos tecidos moles é mais difícil e demorada
196 do que quando comparado aos mexilhões liofilizados. Em média, os tecidos moles dos

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

197 mexilhões são compostos por 83% água, 9% proteínas, 4% carboidratos, 2% cinzas e 1%
198 lipídios (Furlan et al. 2011). A liofilização torna a maceração e homogeneização mais
199 fácil, possibilitando processamento de maiores quantidades de tecidos, pois já atua como
200 um método de pré concentração da amostra (RAJASÄRKKÄ; VIRTÄ, 2013), e é possível
201 obter valores satisfatórios de recuperação (MARTÍNEZ-MORAL; TENA, 2011), sendo
202 uma técnica já utilizada em análises cromatográficas na determinação de vários compostos
203 orgânicos em leite materno (RODRÍGUEZ-GÓMEZ et al., 2014), BPA no zooplâncton,
204 esterco de aves, Pepino-do-mar-comum (*Holothuria tubulosa*) e sedimento marinho
205 (RODRÍGUEZ-GÓMEZ et al., 2014; STANISZEWSKA; NEHRING; MUDRAK-CEGIOŁKA,
206 2016; MARTÍN et al., 2017; AZNAR et al., 2018). A liofilização reduziu em mais de 80% o
207 volume da amostra a ser processada.

208 Resultado do teste de secagem

209 Um dos métodos mais empregado para a secagem de amostras de BPA é sob o
210 fluxo de nitrogênio (N_2) (ARAR; ALAWI, 2019; CERKVENIK-FLAJS, 2020; GUO et al.,
211 2020; HERRERO et al., 2021; DE LEO et al., 2021; TRAN et al., 2021). Em nossos
212 experimentos, para a secagem de 4,5 mL do recipiente de três vials com metanol e água
213 (80:20%) foi utilizado um cilindro de 10 L de N_2 de alta pureza (99,99%), que atualmente
214 custa em torno de R\$ 900,00, já o gás com pureza industrial (99,8%) custa em torno
215 de R\$ 200,00

216 Devido ao alto custo e grande demanda de gás de N_2 para a concentração e
217 secagem das amostras foi investigado outros métodos que possibilitaram a concentração e
218 secagem das amostras sem que as mesmas sejam contaminadas ou que sofram perdas do
219 analito com o objetivo de reduzir custos.

220 Os resultados dos testes de secagem (N_2 , dessecador e estufa) estão na tabela 1. De
221 acordo com os dados obtidos não houve perda de analito durante as secagens. As amostras
222 secas sob fluxo de nitrogênio são colocadas individualmente e exigem o monitoramento do
223 cilindro para o controle do gás e possíveis substituições, com tempo de secagem médio de
224 6 horas para cada vial, para a secagem de 4,5 mL do recipiente de três vials foi utilizado
225 um cilindro de 10 L de N_2 . A utilização da estufa para a secagem de amostras foi
226 considerada a técnica mais demorada (53 horas), que pode ocasionar contaminações extras
227 devido ao longo tempo de exposição do material para a secagem completa. Amostras no
228 dessecador secaram em 2 dias (48 horas) e foram as que exigiam menor manuseio durante
229 o período de secagem sendo este o método eleito o melhor pois não houve grande variação

230 em comparação ao controle (tabela 1).

231 Após os testes de secagem optou-se por utilizar o dessecador para a secagem e
232 concentração das amostras devido aos baixos custos de manutenção e eficiente
233 recuperação.

234 **Tabela 1:** Testes de secagem para observar possíveis perdas de BPA.

Amostras	Recuperação (%)	%RSD
Controle	100	0,77
N2	106,12	1,62
Dessecador	106,18	1,08
Estufa 40° C	112,9	11,05

235

236 **Desempenho analítico**

237 *Linearidade*

238 Para a construção da curva analítica (figura 1) as concentrações variaram entre 0,5;
239 1; 2; 4; e 8 µg/mL. A curva de calibração foi construída plotando as áreas de pico (Y)
240 contra as concentrações (X) para o analito. A relação linear foi demonstrada entre a área
241 do pico e a concentração padrão do BPA. A linha de regressão da execução da calibração
242 foi descrita por $Y = 64,3 X + 17,8$ ($r^2 = 0,994$) para o BPA. O coeficiente de correlação
243 linear atende ao estabelecido pela Anvisa que deve ser igual ou superior a 0,99 (ANVISA,
244 2017), demonstrando que as faixas de concentração indicam um método linear e pode ser
245 utilizado para a quantificação de amostras.

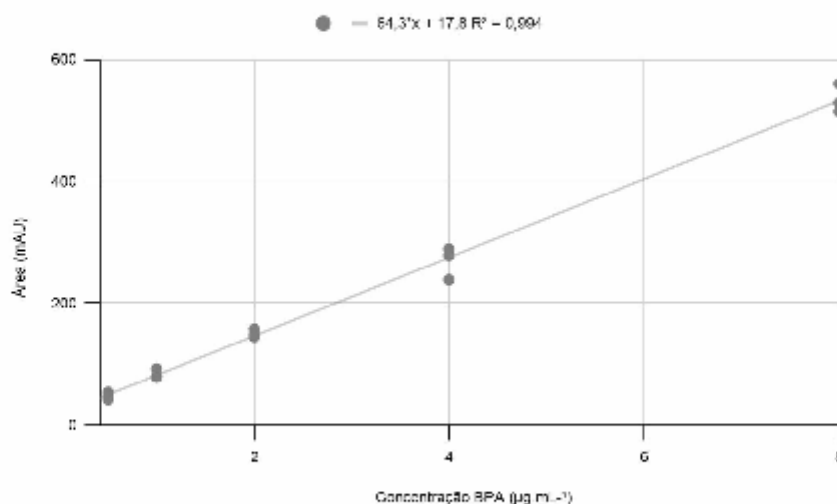


Figura 1: Curva de calibração do BPA

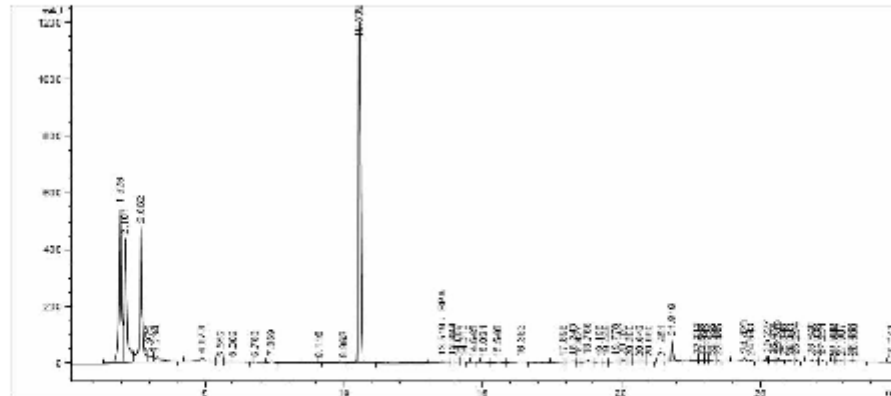
Sensibilidade

A sensibilidade do método é demonstrada através dos limites de detecção e quantificação. O limite de detecção é a menor concentração do analito identificada no branco, já o limite de quantificação é a menor concentração quantificável com confiança do analito. O limite de detecção foi de 0,0023 µg/mL e o limite de quantificação foi 0,0465 µg/mL razão sinal-ruído para o BPA.

Quantificação de BPA nos tecidos do mexilhão dourado

O método desenvolvido foi aplicado nos tecidos moles liofilizados do mexilhão dourado coletado no ambiente. A concentração de BPA nos extratos do mexilhão (0,8365 µg/mL ± 0,0855) ficou acima do limite de quantificação (0,0465 µg/mL).

Nas figuras 2 e 3 é possível observar o cromatograma da extração do BPA (tempo: 13.519) extraído do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*). Os procedimentos adotados geraram uma recuperação média de 83,65 ng/g de mexilhão seco (8,365ng/100 mg de tecido seco). Levando em consideração que cada 100 mg de tecido seco contém 5,5 mexilhões (adultos médios ~15 mm), de acordo com os dados de extração, cada indivíduo contém em seus tecidos aproximadamente 1,5 ng de BPA.



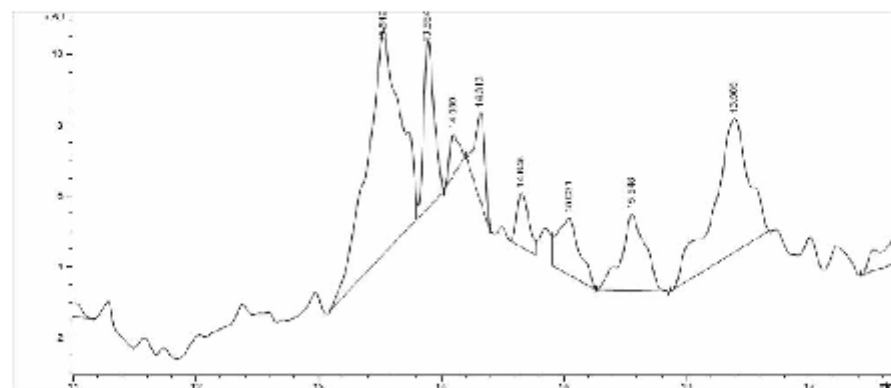
265

266 **Figura 2:** Cromatograma de amostra de BPA (tempo: 13.519) extraído da matriz biológica
 267 (*Limnoperna fortunei*). Absorbância (mAU) eixo no Y e tempo em minutos no eixo X.

268

269 O método não demonstrou seletividade entre os picos, uma vez que foram
 270 observados interferentes no tempo de retenção do analito (Figura 3). No entanto, a
 271 seletividade do método analítico pode ser demonstrada por meio da sua capacidade de
 272 identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, no caso de métodos
 273 cromatográficos, deve ser comprovada a pureza cromatográfica do analito (ANVISA,
 274 2017). O resultado encontrado foi o de elevado grau de pureza, internamente pelo
 275 cromatógrafo (999,475 de pureza). Portanto, além de detectar e identificar, foi obtido um
 276 grau de seletividade na coluna capaz de isolar o composto nas extrações de BPA nos
 277 tecidos do mexilhão.

278



279

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

280 **Figura 3:** Detalhe do cromatograma de amostra de BPA (tempo: 13.519) extraído da
281 matriz biológica (*Limmoperna fortunei*). Absorbância (mAU) eixo no Y e tempo em
282 minutos no eixo X.

283 A confirmação de resultados positivos de poluentes ambientais tornou-se motivo
284 de preocupação devido aos efeitos negativos associados a erros de identificação. Métodos
285 analíticos confiáveis com quantificação precisa dos analitos devem ser desenvolvidos, mas
286 também, o analito precisa ser inequivocamente identificado nos níveis de concentração de
287 interesse (HERNÁNDEZ et al., 2007).

288

289 **Conclusões**

290 O método de pré-concentração por liofilização seguido de extração por solvente
291 (metanol+água) e determinação por HPLC, mostrou-se adequado para a detecção e
292 quantificação de BPA nos tecidos moles do mexilhão dourado. As análises das amostras de
293 mexilhões coletados no Arroio Pelotas-RS demonstraram contaminação por BPA.

294 O desenvolvimento de metodologias rápidas, eficazes, baratas e amigáveis
295 ambientalmente para detecção e quantificação de plastificantes em tecidos e amostras
296 ambientais é importante devido aos efeitos desses poluentes que são prejudiciais à saúde
297 humana e ambiental. Os resultados dos testes são dependentes do tipo de matriz ambiental.
298 O método foi eficiente, barato e ecologicamente correto para a determinação e
299 quantificação de BPA nos tecidos do mexilhão dourado.

300

301 **Referências:**

- 302 AHMED, R. G.; WALAA, G. H.; ASMAA, F. S. Suppressive effects of neonatal
303 bisphenol A on the neuroendocrine system. *Toxicology and industrial health*, v. 34, n. 6,
304 2018. p. 397–407.
- 305 ARAKAWA, K. Simultaneous Metabarcoding of Eukaryotes and Prokaryotes to Elucidate
306 the Community Structures within Tardigrade Microhabitats. *Diversity*, v. 12(3) n. 110.
307 2020. p. 1-12.
- 308 ARAR, S.; ALAWI, M. A new solvent extraction method with gas chromatography–Mass
309 spectrometry for bisphenol a determination in canned foods. *Acta Chromatographica*,
310 2019. v. 31 n. 1. p. 71–78.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 311 AZNAR, R. ALBERTO, B. MARTIN, A. N. R. SÁNCHEZ-BRUNETE, C. Analysis of
312 emerging organic contaminants in poultry manure by gas chromatography-tandem mass
313 spectrometry. *Journal of separation science*, v. 41, n. 4, 2018. p. 940–947.
- 314 BHANDARI, R. K. DEEM, S. L. HOLLIDAY, D. K. JANDEGIAN, C. M. KASSOTIS,
315 C. D. NAGEL, S. C. TILLITT, D. E. SAAL, F. S. V. RESENFELD. C. S. Effects of the
316 environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual
317 development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *V. 14*, 2015. p. 195–219.
- 318 BOLZ, U.; HAGENMAIER, H.; KÖRNER, W. Phenolic xenoestrogens in surface water,
319 sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany.
320 *Environmental pollution*, v. 115, n. 2, 2001. p. 291–301.
- 321 CERKVENIK-FLAJS, V. Bisphenol A background contamination encountered during
322 advanced blood sampling and laboratory analysis. *International Journal of Environmental*
323 *Analytical Chemistry* 2020. p. 1–11
- 324 DE LEO, V. ; CASIELLO, M. DELUCA, G. COTUGNO, P. CATUCCI, L. NACCI, A.
325 FUSCO, C.; D'ACCOLTI, L. Concerning Synthesis of New Biobased Polycarbonates with
326 Curcumin in Replacement of Bisphenol A and Recycled Diphenyl Carbonate as Example
327 of Circular Economy. *Polymers*, v. 13, n. 3, 2021 p. 361.
- 328 FURLAN, E. F., GALVÃO, J. A., SALÁN, E. O., OETTERER, M.. Composição
329 centesimal e valor calórico de mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São
330 Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca.* , São Paulo, v. 37 n. 1. 2011, p. 85 – 93.
- 331
- 332 GATIMEL, N. LACROIX, Z. M. CHANTHAVISOUK, S. PICARD-HAGEN, N. V.
333 GAYRARD, V. PARINAUD, J. LANDRI, R. D. Bisphenol A in culture media and plastic
334 consumables used for ART. *Human reproduction*, v. 31, n. 7, 2016, p. 1436–1444.
- 335 GIBSON, R. BECCERRIL-BRAVO, E. SILVA-CASTRO, V. JIMÉNEZ, B.
336 Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in
337 wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-
338 mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, v. 1169, n. 1-2, 2007, p. 31–39.

- 1
2
3
4 339 GUO, M. HE, M. ZHONG, J. HE, Q. ISMAIL, B. B. CHEN, G. LIU, D. High-
5
6 340 performance liquid chromatography (HPLC)-fluorescence method for determination of
7
8 341 bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its derivatives in canned foods. *The Science of*
9
10 342 *the total environment*, v. 710, 2020, p. 134975.
11
12 343 HERRERO, L. QUINTANILLA-LÓPEZ, J. E. FERNANDEZ, M. A. GÓMORA, B.
13
14 344 Plasticisers and preservatives in commercial milk products: A comprehensive study on
15
16 345 packages used in the Spanish market. *Food Chemistry*, 2021. 128031p.
17
18 346 IM, J.; LÖFFLER, F. E. Fate of Bisphenol A in Terrestrial and Aquatic Environments.
19
20 347 *Environmental science & technology*, v. 50, n. 16, 2016, p. 8403–8416.
21
22 348 KONIECZNA, A.; RUTKOWSKA, A.; RACHOŃ, D. Health risk of exposure to
23
24 349 Bisphenol A (BPA). *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, v. 66, n. 1, p. 5–11, mar. de
25
26 350 2015.
27
28
29 351 MARTÍNEZ-MORAL, M. P.; TENA, M. T. Focused ultrasound solid-liquid extraction
30
31 352 and selective pressurised liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in
32
33 353 sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of separation science*,
34
35 354 v. 34, n. 18, 2011, p. 2513–2522.
36
37 355 MARTÍN, J. ZAFRA-GÓMEZ, A. IBANEZ-YUSTE, A. J. ALONZO, E. VILCHEZ, J. L.
38
39 356 Multi-residue analysis of 36 priority and emerging pollutants in marine echinoderms
40
41 357 (*Holothuria tubulosa*) and marine sediments by solid-liquid extraction followed by
42
43 358 dispersive solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry
44
45 359 analysis. *Talanta*, v. 166, 2017, p. 336–348.
46
47 360 OEHLMANN, J. et al. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on
48
49 361 wildlife. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological*
50
51 362 *sciences*, v. 364, n. 1526, 2009, p. 2047–2062.
52
53 363 PHILBERT, M. A. et al. Scientific peer-review of the draft assessment of bisphenol A for
54
55 364 use in food contact applications. jan. de 2008.
56
57 365 RAJASÄRKKÄ, J.; VIRTÄ, M. Characterization of a Bisphenol A Specific Yeast
58
59 366 Bioreporter Utilizing the Bisphenol A-Targeted Receptor. 2013. 10067–10074p.
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 367 RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R. et al. Stir-membrane solid-liquid-liquid microextraction for the
368 determination of parabens in human breast milk samples by ultra high performance liquid
369 chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, v. 1354, p.
370 26–33, ago. de 2014.
- 371 SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N. et al. Blank and sample handling troubleshooting in
372 ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem
373 mass spectrometry. 2012. 413–419p.
- 374 STANISZEWSKA, M.; NEHRING, I.; MUDRAK-CEGIOŁKA, S. Changes of
375 concentrations and possibility of accumulation of bisphenol A and alkylphenols,
376 depending on biomass and composition, in zooplankton of the Southern Baltic (Gulf of
377 Gdansk). *Environmental pollution*, v. 213, p. 489–501, jun. de 2016.
- 378 STAPLES, C. A. DORN, P. B. KLECKA, G. M. O'BLOCK, S. T. HARRIS, L. R. A
379 review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, v.
380 36, n. 10, 1998, p. 2149–2173.
- 381 TRAN, T. M. TRAN-LAM, T. T. MAI, H. H. T. BACH, L. H. T. NGUYEN, H. M. N.
382 TRINH, H. T. DANG, L. T. MINH, T. B. QUAN, T. C. HONG, A. Q. Parabens in personal
383 care products and indoor dust from Hanoi, Vietnam: Temporal trends, emission sources,
384 and non-dietary exposure through dust ingestion. *The Science of the total environment*, v.
385 761, 2021, p. 143274.
- 386 ZAFRA-GÓMEZ, A. BALESTEROS, O. NAVALÓN, A. VÍLCHEZ, J. L. Determination
387 of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid
388 chromatography-mass spectrometry. 2008. 87–94p.
- 389 How Tubes Can Affect Your Experiments | Lab Manager. Disponível em:
390 <[https://www.labmanager.com/white-papers-and-application-notes/2011/05/eppendorf-](https://www.labmanager.com/white-papers-and-application-notes/2011/05/eppendorf-how-tubes-can-affect-your-experiments)
391 [how-tubes-can-affect-your-experiments](https://www.labmanager.com/white-papers-and-application-notes/2011/05/eppendorf-how-tubes-can-affect-your-experiments)>. Acesso em: 22 nov. 2019.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou empregar uma metodologia para a determinação de bisfenol-A em tecidos moles do mexilhão dourado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. O método desenvolvido foi considerado eficiente pois reduziu custos com secagem através da utilização de dessecador sem contaminar as amostras com BPA.

A metodologia para a obtenção das amostras em branco foi exaustiva e demandou muito tempo, desde a destilação em vidro de água ultra pura até a dupla secagem em mufla.

O método foi considerado ambientalmente amigável pois foram utilizadas quantidades reduzidas de solvente na extração do analito.

Até o momento, os resultados obtidos demonstraram ser um método simples, e eficiente, no entanto, faltaram ser empregados parâmetros de validação aplicável aos métodos analíticos empregados em produtos biológicos.

A extração com diferentes solventes foi realizada, mas as amostras não foram para a leitura no cromatógrafo em virtude da pandemia da Covid-19.

6 ANEXOS



Órgão oficial de informação técnica da ABES - Rio de Janeiro – Brasil

janeiro 2016

Regulamento para apresentação de contribuições

1. Objetivo

O presente regulamento objetiva uniformizar a apresentação das contribuições a serem encaminhadas para publicação na Revista Engenharia Sanitária e Ambiental.

2. Formas de contribuição

2.1. As formas de contribuição são:

- Artigo Técnico
- Nota Técnica
- Revisão da Literatura
- Discussão de Nota Técnica, Artigo Técnico ou Revisão da Literatura

2.2. Artigo Técnico é uma exposição completa e original, totalmente documentada e interpretada, de um trabalho de relevância.

2.3. Nota Técnica é um trabalho sumário podendo corresponder a:

- artigo com resultados ainda parciais
- considerações sobre aspectos pouco abrangentes da área
- desenvolvimento de considerações técnicas relativas a algum aspecto da Engenharia Sanitária e Ambiental
- alguma outra abordagem sumária pertinente, a juízo dos Editores.

2.4. Revisão da Literatura corresponde a um artigo, no qual é levantado o estado da arte de algum tema relevante e inovador, na área de Engenharia Sanitária e Ambiental, cuja abordagem deve ser suficientemente crítica e capaz de identificar avanços, lacunas e desafios científicos, à luz da literatura nacional e internacional. Trabalhos de revisão sistemática e meta-análise podem ser incluídos nessa categoria de artigo.

2.5. Discussão é uma avaliação crítica ou ampliação do conteúdo de uma Nota Técnica, Artigo Técnico ou Revisão da Literatura publicado na Revista. As discussões serão publicadas, sempre que possível, conjuntamente com a resposta do(s) autor(es). A Revista tem como linha editorial o incentivo à publicação de artigos de discussão.

2.6. Não serão aceitos relatórios, traduções e nem artigos já publicados ou submetidos à publicação em outros veículos, ou que impliquem em promoção comercial de determinada marca, produto ou empresa.

3. Encaminhamento das contribuições

3.1. A inscrição das contribuições será feita pelo sistema da SCielo, através do link <http://submission.scielo.br/index.php/esa/index>. Não serão aceitas inscrições de artigos por fax, e-mail ou correio.

3.2. O primeiro passo para o acesso ao sistema é o Cadastro, bastando clicar em "Cadastrar-se" no link no canto superior direito. A partir daí, clicar em "Engenharia Sanitária e Ambiental", que fará a vinculação do cadastro junto à Revista.

3.3. Feito isso, o próprio sistema mostrará, passo a passo, como submeter a sua contribuição.

3.4. Realizada a submissão, o autor receberá um e-mail acusando o recebimento da mesma. E a partir do código dado pelo próprio sistema que o autor poderá acompanhar o processo de avaliação do seu trabalho.

3.5. A Revista Engenharia Sanitária e Ambiental cobra taxa de submissão no valor de: **R\$ 100,00**.

A taxa destina-se a **não sócios** da ABES. Caso o autor principal seja sócio, enviar e-mail para esa@abes-dn.org.br informando número de matrícula ABES para isentar-se da taxa. Observação: A taxa de submissão não será restituída caso o manuscrito seja recusado, e o pagamento da taxa não garante o aceite do artigo, que passará normalmente pelo processo de avaliação. Associe-se à ABES: <http://socio.abes-dn.org.br/>

3.6. Qualquer dúvida, favor enviar e-mail para esa@abes-dn.org.br.

4. Formato das contribuições

4.1. As contribuições devem ser preparadas pelos autores no formato ".doc" aberto para edição usando o recurso de numeração de linhas do Microsoft Word (Arquivo – Configurar página – Layout – Números de linha – Numerar linhas – Contínua – OK – OK).



4.2. As contribuições devem ser enviadas no formato ".doc" pelo Sistema de Envio de Artigos. Todos os demais formatos de arquivos, inclusive os compactados, serão bloqueados.

4.3. Após o processo avaliativo, as contribuições aprovadas para publicação deverão sofrer correções e ser enviadas em sua versão final para diagramação.

4.3. Os trabalhos submetidos devem estar de acordo com as normas da ABNT/NBR 14724:2011– Trabalhos Acadêmicos

4.4. Poderão ser incluídos figuras, gráficos e ilustrações, desde que o tamanho do arquivo não ultrapasse 10MB.

4.5. O texto integral do artigo não poderá exceder 20 (vinte) páginas para Artigo Técnico e Revisão da Literatura e 8 (oito) páginas para Nota Técnica e Discussão, atendendo ao formato estabelecido nos itens a seguir.

4.6. O Artigo Técnico e a Nota Técnica deverão seguir a seguinte sequência de apresentação:

- Título do artigo em português (até 200 caracteres) e em inglês
 - Resumo em português e em inglês, de 100 a 250 palavras (conforme NBR 14724).
 - Palavras-chave em português e em inglês
 - Título resumido do artigo em português (até 60 caracteres) para o cabeçalho
 - Texto do artigo (sem divisão em colunas)
 - Referências
 - Anexos (se houver)
 - i. Agradecimentos, se houver, deverão ser incluídos somente na versão final do artigo aprovado para publicação.
 - ii. O Nome do(s) autor(es), Currículo resumido(s) do(s) autor(es), endereço para correspondência (profissional) devem constar somente nos metadados do Sistema Scielo, preenchidos no momento de cadastro. **IMPORTANTE:** não colocar estas informações no envio da contribuição original.
- 4.7. O texto deverá ser formatado para um tamanho de página A-4, margens 3 cm para esquerda e superior, e 2 cm inferior e direita (conforme NBR 14724). As páginas deverão ser devidamente numeradas. Deve ser empregada fonte Times New Roman, corpo 12, exceto no título que deverá ter corpo 16. O espaçamento entre as linhas deverá ser 1,5.
- 4.8. O corpo do artigo deve ser organizado segundo um encadeamento lógico, contendo subtítulos "Introdução", "Metodologia", "Resultados", "Discussão", (ou "Resultados e Discussão"), "Conclusões" e "Referências". Na redação não deve ser empregada a primeira pessoa e o estilo a ser adotado deve ser objetivo e sóbrio, compatível com o recomendável para um texto científico.
- 4.10. Deverá ser evitada a subdivisão do texto em um grande número de subtítulos ou itens, admitindo-se um máximo de cabeçalhos de terceira ordem.
- 4.11. O conteúdo do trabalho deve ser submetido a criteriosa revisão ortográfica.
- 4.12. Termos grafados em itálico ou negrito poderão ser utilizados no corpo do artigo.
- 4.13. As discussões deverão ser submetidas no máximo até 6 (seis) meses após a publicação do Artigo, Nota Técnica ou Revisão da Literatura.
- 4.14. Somente serão aceitos trabalhos em português Brasil.

5. Figuras e ilustrações

As figuras e ilustrações devem observar os seguintes critérios:

- 5.1. Os arquivos das figuras e ilustrações, sem bordas ao redor, devem ser inseridas no arquivo do texto, de maneira que possam ser editados por meio do MS Word for Windows.
- 5.2. Os textos e legendas não devem ficar muito pequenos ou muito grandes em relação à figura.
- 5.3. As figuras devem ser intercaladas nos locais apropriados e apresentar um título.
- 5.4. A inclusão de fotografias não é aconselhável; porém, se os autores julgarem que são importantes para esclarecer aspectos relevantes do artigo, deverão ser inseridas em resolução mínima de 300 dpi.
- 5.5. Todos os gráficos, desenhos, figuras e fotografias devem ser denominados "Figura", e numerados sequencialmente em algarismos arábicos. Toda figura deve ser mencionada no texto.
- 5.6 O número e título da Figura devem ser colocados centralizados, imediatamente abaixo da figura. O título deve ser claro e autoexplicativo.
- 5.7. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos gráficos e diagramas.

6. Quadros e tabelas

Os quadros e tabelas deverão atender os seguintes critérios:

6.1. Os quadros e tabelas devem ser claros e objetivos, sem linhas de grade. As unidades correspondentes a todos os termos usados devem ser claramente identificadas.

6.2. Todos os quadros ou tabelas devem ser denominados "Quadro" ou "Tabela", numerados sequencialmente em algarismos arábicos e mencionados no texto.

6.3. Cada quadro e tabela, além da numeração, deve possuir um título. O número e o título devem ser colocados centralizados, imediatamente acima do quadro ou tabela. O título deve ser claro e autoexplicativo.

6.4. Um quadro e uma tabela não poderão ser maiores do que uma folha A-4.

6.5. Quadros e tabelas devem aparecer, preferencialmente, intercalados nos locais apropriados do texto, a critério do autor.

6.6. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos quadros e tabelas.

7. Equações

As equações podem ser editadas pela equipe responsável pela diagramação. Portanto, os seguintes critérios devem ser satisfeitos:

7.1. As equações devem ser claras e legíveis, e escritas com a mesma fonte do corpo do texto, sem a utilização de itálico ou negrito.

7.2. As equações e fórmulas devem ser denominadas "Equação" e numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. A numeração à direita da equação deve ser entre parênteses. Todas as equações devem ser mencionadas no texto.

7.3. Todos os símbolos usados devem ser definidos imediatamente após a equação (caso não tenham sido definidos anteriormente), incluindo as suas unidades ou dimensões.

8. Unidades

8.1. Todas as unidades mencionadas no texto, tabelas, quadros e figuras devem ser expressas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI).

8.2. Deve-se evitar o uso da barra de fração na expressão das unidades. Exemplo: Ao invés de mg/L ou m³/s, deve-se utilizar mg.L⁻¹ e m³.s⁻¹.

9. Referências

As referências citadas no texto e listadas ao final do artigo deverão estar de acordo com a norma NBR 6023/2002. A título de esclarecimento são apresentadas algumas diretrizes:

9.1. As referências citadas no texto devem conter o sobrenome do(s) autor(es), em caixa alta, seguidos pelo ano da publicação, observando-se os seguintes critérios:

9.1.1. Quando houver mais de um trabalho, as citações devem ser em ordem alfabética.

9.1.2. Trabalhos com mais de três autores devem ser referenciados ao primeiro autor, seguido por "et al." (em itálico e com ponto).

9.1.3. Quando houver mais de uma publicação do mesmo autor, no mesmo ano, o ano da publicação deve ser seguido dos componentes "a, b, c...", em ordem alfabética.

Exemplos: ... estudos efetuados por Silva (1994a, 1994b) e por Machado *et al.* (1995a) revelaram...; ... estudos recentes (SOUZA, 1993; SILVA, WILSON e OLIVEIRA, 1994; MACHADO *et al.*, 1995b) revelaram...

9.2. Ao final do trabalho deverá ser apresentada uma lista de todas as referências citadas no texto, de acordo com os seguintes critérios, entre outros:

9.2.1. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro

autor.

9.2.2. Devem ser referenciados todos os autores (independentemente do número de autores) pelo sobrenome seguido pelas iniciais de cada autor, separados por vírgulas.

Exemplo: SMITH, P.J.; WATSON, L.R.M.; GREEN, C.M...

9.2.3. O título do periódico referenciado deverá ser apresentado em itálico. As indicações de volume, número e página deverão ser identificados pela letra inicial ("v", "n" ou "p"), seguida de ponto. Não devem ser utilizadas aspas antes e depois do título do trabalho.

Exemplo: JEWELL, W.J.; NELSON, Y.M.; WILSON, M.S. Methanotrophic bacteria for nutrient removal from wastewater: attached film systems. *Water Environment Research*, v. 64, n. 6, 1992, p. 758-65.

9.2.4. O título do livro deve ser apresentado em itálico. Devem ser incluídos a edição, o local, a editora, o número de páginas e a data.

Exemplo: FRANÇA, J.L.; VASCONCELOS A.C. *Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas*. 8 ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2007, 255 p.

9.2.5. Em capítulos de livros e trabalhos de congressos, a obra principal (título do livro ou denominação do congresso) é referenciada em itálico e vem precedida da expressão "In".

Exemplos: Anais - CAIXINHAS, R.D. Avaliação do impacto ambiental de empreendimentos hidro-agrícolas. In: *Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 5 Anais...* Lisboa: APRH, 1992, p. 203-11.

Capítulo de Livro - KUKOR, J.J.; OLSEN, R.H.; IVES, K. Diversity of toluene degradation following exposure to BTEX in situ. In: KAMELY, D.; CHAKABARTY, A.; OLSEN, R.H. (Eds.) *Biotechnology and Biodegradation*. Portfolio Publishing Company, The Woodlands, E.U.A., 1989, p. 405-421.

10. Julgamento

10.1. Após avaliação prévia realizada pelos Editores da Revista, se considerado pertinente, cópias da contribuição, sem identificação dos autores, serão enviadas a pelo menos dois avaliadores, especialistas da área, indicados pelos Editores.

10.2. Em qualquer etapa de julgamento do trabalho, serão levados em consideração a obediência às disposições regulamentares, o relacionamento do tema à Engenharia Sanitária e Ambiental, adequação do título, do resumo e das palavras-chave, existência de encadeamento lógico, ineditismo e qualidade da contribuição.

10.3. Na análise dos editores e dos avaliadores a contribuição será classificada segundo uma das seguintes categorias:

- Aceito
- Revisões requeridas
- Rejeitar

11. Comunicação aos autores

O autor principal será comunicado do resultado da avaliação e no caso de artigos recusados, receberão as devidas justificativas.

12. Número de autores

O número de autores permitido para cada submissão é de até cinco. Casos excepcionais enviar email para esa@abes-dn.org.br para consulta.

13. Responsabilidades e direitos

O conteúdo dos artigos é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es), que declaram se responsabilizar por qualquer reclamação de terceiros quanto a conflitos envolvendo direitos autorais, assumindo e isentando a ESA/ABES de qualquer pendência envolvendo suas publicações. Os autores que encaminharem seus artigos cedem à ESA/ABES os respectivos direitos de reprodução e/ou publicação. Os casos omissos serão resolvidos pelos editores do periódico.