



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL – PPGQA
LABORATÓRIO DE MICROCONTAMINANTES ORGÂNICOS E
ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA - CONECO**



**MÉTODO MULTIRÉSIDUO PARA DETERMINAÇÃO DE BIOCIDAS
UTILIZADOS EM TINTAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO**

NÍVEL MESTRADO

Eliete Westphal Alves

Rio Grande, 19 de agosto de 2011

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE BIOCIDAS
UTILIZADOS EM TINTAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO**

por

Eliete Westphal Alves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Fillmann

Co-Orientador: Ítalo Braga de Castro

Rio Grande, 19 de agosto de 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL - PPGQTA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**MÉTODO MULTIRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE BIOCIDAS
UTILIZADOS EM TINTAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO**

elaborada por
Eliete Westphal Alves

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**
Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Fillmann (orientador) (FURG)

Dr. Ítalo Braga de Castro (co-orientador) (FURG)

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG)

Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi (UNESP)

Rio Grande, 19 de agosto de 2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor, incentivo e pela educação. Em especial ao meu pai que eu sei que ainda está comigo. Vocês sempre me apoiaram nos estudos e nunca me deixaram faltar nada. Amo vocês!

A minha família amada, sempre na torcida por mim.

Ao meu amor Carlinhos que esteve comigo direto nessa fase final.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Fillmann pela oportunidade e confiança.

Ao meu co-orientador Ítalo Braga de Castro pela valiosa co-orientação.

A Pati, que me ajudou incondicionalmente em todo o trabalho e ao mais importante, pela valiosa amizade que levarei pra toda vida.

Ao Rafa e à Fê, amigos queridos, sempre dispostos a me ajudar e também a me abrigar.

Ao pessoal querido do CONECO que também contribuiu de alguma forma com este trabalho, Marilene, Michele, Jú, Gabi e Rodrigo.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, em especial ao amigo Maicom.

Aos professores Ednei e Milani pela participação na banca de qualificação.

A professora Mary Rosa de Marchi pela disponibilidade em participar na defesa da dissertação.

RESUMO

As tintas anti-incrustantes são utilizadas há décadas com a finalidade de minimizar os efeitos causados por organismos marinhos aos cascos de embarcações. A crescente dependência dos países em função de exportações e importações realizadas por via marítima tem estimulado diversos estudos nesta área. Aspectos ecológicos e econômicos indicam que o estudo aprofundado de tintas anti-incrustantes, por se tratar de um campo multidisciplinar e vital do ponto de vista ambiental, merece grande atenção. Sendo assim, este trabalho compila dados de 16 biocidas que podem estar presentes em tintas anti-incrustantes de terceira geração, sendo validado um método capaz de determinar simultaneamente cinco dos principais biocidas (DCOIT, irgarol, TCMTB, diclofluanida e clorotalonil) utilizados em formulações de tintas anti-incrustantes de terceira geração. Para tanto, utilizou-se a técnica de extração em fase sólida (EFS) e determinação por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Para a EFS utilizou-se colunas HLB Oásis de 60 mg e eluição com 4 mL de acetato de etila. Após a otimização dos parâmetros de extração e separação dos compostos, o método foi validado avaliando-se curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (ensaios de recuperação) e efeito de matriz. Todas as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz apresentaram $r > 0,998$. Os limites de quantificação para o método, considerando-se a etapa de pré-concentração de 200 vezes, foram de $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$ para quatro dos biocidas determinados, exceto para o TCMTB que foi de $0,125 \text{ ng mL}^{-1}$. Os % de recuperação estiveram entre 99,9 e 117,6 % para exatidão com % CV variando entre 0,1 e 10,3 %. Para precisão intermediária, os % CV variaram entre 1,9 e 8,2 %. Efeito matriz de médio a alto foi observado para três dos biocidas. O método validado foi aplicado para avaliar a presença destes cinco biocidas em formulações de quatro das principais tintas anti-incrustantes de terceira geração utilizadas na região portuária de Rio Grande/RS. Para isto, utilizou-se um método de lixiviação dos compostos presentes tintas para uma matriz aquosa, sendo que dois destes biocidas foi encontrado em concentrações acima do LQ_m . O método demonstrou-se adequado para os objetivos propostos neste trabalho e todos os parâmetros de validação obtidos estão dentro dos limites sugeridos para validação de métodos cromatográficos.

Palavras-chave: Metodologia analítica; Tintas anti-incrustantes; Biocidas.

ABSTRACT

Antifouling paints are needed to minimize the effects caused by marine organisms on boat and ship hulls. The increasing in marine traffic has stimulated several studies in this area. Thus, ecological and economic aspects indicate that studies about antifouling paints environmental interactions deserve more attention. Therefore, this work presented an overview on 16 booster biocides that might be present in third generation antifouling paints, and validated a method to simultaneously determine five of these booster biocides (DCOIT, irgarol, TCMTB, dichlofluanid and chlorothalonil) used in third generation antifouling paints. Solid phase extraction (SPE) technique and gas-phase chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) were used. The SPE used Oasis HLB columns with 60 mg, which were eluted with 4 mL of ethyl acetate. After optimization, the method was validated by evaluating the analytical curve, linearity, limits of detection and quantification, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy (recovery test) and matrix effect. Analytical curves prepared in the matrix extract presented $r > 0.998$. The limits of quantification for the method, considering a pre-concentration step of 200-fold, were $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$ for all biocides, but TCMTB (0.125 ng mL^{-1}). Recoveries varied between 99.9 and 117.6 % and the accuracy (% RSD) ranged between 0.1 % and 10.3 %. RSD values for precision, in terms of repeatability, ranged between 1.9 % and 8.2 %. A medium to high matrix effect was found for 3 of those biocides. The validated method was applied to evaluate the presence of these five biocides in four of the main antifouling paints currently used at Rio Grande harbor area. A method of leaching of these biocides to the water phase was used. As a result, two of these biocides were found in concentrations above the LOQ. Thus, the method proved to be adequate to achieve the present objectives and all the validation parameters were within the limits suggested for the validation of chromatographic methods.

Keywords: antifouling paints, booster biocides, multi-residue

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. CG-EM Perkin Elmer modelo Clarus 500 MS	44
Figura 2. Experimento realizado para lixiviar os biocidas presentes nas tintas anti-incrustantes utilizadas neste estudo (em triplicata)	48
Figura 3. Cromatograma da mistura dos padrões analíticos na concentração de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ com os respectivos tempos de retenção e íons moleculares.	50
Figura 4. Cromatograma do composto TCMTB na concentração de 5ng mL^{-1} com a relação sinal/ruído do LD.....	52
Figura 5. Cromatograma do composto TCMTB na concentração de 25ng mL^{-1} com a relação sinal/ruído do LQ.....	53
Figura 6. Comparação das inclinações das Curvas analíticas preparadas no extrato da matriz aquosa e no solvente.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupo de 16 biocidas homologados pela IMO para utilização em tintas anti-incrustantes	7
Tabela 2: Principais propriedades físico-químicas dos 16 biocidas usados em tintas anti-incrustantes de terceira geração.....	9
Tabela 3: Toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração sobre diversos grupos de organismos.....	12
Tabela 4. Regentes utilizados nas análises.	40
Tabela 5. Padrões utilizados no desenvolvimento do trabalho	41
Tabela 6: Massa molecular (MM), tempo de retenção (t_R) e seus respectivos íons de quantificação (Q) e confirmação (C 1 e C 2) dos compostos analisados.	44
Tabela 7: Tempo de retenção, fator de retenção, resolução e fator de separação dos cinco biocidas determinados.....	51
Tabela 8: Resultados obtidos para calibração dos biocidas preparados no solvente e no extrato da matriz empregando EFS e CG-EM	51
Tabela 9: Limites de detecção e quantificação (ng mL^{-1}) do instrumento e do método ($n = 3$).....	52
Tabela 10. Dados dos ensaios de exatidão para determinação de um grupo de cinco biocidas determinados em matriz aquosa ($n = 3$)	54
Tabela 11. Ensaios de repetitividade em diferentes níveis de fortificação. ($n = 7$)	55
Tabela 12. Resultados da avaliação da precisão intermediária, obtida para diferentes analistas (A e B) ($n = 3$).....	56
Tabela 13. Valores dos coeficientes angulares das curvas preparadas no solvente e na matriz e % de efeito de matriz calculado para cada analito($n = 3$)	56

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo do fator de retenção	34
Equação 2 Cálculo da resolução.....	34
Equação 3. Equação para o cálculo do fator de separação.	34
Equação 4: Cálculo do limite de detecção	36
Equação 5: Cálculo do limite de quantificação	36
Equação 6: cálculo de recuperação	37
Equação 7. Cálculo do desvio padrão absoluto	38
Equação 8: cálculo de variação de concentração	38
Equação 9: Cálculo de efeito de matriz.....	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Otimização dos parâmetros cromatográficos	74
Anexo B - Curvas analíticas dos compostos preparadas na matriz	76
Anexo C - Curvas analíticas dos compostos preparadas no solvente.....	79
Anexo D - Cromatogramas das tintas analisadas	81
Anexo E - Espectros dos compostos.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM - American Society for Testing and Materials
ATP - Adenosina trifosfato
BT - Benzotiazol
CAS - Chemical Abstracts Service
CE₅₀ - concentração de efeito
CL₅₀ - concentração letal
CG - Cromatografia em fase gasosa
CG-DCE - Cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons
CG-EM - Cromatografia em fase Gasosa com detecção por Espectrometria de Massas
CLAE-DAD - Cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
CLAE-EM - Cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a detector de espectrometria de massas
COES - compostos organoestânicos
Comp. - Comprimento
CONECO - Laboratório de Contaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia
CuPT - cobre piritiona
CV - Coeficiente de Variação
DCOIT - 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazoline-3-one – Sea-nine-211
DMSA - n,n-dimetil-n'-fenilsulfanida
DPR - Desvio Padrão Relativo
E - Isômero Externo
EFS - extração em fase sólida
ELL - extração líquido-líquido
EM - Espectrômetro de Massas
EPA - Environmental Protection Agency
FRR - Fator de Resposta Relativo
FURG - Universidade Federal do Rio Grande

h - hora

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH - International Conference on Harmonisation

I - Isômero Interno

IMO - International Marine Organization

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia

ISO - International Organization for Standardization

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

k - fator de retenção

LD - Limite de Detecção

LD_e - Limite de Detecção do Equipamento

LD_m - Limite de Detecção do Método

log K_{ow} - logaritmo do coeficiente de partição octanol-água

LQ - Limite de Quantificação

MBT - mercaptobenzotiazol

MEFS - micro extração em fase sólida

min - minuto

MM - massa molar

m/z - razão massa carga

NA: não aplicável

NE - não encontrado

NIST - National Institute of Standards and Technology

PE - Ponto de Ebulição

PF- Ponto de Fusão

PI - padrão interno

PR - padrão de recuperação

PV - pressão de vapor

R - Recuperação

R % - Percentual de Recuperação

r - Coeficiente de correlação linear

Rs - resolução

s - estimativa do desvio padrão absoluto

S.A. - solubilidade em água

SIFI - do inglês: Selected Íon and Full Íon

SIM - Single Íon Monitoring

TBT - Tributyl estanho

TCMS - tetracloro-metilsulfonil

TCMTB - 2-(Thiocyanomethylthio) benzothiazole

TCMX - 2,3,5,6-tetracloro-m-xileno

TPBP - trifenilborano piridina

TPT - Trifenil estanho

t_R - tempo de retenção

UNEP - United Nations Environment Programme

USEPA - United States Environmental Protection Agency

UV - ultravioleta

v - Volume

ZnPT - zinco piritiona

α - fator de retenção

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de tabelas	viii
LISTA DE EQUAÇÕES	ix
LISTA DE ANEXOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
SUMÁRIO.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Geral	5
2.2 Específicos.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 BIOCIDAS NÃO METÁLICOS.....	8
3.1.1 Irgarol 1051	8
3.1.2 Diuron.....	11
3.1.3 DCOIT (Sea-Nine 211).....	14
3.1.4 Clorotalonil	15
3.1.5 Diclofluanida.....	17
3.1.6 Tiram	19
3.1.7 TCMTB (Busan).....	20
3.1.8 TCMS Piridina (Densil).....	21
3.1.9 Trifenilborano Piridina (TPBP).....	22
3.2 BIOCIDAS METÁLICOS	23
3.2.1 Piritonas metálicas.....	23
3.2.2 Ziram	25

3.2.3	Maneb	26
3.2.4	Biocidas à base de Cobre	27
3.3	Características ideais de um anti-incrustante	28
3.4	Avaliações Ecotoxicológicas	29
3.5	Determinações analíticas	30
3.5.1	Extração em fase sólida	31
3.5.2	Cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	32
3.5.3	Sistema para injeção de grandes volumes em cromatografia de fase gasosa	32
3.6	Validação de metodologias analíticas	33
3.6.1	Parâmetros cromatográficos	33
3.6.2	Curva analítica e linearidade	35
3.6.3	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	35
3.6.4	Exatidão	36
3.6.5	Precisão (repetitividade e precisão intermediária)	37
3.6.6	Efeito de matriz	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Tintas utilizadas para os testes	40
4.2	Reagentes, Solventes e Materiais	40
4.3	Limpeza da Vidraria	40
4.4	Controle analítico	41
4.5	Preparo das soluções analíticas	42
4.6	Otimização do sistema cromatográfico	43
4.7	Validação do método	44
4.7.1	Curva analítica e linearidade	45
4.7.2	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	45
4.7.3	Exatidão (ensaios de recuperação)	46

4.7.4	Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	46
4.7.5	Efeito de matriz.....	46
4.8	Experimento.....	47
4.9	Processamento das amostras.....	48
4.9.1	Extração dos analitos.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	Identificação dos analitos.....	50
5.2	Validação do método.....	51
5.2.1	Curva analítica e linearidade.....	51
5.2.2	Limites de detecção e quantificação.....	52
5.2.3	Exatidão (ensaios de recuperação).....	54
5.2.4	Precisão.....	55
5.2.5	Efeito de matriz.....	56
5.3	Experimento das tintas.....	58
6	CONCLUSÕES.....	62
7	RECOMENDAÇÕES FUTURAS.....	63
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
9	PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO.....	73
9.1	Artigo publicado em revista científica.....	73
9.2	Resumos apresentados em congressos.....	73
10	ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos grupos de contaminantes orgânicos potencialmente danosos a ecossistemas aquáticos, despontaram nos últimos anos os compostos utilizados como biocidas de tintas anti-incrustantes. Essas tintas são aplicadas como sistemas de proteção de superfícies expostas à água, com a finalidade de combater a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes (“*fouling*”). Usualmente, tintas anti-incrustantes são aplicadas aos cascos de embarcações comerciais e de passeio, plataformas petrolíferas, tubulações submarinas, comportas de represas, tanques destinados à aquicultura, dentre outras estruturas submersas (Yebera *et al.*, 2004). Dentre as aplicações mencionadas para as referidas tintas, a utilização como revestimento protetor em embarcações tem sido apontada por muitos autores como a mais impactante para o ambiente devido ao seu caráter altamente difundido em zonas costeiras (Almeida *et al.*, 2007).

Segundo Kotrikla (, 2009) o emprego de sistemas anti-incrustantes em embarcações é justificado pelos seguintes motivos: (a) o aumento da fricção entre o casco e a água, demandando uma maior potência dos motores e, conseqüentemente, gerando um aumento no consumo de combustível; (b) aumento da frequência de docagens, gerando um incremento de custos e de resíduos gerados; (c) aumento das taxas de corrosão e (d) introdução não intencional de espécies exóticas em ambientes aquáticos.

As tintas anti-incrustantes são atualmente categorizadas em três classes: as de primeira geração, a qual inclui principalmente compostos à base de cobre; segunda geração baseada em compostos organoestânicos (tributilestanho - TBT e trifenilestanho - TPT); e a terceira geração, que inclui as tintas anti-incrustantes livres de organoestânicos, que estão sendo aplicadas atualmente no mundo inteiro (Fernandez & Pinheiro, 2007).

O óxido cuproso passou a ser utilizado como biocida incorporado em tintas anti-incrustantes a partir da metade do século XIX. No entanto, as tintas à base de cobre se tornavam ineficientes em menos de um ano e, portanto, biocidas mais efetivos foram necessários (Champ, 2000). O uso de compostos organoestânicos como biocidas surgiu de um estudo sistemático sobre a ação

desses compostos em fungos e bactérias, organismos marinhos, vermes, parasitas, caramujos aquáticos e insetos. Tal estudo foi conduzido pelo Conselho Internacional de Pesquisas sobre Tintas por volta de 1950, no Instituto de Química Orgânica de Utrecht (Godoi *et al.*, 2003).

As tintas de segunda geração, que apresentavam eficiência elevada (em torno de cinco anos de proteção), foram banidas pela IMO (*International Marine Organization*) no início de 2008 devido à ação danosa sobre a biota marinha. O impacto ambiental causado pela utilização destes compostos surgiu no início dos anos 80, quando se observou os efeitos deletérios desses compostos sobre organismos “não alvo” (Alzieu, 2000). Dessa forma, verificaram-se efeitos nocivos sobre a reprodução e o crescimento de vários organismos de vida marinha (animais e plantas) (Castro *et al.*, 2007). Desde então, os biocidas contidos em tintas anti-incrustantes de segunda geração estão sendo gradativamente substituídos.

Atualmente, cerca de dezesseis biocidas diferentes foram homologados pela Organização Marítima Internacional (IMO) para utilização em tintas anti-incrustantes: Diuron, Irgarol, DCOIT, Clorotalonil, Diclofluanida, Tiram, TCMTB (Busan), Densil, TPBP, Cobre piritona, Zinco piritona, Ziram, Maneb, Óxido cuproso, Tiocianato cuproso e Naftenato cúprico (Fernandez & Pinheiro, 2007). No caso particular do óxido cuproso, passou a ser incorporado novamente nas tintas anti-incrustantes de terceira geração. Entretanto, devido a sua baixa eficiência, é usado concomitantemente com outros biocidas. Embora a busca por sistemas anti-incrustantes eficientes seja necessária, vários estudos têm alertado para os riscos relacionados ao emprego destes compostos, uma vez que o comportamento no ambiente aquático e possíveis efeitos sobre as comunidades biológicas são pouco conhecidos (Thomas *et al.*, 2004).

Embora os biocidas presentes em tintas anti-incrustantes de terceira geração estejam sendo utilizados desde a década de 1980 em países desenvolvidos, não há dados sobre sua utilização ou mesmo seus níveis de contaminação ambiental na América do Sul. Sendo assim, a verificação da presença desses compostos em matrizes ambientais é extremamente necessária, visto que alguns já estão inclusive sendo regulamentados em países europeus e no Japão (Fernandez & Pinheiro, 2007). Porém, um dos grandes problemas relacionados ao monitoramento ambiental de biocidas

oriundos de tintas anti-incrustantes é a carência de métodos analíticos que possibilitem a detecção simultânea de vários destes biocidas. Uma vez que as regiões costeiras e portuárias recebem simultaneamente embarcações oriundas de diferentes regiões do planeta, as quais podem estar utilizando tintas anti-incrustantes com distintas composições, é de grande importância a aplicação de técnicas que possibilitem a detecção simultânea dos possíveis contaminantes presentes.

Concomitantemente ao desenvolvimento desses métodos, é fundamental que sejam identificadas as áreas mais suscetíveis a contaminação e viabilizados estudos de monitoramento das áreas mais passíveis a impacto (ex.: importante atividade de navegação e circulação restrita). Esta questão é especialmente delicada em se tratando de regiões como a América do Sul, em razão da quase inexistência de estudos dessa natureza.

Sendo assim, para o desenvolvimento do presente estudo, os cinco biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração mais frequentemente detectados em amostras ambientais (Irgarol, DCOIT, Clorotalonil, Diclofluanida e TCMTB) foram selecionados, com base na literatura especializada. Além disso, a fim de selecionar compostos passíveis de serem identificados e quantificados por técnicas de cromatografia de fase gasosa foram também consideradas as propriedades físico-químicas desses biocidas. Considerando que as tintas anti-incrustantes comercializadas no Brasil não indicam no rótulo os biocidas utilizados nas suas formulações, não é possível prever quais compostos estão sendo liberados por esses produtos e possivelmente serão encontrados no ambiente aquático. Além disso, os portos recebem regularmente embarcações oriundas de outros países, que tão pouco explicitam os compostos biocidas presentes nas suas tintas anti-incrustantes. Desta forma, no intuito de identificar os biocidas presentes, as tintas mais utilizadas no pólo naval de Rio Grande/RS (Super Marine AF IONEX MB e AF 870, fabricadas pela Renner[®], e Mícron e Tritão, fabricadas pela International[®]) foram analisadas.

O método que foi validado para determinação dos cinco biocidas em água inclui a extração em fase sólida (EFS) e cromatografia de fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM). A EFS é um procedimento amplamente utilizado em análises multiresíduos de biocidas em

amostras ambientais, visto que se refere a um método de extração que possibilita uma redução no tempo de análise e permite que várias amostras sejam processadas concomitantemente. Além dessa vantagem, a EFS apresenta ainda, relativamente, um baixo consumo de solventes e um baixo custo operacional. A CG-EM foi escolhida devido à suas inúmeras aplicações em determinação destes cinco biocidas descritas na literatura, pois apresenta alta precisão qualitativa e quantitativa, bem como alta sensibilidade.

Para o processo de validação do método, utilizou-se soluções padrão preparadas em acetato de etila, as quais foram utilizadas para fortificação em água ultrapura e submetidas ao processo analítico, para simular a matriz. Já para a determinação dos biocidas presentes nas tintas, realizou-se um experimento ao qual foi adaptado e baseado em dois métodos padronizados que determinam a taxa de liberação dos biocidas em tintas anti-incrustantes (Harino *et al.*, 2008a), onde, placas metálicas galvanizadas de 25 cm² foram pintadas separadamente, ambas as faces, com as tintas Mícron Premium International[®], Tritão International[®], Supermarine AF IONEX MB Renner[®], AF 870 Renner[®], seguindo os critérios recomendados pelos fabricantes. Após completa secagem da pintura, as placas foram fixadas por fios inertes de náilon e submersas em água ultrapura por um período de 10 dias sob agitação ao abrigo da luz. Após este período as amostras foram processadas e analisadas de acordo com o método validado.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Otimizar e validar um método analítico para determinação simultânea de cinco biocidas orgânicos presentes em tintas anti-incrustantes de terceira geração comumente utilizadas no Brasil.

2.2 Específicos

- Identificar as principais tintas anti-incrustantes utilizadas na região portuária da cidade de Rio Grande/RS, Brasil;
- Otimizar e validar um procedimento de preparo de amostra em matriz aquosa utilizando uma técnica de extração em fase sólida;
- Otimizar e validar um método analítico para a análise de cinco biocidas orgânicos presentes em tintas anti-incrustantes de terceira geração com base na cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), avaliando para tanto as principais figuras de mérito (limites de detecção e de quantificação, curva analítica, linearidade, precisão, exatidão e efeito de matriz);
- Avaliar os biocidas orgânicos presentes nas principais tintas anti-incrustantes de terceira geração utilizadas pelo pólo naval da cidade de Rio Grande (RS - Brasil) com base na sua liberação para uma matriz aquosa.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Previamente ao desenvolvimento do presente estudo, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre as propriedades químicas, comportamento ambiental, ocorrência ambiental, toxicologia e técnicas de análise relacionadas aos 16 biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração. Este artigo, intitulado, *Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático*, encontra-se publicado no periódico Química Nova (Castro *et al.*, 2011).

Conforme mencionado, 16 diferentes compostos foram homologados pela Organização Marítima Internacional (IMO) para utilização em tintas anti-incrustantes de terceira geração para embarcações (Tabela 1) (IMO, 2005). Estes biocidas pertencem a diferentes grupos químicos e, em alguns casos, podem ser utilizados concomitantemente (até 4 deles) em uma mesma formulação comercial (Okamura & Mieno, 2006).

Na maioria das tintas anti-incrustantes disponíveis no mercado mundial, esses compostos são quimicamente associados a uma matriz acrílica solúvel e atuam como biocidas ou potencializadores do efeito biocida gerado pelos metais presentes na formulação da tinta (Almeida *et al.*, 2007). Esse tipo de associação promove taxas de liberação constantes dos biocidas ao longo do tempo, elevando assim a durabilidade dos revestimentos (Almeida *et al.*, 2007).

Em razão da crescente utilização destes biocidas em tintas anti-incrustantes de terceira geração, começaram a ser publicados estudos relacionando a sua ocorrência ambiental a áreas com intenso tráfego de embarcações (Mukherjee *et al.*, 2009; Albanis *et al.*, 2002). Entretanto, a maior parte destes estudos tem sido realizada em áreas portuárias e marinas da Europa, (Gatidou *et al.*, 2007) Estados Unidos da América (Thomas & Langford, 2009b) e Japão (Harino *et al.*, 2009) existindo, até o momento, somente dois estudos do gênero para a América do Sul sobre Irgarol e Diuron (Demoliner *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2004).

Tabela 1: Grupo de 16 biocidas homologados pela IMO para utilização em tintas anti-incrustantes

Biocida (Nome químico / CAS)	Estrutura	Biocida (Nome químico / CAS)	Estrutura
Irgarol 1051 (2-metil-4-terc-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) N° CAS 28159-98-0		Trifenilborano Piridina / TPBP N° CAS 971-66-4	
Diuron (3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea) N° CAS 330-54-1		Cobre Piritiona / CuPT (Cobre-bis-(2-piridinatiol-1-óxido))N° CAS 14915-37-8	
DCOIT (4,5-Dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona) N° CAS 64359-81-5		Zinco Piritiona / ZnPT (Zinco-bis-(2-piridinatiol-1-óxido)) N° CAS 13463-41-7	
Clortalonil (2,4,5,6-Tetracloroisofaltonitrila) N° CAS 1897-45-6		Ziram (Zinco-bis-(dimetil ditiocarbamato)) N° CAS 137-30-4	
Diclofluanida (N,N-Dimetil-N'-fenil-N'-(diclorofluorometiltio)sulfamida) N° CAS 1085-98-9		Maneb [etilenobis-(ditiocarbamato)manganês]polimérico N° CAS 12427-38-2	
Tiram (Tetrametiluram disulfida) N° CAS 137-26-8		Óxido Cuproso CAS 1317-39-1	
TCMTB / Busan (2-(tiocianometiltio)benzotiazol) N° CAS 21564-17-0		Tiocianato cuproso N° CAS 1111-67-7	
TCMS Piridina / Densil ((2,3,6-tetracloro-4-metilsulfonyl)piridina) N° CAS 13108-52-6		Naftenato cúprico N° CAS 1338-02-9	

3.1 BIOCIDAS NÃO METÁLICOS

Este grupo envolve compostos orgânicos com diferentes funções químicas, entre eles, benzotiazóis, compostos clorados, nitrogenados, triazinas, entre outros (Fernandez & Pinheiro, 2007).

3.1.1 Irgarol 1051

O Irgarol 1051 (2-metiltio-4-*terc*-butilamino-6-ciclopropilamino-*s*-triazina) é um composto pertencente ao grupo das triazinas que apresenta solubilidade moderada em água (7 mg L^{-1}), coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) de 3,95 e baixa taxa de degradação nessa matriz (Tabela 2).

Estudos demonstraram que esse composto permanece intacto por períodos de até 36 dias em amostras de água e que particionam preferencialmente nos sedimentos (Okamura & Sugiyama, 2004). Após esse período, o Irgarol 1051 pode ser hidrolisado em diferentes metabólitos: M1 (2-metiltio-4-*terc*-butilamino-6-amino-*s*-triazina), M2 (2-amino-propanal-4-*terc*-butilamino-6-metiltio-*s*-triazina) e M3 (2,4(diamino-di-*terc*-butil)-6-metiltio-*s*-triazina). Apesar do M1 ser o metabólito preferencialmente formado, as suas concentrações ambientais (ex.: marinhas) são normalmente mais baixas do que as encontradas para o Irgarol (Okamura *et al.*, 2000). Isso sugere que a taxa de transformação de Irgarol a M1 é relativamente lenta e/ou que a taxa de degradação deste metabólito é maior do que a de sua formação (Thomas *et al.*, 2002). Em sedimentos, a degradação do Irgarol é lenta mesmo sob condições aeróbias, com tempos de meia vida de 100 e 200 dias para os sedimentos marinhos e de água doce, respectivamente. Essas taxas são consideravelmente mais lentas em condições anaeróbias (Lam *et al.*, 2006).

O Irgarol é o biocida utilizado em tintas anti-incrustantes mais freqüentemente detectado no mundo, tendo sido primeiramente reportado como contaminante aquático em 1993 na Cote d'Azur (França). (Readman, 2006) Estudos em águas costeiras e continentais indicam uma ocorrência bastante difundida nesses ambientes. (Voulvoulis, 2006) Estudos realizados nos Estados Unidos, Europa e Ásia têm demonstrado elevadas concentrações

desse composto em amostras de água, com valores de até 1.300 ng L⁻¹ nas Ilhas Virgens, 1.700 ng L⁻¹ na Cote d'Azur na França e 4.200 ng L⁻¹ em Singapura. (Harino & Langston, 2009; Thomas & Langford, 2009a; Basheer *et al.*, 2002) Também tem sido reportada a ocorrência ambiental do metabólito M1 com concentrações variando entre 1 e 4.000 ng L⁻¹ em amostras de água oriundas de marinas da Ásia, Europa e Estados Unidos (Gardinali *et al.*, 2004; Ferrer & Barcelo, 2001; Martinez *et al.*, 2000).

Tabela 2: Principais propriedades físico-químicas dos 16 biocidas usados em tintas anti-incrustantes de terceira geração.

Biocida	log K _{ow}	S.A. (mg L ⁻¹)	M.M.	P.V. (Pa)	P.E. (°C)
Irgarol 1051	3,95	7	253,4	1,5x10 ⁻⁵	428,0
Diuron	2,85	36,4	233,1	4,1x10 ⁻⁴	385,2
DCOIT	2,85	0,0065	213,3	4,0x10 ⁻⁴	322,6
Clorotalonil	2,64	0,6	265,9	1,3x10 ⁻⁵	350,5
Diclofluanida	3,70	0,006	333,2	1,3x10 ⁻⁴	336,8
Tiram	1,70	30,0	240,4	NE	307,4
TCMTB	3,30	45,0	238,4	1,0	NA
TCMS Piridina	NE	0,025	294,9	NE	451,1
Trifenilborano Piridina	NE	1,0	321,2	1,3x10 ⁻⁴	348,0
Cobre Piritiona	0,97	<1	315,9	NE	253,8
Zinco Piritiona	0,97	6,0	317,7	1,33x10 ⁻⁴	262,0
Ziram	1,23	17,0	305,8	NE	248,0
Maneb	NE	6,0	265,3	NE	308,2
Óxido Cuproso	NE	NE	145,1	NE	1800,0
Tiocianato de Cobre	NE	NE	179,7	NE	146,0
Naftenato de Cobre	NE	NE	405,9	NE	250,0

Dados obtidos de Voulvoulis *et al.* (, 2006); Sakkas, (, 2006); Lambropoulou *et al.*(, 2004); Van Wezel & Vlaardingen (, 2004); Thomas & e Harino (, 2004); NE: dados não encontrados na literatura; NA: não aplicável, visto que esse composto se decompõe abaixo do ponto de ebulição. (S.A., solubilidade em água; M.M., massa molar; P.V., Pressão de vapor; P.E., Ponto de ebulição).

A ocorrência de Irgarol 1051 em amostras de água do mar tem sido globalmente relacionada a áreas onde se observa fluxo de embarcações, sobretudo em marinas e portos pesqueiros. Zonas exclusivamente portuárias (onde trafegam embarcações de grande porte) têm apresentado concentrações proporcionalmente mais baixas quando comparadas a essas áreas (Gough *et al.*, 1994). Adicionalmente, os níveis de Irgarol variam sazonalmente conforme as atividades náuticas na Europa, evidenciando a ampla utilização deste

composto em tintas anti-incrustantes aplicadas a embarcações de pequeno porte (Bowman *et al.*, 2003). No Brasil, determinações realizadas em amostras de água dos Rio Paraíba do Sul (Azevedo *et al.*, 2004) e do canal do São Gonçalo Demoliner *et al.*, (, 2010) revelaram níveis extremamente baixos, porém detectáveis, de Irgarol. Em ambas as áreas, foi observada a presença de tráfego de embarcações.

Alguns estudos conduzidos com amostras de sedimentos obtidas em portos e marinas encontraram valores de Irgarol de até 113 ng g⁻¹ na baía de Otsuchi (Japão) (Gatidou *et al.*, 2007), 220 ng g⁻¹ no mar Báltico e 1.011 ng g⁻¹ no estuário Blackwater (Reino Unido) (Thomas & Langford, 2009b; Harino *et al.*, 2007a). No Brasil, níveis de concentração variando entre 0,2 ng L⁻¹ e 5,8 ng g⁻¹ foram detectados em amostras de água e sedimentos obtidos em uma zona portuária localizada o estuário da Lagoa dos Patos no Rio Grande do Sul (Dominguez, 2010).

O Irgarol 1051 é um potente inibidor da atividade fotossintética, atuando principalmente sobre o fotossistema II. Esse composto promove a inibição da fixação de carbono, provocando uma redução na produção de carboidratos por seres autotróficos (Hall *et al.*, 1999). Desta forma, seu efeito é mais pronunciado em organismos fitoplanctônicos (Sakkas *et al.*, 2002). Esse fato tem sido confirmado por testes de toxicidade, onde foi verificado, por exemplo, uma CE₅₀ 120 h de 0,43 µg L⁻¹ para a diatomácea *Skeletonema costatum* e de 0,56 µg L⁻¹ para a clorofícea *Dunaliella tertiolecta*. Já para espécies de peixe, como *Menidia beryllina* e *Cyprinodon variegatus*, os valores de CL₅₀ (96 h) foram de 1.580 µg L⁻¹ e 3.500 µg L⁻¹ (Tabela 3) respectivamente.

Adicionalmente testes ecotoxicológicos realizados no Brasil com as espécies de crustáceos *Acartia tonsa* (48 h), *Mysidopsis juniae* (96 h) e *Kalliapseudes schubartii* (96 h) resultaram em valores de CL₅₀ de 714, 310 e 5.600 µg L⁻¹, respectivamente. (Perina, 2009) A determinação de Irgarol 1051 em níveis traço tem sido realizada por diferentes métodos analíticos. Este analito é normalmente extraído de matrizes aquosas por métodos que empregam a extração em fase sólida (EFS) ou extração líquido-líquido (ELL). Para matrizes sólidas, como o sedimento, os métodos de extração mais aplicados utilizam *Soxhlet* ou sonificação (Albanis *et al.*, 2002). Já a quantificação pode ser feita por cromatografia de fase gasosa com detector de

espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia de fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) ou cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas (CLAE-EM). Entretanto, a separação do Irgarol dos seus metabólitos apresenta uma melhor resolução por cromatografia líquida com ionização química à pressão atmosférica (CLAE-IQPA-EM) (Hernando *et al.*, 2006).

3.1.2 Diuron

O Diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) é um herbicida do grupo das feniluréias que vem sendo utilizado na agricultura desde 1950 (Yebra *et al.*, 2004) sendo empregado em tintas anti-incrustantes a partir da década de 1980. (Ferrer *et al.*, 1997) É um composto não iônico, com moderada solubilidade em água (36,4 mg L⁻¹) e coeficiente de partição octanol/água (log K_{ow}) de 2,85 (Tabela 2).

Esse composto é estável a oxidação e atua como inibidor da fotossíntese em diversas espécies. (Harino & Langston, 2009) Sua taxa de hidrólise é insignificante em um pH neutro, mas aumenta sob circunstâncias fortemente ácidas ou alcalinas. Estudos experimentais demonstram que sua meia vida em ambiente aquático encontra-se entre 14 e 27 dias (Thomas & Langford, 2009b).

Tabela 3: Toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração sobre diversos grupos de organismos.

Biocida	Grupo	Espécie	Efeito (tempo)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Irgarol 1051	Alga	<i>Skeletonema costatum</i>	CE ₅₀ (120h)	0,43	
		<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CE ₅₀ (120h)	0,56	
	Peixe	<i>Menidia beryllina</i>	CL ₅₀ (96h)	1.580	
		<i>Cyprinodon variegatus</i>	CL ₅₀ (96h)	3.500	
	Crustáceo	<i>Acartia tonsa</i>	CL ₅₀ (48h)	714	
		<i>Mysidopsis juniae</i>	CL ₅₀ (96h)	310	
		<i>Kalliapseudes schubartii</i>	CL ₅₀ (96h)	5600	
Diuron	Alga	<i>Chaetoceros gracilis</i>	CE ₅₀ (72h)	36,0	
		<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CE ₅₀ (96h)	0,7	
	Crustáceo	<i>Artemia salina</i>	CE ₅₀ (24h)	3.011	
		<i>Acartia tonsa</i>	CL ₅₀ (48h)	1.486	
		<i>Mysidopsis juniae</i>	CL ₅₀ (96h)	589	
			<i>Kalliapseudes schubartii</i>	CL ₅₀ (96h)	7.560
	Ouriço	<i>Paracentrotus lividus</i>	CE ₅₀ (48h)	2.390	
<i>Lytechinus variegatus</i>		CE ₅₀ (24h)	3.335		
DCOIT	Alga	<i>Skeletonema costatum</i>	CL ₅₀ (96h)	13,9	
	Peixe	<i>Cyprinodon variegatus</i>	CL ₅₀ (96h)	20,5	
Clorotalonil	Alga	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CE ₅₀ (96h)	64,0	
	Peixe	<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀ (96h)	22,6	
Diclofluanida	Bactéria	<i>Vibrio fisheri</i>	CE ₅₀ (15min)	15,7	
	Alga	<i>Selenastrum capricornotum</i>	CE ₅₀ (72h)	21	
	Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48h)	1.330	
	Molusco	<i>Mytilus edulis</i>	CE ₅₀ (48h)	81	
	Ouriço	<i>Paracentrotus lividus</i>	CE ₅₀ (48h)	627	
	Nematódeo	<i>Ciona intestinalis</i>	CE ₅₀ (24h)	283	
Tiram	Alga	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CE ₅₀ (96h)	1.000	
	Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CL ₅₀ (48h)	210	
	Peixe	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CE ₅₀ (60dias)	0,64	
TCMTB	Bactéria	<i>Vibrio fisheri</i>	CE ₅₀ (15min)	58,0	
	Alga	<i>Selenastrum capricornotum</i>	CE ₅₀ (30h)	7,8	
	Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48h)	6,8	
TPBP	Alga	<i>Skeletonema costatum</i>	CL ₅₀ (72h)	2,2	
	Crustáceo	<i>Artemia salina</i>	CL ₅₀ (72h)	130	
Piritionas Metálicas	Crustáceo	Várias espécies	CL ₅₀ (72h)	> 100	
Ziram	Alga	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CE ₅₀ (96h)	1.200	
	Peixe	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CE ₅₀ (60dias)	1,5	

CE - concentração efetiva; CL - concentração letal

Apesar do seu uso na agricultura, concentrações mais elevadas de Diuron em água do mar que as observadas em águas doces indicam que a sua fonte está relacionada à utilização como agente anti-incrustante (Thomas *et al.*, 2000). Elevadas concentrações associadas ao seu uso em tintas anti-incrustantes têm sido encontradas em amostras de água obtidas em marinas na Europa, as quais apresentam seus picos nos períodos em que as embarcações de lazer estão sendo utilizadas. (Lamoree *et al.*, 2002) Valores de até 6.742, 2.000 e 1.130 ng L⁻¹ foram encontrados em águas da baía de Southampton (Inglaterra) (Thomas *et al.*, 2001), e em marinas na Catalúnia (Espanha) (Martinez *et al.*, 2000) e na Holanda (Lamoree *et al.*, 2002) respectivamente. Tais resultados são provavelmente conseqüência do grande fluxo de embarcações nessas regiões. Situação similar foi observada também em estudos na Inglaterra, Suécia, Espanha, Holanda, Portugal e Japão (Konstantinou & Albanis, 2004). No Brasil, foram verificadas concentrações detectáveis de Diuron em amostras de água e sedimentos nas concentrações de 20,9 ng L⁻¹ e 1,6 ng g⁻¹, oriundas de áreas sob a influência dos terminais portuários localizados no interior do estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS) (Dominguez, 2010).

Assim como o Irgarol 1051, o Diuron costuma apresentar toxicidade extremamente elevada para organismos fitoplanctônicos, tais como a diatomácea *Chaetoceros gracilis* (CE₅₀ (72 h) = 36,0 µg L⁻¹) e a clorócea *D. tertiolecta* (CE₅₀ (96 h) = 0,7 µg L⁻¹). (Mochida & Fujii, 2009b) Em contrapartida, apresenta níveis inferiores de toxicidade para invertebrados, como os observados para os microcrustáceos *Artemia salina* (CE₅₀ (24 h) = 3.011 µg L⁻¹) (Mochida & Fujii, 2009c), *Acartia tonsa* (CL₅₀ (48 h) = 1.486 µg L⁻¹), *Mysidopsis juniae* (CL₅₀ (96 h) = 589 µg L⁻¹) e *Kalliapseudes schubartii* (CL₅₀ 96 h = 7.560 µg L⁻¹). (Perina, 2009) Adicionalmente, em testes de toxicidade visando verificar embriotoxicidade do Diuron sobre a espécie de ouriço *Paracentrotus lividus*, a CE₅₀ (48 h) obtida foi de 2.390 µg L⁻¹. (Mochida & Fujii, 2009c; Manzo *et al.*, 2006) Similarmente para espécie de ouriço *Lytechinus variegatus* os valores de CE₅₀ (24 h) obtidos foram de 3.335 µg L⁻¹ (Perina, 2009). Esses resultados refletem o fato do Diuron ter sido inicialmente desenvolvido para o combate de ervas daninhas, tendo seu mecanismo de atuação associado à

inibição do fluxo de elétrons necessários à realização da fotossíntese nos organismos autotróficos (Mochida & Fujii, 2009b).

O Diuron tem sido normalmente analisado a partir de matrizes aquosas utilizando EFS, enquanto que a técnica mais frequentemente empregada para sedimentos é a agitação mecânica da amostra em solventes orgânicos como acetonitrila. A identificação e quantificação são feitas por cromatografia de fase líquida com detecção por espectrometria de massas (CLAE-EM), podendo também ser utilizada a cromatografia de fase gasosa, com detector de espectrometria de massas (CG-EM). Neste último caso, é necessária uma etapa prévia de derivatização por alquilação, podendo ser utilizado iodometano ou iodoetano como agente alquilante (Gerecke *et al.*, 2001; Voulvoulis *et al.*, 1999).

3.1.3 DCOIT (Sea-Nine 211)

O Sea-Nine 211 (DCOIT) é uma mistura comercial que possui 30 % do ingrediente ativo (4,5-Dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona) em xileno. Esse biocida, é um isotiazol que foi inicialmente sintetizado pela empresa “*Rohm and Haas*” em 1992, tendo sido homologado para utilização como agente anti-incrustante pela IMO, e recebido registro de utilização pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) em 1994. (Jacobson & Willingham, 2000) Com respeito às características físico-químicas, o DCOIT possui baixa solubilidade em água ($0,0065 \text{ mg L}^{-1}$), $\log K_{ow}$ de 2,85 e rápida taxa de degradação na água do mar (meia-vida de aproximadamente 1 hora) (Takahashi, 2009). Adicionalmente, formam complexos extremamente estáveis com os sedimentos, tornando-se pouco biodisponíveis e, conseqüentemente, apresenta um baixo fator de bioacumulação para organismos aquáticos. A degradação do DCOIT ocorre normalmente pela abertura da porção cíclica da molécula, o que reduz a toxicidade de seus subprodutos numa ordem de magnitude de 4 a 5 vezes. Em água do mar e nos sedimentos, a degradação acontece, sobretudo, pela ação de microrganismos, sendo a contribuição dos processos de hidrólise e de fotólise pouco significativos para essa transformação (Jacobson & Willingham, 2000). Desta forma, o DCOIT vem

sendo considerado o biocida utilizado em tintas anti-incrustante que apresentam menores danos ambientais (Takahashi, 2009; Jacobson & Willingham, 2000).

Os poucos estudos existentes apontam para níveis ambientais baixos. Segundo Harino *et al.*, (, 2009) o DCOIT está entre os biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração detectados em menores níveis em amostras obtidas no litoral japonês. As concentrações detectadas variaram entre 2 e 28 ng L⁻¹ no porto de Osaka e baías Maizuru e Hiroshima (Harino *et al.*, 2009). Já no litoral da Grécia foram detectados valores de até 49 ng L⁻¹, (Sakkas *et al.*, 2006) não sendo detectado entretanto em amostras de água da baía de Southampton (Inglaterra) (Thomas *et al.*, 2002).

Toxicologicamente, o DCOIT demonstra elevada atividade antimicrobiana, sobretudo com relação a bactérias, fungos e algas (Harino & Langston, 2009). Diferentemente do Diuron e do Irgarol 1051, os seus níveis de toxicidade para espécies do fitoplâncton e do zooplâncton, são muito parecidos. De modo similar em testes realizados com a diatomácea *Skeletonema costatum* e com o peixe *Cyprinodon variegatus*, os valores de CL₅₀ (96 h) foram 13,9 e 20,5 µg L⁻¹, respectivamente.

Os métodos analíticos aplicados para determinação do DCOIT em amostras de água são, em sua maioria, a EFS e a micro extração em fase sólida (MEFS) (Aguera *et al.*, 2000). Amostras de sedimentos são normalmente extraídas a partir de agitação mecânica com solventes orgânicos como acetonitrila (Harino *et al.*, 2007a). A identificação e quantificação deste biocida são normalmente realizadas através de cromatografia de fase líquida (CLAE-EM), podendo também ser realizada por cromatografia de fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM) (Thomas, 1998) ou detector de captura de elétrons (CG-DCE) (Hernando *et al.*, 2006).

3.1.4 Clorotalonil

O Clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofaltonitrila) é um organoclorado do grupo das isofaltonitrilas que é utilizado a mais de 30 anos como fungicida na agricultura mundial. (Voulvoulis, 2006) Sua utilização como biocida ativo em

tintas anti-incrustantes iniciou após o banimento das tintas à base de organoestânicos. (Readman, 2006) Esse composto apresenta um $\log K_{ow}$ de 2,64 (Tabela 2), uma baixa solubilidade em água ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) e é extremamente susceptível a fotodegradação. Devido a essas características, apresenta meia vida de até 4 semanas em meio aquático. Sua fotodegradação pode ser ainda mais rápida dependendo da natureza do corpo d'água e de fatores como a concentração de material orgânico, como ácidos húmicos e fúlvicos (Sakkas *et al.*, 2006). Estudos conduzidos por Walker *et al.*, (, 1988) demonstraram que a degradação do Clorotalonil é mais rápida em água estuarina e marinha do que em água esterilizada, sugerindo também uma contribuição microbiana nos processos de degradação desse composto. Em sedimentos, a meia vida do Clorotalonil é maior do que em água, apresentando persistência de até 3 meses (Voulvoulis, 2006; Walker & Jurado-Exposito, 1998). Quanto ao seu equilíbrio sortivo, estudos demonstraram que em pH 8 o Clorotalonil adsorve-se ao material particulado (Voulvoulis, 2006).

De acordo com os resultados obtidos por diversos estudos, a ocorrência ambiental de Clorotalonil não segue o mesmo padrão de distribuição dos demais biocidas utilizados em formulações de tintas anti-incrustantes. Em função do seu uso agrícola ser bastante difundido, (Konstantinou & Albanis, 2004) sendo freqüentemente detectado em solos plantados, poucos estudos relacionam a presença de Clorotalonil à utilização em tintas anti-incrustantes. Em função de suas propriedades físico-químicas, baixas concentrações desse composto têm sido detectadas na coluna d'água. Estudos realizados na Europa encontraram valores de Clorotalonil abaixo dos níveis de detecção das técnicas empregadas, (Carbery *et al.*, 2006; Sakkas *et al.*, 2006; Albanis *et al.*, 2002) sendo os maiores valores reportados para algumas marinas da Grécia ($\leq 120 \text{ ng L}^{-1}$) e para o estuário Blackwater (Inglaterra) ($\leq 1.380 \text{ ng L}^{-1}$). Entretanto, Sakkas *et al.* (, 2002) e Voulvoulis *et al.* (, 2000) reportaram concentrações de até 126 e $34,3 \text{ ng g}^{-1}$ em sedimentos de marinas na Grécia e no estuário Blackwater, respectivamente.

Segundo vários trabalhos, espécies de água doce e salgada não mostram diferenças significativas entre os níveis de toxicidade para esse composto (van Wezel & van Vlaardingen, 2004). Em testes de toxicidade realizados com espécies marinhas foi obtida para diatomácea *D. tertiolecta*

uma CE_{50} (96 h) de $64 \mu\text{g L}^{-1}$, (Mochida & Fujii, 2009a) e para espécie de peixe *Pimephales promelas* foi observada uma CL_{50} (96 h) de $22,6 \mu\text{g L}^{-1}$. (Mochida & Fujii, 2009c; DeLorenzo & Serrano, 2006) Estes resultados sugerem toxicidade ligeiramente maior para espécies animais, fato que pode ser justificado pela forte interação do Clorotalonil com determinadas enzimas de respiração celular (Caux *et al.*, 1996).

A etapa de extração de Clorotalonil a partir de amostras de água utiliza usualmente EFS ou ELL. Para sedimentos, tem sido empregada a sonificação da amostra em solventes orgânicos como acetona. A quantificação do composto é feita normalmente por CG com um detector de captura de elétrons (DCE). Porém, em virtude de sensibilidade, versatilidade e seletividade do CG-EM, essa técnica passou recentemente a ser bastante empregada (Hernando *et al.*, 2006).

3.1.5 Diclofluanida

A Diclofluanida (N,N-dimetil-N'-fenil-N'-(diclorofluorometiltio)sulfamida), pertence ao grupo químico dos organoclorados, apresenta uma baixa solubilidade em água ($0,006 \text{ mg L}^{-1}$) e $\log K_{ow}$ de 3,7 (Tabela 2). (Hamwijk *et al.*, 2005) Em razão das suas características físico-químicas, apresenta grande afinidade por material particulado e sedimentos (Thomas & Langford, 2009b). Além disso, em ambientes aquáticos com pH em torno de 8 a Diclofluanida possui maior tendência a adsorver-se ao material particulado e aos sedimentos (Voulvoulis, 2006). Esse composto mostra rápida taxa de degradação em água, apresentando meia vida de poucas horas nessa matriz. Ao se degradar, a Diclofluanida normalmente origina a N,N-dimetil-N'-fenilsulfamida (DMSA), sendo que os principais fatores envolvidos são a concentração de matéria orgânica, o pH do meio, a atividade microbiana e a incidência de luz. (Sakkas *et al.*, 2001) Este biocida é também suscetível à degradação anaeróbica em sedimento, o que representa uma forma significativa de sua remoção do ambiente (Voulvoulis, 2006).

A Diclofluanida não tem sido comumente detectada em amostras de água. Na Europa e na América do Norte diversos estudos realizados com

amostras de água obtidas em marinas e zonas portuárias encontraram concentrações inferiores aos limites de detecção das técnicas empregadas (Carbery *et al.*, 2006; Sakkas *et al.*, 2002). Entretanto, concentrações de até 214 ng L⁻¹ foram reportadas para algumas marinas na Grécia (Thomas & Langford, 2009a). Por outro lado, concentrações consideravelmente elevadas foram observadas em amostras de sedimentos costeiros oriundos de marinas. Em sedimentos obtidos no estuário de Blackwater (Inglaterra) foram determinadas concentrações de até 688 ng g⁻¹, enquanto que na Ásia as concentrações variaram entre < 0,4 até 14 ng g⁻¹ para baía Otsuchi (Japão) e entre < 0,1 até 13 ng g⁻¹ na costa do Vietnã (Harino *et al.*, 2008b). Adicionalmente, foram verificados picos de Diclofluanida imediatamente após as temporadas de intensa atividade náutica na Europa. Isso reforça a hipótese de uma fonte deste composto para o meio marinho estar ligada à utilização de tintas anti-incrustantes (Thomas *et al.*, 2002).

No que diz respeito à toxicologia, em um estudo realizado por Bellas (, 2006) expondo larvas de três espécies de invertebrados marinhos à Diclofluanida, os valores de toxicidade obtidos para o molusco *Mytilus edulis*, o ouriço *Paracentrotus lividus* e o nematódeo *Ciona intestinalis* foram CE₅₀ (48 h) = 81 µg L⁻¹, CE₅₀ (48 h) = 627 µg L⁻¹ e CE₅₀ (24 h) = 283 µg L⁻¹, respectivamente. Em outro estudo realizado com o microrganismo *Vibrio fisheri* (15 minutos), a alga *Selenastrum capricornotum* (72 h) e o microcrustáceo *Daphnia magna* (48 h), os valores de CE₅₀ observados foram de 15,7, 21 e 1.330 µg L⁻¹, respectivamente (Fernandez-Alba *et al.*, 2002). Com base nesses resultados, e no fato de que a Diclofluanida apresenta acentuado efeito carcinogênico e mutagênico (Fernandez-Alba *et al.*, 2002), pode-se concluir que esse composto possui uma toxicidade mais elevada sobre organismos unicelulares, o quais apresentam ciclo de vida curto (Mochida & Fujii, 2009b).

Os métodos de extração aplicados em matrizes ambientais para determinação da Diclofluanida geralmente são a EFS para água e a agitação mecânica com solventes orgânicos como a acetonitrila para sedimentos (Harino *et al.*, 2007c). A quantificação da Diclofluanida é normalmente realizada por CG acoplada a detectores seletivos como o de captura de elétrons (DCE) ou espectrometria de massas (EM) em modo de ionização química negativa (Hernando *et al.*, 2006).

3.1.6 Tiram

O Tiram (Tetrametiltiuram disulfida) é um ditiocarbamato usado principalmente na agricultura como fungicida no tratamento de folhas e sementes. Existem também registros de sua utilização na indústria de borracha, onde tem sido empregado como agente na vulcanização. Adicionalmente, a presença desse composto no ambiente pode ser também atribuída a processos de oxidação de dois outros fungicidas amplamente empregados: Derbam e Ziram (Cereser *et al.*, 2001). O Tiram apresenta solubilidade moderada em água (30 mg L^{-1}) e $\log K_{ow}$ de 1,7 (Tabela 2) (Voulvoulis, 2006). A persistência do Tiram no ambiente aquático é fortemente influenciada pelo pH do meio, sendo degradado por hidrólise e fotólise. O tempo de meia vida deste composto é inferior a 24 horas em pH 9, aumentando para 77 dias em pH 5. Já em relação à fotodegradação, o tempo de meia vida é de 8,8 horas a um pH de 5,5, ou seja, sob irradiação solar o Tiram diminui significativamente sua persistência no ambiente aquático (Sakkas *et al.*, 2006).

Assim como ocorre com outros tiocarbamatos, o Tiram apresenta níveis de toxicidade mais elevados para espécies de vertebrados como peixes, do que para invertebrados ou algas. Em dois estudos envolvendo testes de toxicidade com as espécies dulcícolas *Chlorella pyrenoidosa* (clorofícea), *Daphnia magna* (microcurstáceo) e *Oncorhynchus mykiss* (peixe), os valores obtidos foram de $1.000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (CE_{50} 96 h), $210 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (CL_{50} 48 h) e $0,64 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (CE_{50} 60 dias), respectivamente (Tabela 3) (Van Leeuwen *et al.*, 1985a; Van Leeuwen *et al.*, 1985b). Adicionalmente, vários trabalhos têm atestado as propriedades teratogênicas e mutagênicas do Tiram e de outros ditiocarbamatos. Entre as alterações sub-letais mais freqüentemente induzidas por esse composto encontram-se as distorções na notocorda de embriões de peixes. Estas distorções acarretam em deformidades na coluna vertebral ao final do desenvolvimento embrionário (Van Leeuwen *et al.*, 1986a; Van Leeuwen *et al.*, 1986b).

Analiticamente, o Tiram pode ser determinado em matrizes ambientais através de técnicas de CG, empregando detectores como o captura de elétrons (DCE), o Fotométrico de Chama (DFC) e Espectrometria de Massa (EM).

Adicionalmente, alguns estudos têm utilizado CLAE com detecção por ultravioleta (UV) para determinação analítica desse composto (Crnogorac & Schwack, 2009). Para preparação de amostras de água, a EFS e a ELL tem sido as técnicas preferencialmente aplicadas (Kawamoto *et al.*, 2005).

3.1.7 TCMTB (Busan)

O biocida TCMTB (2-(tiocianato-metil) benzotiazol) é um tiazol que, além de ser usado em formulações de tintas anti-incrustantes, tem sido aplicado como herbicida na agricultura e fungicida na preservação de madeira e indústria de couro. (Voulvoulis, 2006) Apresenta baixa solubilidade em água (0,00033 mg L⁻¹) e log K_{ow} de 3,3 (Tabela 2). Não existem até o momento estudos descrevendo o equilíbrio sortivo do TCMTB em meio aquático. (van Wezel & van Vlaardingen, 2004) Porém, em matrizes aquosas, esse composto, se degrada rapidamente por fotólise (1,5 a 3,9 horas). Essas características contribuem para a persistência extremamente baixa do TCMTB em ambientes aquáticos. A fotodegradação do TCMTB produz como principal metabólito o 2-mercaptobenzotiazol (MBT), apesar de traços de benzotiazol (BT) também serem originados no processo. A formação desses metabólitos, sobretudo o MBT, são especialmente importantes para estudos de toxicidade ambiental do TCMTB (Sakkas *et al.*, 2006).

Poucos monitoramentos da ocorrência ambiental do TCMTB têm sido publicados na literatura especializada. Em estudo realizado por Thomas *et al.* (, 2002) não é detectada a presença de TCMTB em nenhuma das amostras de água e sedimentos oriundas de áreas portuárias e marinas do Reino Unido. O TCMTB também não foi detectado em amostras de água coletadas de marinas no sul da Espanha (Aguera *et al.*, 2000).

De modo similar ao que se observa com relação a monitoramentos químicos do TCMTB, poucos estudos foram publicados sobre a toxicidade desse composto. Segundo Fernandez-Alba *et al.* (, 2002), o TCMTB atua como inibidor da cadeia de transporte de elétrons ao nível de mitocôndrias. Nesse mesmo estudo, testes de toxicidade realizados com o microrganismo *Vibrio fisheri*, com o microcrustáceo *Daphnia magna* e com a alga *Selenastrum*

capricornotum revelaram valores de CE_{50} equivalentes a $58 \mu\text{g L}^{-1}$ (15 min), $7,8 \mu\text{g L}^{-1}$ (30 h) e $6,8 \mu\text{g L}^{-1}$ (48 h), respectivamente.

Os métodos analíticos normalmente empregados para análise do biocida TCMTB em amostras ambientais são CL-EM e CG-EM. A extração do TCMTB a partir de matrizes aquosas é realizada através de EFS. Para amostras de sedimentos tem sido empregada a agitação mecânica em diclorometano (Fernandez & Pinheiro, 2007).

3.1.8 TCMS Piridina (Densil)

O TCMS Piridina ((2,3,3,6-tetracloro-4-metilsulfonyl) piridina) é uma sulfona que passou a ser utilizada em formulações de tintas anti-incrustantes recentemente, porém esse composto era anteriormente empregado como fungicida na indústria têxtil e de couros (Voulvoulis *et al.*, 1999). Poucas informações sobre as propriedades físico-químicas do TCMS Piridina estão disponíveis na literatura especializada e indicam que sua solubilidade em água é baixa ($0,025 \text{ mg mL}^{-1}$).

Investigações realizadas sobre a ocorrência ambiental de novos biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes detectaram traços de TCMS piridina em amostras ambientais de 4 diferentes estuários navegáveis do Reino Unido. As concentrações, entretanto, estavam abaixo dos limites de quantificação das técnicas empregadas (Thomas *et al.*, 2002).

Do ponto de vista toxicológico o TCMS piridina é reconhecido como um potente inibidor da cadeia respiratória. Conseqüentemente, esse composto é capaz de bloquear a produção de trifosfato de adenosina (ATP) a nível mitocondrial, levando à morte celular (Bragadin *et al.*, 2007).

Poucos trabalhos relatam metodologias analíticas para determinação do TCMS piridina em amostras ambientais. Entretanto, Thomas (, 1998) descreve um método para determinação desse composto em amostras de água usando pré-concentração por EFS, eluição com acetonitrila e posterior quantificação por CL-EM com ionização química negativa a pressão atmosférica.

3.1.9 Trifenilborano Piridina (TPBP)

O Trifenilborano Piridina é composto da classe das boranas, conhecido desde 1960, sendo utilizado em produtos com atividade bactericida, antifúngica e anti-incrustantes. No Japão, a introdução do TPBP como agente anti-incrustante ocorreu em 1993. Poucas informações sobre as propriedades físico-químicas do TPBP estão disponíveis na literatura especializada, entretanto, sabe-se que sua solubilidade em água é relativamente baixa (aproximadamente, 1 mg L^{-1}) (Harino, 2004). As vias de degradação do TPBP em água envolvem principalmente processos de hidrólise e fotólise. Experimentos realizados com diferentes concentrações de TPBP revelaram que esse composto apresenta uma vida inferior a 34 dias. Similarmente, os principais produtos de degradação do TPBP (Hidróxido de difenilborano (DPB), Hidróxido de fenilborano (MPB), fenol, benzeno e o difenil), apresentam persistência extremamente baixa em água (Sakkas *et al.*, 2006).

Possivelmente devido a sua rápida degradação e a formação de metabólitos pouco persistentes, poucos estudos relatam concentrações ambientais desse composto. O TPBP foi detectado em amostras de água obtidas na baía de Hiroshima no Japão. Entretanto, as concentrações foram inferiores ao limite de quantificação do método empregado (Harino *et al.*, 2009).

Praticamente inexitem estudos sobre a toxicologia do TPBP, exceção feita, a um estudo onde a alga *Skeletonema costatum* ($CL_{50} 72 \text{ h} = 0,0022 \text{ mg L}^{-1}$) se mostrou mais sensível ao TPBP do que o microcrustáceo *Artemia salina* ($CL_{50} 72 \text{ h} = 0,13 \text{ mg L}^{-1}$). Neste mesmo estudo foi demonstrado também que os principais produtos de degradação do TPBP apresentam toxicidade bem inferior a do composto parental (Okamura *et al.*, 2009).

O método analítico normalmente empregado para determinação do TPBP utiliza pré-concentração por EFS, eluição com acetonitrila e a quantificação é realizada por CLAE acoplada a detector UV-vis (200 nm) e fluorescência. Não existem até o momento métodos por espectrometria de massas para determinação do TPBP (Zhou *et al.*, 2007).

3.2 BIOCIDAS METÁLICOS

Nos biocidas organometálicos utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração é comum a presença dos elementos cobre, zinco e manganês. Entre esses compostos estão o cobre piritiona, zinco piritiona, ziram, maneb, tiocianato de cobre e o naftenato de cobre. Além disso, o óxido cuproso, um composto inorgânico, também tem sido utilizado na tintas atuais (Fernandez & Pinheiro, 2007).

3.2.1 Piritionas metálicas

As piritionas metálicas à base de cobre e zinco são compostos que vêm sendo largamente utilizados como biocidas a mais de 50 anos. Zinco Piritiona (Zinco-bis-(2-piridinatiol-1-óxido), por exemplo, tem sido utilizado na agricultura como bactericida e fungicida, e na indústria de cosméticos em produtos com atividade anti-caspa, como xampus. Já o composto Cobre Piritiona (Cobre-bis-(2-piridinatiol-1-óxido) possui aplicações como bactericida e fungicida (Doose *et al.*, 2004).

Um aspecto marcante do comportamento ambiental do Zinco Piritiona (ZnPT), é sua grande susceptibilidade a sofrer reações de transquelação com cobre, ferro e, possivelmente, com manganês. Sendo assim, dependendo das concentrações disponíveis desses íons metálicos na água e nos sedimentos o ZnPT converte-se em Cobre Piritiona (CuPT) (Harino & Langston, 2009). Apesar disso, todos os complexos metálicos de piritionas são extremamente sensíveis a luz, sofrendo rápida dimerização por fotodegradação. Estudos experimentais demonstraram que sob irradiação UV, a meia vida do CuPT é de aproximadamente 29 minutos, enquanto que a do ZnPT é de 15 minutos (Sakkas *et al.*, 2006). Adicionalmente, esses compostos também sofrem degradação por hidrólise e por atividade microbiana, tornando suas meias vidas nos ambientes marinhos ainda mais curtas (Harino & Langston, 2009; Maraldo & Dahllof, 2004). Devido a baixa disponibilidade de dados sobre sua ocorrência ambiental, o comportamento de sorção das piritionas metálicas é até o momento desconhecido. (Voulvoulis, 2006) Entretanto, a maior

solubilidade do ZnPT ($77,9 \text{ mg L}^{-1}$) em relação ao CuPT ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$) sugere que esses compostos particionam preferencialmente em compartimentos ambientais distintos. Dessa forma é mais provável encontrar resíduos de ZnPT em amostras de água, enquanto que para CuPT os sedimentos tendem a ser a matriz mais indicada para realização de monitoramentos.

Poucos monitoramentos têm sido realizados para piritionas metálicas no mundo. Em um único estudo conduzido por Thomas *et al.*, (2001) concentrações de até 20 ng L^{-1} de ZnPT foram detectadas em amostras de água coletadas em marinas do Reino Unido. Já as concentrações de CuPT, em um estudo realizado em sedimentos obtidos nas proximidades de áreas portuárias da costa norte do Vietnã, variaram entre $< \text{LQ}$ (inferiores ao limite de quantificação da técnica) e 422 ng g^{-1} , encontrado em uma das estações situada nas proximidades de um terminal pesqueiro. (Harino *et al.*, 2006) Em outro estudo realizado na costa do Japão, concentrações máximas de $8,6 \text{ ng g}^{-1}$ de CuPT foram encontradas na baía de Otsushi. (Harino *et al.*, 2007b) A escassez de dados sobre a ocorrência ambiental do CuPT e do ZnPT ocorre, possivelmente, devido a elevada degradabilidade desses compostos, bem como pelas dificuldades analíticas enfrentadas durante as determinações.

Diversos estudos sobre a toxicidade do CuPT e do ZnPT sobre organismos aquáticos têm sido publicados. Em crustáceos, os valores de CL_{50} para as piritionas metálicas são geralmente superiores a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. (Mochida & Fujii, 2009a) Particularmente no caso do camarão *Heptacarpus futilirustris*, a CL_{50} (96 h) observada para ZnPT foi excepcionalmente elevada ($2,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) (Mochida & Fujii, 2009a). Entretanto, a toxicidade do ZnPT e CuPT para espécies fitoplanctônicas e de peixes mostra-se maior que para crustáceos. Segundo Mochida e Fuji, (2009) elevada toxicidade das piritionas metálicas sobre espécies de peixes se justifica pela sua potente ação como inibidores do transporte de membrana, que afeta diretamente a bomba de prótons necessária a respiração celular. No caso específico do CuPT ocorre um bloqueio da atividade neuromuscular, a qual é imprescindível durante o desenvolvimento embrionário desses organismos. Como consequência desses efeitos sub-letais, surgem deformações esqueléticas e formação de massas inflamatórias em peixes expostos por períodos de 50 dias a concentrações nominais de 2 a $4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ desses compostos.

De modo geral, complexos metálicos de piritiona não são determinados por CG devido à sua baixa volatilidade e alta instabilidade térmica (Karlsson & Eklund, 2004). Dessa forma, as técnicas geralmente empregadas na determinação desses compostos em matrizes ambientais utilizam CLAE-EM com modo de ionização química a pressão atmosférica. Devido à tendência do ZnPT sofrer transquelação em meios onde existam íons metálicos disponíveis, alguns métodos empregados na determinação desse composto induzem essa reação no intuito de formar moléculas mais estáveis e minimizar perdas durante as etapas de análise (Doose *et al.*, 2004). As técnicas de extração usualmente empregadas para amostras ambientais são EFS e agitação mecânica com solventes orgânicos para amostras de água e sedimentos respectivamente (Harino *et al.*, 2006).

3.2.2 Ziram

O Ziram (Zinco-bis-(dimetilditiocarbamato) é um tiocarbamato que é utilizado atualmente como fungicida agrícola para proteção de frutos e sementes, e como catalisador do processo de vulcanização e antioxidante na indústria de borracha. (Agarwal *et al.*, 2005) Apresenta moderada solubilidade em água (17 mg L^{-1}) e $\log K_{ow}$ extremamente baixo (1,23) (Sakkas *et al.*, 2006). Em virtude de suas propriedades físico-químicas, e de ser extremamente suscetível aos processos de hidrólise, fotólise e biodegradação, o tempo de meia vida do Ziram em ambientes marinhos é de, no máximo, 18 dias (van Wezel & van Vlaardingen, 2004).

Embora existam alguns estudos onde se realizaram monitoramentos do Ziram em amostras ambientais, nenhum destes relaciona a ocorrência do composto a sua nova utilização como princípio ativo em tintas anti-incrustantes (Agarwal *et al.*, 2005; van Wezel & van Vlaardingen, 2004).

Assim como outros tiocarbamatos, o Ziram exhibe uma forte toxicidade sobre os estágios iniciais do desenvolvimento larval de peixes, sendo a deformação da notocorda o efeito mais freqüentemente observado. Para a espécie de peixe dulcícola *Oncorhynchus mykiss*, por exemplo, a CE_{50} (60 dias) observada para esse composto foi de $1,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, a CE_{50}

(96 h) obtida para alga *C. prenoidea* foi de $1.200 \mu\text{g L}^{-1}$ (Van Leeuwen *et al.*, 1986a). Embora ainda não existam dados de toxicidade ao Ziram disponíveis para espécies de água salgada, esses resultados ilustram claramente a já mencionada sensibilidade das espécies de peixes a tiocarbamatos.

A maioria dos métodos para determinação de tiocarbamatos envolve a decomposição prévia dos analitos de interesse em disulfeto de carbono ou derivatização para metiltiocarbamatos, com posterior determinação por técnicas cromatográficas (CG ou CLAE). Esses métodos, entretanto, têm baixa seletividade devido às similaridades entre os diversos tiocarbamatos. Sendo assim, foi desenvolvido um método para determinação direta do Ziram (sem derivatização) por CLAE-EM com modo de ionização química positiva a pressão atmosférica. (Moriwaki *et al.*, 2001) A EFS e a ELL são normalmente empregadas para extração do Ziram a partir de amostras de água (Kawamoto *et al.*, 2005).

3.2.3 Maneb

O Maneb [etileno-bis-(ditiocarbamato)manganês]polimérico é um tiocarbamato polimérico que, além de ser utilizado em tintas anti-incrustantes, também possui aplicações na agricultura como fungicida. Embora seja um composto moderadamente solúvel em água (6 mg L^{-1}) (Thiruchelvam, 2005) estudos experimentais revelaram que se decompõe rapidamente nessa matriz através de hidrólise e fotólise. Adicionalmente a degradação biológica tem pouca importância no seu comportamento ambiental (Fernandez *et al.*, 2007). Segundo esses estudos, a persistência do Maneb no ambiente é aproximadamente 10,5 horas. Os principais produtos de degradação do Maneb são a etilenouréia, o etileno bis isotiocianato sulfidado e a carbamida (Fernandez & Pinheiro, 2007; Sakkas *et al.*, 2006).

Algumas possíveis técnicas analíticas para determinação do Maneb em amostras ambientais foram discutidas por Voulvoulis *et al.*, (, 1999) porém ainda não existem métodos para sua determinação rotineira (Fernandez & Pinheiro, 2007). O principal desafio analítico enfrentado para determinação desse composto é a seletividade do método. Isso ocorre em função do fato de

existirem compostos estruturalmente semelhantes ao Maneb, como é o caso do Zineb (zinco etileno bis (ditiocarbamato)), o qual também é um ditiocarbamato que tem aplicações na agricultura e em alguns produtos anti-incrustantes. Sendo assim, um método para determinação do Maneb em amostras ambientais deve ser capaz de diferenciá-lo de compostos similares que, eventualmente, podem estar concomitantemente presentes nas amostras. Uma das soluções apontadas para esse problema seria a realização de uma análise paralela por espectrometria de absorção atômica a fim de diferenciar o manganês do zinco permitindo a discriminação entre o Maneb e o Zineb (Voulvoulis *et al.*, 1999).

3.2.4 Biocidas à base de Cobre

Os compostos à base de cobre atualmente homologados pela IMO para utilização em tintas náuticas são: Óxido cuproso, Tiocianato cuproso e Naftenato cúprico (Okamura & Mieno, 2006). O emprego desses compostos ocorreu após o banimento mundial dos anti-incrustantes à base de compostos organoestânicos (COEs). Nessa época, diversos produtos voltaram a incorporar em suas formulações grandes quantidades de compostos à base de cobre e/ou cobre metálico, com a finalidade de incrementar o efeito biocida dessas novas tintas. Sendo assim, a maioria dos produtos disponíveis no mercado mundial atualmente, utiliza o cobre associado a um ou mais dos biocidas mencionados anteriormente. Dessa forma, devido ao amplo espectro de toxicidade do cobre sobre organismos aquáticos, os demais compostos atuam como intensificadores do efeito biocida (Brooks & Waldock, 2009).

A taxa de liberação do cobre contido em um revestimento anti-incrustante para coluna d'água está relacionada a diversos fatores de natureza física, química e biológica (Brooks & Waldock, 2009). Adicionalmente, os níveis naturais desse elemento na coluna d'água e nos sedimentos não são conhecidos para muitas regiões. Sendo assim, avaliações realísticas sobre a contribuição das tintas anti-incrustantes para as concentrações de cobre observadas em zonas com intensa atividade naval são difíceis de serem realizadas. Porém, diferenças significativas nas concentrações de cobre em

sedimentos foram observadas entre áreas navegadas e não navegadas do Reino Unido. Nesse estudo, as concentrações verificadas em áreas relativamente pouco impactadas estavam entre 1 e 10 $\mu\text{g g}^{-1}$, enquanto que em áreas historicamente navegadas encontrou-se valores de até 3.000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Jones & Bolam, 2007).

A toxicidade do cobre para organismos aquáticos está vinculada a fatores físico-químicos como pH, salinidade, teor de carbono orgânico dissolvido e concentração do metal. Isso ocorre, em virtude da tendência desse elemento em sofrer especiação originando diferentes formas químicas de acordo com as características físico-químicas do ambiente, podendo estar na forma livre, ionizada ou até mesmo formar complexos com ligantes orgânicos e inorgânicos. Dessa forma, as diferentes espécies de cobre apresentam biodisponibilidade e, conseqüentemente, toxicidades diferentes (Brooks & Waldock, 2009).

3.3 Características ideais de um anti-incrustante

Na busca pelo anti-incrustante de alto desempenho, a indústria naval tem procurado equilibrar a eficiência e a durabilidade dos novos produtos com níveis de toxicidade ambientalmente toleráveis. Com foco nesse objetivo, Takahashi (, 2009) argumenta que os compostos de ação anti-incrustante ideal devem apresentar as seguintes características: (1) amplo espectro de ação, a fim de prevenir com eficiência o estabelecimento das várias espécies de organismos que iniciam a formação do biofilme incrustante; (2) baixa toxicidade para mamíferos; (3) baixa solubilidade em água; (4) baixo potencial de bioacumulação e biomagnificação; (5) baixa ou nenhuma persistência ambiental; (6) compatíveis com os equipamentos e técnicas de pintura atualmente em uso e (7) custos e durabilidade competitivos com os produtos atualmente disponíveis no mercado. Nesse aspecto, a prospecção de compostos pouco persistentes, com baixa toxicidade ambiental e que incorporem revestimentos eficientes e de alta durabilidade é uma tarefa difícil devido às características conflitantes requeridas por um anti-incrustante considerado ideal (Harino & Langston, 2009). Entretanto, entre os biocidas utilizados em tintas

anti-incrustantes de terceira geração despontam alguns candidatos em potencial, visto que, alguns destes atendem razoavelmente as exigências, principalmente se comparados aos compostos utilizados em tintas anti-incrustantes de segunda geração (como o TBT e o TPT). Dentre os compostos que melhor atendem tais exigências, o DCOIT (componente ativo do Sea-Nine) tem recebido especial atenção em função de sua elevada eficiência combinada com rápida degradação no ambiente (Jacobson & Willingham, 2000).

3.4 Avaliações Ecotoxicológicas

Do ponto de vista ecotoxicológico, a utilização simultânea de diversos produtos com atividade biocida nas tintas anti-incrustantes de terceira geração, representa uma dificuldade suplementar à realização de experimentos que simulem condições fidedignas. Mesmo assim, estudos do efeito de diferentes combinações de biocidas utilizados nas novas formulações têm sido realizados pela exposição simultânea a organismos-teste. Foram observados, por exemplo, efeitos sinérgicos e aditivos entre combinações de 2 e 3 compostos diferentes (Koutsaftis & Aoyama, 2007). Porém, é muito difícil realizar avaliações precisas na medida que algumas tintas podem conter até 4 diferentes agentes tóxicos na sua composição (Okamura & Mieno, 2006) e que, em uma mesma marina ou porto, trafegam embarcações que utilizam produtos distintos. Somam-se a isso, os demais compostos que constituem as tintas, assim como a interação com inúmeros outros contaminantes já presentes nestes ambientes, o que resulta em uma mistura extremamente complexa de analitos.

Alternativamente, experimentos foram concebidos a fim de realizar exposição de organismos-teste diretamente às tintas anti-incrustantes e não somente aos biocidas nelas presentes. Nesse aspecto, o trabalho realizado por Karlsson *et al.* (, 2006) com a macroalga *Ceramium tenuicorne* e o copépode *Nitocra spinipes* merece especial atenção. Nesse estudo, os autores pintaram placas de plástico de 5 cm² com diferentes produtos destinados a embarcações que trafegam no Mar Báltico. Estas placas foram então submersas em água do mar artificial por diferentes períodos, a qual foi posteriormente utilizada como

solução teste nos experimentos de exposição. Com essa abordagem, Karlsson e colaboradores (2006) desenvolveram uma técnica capaz de avaliar simultaneamente os efeitos tóxicos da complexa matriz que representam as tintas anti-incrustantes.

Apesar das limitações iniciais, experimentos que tentam melhor reproduzir a realidade da exposição representam um avanço e são uma alternativa aos que não levam em consideração a interação na exposição simultânea a diversos compostos.

3.5 Determinações analíticas

Estudos sobre toxicidade, ocorrência e comportamento ambiental de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes requerem métodos robustos e, capazes de determinar simultaneamente esses compostos em amostras ambientais. A grande diversidade de propriedades físico-químicas e a profusão de metabólitos de interesse, que podem se formar no ambiente contribui substancialmente para dificultar o desenvolvimento de um método que atenda estes requisitos. Entretanto, alguns métodos simultâneos de determinação têm sido publicados na literatura especializada. Por exemplo, Thomas (, 1998) descreve um método analítico capaz de determinar simultaneamente Irgarol 1051, Diuron, DCOIT, TCMS piridina e TCMTB, o qual utiliza EFS (com cartuchos de C18 e polimérico) e detecção por CLAE-EM com ionização química a pressão atmosférica. Similarmente, o método proposto por Aguerre *et al.* (, 2000) determina Irgarol 1051, Diuron, DCOIT, TCMTB, Clorotalonil e Diclofluanida, na mesma injeção, por CG-EM. Entretanto, alguns compostos como as Piritionas metálicas (ZnPT e CuPT) e os ditiocarbamatos (Tiram, Ziram e Maneb) apresentam propriedades físico-químicas intrínsecas, as quais dificultam sua análise juntamente com outros compostos. Dessa forma, o desenvolvimento e validação de um método de quantificação multiresíduo para os 16 biocidas homologados para utilização em tintas anti-incrustantes de terceira geração representa ainda um grande desafio analítico (Fernandez & Pinheiro, 2007).

3.5.1 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica muito utilizada para extração, purificação e ou pré-concentração de amostras complexas, a qual permite que analitos em concentrações muito baixas sejam detectados (Lanças, 2004).

O princípio da extração em fase sólida baseia-se nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica, a qual emprega uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração que contém a fase sólida (Lanças, 2004). A extração ocorre a partir de algumas etapas, sendo a primeira destinada a ativar o adsorvente que constitui a fase sólida e o solvente empregado dependerá principalmente do material a ser ativado. Logo após se faz a adição da amostra, que deve ser feita lentamente, onde os interferentes da matriz idealmente escoam através do cartucho e os analitos ficam retidos no adsorvente. A etapa seguinte ocorre com a eluição do(s) analito(s) por um solvente orgânico e sua escolha deve ser determinada pela polaridade relativa do solvente em relação à fase sólida escolhida e o(s) analito(s) de interesse (Lanças, 2004).

A EFS é um dos procedimentos de extração de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes mais citados na literatura. Voulvoulis *et al* (, 2000) cita métodos analíticos para determinação de alguns biocidas, entre eles clorotalonil e irgarol, onde é empregada a EFS. Aguera *et al* (2000) também utilizou EFS em um método para determinação simultânea de cinco biocidas (irgarol, clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB). Foi utilizado um cartucho de extração polimérico Oásis HLB e acetato de etila como solvente de eluição, sendo este método muito utilizado em vários outros trabalhos científicos. Thomas *et al* (, 2002) também utilizou a EFS na avaliação da ocorrência de biocidas em águas costeiras no Reino Unido, tendo utilizado C18 como adsorvente e diclorometano como eluente.

3.5.2 Cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas permite a identificação e quantificação de diversos compostos de amostras desconhecidas, onde uma técnica complementa a outra produzindo resultados com facilidade e confiança (Sabin, 2007). A CG-EM é uma técnica muito utilizada em determinações de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes, utilizada em diversos trabalhos científicos, a qual pode fornecer resultados com alta sensibilidade e seletividade.

Na cromatografia de fase gasosa, o composto a ser analisado deve possuir uma volatilidade considerável a temperaturas inferiores a 300 °C, sendo vaporizado através de um rápido aquecimento sem alterar sua estrutura química (Sabin, 2007).

A detecção por espectrometria de massas produz respostas a praticamente todos os compostos orgânicos, seletivamente, através da obtenção de massas iônicas características dos compostos de interesse e, por isso, é considerada uma técnica de detecção universal. A varredura contínua (*full scan*) do espectro e o monitoramento de íons selecionados são funções geralmente utilizadas para obtenção das respostas analíticas. A varredura do espectro é feita num intervalo de valores de razão massa-carga (m/z) com um tempo determinado, onde são gerados inúmeros espectros. Já no monitoramento por íons selecionados, somente os íons mais intensos e característicos do composto em questão são monitorados, o que resulta num aumento da sensibilidade e especificidade da análise (Sabin, 2007).

3.5.3 Sistema para injeção de grandes volumes em cromatografia de fase gasosa

Os baixos níveis de biocidas normalmente detectados em amostras ambientais demandam a utilização de métodos que possibilitem a quantificação desses compostos na faixa de ng g^{-1} ou ng L^{-1} . Conseqüentemente, a necessidade de monitorá-los em baixas concentrações tem exigido empenho

no desenvolvimento de métodos que forneçam uma maior detectabilidade. Sendo assim, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando métodos instrumentais com injeção de grandes volumes associados a programas de temperatura controlada do injetor, o que têm resultado na detecção de concentrações cada vez menores (Sabin, 2007).

3.6 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos em trabalhos científicos é uma exigência que tem por finalidade avaliar o desempenho do método, o que mostra a confiabilidade do mesmo. Diversos órgãos no âmbito nacional e internacional atuam junto aos laboratórios a fim de definir e padronizar os critérios empregados durante o processo de validação metodológica. Entre esses órgãos podemos citar: a “*International Conference on Harmonisation*” (ICH), a “*International Union of Pure and Applied Chemistry*” (IUPAC), a “*International Organization for Standardization*” (ISO), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), dentre outros (Ribani *et al.*, 2004). Embora os protocolos para validação estipulados por estes órgãos possam diferir, de um modo geral todos eles contemplam parâmetros como: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação (Ribani *et al.*, 2004).

3.6.1 Parâmetros cromatográficos

A avaliação da separação cromatográfica de múltiplos analitos pode ser realizada através de parâmetros como o fator de retenção (k), resolução (R_s) e fator de separação (α).

O fator de separação indica a velocidade de migração dos solutos nas colunas (Skoog, 2002) e é determinado através da razão entre a fração do tempo em que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária e a fração em que percorrem a coluna na fase móvel (Collins *et al.*, 2006).

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Equação 1. Cálculo do fator de retenção

Onde: t_R : tempo de retenção do analito em questão, que é o tempo transcorrido desde a injeção até o ponto máximo do pico e t_M : tempo de retenção de um analito não retido.

Os valores de k para métodos que visam separar apenas dois componentes devem variar entre 1 e 10, e em métodos que separam múltiplos componentes os valores de k aceitáveis devem se encontrar na faixa de 0,5 a 20 (Collins *et al.*, 2006).

A resolução de uma separação cromatográfica entre dois picos adjacentes representa a eficiência do método e é calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da soma das larguras de suas respectivas bases (Ribani *et al.*, 2004).

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}}$$

Equação 2 Cálculo da resolução

Onde: t_{R1} e t_{R2} = tempo de retenção de picos adjacentes; W_{b1} e W_{b2} = largura dos picos na base, em unidades de tempo.

Valores de $R_s > 1$ indicam boa separação. Quando os valores estão em torno de 1,25 já são considerados suficientes para fins quantitativos e quando os valores forem $> 1,5$ indicam 100% de separação para os picos (Collins *et al.*, 2006).

O fator de separação é a razão entre os tempos de retenção entre dois componentes quaisquer. Este fator pode ser muito útil quando há variações na vazão da fase móvel, pois ele é calculado pela razão entre os fatores de retenção.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Equação 3. Equação para o cálculo do fator de separação.

Este fator mede a seletividade de um sistema cromatográfico. Quanto mais seletiva for a retenção pela fase estacionária para o segundo componente que está sendo analisado, maior será o fator de separação. Entretanto, um $\alpha > 1$ não indica que ocorreu a separação de 100 %, pois os picos podem ser largos e estarem sobrepostos. Porém, altos valores de α indicam uma boa separação caso os picos forem estreitos (Collins *et al.*, 2006).

3.6.2 Curva analítica e linearidade

A curva analítica consiste na determinação da resposta de determinado instrumento em relação a várias concentrações do analito, deve conter no mínimo cinco pontos diferentes de concentração. O limite inferior deve ser igual ao limite de quantificação do método e o limite superior dependerá do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2011).

A linearidade é definida como sendo a faixa de concentrações onde a sensibilidade é constante. Geralmente é expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2011).

3.6.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção do instrumento (LD_i) é definido como a menor concentração de um analito que pode ser detectada na amostra a ser analisada e não necessariamente quantificada. O LD_i pode ser estimado através de três métodos distintos: visual, relação sinal-ruído ou baseado em parâmetros da curva analítica (Equação 4) (INMETRO, 2011).

O método visual é determinado através da adição de concentrações conhecidas dos analitos, de maneira que possa ser diferenciada entre ruído e sinal analítico a menor concentração visível.

O método sinal-ruído é feito através de uma relação em que compara os sinais analíticos em concentrações baixas com um branco da amostra analisada. Esta relação estima o limite de detecção em proporções aceitas de 3:1 e, para o limite de quantificação, essa proporção aumenta para 10:1.

O método baseado nos parâmetros da curva analítica pode ser estimado através dos cálculos a seguir, respectivamente para os limites de detecção e quantificação (Ribani *et al.*, 2004).

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Equação 4: Cálculo do limite de detecção

Onde: *s* é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e *S* é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica (Ribani *et al.*, 2004).

O limite de quantificação refere-se à menor concentração do analito que pode ser quantificada sob um procedimento experimental estabelecido (Equação 5). Tanto o LQ como o LD são expressos como concentração, considerando a precisão e a exatidão do método (INMETRO, 2011).

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Equação 5: Cálculo do limite de quantificação

3.6.4 Exatidão/Tendência

A exatidão é avaliada numericamente através da tendência (INMETRO, 2011). Os processos comumente utilizados para a avaliação da exatidão de um método são: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2011).

A realização de ensaios de recuperação é muito utilizada em processos de validação de métodos analíticos. Estes ensaios são estimados pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos analitos. A fortificação dos analitos deve ser feita em pelo menos três concentrações diferentes: baixa, média e alta, da faixa de uso do método (INMETRO, 2011).

Para análise de resíduos, os níveis aceitáveis em ensaios de recuperação encontram-se entre 70 % e 120 %, porém dependendo da complexidade analítica e da matriz, estes valores podem ser entre 40 % e 120 % (Ribani *et al.*, 2004). Calcula-se o percentual de recuperação através da Equação 6.

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Equação 6: cálculo de recuperação

Onde: C_1 = concentração determinada após a fortificação; C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada (branco); C_3 = concentração esperada para o nível de fortificação

3.6.5 Precisão

A precisão de um método é determinada através de situações específicas de medição, sendo que as três formas comumente utilizadas são a repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade e são usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (INMETRO, 2011).

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições repetidas de uma mesma medida, efetuadas sobre as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado nas mesmas condições, mesmo local e curto espaço de tempo (Ribani, 2004). Já a precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, variando uma das seguintes condições: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes tempos. O objetivo da avaliação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (Ribani *et al.*, 2004). A reprodutibilidade é um componente de validação que avalia o desempenho do método em relação aos dados de validação obtidos por outro laboratório, ou seja, está relacionado com

a comparação interlaboratorial e por isso neste trabalho não será avaliado (INMETRO, 2011).

A precisão é expressa pela estimativa do desvio padrão absoluto (s) e desvio padrão relativo (% DPR) ou coeficiente de variação (% CV) que podem ser calculados através da Equação 7 e da Equação 8, respectivamente (INMETRO, 2011). A precisão requerida para análise de traços em amostras ambientais requer % CV com valor até 20 % (Ribani *et al.*, 2004).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{média})^2}{n - 1}}$$

Equação 7. Cálculo do desvio padrão absoluto

Onde X_i é a área do pico, ou seja, o valor de uma medição; $X_{média}$ é a média dos picos da mesma concentração, ou seja, é a média aritmética de um pequeno número de medições; n é o número de vezes que a mesma concentração foi injetada ($n=7$).

$$CV(\%) = \frac{s}{X_{média}} \times 100$$

Equação 8: cálculo de variação de concentração

Onde: s = estimativa do desvio padrão absoluto; X_m = média de uma série de medidas (replicatas).

3.6.6 Efeito de matriz

Efeito de matriz é caracterizado por uma diferença de resposta no detector, para determinado analito, entre padrões preparados no solvente e no extrato da matriz. Este efeito pode ser observado pelo acréscimo ou decréscimo do sinal, dependendo da estrutura química do analito e do tipo de matriz analisada. Outros fatores que podem influenciar no efeito de matriz são as condições cromatográficas, associadas ao injetor, coluna e detector (Hajslova *et al.*, 1998).

Existem alguns métodos para minimizar o efeito de matriz, sendo que, nenhum capaz de eliminar completamente tal efeito. Entre os métodos propostos para compensar o efeito de matriz, estão o preparo da curva analítica na matriz, formas de injeção (como a técnica denominada de temperatura programada de vaporização-TPV), o uso de analitos protetores, limpeza dos extratos, função de correção e método de adição de padrão (Pinho *et al.*, 2009).

A presença ou não do efeito matriz pode ser constatada através da comparação entre soluções analíticas dos compostos a serem analisados preparados no solvente puro e no extrato da matriz e calculado através da Equação 9 e este efeito pode ser classificado como baixo ($-20 < \% C < +20$), moderado ($- 50 < \% C < - 20$ ou $+ 20 < \%C < + 50$) ou alto ($\% C < -50$ ou $\% C > + 50$) (Economou *et al.*, 2009a).

$$\%EF = 100 \times \left(1 - \frac{Sm}{Ss} \right)$$

Equação 9: Cálculo de efeito de matriz

Onde: S_m = coeficiente angular da curva preparada na matriz;

S_s = coeficiente angular da curva preparada no solvente

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tintas utilizadas para os testes

Inicialmente foi realizado um levantamento das principais tintas anti-incrustantes utilizadas pelo pólo naval de Rio Grande. Este levantamento foi feito através de entrevistas com funcionários do Porto do Rio Grande e Estaleiro Rio Grande. Dessa forma, chegou-se aos seguintes produtos: Mícron Premium International[®], Tritão International[®], Super Marine AF IONEX MB Renner[®], AF 870 Renner[®].

4.2 Reagentes, Solventes e Materiais

Para análise de compostos em baixas concentrações como ng mL⁻¹ e µg kg⁻¹, todos os reagentes e solventes utilizados devem possuir alto grau de pureza, de modo que eventuais impurezas não interfiram nas análises. Dessa forma, todos os reagentes utilizados foram grau análise de resíduo como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Regentes utilizados nas análises.

Reagente /solvente	Fornecedor	Grau de pureza	Característica do adsorvente
Diclorometano	J.T.Baker [®] ,	análise de resíduo	-
Hexano	J.T.Baker [®] ,	análise de resíduo	-
Acetato de etila	Mallinckrodt [®]	análise de resíduo	-
Água	Millipore Direct-Q UV3 [®]	ultra pura	resistividade de 18,2 MΩ cm)
Coluna HLB Oásis	Waters [®]	-	30 µm, 60 mg

4.3 Limpeza da Vidraria

A vidraria e os objetos utilizados foram lavados cuidadosamente para garantir a ausência de interferentes e/ou contaminantes, onde o procedimento inicial foi lavagem com uma solução de detergente aniônico alcalino (5 %, v/v) Detertec[®] (Vetec), com posterior imersão nesta solução por 12 a 24 h.

Posteriormente foi feito um enxágüe abundante com água corrente e imersão por 12 a 24 h em solução de ácido nítrico (5 %, v/v). A vidraria foi depois enxaguada abundantemente com água corrente e seca em estufa com circulação forçada de ar a 35 °C. Imediatamente antes do uso, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a vidraria foi rinsada três vezes com acetona P.A., seguido de três rinsadas com *n*-hexano.

4.4 Controle analítico

A confiabilidade dos dados gerados deve ser conhecida em todos os trabalhos científicos. Desta forma, durante as etapas de otimização e validação do método foram utilizados padrão interno, padrão de recuperação e padrões externos de todos os biocidas determinados. Os padrões analíticos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, bem como seus fornecedores e graus de pureza estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Padrões utilizados no desenvolvimento do trabalho

Composto	Padrão	Fornecedor	Pureza	Lote	Validade
TCMTB (líquido)	externo	Waterstone Technology	97,6 %	0826-3	2012
DCOIT (sólido)	externo	Waterstone Technology	98,5 %	64359-81-5	2012
Irgarol (sólido)	externo	Sigma Aldrich	98,6 %	6338X	04/12/2013
Clorotalonil (sólido)	externo	Sigma Aldrich	99,3 %	SZE7296X	23/10/2014
Diclofluanida (sólido)	externo	Sigma Aldrich	98,2 %	9028X	28/01/2013
Atrazina d-5 (sólido)	recuperação	Fluka	99,6 %	SZE9299X	26/10/2012
TCMX (sólido)	interno	Dr. Ehrenstorfer	98,5 %	60831	09/2012

O padrão de recuperação (PR) é um composto adicionado em uma concentração conhecida logo no início do processo, antes da extração, esse composto é quantificado no final de todo procedimento para verificar a ocorrência de perdas ou contaminação (Lanças, 2004). O padrão de recuperação utilizado para o presente trabalho foi a atrazina-d5.

O padrão interno (PI) é um composto adicionado ao extrato da amostra cujas concentrações pretende-se determinar. Essa fortificação é feita imediatamente antes da injeção no sistema cromatográfico, de forma que o PI monitore possíveis interferências na análise. Para tal, o PI deve ser um composto com propriedades químicas semelhantes a dos analitos de interesse, não ser encontrado no ambiente e estar disponível em elevado grau de pureza. Para utilização do PI, o mesmo deve ser adicionado à amostra em concentrações próximas do que se espera encontrar para os demais analitos, além de ser bem resolvido dos demais picos. Este procedimento é extremamente útil, pois corrige variações de volume da injeção que podem ocorrer, bem como na resposta do equipamento (Lanças, 2004). Para o presente trabalho o padrão interno utilizado foi o TCMX.

O padrão externo (PE) é um composto utilizado para a quantificação dos analitos em questão. Esse método compara o tempo de retenção e a área da substância a ser quantificada na amostra com os tempos de retenção e áreas obtidas desta mesma substância em soluções padrão de concentrações conhecidas (Lanças, 2004). Os padrões externos utilizados no presente trabalho foram: TCMTB, DCOIT, Irgarol, Clorotalonil e Diclofluanida.

Os fatores de resposta, juntamente com os tempos de retenção obtidos para cada um dos padrões externos, são agrupados gerando uma curva de calibração que é utilizada posteriormente na quantificação das amostras, determinando a concentração do analito (Lanças, 2004).

4.5 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos clorotalonil, diclofluanida, DCOIT, TCMX e irgarol, em acetato de etila na concentração de 1 mg mL^{-1} . O padrão TCMTB foi diluído e preparado na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e a atrazina-d5 (padrão de recuperação) foi preparada na concentração de $150 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas a $-18 \text{ } ^\circ\text{C}$. A partir das soluções estoque de 1 mg mL^{-1} e $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ foram preparadas soluções estoque de concentrações de $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir desta solução estoque, foi

preparada uma solução trabalho contendo a mistura dos padrões externos e do padrão de recuperação, nas concentrações de 1000 ng mL^{-1} . Diluições de 500, 250, 200, 175, 150, 100, 75, 50, 25, 10, 5 e $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$, foram preparadas para otimização da separação cromatográfica por CG-EM, bem como para o preparo das curvas analíticas e fortificação das amostras, sendo que as diluições eram preparadas no dia em que seriam utilizadas. Todas as concentrações das soluções foram corrigidas pelo percentual de pureza do padrão utilizado. Para obter melhor linearidade, optou-se por preparar duas faixas de concentrações para construção das curvas sendo classificadas como curva baixa (5 a 100 ng mL^{-1}) e curva alta (100 a 500 ng mL^{-1}).

4.6 Otimização do sistema cromatográfico

As análises dos compostos de interesse foram realizadas em um cromatógrafo de fase gasosa equipado com um amostrador automático, injetor *Split/Splitless*, e detector de espectrometria de massas tipo quadrupolo (Perkin Elmer modelo Clarus 500 MS) (Figura 1). Foi utilizada coluna cromatográfica capilar Elite - 5MS (5 % difenil – 95 % dimetil polisiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e revestida internamente com 0,25 μm de filme. O modo de injeção foi *splitless*, com fluxo de 50 mL de hélio após 1 min, e temperatura do injetor de $280 \text{ }^\circ\text{C}$. O volume de injeção foi 50 μL e o gás carreador foi hélio com fluxo constante de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura do forno foi programada em $55 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$; $20^\circ\text{C min}^{-1}$ por 4min até $240 \text{ }^\circ\text{C}$; $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ por 1,75 min até $280 \text{ }^\circ\text{C}$. O tempo total de corrida foi de 20 min.

O espectrômetro de massas foi otimizado no modo de aquisição SIFI (do inglês *Selected Ion and Full Ion Scanning*), que em português significa íon selecionado e escaneamento completo de íon, onde o equipamento CG-EM da Perkin Elmer Clarus 500 realiza, em uma única injeção, a aquisição pelo modo *full scan* (que é programado para analisar as massas determinadas que no presente trabalho foi de 70 a 350 m/z) e monitoramento seletivo de íons (SIM - do inglês *Single Ion Monitoring*). A quantificação foi feita pelo modo de monitoramento seletivo de íons. A temperatura da fonte foi mantida a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e

a temperatura da linha de transferência a 280 °C. A taxa de aquisição foi 2,5 scans seg^{-1} e a energia de ionização (por impacto de elétrons) de 70 eV.



Figura 1. CG-EM Perkin Elmer modelo Clarus 500 MS

Os íons monitorados (um para quantificação e dois para confirmação), ou seja, as massas dos principais fragmentos moleculares (m/z) resultantes da quebra, utilizados para a identificação dos compostos estudados, bem como suas respectivas massas molares e tempo de retenção na coluna cromatográfica de cada composto, encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Massa molar (MM), tempo de retenção (t_R) e seus respectivos íons de quantificação (Q) e confirmação (C 1 e C 2) dos compostos analisados.

Compostos	MM (g mol⁻¹)	t_R (min)	Q (m/z)	C1 (m/z)	C2 (m/z)
TCMX (PI)	243,95	9,70	207	209	244
Atrazina d5 (PR)	220,71	10,30	205	220	105
Clorotalonil	265,9	10,68	266	264	123
Diclofluanida	333,2	11,69	123	167	224
DCOIT	213,3	12,43	169	182	123
Irgarol	253,4	12,56	182	238	253
TCMTB	238,4	13,60	180	108	136

PI = padrão interno; PR = padrão de recuperação.

4.7 Validação do método

Os parâmetros avaliados para a validação do método analítico foram: curva analítica e linearidade, LD e LQ (do instrumento e do método), precisão

(intermediária e repetitividade) e exatidão (expresso em percentual (%) de recuperação), avaliação do efeito de matriz.

4.7.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade da resposta do instrumento e do método foi avaliada pela construção de curvas analíticas através de padronização externa no solvente e por superposição da matriz.

O método de superposição de matriz (*“matrix-matched”*) consiste na adição do padrão das substâncias a serem determinadas em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta das substâncias, e através das respostas do equipamento, é realizada a construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado para calibração, tanto com a padronização interna como com a padronização externa. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de muito importante em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção das substâncias de interesse (Ribani *et al.*, 2004).

Para padronização externa por superposição da matriz foram preparadas as soluções analíticas através de diluições da solução padrão nas concentrações de 2,5; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250 e 500 ng mL⁻¹ realizadas com o extrato da matriz e extraídas por EFS. A padronização externa no solvente foi realizada por diluições da solução padrão (trabalho) com acetato de etila. Cada solução foi injetada três vezes no CG-EM, e a concentração foi obtida com auxílio do software do equipamento.

4.7.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção do instrumento (LDi) e o limite de quantificação do instrumento (LQi) foram estimados a partir da relação sinal/ruído, para cada composto, sendo considerado no mínimo 3 vezes a razão do sinal pela linha de base para o LD e 10 vezes a razão do sinal/ruído para o LQ.

Os limites de detecção e quantificação do instrumento foram obtidos através de padronização externa no solvente, pelo preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações em acetato de etila. Já, os limites de detecção (LD_m) e quantificação (LQ_m) do método empregado foram obtidos pela adição de soluções analíticas de diferentes concentrações, preparadas através de diluições da solução padrão trabalho com o extrato da matriz, extraído por EFS e considerando-se o fator de concentração, que foi de 200 vezes.

4.7.3 Exatidão (ensaios de recuperação)

A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação, em três níveis de fortificação, considerando o LQ, 2 x LQ e 10 x LQ, nas concentrações 25, 50 e 250 ng mL⁻¹, respectivamente. Cada nível de fortificação foi extraído e injetado em triplicata no equipamento. Para a quantificação dos analitos foi utilizada a concentração do padrão diluído no extrato da matriz. Os cálculos foram feitos de acordo com a Equação 6, sendo expressa em porcentagem de recuperação.

4.7.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão do método foi avaliada em função da repetitividade e da precisão intermediária. Para o estudo da repetitividade foi realizada a extração por EFS em 3 níveis de fortificação (LQ, 2 x LQ e 10 x LQ), com 7 réplicas de cada nível, e três injeções de cada e calculado o % CV. A precisão intermediária foi avaliada com dois analistas, em diferentes dias, injetando uma curva analítica nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ng mL⁻¹ cada um no CG-EM. O valor numérico para avaliar a precisão, % CV, foi calculado através da Equação 8. (Ribani *et al.*, 2004)

4.7.5 Efeito de matriz

Para verificar a ocorrência do efeito de matriz foi injetado no sistema cromatográfico a solução padrão com a mistura dos compostos diluída em acetato de etila e a solução padrão diluída com o extrato da matriz extraído por EFS. O cálculo do efeito de matriz foi realizado conforme a Equação 9.

4.8 Experimento

Placas metálicas galvanizadas de 25 cm² foram pintadas separadamente, ambas as faces, com as tintas Mícron Premium International[®], Tritão International[®], Supermarine AF IONEX MB Renner[®], AF 870 Renner[®], seguindo os critérios recomendados pelos respectivos fabricantes. Após completa secagem da pintura, as placas foram fixadas por fios inertes de náilon e submersas em água ultrapura e em água do mar sintética (salinidade 30), em dois experimentos distintos (Figura 2). O experimento foi realizado em triplicata utilizando béqueres de 600 mL, contendo 600 mL de água ultrapura e água do mar sintética. Os béqueres foram envoltos individualmente com papel alumínio e mantidos em agitador orbital (velocidade 24 rpm) por um período de 10 dias sob temperatura ambiente ($\cong 20$ °C) e cobertos totalmente com papel alumínio para evitar a fotodegradação.

Após este período, esperava-se que uma série de compostos fossem liberados para o meio líquido, considerado solução teste. Imediatamente após o término da exposição, a solução presente em cada béquer foi separada em três alíquotas iguais de 200 mL, sendo que os analitos de interesse foram pré-concentrados utilizando EFS. Os cartuchos, após estarem completamente secos, foram congelados até o momento da eluição e determinação dos analitos (máximo de 60 dias).



Figura 2. Experimento realizado para lixiviar os biocidas presentes nas tintas anti-incrustantes utilizadas neste estudo (em triplicata)

4.9 Processamento das amostras

4.9.1 Extração dos analitos

O método de extração mais utilizado para realizar determinações de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes aquosas e posteriormente transferi-los para um solvente orgânico apropriado a análise, é a extração em fase sólida.

Devido aos biocidas orgânicos selecionados para a realização deste trabalho apresentarem ampla faixa de polaridade, a utilização de colunas OASIS[®] HLB, ou seja, *hidrofílic-lipofílic balance*, compostas por igual parte de dois monômeros, um hidrofílico (vinilpirrolidina) e um lipofílico (divinilbenzeno), demonstra ser a opção mais indicada. A parte hidrófila do polímero contribui com um aumento da polaridade da fase sólida, enquanto que a lipofílica aumenta a área da superfície de retenção. Desta forma, o processamento das amostras foi feito utilizando esta técnica com base na metodologia descrita por Aguera e colaboradores (, 2000).

Um volume de 200 mL de amostra foi percolado por colunas OASIS[®] HLB contendo 60 mg do adsorvente. As colunas foram previamente condicionadas com 5 mL de acetato de etila, 5 mL de metanol e 4 mL de água

ultra pura. Antes da eluição, os cartuchos foram secos sob suave fluxo de nitrogênio, embalados com papel alumínio e armazenados à – 20 °C por três dias. A eluição dos analitos foi feita com 2 alíquotas de 2 mL de acetato de etila, com intervalo de 5 min entre as alíquotas. Posteriormente, o extrato foi evaporado sob fluxo suave de nitrogênio a 0,9 mL. Este volume foi transferido para frascos (vials) específicos contendo um volume de 100 µL de TCMX (100 ng mL⁻¹) como padrão interno. Posteriormente as amostras foram analisadas em sistema CG-EM.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos analitos

Os analitos foram identificados considerando os tempos de retenção obtidos através da injeção de uma mistura de padrões autênticos e também através da comparação dos seus espectros com os espectros obtidos com os padrões e os contidos na biblioteca *NIST* do equipamento.

A Figura 3 apresenta o cromatograma dos analitos de interesse com seus respectivos tempos de retenção e íons de quantificação (Q). Os parâmetros avaliados para a verificação da eficiência de separação dos analitos demonstraram que o método foi eficiente, com todos os índices dentro dos níveis aceitáveis para métodos que separam que determinam múltiplos componentes. O método empregado obteve separação de 100 % entre os pares de compostos. Os valores de R_s superiores a 1,5 indicam uma separação completa, e valores de k superiores a 0,5 estando dentro dos limites aceitáveis para métodos onde ocorra a separação de múltiplos analitos e valores de α superiores a 1, com picos estreitos (Tabela 7) (Collins *et al.*, 2006). Desta forma, a mistura dos cinco biocidas analisados nas condições determinadas apresentou boa resolução, retenção e seletividade.

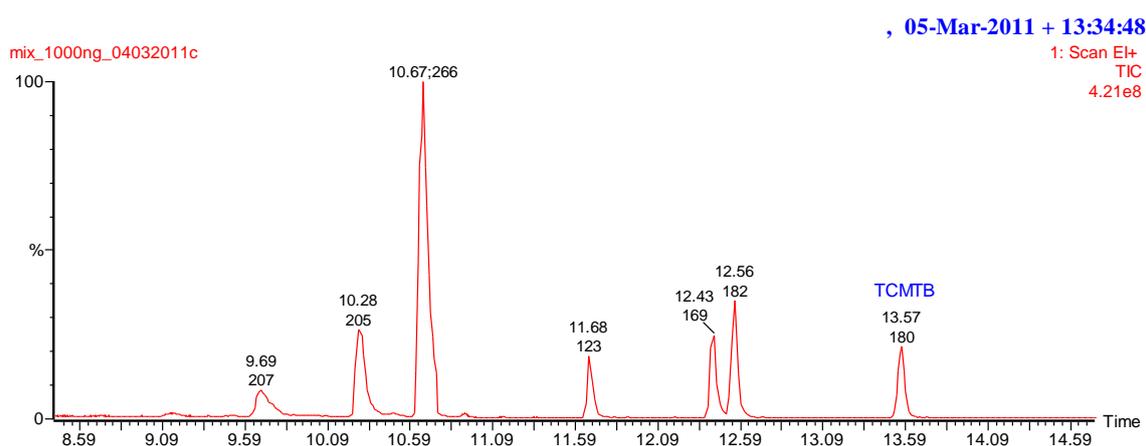


Figura 3. Cromatograma da mistura dos padrões analíticos na concentração de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ com os respectivos tempos de retenção e fragmentos monitorados.

Tabela 7: Tempo de retenção, fator de retenção, resolução e fator de separação dos cinco biocidas determinados.

Biocida	t_r	k	R_s	α
Clorotalonil	10,7	0,6		
Diclofluanida	11,7	0,7	1,9	1,3
DCOIT	12,4	0,7	2,0	1,2
Irgarol	12,6	0,8	1,9	1,1
TCMTB	13,6	0,9	2,5	1,2

TR: tempo de retenção; k: fator de retenção;
Rs: resolução; α : fator de separação.

5.2 Validação do método

5.2.1 Curva analítica e linearidade

A análise dos dados das curvas analíticas e das equações das retas comprova que o modelo de regressão linear para as determinações analíticas em questão é adequado, com valores para os coeficientes de correlação (r) maiores que 0,998, os quais se enquadram dentro das recomendações pelos órgãos regulamentadores (INMETRO, 2011). Os parâmetros de linearidade obtidos através de calibração externa e superposição na matriz para o método de EFS e CG-EM são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados obtidos para calibração dos biocidas preparados no solvente e no extrato da matriz (água ultrapura) empregando EFS e CG-EM

Biocidas	Curva analítica no solvente	Curva analítica na matriz
	r	r
Atrazina d5	$Y=0,000698x + 0,00161$ 0,998	$Y=0,00206x - 0,0105$ 0,999
Clorotalonil	$Y=0,00166x - 0,00361$ 0,999	$Y=0,00322x - 0,0161$ 0,999
Diclofluanida	$Y=0,00428x - 0,0179$ 0,999	$Y=0,00508x - 0,0312$ 0,999
DCOIT	$Y=0,00287x - 0,00453$ 0,999	$Y=0,00177x - 0,00867$ 0,999
Irgarol	$Y=0,0110x - 0,0434$ 0,999	$Y=0,00762x - 0,05119$ 0,999
TCMTB	$Y=0,00174x - 0,00362$ 0,999	$Y=0,00191x - 0,0106$ 0,999

5.2.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação para o instrumento (LD_i, LQ_i) e para o método (LD_m, LQ_m) analisados por CG-EM são apresentados na Tabela 9 em ng mL⁻¹. Os limites de detecção do método foram de 0,0125 ng mL⁻¹ para a maioria dos compostos, exceto para o TCMTB que foi 0,025 ng mL⁻¹. Em um estudo semelhante, Aguera *et al* (, 2000) obtiveram um LD_m de 0,0025 ng mL⁻¹ para clorotalonil e diclorofuanida, 0,0012 ng mL⁻¹ para irgarol e 0,003 ng mL⁻¹ para TCMTB.

Tabela 9: Limites de detecção e quantificação (ng mL⁻¹) do instrumento e do método (n = 3)

Biocida	LD _i	LQ _i	LD _m	LQ _m
Atrazina	2,5	10	0,0125	0,05
Clorotalonil	2,5	10	0,0125	0,05
Diclofluanida	2,5	10	0,0125	0,05
DCOIT	2,5	10	0,0125	0,05
Irgarol	2,5	10	0,0125	0,05
TCMB	5,0	25	0,025	0,125

As Figuras 4 e 5 apresentam as respostas cromatográficas da altura do pico com a relação sinal/ruído no nível de LD e LQ para o composto TCMTB, respectivamente, que foi o composto que apresentou menor detectabilidade dentre os analisados. A relação sinal/ruído para o LD foi de 3,83 e LQ foi 12,80, dentro das recomendações que são 3 e 10, respectivamente (Ribani *et al.*, 2004).

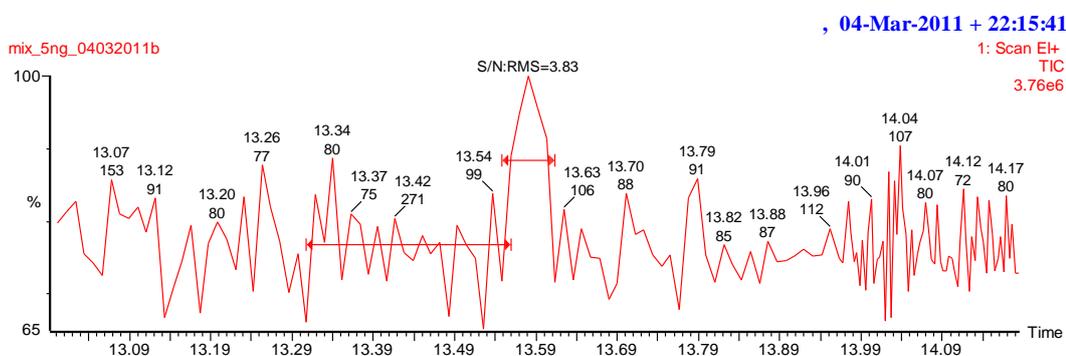


Figura 4. Cromatograma do composto TCMTB na concentração de 5ng mL⁻¹ com a relação sinal/ruído do LD

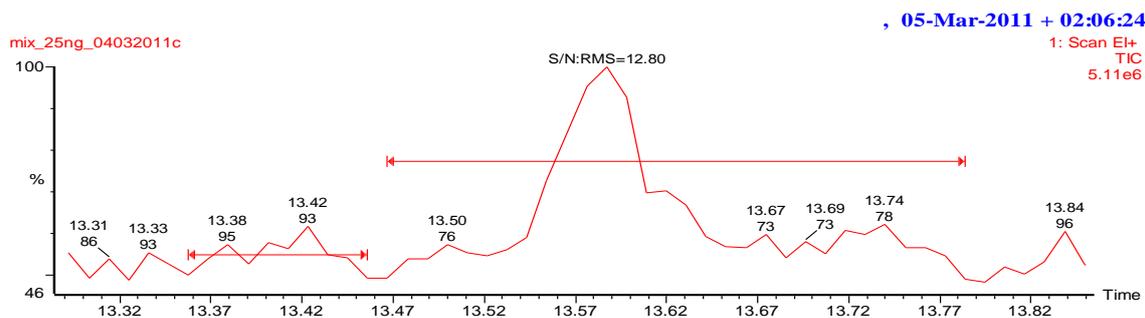


Figura 5. Cromatograma do composto TCMTB na concentração de 25 ng mL^{-1} com a relação sinal/ruído do LQ

Considerando concentrações ambientais destes compostos, Aguera *et al* (, 2000) analisaram amostras de água oriundas de três marinas em Almeria (Espanha). Irgarol foi detectado em todas as amostras analisadas, com concentrações variando de 25 a 450 ng L^{-1} . Entretanto, nesse mesmo estudo os demais biocidas não foram detectados em concentrações significativas. Similarmente, Harino e colaboradores (, 2007c) realizaram em estudo de monitoramento no porto de Osaka (Japão) com alguns biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes. Concentrações relativamente baixas foram detectadas para DCOIT ($0,003\text{--}0,004\text{ ng mL}^{-1}$) e Irgarol ($0,0008\text{--}0,267\text{ ng mL}^{-1}$). Lambropoulou *et al* (, 2000) também analisaram fungicidas em amostras de água de marinas das cidades Igoumenitsa, Preveza and Patras (Grécia). Clorotalonil e diclofluanida foram encontrados em níveis de 0,017 a 0,055 e 0,006 a 0,056 ng mL^{-1} , respectivamente. DCOIT foi detectado em concentrações de até 3.300 ng L^{-1} em amostras de água coletadas de marinas ao longo da costa da Espanha. Concentrações mais baixas de até a 49 ng L^{-1} foram detectados em marinas da Grécia, enquanto todos os outros estudos na Europa e na América não conseguiram detectar DCOIT em concentrações > LDs. (Harino *et al.*, 2008a)

De acordo com os dados observados em estudos que avaliam a presença destes biocidas em água, os limites de detecção e quantificação obtidos para o presente método podem ser considerados satisfatórios. O fator de pré-concentração foi de 200, portanto estes limites ainda poderiam ser melhorados, ou seja, a obtenção de limites inferiores se tornaria possível utilizando um volume maior de amostra, aumentando o fator de pré-

concentração em função da capacidade do cartucho utilizado durante a extração.

5.2.3 Exatidão (ensaios de recuperação)

Os resultados da avaliação de exatidão do método realizados para validação em três níveis de concentração foram expressos em percentual de recuperação e está apresentado na

Tabela 10. Os valores de recuperação variaram entre 99 e 117 %, enquanto que os desvios padrão relativos variaram entre 0,07 e 10,3%. Esses resultados estão dentro da faixa aceitável para análise de resíduos, onde uma recuperação entre 70 e 120 % e um desvio padrão relativo ≤ 20 % é considerada normal (INMETRO, 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por Thomas *et al.* (2000) que determinaram um grupo de biocidas em sedimentos costeiros do Reino Unido, e encontraram recuperações que variaram entre 102 e 123 %.

Tabela 10. Dados dos ensaios de exatidão para determinação de um grupo de (cinco) biocidas determinados em matriz aquosa (n = 3)

Composto	Nível de fortificação ng mL ⁻¹	Recuperação %	CV %
Atrazina d5	0,125	112	2,8
	0,25	116	3,1
	1,25	102	4,0
Clorotalonil	0,125	100	1,1
	0,25	100	1,2
	1,25	108	10,3
Diclofluanida	0,125	101	2,8
	0,25	104	3,1
	1,25	117	1,6
DCOIT	0,125	112	4,3
	0,25	108	3,1
	1,25	100	0,9
Irgarol	0,125	102	2,8
	0,25	101	1,3
	1,25	99	0,07
TCMTB	0,125	101	1,2
	0,25	101	1,2
	1,25	105	6,1

5.2.4 Precisão

Os resultados de repetitividade para os analitos de interesse são apresentados na Tabela 11 em três níveis de fortificação (0,125; 0,25 e 1,25 ng mL⁻¹) com sete repetições de cada concentração e três injeções de cada nível. Conforme mostrado, todos os compostos exceto a atrazina d5, apresentaram coeficientes de variação maiores para as concentrações menores. Esse tipo de variação é frequentemente reportado em estudos que objetivam determinar compostos em níveis traço, sobretudo nas concentrações mais baixas. (Economou *et al.*, 2009a) Apesar disso, os valores de repetitividade foram satisfatórios, uma vez que na quantificação de elementos em baixos níveis de concentração (ng mL⁻¹) são aceitáveis valores de até 20 % (Ribani *et al.*, 2004). Da mesma forma, os valores de precisão intermediária, determinados conforme o item 4.7.4, também foram inferiores a esse limite, sendo que não foi observada variação significativa entre as médias dos valores encontrados para a precisão intermediária para analistas diferentes, confirmando a reprodutibilidade intralaboratorial (INMETRO, 2011) (Tabela 12).

Tabela 11. Ensaios de repetitividade em diferentes níveis de fortificação. (n = 7)

Biocida	Nível de fortificação (ng mL ⁻¹)	Recuperação %	CV %
Atrazina d5	0,125	110	6,0
	0,25	113	7,2
	1,25	104	5,2
Clorotalonil	0,125	102	5,5
	0,25	101	4,6
	1,25	100	2,1
Diclofluanida	0,125	102	5,9
	0,25	104	6,0
	1,25	115	4,5
DCOIT	0,125	110	8,3
	0,25	108	9,4
	1,25	102	4,7
Irgarol	0,125	104	5,0
	0,25	102	4,5
	1,25	101	4,4
TCMTB	0,125	102	3,7
	0,25	101	4,4
	1,25	1041	5,2

Tabela 12. Resultados da avaliação da precisão intermediária, obtida para diferentes analistas (A e B) (n = 3)

Composto	CV A %	CV B %
Atrazina d5	4,27	2,56
Clorotalonil	3,62	3,17
Diclofluanida	1,92	4,02
DCOIT	3,03	3,75
Irgarol	4,48	4,93
TCMTB	8,25	3,37

5.2.5 Efeito de matriz

Os experimentos demonstraram que a análise dos analitos em uma matriz água ultra-pura apresentaram efeito de matriz variável de acordo com o analito analisado, visto que este efeito representa a interferência de outros compostos presentes na matriz analisada sobre a eficiência da ionização do analito de interesse, sendo, portanto específica para o analito e matriz em questão (Figura 6 e Tabela 13).

Tabela 13. Valores dos coeficientes angulares das curvas preparadas no solvente e na matriz e % de efeito de matriz calculado para cada analito (n = 3)

Composto	Coeficiente angular da Curva Solvente	Coeficiente angular da curva matriz	Efeito de Matriz (%)	Nível
Atrazina d5	0,0006983	0,00206231	195,3	alto
Clorotalonil	0,0016619	0,00322643	94,1	alto
Diclofluanida	0,0042893	0,00508833	18,6	baixo
DCOIT	0,0028714	0,00177028	-38,4	médio
Irgarol	0,0110805	0,00762260	-31,2	médio
TCMTB	0,0017485	0,00191818	9,7	baixo

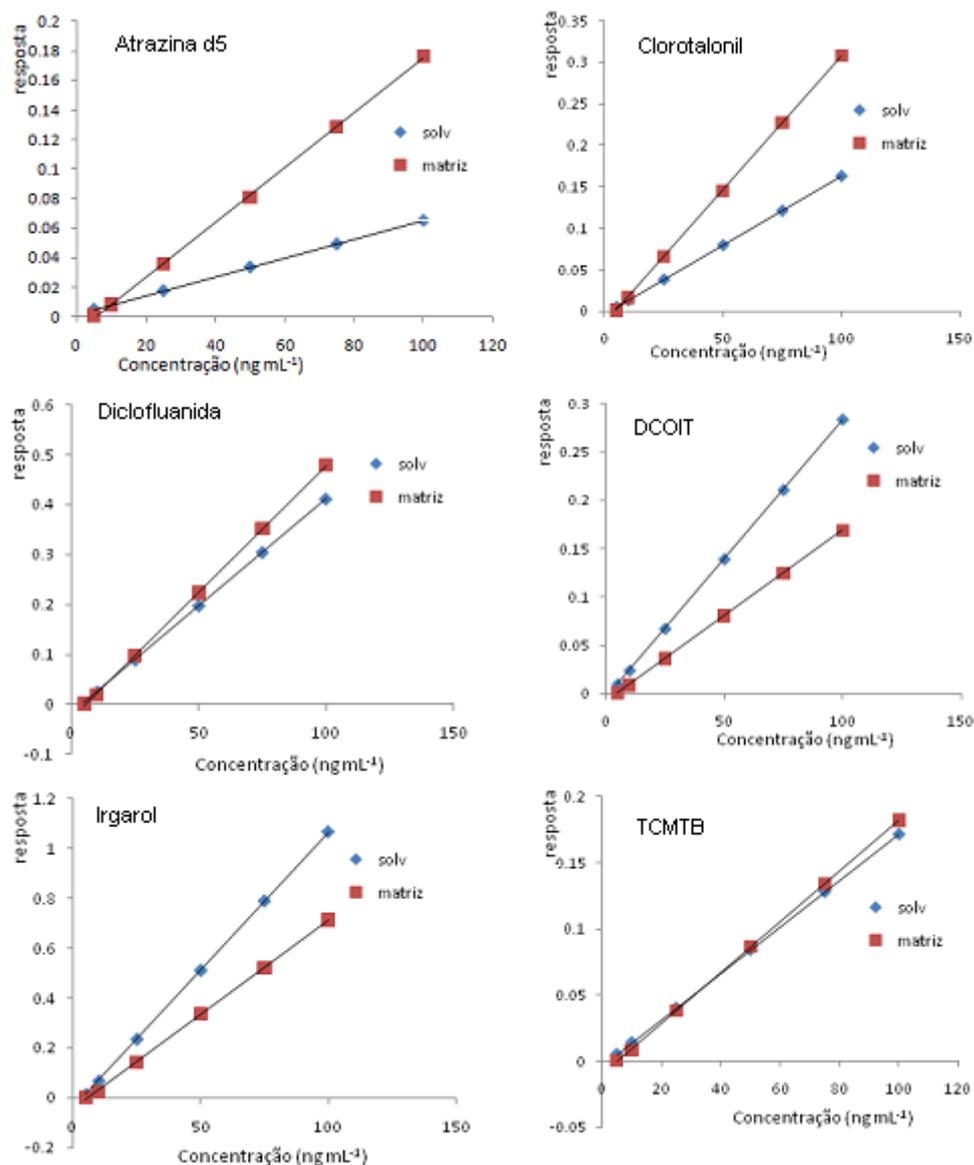


Figura 6. Comparação das inclinações das Curvas analíticas preparadas no extrato da matriz aquosa (água ultrapura) e no solvente

Considerando que efeito matriz inferior a 20% é considerado baixo (Economou et al., 2009b), TCMTB (9,7%) e diclofluanida (18,6%) apresentaram efeito matriz desprezível. Por outro lado, os analitos DCOIT (-38,4%) e Irgarol (-31,2%) apresentaram efeito matriz moderado, ocorrendo uma supressão no sinal cromatográfico (sinal negativo). Já atrazina d5 e clorotalonil apresentaram um aumento do sinal cromatográfico (195 e 94 %, respectivamente), sendo o efeito de matriz considerado alto para estes analitos. O exato mecanismo de supressão ou aumento do fator de resposta é desconhecido, porém as

propriedades físico-químicas do analito como também as condições cromatográficas do sistema utilizado (como injetor, coluna cromatográfica e detector) também influenciam na resposta do efeito de matriz (Pinho, 2009).

Vários são os métodos para minimizar o efeito de matriz (como curva analítica na matriz, formas de injeção, analitos protetores, limpeza dos extratos, método de adição de padrão). Entretanto, nenhum deles é capaz de eliminá-lo totalmente. A escolha de método apropriado depende dos analitos analisados, do método analítico, das condições do equipamento e da disponibilidade de tempo e recursos. O mais comum é o uso de soluções padrão preparadas no próprio extrato da matriz, o qual foi utilizado no presente trabalho.

5.3 Experimento das tintas

Este experimento avaliou a presença dos biocidas DCOIT, Irgarol, Clorotalonil, TCMTB e Diclofluanida em 4 tintas anti-incrustantes mais comumente utilizadas em estaleiros da região do porto de Rio Grande. Os resultados não caracterizam a constituição integral das tintas, uma vez que os analitos foram medidos na água e não nas tintas, onde as condições experimentais não garantiram a completa liberação dos biocidas presentes. Entretanto, mesmo com tais limitações, este estudo representa uma grande contribuição para o conhecimento de quais biocidas são utilizados em/liberados de tintas anti-incrustantes de terceira geração, visto que estas tintas não indicam no rótulo os princípios ativos empregados.

O experimento realizado foi baseado e adaptado de dois métodos padronizados que determinam a taxa de liberação dos biocidas em tintas anti-incrustantes. Um é o método de Ketchum que foi projetado no Instituto Oceanográfico Woods Hole (EUA), o qual mediu a taxa de liberação de cobre de tintas anti-incrustantes. Este método foi desenvolvido para fornecer um procedimento laboratorial estático para medir as taxas de liberação de biocidas que ocorrem durante um período de imersão sob condições específicas de temperatura, pH, salinidade e baixas concentrações de biocidas. Uma placa (10 x 15 cm) é revestida duas vezes com tinta anti-incrustante e imersa em um béquer contendo 1,5 L de água do mar sintética sob aeração. Após 1 - 2 horas,

a concentração dos biocidas na água do mar sintética é determinada por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (metais), cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa (biocidas orgânicos). O outro método é baseado nas normas da ASTM/ISO para determinação das taxas de liberação de biocidas, tais como a ASTM D5108-90 que descreve o método padrão para taxas de liberação de organoestânicos em água do mar, a ASTM D6442-99 para cobre e a ASTM D6903-07 para DCOIT, CuPT, ZnPT e Irgarol. São baseados no "método de rotação do cilindro", onde cilindros (diâmetro de 64 ± 5 mm) são pintados com tinta anti-incrustante e imersos em tanque contendo água do mar sintética. Em intervalos de tempos específicos, os cilindros teste são removidos dos tanques e expostos em recipientes contendo 1,5 L de água do mar sintética, submetidos a uma velocidade de rotação fixa de 60 ± 5 rpm por 1 hora. A concentração do biocida liberado é medida, sendo esta operação repetida em intervalos de tempo definidos (1, 3, 7, 10, 14, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42 e 45 dias). Então, são calculadas a taxa de liberação de biocida em cada dia de teste, a liberação de 14 dias cumulativos ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e a média da taxa de liberação ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{dia}$) de 21 a 45 dias (Takahashi, 2009).

Além desses citados acima, que possibilitam determinar os biocidas existentes nas tintas, existem outros métodos que determinam taxa de liberação, tais como o Método de Domo, que foi desenvolvido pela marinha dos EUA, destinado à medição *in situ* da liberação de cobre utilizando um dispositivo (domo) de policarbonato fixado na superfície pintada do casco do navio. (Takahashi, 2009) Outro método foi obtido a partir da experiência de ASTM / ISO para cobre e organoestânicos, sendo baseado no balanço de massa, onde o volume de tinta seca aplicada, sua carga real de biocidas e tempo de vida específico da pintura são levados em consideração no cálculo. (Takahashi, 2009) É aceito pelas autoridades reguladoras da Associação Européia de Fabricantes de tintas (CEPE).

No presente estudo, a análise experimental que avaliou a liberação dos biocidas utilizados nas tintas Mícron Premium International[®], Triton International[®], Supermarine AF IONEX MB Renner[®] e AF 870 Renner[®], utilizando como veículo água ultra pura, revelou a presença de três compostos dentre os cinco determinados. Durante as análises inúmeros interferentes foram liberados pelas tintas, o que dificultou a interpretação dos dados

cromatográficos. Os cromatogramas gerados na análise de cada tinta apresentaram perfis distintos, sendo que a tinta Tritão International[®] foi a que apresentou um número maior de interferentes, seguido pela AF 870 Renner[®], Supermarine AF IONEX MB Renner[®] e, por último, a Mícron Premium International[®].

Na tinta Tritão International[®], o único composto detectado nas condições experimentais testadas foi o TCMTB, numa concentração média relativamente baixa de 0,20 ng mL⁻¹. Tal constatação está de acordo com o fato de que essa tinta é a mais barata dentre as analisadas, sendo frequentemente empregada em embarcações destinadas a pesca de subsistência e necessitando de repinturas anuais e, às vezes, semestrais. (I. B. Castro, comunicação pessoal)¹

As duas tintas distintas da Renner[®] analisadas (Supermarine AF IONEX MB e AF 870) são utilizadas em condições estáticas (como comportas e equipamentos) e dinâmicas (iates, navios, assim como barcos de recreação). São constituídas de polímeros organo-metálicos, com biocidas intensificadores de alta eficiência. (Renner, 2011) Na Supermarine AF IONEX MB foram encontrados dois desses biocidas, Diclofluanida em concentração média de 0,28 ng mL⁻¹ e o TCMTB de 2,07 ng mL⁻¹. Já na AF 870 foi encontrado somente o TCMTB em concentração média de 0,42 ng mL⁻¹. Segundo as especificações do rótulo, a AF 870 possui baixo teor de óxido cuproso que, aliada aos resultados de biocidas encontrados, justificam o maior custo da tinta Supermarine AF Ionex MB em relação a AF 870.

A tinta Mícron Premium International[®], conforme especificado no rótulo, é uma tinta de alta performance, muito utilizada em estaleiros, e embarcações de médio e grande porte. Nesta tinta foi liberado o biocida TCMTB, em concentração média de 0,23 ng mL⁻¹.

Dados não publicados de estudos ecotoxicológicos realizados no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO) da FURG demonstraram que a tinta Mícron Premium International[®] apresentou uma maior toxicidade a organismos fitoplanctônicos e microcústáceos, quando comparada às tintas da marca Renner. (R. S.

¹ Ítalo Braga de Castro; IO-FURG, Rio Grande, Email: italobraga@gmail.com

Camargo, comunicação pessoal)² Entretanto, cabe ressaltar que o experimento realizado para identificar os biocidas nas tintas analisadas responde tão somente aos 5 biocidas validados neste trabalho, o que não significa que outros compostos biocidas não possam estar presentes, sendo esperados inclusive compostos organometálicos de cobre e zinco.

² Rafael Camargo Souza, IO-FURG, Rio Grande, Email: rafaelcs17@hotmail.com

6 CONCLUSÕES

O método analítico para determinação simultânea dos biocidas irgarol, DCOIT, TCMTB, clorotalonil e diclofluanida em matriz aquosa utilizando o cartucho polimérico HLB e CG-EM atendeu as normas estabelecidas pelos órgãos reguladores.

Atrazina d5 e clorotalonil analisados em água ultrapura apresentaram um alto efeito matriz nas condições testadas, enquanto irgarol e DCOIT apresentaram efeito matriz moderado. O efeito matriz sobre diclofluanida e TCMTB foi considerado desprezível.

São quatro as principais tintas anti-incrustantes atualmente comercializadas na região portuária da cidade de Rio Grande (RS, Brasil): Mícron Premium International[®], Tritão International[®], Super Marine AF IONEX MB Renner[®] e AF 870 Renner[®].

O método de lixiviação empregado se mostrou eficiente para determinar a presença dos biocidas estudados a partir de uma matriz de água ultrapura.

Dentre os biocidas anti-incrustantes de 3ª geração analisados, somente diclofluanida e TCMTB foram encontrados nas tintas empregando o método de lixiviação.

7 RECOMENDAÇÕES FUTURAS

Embora com o desenvolvimento do presente estudo tenha sido possível avançar no conhecimento sobre tintas anti-incrustantes, diversas novas questões surgiram. Sendo assim, a fim de continuar avançando nesta linha de pesquisa seria importante a realização de um teste de robustez com água salgada, bem como estudos quanto à aplicabilidade de outros cartuchos poliméricos como o PS-DVB (copolímero de estireno divinilbenzeno) para o processo de extração e purificação em matriz aquosa, visto que tem custo inferior ao HLB utilizado. Além disso, a otimização de métodos de preparo de amostras e determinação de biocidas anti-incrustantes em matrizes como água salgada/estuarina, sedimento e biota contribuiriam, sobremaneira, para a execução de estudos desses biocidas nas áreas sob a influência de atividades de navegação. Adicionalmente, um novo método incluindo outros biocidas anti-incrustantes, bem com seus metabólitos mais relevantes, deve ser otimizado e validado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, S., Aggarwal, S.G., and Singh, P. (2005). Quantification of ziram and zineb residues in fog-water samples. *Talanta* **65**, 104-110.
- Aguera, A., Piedra, L., Hernando, M.D., and Fernandez-Alba, A.R. (2000). Multiresidue method for the analysis of five antifouling agents in marine and coastal waters by gas chromatography-mass spectrometry with large-volume injection. *Journal of Chromatography A* **889**, 261-269.
- Albanis, T.A., Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., and Konstantinou, I.K. (2002). Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. *Chemosphere* **48**, 475-485.
- Almeida, E., Diamantino, T.C., and de Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings* **59**, 2-20.
- Alzieu, C. (2000). Environmental impact of TBT: the French experience. *Science of the Total Environment* **258**, 99-102.
- Azevedo, D.d., Gerchon, E., and Reis, E.O. (2004). Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **15**, 292-299.
- Basheer, C., Tan, K.S., and Lee, H.K. (2002). Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* **44**, 697-703.
- Bellas, J. (2006). Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Science of the Total Environment* **367**, 573-585.
- Bowman, J.C., Readman, J.W., and Zhou, J.L. (2003). Seasonal variability in the concentrations of Irgarol 1051 in Brighton Marina, UK; including the impact of dredging. *Marine Pollution Bulletin* **46**, 444-451.
- Bragadin, M., Iero, A., Cima, F., Ballarin, L., and Manente, S. (2007). TCMS inhibits ATP synthesis in mitochondria: A systematic analysis of the inhibitory mechanism. *Toxicology in vitro* **21**, 1127-1133.
- Brooks, S.J. and Waldock, M. (2009). Copper Biocides in the Marine Environment. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 413-428.
- Carbery, K., Owen, R., Frickers, T., Otero, E., and Readman, J. (2006). Contamination of Caribbean coastal waters by the antifouling herbicide Irgarol 1051. *Marine Pollution Bulletin* **52**, 635-644.

- Castro, I.B., Rodrigues-Queiroz, L., and Rocha-Barreira, C.A. (2007). Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha - uma Revisão. *Arquivos de Ciências do Mar* **40**, 96-12.
- Castro, I.B., Westphal, E., and Fillmann, G. (2011). Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova* **6**, 1021-1031.
- Caux, P.Y., Kent, R.A., Fan, G.T., and Stephenson, G.L. (1996). Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **26**, 45-93.
- Cereser, C., Boget, S., Parvaz, P., and Revol, A. (2001). An evaluation of thiram toxicity on cultured human skin fibroblasts. *Toxicology* **162**, 89-101.
- Champ, M.A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Science of the Total Environment* **258**, 21-71.
- Collins, C.H., Braga, G.L., and Bonato, P.S. (2006). Fundamentos de cromatografia. Campinas. 456 p.
- Crnogorac, G. and Schwack, W. (2009). Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **28**, 40-50.
- DeLorenzo, M.E. and Serrano, L. (2006). Mixture toxicity of the antifouling compound irgarol to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **41**, 1349-1360.
- Demoliner, A., Caldas, S.S., Costa, F.P., Gonçalves, F.F., Clementin, R.M., Milani, M.R., and Primel, E. (2010). 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* **21**, 1424-1433.
- Dominguez, L.A. (2010). Determinação dos anti-incrustantes Diuron e Irgarol na Região estuarina de Rio Grande - RS. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 112 p.
- Doose, C.A., Szaleniec, M., Behrend, P., Muller, A., and Jastorff, B. (2004). Chromatographic behavior of pyrithiones. *Journal of Chromatography A* **1052**, 103-110.
- Economou, A., Botitsi, H., Antoniou, S., and Tsipi, D. (2009a). Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 5856-5867.
- Economou, A., Botitsi, H., Antoniou, S., and Tsipi, D. (2009b). Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 5856-5867.
- Fernandez, M.A. and Pinheiro, F. (2007). New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. *Int.J. Environ. Health* **1**, 427-448.
- Fernandez, M.A., Pinheiro, F.M., de Quadros, J.P., and Camillo, J. (2007). An easy, non-destructive, probabilistic method to evaluate the imposex response of gastropod populations. *Marine Environmental Research* **63**, 41-54.
- Fernandez-Alba, A.R., Hernando, M.D., Piedra, L., and Chisti, Y. (2002). Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta* **456**, 303-312.
- Ferrer, I., Ballesteros, B., Marco, M.P., and Barcelo, D. (1997). Pilot survey for determination of the antifouling agent Irgarol 1051 in enclosed seawater samples by a direct enzyme-linked immunosorbent assay and solid-phase extraction followed by liquid chromatography diode array detection. *Environmental Science and Technology* **31**, 3530-3535.
- Ferrer, I. and Barcelo, D. (2001). Identification of a new degradation product of the antifouling agent Irgarol 1051 in natural samples. *Journal of Chromatography A* **926**, 221-228.
- Gardinali, P.R., Plasencia, M.D., and Maxey, C. (2004). Occurrence and transport of Irgarol 1051 and its major metabolite in coastal waters from South Florida. *Marine Pollution Bulletin* **49**, 1072-1083.
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., and Zhou, J.L. (2007). Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. *Environment International* **33**, 70-77.
- Gerecke, A.C., Tixier, C., Bartels, T., Schwarzenbach, R.P., and Muller, S.R. (2001). Determination of phenylurea herbicides in natural waters at concentrations below 1 ng l⁻¹ using solid-phase extraction, derivatization, and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **930**, 9-19.
- Godoi, A.F.L., Favoreto, R., and Santiago-Silva, M. (2003). Contaminação Ambiental Por Compostos Organoestânicos. *Química Nova* **26**, 708-716.
- Gough, m.A., Fothergill, J., and Hendrie, J.D. (1994). A Survey of Southern England Coastal Waters for the S-Triazine Antifouling Compound Irgarol-1051. *Marine Pollution Bulletin* **28**, 613-620.
- Hajslova, J., Holadova, K., Kocourek, V., Poustka, J., Godula, M., Cuhra, P., and Kempny, M. (1998). Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *Journal of Chromatography A* **800**, 283-295.

- Hall, L.W., Giddings, J.M., Solomon, K.R., and Balcomb, R. (1999). An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints. *Critical Reviews in Toxicology* **29**, 367-437.
- Hamwijk, C., Schouten, A., Foekema, E.M., Ravensberg, J.C., Collombon, M.T., Schmidt, K., and Kugler, M. (2005). Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas. *Chemosphere* **60**, 1316-1324.
- Harino, H., Arai, T., Ohji, M., and , M.N. (2008a). Asia. In: T. Arai, M. Ohji, H. Harino, and W. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, New York. pp. 345-362.
- Harino, H., Ohji, M., Wattayakorn, G., Adulyanukosol, K., Arai, T., and Miyazaki, N. (2007a). Accumulation of organotin compounds in tissues and organs of stranded whales along the coasts of Thailand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **53**, 119-125.
- Harino, H., Ohji, M., Wattayakorn, G., Adulyanukosol, K., Arai, T., and Miyazaki, N. (2007b). Concentrations of organotin compounds in tissues and organs of dugongs from Thai coastal waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **53**, 495-502.
- Harino, H., Ohji, M., Wattayakorn, G., Adulyanukosol, K., Arai, T., and Miyazaki, N. (2008b). Accumulation of organotin compounds in tissues and organs of dolphins from the coasts of thailand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **54**, 145-153.
- Harino, H., Ohji, M., Wattayakorn, G., Arai, T., Rungsupa, S., and Miyazaki, N. (2006). Occurrence of antifouling biocides in sediment and green mussels from Thailand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **51**, 400-407.
- Harino, H., Yamamoto, Y., Eguchi, S., Kawai, S., Kurokawa, Y., Arai, T., Ohji, M., Okamura, H., and Miyazaki, N. (2007c). Concentrations of antifouling biocides in sediment and mussel samples collected from Otsuchi Bay, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **52**, 179-188.
- Harino, H. (2004). Occurrence and degradation of representative TBT free-antifouling biocides in aquatic environment. *Coastal marine science* **29**, 28-39.
- Harino, H., Arai, T., Ohji, M., and Nobuyuki, M. (2009). Asia. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 345-362.
- Harino, H. and Langston, W.J. (2009). Degradation of Alternative Biocides in the Aquatic Environment. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Tokyo. pp. 397-412.
- Hernando, M., Mezcuca, M., Barcelo, D., and Fernandez-Alba, A.R. (2006). Evaluation of Antifouling Booster Biocides in Marine Water and Sediments

Based on Mass Spectrometric Techniques. In: I.K. Konstantinou (eds.), *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 121-153.

IMO (2005). *Antifouling Systems*. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. International Maritime Organization, London,

INMETRO (2011). *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio*. DOQ-CGCRE-008,

Jacobson, A.H. and Willingham, G.L. (2000). Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *Science of the Total Environment* **258**, 103-110.

Jones, B. and Bolam, T. (2007). Copper speciation survey from UK marinas, harbours and estuaries. *Marine Pollution Bulletin* **54**, 1127-1138.

Karlsson, J. and Eklund, B. (2004). New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Marine Pollution Bulletin* **49**, 456-464.

Karlsson, J., Breitholtz, M., and Eklund, B. (2006). A practical ranking system to compare toxicity of anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin* **52**, 1661-1667.

Kawamoto, T., Yano, M., and Makihata, N. (2005). Development of a high-sensitivity quantitative analytical method for determining polycarbamate by gas chromatography-mass spectrometry incorporating temperature-programmable inlet on-column injection. *Journal of Chromatography A* **1074**, 155-161.

Konstantinou, I.K. and Albanis, T.A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International* **30**, 235-248.

Kotrikla, A. (2009). Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management* **90**, S77-S85.

Koutsaftis, A. and Aoyama, I. (2007). Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of the Total Environment* **387**, 166-174.

Lam, K.H., Wai, H.Y., Leung, K.M.Y., Tsang, V.W.H., Tang, C.F., Cheung, R.Y.H., and Lam, m.H.W. (2006). A study of the partitioning behavior of Irgarol-1051 and its transformation products. *Chemosphere* **64**, 1177-1184.

Lambropoulou, D.A., Konstantinou, I.K., and Albanis, T. (2000). Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **893**, 143-156.

- Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., and Albanis, T.A. (2004). Partitioning of antifouling agents, Irgarol 1051 and Sea Nine 211, to humic organic matter investigated by solid-phase microextraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **84**, 47-54.
- Lamoree, M.H., Swart, C.P., van der Horst, A., and van Hattum, B. (2002). Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters. *Journal of Chromatography A* **970**, 183-190.
- Lanças, F.M. (2004). Extração em fase sólida (SPE). São Paulo. 96 p.
- MacVeety, B.D. and Hites, R.A. (1988). Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to waters surfaces: a mass balance approach. *Atmospheric Environmental* **22**, 511-536.
- Manzo, S., Buono, S., and Cremisini, C. (2006). Toxic effects of irgarol and diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **51**, 61-68.
- Maraldo, K. and Dahllof, I. (2004). Indirect estimation of degradation time for zinc pyrithione and copper pyrithione in seawater. *Marine Pollution Bulletin* **48**, 894-901.
- Martinez, K., Ferrer, I., and Barceló, D. (2000). Part-per-trillion level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **879**, 27-37.
- Mochida, K. and Fujii, K. (2009a). Further Effects of Alternative Biocides on Aquatic Organisms. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 383-393.
- Mochida, K. and Fujii, K. (2009b). Toxicity for Aquatic Organisms. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 148-160.
- Mochida, K. and Fujii, K. (2009c). Toxicity in Plankton and Fish. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 364-382.
- Moriwaki, H., Yukihiro Yamaguchi, and Minoru Fukushima (2001). Direct detection of Ziram by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**, 2374-2376.
- Mukherjee, A., Mohan Rao, K.V., and Ramesh, U.S. (2009). Predicted concentrations of biocides from antifouling paints in Visakhapatnam Harbour. *Journal of Environmental Management* **90**, S51-S59.

- Okamura, H., Aoyama, I., Takami, T., Maruyama, T., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Katsuyama, I., Hamada, J., Beppu, T., Tanaka, O., Maguire, R.J., Liu, D., Lau, Y.L., and Pacepavicius, G.J. (2000). Phytotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 and a major degradation product. *Marine Pollution Bulletin* **40**, 754-763.
- Okamura, H., Kitano, S., Toyota, S., Harino, H., and Thomas, K.V. (2009). Ecotoxicity of the degradation products of triphenylborane pyridine (TPBP) antifouling agent. *Chemosphere* **74**, 1275-1278.
- Okamura, H. and Sugiyama, Y. (2004). Photosensitized degradation of Irgarol 1051 in water. *Chemosphere* **57**, 739-743.
- Okamura, H. and Mieno, H. (2006). Present Status of Antifouling Systems in Japan: Tributyltin Substitutes in Japan. In: I.K. Konstantinou (eds.), *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 201-212.
- Perina, F.C. (2009). Avaliação da toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes. Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil,
- Pinho, G.P. (2009). Efeito de componentes da matriz na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa. Universidade federal de Viçosa, 120 p.
- Pinho, G.P., Neves, A.A., Queiroz, M.E., and Silvério, F.O. (2009). Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova* **32**, 987-995.
- Readman, J. (2006). Development, Occurrence and Regulation of Antifouling Paint Biocides: Historical Review and Future Trends. In: I.K. Konstantinou (eds.), *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1-15.
- Renner (2011). Recomendações do fabricante para o uso de tintas anti-incrustantes.
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., and Melo, L.c.F.C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **27**, 771-780.
- Sabin, G.P. (2007). Desenvolvimento e Validação de Método utilizando SPE e GC-MS para a determinação multirresíduo de pesticidas em água potável. Universidade Federal de Santa Maria, 166 p.
- Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., and Albanis, T.A. (2006). Photochemical Fate of Organic Booster Biocides in the Aquatic Environment. In: I.K. Konstantinou (eds.), *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 171-200.
- Sakkas, V.A., Lambropoulou, D.A., and Albanis, T.A. (2002). Photochemical degradation study of irgarol 1051 in natural waters: influence of humic and fulvic substances on the reaction. *J.Photochem.Photobio.A.* **147**, 135-141.

- Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., and Albanis, T.A. (2001). Photodegradation study of the antifouling booster biocide dichlofluanid in aqueous media by gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* **930**, 135-144.
- Skoog, D.A. (2002). Princípios de Análise Instrumental. In: Bookman (eds.), Porto Alegre. p. -836.
- Takahashi, K. (2009). Release Rate of Biocides from Antifouling Paints. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 3-22.
- Thiruchelvam, M. (2005). Maneb. In: W. Philip (eds.), *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, New York. pp. 8-11.
- Thomas, K.V., McHugh, M., and Waldock, M. (2002). Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Science of the Total Environment* **293**, 117-127.
- Thomas, K.V. (1998). Determination of selected antifouling booster biocides by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **825**, 29-35.
- Thomas, K.V., Blake, S.J., and Waldock, M.J. (2000). Antifouling Paint Booster Biocide Contamination in UK Marine Sediments. *Marine Pollution Bulletin* **40**, 739-745.
- Thomas, K.V., Fileman, T.W., Readman, J.W., and Waldock, M.J. (2001). Antifouling Paint Booster Biocides in the UK Coastal Environment and Potential Risks of Biological Effects. *Marine Pollution Bulletin* **42**, 677-688.
- Thomas, K.V. and Langford, K.H. (2009a). Europe and USA. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 331-344.
- Thomas, K.V. and Langford, K.H. (2009b). The Analysis of Antifouling Paint Biocides in Water, Sediment and Biota. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 311-327.
- Thomas, L.D., Shah, H., Green, S.A., Bankhurst, A.D., and Whalen, M.M. (2004). Tributyltin exposure causes decreased granzyme B and perforin levels in human natural killer cells. *Toxicology* **200**, 221-233.
- Van Leeuwen, C.J., Espeldoorn, A., and Mol, F. (1986a). Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. III. Embryolarval studies with rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicology* **9**, 129-145.
- Van Leeuwen, C.J., Helder, T., and Seinen, W. (1986b). Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. IV. Teratogenicity and histopathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicology* **9**, 147-159.

- Van Leeuwen, C.J., Maas-Diepeveen, J.L., Niebeek, G., Vergouw, W.H.A., Griffioen, P.S., and Luijken, M.W. (1985a). Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. I. Short-term toxicity tests. *Aquatic Toxicology* **7**, 145-164.
- Van Leeuwen, C.J., Moberths, F., and Niebeek, G. (1985b). Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. II. Effects on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* **7**, 165-175.
- van Wezel, A.P. and van Vlaardingen, P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology* **66**, 427-444.
- Voulvoulis, N. (2006). Antifouling Paint Booster Biocides: Occurrence and Partitioning in Water and Sediments. In: I.K. Konstantinou (eds.), Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides. *Springer-Verlag*, Berlin. pp. 155-170.
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M.D., and Lester, J.N. (1999). Analytical methods for the determination of 9 antifouling paint booster biocides in estuarine water samples. *Chemosphere* **38**, 3503-3516.
- Vouvoulis, N., Scrimshaw, M.D., and Lester, J.N. (2000). Occurrence of Four Biocides Utilized in Antifouling Paints, as Alternatives to Organotin Compounds, in Waters and Sediments of a Commercial Estuary in the UK. *Marine Pollution Bulletin* **40**, 938-946.
- Walker, A. and Jurado-Exposito, M. (1998). Adsorption of isoproturon, diuron and metsulfuron-methyl in two soils at high soil : solution ratios. *Weed Research* **38**, 229-238.
- Walker, W.W., Cripe, C.R., Pritchard, P.H., and Bourquin, A.W. (1988). Biological and abiotic degradation of xenobiotic compounds in estuarine water and sediment/water systems. *Chemosphere* **17**, 2255-2270.
- Yebra, D.M., Kiil, S., and Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology: past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **50**, 75-104.
- Zhou, X., Okamura, H., and Nagata, S. (2007). Abiotic degradation of triphenylborane pyridine (TPBP) antifouling agent in water. *Chemosphere* **67**, 1904-1910.

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

9.1 *Artigo publicado em revista científica*

Ítalo B. Castro, Eliete Westphal & Gilberto Fillmann **Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático** *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 6, 1021-1031, 2011

9.2 *Resumos apresentados em congressos*

Eliete Westphal Alves; Patrícia Costa; Gilberto Fillmann; & Ítalo Braga Castro **Identificação de biocidas orgânicos presentes nas principais tintas anti-incrustantes de terceira geração utilizadas no pólo naval de Rio Grande/RS**. XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (ECOTOX) 2010. Bombinhas-SC

Eliete Westphal Alves; Gilberto Fillmann; & Ítalo Braga Castro **Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático**. XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (ECOTOX) 2010. Bombinhas-SC

Eliete Westphal Alves; Patrícia Costa; Gilberto Fillmann; & Ítalo Braga Castro **Avaliação da eficiência de derivatização do diuron utilizando CLAE-UV, para posterior determinação simultânea de biocidas em matrizes ambientais por CG-EM**. XVIII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-SUL), 2010. Curitiba-PR

10 ANEXOS

Anexo A - Otimização dos parâmetros cromatográficos

GC Control

Instrument Name	: inst1	Injection	: AUTO	Inlet A	: PSSI
Experiment Time	: 20.00 min	Injection Volume	: 50.0 µL	Inlet B	: NONE
Delay Time	: 0.00 min	Sampling Rate	: 12.50000 pts/s	Detector A	: NONE
Run Time	: 20.00 min	Channel	: A	Detector B	: NONE

Oven Temperature Program :

- Initial Temperature : 55 deg for 1.00 min
- Ramp 1 : 20.0 deg/min to 240 deg, hold for 4.00 min
- Ramp 2 : 10.0 deg/min to 280 deg, hold for 1.75 min

GC Control

Instrument Name	: inst1	Injection	: AUTO	Inlet A	: PSSI
Experiment Time	: 15.00 min	Injection Volume	: 10.0 µL	Inlet B	: NONE
Delay Time	: 0.00 min	Sampling Rate	: 12.50000 pts/s	Detector A	: NONE
Run Time	: 15.00 min	Channel	: A	Detector B	: NONE

Oven Temperature Program :

- Initial Temperature : 105 deg for 1.00 min
- Ramp 1 : 25.0 deg/min to 180 deg, hold for 0.00 min
- Ramp 2 : 5.0 deg/min to 230 deg, hold for 1.00 min

GC Control

Instrument Name	: inst1	Injection	: AUTO	Inlet A	: PSSI
Experiment Time	: 20.00 min	Injection Volume	: 3.0 µL	Inlet B	: NONE
Delay Time	: 0.00 min	Sampling Rate	: 12.50000 pts/s	Detector A	: NONE
Run Time	: 20.00 min	Channel	: A	Detector B	: NONE

Oven Temperature Program :

- Initial Temperature : 55 deg for 1.00 min
- Ramp 1 : 20.0 deg/min to 240 deg, hold for 4.00 min
- Ramp 2 : 10.0 deg/min to 280 deg, hold for 1.75 min

GC Control

Instrument Name	: inst1	Injection	: AUTO	Inlet A	: PSSI
Experiment Time	: 20.00 min	Injection Volume	: 50.0 µL	Inlet B	: NONE
Delay Time	: 0.00 min	Sampling Rate	: 12.50000 pts/s	Detector A	: NONE
Run Time	: 20.00 min	Channel	: A	Detector B	: NONE

Oven Temperature Program :

- Initial Temperature : 55 deg for 1.00 min
- Ramp 1 : 20.0 deg/min to 240 deg, hold for 4.00 min
- Ramp 2 : 10.0 deg/min to 280 deg, hold for 1.75 min

GC Control

Instrument Name	: inst1	Injection	: AUTO	Inlet A	: PSSI
Experiment Time	: 20.00 min	Injection Volume	: 2.0 µL	Inlet B	: NONE
Delay Time	: 0.00 min	Sampling Rate	: 12.50000 pts/s	Detector A	: NONE
Run Time	: 20.00 min	Channel	: A	Detector B	: NONE

Oven Temperature Program :

- Initial Temperature : 55 deg for 1.00 min
- Ramp 1 : 20.0 deg/min to 240 deg, hold for 4.00 min
- Ramp 2 : 10.0 deg/min to 280 deg, hold for 1.75 min

GC Control

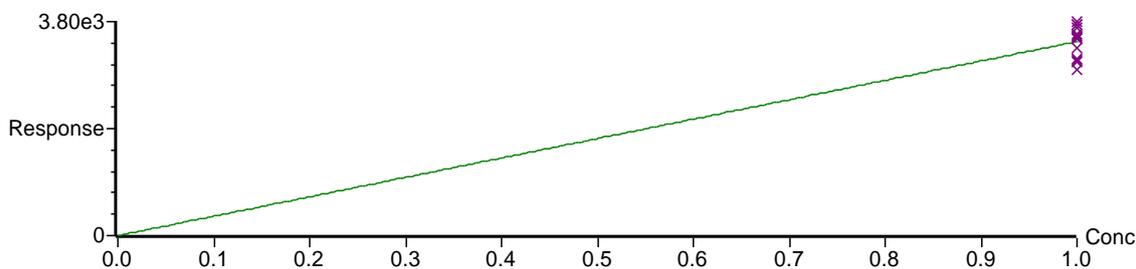
Instrument Name	: inst1	Injection	: AUTO	Inlet A	: PSSI
Experiment Time	: 20.00 min	Injection Volume	: 20.0 μ L	Inlet B	: NONE
Delay Time	: 0.00 min	Sampling Rate	: 12.50000 pts/s	Detector A	: NONE
Run Time	: 20.00 min	Channel	: A	Detector B	: NONE

Oven Temperature Program :

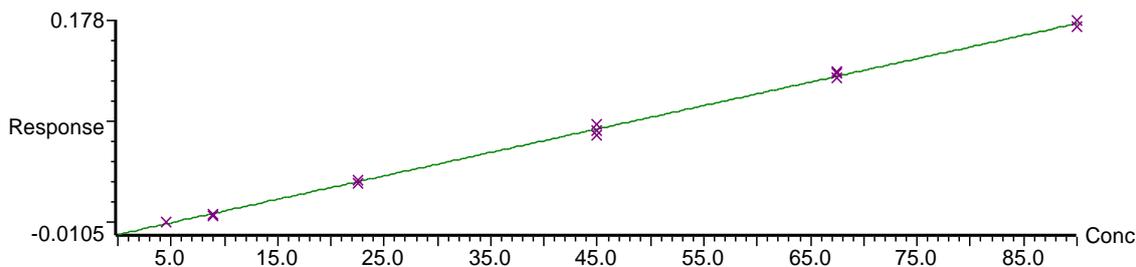
Initial Temperature : 55 deg for 1.00 min
Ramp 1 : 20.0 deg/min to 240 deg, hold for 4.00 min
Ramp 2 : 10.0 deg/min to 280 deg, hold for 1.75 min

Anexo B - Curvas analíticas dos compostos preparadas na matriz

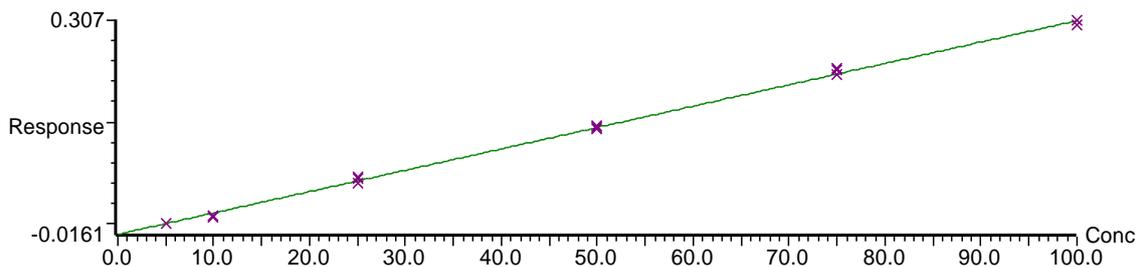
Compound 1 name: TCMX
Response Factor: 3449.42
Response type: External Std, Area
Curve type: RF



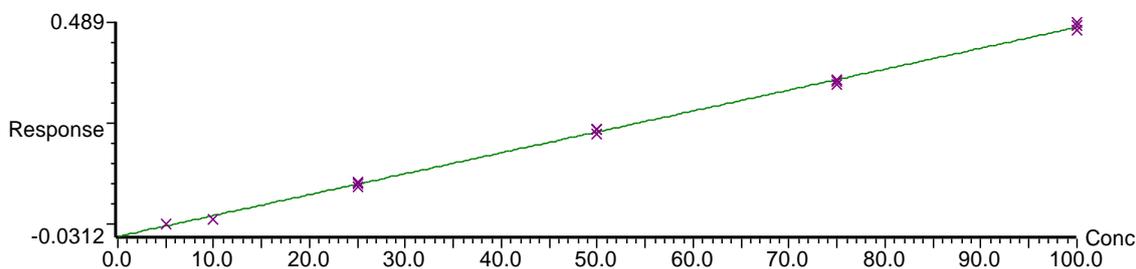
Compound 2 name: Atrazina d_5
Correlation coefficient: $r = 0.999202$, $r^2 = 0.998406$
Calibration curve: $0.00206231 * x + -0.0105486$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



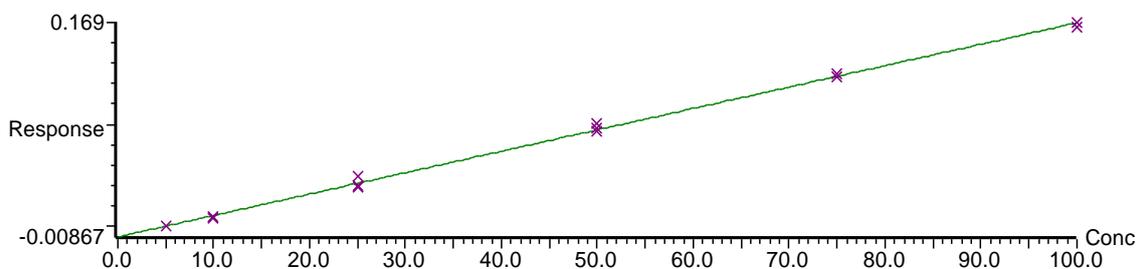
Compound 3 name: Clorotalonil
Correlation coefficient: $r = 0.999155$, $r^2 = 0.998310$
Calibration curve: $0.00322643 * x + -0.0161477$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



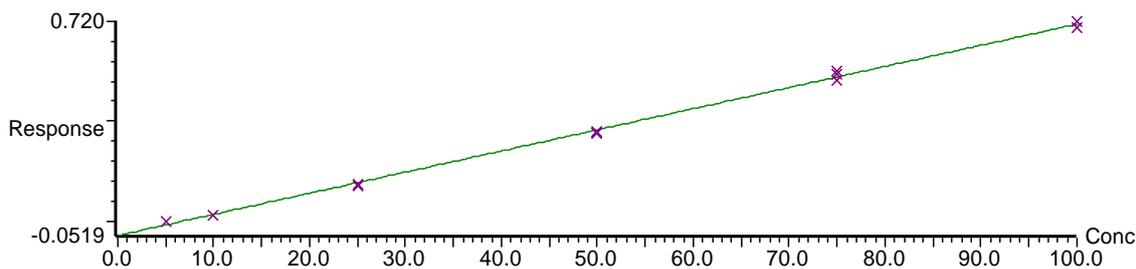
Compound 4 name: Diclorofluanida
Correlation coefficient: $r = 0.999250$, $r^2 = 0.998500$
Calibration curve: $0.00508833 * x + -0.0312314$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



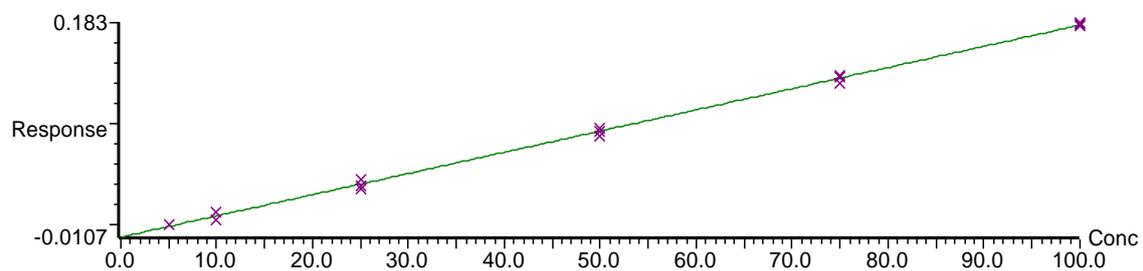
Compound 5 name: DCOIT
Correlation coefficient: $r = 0.999249$, $r^2 = 0.998498$
Calibration curve: $0.00177028 * x + -0.00867246$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound 6 name: Irgarol
Correlation coefficient: $r = 0.999071$, $r^2 = 0.998143$
Calibration curve: $0.00762260 * x + -0.0519457$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

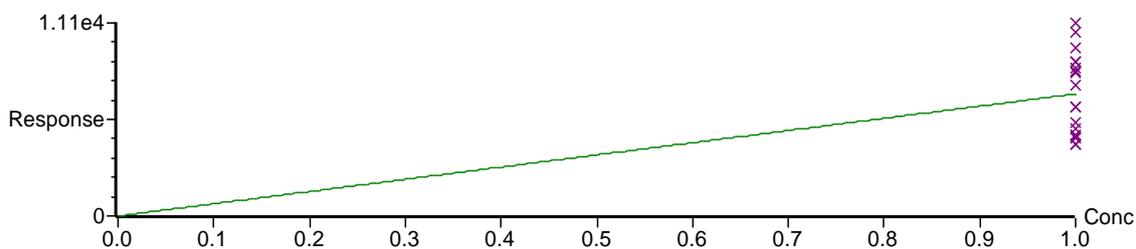


Compound 7 name: TCMTB
Correlation coefficient: $r = 0.999109$, $r^2 = 0.998219$
Calibration curve: $0.00191818 * x + -0.0106727$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

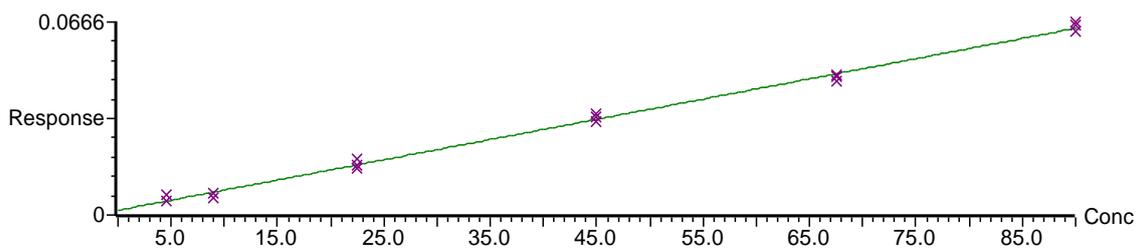


Anexo C - Curvas analíticas dos compostos preparadas no solvente

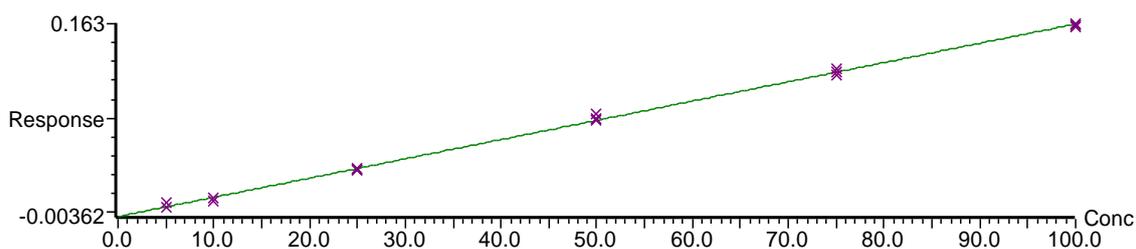
Compound 1 name: TCMX
 Response Factor: 6993.70
 Response type: External Std, Area
 Curve type: RF



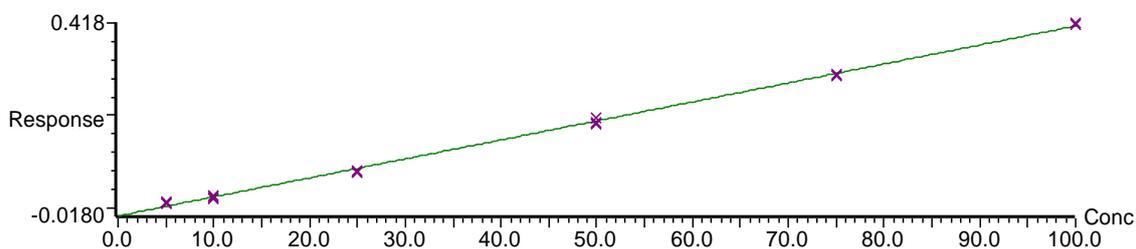
Compound 2 name: Atrazina d_5
 Correlation coefficient: $r = 0.998061$, $r^2 = 0.996126$
 Calibration curve: $0.000698354 * x + 0.00161917$
 Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



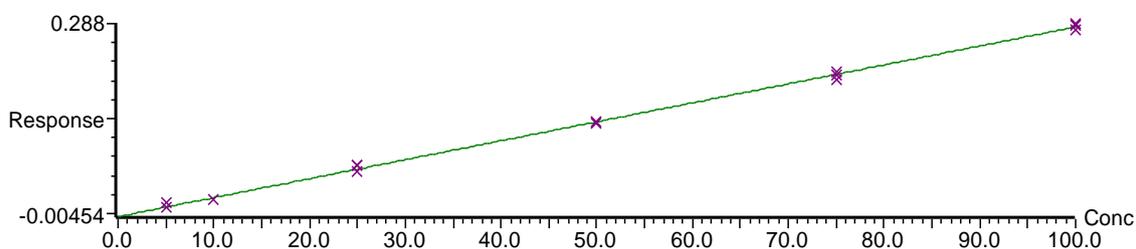
Compound 3 name: Clorotalonil
 Correlation coefficient: $r = 0.999148$, $r^2 = 0.998297$
 Calibration curve: $0.00166190 * x - 0.00361666$
 Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



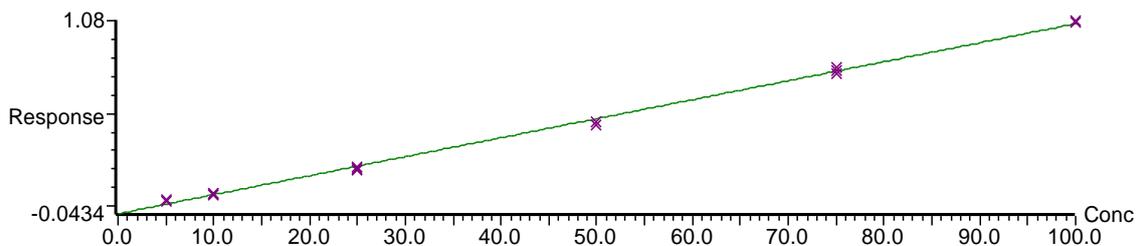
Compound 4 name: Diclorofluanida
Correlation coefficient: $r = 0.999134$, $r^2 = 0.998268$
Calibration curve: $0.00428938 * x + -0.0179823$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



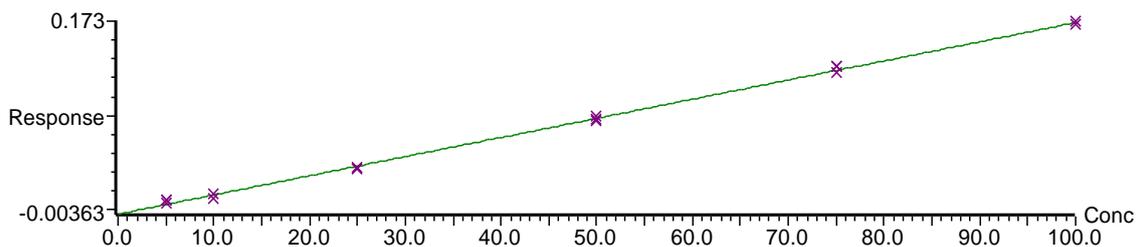
Compound 5 name: DCOIT
Correlation coefficient: $r = 0.999173$, $r^2 = 0.998347$
Calibration curve: $0.00287149 * x + -0.00453665$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



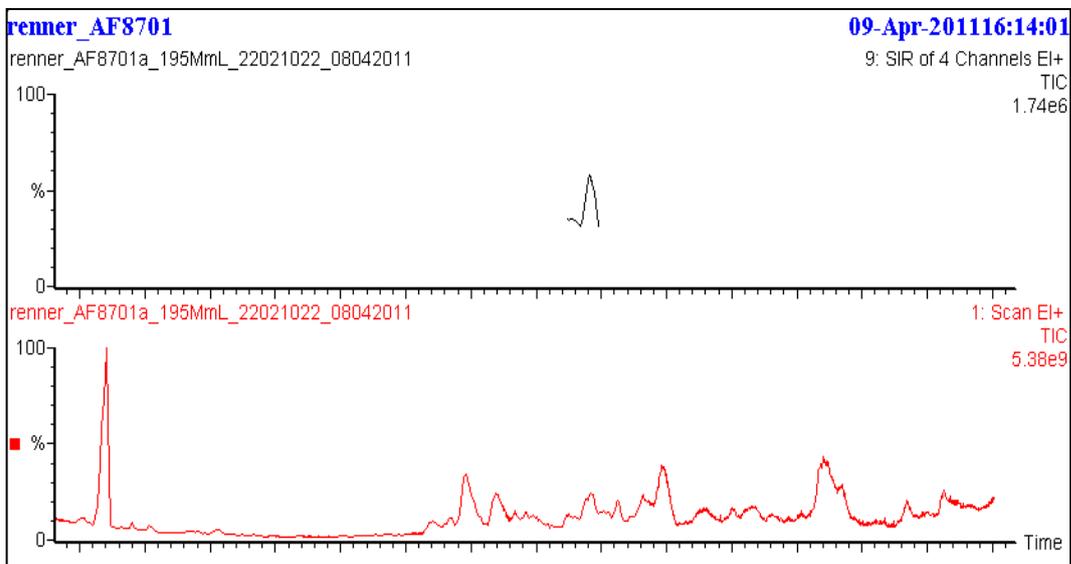
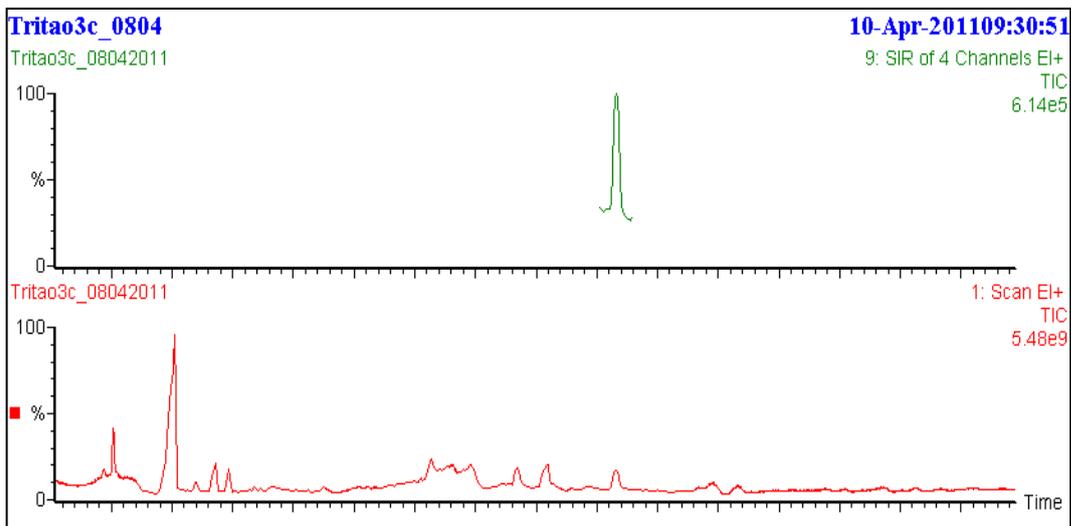
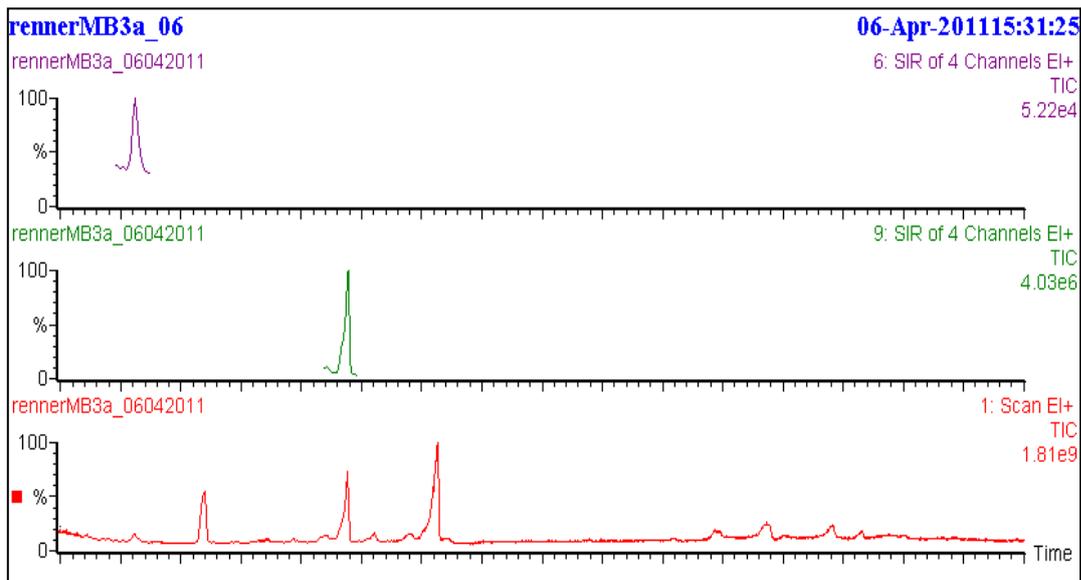
Compound 6 name: Irgarol
Correlation coefficient: $r = 0.999039$, $r^2 = 0.998079$
Calibration curve: $0.0110805 * x + -0.0434335$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

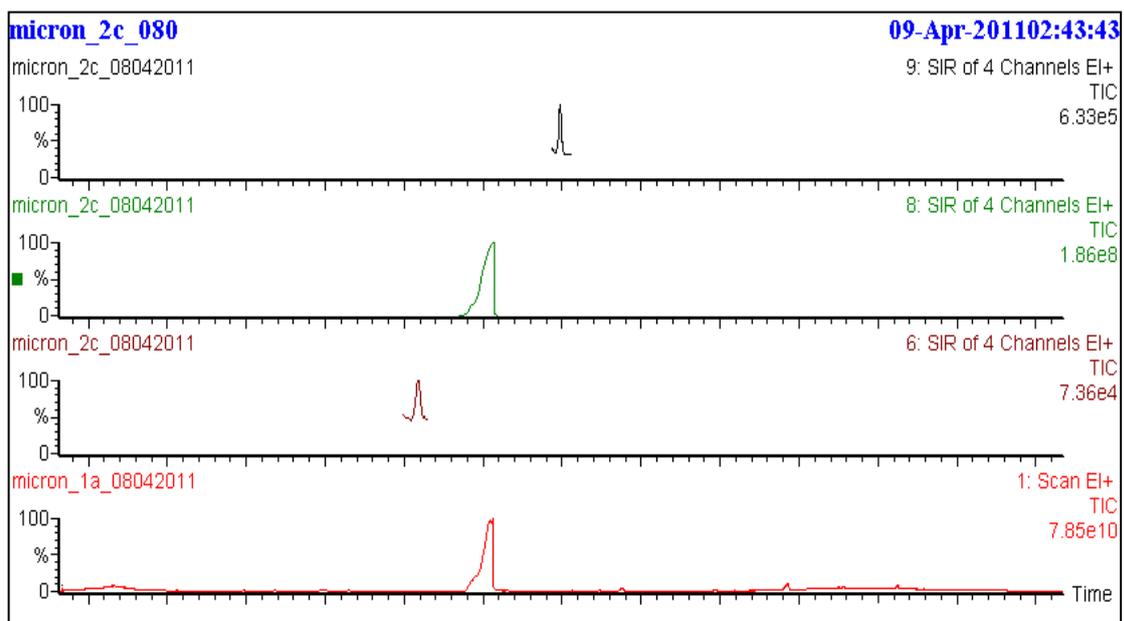


Compound 7 name: TCMTB
Correlation coefficient: $r = 0.999078$, $r^2 = 0.998157$
Calibration curve: $0.00174849 * x + -0.00362883$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



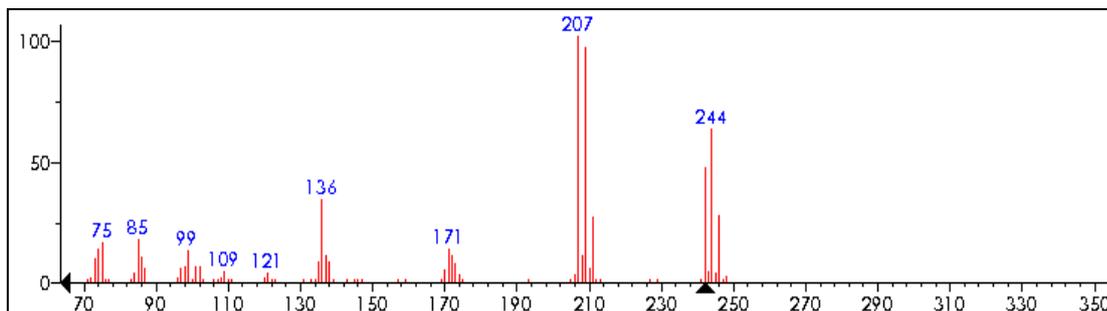
Anexo D - Cromatogramas das tintas analisadas



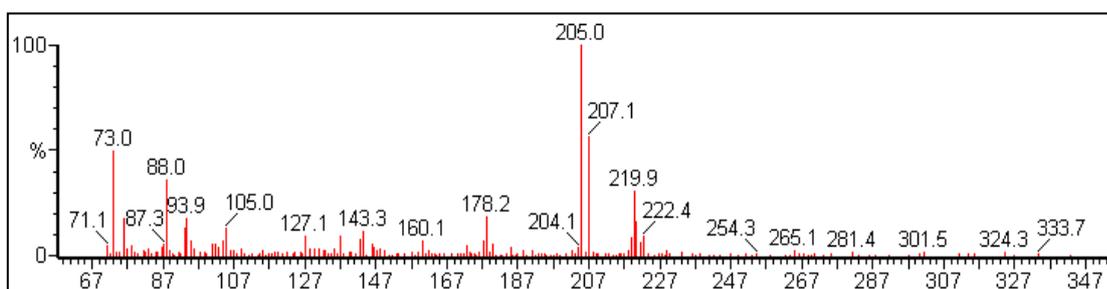


Anexo E - Espectros dos compostos

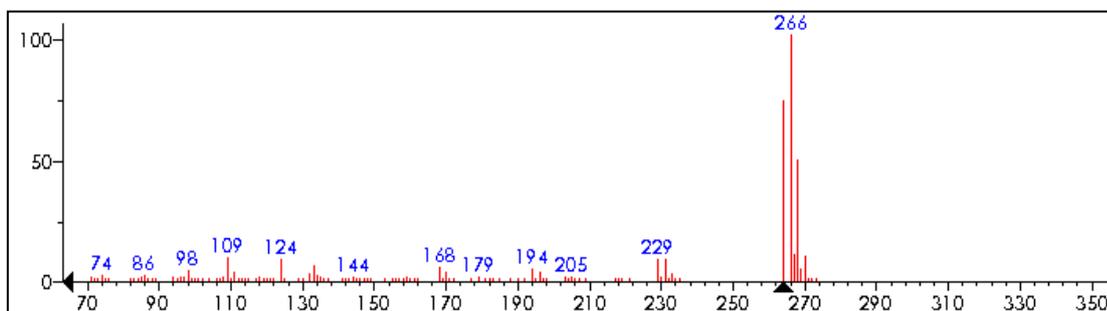
TCMX



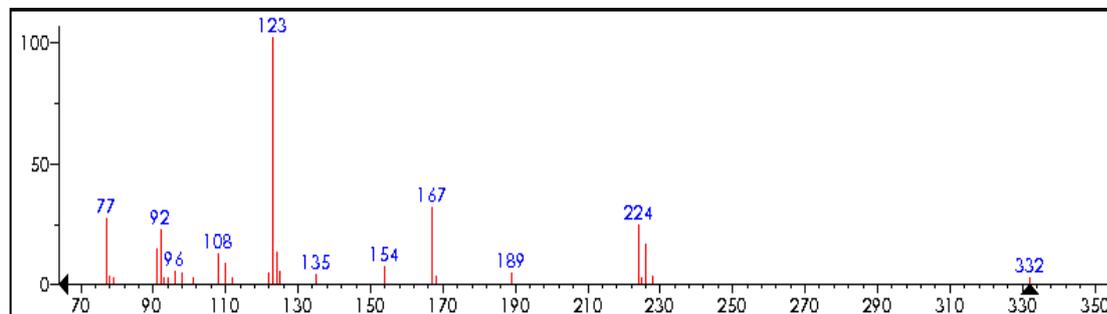
ATRAZINA



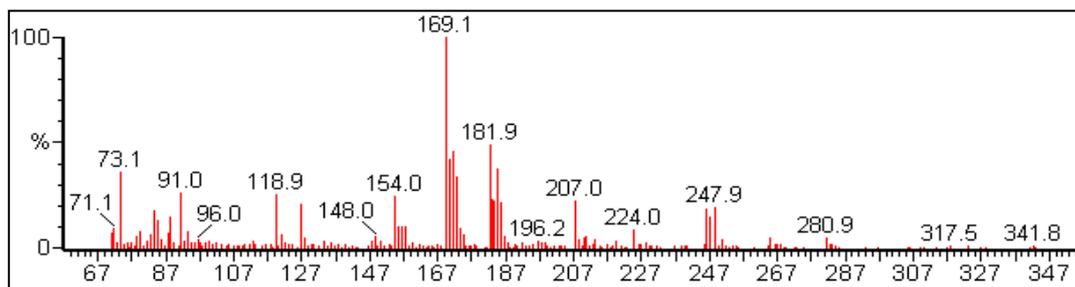
CLOROTALONIL



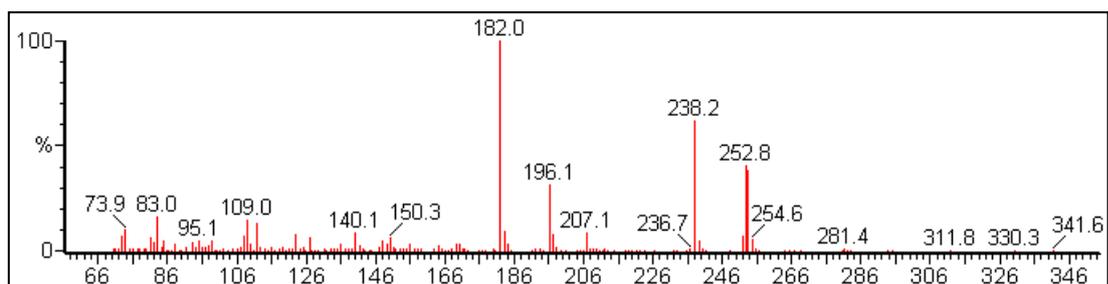
DICLOFLUANIDA



DCOIT



IRGAROL



TCMTB

