Lia Gracy Rocha Diniz

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DE MAR E TECIDO DE MOLUSCOS.**

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

Exemplar Revisado

O exemplar original encontra-se em acervo
reservado na Biblioteca do IQC-USP

São Carlos
2016

Diniz, Lia Gracy Rocha

Análise cromatografica de biocidas anti-incrustantes em amostras de água de mar e tecido de moluscos. / Lia Gracy Rocha Diniz – 2016. 87f.

Impresso por computador (Fotocópia)

Orientadora: Eny Maria Vieira

Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Química (Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica), 2016.

1. Água – Poluição marinha – Análise química. 2. Substâncias anti-incrustantes.

CDU:

Dedico este trabalho

Aos meus pais Getúlio Pereira Diniz (*in memoram*) e Maria das Neves Rocha Diniz, pelo amor, educação e inspiração que me proporcionam constantemente, aos meus irmãos Joubert Diniz, Elton Diniz e Jadson Diniz, pelo incentivo, amizade. Por vocês e para vocês!

*Quem deseja segurança, melhor
permanecer na praia. Quem busca
tesouros, precisa mergulhar no oceano.*

(Saadi de Shiraz)

AGRADECIMENTOS

Sem compreensão, incentivo e carinho que me cercam não seria tão gratificante chegar até aqui e continuar esta caminhada. Sou feliz, pois ampla é minha lista de agradecimentos, se por acaso a memória me faltar e ao final esquecer alguém, desde já peço perdão.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por esse sopro de vida e pela sabedoria e discernimento concedidos sempre que solicitados.

A minha mãe, Maria da Neves, que de todos os valiosos ensinamentos, ensinou-me a ter fé em mim mesma e em Deus. Você é o melhor exemplo de ser humano que eu poderia ter.

Aos meus irmãos, Elton, Jadson e Joubert Diniz. Vocês são meus alicerces e melhores amigos que eu poderia ter, obrigada pelo incentivo e amizade em todos os momentos de minha vida.

Aos meus tios, Felipe, Noberto e Verônica Rocha, pelo carinho e amizade.

Às primas Norvana, Carliane, Thaynara, Thaliane e especialmente a minha afilhada Norvanildes, por acreditarem e sempre torcerem por mim.

Aos meus avós Eugênio Rocha e Terezila Diniz (in memoriam) por todo carinho depositado.

Aos meus sobrinhos, Arthur, Elaine, Ellen, Elton e Heitor, pelos momentos calorosos, sorrisos e instantes de descontração e alegria, minhas válvulas de escape.

Aos antigos e novos amigos do LaQuAAE que fizeram parte dessa jornada Luciana Capellini, Maressa, Caroline Derisso, Caroline Thiessa Maramaldo, Tiago Silva, Carlos Galinaro, Guilherme Zanuto, Ana Luiza.

Aos amigos Welma Beatriz, Luciano, Jonas, Janilson, Maria da Natividade, Celis, Mitchell e Maya. Graças a vocês, o período em que vivi em São Carlos tornou-se muito mais do que uma experiência profissional, mas, também proporcionou o surgimento de fortes laços de amizade.

A Sinara Freire e Waléria Rabelo, por disporem de seu espaço, tempo e pelos momentos descontração.

Aos funcionários do Instituto de Química de São Carlos, Veroneide e Cláudia, Gislei, Andreia, Silvia, Gustavo, Wiliam, por muito me ajudarem nas questões burocráticas

Aos professores Dr. José Juan Santana Rodrigues, Miriam Torres Padrón, Zoraida Sosa Ferera, orientador durante o doutorado sanduíche na Universidade de Las Palmas de Gran Canaria (Gran Canaria, Espanha), pelo aceite da orientação, amizade, confiança, liberdade e apoio.

Aos amigos Cristina Afonso, Rayco Alonso, Sarah Montesdeoca, Sergio e Alejandro do Grupo de Analises Quimico Mediodambiental (AQMA), vosotros soys los mejores companeros que podia tener.

Ao Prof. Italo Braga Castro da UNIFESP pela ajuda durante as coletas em Santos.

Ao Prof. Dr Eduardo Bessa pela amizade e ensinamentos.

A Empresa Maranhense de Administração Portuária (EMAP), por permitir a coleta na sua área porto do Itaqui.

A Granel Química Ltda pelo apoio logístico e empréstimo dos EPI's necessários para as coletas.

A FAPEMA pela bolsa de doutorado no Brasil (Edital BBD-01902/12).

A CAPES pela viabilização de bolsa PDSE que possibilitou desenvolver parte desse projeto na Espanha (Processo BEX 12700/13-4).

A Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco pela co-orientação e amizade.

A minha orientadora Profa. Dra. Eny Maria Vieira, por me oferecer o suporte necessário para o desenvolvimento desta pesquisa e além de tudo pela confiança a mim depositada e por sua amizade.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite e disponibilidade em ceder tempo e esforço para contribuir com esta tese e com a minha formação.

A todos aqueles que fazem parte da minha vida e me ajudaram a chegar até aqui.

Obrigada a todos!

RESUMO

DINIZ, L. G. R. **Análise cromatográfica de biocidas anti-incrustantes em amostras de água de mar e tecido de moluscos.** 2016. 87p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2016.

A indústria naval é uma das mais importantes para economia e desenvolvimento de um país, no entanto, as diversas atividades desenvolvidas em zonas portuárias contribuem para o impacto ambiental a ambientes costeiros, dentre os vários grupos de micropoluentes orgânicos potencialmente danosos a esses ecossistemas, emergiram nos últimos anos os biocidas anti-incrustantes. Pinturas anti-incrustantes são tratamentos utilizados para minimizar processos corrosivos, diminuindo custos com manutenção, economizando combustíveis e reduzindo a veiculação de espécies não nativas entre ecossistemas costeiros. Neste estudo foi desenvolvido, validado e aplicado um método analítico para determinação dos biocidas anti-incrustantes, clorotalonil, diuron, irgarol e tiram em amostras de água, e tecido biológico em diferentes regiões portuárias da costa brasileira e da Ilha de Gran Canaria –Espanha.

Palavras-chave: Tintas anti-incrustantes de terceira geração, poluição marinha, cromatografia.

ABSTRACT

The maritime industry is an important aspect of a countries economy, however, the cumulative activities of port areas has an impact on coastal environments, this can include the addition of harmful micro-organic material. Among the potentially harmful micro-organic material being added to ecosystems, are recently emerged anti-fouling biocidal paints. Anti-fouling paints are used as a treatment to minimize corrosive processes, reduce maintenance costs, save fuel and reduce the transmission of non-native species to coastal ecosystems. This study developed, validated and applied an analytical method for the determination of the anti-fouling biocidal paints, chlorothalonil, diuron, irgarol and tiram in water samples and biological tissue in different port areas of the Brazilian coast and the Gran Canaria Island in Spain.

Keywords: booster biocide antifouling, marine pollution, Third generation antifouling paints.

Lista de Figuras

APRESENTAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE

Figura 1 – Fluxograma das etapas desenvolvidas nesse estudo	18
---	----

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1- Etapas da bioincrustação sob superfícies submersas	19
--	----

CAPÍTULO I

Figura 1- Pontos de coleta no Complexo Portuário de São Luís, MA e no Sistema Estuarino de Santos e São Vicente.....	32
--	----

Figura 2 - Fluxograma representativo do processo SPE.....	34
---	----

Figura 3 - Espectros de absorção, de 190 a 380 nm, obtidos por HPLC-DAD para os padrões: (a) clorotalonil, (b) diuron, (c) irgarol e (d) tiram, com concentração de 500 µg L ⁻¹	37
--	----

Figura 4- Cromatograma dos biocidas na concentração de 500 µg L ⁻¹ , nas condições estabelecidas	37
---	----

Figura 5 - Curvas analíticas para (a) clorotalonil e (b) diuron (c) irgarol e (d) tiram	39
--	----

CAPÍTULO II

Figura 1 - <i>Stramonita haemastoma</i> com imposex.....	50
--	----

Figura 2 -Estruturas químicas de irgarol e diuron.	52
---	----

Figura 3 -Organismos utilizados na pesquisa.	57
---	----

Figura 4 - Cromatograma dos biocidas diuron e irgarol por HPLC-DAD na concentração 500 µg g ⁻¹	61
---	----

Figura 5 -Influência da quantidade de amostra na extração por MAE com 5 mL de metanol, 200W por 6 min.....	63
--	----

Figura 6 - Influência do tipo de solvente na eficiência da extração	64
---	----

Figura 7 - Superfícies de resposta do planejamento fatorial completo 3 ² , efeito das variáveis (tempo e potência) para extração de (a) diuron e (b) irgarol	65
---	----

Figura 8 – Gráfico de Pareto e Superfícies de resposta do planejamento 2 ³ para extração de (a) diuron e (b) irgarol por MAE.	67
---	----

Figura 9 - Superfície de resposta e influência das variáveis (volume e tempo) para extração de (a) diuron e (b) irgarol.	69
---	----

Figura 10 - Curvas analíticas para (a) diuron e (b) irgarol aplicando-se o método MAE-LC–MS/MS. Avaliando as concentrações de 10 a 500 ng g⁻¹. 71

Figura 11 - Curvas analíticas para (a) diuron e (b) irgarol aplicando-se o método Ultrassom - LC–MS/MS. Avaliando as concentrações de 10 a 500 ng g⁻¹. 71

Figura 12 - Curvas analíticas para (a) diuron e (b) irgarol aplicando-se o método MAE seguido de SPE analisado por LC–MS/MS. Avaliando as concentrações de 10 a 500 ng g⁻¹. 73

Figura 13 -Comparação dos métodos de extração para a determinação de irgarol e diuron em amostras de tecido biológico de moluscos. 75

Lista de Tabelas

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Ocorrência dos biocidas e métodos analíticos aplicados para diferentes matrizes	28
Tabela 2- Identificação dos pontos de amostragem.....	33
Tabela 3 – Parâmetros analíticos por HPLC-DAD.	38
Tabela 4 – Dados da recuperação e precisão	40
Tabela 5- Concentrações dos biocidas diuron, irgarol e tiram em amostras de águas de mar coletadas em zonas portuárias brasileiras.	42

CAPÍTULO II

Tabela 1- Propriedades físicas e químicas dos biocidas.....	52
Tabela 2- Gradiente da fase móvel utilizada para a determinação de diuron e irgarol. .	51
Tabela 3 - Condições cromatográficas por HPLC-DAD.....	61
Tabela 4 - Gradiente da fase móvel utilizado no LC–MS/MS	62
Tabela 5 -Condições cromatográficas para o LC–MS/MS.....	62
Tabela 6 - Condições de fragmentação para determinação do diuron e do irgarol por LC–MS/MS.	62
Tabela 7 - Níveis das variáveis (potência e tempo) utilizados no planejamento experimental completo (3 ²) para do método MAE.....	64
Tabela 8 - Níveis das variáveis, tempo e volume, utilizados no planejamento experimental completo (3 ²) para a extração de diuron e irgarol por ultrassom.....	68
Tabela 9 - Parâmetros analíticos obtidos por LC–MS/MS.....	70
Tabela 10- Precisão e recuperação de diuron e irgarol nas amostras, por MAE - LC–MS/MS	72
Tabela 11- Precisão e recuperação de diuron e irgarol nas amostras, por Ultrassom - LC–MS/MS.	72
Tabela 12 - Parâmetros analíticos por MAE –SPE -LC–MS/MS	73
Tabela 13 - Precisão e recuperação de diuron e irgarol nas amostras, por MAE-SPE-LC–MS/MS.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACE - Antifouling Agents in Coastal Environments

ACN – Acetonitrila

ANA – Agência Nacional de Águas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AQMA – Análisis Químico Medio Ambiental

ASE – Extração acelerada com solventes (Accelerated Solvent Extraction)

C18 - Octadecil Silano

DAD – Detector de Arranjo de diodos (Diode array detector)

DCA – Produto de degradação do diuron (3,4-dichloroanilina)

DCM – Diclorometano

DCPMU - Produto de degradação do diuron (3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia)

DCPU - Produto de degradação do diuron (3,4-diclorofenilureia)

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DPC - Diretoria de Portos e Costas

EF – Efeito matriz

GC - Cromatografia Gasosa (Gas Chromatography)

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High performance liquid chromatography)

IC₅₀ – Concentração inibitória (Inhibitory concentration)

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

K_a- Constante de ionização de ácidos

K_{ow} – Coeficiente octanol/água

LC – Cromatografia Líquida

LC₅₀ – Concentração letal (Lethal concentration)

LC–MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada a detector de massas e análise de massa após a fragmentação da molécula

LD – Limite de detecção

LLE - Extração Líquido-Líquido (Liquid – liquid extration)

LQ – Limite de quantificação

M1 – Produto de degradação do irgarol (2-metiltio-4-tert-butilamina-6-amina-s-triazina)

M2 – Produto de degradação do irgarol (3-[4-tert-butilamina-6-metil tol- triazina-2-amina]propionaldeído)

M3 – Produto de degradação do irgarol (N,N0-di-tert-butil-6-metiltiol-s-triazina-2,4-diamina)

MAE – Extração Assistida por Micro-ondas (Microwave-assisted extraction)

MeOH - Metanol

MF-LPME – Microextração em fase líquida com fibras ocas (Microfunnel-supported liquid-phase microextraction)

MM - Massa Molar

MS - Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry)

NORMAM - Norma da Autoridade Marítima do Brasil

pH – Potencial hidrogeniônico

OTs - Organoestânicos (Organotins)

PTFE – Politetrafluoretileno

SPE - Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction)

SPME – Micro extração em sólida (Solid phase microextraction)

TBT - Tributilestanho (Tributyltin)

TCMTB - Benzotiazol

TPT – Trifenilestanho (Triphenyltin)

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

ULPGC – Universidad de Las Palmas de Gran Canária

USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE	17
INTRODUÇÃO GERAL	19
Bioincrustação Marinha	19
Sistemas Anti-incrustantes	20
CAPITULO I	22
Biocidas anti-incrustantes de 3ª geração em zonas portuárias brasileiras	22
RESUMO	23
1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 MATÉRIAS E MÉTODOS	31
3.1 Materiais e reagentes	31
3.2 Coleta e preparo das amostras	32
3.3 Extração em Fase Sólida (SPE)	33
3.4 Análise cromatográfica por HPLC-DAD	34
3.5 Parâmetros Analíticos	35
3.6 Avaliação do efeito de matriz	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1 Condições cromatográficas para HPLC – DAD	37
4.2 Parâmetros Analíticos	38
4.3 Avaliação do efeito de matriz	40
4.4 Determinação dos biocidas anti-incrustantes em amostras de água coletadas em portos brasileiros.	41
5 CONCLUSÕES	43
REFERENCIAS	44
CAPITULO II	47
Determinação de diuron e irgarol 1051 em organismos marinhos usando diferentes métodos de extração e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.	47
RESUMO	48
1 INTRODUÇÃO	50
2 OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo geral	55

2.2	Objetivos específicos.....	55
3	MATÉRIAS E MÉTODOS	56
3.1	Materiais e reagentes	56
3.2	Coleta e preparo das amostras	57
3.3	Extração Assistida por Micro-ondas (MAE).....	57
3.4	Extração por ultrassom.....	59
3.5	Análise cromatográfica.....	59
3.6	Parâmetros Analíticos.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
4.1	Condições cromatográficas para HPLC – DAD.....	61
4.2	Condições cromatográficas para LC–MS/MS.....	62
4.3	Condições analíticas para o isolamento do diuron e do irgarol por MAE.....	63
4.4	Parâmetros Analíticos.....	70
4.5	Avaliação do efeito matriz.....	74
4.6	Comparação entre os métodos de extração	75
4.7	Determinação do diuron e do irgarol em amostras de moluscos.....	75
5	CONCLUSÕES	76
	REFERENCIAS	77
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
	PERSPECTIVAS PARA CONTINUIDADE DO ESTUDO	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	85

APRESENTAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE

Esta tese é apresentada em forma de capítulos, os quais foram elaborados de acordo com o delineamento experimental, métodos e parâmetros. Com o intuito de tornar a leitura mais direta e de melhor compreensão, cada capítulo contempla os itens, Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussões, Conclusões e Referências.

Os capítulos I e II foram preparados de forma a serem submetidos para a publicação. Os dados gerados podem vir a ser importantes fontes de informação para discutir a presença dos biocidas anti-incrustantes, clorotalonil, diuron, irgarol e tiram em amostras ambientais.

O Capítulo I: **Biocidas anti-incrustantes de 3ª geração em zonas portuárias brasileiras**, contém os resultados da primeira etapa da pesquisa, na qual foram realizados procedimentos experimentais para o ajustamento do método analítico, campanha de amostragem e análise das amostras de água de mar do Porto do Itaqui, em São Luís do Maranhão e no Sistema Estuarino de Santos e São Vicente em São Paulo.

O Capítulo II, apresenta os resultados gerados durante o doutorado sanduíche (PDSE-CAPES) realizado na Universidad de Las Palmas de Gran Canária de fevereiro de 2014 a fevereiro de 2015, sob a orientação do Prof. Dr. José Juan Santana Rodrigues e colaboração do Grupo de Análisis Químico Medio Ambiental.

A Abordagem dessa segunda etapa da pesquisa está direcionada à análise de dois dos biocidas mais utilizados em formulações de tintas anti-incrustantes, o diuron e o irgarol. Foram comparados dois métodos de extração. A Extração Assistida por Micro-ondas e Extração por Ultrassom, seguidas por análises de LC-MS/MS. Esse estudo resultou no artigo: **Determinação de diuron e irgarol 1051 em organismos marinhos usando diferentes métodos de extração e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. Já submetido para a publicação em periódicos da área.

A fim de proporcionar uma melhor compreensão da tese, na Figura 1 estão apresentadas em forma de fluxograma todas as etapas desenvolvidas neste estudo.

Figura 1 – Fluxograma das etapas desenvolvidas nesse estudo

Fonte: Autoria própria

INTRODUÇÃO GERAL

Bioincrustação Marinha

A bio-incrustação marinha é um fenômeno resultante da colonização ou do crescimento de bactérias, algas ou invertebrados sésseis sobre superfícies submersas, a exemplo rochas, cais, plataformas, cascos de navios, etc. As comunidades incrustantes são diversificadas, uma vez que podem ser compostas por uma ou mais camadas constituídas por diversos organismos. Na Figura 1 está disposta uma representação esquemática do processo de bioincrustação (DA GAMA et al., 2009).

Figura 1- Etapas da bioincrustação sob superfícies submersas.

Fonte: Adaptação de Martín-Rodríguez (2015).

A primeira fase do processo de bioincrustação, constitui na adesão de moléculas sobre uma superfície submersa. Em questão de minutos a superfície adsorve um filme molecular composto por material orgânico dissolvido. Dentro de horas ocorre a segunda fase caracterizada pelo surgimento de micro-organismos, possivelmente algas unicelulares e cianobactérias (algas azuis). Esses primeiros colonizadores formam um biofilme: um conjunto de células unidas por vezes classificado como micro incrustação ou limo (CALLOW; CALLOW, 2002).

A terceira fase ocorre durante duas ou três semanas, e é caracterizada pelo surgimento de uma comunidade biológica complexa onde, (principalmente diatomáceas) formadora de biofilmes capazes de promover a colonização de zoósporos de macroalgas e larvas de macrorganismos, moluscos, ascídias, crustáceos, e poliquetas que acabam formando a incrustação macroscópica (MARTÍN-RODRÍGUEZ, 2015).

Esse processo de bioincrustação resulta de fenômenos físicos e reações bioquímicas. As duas primeiras etapas são conduzidas principalmente por efeitos físicos como a interação eletrostática, gravidade e fluxo de água. E as últimas etapas por meio de efeitos bioquímicos, tais como a secreção de substâncias poliméricas extracelulares (CAO et al., 2011).

Sistemas Anti-incrustantes

Para a indústria naval, a bioincrustação gera sérios problemas, como, o aumento do atrito (fricção) entre a embarcação e a água, o que implica num maior consumo de combustível, aumentar a frequência com que a embarcação deve ser docada (para raspagem destes organismos) agravar as taxas de corrosão. Esse fenômeno ocasiona também problemas ecológicos, através da introdução de espécies não- nativas (PARADAS, 2007).

Devido a esses problemas, desde o início da navegação os marítimos buscaram diferentes estratégias para prevenir e combater a bioincrustação. Os fenícios e cartagineses aplicavam um revestimento de cobre na parte inferior de seus navios, enquanto que os gregos e romanos usavam tanto o revestimento com chumbo quanto com pregos de cobre. O cobre foi bastante utilizado pela marinha britânica desde 1780. A partir de então, foram desenvolvidas tintas anti-incrustantes incorporando sais de cobre (CALLOW; CALLOW, 2002).

Por volta da década de 50 surgiram as primeiras tintas organometálicas (com estanho, arsênio, mercúrio e outros), e vieram a dar origem após numerosos e sucessivos desenvolvimentos, às tintas anti-incrustantes à base de tributil-estanho (TBT) e trifetil-estanho (TPhT), as quais se tornaram célebres pela sua elevada eficiência e versatilidade (ALMEIDA, 2007).

Os organoestânicos, particularmente tributil-estanho (TBT) foram os compostos mais utilizados em tintas anti-incrustantes até os anos 90. No entanto, estudos apontaram sérios problemas ambientais devido à elevada persistência do composto em água do mar, a exemplo o imposex, o desenvolvimento de características masculinas em gastrópodes femininos. Assim, na década de 1980 alguns países europeus restringiram a utilização de tintas à base de TBT e uma proibição global final foi aplicada em 2008 pela IMO (Organização Marítima Internacional) para todas as embarcações (KONSTANTINO; ALBANIS 2004).

Como consequência dessa restrição, a indústria de tintas anti-incrustantes buscou novas alternativas ao uso dos organoestânicos, surgindo os biocidas de reforço, conhecidos como biocidas de terceira geração.

Esses novos compostos pertencem a diferentes grupos químicos e, em alguns casos, são utilizados simultaneamente em uma mesma formulação comercial com intuito de potencializar a ação da pintura. As novas tintas anti-incrustantes contêm substâncias inorgânicas, orgânicas ou organometálicas (CASTRO et al, 2011).

O agente anti-incrustante Irgarol 1051 e outros pesticidas multi-uso: diuron, clorotalonil, diclofluanida e tiram estão entre os biocidas anti-incrustantes mais utilizados em muitos países (THOMAS, 2001, BASHEER, 2002; MANZO, 2006; SAPOZHNIKOVA, 2008).

CAPITULO I

BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE 3ª GERAÇÃO EM ZONAS PORTUÁRIAS BRASILEIRAS.

RESUMO

A bioincrustação é um processo natural de colonização e crescimento de organismos em superfícies submersas, tais como cascos de navios. No entanto a bioincrustação pode acarretar diversos problemas econômicos. Para minimizar proliferação de organismos em embarcações e estruturas portuárias são aplicadas pinturas contendo biocidas anti-incrustantes, os mais utilizados são; clorotalonil, diuron, irgarol e tiram que embora considerados menos tóxico e persistente que os organoestânicos que os antecederam, esses compostos têm sido mundialmente detectados em ambientes marinhos. O presente estudo teve por objetivo verificar a presença de biocidas anti-incrustantes em amostras de água coletadas no Complexo Portuário de São Luís, MA e no Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP. O isolamento dos compostos nas amostras de água foi feito por Extração em Fase Solida (SPE) e análise em Cromatografia Líquida acoplada um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). A recuperação do método foi satisfatória entre 72 e 115% e o desvio padrão ficou abaixo de 10% para todos os compostos estudados. O limite de quantificação foi de 0, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o clorotalonil, 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diuron, 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o irgarol e 1,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o tiram. Das amostras coletadas no Complexo Portuário de São Luís e Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, não foi possível observar a presença do clorotalonil, mas foram detectadas concentrações de diuron e do irgarol, possivelmente por serem os principais agentes ativos utilizados na atualidade. As concentrações encontradas foram na faixa de 0,30 e 7,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diuron e 1,98 e 5,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o irgarol, apenas em dois pontos localizados em Santos, foi encontrado o tiram nas concentrações 1,30 e 0,45 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Palavras-chave: Poluição marinha, Substâncias anti-incrustantes, Zona costeira brasileira.

ABSTRACT

Biofouling is the natural process of colonization and growth of organisms on submerged surfaces such as ship hulls. However biofouling can cause many economic problems. To minimize the proliferation of organisms in ships and port facilities paints containing antifouling biocides are applied, the most used are; chlorothalonil, diuron, irgarol and tiram. Whilst they are considered less toxic and persistent than the organotin compounds that preceded them, these compounds have been detected worldwide in marine environments. This study at verifying the presence of antifouling biocides in water samples collected at the port complex of São Luís, MA and at estuarine system of Santos and São Vicente, SP. The isolation of the compounds in water samples performance by use of solid phase extraction (SPE) in together with liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). The method recovery was satisfactory between 72 and 115% and the standard deviation was less than 10% for all studied compounds. The quantification limit was 0, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ for chlorothalonil, 0.07 $\mu\text{g L}^{-1}$ for diuron, 0.50 $\mu\text{g L}^{-1}$ for irgarol and 1.04 $\mu\text{g L}^{-1}$ for tiram. Of the samples collected in the port complex of St. Louis and estuarine system of Santos and São Vicente it was not possible to observe the presence of chlorothalonil, but concentrations of diuron and irgarol were detected as they are possibly the main active agents used currently. The concentrations were found in the range of 0.30 to 7.39 $\mu\text{g L}^{-1}$ for diuron and 1.98 to 5.70 $\mu\text{g L}^{-1}$ for irgarol, only two points located in Santos were found to contain tiram concentrations of 1.30 and 0.45 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Keywords: Marine pollution, Anti-fouling substances, Brazilian coastal zone.

1 INTRODUÇÃO

A proliferação de organismos incrustantes (biofouling) em cascos de embarcações e estruturas portuárias ocasionam diversos problemas econômicos e também ambientais, visto que, além de interferirem na vida útil dessas estruturas, podem também servir de vetor para introdução de espécies exóticas, intervindo na biodiversidade e riqueza de diferentes ecossistemas (KOTRIKLA, 2009).

Para a navegação, a bioincrustação gera problemas por tornar a superfície dos cascos de embarcações irregular e rugosa, dificultando a mobilidade, aumentando o consumo de combustível, gerando sobrecarga de peso, o entupimento de sistemas de resfriamento e ainda causando a redução da propulsão da hélice (KOTRIKLA, 2009).

Com o intuito de reduzir os problemas causados pela bioincrustação ao longo do tempo, foram desenvolvidos recobrimentos especiais no setor de pinturas chamados anti-incrustantes. As primeiras tintas desenvolvidas com esse propósito tinham na composição, arsênio ou mercúrio, em alguns casos eram adicionados pesticidas como o DDT (ALMEIDA, E; DIAMANTINO, 2007)

Na década de 60, foram apresentadas pela indústria química, tintas anti-incrustantes eficazes, cuja formulação era constituída por compostos organometálicos, em especial o tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT). No entanto, embarcações que continham esse tipo de revestimento necessitavam frequentemente de manutenção para a renovação da pintura anti-incrustante devido ao seu rápido desgaste. Na década de 70 foram desenvolvidas as chamadas tintas de desgaste controlado, compostas por TBT quimicamente ligado a uma base polimérica (copolímeros), permitindo um longo intervalo entre as docagens, além de boa resistência ao intemperismo (CASTRO et al., 2011; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Em função dos efeitos danosos provocados pelo TBT em ecossistemas aquáticos, países como a França, Reino Unido, Suécia, Noruega, Nova Zelândia, Japão, entre outros, proibiram já no final da década de 80 e início da de 90 a utilização do TBT em

embarcações maiores que 25 metros de comprimento (CHAMP, 2000; KONSTANTINOU; ALBANIS, 2004). No entanto, a proibição foi pouco efetiva devido ao tráfego internacional envolvendo países sem legislação restritiva ao TBT (KANNAN; TANABE, 2009).

Em 2001, a Organização Marítima Internacional (IMO), por meio da Convenção para Sistemas Anti-incrustantes, propôs que o uso de TBT em tintas anti-incrustantes fosse banido mundialmente em 2003, no entanto as embarcações que já tinham sido revestidas poderiam permanecer com seus revestimentos até 2008 (IMO, 2001).

No Brasil, a única restrição quanto ao uso de tintas anti-incrustantes de efeitos danosos, consiste na aprovação da convenção através do Decreto Legislativo nº 797/2010, que entrou em vigor apenas em 20/05/2012 proibindo a aplicação de sistemas anti-incrustantes danosos que contenham TBT (SAPOZHNIKOVA et al., 2007; CASTRO et al., 2011; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Após a proibição do uso dos organoestânicos em tintas anti-incrustantes, as indústrias buscaram novas alternativas surgindo assim, uma terceira geração de biocidas na qual se destacaram compostos orgânicos sem a presença de íons metálicos e não metálicos. Os mais estudados mundialmente são: 4-cloro-3-metilfenol, clorotalonil, diclofluanida, diuron, irgarol, tiram e zineb (SAPOZHNIKOVA et al., 2007; CASTRO et al., 2011; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Apesar de uma menor persistência no ambiente aquático e partição na fração particulada do ambiente marinho, vários destes compostos já foram associados a efeitos deletérios em organismos aquáticos, tais como, distúrbios metabólicos, infertilidade, inibição de crescimento, baixa defesa imunológica e morte (ALMEIDA et al., 2007).

Atualmente, as principais fontes de contaminação por biocidas em ecossistemas costeiros e marinhos são os portos, e as atividades industriais, combinados com a contribuição urbana (DINIZ, 2011).

O Complexo Portuário de São Luís consiste no Porto de Itaqui da Empresa Maranhense de Administração Portuária (EMAP) e dois terminais privados, o Terminal Ponta da Madeira da Vale e o Terminal da Alumar (FERES, 2010; DINIZ et al., 2014).

O porto do Itaqui está classificado entre os mais extensos do litoral brasileiro. Nele aportam navios de grande calado, transportando os mais diversificados produtos industrializados, além de sub-produtos extraídos do petróleo e também uma grande quantidade de minério. A extensão do seu cais é de 1616 metros. O canal de acesso possui profundidade natural mínima de 27 metros e largura aproximada de 1,8 km, características que o tornam o segundo porto de maior calado do mundo (FERES, 2010; DINIZ et al., 2014).

O Sistema Estuarino de Santos e São Vicente está localizados no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. Trata-se de um dos estuários mais importantes do país sob o ponto de vista socioeconômico uma vez que esta área dispõe de um grande complexo industrial, situado em Cubatão, bem como o maior porto da América Latina em tamanho e movimentação de carga. O Porto de Santos é o responsável por um terço da balança comercial brasileira (PEREIRA, 2012).

Por esse motivo está ocorrendo um aumento no interesse em estudar esses compostos por diversos grupos de pesquisa. Atualmente na literatura há diversos métodos de se medir os compostos clorotalonil, diuron, irgarol e tiram em água de mar; em todos os métodos analíticos comumente empregados pode-se observar etapas de extração e pré concentração seguida de análise cromatográfica (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

A etapa de isolamento dos compostos é muitas vezes necessária devido às baixas concentrações desses contaminantes no ambiente e seu efeito matriz. Dentre as técnicas de extração mais aplicadas estão, a Extração Líquido-Líquido (LLE), a Microextração em Fase Sólida (SPME) e a Extração em Fase Sólida (SPE) usando preferencialmente cartuchos de adsorção de fase-reversa (GATIDOU et al, 2004; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Dentre estas, a SPE é a técnica mais comum de extração e pré-concentração, sendo utilizada devido à necessidade de uma menor quantidade de solventes orgânicos, o que torna o custo menor e com produção de menores quantidades de resíduos. A SPE apresenta recuperação adequada para vários e distintos analitos e um menor tempo de extração (KNUTSON et al, 2006).

Ocorrência dos biocidas anti-incrustantes em diferentes matrizes

A Tabela 1 apresenta um breve levantamento da ocorrência de biocidas anti-incrustantes de terceira geração em diferentes matrizes com os respectivos métodos de extração e detecção aplicados.

O irgarol e diuron são os mais comumente usados como ativos nas formulações de tintas, no entanto esses novos biocidas e seus produtos de degradação são mais estáveis do que a outros biocidas.

Tabela 1 – Ocorrência dos biocidas e métodos analíticos aplicados para diferentes matrizes

Área de estudo	Biocidas	Matriz	Extração	Análise	Conc. (ng L ⁻¹ ou ng g ⁻¹)	Ref.
Bushehr, Golfo Pérsico	Irgarol 1051 e diuron	Água de mar	MF-LPME	HPLC-DAD	Diuron: < 4,8 a 29,1 Irgarol: <1,0 a 63,4	Saleh et al., 2016
Panamá	Irgarol 1051, diuron e diclofluanida.	Água de mar	SPE, C18	LC-MS/MS	Diuron: 2,7–70 Irgarol: <0,5 a 5,0	Batista-Andrade et al., 2016
Ilhas Égadas, Itália	Diuron, irgarol clorotalonil e o diclofluanida	Água de mar	LLE, DCM	GC-MS	Diuron: 200 Irgarol: 2,5 Clorotalonil: nd Diclofluanida: nd	Massanisso et al., 2015
Ilhas Égadas, Itália	Diuron, irgarol clorotalonil e o diclofluanida	Sedimento	Agitação mecânica, DCM	GC-MS	Diuron: nd Irgarol: nd Clorotalonil: nd Diclofluanida: nd	Massanisso et al., 2015
Ilha de Gran Canária, Espanha	Irgarol 1051 e diuron	Músculo de peixe	MAE	LC-MS	Diuron: 0,51 a 1,73 Irgarol: 0,35 a 0,84	Franco-Barrios et al., 2014
Ilha de Gran Canária, Espanha	Irgarol 1051 e diuron	Fígado de peixe	MAE	LC-MS	Diuron: nd Irgarol: 0,53 a 1,054	Franco-Barrios et al., 2014
São Luís, Brasil	Irgarol e diuron	Água de mar	SPE, C18	LC-MS	Diuron: 50 a 780 Irgarol: 10 a 480	Diniz et al., 2014
Califórnia, USA	Irgarol 1051 M1 Diuron	Água de mar	SPE, C18	LC-MS	Irgarol: 2 a 254 M1: <1 a 62 Diuron: <2 a 68	Sapozhnikova et al., 2013
Califórnia, USA	Irgarol 1051 M1 Diuron	Sedimento	ASE, DCM	LC-MS	Irgarol: <0,3 a 8,9 M1: <0,3 a 5,3 Diuron: <0,3 a 4,2	Sapozhnikova et al., 2013
Ilha Zhoushan, China	Diuron	Água de mar	SPE, C18	HPLC - UV	Diuron: 3,0 a 52,1	Xu et al., 2013
Ilha Zhoushan, China	Diuron	Sedimento	Soxhlet, SPE	HPLC - UV	Diuron: 0,3 a 3,9	Xu et al., 2013
Ilhas do Mar de Seto, Japão	Diuron e irgarol	Água de mar	SPE, C18	HPLC - UV	Diuron: 10 a 62 Irgarol: 11 a 55	Balakrishnan et al., 2012
Ilhas do Mar de Seto, Japão	Diuron e irgarol	Sedimento	Agitação mecânica, ACN	HPLC - UV	Diuron: 10 a 90 Irgarol: 11 a 68	Balakrishnan et al., 2012
Ilhas do Mar de Seto, Japão	Diuron e irgarol	Plâncton	Ultrassom	HPLC - UV	Diuron: 75 a 450 Irgarol: 20 a 360	Balakrishnan et al., 2012
Coreia	Clorotalonil, diclofluanida e irgarol	Água de mar	LLE	GC-MS	Clorotalonil: 29,78 Diclofluanida: 21,77 Irgarol: 11,82	Lee et al., 2011

Tabela 1(cont.) – Ocorrência dos biocidas e métodos analíticos aplicados para diferentes matrizes

Ilha de Gran Canária, Espanha	Diuron, irgarol, TCMTB e diclofluanida	Água de mar	SPE, C18	LC–MS/MS	Diuron: 2 a 195 Irgarol: 2 a 146 Diclofluanida: nd TCMTB: nd	Sánchez-Rodríguez et al., 2011
Hong Kong, China	Irgarol e PD's (M1, M2 3 M3)	Sedimento	Ultrassom, Acetona	LC–MS/MS	Irgarol: 0,20 a 21,26 M1: 0,18 a 18 M2: 0,13 a 1,50 M3: 0,006 a 0,70	Tsang et al., 2009
Hong Kong, China	Irgarol e PD's (M1, M2 3 M3)	Tecidos de moluscos	Ultrassom, Acetona	LC–MS/MS	Irgarol: 0,35 a 1,17 M1: 1,0 a 5,10 M2: 1,5 a 2,80 M3: 0,089 a 0,44	Tsang et al., 2009
Vietnã	Clorotalonil, diclofluanida e irgarol	Sedimento	Agitação mecânica	LC-MS	Diuron: 0,11 a 3,0 Diclofluanida: <0,10 a 13 Irgarol: 0,05 a 4,0	Harino et al., 2006
Vietnã	Clorotalonil, diclofluanida e irgarol	Tecido de mexilhão	Agitação mecânica	LC-MS	Diuron: Diclofluanida: nd Irgarol: nd	Harino et al., 2006
Ilha de Lesbos, Grécia	Diuron, DCA, DCPMU, DCPU Irgarol e M1	Água de mar	SPE, C18	HPLC - DAD	Diuron: 30 a 50 DCA: nd DCPMU: nd DCPU: nd Irgarol: 40 a 50 M1: nd	Gatidou et al. (2005)

Segundo a literatura, atualmente aplica-se diversas técnicas analíticas para determinação desses biocidas e seus produtos de degradação, dentre eles pode-se citar a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) devido à sensibilidade e ao desenvolvimento de novos instrumentos e novas interfaces para o acoplamento de espectrômetros de massas (MS) (GIMENO et al, 2004).

A cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) é um método bastante utilizado na análise de biocidas em amostras aquosas, por ser sensível e proporcionar informações de natureza tanto qualitativa quanto quantitativa, sendo os analitos adequadamente separados e, em seguida, detectados. (GIMENO et al, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo investigar a presença dos biocidas de terceira geração, clorotalonil, diuron, irgarol e tiram, utilizados em tintas anti-incrustantes, em amostras de água de mar provenientes de ambientes portuários brasileiros.

2.2 Objetivos específicos

Validar o método analítico para a determinação simultânea dos biocidas anti-incrustantes clorotalonil, diuron, irgarol e tiram em amostras de água de mar.

Aplicar o método analítico desenvolvido para determinar o clorotalonil, diuron, irgarol e tiram em amostras de águas coletadas em diferentes pontos do Complexo Portuário de São Luís, MA e do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, São Paulo.

3 MATÉRIAS E MÉTODOS

3.1 Materiais e reagentes

Os materiais utilizados foram previamente lavados com solução de Extran® alcalino a 5%, e depois enxaguados com água potável e posteriormente com água ultra pura. A secagem dos materiais volumétricos foi feita à temperatura ambiente e os demais, em estufa a aproximadamente de 45 °C.

Para o desenvolvimento do método analítico foram utilizados os seguintes equipamentos e reagentes: Sistema de extração a vácuo (Manifold), com capacidade para 12 cartuchos – Agilent Technologies (EUA); balança eletrônica, modelo APX 200 com faixa de pesagem de 0,10 mg a 200 g da Denver Instrument, (USA); Banho de ultra-som 2848D – Odontobras (Brasil); Compressor\Aspirador- Diapump, Fanem® (Brasil); Sonda Paramétrica YSI® Professional Plus (USA). Sal marinho sintético (Red Sea Salt, Germany). Metanol, grau cromatográfico, (J. T. Baker). Água ultrapura preparada no laboratório com o sistema de purificação Milli-Q, Millipore (USA). Os cartuchos de SPE (Chromabond® C18 500 mg, 6 mL) foram adquiridos da Agilent Bond Elut (USA).

Os padrões analíticos do clorotalonil, diuron irgarol e tiram foram adquiridos da Sigma Aldrich (USA) com pureza de 98%. A partir dos padrões sólidos, foram preparadas soluções-estoque na concentração de 1000 mg L⁻¹ e armazenados a 4 °C até sua utilização para o preparo das soluções de trabalho em diferentes concentrações.

A Extração em Fase Sólida (SPE) foi feita com cartuchos Chromabond® do tipo seringa, da Macherey-Nagel, preenchidos com material adsorvente C18 (octadecilsilano) com quantidade de adsorvente de 500 mg e capacidade de volume de 6 mL.

Para a secagem do eluato oriundo da SPE foi usado o gás nitrogênio, com 99,999% de pureza (White Martins, Brazil).

Para a análise dos biocidas foi utilizado um cromatógrafo a líquido da série 1200, da Agilent® (EUA), composto por: desgaseificador G1322A, Bomba quaternária de alta pressão G1311A, injetor automático ALS G1329A, termostato para controle da temperatura da

fase móvel na coluna G1315A e detector de arrajo de diodos G1315D. A aquisição e o processamento de dados foram realizados com o auxílio do software ChemStation, ver B.03.01.

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna Zorbax Eclipse Plus C-18, da Agilent, com 100 mm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro interno, preenchida com C18 quimicamente ligado a sílica, com partículas de 3,5 µm.

3.2 Coleta e preparo das amostras

Para avaliar a presença dos biocidas anti-incrustantes, clorotalonil, diuron, irgarol e tiram, foram estabelecidos pontos de coleta das amostras de água situados na área sob influência dos portos, sendo, 6 pontos no Complexo Portuário de São Luís situado na Ilha do Maranhão e 8 pontos no Sistema Estuarino de Santos e São Vicente localizado no litoral de São Paulo (Figura 1).

Figura 1- Pontos de coleta no Complexo Portuário de São Luís, MA e no Sistema Estuarino de Santos e São Vicente.

Fonte: Msc. Tiago Silva

As amostras de água de mar foram coletadas em agosto de 2012 e julho de 2013, no cais do Porto do Itaqui – MA, com início na preamar, em níveis máximos de marés cheias, de 5,5 e 5,1 metros, respectivamente. As amostras provenientes do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente foram coletadas em setembro de 2014, também durante a preamar com o nível máximo de 2,0 metros. Os pontos escolhidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Identificação dos pontos de amostragem.

Amostra	São Luís, MA (CAIS)	São Luís, MA^(a) (MAR)	Santos, SP
P1	Pier 104	Pier 104	Ponta da Praia
P2	Berço 103 ^(b)	Berço 103 ^(b)	Terminal 1
P3	Berço 103	Berço 103	Terminal 2
P4	Berço 104	Berço 104	Terminal 3
P5	Berço 102	Berço 102	Cas da Alemoa
P6	Rampa 101	Rampa 101	S. Vicente 1 (Ponte Anchieta)
P7	-	-	S. Vicente 2
P8	-	-	S. Vicente 3

^(a) As coletas feitas em mar, foram a uma distância de pelo menos 20 m do cais.

^(b) Área de mangue

Para a coleta das amostras de água foram utilizados frascos de vidro âmbar, previamente lavados em banho de ácido nítrico a 10% em volume seguida de enxague com água deionizada (CETESB, 2011).

As medidas de temperatura, pH e salinidade da água foram feita no momento da coleta com o auxílio de uma sonda multiparâmetro . As amostras foram transportadas em caixa de isopor para o laboratório e mantidas a 4 °C até a extração e análise que foi feita em até 30 horas após a coleta.

3.3 Extração em Fase Sólida (SPE)

Para adequação do método de extração, foram preparadas soluções da mistura dos compostos nas concentrações; 1,0; 5,0 e 7,5 µg L⁻¹ em água destilada com salinidade ajustada para 35 por dissolução de sal marinho.

O material adsorvente (C18) contido no interior dos cartuchos foi condicionado duas vezes com 2,5 mL de metanol e duas vezes com 2,5 mL de água Milli-Q numa vazão de

4 mL min⁻¹. Em seguida as amostras foram percoladas através dos cartuchos, sob vácuo, na vazão de 1,0 mL min⁻¹ seguido de eluição com 1,0 mL de metanol.

O protocolo SPE aplicado neste estudo foi desenvolvido e relatado por Franco-Barrios et al. (2014). O fluxograma da Figura 2 apresenta as etapas da extração em fase sólida aplicada neste estudo.

Figura 2 - Fluxograma representativo do processo SPE.

Fonte: Autoria própria.

3.4 Análise cromatográfica por HPLC-DAD

A adequação da metodologia analítica foi feita aplicando-se procedimentos descritos na literatura, com pequenas modificações que foram estabelecidas, mediante os testes feitos previamente (THOMAS et al., 2002; GATIDOU et al., 2004; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011).

Foram injetados 20 µL de solução no sistema cromatográfico. A fase móvel consistiu de água ultra pura e metanol, usada no modo gradiente, iniciando-se com 50% de metanol por 3 min e em seguida 80 % por 13 min, na vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Após a corrida cromatográfica, o sistema foi equilibrado por 3 min para voltar às condições iniciais do gradiente de eluição. O detector de arranjo de diodos permitiu verificação dos espectros no UV, no intervalo de 190-380 nm.

Os compostos irgarol e clorotalonil foram analisados em 230 nm e diuron e tiram foram analisados em 248 nm, selecionados por meio dos espectros (máxima absorbância) dos padrões analíticos com concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.5 Parâmetros Analíticos

O desempenho do método foi estabelecido de acordo com os parâmetros de validação, utilizando-se solução padrão e amostra fortificada.

Para a determinação da faixa de trabalho foram feitas curvas analíticas para cada composto em solvente e na matriz, com soluções contendo a mistura dos 4 biocidas nas concentrações de 1,0; 5,0; 7,5; 10; 15 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. A relação linear foi verificada mediante representação gráfica das áreas dos picos cromatográficos e a concentração de cada analito na amostra. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados com base na relação sinal/ruído de 3 e de 10, respectivamente (INMETRO, 2011).

A precisão e a exatidão foram verificadas utilizando-se 3 concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa linear da metodologia. A exatidão foi determinada a partir de ensaios de recuperação dos analitos, que consistiram na adição de quantidades conhecidas de uma solução mista dos biocidas nas mesmas condições. A precisão foi avaliada pela dispersão de resultados entre ensaios com 6 replicatas para cada concentração. Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação e desvio-padrão relativo apresentado entre os valores das determinações para cada nível de concentração (EURACHEM, 2000; INMETRO, 2011).

3.6 Avaliação do efeito de matriz

O efeito de matriz é dependente da natureza química das substâncias analisadas e das características dos componentes endógenos da matriz (tamanho das moléculas, polaridade, salinidade, etc.), por essa razão o efeito de matriz é um grande desafio para a análise quantitativa em amostras complexas (PETERS; REMANE, 2012).

A avaliação do efeito de matriz foi feita, adicionando-se os compostos de interesse à água de mar reconstituída, ausente dos biocidas. Essa solução foi analisada para

verificar o comportamento da resposta dos analitos na amostra em relação aos padrões em solvente.

A razão entre o coeficiente angular da reta na matriz e o coeficiente angular da reta no solvente foram calculados e utilizados para avaliar o efeito dos componentes da matriz no aumento ou supressão do sinal dos analitos no sistema cromatográfico. O resultado, em percentagem do efeito matriz (%EM), foi calculado pela equação 1 (ECONOMOU et al., 2009):

$$\%EM = 100 \frac{(I - I_m)}{I_s} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

% EM é a percentagem do efeito matriz.

I_m é a inclinação da curva padrão feita na matriz;

I_s é a inclinação da curva padrão feita no solvente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Condições cromatográficas para HPLC – DAD.

Para confirmar a presença dos biocidas nas amostras, foi feita a comparação entre os tempos de retenção e os espectros de absorção do extrato da amostra e da solução para cada composto. Na Figura 3 estão apresentados os espectros de absorção para cada composto.

Figura 3 - Espectros de absorção, de 190 a 380 nm, obtidos por HPLC-DAD para os padrões: (a) clorotalonil, (b) diuron, (c) irgarol e (d) tiram, com concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria.

O cromatograma gerado (Figura 4), demonstrou que o método para análise simultânea dos 4 biocidas foi seletivo. O tempo de retenção para cada biocida foi de 3,40 min para o tiram, 10,70 min para o diuron, 13,10 min para o clorotalonil e 14,33 min para o irgarol.

Figura 4- Cromatograma dos biocidas na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, nas condições estabelecidas.

Fonte: Autoria própria.

4.2 Parâmetros Analíticos

A validação do método analítico empregado foi efetuada para avaliar a qualidade analítica dos dados obtidos, o protocolo foi adaptado com base em critérios aceitos em diferentes diretrizes nacionais e internacionais, ANVISA, INMETRO e EURACHEM (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011; MAGNUSSON, B.; ÖRNEMAR, 2014).

Essa adaptação se fez necessária, pois estes guias têm caráter apenas orientativo e por não haver documentos específicos para análise desses biocidas em amostras de água de mar. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação do método, precisão e recuperação (exatidão).

4.2.1. Curva analítica, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).

Na Tabela 3 estão apresentados a faixa linear de trabalho e os dados dos principais parâmetros analíticos do método, valores dos coeficientes de determinação (R^2), equação da reta, limite de detecção e limite de quantificação.

Tabela 3 – Parâmetros analíticos por HPLC-DAD.

Analito	Equação da reta ^(a)	R^2	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^(b)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^(b)
Clorotalonil	$y = 18,064x + 3,1403$	0,998	0,07	0,20
Diuron	$y = 9,3065x - 0,4661$	0,998	0,02	0,07
Irgarol	$y = 15,882x - 5,6013$	0,998	0,15	0,50
Tiram	$y = 6,4181x + 2,040$	0,995	0,35	1,04

^(a) Faixa linear (1 – 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, n = 6 pontos)

^(b) Fator de concentração: 200

O limite de detecção e de quantificação para cada analito foi determinado mediante a razão sinal/ruído igual a 3 e 10, respectivamente (INMETRO, 2011), estabelecendo-se a concentração mínima na qual os analitos podem ser detectados e ainda a menor concentração dos analitos, que pode ser quantificada na amostra, sob as condições experimentais adotadas.

Para avaliar a linearidade do método foi construída curva analítica na matriz para cada composto, com seis concentrações e foi observada a relação matemática entre as áreas dos picos e as concentrações dos analito em estudo.

Observou-se que a faixa de concentração de trabalho selecionada foi aceitável com o sinal analítico, evidenciado pelo valor de coeficiente de correlação superiores a 0,990 (INMETRO, 2011). A Figura 5 apresenta a curva analítica na matriz para cada biocida estudado.

Figura 5 - Curvas analíticas para (a) clorotalonil e (b) diuron (c) irgarol e (d) tiram.

(a) Clorotalonil

(b) Diuron

(c) Irgarol

(d) Tiram

Fonte: Autoria própria.

4.2.2. Exatidão e precisão.

O estudo de recuperação foi feito comparando-se os valores de área das amostras fortificadas antes do processo de extração com os dados obtidos ao analisar as amostras contaminadas após o processo contendo concentrações conhecidas de padrões (branco fortificado).

Os dados de recuperação e de precisão para cada composto estão apresentados na Tabela 4. Considerando-se as recomendações dos órgãos orientadores de validação, o intervalo de recuperação recomendável deve ficar entre 70 e 120%, para todos os biocidas estudados os valores de recuperação estão dentro dessa faixa de trabalho sendo, portanto, aceitáveis (INMETRO, 2011).

Tabela 4 – Dados da recuperação e da precisão do método.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	REC. % (RSD%, n = 6)			
	Clorotalonil	Diuron	Irgarol	Tiram
1,0	106,90 (5,45)	111,28 (5,80)	112,67 (7,60)	101,03 (9,03)
5,0	72,11 (6,35)	89,36 (5,20)	91,49 (6,28)	106,54 (6,49)
7,5	96,10 (7,81)	114,30 (4,60)	113, 16(3,10)	76,68 (3,00)

(%RSD) – estimativa de desvio padrão relativo (n=6).

Fonte: Autoria própria

A precisão foi avaliada em relação aos níveis de repetibilidade. Para esta finalidade seis amostras foram enriquecidas em três diferentes níveis de concentração 1,0; 5,0 e 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A precisão do método foi aceitável para todos os compostos e em todos os níveis estudados, com RSD inferiores a 10%, o que demonstra adequação do método para a análise dos biocidas clorotalonil, diuron, irgarol e tiram em amostras de água de mar.

4.3 Avaliação do efeito de matriz

O efeito de matriz (EF) foi avaliado através da relação entre o coeficiente angular da curva analítica em solvente com o coeficiente angular da curva analítica na matriz, para cada composto. O diuron, o irgarol, o clorotalonil e o tiram apresentaram efeito de matriz de 8,84; 8,82; 13,64 e 12,26%, respectivamente, o que pode ser considerado aceitável, uma vez que esses valores, refletem os resultados de recuperação acima de 100% (ECONOMOU et al., 2009).

4.4 Determinação dos biocidas anti-incrustantes em amostras de água coletadas em portos brasileiros.

As amostragens foram feitas na estação chuvosa, nos meses de agosto em São Luís e setembro em Santos. Observou-se que as amostras foram semelhantes em relação aos parâmetros físico e químicos, pH e salinidade nos locais de coleta.

Para as amostras coletadas no Complexo Portuário de São Luís, Maranhão, o pH ficou entre 8,04 e 8,25 a temperatura da água entre 25 e 28 °C e salinidade 36 ‰. Já para as amostras coletadas no sistema estuarino de Santos e São Vicente, São Paulo as medidas de pH variaram entre 8,04 e 8,27 a temperatura da água 22 °C e salinidade 35 ‰.

Os valores encontrados são característicos desses ambientes e estão de acordo com o intervalo citado na Resolução CONAMA Nº 357/05 para águas salinas (salinidade igual ou superior a 30 ‰ e pH entre 8,04 e 8,27) (CONAMA, 2005).

O método analítico desenvolvido nesse estudo foi aplicado para avaliação da concentração dos biocidas anti-incrustantes clorotalonil, diuron irgarol e tiram em amostra de água de mar coletadas em duas zonas portuárias brasileiras. No porto de Itaqui, na Ilha do Maranhão e no sistema estuarino de Santos e São Vicente, no estado de São Paulo.

O anti-incrustante clorotalonil não foi detectado em nenhum dos pontos amostrados, isso possivelmente por esse biocida ter baixa solubilidade em água (0,6 a 1,2 mg L⁻¹), meia-vida de apenas algumas horas e ser susceptível à biodegradação e fotodegradação na coluna de água. (CAUX et al., 1996; CASTRO et al., 2011).

O tiram foi detectado em dois pontos de coleta do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, com valores próximos e abaixo do limite de quantificação (LQ = 1,04 µg L⁻¹) do método nas concentrações de 1,30 e 0,45 µg L⁻¹ respectivamente.

O fato de não ser observada a presença dos biocidas clorotalonil e o tiram nas amostras de água de mar, deve ser porque apenas a poucos anos eles começaram a ser adicionados às tintas anti-incrustantes, geralmente em conjunto com cobre como “biocidas de reforço”. Segundo a literatura há apenas registro de cinco tintas contendo o anti-incrustante tiram como princípio ativo e somente uma contendo o clorotalonil (ACE, 2002).

Os biocidas diuron e irgarol, foram encontrados na maioria das amostras de água de mar dos pontos de coleta entre 0,30 e 7,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diuron e 1,98 e 5,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ de irgarol. Isso se deve ao uso mais frequente desses dois biocidas e também a algumas propriedades físicas e químicas como o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) de 2,6 e 3,7 para diuron e irgarol respectivamente, o que indica considerável tendência das substâncias em se associarem a sedimentos com elevado teor de matéria orgânica, como ocorre nas regiões de mangue. (MOHR et al, 2008)

O diuron é considerado relativamente persistente em água salina com meia-vida que varia de 43 a 2180 dias. O irgarol é considerado pouco biodegradável e sua degradação, tanto em águas doces quanto salinas, é bastante lenta, observando-se tempos de meia-vida entre 1 e 3 meses (GATIDOU et al., 2005; SAPOZHNIKOVA et al., 2008, CASTRO et al., 2011). A Tabela 5 apresenta as concentrações dos biocidas estudados nos diferentes pontos estudados.

Tabela 5- Concentrações dos biocidas diuron, irgarol e tiram em amostras de águas de mar coletadas em zonas portuárias brasileiras.

Amostras Local	Pontos	Conc. $\mu\text{g L}^{-1}$		
		Diuron	Irgarol	Tiram
São Luis/2012 (CAIS)	P1	0,56	3,02	<LQ
	P2	0,80	<LQ	<LQ
	P3	0,94	4,77	<LQ
	P4	3,05	2,81	<LQ
	P5	4,70	<LQ	<LQ
	P6	7,11	4,56	<LQ
São Luis/2012 (MAR)	M1	7,40	4,21	<LQ
	M2	4,72	3,96	<LQ
	M3	3,01	5,50	<LQ
	M4	4,12	5,70	<LQ
	M5	3,70	<LQ	<LQ
São Luis/2013 (CAIS)	P1	<LQ	<LQ	<LQ
	P2	<LQ	<LQ	<LQ
	P3	<LQ	<LQ	<LQ
	P4	<LQ	<LQ	<LQ
	P5	<LQ	<LQ	<LQ
	P6	<LQ	<LQ	<LQ
SANTOS/SÃO VICENTE 2015	P1	<LQ	1,98	1,30
	P2	0,30	2,33	0,45
	P3	0,54	<LQ	<LQ
	P4	<LQ	<LQ	<LQ
	P5	1,26	<LQ	<LQ
	P6	0,52	<LQ	<LQ
	P7	<LQ	<LQ	<LQ
	P8	<LQ	<LQ	<LQ

5 CONCLUSÕES

O método analítico empregado SPE – HPLC/DAD, permitiu a determinação simultânea dos biocidas anti-incrustantes clorotalonil, diuron, irgarol e tiram em amostras de água de mar.

O método analítico para amostras de água de mar coletadas nos dois importantes portos do Brasil permitiu a determinação do diuron, do irgarol e do tiram. A região que apresentou maior concentração de diuron e de irgarol foi o Complexo Portuário de São Luís. Esse fato pode estar relacionado com período de expansão da infraestrutura portuária que ocorreu de 2012 a 2014.

Não foi detectado o biocida clorotalonil e a baixa concentração de tiram encontrada nos dois pontos amostrados, pode estar relacionada provavelmente mais a fontes de poluição urbana do que a embarcações, devido ao número restrito de formulações que contêm esses compostos.

REFERENCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas**. Brasília, 2011.

ALMEIDA, E. A.; BAINY, A.C.D.; LOUREIRO, A.P.M.; MARTINEZ, G.R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L.F.; GARCIA, C.C.M.; PRADO, F.M.; RONSEIN, G.E.; SIGOLO, C.A.; BROCHINI, C. B.; MARTINS, A.M. G.; MEDEIROS, M.H. G.; MASCIO, P. D. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, p. 588-600, 2007.

ASSESSMENT OF ANTIFOULING AGENTS IN COASTAL ENVIRONMENTS (ACE) MAS3-CT98-0178. **Final Scientific and Technical Report European Commission**, p. 1–53, 2002. (Relatório técnico)

BATISTA-ANDRADE, J.A.; CALDAS, S. S.; ARIAS, J.L.O; CASTRO, I. B; FILLMANN, G.; PRIMEL, E. G. Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones. **Marine Pollution Bulletin**, 2016. Disponível em : <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.045>

BRASIL, Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 de março de 2005.

CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v. 34, p. 1021-1031, 2011.

CAUX, P.Y.; KENT, R.A.; FAN, G. T.; STEPHENSON, G. L. Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 26, p. 45–93, 1996.

CHAMP, M. A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **Science of the Total Environment**. v. 258, p. 21-71, 2000.

DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; COUTINHO, R. Bioincrustação marinha. In: Pereira, R.C. ; Soares-Gomes, A. (orgs.) *Biologia Marinha*. 2ª edição, **Editora Interciência**, Rio de Janeiro, p. 299-318. 2009.

DINIZ, L. G. R. **Identificação de resíduos de Irgarol em amostras de água da região portuária de São Luís, MA, e avaliação da toxicidade aguda e crônica do algicida frente a organismos aquáticos**. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação)- Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

DINIZ, L. G. R.; JESUS, M. S.; DOMINGUEZ, L. A. E.; FILLMANN, G.; VIEIRA, E. M.; FRANCO, T. C. R. S. First appraisal of water contamination by antifouling booster biocide of 3rd generation at Itaqui Harbor (São Luiz - Maranhão - Brazil). **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 25, p.380-388, 2014.

DIRETORIA DE PORTOS E COSTAS - MINISTÉRIO DA DEFESA (DPC). **NORMAM 23/DPC - Controle de sistemas anti-incrustantes danosos em embarcações**. 2007. Disponível em www.dpc.mar.mil.br/normam/N23/N_23.htm Acesso em 20/10/2015.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S. E.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.5856-5867, 2009.

FERES, S. J. C. **Organismos Exóticos: Uma ameaça a sustentabilidade ambiental do golfo maranhense**. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade de Ecossistemas) - Universidade Federal do Maranhão. São Luís. 219p, 2010.

FRANCO-BARRIOS, A.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Development and application of a microwave-assisted extraction and LC/MS/MS methodology to the determination of antifouling booster biocides in sea mullets *Mugil cephalus* organisms. **Journal of AOAC International**. v. 97, p. 197- 04, 2014.

GATIDOU, G.; KOTRIKLA, A.; THOMAIDIS, N. S.; LEKKAS, T. D. Determination of two antifouling booster biocides and their degradation products in marine sediments by high performance liquid chromatography–diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 505, p. 153-159, 2004.

GIMENO, R. A.; MARCÉ, R.M; BORRULL, F. Determination of organic contaminants in coastal water. **Trends in Analytical Chemistry**, v.23, p. 341–350 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008**, Rev.o 04 – JULHO/2011.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION (IMO). **International convention on the control of harmful anti-fouling systems on ships**. London, 2001. Disponível em: [http://www.imo.org/about/conventions/listofconventions/pages/international-convention-on-the-control-of-harmful-anti-fouling-systems-on-ships-\(afs\).aspx](http://www.imo.org/about/conventions/listofconventions/pages/international-convention-on-the-control-of-harmful-anti-fouling-systems-on-ships-(afs).aspx). Acesso em: 12 mar. 2014.

KANNAN, K.; TANABE, S. Global Contamination by Organotin Compounds. In ARAI, T.; HARINO, H.; OHJI, M.; LANGSTON; W.J. (ed.) *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. p. 39-60, 2009.

KNUTSON, S.; DOWNS, C.; RICHMOND, R. H. Concentrations of Irgarol in selected marinas of Oahu, Hawaii and effects on settlement of coral larval. **Ecotoxicology**. v.21, p. 1-8, 2012.

KONSTANTINOU, I. K.; ALBANIS, T. A.; Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**. n.30, p. 2035-2048, 2004.

KOTRIKLA, A. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. **Journal of Environmental Management**. v. 90, p. S77-S85, 2009.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. (eds.) **Eurachem Guide: the fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics**, 2. Ed, 2014.

MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. J.; BABARRO, J. M. F.; LAHOZ, F.; SANSÓN, M.; MARTÍN, V. S.; NORTE, M.; FERNÁNDEZ, J. J. From Broad-Spectrum biocides to quorum sensing disruptors and mussel repellents: antifouling profile of alkyl triphenylphosphonium salts. **PLoS ONE**. v. 10, p. 1-30, 2015.

PARREIRA, C.N. **Avaliação da hidrodinâmica e da poluição no Canal de Piaçaguera, no Estuário de Santos-São Vicente (SP), a partir de informações ambientais e modelagem numérica**. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) - Universidade de São Paulo. São Paulo. 176p, 2012.

PETERS, F. T.; REMANE, D. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography – mass spectrometry to forensic and clinical toxicology – a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p.2155-2172, 2012.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ. Analytical methods for the determination of common booster biocides in marine samples. **Central European Journal of Chemistry**. v. 10, p 521-533, 2012.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ. Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC–MSMS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments. **Chemosphere**. v.82 p. 96–102, 2011.

SAPOZHNIKOVA, Y.; WIRTH, E.; SCHIFF, K.; BROWN, J.; FULTON, H. Antifouling pesticides in the coastal waters of Southern California. **Marine Pollution Bulletin**. v. 54, p. 1962-1989, 2007.

THOMAS, K. V.; MCHUGH, M.; WALDOCK, M. J. Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. **The Science of the Total Environment**. v. 293, p. 117- 127, 2002.

CAPITULO II

DETERMINAÇÃO DE DIURON E IRGAROL 1051 EM ORGANISMOS MARINHOS USANDO DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

RESUMO

Este estudo analisa e compara dois métodos diferentes de extração, a extração assistida por micro-ondas e assistida por ultrassom, seguido por análise com HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de diuron e irgarol em tecidos moluscos. Devido aos regulamentos restritivos do tributilestano agente anti-incrustantes de altos níveis de contaminação nos ecossistemas marinhos e costeiros, os estudos com alternativas para tintas anti-incrustantes livre de estanho aumentou. Cerca de vinte e três compostos orgânicos não-metálicos em todo o mundo são atualmente utilizados como biocidas em tintas anti-incrustantes. No entanto, poucos estudos têm lidado com métodos para a determinação de biocidas anti-incrustantes em amostras biológicas. Alguns estudos relataram a presença de diuron, irgarol e M1 (um produto de degradação Irgarol) em algas marinhas e tecidos de moluscos em ng g^{-1} . O uso de tecidos moles de moluscos podem ser uma opção viável para a determinação de anti-incrustação nas zonas portuárias, como alguns estudos relataram uma relação de causa e efeito entre a exposição a tintas anti-incrustantes contendo organoestânicos e o desenvolvimento de imposex em *Stramonita haemastoma*, um molusco, muitas vezes encontrado em costas rochosas. Este molusco é anatomicamente relacionado com espécies do gênero *Thais*, comumente encontrada em águas tropicais e temperadas. Para avaliar as técnicas de extração, foram feitas análises experimentais dos métodos. A extração assistida por microondas (MAE) foi o método mais eficaz, apresentando recuperações entre 65-70% para diuron e 85-87% para irgarol

Palavras-chave: biocidas anti-incrustantes, poluição marinha, *Stramonita haemastoma*

ABSTRACT

This study examines and compares two different extraction techniques, microwave- and ultrasound-assisted extraction, followed by liquid chromatography - mass spectrometry for the determination of Diuron and Irgarol 1051 in shellfish tissues. Due to restrictive regulations of the antifouling agent tributyltin and high levels of contamination in marine and coastal ecosystems, the study of alternatives for tin-free antifouling paints has increased. Approximately twenty-three non-metallic organic compounds worldwide are currently used as biocides in antifouling paints. Few studies however have dealt with methods for the determination of booster biocides in biological samples. Some studies reported the presence of diuron, irgarol 1051, and M1 (an irgarol degradation product) in marine algae and molluscs tissues in ng g^{-1} . The use of soft tissues of clams may be a feasible option for the determination of antifouling in port areas, as some studies reported a cause-and-effect relationship between exposure to organotin antifouling paints and the development of imposex in *Stramonita haemastoma*, a mollusc often found in rocky shores. This mollusc is anatomically related to species of the genus *Thais*, commonly found in tropical and temperate waters. To assess the extraction techniques, experimental analysis of the methods were performed. Microwave-assisted extraction (MAE) was the most effective method, presenting recoveries between 65-70% for diuron and 85-87% for Irgarol.

Keywords: antifouling substances, marine pollution, *Stramonita haemastoma*

1 INTRODUÇÃO

Biocidas usados como princípios ativos em tintas anti-incrustantes fazem parte do grupo de micropoluentes potencialmente danosos a ecossistemas marinhos, costeiros e estuarinos (NICOLODI et al., 2009, CASTRO et al., 2011).

O uso prolongado do tributilestanho (TBT) apresentou sérios problemas ambientais, como mutações genéticas em moluscos e ostras devido à alta toxicidade (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011). Estudos feitos por Alzieu et al. (1986), descrevem a relação entre a presença de compostos organoestânicos e alterações denominadas de imposex, em que fêmeas de moluscos gastrópodes passaram a apresentar formação de pênis e de vaso deferente. Em toda a costa brasileira já foram registrados casos de imposex para dez espécies de moluscos (CASTRO et al., 2012).

O molusco *Stramonita haemastoma*, Mollusca, Gastropoda são organismos marinhos frequentemente encontrados em costões rochosos, relacionados anatomicamente com espécies do gênero *Thais*, e são comumente, encontrados em águas tropicais e temperadas, incluindo o Mediterrâneo, América do Norte, Caribe, América do Sul, Austrália e Ásia.

Estes moluscos ocorrem até mesmo em águas frias da Coreia e do Japão (LIMAVERDE et al., 2007). Eles moluscos são amplamente distribuídos ao longo da costa brasileira (RIBEIRO, 2002).

O *Stramonita haemastoma* é considerado um organismo bioindicador de TBT (FERNANDEZ et al., 2006) por apresentar dimorfismo nas estruturas reprodutoras de fêmeas, como um “sexo imposto”, denominado “imposex” uma modificação morfofisiológica sexual causada por poluentes tóxicos em moluscos gastrópodes, ocorre o surgimento de caracteres sexuais masculinos (Figura 1), tais como pênis e canal deferente em fêmeas desses moluscos expostas a compostos orgânicos de estanho tais como o tributilestanho (TBT) e o trifenilestanho (TPT) (MATHIESSEN ; GIBBS, 1997, GARAVENTA et al., 2006).

Figura 1 -*Stramonita haemastoma* com imposex.

Fonte: Dr. Ítalo Braga Castro, UNIFESP.

Imposex é uma anomalia notada geralmente em populações de moluscos presentes em zonas portuárias. O tributilestanho que por agir nas mesmas vias metabólicas da enzima que converte os androgênios em estrogênios (aromatase), inibe a transformação hormonal mediada por ela ou por desativação do complexo enzimático ou por competição bioquímica (BORGES, 1997).

Por isso, os tecidos moles dos moluscos podem ser uma opção disponível para a avaliação química sobre a presença de biocidas anti-incrustantes em diferentes áreas. Antes disso, é necessário desenvolver um método eficiente e viável para extrair e determinar biocidas anti-incrustantes em amostras biológicas.

Ensaio ecotoxicológicos com organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos (produtor, consumidores primário, secundário e terciário e decompositor) podem, juntamente com a determinação analíticas dos biocidas, prover informações importantes dos efeitos de contaminantes sobre a biota marinha, avaliando diferentes efeitos de toxicidade, IC₅₀ (inibição do crescimento) e LC₅₀ (letalidade) (IHARA, 2008).

São poucos os estudos relacionados com a presença de biocidas nos ecossistemas aquáticos da América do Sul. Dominguez (2010) e Demoliner et al. (2010) determinaram os níveis de irgarol e diuron em amostras do estuário da Lagoa dos Patos e no rio Guaíba, ambos no estado do Rio Grande do Sul. Em São Paulo, Azevedo et al. (2004) investigaram irgarol no rio Paraíba do Sul, e Diniz et al. (2014) determinaram irgarol e de diuron em amostras de água do Complexo Portuário de São Luís na Ilha do Maranhão.

Conhecer a situação e as tendências da contaminação ambiental por compostos anti-incrustantes na costa brasileira, é uma ferramenta valiosa para nortear políticas de fiscalização e gestão ambiental em áreas sob a influência de portos, marinas e estaleiros (PERINA et al., 2011).

Em termos de ecossistemas e espécies, a extensão e a diversidade da zona costeira e marinha brasileira, configuram situações distintas e peculiares, em que a biodiversidade local e as inúmeras espécies endêmicas sobrepõem rotas migratórias, sítios de condicionamento e desova para espécies migratórias de distribuição global. Assim, a preservação ou a degradação de determinados ecossistemas não têm apenas efeito local (ANA, 2002; ZAMBONI; NICOLODI, 2008).

A perda de espécies endêmicas implica no empobrecimento da biodiversidade global e na devastação ou fragmentação de habitats e isso pode gerar efeitos amplificados sobre

diversas populações, interferindo na dinâmica de ecossistemas muitas vezes distantes das áreas expostas a esses anti-incrustantes (ANA, 2002; ZAMBONI; NICOLODI, 2008).

O diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) é um herbicida que pertence ao grupo dos derivados da ureia, sendo também recomendado no controle de ervas daninhas mono e dicotiledôneas, geralmente aplicado no solo ou borrifado sobre as culturas agrícolas. (MELLO et al., 2009).

O irgarol pertence ao grupo das s-triazinas e atua na inibição do transporte de elétrons no sistema fotossintético (PSII) nos cloroplastos, sendo mais tóxico que algumas triazinas que atuam da mesma forma, por exemplo, atrazina ou simazina (MOHR et al., 2008). A estrutura química do irgarol e do diuron estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2 -Estruturas químicas de irgarol e diuron.

Fonte: Adaptação de Sakkas et al, 2002.

Na Tabela 1 estão descritas as principais propriedades físicas e químicas do diuron e do irgarol.

Tabela 1- Propriedades físicas e químicas dos biocidas.

Biocida	MM (g mol ⁻¹)	pKa	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Pressão de Vapor (mPa), 25°C	Log Kow	Grupo Químico
Diuron C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233,1	13,55	42,0	1,1. 10 ⁻⁶	2,81-2,87	Feniluréia
Irgarol C ₁₁ H ₁₉ N ₅ S	253,36	4,13	7,0	8,8. 10 ⁻⁵	3,70 – 3,95	Triazina

A análise de diuron e de irgarol em amostras de água de mar tem sido feita em várias partes do mundo. O diuron, por exemplo, foi encontrado em amostras de águas costeiras

da Inglaterra e da Espanha em concentrações variando entre 10^{-2} e $10^{-1} \mu\text{g L}^{-1}$ (BOXALL et al., 2000; MARTINEZ et al., 2001; THOMAS et al., 2001).

O irgarol já foi encontrado em concentrações na faixa de 0,001 a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, em amostras de água de áreas portuárias de países da Europa, nos Estados Unidos, e no Japão (SARGENT et al., 2000; THOMAS et al., 2001; GARDINALI et al., 2002; SAKKAS et al., 2002; BOWMAN et al., 2003; HARINO et al., 2006; DINIZ et al., 2014).

Embora estudos que investigam a contaminação por biocidas anti-incrustantes tenham sido relatados em vários países, existem poucos dados disponíveis sobre a presença de diuron e de irgarol em amostras biológicas (BOXALL et al., 2000; THOMAS et al., 2002). Esses compostos possuem o potencial de acumulação nos sedimentos e biota. Além disso, o acúmulo de biocidas na biota ainda não foi estudado até o momento (HARINO et al. 2006a).

Existem poucas pesquisas focadas na determinação e consequência de substâncias anti-incrustantes em organismos marinhos. Dessa forma, estudos mais abrangentes que tenham por objetivo fornecer suporte a pesquisadores em relação a estudos ecotoxicológicos em áreas sob a influência de portos, são de fundamental importância (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Os biocidas anti-incrustantes estão normalmente presentes em baixas concentrações no ambiente costeiro e marinho. A determinação desses compostos, portanto, envolve etapas de extração pré-concentração e limpeza da amostra, de forma a torná-los suficientemente perceptíveis pelos sistemas de detecção atualmente disponíveis.

Considerando, assim, as baixas concentrações dos biocidas anti-incrustantes em amostras de água e de sedimentos marinhos, é comum haver um grande número de interferentes presentes na matriz que podem comprometer os resultados das análises.

Poucos estudos relatam métodos para a determinação dos anti-incrustantes em matrizes biológicas. Nos estudos disponíveis, geralmente são empregadas técnicas convencionais aplicadas a análise de sedimentos tais como, a extração Soxhlet usando solventes como acetona e diclorometano (bastante tóxicos e, portanto, pouco recomendados), agitação

mecânica com hexano: acetona (também bastante tóxicos) e ultrassom com acetona (SÁNCHEZ - RODRÍGUEZ et al., 2012; ANSANELLI ; DI LANDA, 2014).

Outros métodos que usaram extrações alternativas, tais como extração assistida por micro-ondas (MAE), cujo o processo é mais simples e requer menos tempo, e ainda, apresenta as vantagens de baixo custo, menor consumo de solvente orgânico (cerca de 10 mL), e a capacidade de processar um maior número de amostras simultaneamente. (ESKILSSON; BJÖRKLUND, 2000; CAMEL, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo investigar a presença de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes em ambientes portuários, mediante desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para a determinação de irgarol e de diuron em amostras de moluscos marinhos.

2.2 Objetivos específicos

Desenvolver, validar o método analítico para determinação dos biocidas anti-incrustantes, diuron, irgarol, em amostras de tecido biológico de moluscos gastrópodes.

Comparar dois métodos de extração, por ultrassom e micro-ondas assistida (MAE), seguido por análise cromatográfica líquida - espectrometria de massas para a determinação do diuron e do irgarol em amostras de moluscos.

Aplicar o método analítico para a determinação dos biocidas anti-incrustantes, diuron e irgarol, em amostras de tecido biológico dos moluscos, *Monodonta turbinata*, coletados na Ilha de Gran Canaria, Espanha e *Stramonita haemastoma*, provenientes da Ilha de São Luís –Maranhão – Brasil.

3 MATÉRIAS E MÉTODOS

3.1 Materiais e reagentes

Todos os materiais utilizados foram previamente lavados com solução de Extran® alcalino a 5%, e depois enxaguados seguidamente, com água potável e água ultra-pura. No caso de material volumétrico, a secagem foi feita ao ar. Para os demais materiais, procedeu-se à secagem em estufa a cerca de 40 °C.

O diuron e o irgarol foram adquiridos da Sigma Aldrich (USA) em níveis de pureza de 98 %. Foram preparadas soluções-estoque em metanol, na concentração de 1000 mgL⁻¹ e armazenados a 4 °C até sua utilização, para o preparo das soluções de trabalho. Metanol, grau cromatográfico, foi fornecido pela Panreac Química SA (Barcelona, Espanha). Água ultrapura (Milli-Q) foi preparada no laboratório com o sistema de purificação Milli-Q, Millipore (USA). Cartuchos de SPE (EnvirElut pesticide 500 mg, 6 mL) foram adquiridos da Agilent Bond Elut (USA).

Para o desenvolvimento do método analítico foram utilizados os seguintes equipamentos: Sistema de extração a vácuo VacElut 20 (manifold), com capacidade para 20 cartuchos – Varian (USA); bomba de vácuo GAST (modelo DOA-P504-BN); Sistema de preparação de amostra em forno de micro-ondas (Multiwave® Anton Paar, Graz, Áustria) com cavidade de capacidade para 6 frascos pressurizados de 50 mL cada de TFM®- PTFE, Liofilizador LYOQUEST-55 (Telstar®, Barcelona, Espanha), banho de limpeza ultra-sônica USC-100TH, VWR (USA).

Sistema HPLC equipado com uma bomba binária, amostrador automático, forno de coluna e um detector de arranjo de diodos. A aquisição e tratamento de dados foram controlados utilizando-se o software Star versão 6.5 (Varian Inc., Madrid, Espanha).

Sistema cromatográfico a líquido acoplado a um espectrômetro de massas com um triplo quadrupolo equipado com uma interface de electrospray (LC-ESI-MSMS). O equipamento é composto de um espectrômetro de massas Varian 320 TQ-MS com um sistema Varian LC constituído por uma bomba binária, um amostrador automático, e o compartimento para coluna com temperatura controlada. Coluna analítica SunFire® C18 (3,0x100 mm) 3,5µm obtida da Waters (USA). O gás para secagem e nebulização (N₂) com pureza > 99 % foi

fornecido por um gerador Zefiro LC/MS 35. O software Workstation v. 6.9 foi usado para aquisição e tratamentos de dados.

3.2 Coleta e preparo das amostras

Para adequação do método de extração, foram utilizadas amostras comerciais de moluscos marinhos (*Littorina littorea*), Figura 3a, Adquiridos a partir do mercado central de Gran Canaria (Ilhas Canárias Islands, Espanha). Estas amostras são provenientes de ambientes circundantes à ilha. Para aplicação do método utilizaram-se os moluscos *Monodonta turbinata*, Figura 3b, provenientes da Ilha de Gran Canária, Espanha e *Stramonita haemastoma* Figura 3c, originários de áreas costeiras da Ilha de São Luís –Maranhão – Brasil.

Figura 3 -Organismos utilizados na pesquisa.

Fonte: Adaptação de H. Zell, 2012.

Após a coleta os organismos foram levados ao laboratório animais coletados foram levados ao laboratório Análises Químico Mediodambiental (AQMA), onde foram congelados em sacos plásticos até o seu processamento.

Em laboratório, as conchas dos organismos foram removidas para análise dos tecidos moles. As amostras foram secas por liofilização, trituradas e homogeneizadas, em seguida foram misturadas com uma solução contendo diuron e irgarol em metanol de forma a se obter concentração final de 500 ng g⁻¹ de cada composto.

3.3 Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)

Como verificação preliminar foi feito um planejamento experimental completo 3² + replica no ponto central, com dois fatores a três níveis cada um, tempo (1; 1,5 e 2 min) e potência (500; 700 e 1000 W), totalizando onze combinações possíveis. Esses experimentos foram executados de forma aleatória, fixando-se o volume de solvente extrator em 5 mL.

Foram estudados os principais parâmetros do procedimento MAE as amostras foram diluídas com metanol e transferidas para recipientes de PTFE. Os recipientes foram simetricamente colocados no forno de micro-ondas. A temperatura e a pressão foram controladas automaticamente pelo sistema.

Após o processamento, as amostras foram deixadas em condições ambientais e depois foi feito o “clean-up” com filtro de seringa de 0,45 μm (Chromafil® Xtra). Os eluatos foram secos sob uma corrente suave de nitrogênio gasoso e reconstituído com 1 mL de metanol.

O primeiro parâmetro do método de extração a ser estudado foi a quantidade de amostra, 50; 100 e 500 mg g^{-1} nas condições 200 W de potência por 6 min de radiação. O mesmo procedimento foi seguido, de modo a se determinar o melhor solvente de extração (acetonitrila, metanol ou uma mistura a 50% em volume de acetonitrila e metanol), em seguida foi analisado o melhor volume de solvente extrator (2,5; 5 e 10 mL).

4.3.1 Planejamento experimental 2^3

Foi feito um planejamento experimental 2^3 em duplicata, totalizando 16 experimentos. A fim de identificar a influências dos principais parâmetros no processo MAE, (tempo, potência e volume), sendo assim, na resposta foram analisados as variáveis experimentais e os efeitos de interação dessas variáveis.

4.3.2 Clean up aplicando Extração em Fase Sólida (SPE)

Após o procedimento MAE foi adicionada uma etapa de clean-up dos eluatos. Os extratos foram previamente filtrados em filtro de seringa de 0,45 μm e em seguida diluídas com 100 mL de água ultrapura.

O material adsorvente contido no interior dos cartuchos foi ativado pela passagem de duas vezes 2,5 mL de metanol e duas vezes com 2,5 mL de água ultra pura numa vazão de 4 mL min^{-1} . Em seguida os extratos foram percolados através dos cartuchos, sob vácuo, em vazão de 1,0 mL min^{-1} seguido de eluição com 1,0 mL de metanol. O protocolo SPE aplicado neste estudo foi desenvolvido e relatado por Franco-Barrios et al. (2014).

3.4 Extração por ultrassom

Neste conjunto de experimentos 100 mg de amostra de tecido de molusco foram tratados em ultrassom usando-se 5 mL de solvente extrator (acetonitrila, metanol ou uma mistura a 50% em volume de acetonitrila e metanol). Os eluatos foram secos sob uma corrente suave de nitrogênio gasoso e reconstituído com 1 mL de metanol. Após a seleção do melhor solvente de extração, os parâmetros foram modelados simultaneamente pela utilização de um planejamento experimental completo (3^2 + replica no ponto central), devido aos possíveis efeitos de interação entre os diferentes parâmetros, volume de solvente de extração (2,5; 5 e 10 mL) e o tempo de sonicação (10; 15 e 20 min).

3.5 Análise cromatográfica

3.5.1. HPLC-DAD

A adequação da metodologia analítica foi feita previamente por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, HPLC -DAD, 20 μ L da amostra foram injetados no sistema cromatográfico. A fase móvel consistiu de água MilliQ (solvente A) e metanol (solvente B), usada no modo gradiente, Tabela 2, com vazão de 0,5 mL min⁻¹.

Tabela -2 Gradiente da fase móvel utilizada para a determinação de diuron e irgarol

Tempo (min)	Percentagem de solvente (%)	
	(solvente A)	(solvente B)
0	50	50
3	40	60
7	30	70
13	30	70

Fonte: Autoria própria.

Após a corrida cromatográfica, o sistema foi equilibrado por 3 min para voltar às condições iniciais do gradiente de eluição. O detector de arranjo de diodos permitiu a verificação dos espectros no UV, no intervalo de 190-380 nm. Os compostos irgarol e diuron foram analisados em 230 nm e 248 nm, respectivamente, selecionados por meio dos espectros (máxima absorbância) dos padrões analíticos com concentração de 500 μ g L⁻¹.

3.6 Parâmetros Analíticos

O desempenho dos métodos para HPLC-DAD e LC-MS/MS foi estabelecido de acordo com os parâmetros de validação, utilizando-se soluções padrão e amostra fortificada.

A linearidade foi avaliada utilizando-se seis diferentes concentrações (100; 250; 500; 750; 1000 e 1500 ng g⁻¹) por HPLC-DAD e (10; 25; 50; 100; 250 e 500 ng g⁻¹) para a LC-MS/MS para cada composto. A relação linear foi obtida mediante representação gráfica das áreas dos picos cromatográficos e as concentrações de cada analito na amostra. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para os dois métodos foram estimados com base na relação sinal/ruído de 3 e de 10, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade, expressa como o desvio-padrão relativo obtido ao se realizar a extração e análise de amostras fortificadas em três concentrações diferentes.

A avaliação do efeito matriz foi feita comparando-se os coeficientes angulares das curvas analíticas com solução padrão preparada no solvente e nas matrizes.

A razão entre o coeficiente angular da reta na matriz e o coeficiente angular da reta no solvente foi calculada e utilizada para se avaliar o efeito dos componentes da matriz no aumento ou supressão do sinal dos analito no LC-MS/MS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Condições cromatográficas para HPLC – DAD

Na Tabela 3 são apresentadas as condições cromatográficas selecionadas para a separação e quantificação dos anti-incrustantes irgarol e diuron em amostras de tecido de molusco por HPLC-DAD.

Tabela 3 - Condições cromatográficas por HPLC-DAD

Coluna analítica	SunFire® C18 (3,0x100 mm) 3,5µm
Fase móvel	Metanol : Água ultra pura
Vazão	0,5 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Detector	DAD
Comprimento de onda para Quantificação	Diuron: 248 nm Irgarol: 230 nm
Identificação	Tempo de retenção Espectro de absorção

Fonte: Autoria própria.

A Figura 4 apresenta um cromatograma obtido nas condições descritas na Tabela 3 para uma amostra de tecido de molusco com o nível de fortificação de 500 µg g⁻¹ de diuron e de irgarol. O primeiro pico é do diuron (tR = 7,363 min) e o segundo do irgarol (tR = 11,363 min).

Figura 4 - Cromatograma dos biocidas diuron e irgarol por HPLC-DAD na concentração 500 µg g⁻¹.

Fonte: Autoria própria

4.2 Condições cromatográficas para LC–MS/MS.

O volume de 10 µL de solução foi injetado no sistema cromatográfico numa vazão de 0,2 mL min⁻¹ mantido durante um total de 15 minutos. A fase móvel consistiu de água ultra pura e metanol, usada no modo gradiente apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Gradiente da fase móvel utilizado no LC–MS/MS

Tempo (min)	Percentagem de solvente (%)	
	(Água ultra pura)	(Metanol)
0	40	60
2	40	60
7	30	70
9	0	100
11	0	100
12	40	60
15	40	60

Fonte: Autoria própria.

Foram injetadas soluções individuais na concentração de 500 µg L⁻¹ de diuron e de irgarol para que fossem determinadas as melhores condições de fragmentação e a escolha dos íons a serem monitorados para análise por LC–MS/MS. As condições de operação do instrumento estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 -Condições cromatográficas para o LC–MS/MS

Coluna	SunFire® C18 (3.0x100 mm) 3,5µm
Temperatura do gás de secagem	300 °C
Temperatura de vaporização	300°C
Gás de nebulização e secagem	Nitrogênio
Pressão do gás de nebulização	65 psi
Pressão do gás de secagem	30 psi

Fonte: Autoria própria.

Os parâmetros de fragmentação foram estabelecidos: O modo de ionização da fonte foi o positivo, a voltagem do cone capilar foi de 32 V. Para cada composto foram selecionadas duas energias de colisão, com o objetivo de obter duas transições características de boa intensidade a do íon precursor e do íon produto. A Tabela 6 apresenta as condições de fragmentação selecionadas para a análise dos anti-incrustantes diuron e irgarol no sistema LC–MS/MS.

Tabela 6 - Condições de fragmentação para determinação do diuron e do irgarol por LC–MS/MS

Composto	Massa (gmol ⁻¹)	Íon precursor * (eV)	Íon produto * (eV)	Voltagem do cone (V)
Diuron	232	71,9 (12)	46,1 (8)	32
Irgarol	254	198 (11,5)	107,9 (25)	32

*Transição mais intensa (íon precursor) foi utilizada na quantificação e a segunda mais intensa (íon produto) na confirmação. Energia de colisão (eV).

4.3 Condições analíticas para o isolamento do diuron e do irgarol por MAE.

A fim de se selecionar as melhores condições para a extração dos biocidas por MAE foi necessária à avaliação de diferentes parâmetros que podem afetar o processo tais como, quantidade de material e solvente extrator.

4.3.1. Quantidade de amostra

As diferentes quantidades de amostra estudadas foram, 50; 100; 250 e 500 mg, fortificadas de forma a se obter concentração final de 500 ng g⁻¹ de cada analito.

Foi observado que o aumento da quantidade de amostra até 500 mg resultou numa diminuição das áreas dos picos (Figura 5). Provavelmente, isto ocorreu devido ao fato de que, o volume de solvente de extração permaneceu constante (5 mL) e não foi suficiente para extrair os compostos, a partir de então, foi considerada também a razão entre a massa da amostra e o volume do solvente extrator.

Figura 5 -Influência da quantidade de amostra na extração por MAE com 5 mL de metanol, 200W por 6 min.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados para os quatro valores de quantidade de amostra estudados foram próximos, assim, foram selecionados 100 mg de amostra, como massa adequada para extração, evitando assim a geração de grandes quantidades de resíduos e ainda de impurezas da amostra que podem interferir na análise.

4.3.2. Seleção do solvente extrator

Para a extração do diuron e do irgarol das amostras de tecido de molusco, foram testados como solvente extrator: metanol, acetonitrila e uma mistura de acetonitrila; metanol a 50% em volume, água destilada em pH 5 e água destilada em pH 7. Observou-se que o solvente metanol forneceu melhores respostas para ambos os compostos estudados.

A Figura 6 apresenta os resultados da influência do tipo de solvente no processo de extração.

Figura 6 - Influência do tipo de solvente na eficiência da extração.

Fonte: Autoria própria.

4.3.3. Planejamento experimental para a seleção da melhor condição para o isolamento dos compostos por extração assistida por micro-ondas (MAE).

O planejamento fatorial completo 3² está apresentado na Tabela 7, com volume fixo de solvente extrator, 5 mL de metanol e feitos em triplicata para cada nível de fortificação.

Tabela 7 - Níveis das variáveis (potência e tempo) utilizados no planejamento experimental completo (3²) para do método MAE.

Variáveis	Níveis		
Potência (W)	500	750	1000
Tempo (min)	1	1,5	2

Fonte: Autoria própria.

As variáveis do método de extração assistida por microondas foram avaliadas por um planejamento fatorial, o tempo e a potência foram identificados como os parâmetros que poderiam afetar a eficiência do método.

A Figura 7 apresenta os gráficos de superfície de resposta para o (a) diuron e para o (b) irgarol.

Figura 7 - Superfícies de resposta do planejamento fatorial completo 3^2 , efeito das variáveis (tempo e potência) para extração do (a) diuron e do (b) irgarol.

(a) DIURON

(b) IRGAROL

Para verificar a influência dos parâmetros sobre a eficiência do processo de extração do diuron e do irgarol, foram feitos 9 experimentos distribuídos aleatoriamente. Todas as análises foram feitas com 100 mg de amostra, contendo 500 ng g⁻¹ de cada analito.

O software Statistica. v13, foi utilizado para processar os dados dos experimentos que abrangeram a adequação do método.

Os resultados, representados pela área dos picos, evidenciaram que uma eficiência maior de extração do diuron e do irgarol em tecido de moluscos por MAE se encontra na condição de maior potência aplicada e menor tempo de exposição.

Essa resposta foi semelhante as do estudo de Franco-Barrios et al. (2014) na determinação desses anti-incrustantes em amostras de músculo do peixe curimã (*Mugil cephalus*).

Após a finalização dos experimentos, o método MAE consistiu na aplicação de uma potência de 1000 W durante 2 min a uma amostra de 100 mg de tecido mole de molusco utilizando 5 mL de metanol como solvente de extração.

5.3.3.1 Planejamento experimental 2³

Um planejamento 2³ foi feito para modelar o processo adicionando-se o fator volume de solvente extrator.

A Figura 8, na página seguinte, apresenta os gráficos de Pareto e superfícies de resposta para resumir graficamente a importância relativa de cada parâmetro no que diz respeito à resposta completa no método MAE para (a) diuron e (b) irgarol.

Observou-se que, o volume e o tempo foram as variáveis significativas ao nível de confiança de 95%.

Figura 8 – Gráfico de Pareto e Superfícies de resposta do planejamento 2^3 para extração de (a) diuron e (b) irgarol por MAE.

(a) DIURON

(b) IRGAROL

No processo de extração um menor volume de solvente mostrou uma melhoria do tempo de resposta a radiação, por conseguinte, foi definido o volume de 5 mL de solvente orgânico e 1 min de exposição à radiação para proporcionar efeitos satisfatórios. Estas condições foram aplicadas nos experimentos seguintes.

4.3.4. Planejamento Experimental para seleção da melhor condição para isolamento dos compostos por ultrassom.

O mesmo solvente extrator (metanol) e a mesma quantidade de amostra (100 mg) foram usadas em todos os experimentos para adequação do método com extração por ultrassom. Para conhecer os valores adequados de volume de solvente e tempo de extração, foi feito um planejamento fatorial de 3^2 , com duas variáveis e três níveis, Tabela 8.

Tabela 8 - Níveis das variáveis, tempo e volume, utilizados no planejamento experimental completo (3²) para a extração de diuron e irgarol por ultrassom.

Variáveis	Níveis		
Tempo (min)	10	15	20
Vol. do solvente extrator (mL)	2,5	5	7,5

Fonte: Autoria própria.

Os experimentos foram feitos em triplicata. Os resultados foram avaliados mediante a interação entre as variáveis do método aplicando-se a metodologia de superfície de resposta, como demonstrados na próxima página, na Figura 9.

A escala de tempo de irradiação e do volume de extração analisados foi estabelecida num intervalo de $\pm 50\%$ dos parâmetros máximos e mínimos estabelecidos por estudo similar (MARTÍNEZ ; BARCELÓ, 2001). As condições experimentais selecionadas para esta extração foram os seguintes: 2,5 mL de metanol como solvente de extração com 15 minutos de tempo de ultrassom.

Figura 9 - Superfície de resposta e influência das variáveis (volume e tempo) para extração de (a) diuron e (b) irgarol.

(a) DIURON

$\hat{\text{Área}} = 4,2099\text{E}5 + 895,2111 * x - 21200,4889 * y - 14827,5644 * x * x + 5922,5667 * x * y - 236,1978 * y * y$

(b) IRGAROL

$\hat{\text{Área}} = -4,2664\text{E}5 - 34701,722 * x + 1,5681\text{E}5 * y - 5124,9244 * x * x + 5359,1933 * x * y - 5955,5511 * y * y$

4.4 Parâmetros Analíticos

Após adequação dos métodos de extração foram estabelecidos os parâmetros analíticos a partir da fortificação da amostra de tecido de moluscos com padrões do diuron e do irgarol.

A validação do método analítico aplicado foi efetuada para verificar a qualidade analítica dos dados obtidos, o protocolo foi adaptado com base em critérios aceitos em diferentes diretrizes, ANVISA, INMETRO e EURACHEM (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007; MAGNUSSON, B. ; ÖRNEMARK, 2014). Essa adaptação se fez necessária, haja visto estes serem guias de caráter apenas orientativo e não haver documentos específicos para análise de biocidas em amostras biológicas.

Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação instrumental, limite de quantificação do método, precisão e recuperação (exatidão).

4.4.1. Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).

A linearidade foi avaliada por meio da relação linear entre as áreas dos picos e as concentrações de analito, representada pelos valores dos coeficientes de determinação (R^2), obtidos conjuntamente com as equações das retas por LC–MS/MS ($R^2 > 0,99$) como podem ser observados na Tabela 9 e nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

Tabela 9 - Parâmetros analíticos obtidos por LC–MS/MS.

Analito	Faixa linear (ng g⁻¹)	Equação da reta	R²	LD (ng g⁻¹)	LQ (ng g⁻¹)
MAE					
Diuron	10 – 500	$y = 341515 x + 3,10^6$	0,99	1,14	3,80
Irgarol	10 – 500	$y = 10^7 x + 8,10^7$	0,99	0,24	0,80
Ultrassom					
Diuron	10 – 500	$y = 249131 x + 7,10^6$	0,98	2,66	8,86
Irgarol	10 – 500	$y = 10^7 x + 5,10^8$	0,98	0,13	0,42

Fonte: Autoria própria.

Figura 10 - Curvas analíticas para (a) diuron e (b) irgarol aplicando-se o método MAE-LC-MS/MS. Avaliando as concentrações de 10 a 500 ng g⁻¹.

(a) DIURON

(b) IRGAROL

Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Curvas analíticas para (a) diuron e (b) irgarol aplicando-se o método Ultrassom -LC-MS/MS. Avaliando as concentrações de 10 a 500 ng g⁻¹.

(a) DIURON

(b) IRGAROL

Fonte: Autoria própria.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados mediante a razão sinal/ruído (RIBANI et al., 2004), estabelecendo-se a concentração mínima na qual os analitos podem ser detectados e ainda a menor concentração dos analitos, que pode ser quantificada na amostra, sob as condições experimentais adotadas.

Observou-se que os intervalos de trabalho selecionados apontam boa relação linear com o sinal analítico, evidenciados pelos valores de coeficiente de determinação superiores a 0,99, exceto para extração por ultrassom seguida por análise por LC-MS/MS apresentou um R² de 0,98.

4.4.2. Precisão e exatidão

Os resultados estão resumidos nas Tabelas 10 e 11. Em todos os casos, a repetitividade pode ser considerada aceitável, com RSD inferiores a 10% para extração por MAE, o que demonstra adequação desse método para determinação dos biocidas diuron e irgarol em amostras biológicas.

Tabela 10- Precisão e recuperação de diuron e irgarol nas amostras, por MAE - LC-MS/MS

Analito	Conc. (ng g ⁻¹)	Rec (%; n=3)	RSD (%; n = 6)
Diuron	25	69,32	9,32
	100	43,50	10,0
	250	51,24	9,87
Irgarol	25	92,78	1,66
	100	68,35	7,41
	250	75,85	5,12

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11- Precisão e recuperação de diuron e irgarol nas amostras, por Ultrassom - LC-MS/MS

Analito	Conc. (ng g ⁻¹)	Rec (%; n=3)	RSD (%; n = 6)
Diuron	50	28,93	5,21
	100	50,33	13,70
	250	46,38	8,25
Irgarol	50	-	-
	100	62,29	40,50
	250	58,91	15,00

Fonte: Autoria própria.

A precisão foi avaliada a partir dos resultados dos desvios-padrão relativos (RSD%). Para esta finalidade, seis amostras enriquecidas em diferentes níveis de concentração foram analisadas por LC-MS/MS, aplicando-se a extração assistida por micro-ondas (MAE). As concentrações usadas foram 25; 100 e 250 ng g⁻¹ e para a extração por ultrassom, concentrações de 50; 100 e 250 ng g⁻¹.

Considerando-se o intervalo de recuperação recomendável para a análise, de 70 a 120%, segundo as diretrizes da ANVISA e também do INMETRO, a recuperação obtida para os compostos em diferentes concentrações estudadas foram inferiores, contudo, resultados similares foram relatados em estudos desses biocidas em amostras biológicas. Harino e colaboradores (2006a) procederam a extração do diuron e do irgarol em bivalves (*Perna viridis*) usando agitação mecânica com acetonitrila como solvente, obtendo recuperações entre 63 e 92 de diuron e de irgarol, respectivamente.

Em um outro estudo o mesmo método foi aplicado para a extração de cinco biocidas anti-incrustantes, entre estes diuron e irgarol, em amostras de tecidos moles de moluscos (*Meretrix spp*). A recuperação foi de 60 a 99 % (HARINO et al. 2006b), sendo que para o diuron 89 %, com desvio padrão relativo de 5,5 % e para o irgarol 60 %, com desvio de 5,2.

4.4.3. Parâmetros Analíticos por MAE - SPE - LC–MS/MS

Considerando-se que a extração por MAE apresentou melhores resultados de recuperação e precisão, aplicou-se uma etapa de clean-up dos extratos com a finalidade de eliminar interferências da matriz e promover a robustez e confiabilidade dos resultados. A Tabela 12 e a Figura 12 apresentam parâmetros analíticos do método de extração MAE com a adição da etapa de clean-up, seguida de análise por LC–MS/MS.

Tabela 12 - Parâmetros analíticos por MAE –SPE -LC–MS/MS.

Analito	Faixa linear (ng g ⁻¹)	Equação da reta	R ²	LD (ng g ⁻¹)	LQ (ng g ⁻¹)
Diuron	10 – 500	$y = 49919x + 3.10^6$	0,990	1,0	4,0
Irgarol	10 – 500	$y = 9.10^6 x + 7.10^7$	0,970	0,1	0,3

Fonte: Autoria própria.

Figura 12 - Curvas analíticas para (a) diuron e (b) irgarol aplicando-se o método MAE seguido de SPE analisado por LC–MS/MS. Avaliando as concentrações de 10 a 500 ng g⁻¹.

(a) DIURON

(b) IRGAROL

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 13 apresenta os resultados de recuperação e precisão para o método aplicando-se MAE seguida de limpeza com cartuchos SPE EnvirElut pesticide (100 mg de quantidade de adsorvente) e análise por LC–MS/MS.

Tabela 13 - Precisão e recuperação de diuron e irgarol nas amostras, por MAE-SPE-LC–MS/MS.

Analito	Conc. ng g⁻¹	Rec (% , n=3)	RSD (% , n=6)
Diuron	25	70,18	9,45
	100	48,32	9,38
	250	65,73	9,75
Irgarol	25	85,73	8,64
	100	55,02	12,0
	250	87,35	7,24

Fonte: Autoria própria.

Embora os dados demonstrem uma melhora nos valores de recuperação, não justificaria a necessidade de se usar a SPE no método, uma vez que, não implica em pré-concentração dos analitos. Torna a metodologia mais demorada, sobretudo em processos de triagem, e ainda acarreta em uso de maior volume de solventes orgânicos e consequentemente geração de resíduos.

4.5 Avaliação do efeito matriz

As curvas analíticas construídas a partir das amostras fortificadas foram comparadas com as curvas de soluções padrões ou curvas instrumentais, nos mesmos níveis de concentração para dessa forma ser avaliado o efeito de interferência da matriz.

Um efeito matriz para o diuron foi de 35,7 % para MAE (considerado médio) e de 6% para MAE + SPE (considerado baixo) e de 55 % (considerado alto) para extração com ultrassom.

Este tipo de comportamento é observado em compostos que contêm grupamentos mais polares, como derivados da uréia, do qual diuron é um exemplo (ECONOMOU et al., 2009). Dessa forma, o efeito matriz deve ser considerado na análise do diuron em tecidos biológicos.

O efeito matriz na análise do irgarol foi de 40% (considerado médio), com o uso de MAE seguido por SPE. Dessa forma, o irgarol é menos afetado pelos componentes da matriz em extrações diretas, uma vez que não apresenta a variação do sinal nas amostras.

4.6 Comparação entre os métodos de extração

Avaliando-se todas as etapas na preparação da amostra: tal como a limpeza e a concentração do extrato, pode ser observado (Figura 13) que o método de extração mais rápida para a análise do diuron e do irgarol em amostras de tecido mole de molusco é o forno de micro-ondas (MAE), sem necessariamente o uso da SPE.

Figura 13 -Comparação dos métodos de extração para a determinação de irgarol e diuron em amostras de tecido biológico de moluscos.

Fonte: Autoria própria.

4.7 Determinação do diuron e do irgarol em amostras de moluscos

Duas espécies de moluscos provenientes de zona marinha (a saber, *Monodonta turbinata*, da Ilha de Gran Canaria, Espanha, e *Stramonita haemastoma*, da Ilha de São Luís, Brasil) foram analisadas para o procedimento aplicado neste estudo, procedendo-se análise em triplicata (n = 3).

O diuron e o irgarol não foram encontrados nas amostras dos moluscos investigados isso indica que, possivelmente, o diuron e o irgarol, ao contrário dos organoestânicos, não são bioacumulados ou, ainda, que os organismos investigados têm capacidade de metabolizar ou eliminar esses biocidas. No entanto são necessários mais estudos com um maior número de amostragem.

Para avaliar a aplicabilidade do método proposto, os dois biocidas foram adicionados a 100 mg de tecido (concentração final de 500 ng g⁻¹). A recuperação do método obtida para o diuron e para o irgarol foi entre 95 e 117 % e 90 e 109 % com RSD de 6 e 11 % e 8 e 12%, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

A abordagem envolvendo o planejamento experimental permitiu avaliar os efeitos da interação entre fatores que podem afetar a eficiência dos métodos desenvolvidos, possibilitando um número reduzido de ensaios.

Foi possível estabelecer as adequações analíticas que propiciaram a identificação dos biocidas em estudo, visando o estabelecimento de testes com organismos nativos da região em estudo.

O método proposto aplicando-se extração assistida por micro-ondas seguida por análise cromatográfica direta, mostrou-se adequado para determinação do diuron e do irgarol em amostras de tecidos de moluscos presentes em ecossistemas marinhos e estuarinos de regiões portuárias da costa brasileira e da Ilha de Gran Canária - Espanha.

Agradecimentos

Estes dados foram gerados durante o doutoramento sanduiche realizado na Universidade de Las Palmas de Gran Canaria (Espanha) entre fev/2014 e fev/2015, sob a supervisão do prof. José Juan Santana-Rodriguez e colaboração do Grupo de Análisis Químico Medio Ambiental (AQMA). A autora foi bolsista de doutorado PDSE (CAPES - Processo 99999.012700/2013-04).

REFERENCIAS

ALMEIDA, E. A.; BAINY, A.C.D.; LOUREIRO, A.P.M.; MARTINEZ, G.R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L.F.; GARCIA, C.C.M.; PRADO, F.M.; RONSEIN, G.E.; SIGOLO, C.A.; BROCHINI, C. B.; MARTINS, A.M. G.; MEDEIROS, M.H. G.; MASCIO, P. D. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, p. 588-600, 2007.

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T.; SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 59, p. 2-20, 2007.

ALZIEU, C.L.; SANJUAN, J.; DELTREIL, J.P.; BOREL, M. Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 17, p. 494-498, 1986.

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (ANA). **Diagnóstico para avaliação e ações prioritárias para conservação da biodiversidade da zona costeira-estuarina dos estados do Piauí, Maranhão, Pará e Amapá**. Brasília. 2002. (Sumário Executivo).

ANSANELLI G, DI LANDA G. An overview of the analytical methods to determine the main antifouling paint biocides in marine samples. **Energia, Ambiente e Innovazione**, n. 1. p.57-66, 2014.

BRASIL, Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm

AZEVEDO, D. D.; GERCHON, E.; REIS, E. O. Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 292-299, 2004.

BASHEER, C.; TAN, K. S.; LEE, H. K. Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 697-703, 2002.

BELLAS, J. Comparative toxicity alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. **Science of Total Environment**, v. 367. p.573-585, 2006.

BISELLI, S.; BESTER, K.; HUHNERFUSS, H.; FENT, K. Concentrations of the antifouling compound Irgarol 1051 and of organotins in water and sediments of German North and Baltic Sea Marine. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, p.233-243, 2000.

BORGES, L. M. S. **Alguns aspectos da biologia de *Thais haemastoma* (Gastropoda: Muricidae) e a sua utilização como espécie indicadora de poluição por TBT, nas águas do porto e marina de Ponta Delgada**. 1997. 133f. Estágio (Licenciatura em biologia) - Universidade dos Açores, Ponta Delgada.1997.

BOWMAN, J.C.; READMAN, J.W.; ZHOU, J.L. Seasonal variability in the concentrations of Irgarol 1051 in Brighton Marina, UK; including the impact of dredging. **Marine Pollution Bulletin**, 46, p. 444-451, 2003.

BOXALL, A.B.A., COMBER, S.D., CONRAD, A.U., HOWCROFT, J.; ZAMAN, N. Inputs, monitoring and fate modelling of antifouling biocides in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, 40, p. 898-905, 2000.

BUENO, M. J. M.; HERNANDO, M. D.; AMADEO, A. A. Application of passive sampling devices for screening of micro-pollutants in marine aquaculture using LC-MSMS. **Talanta**, n. 77, p. 1518-1527, 2009.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **Analyst**, v.126, p. 1182-1193, 2001.

CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 2011.

CAUX, P.Y.; KENT, R.A.; FAN, G.T.; STEPHENSON, G.L. Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective. **Crit. Rev. Environmental Science & Technology**, n.26, p. 45- 93, 1996.

CHAMP, M. A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **Science of the Total Environment**, v. 258, p. 21-71, 2000.

DEMOLINER, A.; CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; GONÇALVES, F. F.; CLEMENTIN, R. M.; MILANI, M. R.; PRIMEL, E. Development and validation of a method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the determination of multiple classes of pesticides and metabolites in water samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p. 1424-1433, 2010.

DINIZ, L. G. R.; JESUS, M. S. DOMINGUEZ, L. A. E.; FILLMANN, G.; VIEIRA, E. M. FRANCO, T. C. R. S. First appraisal of water contamination by antifouling booster biocide of 3rd generation at Itaqui Harbor (São Luiz - Maranhão - Brazil). **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 25, p.380-388, 2014.

DOMINGUEZ, L.A. **Determinação dos anti-incrustantes diuron e irgarol na região estuarina de Rio Grande - RS**. Tese (Doutorado em Oceanografia Física, Química e Geológica), Instituto de oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S. E.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.5856-5867, 2009.

ESKILSSON, C.; BJÖRKLUND, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 227 - 250, 2000.

FERNANDEZ, M. A.; OSTRITZ, F.; REZENDE, A. R.; SILVA, S. C.; FOLHA, D. O.; PINHEIRO, F. M. Temporal variability of imposex development in *Stramonita haemastoma* in guanabara bay at a fixed sampling station: Results from 1998-2006. **Environmental and Health World Congress**, p. 75 -79, 2006.

FORTES, L. F.; LABIDI, S.; NETA, R. F. C. Projeto e Construção de Bio-ontologia para suporte a sistema multagente de monitoramento Ambiental do Complexo Portuário da Ilha de São Luís do Maranhão. **Cadernos de Pesquisa**, n. 16, p. 43-52, 2009.

GARAVENTA, F.; PELLIZZATO, F.; FAIMALI, M.; TERLIZZI, A.; MEDAKOVIC, D.; GERACI, S.; PAVONI, B. Imposex in *Hexaplex trunculus* at some sites on the North Mediterranean Coast as a base-line for future evaluation of the effectiveness of the total ban on organotin based antifouling paints. **Hydrobiologia**, v. 555, p 281-287, 2006.

GARDINALI, P.R.; PLASENCIA, M.; MACK, S.; POPPELL, C. Occurrence of Irgarol 1051 in coastal waters from Biscayne Bay, Florida, USA. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 781-788, 2002.

GATIDOU, G.; KOTRIKLA, A.; THOMAIDIS, N. S.; LEKKAS, T. D. Determination of two antifouling booster biocides and their degradation products in marine sediments by high performance liquid chromatography–diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 505. p. 153-159, 2004.

GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 708-716, 2003.

GOUGH, M. A. FOTHERGILL, G.; HENDRIE, J. D. Survey of southern England coastal waters for the s-Triazine antifouling compound Irgarol 1051. **Marine Pollution Bulletin**, v. 28, p. 613-620, 1994.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. (eds.) **Eurachem Guide: the fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics**, 2. Ed, 2014.

HARINO, H.; OHJI, M.; WATTAYAKORN, V.; ARAI, T.; RUNGSUPA, S.; MIYAZAKI, N. Occurrence of antifouling biocides in sediment and green mussels from Thailand. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.51, p. 400–407, 2006a.

HARINO H.; OHJI, M.; WATTAYAKORN, V.; ARAI, T.; RUNGSUPA, S.; MIYAZAKI, N. Concentrations of booster biocides in sediment and clams from Vietnam. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v.86, p. 1163-1170, 2006b.

IHARA, P. M. **Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos-teste na determinação da toxicidade da água produzida**. 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica), Instituto de oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION (IMO). **International convention on the control of harmful anti-fouling systems on ships**. London, 2001. Disponível em: [http://www.imo.org/about/conventions/listofconventions/pages/international-convention-on-the-control-of-harmful-anti-fouling-systems-on-ships-\(afs\).aspx](http://www.imo.org/about/conventions/listofconventions/pages/international-convention-on-the-control-of-harmful-anti-fouling-systems-on-ships-(afs).aspx). Acesso em: 12 mar. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO) - **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**. DOQ-CGCRE-008, rev. 02 – JUNHO/2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO/ IEC 17025:1999. **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**. Geneva. Switzerland, 1999.

KANNAN, K.; TANABE, S. Global Contamination by Organotin Compounds. In ARAI, T.; HARINO, H.; OHJI, M.; LANGSTON, W.J. (ed.) **Ecotoxicology of Antifouling Biocides**. p. 39-60, 2009.

KONSTANTINOU, I. K.; ALBANIS, T. A.; Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**. n.30, p. 2035-2048, 2004.

KOTRIKLA, A. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. **Journal of Environmental Management**. v. 90, p. S77-S85, 2009.

LIMAVERDE, A. M.; WAGENERA, A. L. R.; FERNANDEZ, M. A.; SCOFIELDA, A. L.; COUTINHO, R. *Stramonita haemastoma* as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. **Marine Environmental Research**, n. 64. p. 384–398, 2007.

LIU, D.; PACEPAVICIUS, G. J.; MAGUIRE, R. J.; LAU, Y. L.; OKAMURA, H.; AOYAMA, I. Survey for the occurrence of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. **Water Research**, v.33, p.2833-2843, 1999.

MARTÍNEZ, K. ; BARCELÓ, D. Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC–APCI–MS. **Journal Analytical Chemistry**, v. 370 p.940–945, 2001.

MARTINEZ, K.; FERRER, I.; HERNANDO, M. D.; FERNANDEZ-ALBA, A.R.; MARCE, R.M.; BORRULL, F.; BARCELO, D. Occurrence of antifouling biocides in the Spanish Mediterranean marine environment. **Environmental Toxicology**, v. 22, p.543-552, 2001.

MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P. E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin – mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17. p. 37-43, 1998.

MELLO, P.C.M.; LOBO, I.; YABE, M. J. S. Optimization of ultrasonic extraction and analyses methodology by HPLC for determination of diuron and its metabolites in soil cultivation of sugar cane. **Seminário: Ciência Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 30, n.2. p. 107-116, 2009.

MOCHIDA, K.; FUJII, K. Further Effects of Alternative Biocides on Aquatic Organisms." In ARAI, T.; HARINO, H.; OHJI, M.; LANGSTON, W.J. ed. **Ecotoxicology of Antifouling Biocides**. Springer. Tokyo, p. 383-393, 2009.

MOHR, S.; SCHRÖDER, H.; FEIBICKE, M.; BERGHAHN, R.; ARP, W.; NICKLISCH, A. Long-term effects of the antifouling booster biocide Irgarol 1051 on periphyton, plankton and ecosystem function in freshwater pond mesocosms. **Aquatic Toxicology**, v. 90. p. 109-120, 2008.

NASCIMENTO I. A.; ARAÚJO M. M. S. Testes ecotoxicológicos marinhos: análise de sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v.2. p. 41-47, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Brasília, 2001.

NICOLODI, J.L.; ZAMBONI, A.; FONSECA, G. F. B. Gestão integrada de bacias hidrográficas e zonas costeiras no Brasil: Implicações para a região hidrográfica amazônica integrated management of river basins and coastal zone in Brazil: Implications to the Amazon hydrographic region. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, n. 9, p. 9-32, 2009.

OKAMURA, H.; WATANABE, T.; AOYAMA, I.; HASOBE, M. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. **Chemosphere**, n. 46, p. 945–951, 2002.

PERINA, F.; ABESSA, D. S.; PINHO, G.; FILLMANN, G. Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 8, p. 1870-1880, 2011.

RIBEIRO, V.P. **Avaliação do potencial da espécie *Stramonita haemastoma* (Koll, 1987) como indicador biológico de contaminação ambiental por compostos organo-estânicos**. Dissertação. (Mestrado em Ecotoxicologia Marinha) -Faculdade de Oceanografia, Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, 2002.

SAKKAS, V. A.; KONSTANTINOU, I. K.; LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 9, p.327-332, 2002.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ. Analytical methods for the determination of common booster biocides in marine samples. **Central European Journal of Chemistry**. v. 10, p 521-533, 2012.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ. Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC–MSMS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments. **Chemosphere**. v.82 p. 96–102, 2011.

SAPOZHNIKOVA, Y.; WIRTH, E.; SCHIFF, K.; BROWN, J.; FULTON, H. Antifouling pesticides in the coastal waters of Southern California. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 1962-1989, 2007.

SARGENT, C. J.; BOWMAN, J. C.; ZHOW, J. L. Levels of antifoulant Irgarol 1051 in the Conwy Marina, North Wales. **Chemosphere**, v. 41, p. 1755-1760, 2000.

THOMAS, K. V.; MCHUGH, M.; WALDOCK, M. Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. **The Science of the Total Environment**, v. 293, p. 117- 127, 2002.

THOMAS, K. V.; FILEMAN, T. W.; READMAN, J. W.; WALDOCK, M. J. Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 677-688, 2001

VAN LEEUWEN, C. J.; MAAS-DIEPEVEEN, J. L.; NIEBEEK, G.; VERGOUW, W.H.A.; GRIFFIOEN, P. S.; LUIJKEN, M. W. Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. I. Short-term toxicity tests. **Aquatic Toxicology**, n. 7, 1985a.

VAN LEEUWEN, C.J.; MOBERTS, F.; NIEBEEK, G. Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. II. Effects on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, n. 7, 1085b.

VAN WEZEL, AP. ; VAN VLAARDINGEN, P. Environmental risk limits for antifouling substances. **Aquatic Toxicology**. v. 66, p. 427-444, 2004.

ZAMBONI, A.; NICOLODI, J. L. (org.) Macrodiagnóstico da Zona Costeira e Marinha do Brasil. Brasília, **MMA**, 2008. Disponível em:
ftp://gw.laget.igeo.ufrj.br/Macro/01_introducao.pdf. Acesso em 12 mar, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas anti-incrustantes são de extrema importância, tanto do ponto de vista ecológico (controle de bioinvasores), quanto do econômico. Haja visto o transporte marítimo ser imprescindível para a circulação das mercadorias e para o ganho de escala, sobretudo, internacional, afetando assim todos os setores industriais.

Contudo, é crucial que o uso de biocidas anti-incrustantes seja controlado, uma vez que as novas formulações de tinta contêm normalmente, irgarol e diuron, que embora apresentem efeitos menos deletérios que os organoestânicos, seus produtos de degradação são mais estáveis, portanto, têm o potencial para causar problemas ambientais futuros.

No Brasil o uso de biocidas anti-incrustantes ainda não é bem regulamentado, logo é importante maiores informações sobre a dinâmica e efeitos destes compostos para os ecossistemas marinhos e estuarinos.

Os resultados deste estudo podem servir de base para estudos de monitoramento em regiões de tráfego portuário, assim como os ecossistemas que compõem este ambiente.

PERSPECTIVAS PARA CONTINUIDADE DO ESTUDO

Os resultados deste estudo podem servir de incentivo à elaboração de pesquisas futuras nas regiões costeiras e estuarinas que estão inseridas em locais de forte atividade portuária, sugere-se;

- ✓ Avaliação de risco ambiental do diuron e do irgarol em zonas portuárias do Brasil.
- ✓ Estudo detalhado em campo com maior número amostral, abrangendo as diferentes matrizes ambientais, como amostras biológicas, sedimento e água de mar.
- ✓ Avaliação ecotoxicológica dos biocidas anti-incrustantes sobre diferentes espécies marinhas.
- ✓ Avaliação proteica de organismos gastrópodes expostos à contaminação por biocidas anti-incrustantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T.; SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 59. p. 2-20, 2007.
- BALAKRISHNAN, S. TAKEDA, K.; SAKUGAWA, H. Occurrence of Diuron and Irgarol in seawater, sediments and planktons. **Geochemical Journal**, v. 46. p.169 -177, 2012.
- BASHEER, C.; TAN, K. S.; LEE, H. K. Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44. p. 697-703, 2002.
- CALLOW, M. E; CALLOW, J. A. Marine biofouling: a sticky problem. **Biologist**, v. 49. p.1 - 5. 2002.
- CAO, S.; WANG, J.; CHEN, H.; CHEN, D. Progress of marine biofouling and antifouling Technologies. **Chinese Science Bulletin**, v. 56. p. 598–612, 2011.
- CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v. 34, p. 1021-1031, 2011.
- DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; COUTINHO, R. Bioincrustação marinha. In: Pereira, R.C. ; Soares-Gomes, A. (orgs.) *Biologia Marinha*. 2ª edição, **Editora Interciência**, Rio de Janeiro, p. 299-318. 2009.
- DINIZ, L. G. R.; JESUS, M. S.; DOMINGUEZ, L. A. E.; FILLMANN, G.; VIEIRA, E. M.; FRANCO, T. C. R. S. First appraisal of water contamination by antifouling booster biocide of 3rd generation at Itaquí Harbor (São Luiz - Maranhão - Brazil). **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 25, p.380-388, 2014.
- FRANCO-BARRIOS, A.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Development and Application of a Microwave-Assisted Extraction and LC/MS/MS Methodology to the Determination of Antifouling Booster Biocides in Sea Mullet (Mugil cephalus) Organisms. **Journal of AOAC International**. v. 97, p. 197 – 204, 2014.
- GATIDOU, G.; KOTRIKLA, A. K.; THOMAIDIS, N. T.; LEKKAS, T. D.; Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and Diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography–diode array detector. **Analytica Chimica Acta**. v. 528, p. 89-99, 2005.
- HARINO, H.; MIDORIKAWA, S.; ARAIO, T.; OHJIO, M.; CUP, N. D.; MIYAZAKI, N. Concentrations of booster biocides in sediment and clams from Vietnam. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 86, p. 1163-1170, 2006.
- KONSTANTINO, I. K.; ALBANIS, T. A.; Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**. n.30, p. 2035-2048, 2004.

LEE, S.; CHUNG, J.; WONA, H.; LEE, D.; LEE, Y. W. Analysis of antifouling agents after regulation of tributyltin compounds in Korea. **Journal of Hazardous Materials** v. 185.p. 1318–1325, 2011.

MANZO, S.; BUONO, S.; CREMISINI, C. Toxic effects of irgarol and diuron on sea urchin *paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 51. p. 61-68, 2006.

MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. J.; BABARRO, J. M. F.; LAHOZ, F.; SANSÓN, M.; MARTÍN, V. S.; NORTE, M.; FERNÁNDEZ, J. J. From Broad-Spectrum Biocides to Quorum Sensing Disruptors and Mussel Repellents: Antifouling Profile of Alkyl Triphenylphosphonium Salts. **PLoS ONE**. v. 10. p. 1-30, 2015.

MASSANISSO, P.; UBALDI, C.; CHIAVARINI, S.; PEZZA, M.; CANNARSA, S. BORDONE, A. Distribution of antifouling biocides in coastal seawater of Egadi Islands **Energia, Ambiente e Innovazione**. v. 4. p. 30 - 36, 2015.

PARADAS, W. C. ; FILHO, G. M. A. Are metals of antifouling paints transferred to marine biota? **Brazilian journal of oceanography**, v.55, p. 51-56, 2007.

SALEH, A.; MOLAEI, S.; FUMANI, N. S.; ABEDI, E. Antifouling paint booster biocides (Irgarol 1051 and diuron) in marinas and ports of Bushehr, Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**. v. 105. p. 367–372, 2016.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ. Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC–MS/MS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments. **Chemosphere**. v.82 p. 96–102, 2011.

SAPOZHNIKOVA, Y.; WIRTH, E.; SCHIFF, K.; FULTON, M. Antifouling biocides in water and sediments from California marinas. **Marine Pollution Bulletin**. v. 69. p. 189–194, 2013.

SAPOZHNIKOVA, Y.; WIRTH, E.; SINGHASEMANON, N.; BACEY, J.; FULTON, M. Distribution of antifouling biocides in California marinas. **Journal of Environmental Monitoring**. v.10, p. 1069–1075, 2008.

THOMAS, K. V.; FILEMAN, T. W.; READMAN, J. W.; WALDOCK, M. J. Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 677-688, 2001.

TSANG, V. W. H.; LEI, N. Y.; LAM, M. H. W. Determination of Irgarol-1051 and its related s-triazine species in coastal sediments and mussel tissues by HPLC–ESI-MS/MS. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58. p. 1462–1471, 2009.

XU, H.; LU, A.; YU, H.; SUN, J.; SHEN, H. Distribution of Diuron in Coastal Seawater and Sediments from West Sea Area of Zhoushan Island. **Open Journal of Marine Science**, v. 3. p.140-147, 2013.

São Luís, Maranhão
Foto: Meireles Junior

CÂNTICO NEGRO

“Vem por aqui” — dizem-me alguns com os olhos doces
Estendendo-me os braços, e seguros
De que seria bom que eu os ouvisse
Quando me dizem: “vem por aqui!”
Eu olho-os com olhos lassos,
(Há, nos olhos meus, ironias e cansaços)
E cruzo os braços,
E nunca vou por ali...
A minha glória é esta
Criar desumanidades!
Não acompanhar ninguém.
— Que eu vivo com o mesmo sem-vontade
Com que rasquei o ventre à minha mãe
Não, não vou por aí! Só vou por onde
Me levam meus próprios passos...
Se ao que busco saber, nenhum de vós responde
Por que me repetis: “vem por aqui!”?
Prefiro escorregar nos becos lamacentos,
Redemoinhar aos ventos,
Como farrapos, arrastar os pés sangrentos,
A ir por aí...
Se vim ao mundo, foi
Só para desflorar florestas virgens,
E desenhar meus próprios pés na areia inexplorada!
O mais que faço não vale nada.
Como, pois, sereis vós
Que me dareis impulsos, ferramentas e coragem
Para eu derrubar os meus obstáculos?...
Corre, nas vossas veias, sangue velho dos avós,
E vós amais o que é fácil!
Eu amo o Longe e a Miragem,
Amo os abismos, as torrentes, os desertos...
Ide! Tendes estradas,
Tendes jardins, tendes canteiros,
Tendes pátria, tendes tetos,
E tendes regras, e tratados, e filósofos, e sábios...
Eu tenho a minha Loucura!
Levanto-a, como um facho, a arder na noite escura,
E sinto espuma, e sangue, e cânticos nos lábios...
Deus e o Diabo é que guiam, mais ninguém!
Todos tiveram pai, todos tiveram mãe;
Mas eu, que nunca princípio nem acabo,
Nasci do amor que há entre Deus e o Diabo.
Ah, que ninguém me dê piedosas intenções,
Ninguém me peça definições!
Ninguém me diga: “vem por aqui!”
A minha vida é um vendaval que se soltou,
É uma onda que se alevantou,
É um átomo a mais que se animou...
Não sei por onde vou,
Não sei para onde vou
Sei que não vou por aí!

(José Régio — Poeta Português)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO PAULO

Lia Gracy Rocha Diniz

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE BIOCIDAS ANTI-
INCRUSTANTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE MAR E
TECIDO DE MOLUSCOS.**

São Carlos, SP

2016