



FURG

Dissertação de Mestrado

**BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA
GERAÇÃO NAS ÁREAS COSTEIRAS DO PANAMÁ**

Jahir Antonio Batista Andrade

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2017

BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO NAS ÁREAS COSTEIRAS DO PANAMÁ

por

JAHIR ANTONIO BATISTA ANDRADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2017

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO NAS ÁREAS COSTEIRAS DO PANAMÁ

elaborada por

JAHIR ANTONIO BATISTA ANDRADE

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (Orientador) (Universidade Federal do Rio Grande – RS)

Prof. Dr. Gilberto Fillmann (Coorientador) (Universidade Federal do Rio Grande – RS)

Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi (Universidade Federal do Paraná – PR)

Prof. Dr. Ítalo Braga de Castro (Universidade Federal de São Paulo – SP)

Rio Grande, 31 de janeiro de 2017.

“Nunca consideres el estudio como una obligación sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

Dedico esta disertación a mis padres Antonina y Eliécer. Sin ustedes nada de esto sería posible. Los amo mucho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela proteção e por me conceder mais esta vitória.

Ao Programa de Alianças para a Educação e Capacitação (PAEC), Organização dos Estados Americanos (OEA) e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), pela oportunidade de estudo no Brasil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Durante o período do mestrado, desfrutei do inestimável apoio de um grande número de pessoas, tanto no Brasil como no Panamá.

Aos meus pais, **Antonina** e **Eliécer**, pela educação, pelo carinho, atenção e comprometimento a mim dedicados e por apoiarem minhas decisões incondicionalmente. Mesmo estando a milhares de quilômetros, sem o apoio de vocês eu nunca teria concluído esse sonho de ser Mestre. A meus irmãos **Eliécer** e **Oto**, a minha cunhada **Esther**, e minhas sobrinhas **Nely** e **Sofía**, obrigado pelo carinho e incentivo. A toda minha família *muchas gracias*. Eu amo todos vocês.

Aos professores **Dr. Carlos Francisco Ferreira de Andrade**, **Dra. Larine Kupski** e **Dra. Sergiane Souza Caldas** pela participação e sugestões no exame de qualificação.

Aos professores **Dr. Marco Tadeu Grassi** e **Dr. Ítalo Braga Castro** pela disposição em participar na defesa da dissertação e pelas valiosas sugestões na finalização deste estudo.

À meu orientador **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**, agradeço você por me aceitar como seu orientado mesmo sem me conhecer. Obrigado pela confiança deste projeto e por me levar pelo caminho da Química Analítica. Seu apoio e incentivo desde minha chegada, durante o desenvolvimento do trabalho, e na viagem de coleta das amostras do Panamá, pode ter certeza que nunca esquecerei. Fico muito orgulhoso de ser seu estudante. Obrigado pela ótima orientação.

À meu coorientador **Prof. Dr. Gilberto Fillmann**, você é merecedor de admiração por sua dedicação com seus estudantes, disposição e empenho ao ajudar em todo, sem dúvida um exemplo a ser seguido. Obrigado pelo ensino na aula e na saída de campo. Você ampliou meu horizonte de conhecimento através da Química Ambiental. Obrigado pela ótima orientação.

À **Dra. Sergiane Souza Caldas**, considerada como minha segunda coorientadora e grande amiga, pelo apoio incondicional durante todo o período do mestrado. Sem dúvida você foi uma chave fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Fico muito feliz de ter trabalhado com você, além do conhecimento acadêmico, nesses dois anos você me mostrou alguns valores que nunca esquecerei. Obrigado pela amizade, confiança e dedicação em mim depositadas.

À **Prof. Dr. Ítalo Braga Castro**, considerado meu terceiro coorientador e grande parceiro, pelo apoio incondicional que deu para mim durante estes dois anos, sem dúvida você é merecedor de admiração. Exemplo de entusiasmo, constância e dedicação. Com você aprendi que como é bom quando as pessoas fazem o que gostam. Obrigado por tudo.

Ao **Yeik Manuel** pela companhia e parceria nos últimos seis anos. Apesar da distância, sua força e apoio me motivaram sempre a seguir adiante.

Aos meus amigos **José Alberto e Luis Javier**, obrigado pelo apoio incondicional que vocês forneceram para mim. Nunca esquecerei aquelas palavras de motivação e superação. **Adhara, Nadine, Zully, Salvador, Alexis, Emanuel, Nilsa, Julissa e Daysi**, obrigado por fazerem parte da minha vida desde o ensino médio até o presente momento.

Às minhas colegas, amigas e irmãs de apartamento **Ana e Diana**, obrigado pela convivência nestes dois anos e fazer meus dias mais agradáveis. Sempre estarão no meu coração.

Aos meus colegas latino-americanos que chegaram comigo ao Brasil para conquistar o sonho de superação acadêmica **Paola, César, María, Eliana, Diana, Ana, Robert, Álvaro, Karen e Verónica**, obrigado pelos momentos compartilhados.

Aos colegas e amigos do LACOM por fazerem meus dias mais divertidos e que minha experiência no Brasil seja inesquecível. Agradeço pelos dias maravilhosos de MSPD, de churrascos e de vôlei. **Sergi, Ana Laura, Lizi, Maristela, Karina, Gabriela, Jean, Antunielle, Bruno, Augusto, Joana, Marcos, Elisane, Larine, Lucas, Júlia, Laísa, Larissa, Állison, Sônia, Ana Victoria, Ronan e Andressa**. Vocês tornaram-se minha família brasileira.

À minha **Karinin**, uma pessoa maravilhosa e única. Agradeço por tantos momentos compartilhados, você tornou-se aquela amiga de confiança que sempre me escutou e aconselhou. Muito obrigado por tudo. Tenha certeza que levarei você no meu coração e nossa amizade atravessará fronteiras. Eu amo você.

Ao **Jean Lucas** e a **Antunielle** por me receber em Rio Grande e saber que contei com vocês sempre que precisei. Obrigado pelos maravilhosos dias de passeios, de jantares e de parceria. Vocês são demais.

À **Larine**, exemplo de constância e superação. Muito obrigado pelas incontáveis vezes que precisei de sua ajuda, e principalmente pelas inúmeras risadas que compartilhamos.

Ao **Augusto**, meu colega de mestrado, meu time biocidas, pela sua ajuda e amizade incondicional.

Aos colegas do CONECO por ajudarem em parte deste trabalho e sempre me receber com os braços abertos, especialmente a **Rodrigo, Fiamma, Vanda, Sanye e César**.

À **Diana Pérez e Marcos Mendizabal** da *Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá* pelo apoio fornecido durante as coletas das amostras no Panamá. Ao **Luis Chong** do laboratório OTILATAM de Panamá pelos frascos âmbar para coleta das amostras de água.

À **Rosane**, secretária do PPGQTA por todos os esclarecimentos e atenção dispensada quando necessário.

Aos **professores do Programa de Pós-graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Geral	4
2.2. Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Biocidas em tintas anti-incrustantes	5
3.1.1. Tintas anti-incrustantes de segunda geração	6
3.1.2. Tintas anti-incrustantes de terceira geração	7
3.1.3. Partículas de tintas anti-incrustantes	11
3.2. Padrões de qualidade ambiental	12
3.3. Ocorrência ambiental de biocidas anti-incrustantes	14
3.4. Preparo de amostras para matrizes ambientais	16
3.4.1. Água	16
3.4.1.1. Extração em fase sólida (SPE)	16
3.4.2. Sedimentos	17
3.4.2.1. Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)	18
3.5. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Materiais utilizados	23
4.1.1. Instrumentação	23
4.1.2. Reagentes, solventes, sorventes e materiais	24
4.2. Preparo das soluções analíticas	25
4.3. Condições do sistema cromatográfico LC-MS/MS	25
4.4. Padronização da técnica SPE	27

4.4.1.	Escolha do sorvente na SPE	27
4.4.2.	Efeito do pH	27
4.4.3.	Efeito da salinidade	28
4.5.	Padronização da VA-MSPD	28
4.5.1.	Avaliação do etanol como solvente extrator	29
4.5.2.	Escolha de volume de etanol	29
4.5.3.	Avaliação do C18 reutilizado como suporte sólido	29
4.6.	Validação de métodos cromatográficos	30
4.6.1.	Limite de detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)	30
4.6.2.	Curva analítica e linearidade	31
4.6.3.	Exatidão	31
4.6.4.	Precisão	32
4.6.5.	Efeito matriz	33
4.7.	Área de estudo	33
4.8.	Coleta das amostras	34
4.9.	Caracterização físico-química das águas	38
4.10.	Caracterização dos sedimentos	38
4.10.1.	Análise granulométrica	38
4.10.2.	Análise de Carbono Orgânico Total	39
4.10.3.	Efeito matriz nas amostras de sedimentos do Panamá	39
4.10.4.	Análise de partículas de tintas anti-incrustantes	40
4.11.	Uso do padrão de recuperação	40
4.12.	Análise das amostras do Panamá e controle de qualidade	41
4.13.	Análise estatística	41
4.14.	Tratamento de resíduos	41
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	42
5.1.	Preparo de amostra por SPE	42
5.1.1.	Escolha do sorvente	42
5.1.2.	Efeito do pH na extração dos biocidas	45
5.1.3.	Efeito da salinidade	47
5.1.4.	Procedimento SPE padronizado	48
5.2.	Preparo de amostra por VA-MSPD	49

5.2.1.	Etanol como solvente extrator	49
5.2.2.	Volume de etanol como solvente extrator	50
5.2.3.	Avaliação do C18 reutilizado como suporte sólido	51
5.2.4.	Procedimento VA-MSPD padronizado	52
5.3.	Validação dos métodos	52
5.3.1.	Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)	52
5.3.2.	Curva analítica e linearidade	53
5.3.3.	Exatidão	54
5.3.4.	Precisão	55
5.3.5.	Efeito Matriz	56
5.4.	Amostras de água	58
5.4.1.	Salinidade e pH	58
5.4.2.	Biocidas anti-incrustantes na fração dissolvida na água do mar	59
5.5.	Sedimentos superficiais	63
5.5.1.	Teor de finos e carbono orgânico total	63
5.5.2.	Efeito matriz nas amostras de sedimento	65
5.5.3.	Biocidas anti-incrustantes no sedimento	67
5.5.3.1.	Irgarol 1051	68
5.5.3.2.	Diuron	70
5.5.3.3.	DCOIT e partículas de tintas anti-incrustantes	72
6.	CONCLUSÕES	77
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	78
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
9.	PRODUÇÃO CIENTIFICA REFERENTE AO TRABALHO	92
10.	APÊNDICE	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT)	6
Figura 2. Estrutura química de cinco biocidas anti-incrustantes de terceira geração estudados neste trabalho.	8
Figura 3. Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição dos analitos.	17
Figura 4. Etapas envolvidas na VA-MSPD	19
Figura 5. Esquema de um analisador do tipo Triplo Quadrupolo	22
Figura 6. Pontos de coleta ao longo do litoral panamenho.	35
Figura 7. (A) Entrada do Canal do Panamá no Oceano Pacífico; (B) Marina Shelter no Mar do Caribe; (C) Mercado de Mariscos no Oceano Pacífico.	36
Figura 8. Efeito de diferentes sorventes na eficiência de extração dos biocidas (n=3). Condições do teste: 250 mL de água destilada (pH 5,5 e salinidade 0) fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada biocida, e 2 mL de metanol como solvente de eluição. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada analito.	42
Figura 9. Estruturas químicas dos sorventes utilizados no desenvolvimento da SPE. a) Strata C18-E, b) Oasis® HLB, e c) Strata X.	43
Figura 10. Efeito do pH na eficiência de extração dos biocidas (n=3). Condições: 250 mL de água destilada (salinidade 0) com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada biocida, sorvente Strata C18-E e 2 mL de metanol como solvente de eluição. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada analito.	45
Figura 11. Espécies neutra (Ir), ácida (Ir+) e básica (Ir-) do irgarol 1051.	46
Figura 12. Distribuição das espécies predominantes do Irgarol 1051 em função do pH.	47
Figura 13. Efeito da salinidade na eficiência de extração dos biocidas (n=3). Condições: 250 mL de amostra de água sintética com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada biocida, sorvente Strata C18-E e 2 mL de metanol como solvente de eluição. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada analito.	48
Figura 14. Efeito do tipo de solvente na eficiência de extração (n=3). Condições: 2 g de sedimento fortificado com 25 ng g^{-1} de cada biocida foi macerado com 0,25 g de C18,	

seguido da extração com 10 mL de solvente (metanol ou etanol) em tubo de fundo cônico por vórtex durante 1 min e centrifugado por 5 min a 7000 rpm. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada analito. 49

Figura 15. Efeito do volume de etanol (EtOH) na eficiência de extração ($n=3$). Condições: 2 g de sedimento fortificado com 25 ng g^{-1} de cada biocida foi macerado com 0,25 g de C18, extraído com etanol (5 ou 10 mL) em tubo de fundo cônico por vórtex durante 1 min e centrifugado por 5 min a 7000 rpm. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada analito. 50

Figura 16. Efeito do tipo de suporte sólido na eficiência de extração ($n=3$). Condições do teste: 2,0 g de sedimento fortificado com 25 ng g^{-1} de cada biocida foi macerado com 0,25 g de C18 (comercial e reutilizado), seguido da extração com 5 mL de etanol em tubo de fundo cônico por vórtex durante 1 min e centrifugado por 5 min a 7000 rpm. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada analito. 51

Figura 17. Efeito matriz (%) nas amostras de água do mar dos biocidas anti-incrustantes em estudo utilizando o método SPE e LC-MS/MS. 57

Figura 18. Efeito matriz (%) nas amostras de sedimentos superficiais dos biocidas anti-incrustantes em estudo utilizando o método VA-MSPD e LC-MS/MS. 57

Figura 19. Efeito matriz (%) das amostras de sedimento fortificadas com os biocidas em um nível intermediário ($5 \times \text{LOQ}$). 66

Figura 20. Imagem de partículas de tintas anti-incrustantes, obtida por microscopia óptica, encontradas na amostra de sedimento PA2. Aumento de 5x. 72

Figura 21. Imagem por MEV (a) e espectros EDS (b/c) de uma micropartícula de tinta anti-incrustante coletada no Porto de Colón (PA2), mostrando duas camadas na micropartícula. Aumento de 30x. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos biocidas anti-incrustantes de terceira geração.	9
Tabela 2. Concentração Máxima Permissível (MPC) proposta pelas autoridades holandesas para o irgarol 1051, diuron e TCMTB.	13
Tabela 3. Sistema de classificação norueguês para o irgarol 1051 e diuron em água do mar e sedimentos.	13
Tabela 4. Níveis de biocidas anti-incrustantes de terceira geração detectados em água e sedimento de várias regiões do mundo.	15
Tabela 5. Gradiente utilizado para a separação por LC-MS/MS	26
Tabela 6. Condições de fragmentação dos biocidas no espectrômetro de massas e o tempo de retenção (t_R). Modo de ionização positiva (ESI+). Tempo de permanência (dwell time) para cada transição monitorada: 0,2 s.	26
Tabela 7. Descrição dos locais de amostragem, amostra coletada (A: água do mar, S: sedimentos) e localização geográfica.	37
Tabela 8. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumental dos métodos e legislações europeias (ERL/MPC) dos biocidas em estudo.	53
Tabela 9. Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas no solvente e no extrato para o método SPE LC-MS/MS.	54
Tabela 10. Equações das retas e coeficiente de correlação das curvas analíticas no solvente e no extrato para o método VA-MSPD LC-MS/MS.	54
Tabela 11. Recuperação (R%) e desvio padrão relativo (RSD) de cada analito para SPE e VA-MSPD nos três níveis de fortificação.	55
Tabela 12. Nível de fortificação, recuperação (R) e precisão intermediária (RSD _{pi}) para os analitos.	56
Tabela 13. Salinidade e pH das amostras de água do mar	58
Tabela 14. Níveis de biocidas anti-incrustantes detectados nas amostras de água do mar das áreas costeiras do Panamá e percentual de recuperação do diuron-d ₆	59
Tabela 15. Percentual de carbono orgânico total (COT) e de finos das amostras de sedimentos coletadas no Panamá e da amostra utilizada como referência nos testes de padronização e validação.	64

Tabela 16. Níveis de biocidas anti-incrustantes detectados nas amostras de sedimentos e percentuais de recuperação do diuron-d ₆	68
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. %F: porcentagem de finos
2. ANOVA: análise de variância
3. APCI: Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)
4. APPI: Fotoionização à Pressão Atmosférica (do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*)
5. ARAP: Autoridade dos Recursos Aquáticos do Panamá
6. CEME-SUL: Centro de Microscopia Eletrônica do Sul
7. CONECO: Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática
8. COT: carbono orgânico total
9. DCOIT: 4,5-dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona
10. DMSA: N,N-dimetilaminosulfanilida
11. EDS: Espectro de Energia dispersiva de raios x
12. EM: efeito matriz
13. EQS: Normas de Qualidade Ambiental (do inglês *Environmental Quality Standard*)
14. ERL: Limite de risco ambiental (do inglês *Environmental Risk Limit*)
15. ESI: Eletronebulização (do inglês *Electrospray Ionization*)
16. FURG: Universidade Federal do Rio Grande
17. GC-ECD: Cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detector*)
18. HLPC: Cromatografia Líquida de Alto desempenho (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)
19. IEC: Comissão Internacional Eletrotécnica (do inglês *International Electrotechnical Commission*)
20. IMO: Organização Marítima Internacional (do inglês *International Maritime Organization*)
21. ISO: Organização Internacional de Normalização (do inglês *International Organization for Standardization*)
22. Log Koc: coeficiente de partição octanol-carbono

23. Log Kow: coeficiente de partição octanol-água
24. LACOM: Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais
25. LC-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (do inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*)
26. LLE: Extração Líquido-Líquido (do inglês *liquid-liquid extraction*)
27. LOD: Limite de detecção (do inglês *Limit of detection*)
28. LOQ: Limite de quantificação (do inglês *Limit of quantification*)
29. M₁: 2-metiltio-4-terc-butilamino-6-amino-s-triazina
30. M₂: 2-amino-propanal-4-terc-butilamino-6-metiltio-s-triazina
31. M₃: 2,4(diamino-di-terc-butil)-6-metiltio-s-triazina
32. MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
33. MPC: Concentração Máxima Permissível (do inglês *Maximum Permissible Concentration*)
34. MRM: Monitoramento de Reações Múltiplas (do inglês *Multiple Reactions Monitoring*)
35. MS: Espectrometria de massas (do inglês *Mass Spectrometry*)
36. MSPD: Dispersão da Matriz em Fase Sólida (do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*)
37. r: coeficiente de correlação
38. R: recuperação
39. RSD: Desvio Padrão Relativo (do inglês *Relative Standard Deviation*)
40. RSD_{pi}: precisão intermediária
41. SPE: Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)
42. TBT: tributilestanho (do inglês *tributyltin*)
43. TIC: Cromatograma de íons totais (do inglês *Total Ion Chromatograph*)
44. TCMTB: 2-(tiocianometiltio) benzotiazol
45. TPT: trifenilestanho (do inglês *triphenyltin*)
46. t_R : tempo de retenção
47. TSD: teste de Tukey (do inglês *Tukey Significant Difference*)
48. VA-MSPD: Dispersão da Matriz em Fase Sólida assistida por vórtex (do inglês *Vortex-Assisted Matrix Solid-Phase Dispersion*)

RESUMO

Título: BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO NAS ÁREAS COSTEIRAS DO PANAMÁ

Autor: JAHIR ANTONIO BATISTA ANDRADE

Orientador: Prof. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL

Coorientador: Prof. Dr. GILBERTO FILLMANN

O presente estudo investigou a presença de cinco biocidas anti-incrustantes de terceira geração (irgarol 1051, diuron, 4,5-dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona (DCOIT), 2-(tiocianometiltio) benzotiazol (TCMTB), e diclofluanida) em amostras de água do mar (fração total dissolvida) e sedimentos marinhos coletados nas áreas costeiras do Panamá influenciadas por atividades marítimas, incluindo o Canal do Panamá. Para as amostras de água foi empregada a técnica de extração em fase sólida (SPE) e para os sedimentos foi utilizada a técnica da dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD). As análises foram realizadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Ambos os métodos foram previamente padronizados e validados para posterior aplicabilidade. TCMTB, diclofluanida e DCOIT não foram detectados em nenhuma amostra da fração dissolvida da água do mar, porém, irgarol 1051 e diuron foram detectados nas faixas de $<0,3$ a $5,0 \text{ ng L}^{-1}$ e de $<2,7$ a $70,0 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente. No sedimento, TCMTB e diclofluanida não foram detectados em nenhuma amostra, mas concentrações nas faixas de $<0,25$ a $2,83 \text{ ng g}^{-1}$ para o irgarol 1051; $2,42$ a $14,06 \text{ ng g}^{-1}$ para o diuron; e $2,42$ a $81,60 \text{ ng g}^{-1}$ para o DCOIT foram detectadas. Os níveis de DCOIT foram associados à presença de partículas de tintas anti-incrustantes em duas amostras de sedimentos. Embora focos de contaminação tenham sido identificados em áreas influenciadas por marinas, portos e na entrada do Canal do Panamá, os níveis de irgarol 1051 e diuron em amostras de água do mar foram menores que os limites estabelecidos pelo Padrão de Qualidade Ambiental (EQS) do Reino Unido. Em contraste, níveis de irgarol 1051 e diuron em duas amostras de sedimentos foram maiores do que o EQS proposto pelas autoridades holandesas e norueguesas, sugerindo que efeitos tóxicos podem estar ocorrendo em comunidades de corais e organismos bentônicos. O presente estudo representa apenas uma avaliação preliminar do estado de contaminação por biocidas anti-incrustantes, sendo necessária uma avaliação mais abrangente para estimar os riscos associados à exposição em longo prazo destes contaminantes nos ecossistemas costeiros do Panamá.

ABSTRACT

Title: ANTIFOULING BOOSTER BIOCIDES IN COASTAL AREAS OF PANAMA

Author: JAHIR ANTONIO BATISTA ANDRADE

Advisor: Prof. EDNEI GILBERTO PRIMEL Ph.D

Co-Advisor: Prof. GILBERTO FILLMANN Ph.D

The present study investigated the presence of five booster biocides (irgarol 1051, diuron, (2-thiocyanomethylthio)benzothiazole (TCMTB), 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) and dichlofluanid) in seawater (dissolved fraction) and surface sediments samples from coastal areas of Panama influenced by marine activities, including the Panama Canal. Solid Phase Extraction (SPE) was used for seawater samples and Vortex-Assisted Matrix-Solid Phase Dispersion (VA-MSPD) was used for surface sediments samples. Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) was applied for the quantification of target analytes. Both methods were previously standardized and validated for later applicability. TCMTB, DCOIT and dichlofluanid were not detected in any seawater sample (dissolved fraction), while irgarol 1051 and diuron were found in four out of thirteen areas (<0.3 to 5.0 ng L^{-1} and <2.7 to 70 ng L^{-1} , respectively). In sediments, TCMTB and dichlofluanid were not detected in any sample, however, irgarol 1051 levels ranged from <0.25 to 2.83 ng g^{-1} , diuron from 2.42 to 14.06 ng g^{-1} and DCOIT from 2.42 to 81.60 ng g^{-1} . The levels of DCOIT were associated with the presence of antifouling paint particles in the two sediments samples. Although the hotspots were identified in areas influenced by marinas, ports and entrance of Panama Canal, diuron and irgarol 1051 levels in seawater samples were all lower than the threshold levels set by the Environmental Quality Standard (EQS) of United Kingdom. In contrast, diuron and irgarol 1051 levels in two sediment samples were greater than EQS proposed by Dutch and Norway authorities suggesting that toxic effects may be occurring in marine organisms, especially in coral reef communities and benthic organisms. However, this is only a snapshot of the status of coastal areas contamination by antifouling booster biocides and a more comprehensive assessment is needed to assess risks associated to long term exposure.

1. INTRODUÇÃO

Entende-se por incrustação marinha a comunidade de micro-organismos, algas e/ou animais que se instalam e crescem nas superfícies externas de objetos naturais ou artificiais submersos ou semi-submersos em ambientes aquáticos. Este processo biológico está presente em todos os ambientes marinhos e é um grave problema para a indústria naval (DAFFORN *et al.*, 2011).

Para combater esse problema foram desenvolvidas tintas anti-incrustantes, as quais têm em sua composição compostos químicos denominados biocidas. Considerando o tipo de biocida empregado na formulação das tintas anti-incrustantes, bem como o período histórico em que foram utilizadas, as mesmas podem ser classificadas em três gerações (CASTRO *et al.*, 2011). Em meados do século XX, os óxidos de cobre e de zinco foram os primeiros compostos utilizados regularmente em tintas anti-incrustantes sendo então denominados biocidas de primeira geração. Porém, estas tintas apresentavam pouca durabilidade (um ano) perdendo eficiência contra a incrustação (DAFFORN *et al.*, 2011).

Nos anos sessenta, a indústria naval desenvolveu tintas anti-incrustantes à base de compostos organoestânicos como princípio ativo, entre eles o tributilestanho (TBT, do inglês *tributyltin*) e o trifenilestanho (TPT, do inglês *triphenyltin*), as quais são conhecidas como tintas anti-incrustantes de segunda geração (YEBRA *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2011). Estas tintas apresentavam grande eficiência, durabilidade, e no auge da sua utilização chegaram a recobrir 90% da frota mundial. No entanto, diversos estudos revelaram que os compostos organoestânicos causam uma ampla gama de efeitos tóxicos em organismos não alvo (desde bactérias até mamíferos) (ALZIEU, 2000; BANGKEDPHOL *et al.*, 2009; SWENNEN *et al.*, 2009) e, por isso, a utilização de compostos organoestânicos em tintas anti-incrustantes foi banida pela Organização Marítima Internacional (IMO, do inglês *International Maritime Organization*). O processo de banimento teve início em 2003 e foi estabelecido o prazo limite até setembro de 2008 para remoção desses revestimentos de estruturas em operação (IMO, 2008).

Devido ao banimento dos compostos organoestânicos pela IMO, a indústria naval começou a utilizar novamente metais como princípio ativo em formulações de

tintas (CASTRO *et al.*, 2011). Porém, metais (tais como cobre e zinco) não são suficientemente eficientes para prevenir todas as formas de incrustação biológica, e requerem biocidas de reforço (*booster biocides*) para uma efetiva proteção dos cascos das embarcações (MUKHERJEE *et al.*, 2009). Assim, tintas anti-incrustantes de terceira geração contêm biocidas de reforço, empregando até quatro diferentes compostos orgânicos ou/e organometálicos (THOMAS e BROOKS, 2010; CASTRO *et al.*, 2011). Entre os biocidas de reforço atualmente utilizados estão o irgarol 1051, diuron, clorotalonil, diclofluanida, TCMS, piridina, TCMTB, DCOIT, zinco e cobre piritiona, tiram, ziram, maneb e zineb, dentre outros (CASTRO *et al.*, 2011).

Alguns destes biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração, como o irgarol 1051 e o diuron, também apresentam certa toxicidade para organismos aquáticos (DAFFORN *et al.*, 2011). Devido este fato na Suécia, França, Reino Unido e Dinamarca, os mesmos foram banidos para utilização em embarcações menores de 25 m por apresentarem efeitos nocivos sobre o crescimento de organismos fotossintéticos não alvo (KIM *et al.*, 2015).

Considerando que os biocidas presentes nas tintas anti-incrustantes são liberados para a coluna de água e podem ser acumulados nos sedimentos superficiais, existe uma preocupação ambiental quanto aos níveis que podem estar presentes nesses compartimentos. As áreas frequentemente impactadas por estes biocidas são regiões com intensas atividades marítimas, destacando assim zonas costeiras sob a influência de terminais portuários, marinas, canais de navegação e estaleiros (BOWMAN *et al.*, 2003; ABREU, 2016).

Recentemente estudos sobre níveis de contaminação de biocidas anti-incrustantes de terceira geração têm sido publicados em diversas partes do mundo em matrizes como a água do mar e sedimentos superficiais. Estes estudos incluem países como a Coreia do Sul (KIM *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015), Estados Unidos (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013), Espanha (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011b; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011c), Irã (SALEH *et al.*, 2016), Malásia (ALI *et al.*, 2013) e Brasil (DINIZ *et al.*, 2014; DOMINGUEZ *et al.*, 2014).

Entretanto, no Panamá, apenas um trabalho foi publicado em relação à contaminação por biocidas anti-incrustantes de segunda geração. Nesse estudo o imposex foi observado em todas as espécies de moluscos gastrópodes examinados a

partir da entrada do Canal do Panamá, e em todos os casos, a frequência e efeito do imposex aumentaram com a proximidade do Canal. (LI e COLLIN, 2009). Além disso, até o momento nenhum estudo quantificou a ocorrência de biocidas anti-incrustantes em amostras de água do mar e sedimentos superficiais em áreas costeiras do Panamá. O Panamá tem uma posição geográfica estratégica para o comércio internacional devido à presença do Canal do Panamá, e é reconhecido como uma das zonas de navegação mais movimentadas do mundo. Portanto, é de grande importância avaliar a contaminação por biocidas anti-incrustantes nas regiões onde ocorre grande atividade marítima no Panamá.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Realizar um diagnóstico preliminar dos níveis de contaminação por biocidas anti-incrustantes de terceira geração (irgarol 1051, diuron, TCMTB, DCOIT e diclofluanida) em amostras de águas marinhas e sedimentos superficiais em áreas sob a influência de atividades marítimas do Panamá.

2.2. Específicos

- Padronizar um método de preparo de amostras através da técnica de extração em fase sólida (SPE) e análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para determinação de biocidas anti-incrustantes de terceira geração em amostras de águas marinhas e estuarinas;
- Padronizar um método de preparo de amostras através da técnica da dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD) e análise por LC-MS/MS para determinação de biocidas anti-incrustantes de terceira geração em amostras de sedimentos superficiais;
- Validar os métodos propostos conforme os parâmetros de desempenho da SANTE e INMETRO;
- Avaliar a contaminação de biocidas anti-incrustantes de terceira geração em portos, marinas e no Canal do Panamá, e comparar estes níveis de com os limites estabelecidos internacionalmente e com outros estudos a nível mundial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biocidas em tintas anti-incrustantes

Os biocidas são substâncias químicas sintéticas, naturais ou produzidas por micro-organismos que se destinam a destruir, neutralizar, evitar a ação ou exercer controle sobre qualquer organismo considerado nocivo para os seres humanos ou suas atividades (ROSSMARE, 1995).

O uso de sistemas anti-incrustantes data de tempos antigos. Nos anos 1500 – 300 A.C, os fenícios utilizavam revestimentos a base de chumbo e cobre para prevenir a bioincrustação em embarcações de madeiras (DAFFORN *et al.*, 2011). No século XIII e XV, o breu (resina vegetal escura) foi usado extensivamente para proteger embarcações, misturados às vezes com óleo ou resina (YEBRA *et al.*, 2004). Como exemplo, os navios de Cristóvão Colombo puderam ter sido recobertos com uma mistura de breu e sebo (YEBRA *et al.*, 2004). Embora no começo do século XVI o revestimento de madeira, colocado sobre uma camada de pelos de animais e alcatrão, fosse um procedimento habitual, revestimentos de chumbo eram muito mais difundido naquela época, como pode ser visto a partir de sua adoção oficial pela Espanha, França e Inglaterra (YEBRA *et al.*, 2004). No final do século XVIII e começo do XIX, os navios aumentaram o consumo de revestimentos anti-incrustantes a base de cobre, arsênio e mercúrio, o que representou uma entrada crescente de compostos químicos nos ambientes aquáticos (DAFFORN *et al.*, 2011).

O emprego de sistemas anti-incrustantes em embarcações é justificado pelos seguintes motivos: i) o aumento da fricção entre o casco e a água demanda uma maior potência dos motores e, conseqüentemente, gera um aumento no consumo de combustível; ii) aumento da frequência de docagens gerando um incremento de custos e de resíduos gerados; iii) aumento das taxas de corrosão; e iv) introdução não intencional de espécies não nativas em ambientes aquáticos (YEBRA *et al.*, 2004).

Devido à preocupação com a bioincrustação, as tecnologias foram melhoradas com o passar do tempo. No século XX as tintas anti-incrustantes de primeira geração tinham como princípio ativo compostos de óxido de cobre e zinco, no entanto

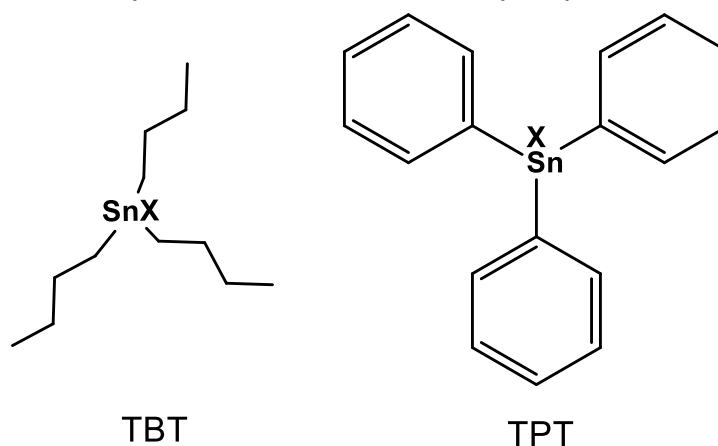
apresentavam uma duração de mais ou menos um ano, o que acabava aumentando os custos de manutenção das embarcações. Além disso, algumas espécies de algas mostraram tolerância fisiológica ao cobre, diminuindo assim a eficiência dessas tintas (YEBRA *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2007).

3.1.1. Tintas anti-incrustantes de segunda geração

Na década de 1960, desenvolveram-se tintas anti-incrustantes a base de compostos organoestânicos como o tributilestanho (TBT) e o trifenilestanho (TPhT), as quais tiveram uma maior popularidade devido a sua resistência e efetividade contra organismos incrustantes aquáticos. Estas tintas foram consideradas como tintas anti-incrustantes de segunda geração (CASTRO *et al.*, 2011).

Os compostos organoestânicos caracterizam-se pela presença de um átomo de estanho (Sn) covalentemente ligado a um ou mais substituintes orgânicos (Figura 1). Estes compostos são lipossolúveis e podem ser absorvidos facilmente nos tecidos gordurosos da biota marinha. Como estes compostos podem se acumular ao longo da cadeia trófica, representam um risco para os organismos marinhos (COLE *et al.*, 2015).

Figura 1. Estrutura química do tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT)



X: Cl⁻, H⁻, -OH, entre outras formas aniônicas

Os compostos organoestânicos, em particular o TBT, provocam vários efeitos deletérios sobre diversos organismos (BANGKEDPHOL *et al.*, 2009). Estes compostos têm propriedades teratogênicas, podem causar interrupções na função reprodutiva em mamíferos e atuam como desreguladores endócrinos (KETATA *et al.*, 2008).

Nos anos oitenta, diversas avaliações ambientais foram realizadas na Europa, mostrando impactos significantes do uso do TBT sobre a biota. Na França, várias fazendas de ostras observaram grandes declínios da produção devido às anomalias de desenvolvimento larval induzidas pelo uso desse composto (DAFFORN *et al.*, 2011). Além disso, outro efeito biológico relacionado à exposição dos compostos organoestânicos, é o imposex. O mesmo é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas em fêmeas de moluscos gastrópodes, notadamente um pênis e um canal deferente, ocasionado mesmo em baixas concentrações ambientais de TBT (KETATA *et al.*, 2008).

Devido à elevada toxicidade e persistência do TBT nos ambientes aquáticos, a Organização Marítima Internacional (IMO) adotou uma Convenção Internacional sobre o Controle dos Sistemas Anti-incrustantes em navios. Essa convenção proibiu a utilização de compostos organoestânicos em tintas anti-incrustantes e estabeleceu um mecanismo para evitar a eventual utilização futura destas substâncias em embarcações. O processo de banimento de tintas anti-incrustantes a base de TBT entrou em vigor em 2003 e foi concluído em setembro de 2008 com a proibição global desses produtos (IMO, 2008).

3.1.2. Tintas anti-incrustantes de terceira geração

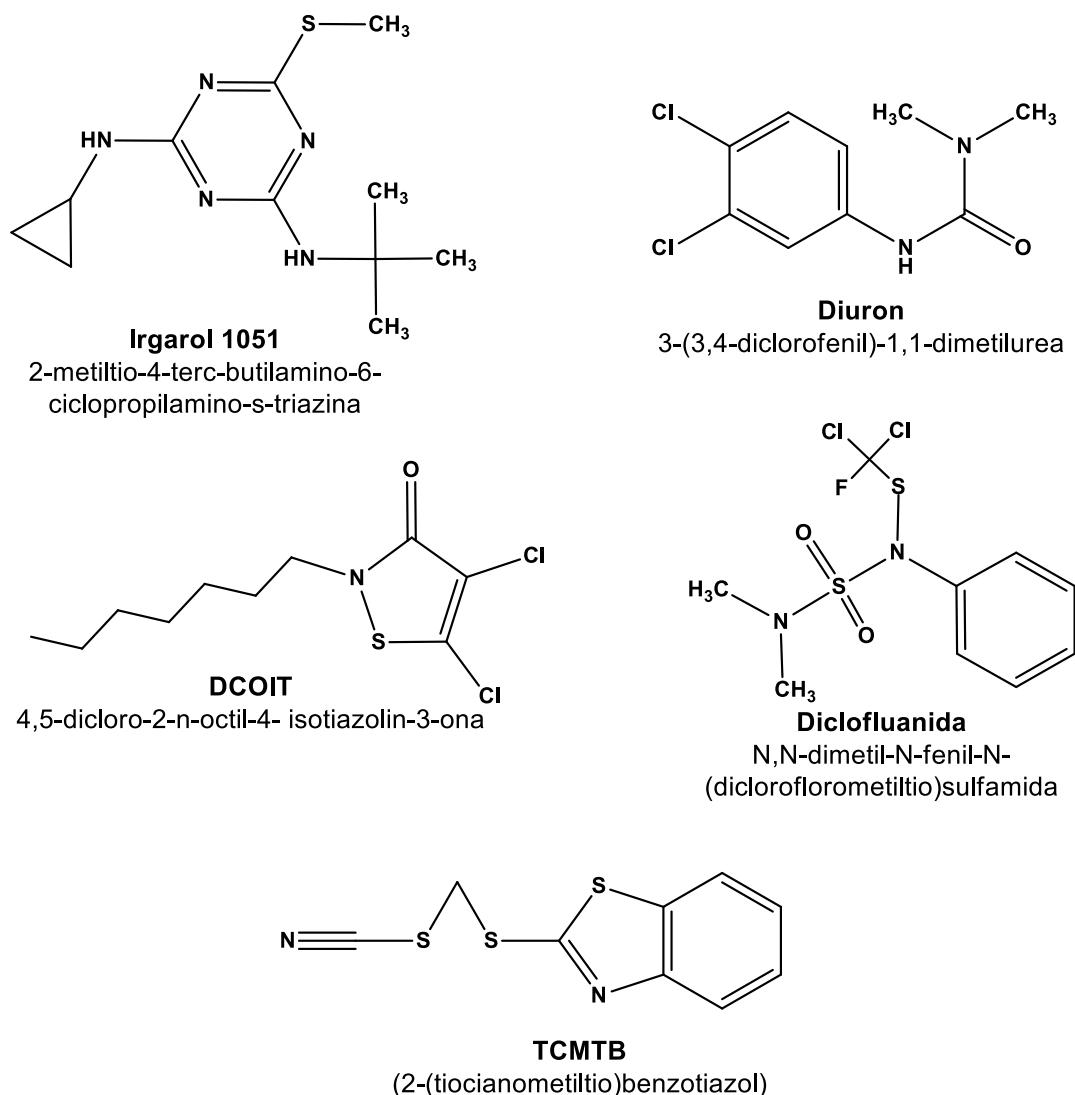
Devido aos problemas ambientais causados pelo uso do TBT e seu banimento mundial, novos compostos químicos foram adicionados às tintas anti-incrustantes para reforçar o efeito contra organismos incrustantes. Dentre esses biocidas de reforço encontram-se: irgarol 1051, diuron, clorotalonil, DCOIT, diclofluanida, TCMTB/Busam, TCMS piridina, zinco e cobre piritiona, maneb, tiram, trifetilborano piridina/TPBP, ziram, óxido cuproso, tiocianato de cobre, naftenato de cobre, dentre outros. Estudos mostraram que estes biocidas, podem ser utilizados concomitantemente (até quatro deles) em uma mesma formulação (CASTRO *et al.*, 2011).

A toxicidade, ocorrência e comportamento ambiental dos biocidas de terceira geração também vêm sendo foco de estudo uma vez que estes também são liberados em ambientes marinhos (CASTRO, 2011). Além disso, alguns desses compostos, como o irgarol 1051 e o diuron, são empregados na agricultura como agrotóxicos e apresentam efeitos nocivos para certas espécies aquáticas como as macroalgas, uma

vez que inibem a atividade fotossintética (DAFFORN *et al.*, 2011; KAONGA *et al.*, 2015).

Na Figura 2 são apresentadas as estruturas químicas dos cinco biocidas anti-incrustantes de terceira geração estudados neste trabalho.

Figura 2. Estrutura química de cinco biocidas anti-incrustantes de terceira geração estudados neste trabalho.



As propriedades físico-químicas desses compostos tais como: o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), a solubilidade na água, o coeficiente de partição entre a água e octanol (K_{ow}), e o coeficiente de partição entre a água e o carbono orgânico (K_{oc}) são fundamentais para prever o destino e transporte desses compostos no meio ambiente

(BAPTISTA NETO *et al.*, 2008). Assim, compostos com $K_{oc} > 3$ tendem a se adsorver no carbono orgânico dos sedimentos, com $K_{ow} > 3$ tendem a se bioacumular nos tecidos de organismos, e uma alta solubilidade preferência sua mobilidade na coluna d'água (FAY e SILVA, 2004). Na Tabela 1 é apresentado um resumo das principais propriedades físico-químicas dos biocidas estudados neste trabalho.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos biocidas anti-incrustantes de terceira geração.

Nome	M.M	S.A (mg L ⁻¹)	log Kow	log Koc	t _{1/2} A.M (dias)	t _{1/2} S (dias)
Irgarol 1051	253,4	7,0	3,95	3,3	24 – 365	100 – 250
Diuron	233,1	36,4	2,85	2,3	<42	14
DCOIT	213,3	0,0065	2,85	4,2	<1	1,5
Diclofluanida	333,2	0,0060	3,70	3,1	<2	1,4
TCMTB	238,4	45,0	3,30	2,7	<3	2,7

M.M., massa molar; S.A., solubilidade em água; log Kow; logaritmo do coeficiente de partição entre a água e octanol; log Koc: logaritmo do coeficiente de partição entre a água e o carbono orgânico do sedimento; t_{1/2} A.M: tempo de meia vida na água do mar; t_{1/2} S: tempo de meia vida no sedimento. Adaptado de: (SAKKAS *et al.*, 2001; SAKKAS *et al.*, 2002b; VAN WEZEL e VAN VLAARDINGEN, 2004; CASTRO *et al.*, 2011).

O irgarol 1051 (2-metiltio-4-terc-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) é um herbicida da família das triazinas que apresenta moderada solubilidade em água (7 mg L⁻¹), coeficiente de partição octanol/água (log Kow) de 3,95, sendo relativamente persistente em ambientes aquáticos apresentando uma meia vida na coluna d'água (t_{1/2}) de 100 a 350 dias (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013). O Irgarol 1051 sofre um processo de partição preferencialmente nos sedimentos e pode ser hidrolisado em diferentes produtos de degradação: 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) (OKAMURA *et al.*, 2000; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

O irgarol 1051 é um potente inibidor da atividade fotossintética, atuando principalmente sobre o fotossistema II. Este composto promove a inibição da fixação de

carbono, causando uma redução na produção de carboidratos por seres autotróficos, mais pronunciado em organismos fitoplanctônicos (SAKKAS *et al.*, 2002b). Vários estudos têm demonstrado os impactos do irgarol 1051 sobre a produtividade primária de organismos marinhos (BAO *et al.*, 2011), assim como impactos sobre comunidades recifais (OWEN *et al.*, 2002; BAO *et al.*, 2011; KNUTSON *et al.*, 2012; SHEIKH *et al.*, 2016). Estudos têm reportado que 60 ng L⁻¹ de irgarol 1051 limitam a incorporação de ¹⁴C na espécie *Madracis mirabilis*, enquanto 63 ng L⁻¹ reduzem a atividade fotossintética de corais intactos (OWEN *et al.*, 2002). Além disso, 1000 ng L⁻¹ de irgarol 1051 diminui significativamente a taxa de fotossíntese da espécie *Galaxea fascicularis* e 100 ng L⁻¹ reduz a colonização de larvas de corais (SHEIKH *et al.*, 2009; KNUTSON *et al.*, 2012).

O diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) é um herbicida do grupo das fenilureas que vem sendo utilizado na agricultura desde 1950 (YEBRA *et al.*, 2004). É um composto com moderada solubilidade em água (36,4 mg L⁻¹) e log Kow de 2,85 (CASTRO *et al.*, 2011). Assim como o Irgarol, o diuron inibe a fotossíntese bloqueando a transferência de elétrons no fotossistema II (DAFFORN *et al.*, 2011), sendo também persistente em água com meia vida de 43 a 2180 dias (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013).

A diclofluanida (N,N-Dimetil-N-fenil-N-(diclorofluorometiltio)sulfamida), pertence ao grupo químico dos organoclorados, apresenta uma baixa solubilidade em água (0,006 mg L⁻¹) e um log Kow de 3,7 (HAMWIJK *et al.*, 2005). Esse composto apresenta uma rápida taxa de degradação em água originando o composto N,N-dimetilaminosulfanilida (DMSA) (SAKKAS *et al.*, 2001). Devido a sua baixa solubilidade em água e alto log Kow, apresenta uma grande afinidade por material particulado e tem potencial para se acumular nos sedimentos (ALBANIS *et al.*, 2002). Com relação a sua toxicidade, estudos demonstram que a diclofluanida apresenta efeito carcinogênico e mutagênico em organismos unicelulares (FERNÁNDEZ-ALBA *et al.*, 2002).

O DCOIT (4,5-Dicloro-2-n-octil-4- isotiazolin-3-ona) é um isotiazol que possui baixa solubilidade em água (0,0065 mg L⁻¹), um log Kow de 2,85, uma rápida taxa de degradação na água do mar (t_{1/2} de aproximadamente 1 hora) e forma complexos estáveis com os sedimentos. O DCOIT apresenta elevada atividade antimicrobiana em relação a bactérias, fungos e algas (YEBRA *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2011).

O TCMTB (2-(tiocianometiltio)benzotiazol) é um tiazol que além de ser usado em tintas anti-incrustantes, tem sido aplicado como herbicida na agricultura e fungicida na preservação de madeira e indústria de couro. Apresenta moderada solubilidade em água (45 mg L^{-1}) e log Kow de 3,3 (MENESES *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2011).

3.1.3. Partículas de tintas anti-incrustantes

Grande quantidade de partículas de tintas anti-incrustantes são geradas em estaleiros durante a reparação, manutenção, e limpeza de cascos de embarcações (PARKS *et al.*, 2010). O tamanho das partículas produzidas depende do método de remoção da tinta (raspagem, decapagem, lixação, lavagem com água, entre outros) e podem variar de alguns micrometros de diâmetro a vários centímetros de comprimento (SINGH e TURNER, 2009b).

Em muitos países, as partículas e resíduos gerados durante a manutenção das embarcações são recolhidos e tratados nas próprias instalações e eliminadas como resíduos perigosos. Porém, em outros países com legislações ambientais menos rigorosas, métodos eficazes de destinação desses resíduos não são praticados ou claramente definidos (TURNER, 2010). Como consequência destas más práticas de eliminação de resíduos, partículas de tintas anti-incrustantes entram no ambiente aquático e são acumuladas nos sedimentos, principalmente em áreas costeiras sob a influência de estaleiros (THOMAS *et al.*, 2003).

Uma consequência direta da presença de partículas de tintas anti-incrustantes nos sedimentos são os elevados níveis de biocidas anti-incrustantes e metais, detectados frequentemente em concentrações superiores aos padrões de qualidade ambiental estabelecido, para ambientes bentônicos (SINGH e TURNER, 2009b; SINGH e TURNER, 2009a). Inclusive, é previsto que a lixiviação gradual dos biocidas a partir destas partículas de tintas intensifique as concentrações destes contaminantes nas águas intersticiais e, durante a ressuspensão ou dragagem dos sedimentos (SINGH e TURNER, 2009a; HASAN *et al.*, 2014).

PARKS *et al.* (2010) coletaram fragmentos de partículas de tintas anti-incrustantes em marinas, estaleiros e embarcações abandonadas em Plymouth, Inglaterra, as quais apresentaram altos níveis de metais como cobre ($23 - 380 \text{ mg g}^{-1}$) e zinco ($14 - 160 \text{ mg g}^{-1}$). Estas concentrações foram relacionadas com o uso desses metais como principal biocida nas formulações de tintas anti-incrustantes. Por outro

lado, nas análises de biocidas anti-incrustantes de terceira geração, diclofluanida foi o composto detectado em concentrações acima de 20 mg g^{-1} . Clorotalonil e irgarol 1051 também foram detectados em algumas amostras de partículas de tintas analisadas, nas faixas de $<0,01 - 1,17 \text{ mg g}^{-1}$ e $<0,01 - 1,15 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente.

Vale ressaltar que as partículas de tintas, quando associadas aos sedimentos, podem atuar como uma fonte significativa, em longo prazo, de biocidas anti-incrustantes para os ambientes aquáticos (HASAN *et al.*, 2014). Além disso, também representam uma ameaça para os organismos que habitam os ambientes bentônicos e intermareais, em particular os que se alimentam de partículas de forma não seletiva (PARKS *et al.*, 2010).

3.2. Padrões de qualidade ambiental

A ausência de padrões de qualidade ambiental (EQS, do inglês *Environmental Quality Standards*) em muitos países, incluindo os da América Central e do Sul, acontece especialmente pela limitação de informações básicas sobre a ocorrência e comportamento ambiental desses compostos na região. Porém, em países europeus a ocorrência ambiental destes contaminantes em áreas costeiras levou às autoridades ambientais propor EQS que estabelecem os níveis permitidos em água, solo e sedimento.

Na União Europeia, o irgarol 1051 foi banido para utilização em embarcações menores de 25 m no Reino Unido, na Suécia e na Dinamarca (ZHOU, 2008), enquanto o diuron foi totalmente proibido no Reino Unido. Além disso, no Reino Unido estabeleceram limites de riscos ambientais (ERL, do inglês *Environmental Risk Limit*) para o irgarol 1051 e para o diuron em águas do mar com valores de 24 ng L^{-1} e 100 ng L^{-1} , respectivamente (CRESSWELL *et al.*, 2006; MUKHERJEE *et al.*, 2009).

Uma das mais importantes EQS utilizadas como referência a nível mundial é a estabelecida pelas autoridades ambientais da Holanda (*Ducht authorities*), que é baseada nos limites de risco para compartimentos ambientais (VAN WEZEL e VAN VLAARDINGEN, 2004). Este EQS expressa a Concentração Máxima Permissível (MPC, do inglês *Maximum Permissible Concentration*) no ambiente acima do qual o risco de efeitos adversos é considerado inaceitável para os ecossistemas aquáticos (CROMMENTUIJN *et al.*, 2000). Na Tabela 2 são apresentados os MPC para alguns biocidas anti-incrustantes em água e no sedimento.

Tabela 2. Concentração Máxima Permissível (MPC) proposta pelas autoridades holandesas para o irgarol 1051, diuron e TCMTB.

Biocida	MPC na água (ng L ⁻¹)	MPC no sedimento (ng g ⁻¹)
Irgarol 1051	24	1,4
Diuron	430	9,0
TCMTB	380	n.e

n.e: não estabelecido

Por outro lado, as autoridades ambientais da Noruega também estabeleceram EQS de uma ampla variedade de contaminantes metálicos e orgânicos, no qual incluem o irgarol 1051 e o diuron, em água do mar e nos sedimentos (BAKKE *et al.*, 2010). O sistema norueguês tem cinco níveis de classificação baseado na toxicidade dos contaminantes no ambiente. O nível I corresponde aos níveis basais dos limites permitidos (*background*); o nível II representa a faixa onde a concentração do composto não representa efeitos tóxicos (*good*); o nível III representa a concentração onde os compostos podem produzir efeitos tóxicos aos organismos após exposição crônica (*moderate*); o nível IV a faixa onde o contaminante produz efeitos tóxicos após a exposição em curto prazo (*bad*); e o nível V representa as concentrações acima da qual o composto produz efeitos tóxicos graves nos ecossistemas (*very bad*). Na Tabela 3 são apresentadas as faixas de cada um dos níveis estabelecidos pelas autoridades norueguesas para o irgarol 1051 e o diuron.

Tabela 3. Sistema de classificação norueguês para o irgarol 1051 e diuron em água do mar e sedimentos.

Biocida	I <i>Background</i>	II <i>Good</i>	III <i>Moderate</i>	IV <i>Bad</i>	V <i>Very bad</i>
Água do mar (ng L ⁻¹)					
Irgarol 1051	-----	<8	8 – 50	50 – 250	>250
Diuron	-----	<200	200 – 1800	1800 – 3600	>3600
Sedimento (ng g ⁻¹)					
Irgarol 1051	-----	<0,80	0,08 – 0,50	0,50 – 2,50	>2,50
Diuron	-----	<0,71	0,71 – 6,40	6,40 – 13,00	>13,00

Em relação aos outros biocidas anti-incrustantes em estudo (diclofluanida e DCOIT) não há EQS ou guias ambientais que estabeleçam concentrações para os

compartimentos ambientais. Por esta razão é de extrema importância o estudo da ocorrência ambiental, bem como a avaliação dos efeitos toxicológicos que os mesmos possam causar em organismos marinhos.

3.3. Ocorrência ambiental de biocidas anti-incrustantes

Nas últimas duas décadas, Irgarol 1051, diuron e DCOIT têm sido detectados em amostras de água do mar, sedimentos superficiais e em biota marinha em diferentes partes do mundo (Tabela 4). As fontes de contaminação por estes biocidas estão relacionadas diretamente com ambientes aquáticos sob a influência de terminais portuários, marinas e estaleiros.

A maior concentração de irgarol 1051 em amostras de água do mar foi reportada em Singapura (4000 ng L^{-1}) (BASHEER *et al.*, 2002) e nas Ilhas Virgens Americanas (1300 ng L^{-1}) (CARBERY *et al.*, 2006). Elevadas concentrações deste composto também tem sido detectadas em amostras de sedimentos marinhos (100 ng g^{-1}) (HARINO *et al.*, 2006c), e em plâncton ($20 - 360 \text{ ng g}^{-1}$) (BALAKRISHNAN *et al.*, 2012) no Japão. Em relação ao diuron, este biocida tem sido detectado em níveis elevados em amostras de água do mar na Coreia do Sul (1360 ng L^{-1}), em amostras de sedimentos (530 ng g^{-1}) (HARINO *et al.*, 2006c), e em plâncton ($75 - 450 \text{ ng g}^{-1}$) (BALAKRISHNAN *et al.*, 2012) no Japão.

No Panamá e na América Central, nenhum estudo avaliou a ocorrência de biocidas anti-incrustantes de terceira geração em compartimentos ambientais. Por outro lado na América do Sul, poucos estudos foram realizados envolvendo basicamente irgarol 1051 e diuron.

Na Argentina, DEL BRIO *et al.* (2016) reportaram níveis dos biocidas irgarol 1051 e diuron ($<0,03 \text{ ng g}^{-1}$) em amostras de sedimentos marinhos oriundos do Golfo Nuevo, Patagonia. Por outro lado, DOMINGUEZ *et al.* (2014) detectaram níveis de irgarol 1051 e diuron nas faixas de $<1,3$ a 21 e $<1,3$ a 6 ng L^{-1} , respectivamente, em águas do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul. DINIZ *et al.* (2014) também registraram a presença dos biocidas diuron e irgarol 1051 em concentrações que variaram de $0,05$ a $7,8$ e $0,02$ a $4,8 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente, em águas estuarinas próximo ao porto de Itaqui em São Luis, Maranhão.

Tabela 4. Níveis de biocidas anti-incrustantes de terceira geração detectados em água e sedimento de várias regiões do mundo.

Local, ano da coleta	Coluna de água (ng L ⁻¹)			Sedimento (ng g ⁻¹)			Preparo de amostra /determinação	Referência
	Irgarol	Diuron	Preparo de amostra /determinação	Irgarol	Diuron	DCOIT		
Vietnã, 2002	n.a	n.a	n.a	0,05 – 4,0	0,11 – 3,0	0,09 – 1,3	AM + LLE LC-MS/MS	HARINO <i>et al.</i> (2006a)
Tailândia, 2004	n.a	n.a	n.a	0,03 – 3,2	0,07 – 25	0,051 – 0,094	AM + LLE LC-MS/MS	HARINO <i>et al.</i> (2006b)
Malásia, 2005	n.a	n.a	n.a	<0,02 – 14	<0,02 – 5	<0,04 – 1,7	AM + LLE LC-MS/MS	HARINO <i>et al.</i> (2009)
Japão, 2005	n.a	n.a	n.a	<0,05 – 100	1,0 – 530	<0,04 – 150	AM + LLE LC-MS/MS	HARINO <i>et al.</i> (2006c)
Japão, 2007	n.a	n.a	n.a	<0,08 – 4,7	0,76 – 120	0,10 – 12	AM + LLE LC-MS/MS	HARINO <i>et al.</i> (2010)
Estados Unidos, 2008	2 – 254	<2 – 68	SPE LC-MS/MS	<0,3 – 8,9	<0,3 – 4,2	n.a	ASE LC-MS/MS	SAPOZHNIKOVA <i>et al.</i> (2013)
Espanha, 2009	2,4 – 147	2,3 – 204	SPE LC-MS/MS	<0,1 – 26,4	<0,2 – 21	n.a	MWE LC-MS/MS	SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> (2011b)
Brasil, 2009	<1,3 – 21	<1,3 – 6	SPE LC-MS/MS	n.a	n.a	n.a	n.a	DOMINGUEZ <i>et al.</i> (2014)
Coreia do Sul, 2010	0,2 – 14	13 – 1360	LLE LC-MS/MS	1,0 – 11,5	2,3 – 62,3	3,6 – 5,5	AM LC-MS/MS	KIM <i>et al.</i> (2014); KIM <i>et al.</i> (2015)
Coreia do Sul, 2010	n.a	n.a	n.a	1,8 – 73	6,9 – 46	30 – 281	AM + UAE + SPE LC-MS/MS	LEE <i>et al.</i> (2015)
Irã, 2013	<1,0 – 63	<4,8 – 29	MF-LPME LC-DAD	<6,8 – 35,4	n.a	n.a	UAE + DLLME GC-MS	SALEH <i>et al.</i> (2016)

n.d: não detectado; n.a: não analisado; AM: agitação mecânica; SPE: extração em fase sólida; LLE: extração líquido-líquido; MF-LPME: micro-extração em fase líquida suportada com micro-funil; LC-MS/MS: cromatografia líquida com detector por espectrometria de massas sequencial; LC-DAD: cromatografia líquida com detector por arranjo de diodos; ASE: extração acelerada com solvente; MWE: extração por micro-ondas; UAE: extração assistida por ultrassom; DLLME: micro-extração líquido-líquido dispersiva; GC-MS: cromatografia gasosa com detector por espectrometria de massas.

3.4. Preparo de amostras para matrizes ambientais

A etapa de preparo de amostras é um dos passos mais importantes na análise de compostos orgânicos em matrizes ambientais. Ela desempenha um papel fundamental, pois pode influenciar os resultados analíticos de diversas maneiras, por exemplo, devido às perdas dos analitos, contaminação ou impurezas interferindo no processo de extração (MITRA, 2003).

Adicionalmente, os biocidas anti-incrustantes podem estar presentes em ambientes aquáticos em baixas concentrações. Deste modo, as técnicas de extração utilizadas requerem um alto grau de concentração (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

3.4.1. Água

A extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liqui-liquid extraction*) é uma técnica convencional que tem sido utilizada para a extração de uma ampla variedade de contaminantes orgânicos em amostras de água (MITRA, 2003). Recentemente, pesquisadores têm desenvolvido técnicas de extração mais eficientes que podem substituir os métodos convencionais, uma vez que essas técnicas são procedimentos trabalhosos, demorados e que expõem os analistas a solventes orgânicos tóxicos. Sendo assim, a técnica mais utilizada nos últimos anos para extração de biocidas anti-incrustantes em amostras de água é a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

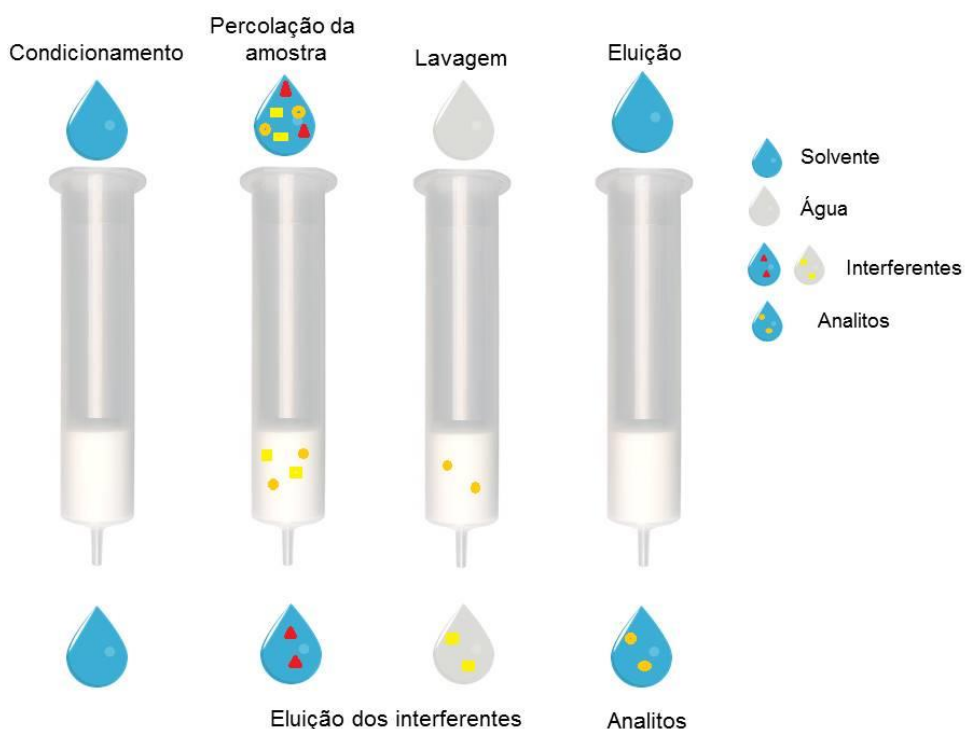
3.4.1.1. Extração em fase sólida (SPE)

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão e tem como objetivo principal isolar os analitos de uma matriz complexa. As etapas da extração incluem a ativação do sorvente, percolação da amostra/sorção dos analitos no sorvente, eliminação dos interferentes da matriz, eluição dos analitos e posterior concentração dos compostos de interesse (Figura 3) (CALDAS *et al.*, 2011).

A SPE apresenta muitas vantagens sob a extração líquido-líquido, o que faz com que esta técnica seja adequada para a determinação de biocidas e outros contaminantes em amostras de água. Dentre as vantagens destaca-se o menor

consumo de solventes orgânicos, a variedade de sorventes disponíveis no mercado, a fácil automatização e o baixo custo. A sua principal desvantagem é decorrente do possível bloqueio da fase sólida pelo material particulado, tornando-se necessário a filtração das amostras antes da extração. (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

Figura 3. Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição dos analitos.



3.4.2. Sedimentos

Os métodos para a determinação de contaminantes orgânicos semi-voláteis em matrizes sólidas são geralmente baseados em técnicas convencionais como extração por Soxhlet, ultrassom e por agitação mecânica (HAWTHORNE *et al.*, 2000; WELLS, 2003). Em relação à determinação de biocidas anti-incrustantes em sedimentos marinhos nos últimos anos, destacam-se as técnicas como a extração acelerada com solvente (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013); assistida por micro-ondas (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011c); e a com fluido supercrítico (CARRASCO *et al.*, 2003). Estas técnicas requerem uma grande quantidade de solvente orgânico; consomem um tempo significativo; e abordam procedimentos complexos, tornando-as técnicas de alto custo e pouco amigáveis ao ambiente.

Para minimizar estes problemas, diferentes métodos têm sido propostos a fim de otimizar e propor alternativas as extrações convencionais. Atualmente, atenção especial é dedicada para métodos que sejam rápidos, eficientes e ambientalmente corretos (CALDAS, 2015). Desta forma, a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*) vem sendo utilizada como alternativa aos métodos convencionais de extração.

3.4.2.1. Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)

A MSPD é uma técnica rápida e robusta introduzida em 1989 por BARKER *et al.* (1989) para a extração de resíduos de drogas em tecidos de animais. Esta técnica é realizada em três etapas, onde primeiramente a amostra é homogeneizada com o suporte sólido em um almofariz por um tempo determinado. Em seguida, o pó homogeneizado é transferido para um cartucho de SPE, onde finalmente ocorre a eluição dos analitos com solvente ou mistura de solventes apropriados (CAPRIOTTI *et al.*, 2013).

A MSPD apresenta como principais vantagens o uso de pequenos volumes de solventes, alta eficiência de extração e a possibilidade de realização da limpeza e a extração em uma única etapa (CALDAS *et al.*, 2013b). Além disso, os fatores-chave como sua viabilidade, flexibilidade, versatilidade, baixo custo e rapidez (CAPRIOTTI *et al.*, 2015) fazem com que esta técnica seja utilizada para determinação de contaminantes orgânicos e inorgânicos em diferentes tipos de matrizes.

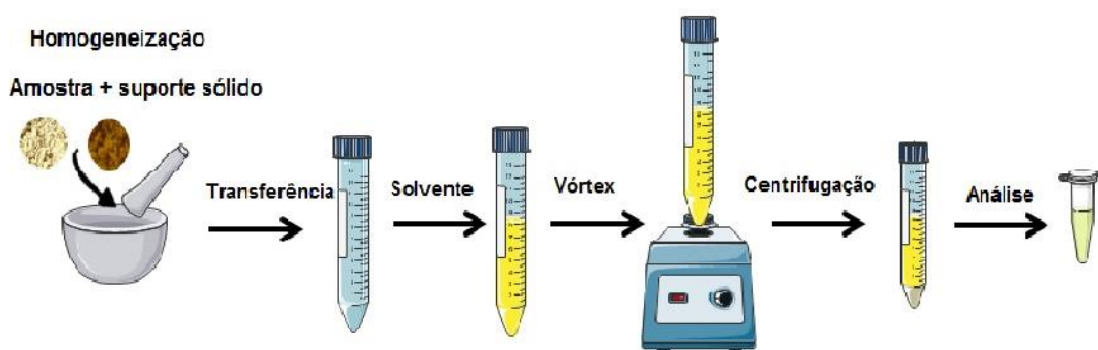
ZIARRUSTA *et al.* (2015) desenvolveram um método analítico utilizando a MSPD para extração de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), éteres difenílicos polibromados (PBDE), agrotóxicos organoclorados e organofosforados em tecidos de moluscos; MOLINER-MARTÍNEZ *et al.* (2012) aplicaram a MSPD para extração de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) em sedimentos marinhos; e CHENG *et al.* (2014) aplicaram esta técnica para extrair retardadores de chama clorados (PBDEs) em peixes comerciais. De igual forma a MSPD tem sido aplicada para amostras de alimentos como para a extração de agrotóxicos em coco (SILVA *et al.*, 2008); e agrotóxicos em ovos liofilizados (SOUZA *et al.*, 2013).

Além das diferentes aplicações da MSPD, modificações na técnica têm sido desenvolvidas com o objetivo de torna-la mais rápida, mais eficiente para determinadas

classes de compostos, gerar resíduos menos tóxicos, e diminuir o consumo de solvente, entre outros.

SEBASTIÀ *et al.* (2010) propuseram uma modificação na técnica de MSPD, onde não há uso do empacotamento da amostra macerada em cartucho SPE, mas se aplica a direta agitação de um tubo de fundo cônico contendo a amostra macerada com solvente, para extrair aflatoxinas de chufas. A mesma técnica foi utilizada por DUARTE *et al.* (2013b) para a extração de espécies de mercúrio em peixe, e por CALDAS *et al.* (2013a) para a extração de agrotóxicos de fígado de peixe e hepatopâncreas de caranguejo. Estes denominaram a técnica como dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD, do inglês *Vortex-assisted matrix solid-phase dispersion*) (Figura 4).

Figura 4. Etapas envolvidas na VA-MSPD



Dentre as vantagens da substituição da eluição em cartucho de SPE pela agitação em vórtex está a eliminação da etapa de empacotamento da amostra, já que esta pode gerar maiores desvios na extração devido à variações na forma como a amostra é macerada e empacotada. Outra vantagem é que a agitação em vórtex aumenta o tempo no qual a amostra fica em contato com o solvente, podendo melhorar a eficiência de extração (CALDAS *et al.*, 2013a).

3.5. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases. Uma das fases permanece estacionária, em quanto à outra se move através desta. Durante a percolação da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da

mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS *et al.*, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HLPC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, ou simplesmente LC) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. Apesar de ser uma excelente técnica de separação, a LC necessita de um detector quando a análise qualitativa (confirmação da identidade química) é também necessária. O detector é o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico, ele mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra, ou da solução que a contém, e envia um sinal para registro, geralmente diretamente proporcional à concentração do componente na amostra (COLLINS *et al.*, 2006).

Dentre as várias opções existentes neste momento, a espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) é o detector que melhor fornece as informações estruturais necessárias. O acoplamento entre estas duas técnicas (LC e MS) dá origem a uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa: a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (LANÇAS, 2009a). Um MS é composto por: sistema de injeção da amostra, fonte de íons, analisador/separador de massas, detector e sistema de aquisição de dados.

As fontes de ionização, inicialmente investigadas para o acoplamento LC-MS, foram baseadas no impacto eletrônico e na ionização química, empregadas com sucesso no acoplamento GC-MS (LANÇAS, 2009a). Entretanto, devido às diferentes características existentes entre as fases móveis empregadas nas duas técnicas de separação (GC e HPLC), este acoplamento mostrou-se inadequado para análise de compostos em baixas concentrações, além de não apresentarem robustez necessária (LANÇAS, 2009a). Após décadas de esforços novas fontes de ionização foram desenvolvidas as quais são capazes de combinar duas características em um mesmo sistema: facilitar a transferência da amostra que sai da coluna para a fase gasosa (interface coluna-MS) e a ionização da amostra (LANÇAS, 2009a). Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas são a eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês,

Atmospheric Pressure Chemical Ionization) (ROSENBERG, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008). Neste trabalho será dada ênfase a ESI.

Na ionização ESI, o eluente cromatográfico é pressurizado em um tubo capilar feito de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3,0 e 5,0 kV. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas são dessolvatadas e os íons fluem para o analisador induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (LANÇAS, 2009a).

A forma encontrada para se obter mais informações e tornar a confirmação da identidade da substância mais segura é o uso de dois analisadores em série (denominados sistemas *tandem*). Este arranjo é geralmente denominado LC-MS/MS (LANÇAS, 2009b). O sistema MS/MS é um sistema que, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas (MS_1 e MS_2), em que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida (CHIARADIA *et al.*, 2008).

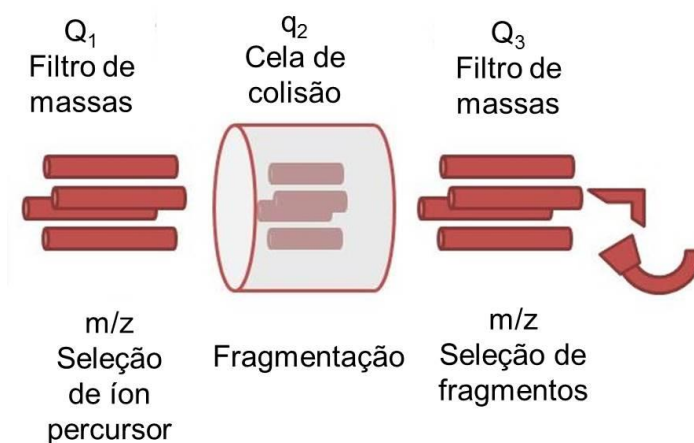
Existem diferentes tipos de analisadores de massa, sendo os mais populares, no momento, o quadrupolo (Q), o triplo quadrupolo (QqQ), o aprisionador de íons (IT, do inglês *Ion Trap*) e os do tipo tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*). Cada um deles possui diferentes características, resoluções e preços, sendo que o usuário deve analisar, com cuidado, cada um antes de decidir qual o mais adequado para sua aplicação (LANÇAS, 2009b).

Neste trabalho será utilizado um cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) com analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ). O quadrupolo é composto de quatro barras, usualmente feitas de metal, dispostas em dois pares. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto que o outro a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua e radiofrequência é aplicada nas barras. O par positivo de barras atuará como um filtro para massas mais elevadas, enquanto que o par negativo age como um filtro para massas pequenas. Considerando-se uma dada amplitude para as voltagens radiofrequências e corrente contínua, somente os íons que apresentarem determinada razão massa/carga (m/z), a qual esteja em ressonância com o campo aplicado, irão

passar pelas barras do quadrupolo e serão detectados. Os demais íons que entrarem no quadrupolo terão suas trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados pela bomba de vácuo (LANÇAS, 2009a).

Nos analisadores do tipo QqQ, um quadrupolo (Q_1) atua inicialmente como filtro de massas, selecionando os íons provenientes da fonte de íons. Em seguida, os íons selecionados sofrem fragmentação em uma cela de colisão (q_2) pela ação de íons de nitrogênio ou argônio, formando os íons produto, que serão analisados no terceiro quadrupolo (Q_3) (Figura 5) (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Figura 5. Esquema de um analisador do tipo Triplo Quadrupolo



Fonte: <http://www.nomadsonwheels.com/quadrupole/quadrupole-m-spectrometer>

O arranjo de analisadores confere ao sistema QqQ alta seletividade e sensibilidade, devido à possibilidade de operação no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*). O modo MRM é baseado na detecção de um íon precursor e de um fragmento conhecido. Essa tecnologia tem se tornado o método mais comum na determinação de resíduos de contaminantes em análises ambientais e de alimentos por LC-MS/MS (LANÇAS, 2013).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na coleta de amostras, padronização, validação e aplicação dos métodos para determinação de cinco biocidas anti-incrustantes de terceira geração em amostras de água do mar (fração total dissolvida) e sedimentos marinhos superficiais. Para a extração foi utilizada as técnicas de preparo de amostra SPE e VA-MSPD e para a determinação a técnica LC-MS/MS. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM) da Escola de Química e Alimentos (EQA), e no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO) do Instituto de Oceanografia (IO), na Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

Além disso, algumas partes do estudo foram realizadas no Laboratório de Oceanografia Geológica (LOG) do Instituto de Oceanografia (IO), e no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da FURG. No Panamá foi utilizado o Laboratorio da *Estación de Maricultura del Pacífico en Vacamonte* da Autoridade dos Recursos Aquáticos do Panamá – ARAP.

4.1. Materiais utilizados

4.1.1. Instrumentação

- Bomba de vácuo Tecnal TE-058 (Brasil);
- Sistema de filtração em membrana Phenomenex (EUA);
- Sistema manifold para SPE Phenomenex (EUA) para a pré-concentração simultânea de até 12 amostras;
- Ultra-som Quimis® modelo Q335D (Brasil);
- pHmetro modelo pH21 Hanna – Eletrodo de vidro combinado com BNC (Brasil);
- Liofilizador (Liotop – L101) (Brasil);
- Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa (Brasil);
- Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos) (Brasil);
- Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (EUA);

- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL) (Polônia);
- Agitador Vórtex modelo Certomat® MV-B. Braun. (Brasil);
- Cromatógrafo a líquido Alliance Separations Module 2695 (EUA) equipado com: Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de desgaseificação. Detector MS/MS, Micromass® Quatro Micro™ API (Inglaterra) com fonte API, com ionização por Eletrospray;
- Sistema de aquisição de dados através do software MassLynx e QuanLynx 4.0 (Inglaterra);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics - Instruments Ltda., (Escócia);
- Analisador de carbono total (Shimadzu TOC-L, SSM 50000 A) (Japão);
- Refratômetro Seawater HI 96822 (Inglaterra);
- pHmetro Denver Instrument (EUA);
- Microscópio óptico Opton, resolução de 5x (Brasil);
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), em modo alto e baixo vácuo, Jeol, JSM - 6610LV, com microsonda de EDS (EUA).

4.1.2. Reagentes, solventes, sorventes e materiais

- Vidraria comum de laboratório (balões volumétricos, pipetas volumétricas calibradas, béquer, etc.);
- Cartuchos SPE Strata-X, 200 mg, 3 mL, Phenomenex® Allcrom (Brasil); Cartuchos SPE Oasis® HLB, 500 mg, 6 mL Waters (USA); Cartuchos Strata C18-E, 500 mg, 3 mL Phenomenex®, Allcrom (Brasil);
- Padrões analíticos: irgarol 1051, diuron, diuron-d₆, diclofluanida, DCOIT, e TCMTB. Sigma-Aldrich (Brasil);
- Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS White Martins (Brasil);
- Gás Nitrogênio 99,99% de pureza, White Martins (Brasil);
- Água ultrapura (Millipore Direct-Q UV3®)
- Metanol e etanol grau HPLC, J.T Baker (EUA);
- Acetonitrila grau HPLC, J.T Baker (EUA);
- Acetato de etila grau HPLC, J.T Baker (EUA);

- Detergente neutro Extran®, Merck (Brasil);
- C18 – Bondesil 40 µm, Varian (EUA);
- C18 reutilizado de cartuchos de SPE Strata C18-E;
- Membrana filtrante de nylon 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro, Milipore (Brasil) utilizado para filtração da fase móvel;
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 µm diâmetro de poro, Sartorius, Biolab products (Alemanha) utilizadas para filtração das amostras de água do mar;
- Água destilada;
- Frascos de vidro âmbar, capacidade de 10 e 50 mL;
- Água sintética a diferentes salinidades;
- Hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹;
- Mistura de sal marinho *Coralife*
- Ácido fosfórico (1:1 v/v).

4.2. Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque, contendo 1000 mg L⁻¹ de cada biocida (irgarol 1051, diuron, diclofluanida, DCOIT, TCMTB e diuron-d₆) foram preparadas em metanol grau HPLC, efetuando-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido puro a ser pesado considerando o grau de pureza. As soluções analíticas estoques foram preparadas em balão volumétrico calibrado, logo após foram condicionadas em frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE) e armazenadas a temperatura de -18 °C em freezer.

A partir das soluções estoque foram preparadas soluções trabalho de concentrações de 100 e 10 mg L⁻¹ de cada composto em metanol. Foi preparada uma solução trabalho na concentração de 1 mg L⁻¹, contendo a mistura dos biocidas. Diluições desta solução trabalho, preparadas diariamente, foram utilizadas para a padronização e validação do método por LC-MS/MS.

4.3. Condições do sistema cromatográfico LC-MS/MS

A separação cromatográfica dos cinco biocidas anti-incrustantes (diuron, irgarol 1051, TCMTB, DCOIT e diclofluanida) por LC-MS/MS foi realizada utilizando a coluna XTerra® C18 MS (50 x 3 mm, 3,5 µm). A fase móvel foi composta por uma solução de

ácido acético 0,1% (v/v) em água ultrapura e metanol grau HPLC em modo gradiente. A Tabela 5 apresenta as condições utilizadas no modo gradiente.

Tabela 5. Gradiente utilizado para a separação por LC-MS/MS

Tempo (min)	Metanol (% v/v)	Solução de ácido acético 0,1 % (v/v) em água ultrapura	Vazão (mL min ⁻¹)
0,0	50	50	0,2
6,0	90	10	0,4
10,5 – 15,0	50	50	0,2

As condições para a fragmentação dos íons monitorados foram: temperatura da fonte de ionização de 115 °C, temperatura do gás de dessolvatação (N₂) de 400 °C, vazão do gás de dessolvatação de 500 L h⁻¹ e voltagem do capilar de 4,0 kV.

Para cada analito foram selecionadas duas transições características, o fragmento mais intenso foi utilizado para a quantificação e o segundo mais intenso para a confirmação. A voltagem do cone, a energia de colisão, o tempo de retenção e as transições monitoradas são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Condições de fragmentação dos biocidas no espectrômetro de massas e o tempo de retenção (t_R). Modo de ionização positiva (ESI+). Tempo de permanência (dwell time) para cada transição monitorada: 0,2 s.

Biocida	t _R (min)	Transição (m/z)	Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)
Diuron	4,39	232,97>72*	17	23
		232,97>160	37	23
TCMTB	5,18	238,76>180*	15	17
		238,76>136	25	17
Irgarol 1051	5,82	253,87>198*	17	27
		253,87>108	31	27
Diclofluanida	5,98	332,82>123*	29	23
		332,82>76,9	57	23
DCOIT	7,84	281,91>170*	15	29
		281,97>57	17	29

(*) transições utilizadas para a quantificação.

4.4. Padronização da técnica SPE

Inicialmente o método de extração foi realizado utilizando as condições desenvolvidas por CALDAS *et al.* (2013c) para a determinação de fármacos, agrotóxicos e produtos de cuidado pessoal em amostras de água destinada ao abastecimento público e água superficial. Considerando as propriedades físico-químicas dos analitos em estudo e da matriz utilizada (águas marinhas e estuarinas), algumas modificações nos parâmetros na SPE foram padronizadas, sendo eles: tipo de cartucho, efeito do pH, e efeito da salinidade. O método de extração por SPE foi padronizado e validado utilizando água destilada e água sintética (solução de sal de marinha *Coralife* em água destilada) a diferentes salinidades (10, 20 e 30) preparadas no Laboratório CONECO. As extrações para cada teste quantitativo foram realizadas em triplicata (n=3).

4.4.1. Escolha do sorvente na SPE

O primeiro teste foi realizado para escolher com qual tipo de sorvente haveria uma melhor eficiência na extração dos biocidas anti-incrustantes em estudo. A concentração dos analitos foi avaliada em três diferentes sorventes, sendo eles: Strata-X, 200 mg, 3 mL (Phenomenex); Oasis® HLB, 500 mg, 6 mL (Waters); e Strata C18-E, 500 mg, 3 mL (Phenomenex). Nesta avaliação, foi utilizado 250 mL de amostra (água destilada a pH 5,5) fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada biocida, e 2 mL de metanol como solvente de eluição.

4.4.2. Efeito do pH

O pH informa, numa escala de 0 a 14, a acidez e a basicidade da água. A água do mar é levemente básica devido ao equilíbrio $\text{CO}_2 (\text{g}) / \text{CO}_3^{2-} (\text{aq})$, com pH da ordem de 8,1 a 8,3 (MARION *et al.*, 2011). Em ambientes marinhos e estuarinos o pH pode crescer levemente quando há rápida remoção de CO_2 das águas das superfície durante a fotossíntese, ou pode alcançar valores menores em águas de baixa salinidade quando a presença de carbonatos é menos acentuada (NIENCHESKI, 2015). Além disso, a crescente captação de $\text{CO}_2 (\text{g})$, oriundo da combustão de combustíveis fósseis, faz que o pH do água do mar diminua de forma significativa nos oceanos (MARION *et al.*, 2011). Neste contexto, valores entre 6,0 e 8,3 são faixas de

pH normalmente encontradas em águas marinhas e estuarinas pelo mundo (DUARTE *et al.*, 2013a).

Considerando estes fatores ambientais que ocorrem naturalmente e que o pH influencia na retenção dos biocidas no sorvente na SPE, níveis de pH entre 6 e 8 foram avaliados a fim de se obter maiores percentuais de recuperação. O pH das amostras para a padronização do método foi ajustado com ácido fosfórico (1:1 v/v) quando necessária acidificação, ou com hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ quando necessária a alcalinização. Nesta avaliação, foi utilizado 250 mL de amostra (água destilada pH entre 6 – 8) fortificada com 10 µg L⁻¹ de cada biocida, sorvente Strata C18-E e 2 mL de metanol como solvente de eluição.

4.4.3. Efeito da salinidade

A salinidade é a medida de todos os sais dissolvidos em água que por convenção internacional é uma unidade adimensional (NIENCHESKI, 2015). A água do mar é notavelmente constante em torno de 35. No entanto, a salinidade das águas estuarinas variam de acordo com a localização no estuário, as marés diárias e o volume de água doce que flui para o sistema (US-EPA, 2015).

Salinidades de 10, 20 e 30 foram testadas para a extração dos biocidas anti-incrustantes em água do mar. Estes valores foram escolhidos visando abranger principalmente as faixas de salinidades frequentemente encontradas em águas marinhas e estuarinas (US-EPA, 2015).

As amostras de águas sintéticas para a padronização do método foram preparadas dissolvendo 10, 20 e 30 g de uma mistura de sal marinha comercial *Coralife* em 1 L de água destilada para se obter água a salinidades de 10, 20 e 30, respectivamente. Estes valores foram verificados com um refratômetro. Nesta avaliação, foi utilizado 250 mL de amostra de água sintética com valores de salinidades previamente mencionadas (pH 8) fortificadas com 10 µg L⁻¹ de cada biocida, Strata C18-E como sorvente, e 2 mL de metanol como solvente de eluição.

4.5. Padronização da VA-MSPD

As amostras de sedimentos marinhos empregadas na padronização e validação do método VA-MSPD foram coletadas no estaleiro Irmãos Fernandez, município de Rio

Grande, RS, Brasil, seguindo os procedimentos de coleta do item 4.8. Estas amostras foram previamente caracterizadas segundo o item 4.10.

O método utilizado para a extração dos biocidas anti-incrustantes em sedimentos marinhos foi baseado em um método previamente desenvolvido no laboratório LACOM. Este método consiste da maceração por 5 minutos de 2 g de amostra e 0,25 g de C18 como suporte sólido, seguido da extração com 10 mL de metanol em tubo de fundo cônico agitado em vórtex durante 1 minuto e centrifugado por 5 minutos a 7000 rpm. No entanto, algumas modificações nesse método foram realizadas: tipo e volume de solvente extrator, e avaliação de C18 reutilizada de suporte sólido. As extrações para cada teste quantitativo foram realizadas por triplicata ($n=3$).

4.5.1. Avaliação do etanol como solvente extrator

A fim de utilizar um solvente ambientalmente amigável, foi avaliado o etanol como solvente extrator. Nesta avaliação, 2 g de sedimento fortificado com 25 ng g^{-1} de cada biocida (deixado em equilíbrio por 45 minutos) foi macerado com 0,25 g de C18, seguido da extração com 10 mL de solvente (metanol ou etanol) em tubo de fundo cônico, agitado por vórtex durante 1 min e centrifugado por 5 min a 7000 rpm.

4.5.2. Escolha de volume de etanol

Para a escolha do volume de solvente extrator, foram estudados os volumes de 5 e 10 mL de etanol. Este teste foi realizado a fim de se obter menores limites de quantificação do método e gerar menos resíduos após a extração. Nesta avaliação, 2 g de sedimento fortificado com 25 ng g^{-1} de cada biocida (deixado em equilíbrio por 45 minutos) foi macerado com 0,25 g de C18, seguido da extração com etanol (5 ou 10 mL) em tubo de fundo cônico, agitado em vórtex durante 1 min e centrifugado por 5 min a 7000 rpm.

4.5.3. Avaliação do C18 reutilizado como suporte sólido

A fim de se obter um método de preparo de amostra que seja menos dispendioso, foi avaliado o uso de C18 reutilizado, previamente descontaminado, como suporte sólido. O método de descontaminação do C18 foi baseado no protocolo descrito por RODRIGUES *et al.* (2010): aproximadamente 50 g de C18 reutilizado com 100 mL de hexano, 100 mL de acetonitrila, e 100 mL de metanol em uma coluna

cromatográfica de vidro de 300 mL de capacidade. Após a lavagem, o C18 foi seco em uma estufa a 50 °C por 48 h.

Nesta avaliação, 2 g de sedimento fortificado com 25 ng g⁻¹ de cada biocida (deixado em equilíbrio por 45 minutos) foi macerado com 0,25 g de C18 (comercial e reutilizado), seguido da extração com 5 mL de etanol em tubo de fundo cônico, agitado em vórtex durante 1 min e centrifugado por 5 min a 7000 rpm.

4.6. Validação de métodos cromatográficos

Após o desenvolvimento de um método analítico, e antes de sua aplicação na análise de amostras de interesse, o mesmo precisa ser validado de forma a assegurar confiabilidade nos resultados obtidos (LANÇAS, 2009b). Segundo a Organização Internacional de Normalização (ISO, do inglês *International Organization for Standardization*), a validação analítica é a confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional (ISO/IEC17025, 2005).

O método foi validado avaliando as seguintes figuras de mérito: linearidade, limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of detection*), limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of quantification*), exatidão e precisão (INMETRO, 2011; SANTE, 2015). Também foi avaliada a influência do efeito matriz (EM), como sugerido pelo guia de validação para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos da Comissão Europeia (SANTE, 2015), comparando as declividades das curvas analíticas na matriz com as curvas analíticas no solvente (ECONOMOU *et al.*, 2009).

4.6.1. Limite de detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)

O LOD representa a menor concentração do composto que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. O LOQ representa a menor concentração do composto que pode ser quantificada (SANTE, 2015). O LOD e LOQ do instrumento (LOD_i e LOQ_i) para cada composto foi estimado a partir da relação sinal/ruído (s/n) calculada pelo *software* do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha base (ruído), respectivamente. Os limites do método foram obtidos através de padronização por sobreposição na matriz, pelo preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações no extrato branco da matriz.

Como a técnica SPE empregada apresenta um fator de concentração de 125 vezes (250 mL de amostra de água/2 mL de metanol para eluição), o LOQ do método (LOQ_m) em $ng\ L^{-1}$ foi calculado dividindo o LOQ_i pelo fator de concentração do método (125x). Em VA-MSPD, o LOQ_m em $ng\ g^{-1}$, foi obtido multiplicando o valor do LOQ_i em $\mu g\ L^{-1}$, pelo fator de conversão obtido (fator = 2,5). O fator de conversão foi calculado pela razão do volume do solvente extrator (5 mL) e a massa da amostra (2 g). Os valores obtidos foram confirmados experimentalmente, e foram considerados como verdadeiros, quando a amostra fortificada nestas concentrações apresentou recuperações entre 70 e 120% com desvio padrão relativo menor ou igual a 20% (SANTE, 2015).

4.6.2. Curva analítica e linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração dos analitos em estudo, dentro de uma determinada faixa de resposta (INMETRO, 2011). A fim de se avaliar a linearidade das respostas instrumentais para os compostos em estudo, foram construídas curvas analíticas através de padronização externa no solvente e por padronização externa no extrato da matriz.

As curvas por padronização externa no solvente foram preparadas através de diluições da solução padrão de trabalho no solvente, metanol para a SPE e etanol para a VA-MSPD. As curvas por padronização externa no extrato da matriz foram preparadas a partir de diluições da solução padrão de trabalho no extrato branco da matriz, extraídas por SPE (amostras de águas salinas sintéticas) e por VA-MSPD (amostras de sedimentos). Estes últimos conjuntos de soluções preparadas também foram utilizados para calcular o efeito matriz (EM) dos métodos.

Cada solução foi injetada três vezes, e cada curva teve no mínimo 5 níveis de concentração (LOQ , $5xLOQ$, $10xLOQ$, $20xLOQ$ e $50xLOQ$). Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do software (Masslynx 4.0 Waters) do equipamento LC-MS/MS. A partir destes dados foi avaliado o coeficiente de correlação linear (r).

4.6.3. Exatidão

A exatidão, obtida por um método analítico, representa o grau de concordância entre os resultados individualmente obtidos em um determinado ensaio em

comparação com um valor de referência aceito como verdadeiro (SANTE, 2015). Os processos mais utilizados para se avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaios de recuperação e ainda adição padrão. Nesse estudo, devido à inexistência de material de referência certificado para biocidas anti-incrustantes de terceira geração em água do mar e sedimento marinhos, a exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação. A recuperação, R, é definida como a proporção da quantidade da substância de estudo, presente ou adicionada na proporção analítica do material, que é extraída e passível de ser quantificada.

Para a avaliação da exatidão, foram adicionadas quantidades conhecidas dos analitos nas amostras de água do mar e sedimentos marinhos em três níveis: baixo (LOQ), médio (5xLOQ) e alto (10xLOQ). A exatidão foi avaliada em termos de recuperação conforme a Equação 1, descrita abaixo:

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{C_2 - \text{branco}}{C_1} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

C₁: média das áreas do padrão na concentração fortificada;

C₂: média das áreas da amostra fortificada após a extração (pós-fortificação);

Branco: média das áreas da amostra não fortificada.

4.6.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada em função da repetitividade (RSDr) e da precisão intermediária (RSDpi). Para a repetitividade, as amostras foram fortificadas em três níveis (LOQ, 5xLOQ, e 10xLOQ) em triplicata seguindo todo o procedimento de extração padronizado para a SPE e VA-MSPD e injetadas em triplicata no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. A partir das nove determinações foi calculado o desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*). A precisão intermediária foi realizada da mesma maneira que a repetitividade, porém em dois níveis (5xLOQ e 10xLOQ) e em dias diferentes. Para os cálculos dos RSD utilizou-se a Equação 2, apresentada a seguir:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{\bar{x}_m} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

s: estimativa do desvio padrão absoluto;

Xm: média das medidas em replicadas.

4.6.5. Efeito matriz

O efeito matriz (EM) corresponde as interferências de componentes na matriz em um resultado analítico, seja ele positivo (enriquecimento de sinal) ou negativo (supressão de sinal) (NIESSEN *et al.*, 2006; ECONOMOU *et al.*, 2009).

Para os métodos de SPE e VA-MSPD, a avaliação do efeito matriz do método foi realizada por meio de comparações das curvas analíticas através de padronização externa no solvente e daquelas obtidas por padronização externa no extrato branco da matriz (ECONOMOU *et al.*, 2009), utilizando-se a Equação 3.

$$EM (\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_2} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

A₁: inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada biocida, preparada no extrato da matriz (extrato de água salina sintética ou de sedimento);

A₂: inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada biocida, preparada no solvente (metanol ou etanol).

Quando os valores calculados para o EM estão entre -20 e +20%, considera-se que o EM é baixo; se estiverem entre -50 e -20% ou entre +20 e +50% é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50% ou acima de +50%, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU *et al.*, 2009).

4.7. Área de estudo

A República do Panamá está situada na América Central, fazendo fronteira com o Mar do Caribe ao norte, o Oceano Pacífico ao sul, a República da Colômbia a leste, e é delimitada pela República da Costa Rica, ao oeste (MONTERO LLÁCER, 2004). A superfície continental panamenha é de aproximadamente 78082 km² e a economia do país é baseada principalmente em um setor de serviços, especialmente o turismo e o comércio. O Panamá tem uma posição geográfica estratégica e o Canal do Panamá facilita a comunicação entre os oceanos Atlântico e Pacífico, influenciando significativamente o comércio mundial (MONTERO LLÁCER, 2004). Cerca de quatro mil navios de diferentes bandeiras atravessam o Canal do Panamá anualmente, o que representa cerca de 5% do comércio mundial (CANAL DE PANAMÁ, 2016). Estas

embarcações utilizam tintas anti-incrustantes para a prevenção da incrustação marinha, as quais são consideradas uma potencial fonte de contaminação por biocidas anti-incrustantes. Além disso, as áreas costeiras do Atlântico e do Pacífico perto do Canal do Panamá têm numerosas marinas, portos pesqueiros, e um alto fluxo de navios comerciais, devido à presença de portos internacionais e navios à espera para atravessar o Canal.

Neste estudo, os pontos de amostragem foram estabelecidos levando em consideração a existência de fontes potenciais de biocidas anti-incrustantes de terceira geração como terminais portuários, marinas e entrada do Canal do Panamá. Na Figura 6 podemos observar um mapa dos pontos de amostragem e na Figura 7 algumas fotos dos pontos de coleta. Na Tabela 8 são descritos cada local de amostragem com seu respectivo tráfego de embarcações, tipo de amostra e área costeira. Os locais selecionados são áreas com maior relevância marítima do país, destacando assim a região metropolitana na província do Panamá (PA3, PA4, PA5, PA6, PA7 e PA8) e Colón (PA1a, PA1b e PA2); e a região fronteira com a Costa Rica (PA9, PA10, PA11 e PA12) na costa do Pacífico e do Caribe no Panamá. As amostragens foram realizadas em fevereiro de 2016, em um total de 13 pontos ao longo do litoral panamenho.

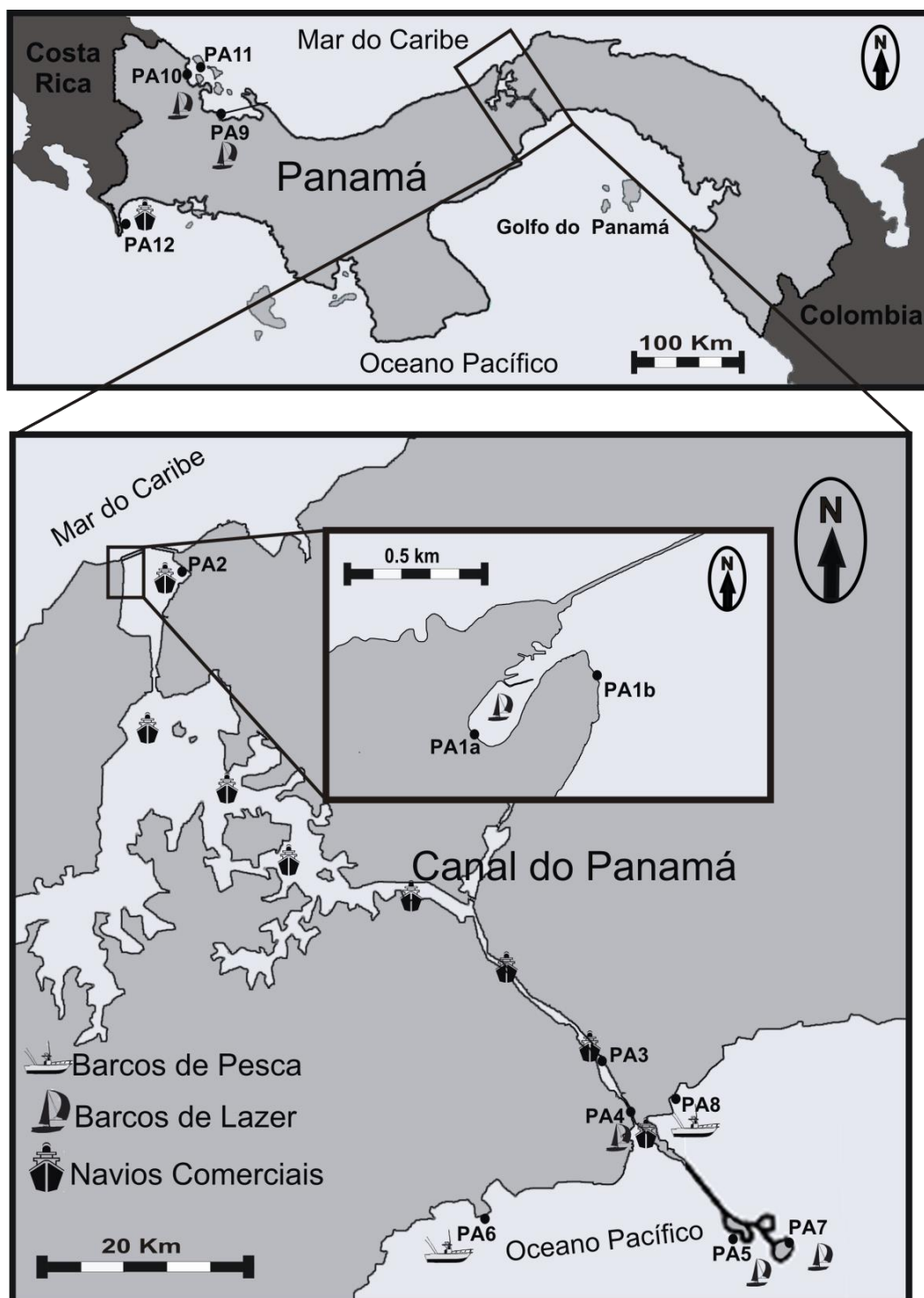
4.8. Coleta das amostras

As amostras de água foram coletadas a 0,5 m da superfície, em duplicata, utilizando um amostrador de aço inoxidável e garrafas de vidro âmbar previamente descontaminadas. Um total de 13 amostras de água do mar foram coletadas. As amostras foram refrigeradas e levadas para o Laboratório dos Recursos Aquáticos do Panamá (ARAP) para realizar o procedimento de extração em fase sólida (SPE). Após a SPE, os cartuchos foram congelados e transportados ao Laboratório LACOM, onde foi realizada a eluição dos cartuchos e posterior análise por LC-MS/MS.

As amostras de sedimento foram coletadas em duplicata com uma draga de aço inoxidável tipo “Van Veen” (KC Denmark). Para cada amostra foi coletada apenas a camada superficial (~2 cm), sendo transferida para recipientes de alumínio previamente calcinados (450 °C por 8 h). Um total de 11 amostras de sedimento foram coletadas. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas, congeladas e conduzidas ao Laboratório CONECO, onde foi realizada a liofilização e as análises de carbono orgânico total e granulometria. As amostras foram armazenadas em frascos de

vidro âmbar, sob refrigeração e em lugar protegido da luz, minimizando a fotodegradação dos compostos até a extração. No LACOM foi realizado o procedimento de extração por VA-MSPD e análise por LC-MS/MS.

Figura 6. Pontos de coleta ao longo do litoral panamenho.



Fonte: Mapa construído por Ítalo Braga de Castro e Jahir Antonio Batista Andrade, 2016

Figura 7. (A) Entrada do Canal do Panamá no Oceano Pacífico; (B) Marina Shelter no Mar do Caribe; (C) Mercado de Mariscos no Oceano Pacífico.

A



B



C



Fonte: Fotos de Jahir Antonio Batista Andrade, 2016

Tabela 7. Descrição dos locais de amostragem, amostra coletada (A: água do mar, S: sedimentos) e localização geográfica.

	Estação	Amostra coletada	Área costeira	Localização geográfica	Descrição
PA1a	Marina Shelter	A, S	Caribe	09°21'58.00"N 79°57'04.10"O	Estaleiro e embarcações de lazer.
PA1b	Saída da marina Shelter	A	Caribe	09°21'55.20"N 79°57'00.25"O	Mar aberto, saída de embarcações da marina.
PA2	Porto de <i>Colón</i>	A, S	Caribe	09°21'54.49"N 79°53'40.49"O	Embarcações comerciais, pesqueiras e estaleiros.
PA3	Porto do Panamá	A, S	Pacífico	08°57'49.70"N 79°34'21.10"O	Embarcações comerciais e pequenas embarcações pesqueiras
PA4	Ponte das Américas	A, S	Pacífico	08°56'43.20"N 79°33'54.90"O	Entrada do Canal do Panamá
PA5	Marina <i>La Playita</i>	A, S	Pacífico	08°54'33.50"N 79°31'37.60"O	Embarcações de lazer
PA6	Porto de Vacamonte	A, S	Pacífico	08°51'44.50"N 79°40'22.60"O	Porto pesqueiro no Pacífico
PA7	Marina Flamenco	A, S	Pacífico	08°54'40.20"N 79°31'18.50"O	Estaleiro e embarcações de lazer
PA8	Mercado de Mariscos	A, S	Pacífico	08°57'30.78"N 79°32'09.41"O	Porto pesqueiro, embarcações de passageiros.
PA9	<i>Chiriquí Grande</i>	A, S	Caribe	10°38'29.30"N 85°39'00.30"O	Porto de embarcações de petróleo e tanques de reserva, embarcações comerciais e de passageiros.
PA10	Almirante	A, S	Caribe	09°17'24.80"N 82°24'05.60"O	Porto de embarcações comerciais e de passageiros.
PA11	<i>Bocas del Toro</i>	A, S	Caribe	09°20'12.20"N 82°14'34.70"O	Embarcações de lazer, comerciais e de passageiros. Ponto turístico no Caribe.
PA12	<i>Puerto Armuelles</i>	A	Pacífico	08°13'34.80"N 82°52'29.60"O	Porto de embarcações de petróleo e tanques de reserva

4.9. Caracterização físico-química das águas

Antes do procedimento de extração por SPE, foram medidos os parâmetros de pH e salinidade no Laboratório da *Estación de Maricultura del Pacífico en Vacamonte* da ARAP. Para a salinidade foi utilizado um refratômetro Seawater HI 96822 (Inglaterra) e para o pH um pHmetro Denver Instrument (EUA).

4.10. Caracterização dos sedimentos

As amostras de sedimentos liofilizadas foram desagregadas usando gral e pistilo de porcelana, uma alíquota foi separada para a análise granulométrica. O restante foi desagregado até a obtenção um sedimento homogêneo para posterior análise de carbono orgânico e biocidas anti-incrustantes.

4.10.1. Análise granulométrica

A análise granulométrica do sedimento foi realizada no Laboratório CONECO, através da técnica de peneiramento. Essa metodologia consiste em caracterizar a porção de sedimento coletado de acordo com o tamanho do grão, sendo as frações classificadas como areia grossa (<1000 µm), areia intermediária (<500 µm), areia fina (<250 µm), areia muito fina (<125 µm), silte e argila (<63 µm) (GRAY e ELLIOT, 2009). As amostras, depois de secas foram desagregadas e homogeneizadas. Posteriormente 30 g de cada amostra foram lavadas através de uma peneira de 63 µm de diâmetro com água suficiente para separar uma parte da fração fina (silte e argila), o restante do sedimento foi seco numa estufa a 80 °C por dois dias.

Após a secagem, o sedimento foi desagregado, pesado e passado por um conjunto de peneiras, com malhas de diferentes diâmetros (1000 µm, 500 µm, 250 µm, 125 µm, 63 µm), sob agitação (agitador eletromagnético) durante aproximadamente 10 min. Após esse período o sedimento separado em diferentes tamanhos, foi pesado para obtenção da porcentagem de cada tipo de grão. A porção de sedimentos considerados finos (silte e argila) corresponderam as frações que ultrapassam a última peneira (63 µm) e a porção perdida na lavagem obtida pela diferença da massa inicial e final do sedimento (Equação 4).

$$\% \text{ Finos} = \frac{(m_i - m_f) + m_{<63\mu m}}{m_i} \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

m_i : massa inicial do sedimento (aproximadamente 30 g)

m_f : massa do sedimento depois da lavagem e secagem

$m_{<63\ \mu m}$: massa da fração do sedimento que ultrapassaram a última peneira (63 μm)

4.10.2. Análise de Carbono Orgânico Total

As análises do teor de carbono orgânico (COT) foram realizadas no Laboratório CONECO e no Laboratório de Oceanografia Geológica (LOG) da FURG. Aproximadamente 1 g de sedimento seco e homogêneo foi pesado em uma placa de petri (procedimento realizado em duplicata). Essas placas foram colocadas em um dessecador fechado com ácido clorídrico P.A, durante 24 – 36 h a fim de promover a descarbonatação (procedimento necessário para eliminar todo o carbono inorgânico da amostra). Após esse período as amostras foram secas em uma estufa a 60 °C até obtenção de peso constante. Para a determinação da porcentagem de carbono orgânico total, foi pesado de 2,5 a 3,0 mg de sedimento em uma cápsula de estanho, a qual teve seu %COT determinada pelo analisador de carbono total TOC-L (*Total Organic Carbon Analysis*) - SSM 5000 A, Shimadzu, Japão.

4.10.3. Efeito matriz nas amostras de sedimentos do Panamá

Devido ao fato da padronização e validação do método VA-MSPD e LC-MS/MS ter sido realizado com amostras de sedimentos superficiais oriundas de um estaleiro do Rio Grande, RS, Brasil; e a aplicabilidade ter sido realizada em amostras do Panamá, foi necessário avaliar o efeito matriz para cada amostra coletada ao longo do litoral panamenho.

O EM das amostras de sedimentos superficiais coletadas no Panamá foi avaliado comparando as áreas obtidas das soluções analíticas no solvente e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas nos extratos das matrizes (sedimentos do Panamá) fortificados na concentração de 5xLOQ. A equação 5 ilustra como o efeito matriz foi calculado.

$$EM (\%) = \frac{(C_2 - C_{Br}) - C_1}{C_1} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

C_1 : média das áreas dos picos referente a cada analito na solução padrão no solvente (5xLOQ);

C_2 : média das áreas dos picos referente a cada analito preparada no extrato da matriz (5xLOQ);

C_{Br} : média das áreas dos picos referente a cada analito da amostra não fortificada (branco).

4.10.4. Análise de partículas de tintas anti-incrustantes

A identificação e separação das partículas de tintas anti-incrustantes das amostras de sedimentos foi realizada no laboratório CONECO seguindo o protocolo descrito por TAKAHASHI *et al.* (2012). Primeiramente, as partículas de tintas anti-incrustantes foram identificadas utilizando um microscópio óptico Opton com ampliação de 5x. Posteriormente, as partículas foram separadas cuidadosamente das amostras de sedimento utilizando pinças e espátulas de aço inoxidável.

Após a separação, as partículas foram levadas para o CEME-SUL da FURG e um conjunto de 2 a 3 partículas de tintas foram colocadas nos porta amostras do microscópio e recobertas com grafite para posterior análise por Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS).

4.11. Uso do padrão de recuperação

Padrões de recuperação são definidos como compostos ou elementos puros os quais são adicionados ao material teste, no qual o comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse na forma nativa. Este composto pode ser uma versão da substância modificada isotopicamente, deve ter elevado teor de pureza, e a matriz deve ser isenta deste composto (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

Neste trabalho foi avaliado o uso do padrão de recuperação para acompanhar a eficiência de extração. Para tal, foi selecionado o diuron- d_6 , sendo este o padrão deuterado disponível no laboratório de classe química correspondente a classe das fenilureias, substância modificada isotopicamente do biocida diuron. A avaliação foi feita fortificando 250 mL de água do mar e 2 g de sedimento com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e 25 ng g^{-1} do diuron- d_6 , respectivamente. Após fortificação, as amostras foram submetidas aos procedimentos de preparo padronizados.

4.12. Análise das amostras do Panamá e controle de qualidade

As extrações dos biocidas nas amostras de água do mar foram realizadas em duplicata (duas amostras coletadas) e injetadas três vezes no sistema LC-MS/MS. A quantificação foi feita através da curva analítica preparada por padronização externa no solvente (metanol). Os resultados foram expressos como a média de duas amostras coletadas ($N=2$) $\pm$ desvio padrão em ng L^{-1} .

As amostras de sedimentos foram extraídas em triplicata ($n=3$) para cada amostra coletada (duplicata por local) e injetada três vezes no sistema LC-MS/MS. A quantificação foi feita através da curva analítica preparada por padronização externa no solvente (etanol). Os resultados foram expressos como a média de duas amostras coletadas ($N=2$) $\pm$ desvio padrão em ng g^{-1} .

O controle de qualidade foi realizado com base na análise diária de “brancos” da matriz e da vidraria para verificar e eliminar falsos positivos por contaminação no processo de extração, instrumento, materiais ou reagentes utilizados durante todo o processo.

Além disso, durante a extração de amostras, o padrão de recuperação diuron- d_6 foi adicionado, para acompanhar a eficiência da extração (item 4.11). Assim, os erros de quantificação causados por efeitos matriz, além de possíveis flutuações instrumentais puderam ser monitorados.

4.13. Análise estatística

A análise estatística dos resultados da padronização dos métodos foi realizada por ANOVA considerando as médias de triplicatas dos testes, seguida pelo teste de Tukey a um nível de 5% ($p<0,05$), utilizando o programa “Statistica” (versão 7.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Foram verificados os pré-requisitos do ANOVA: Normalidade Shapiro wilk e Homocedasticidade Levene.

4.14. Tratamento de resíduos

Os resíduos gerados por esse trabalho foram armazenados em frascos devidamente rotulados seguindo o protocolo da Escola de Química e Alimentos (EQA), sendo armazenados em espaços pré-definidos. Posteriormente os resíduos foram recolhidos e destinados pela empresa contratada pela FURG para esta finalidade.

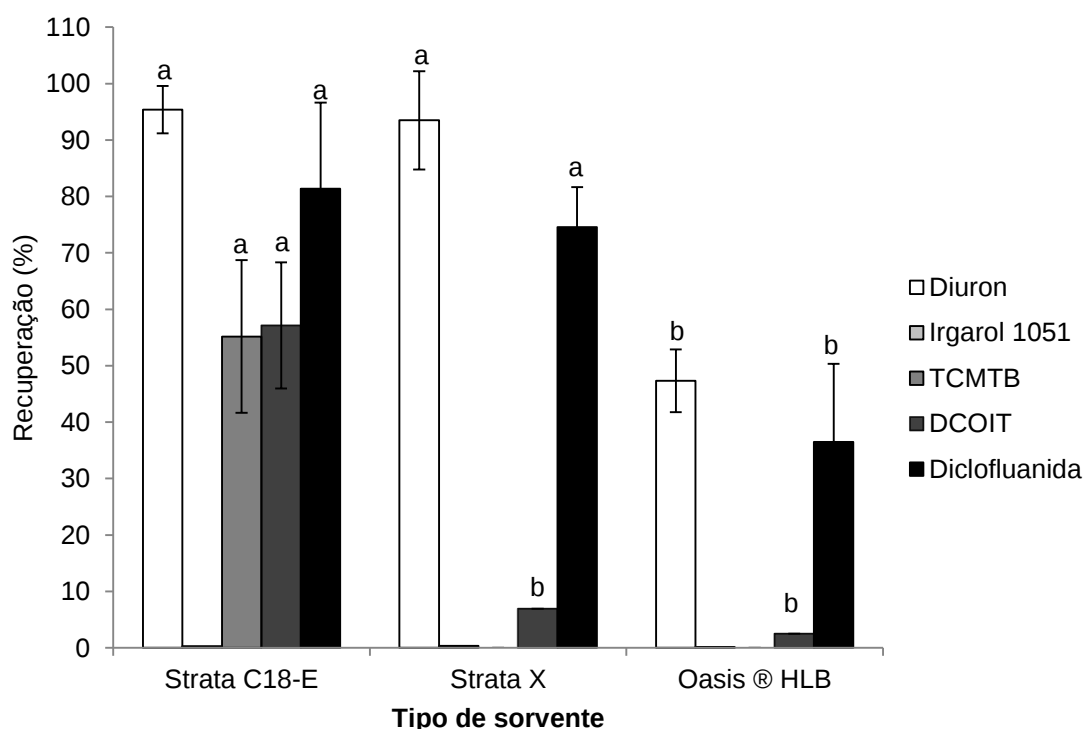
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Preparo de amostra por SPE

5.1.1. Escolha do sorvente

A seleção adequada do sorvente na SPE é fundamental na eficiência de extração dos analitos em amostras líquidas (WELLS, 2003). Strata X, Oasis® HLB e Strata C18-E foram testados e os resultados de recuperação dos analitos são apresentados na Figura 8.

Figura 8. Efeito de diferentes sorventes na eficiência de extração dos biocidas (n=3). Condições do teste: 250 mL de água destilada (pH 5,5 e salinidade 0) fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada biocida, e 2 mL de metanol como solvente de eluição. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada analito.



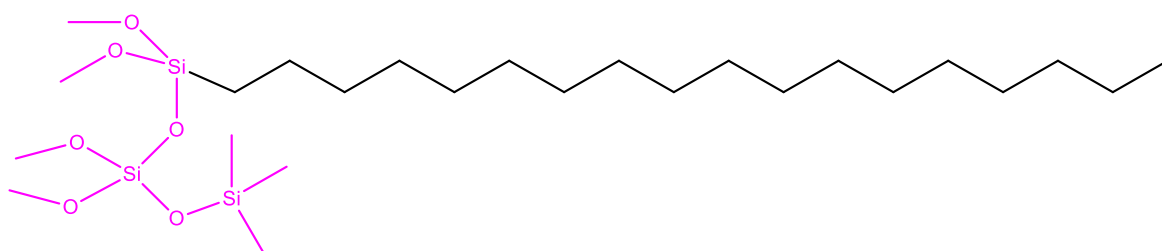
De acordo com os resultados, baixas recuperações (<35%) e diferenças significativas ($p < 0,05$) foram obtidas para os compostos DCOIT e TCMTB utilizando os sorventes Strata X e Oasis® HLB. No entanto, para o diuron, TCMTB, DCOIT e

diclofluanida maiores recuperações foram obtidas utilizando o sorvente Strata C18-E (56 – 93%). O irgarol 1051 não foi extraído em nenhum dos sorventes provavelmente devido ao efeito do pH do meio, questão que será discutida na seção 5.1.2.

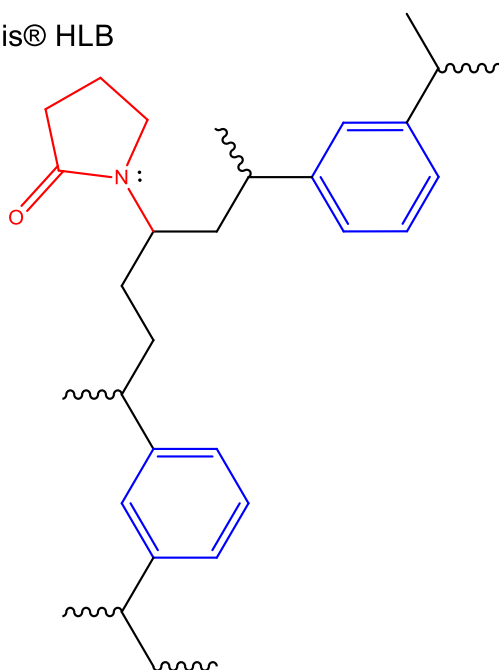
Os sorventes Strata X e Oasis HLB são sorventes poliméricos recomendados para reter moléculas de média à alta polaridade (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016). Na Figura 9 pode-se observar a estrutura química dos sorventes utilizados nos testes.

Figura 9. Estruturas químicas dos sorventes utilizados no desenvolvimento da SPE. a) Strata C18-E, b) Oasis® HLB, e c) Strata X.

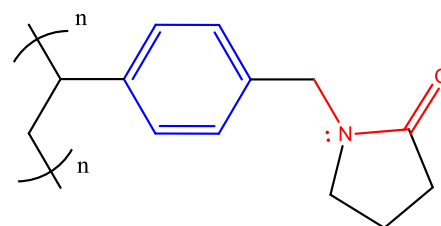
a) Strata C18-E



b) Oasis® HLB



c) Strata X



Azul: grupos hidrofóbicos (ligações pi - pi)
 Vermelho: grupos hidrofílicos (ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo)
 Roxa: estrutura química da sílica
 Preto: cadeias alquílicas (ligações hidrofóbicas)

O Strata X (Figura 9c) tem uma superfície modificada com estireno e com um grupo pirrolidona. O sorvente Oasis® HLB (Figura 9b) tem o grupo N-vinilpirrolidona (parte hidrofílica) e o monômetro divinilbenzeno (parte lipofílica). Estes dois sorventes são utilizados para extração de compostos ácidos, básicos e neutros. Os mecanismos

de retenção nestes sorventes são basicamente ligações π - π (azul); ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo (vermelho); e interações hidrofóbicas (azul e preto) (BRATKOWSKA *et al.*, 2010; ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016).

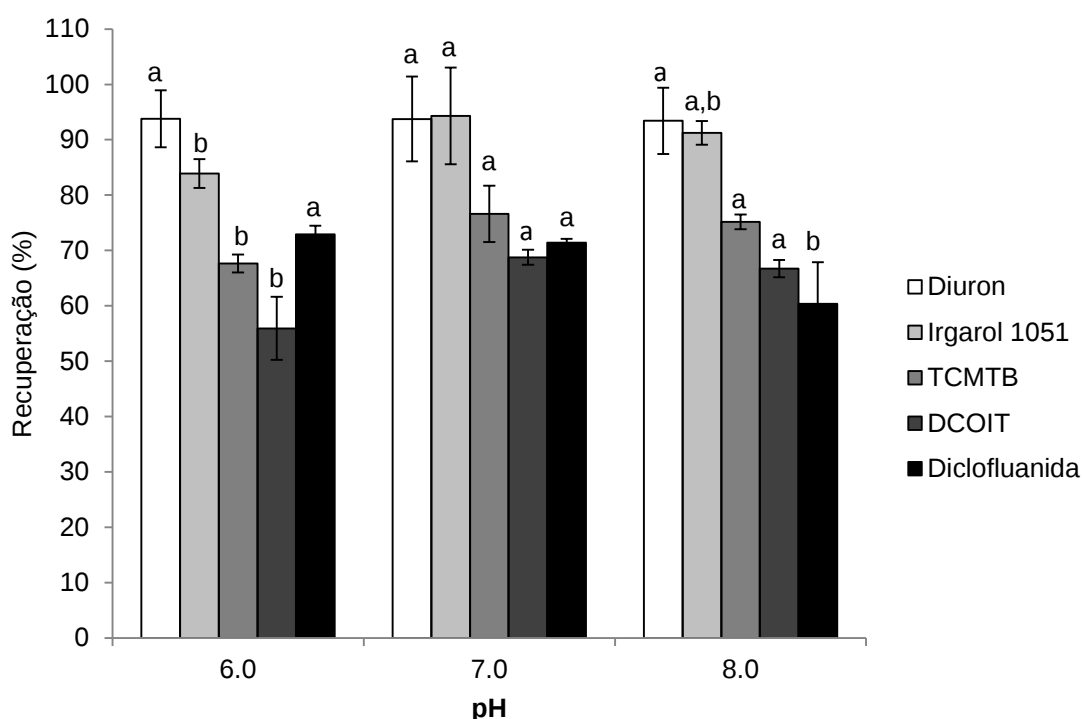
O sorvente Strata C18-E é um sorvente de sílica alquilada (Figura 9a) que é recomendado para a extração de moléculas hidrofóbicas neutras por possuir uma cadeia de 18 átomos de carbono. Os mecanismos de retenção são basicamente interações hidrofóbicas. Segundo estas estruturas químicas e levando em consideração as estruturas químicas dos compostos em estudo (Figura 2), pode-se observar que os biocidas anti-incrustantes têm maior afinidade de retenção pela cadeia alquilada que pelos outros sorventes. Os sorventes poliméricos têm na sua estrutura química espaços com grupos hidrofílicos, o que leva a uma menor eficiência de retenção dos analitos, especialmente para os compostos mais hidrofóbicos (DCOIT, diclofluanida e TCMTB). Portanto, com base nos resultados obtidos no teste de recuperação e no conhecimento da estrutura química dos sorventes e analitos, o Strata C18-E foi escolhido como sorvente para a extração dos biocidas na água do mar.

Sorventes de C18 têm sido amplamente utilizados por muitos pesquisadores para extrair biocidas anti-incrustantes de água do mar. SAPOZHNIKOVA *et al.* (2013) usaram C18 para a determinação de diuron, irgarol 1051 e o produto de degradação do irgarol 1051 (M_1) em marinas da Califórnia. Além disso, DOMINGUEZ *et al.* (2014) otimizaram um método para determinação do irgarol 1051 e o diuron em áreas costeiras de Rio Grande, RS, Brasil. Ambos autores utilizaram o sistema LC-MS/MS. SAKKAS *et al.* (2002a) utilizaram C18 para determinação de DCOIT e diclofluanida com detecção por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD, do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detector*), obtendo recuperações de 85 e 56%, respectivamente.

5.1.2. Efeito do pH na extração dos biocidas

O efeito do pH na eficiência da extração foi avaliado na faixa de 6 a 8. A Figura 10 apresenta os resultados obtidos.

Figura 10. Efeito do pH na eficiência de extração dos biocidas (n=3). Condições: 250 mL de água destilada (salinidade 0) com 10 µg L⁻¹ de cada biocida, sorvente Strata C18-E e 2 mL de metanol como solvente de eluição. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) para cada analito.

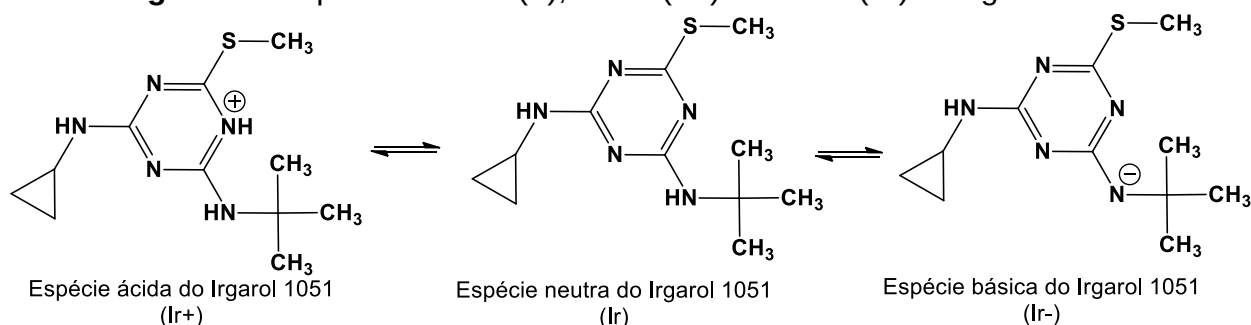


A análise estatística demonstrou que não houve diferenças significativas na eficiência de extração em pH 7 e 8 para o diuron, irgarol 1051, TCMTB e DCOIT (p>0,05). Com um pH 6, o irgarol 1051, TCMTB e DCOIT apresentaram diferenças significativas (p<0,05) em relação ao pH 7 e 8. Estes resultados indicam que valores de pH entre 7 e 8 abrangem uma maior eficiência de extração dos biocidas em estudo. Portanto, durante o processo de extração o pH deve ser aferido, e se não estiver entre 7 e 8 deve ser ajustado a esta faixa.

O efeito do pH na eficiência de extração é um dos parâmetros mais importantes na extração por SPE. Isto se deve ao fato que se um composto é ionizável (neste caso diuron e irgarol 1051), a retenção no sorvente vai depender do pH da matriz. O

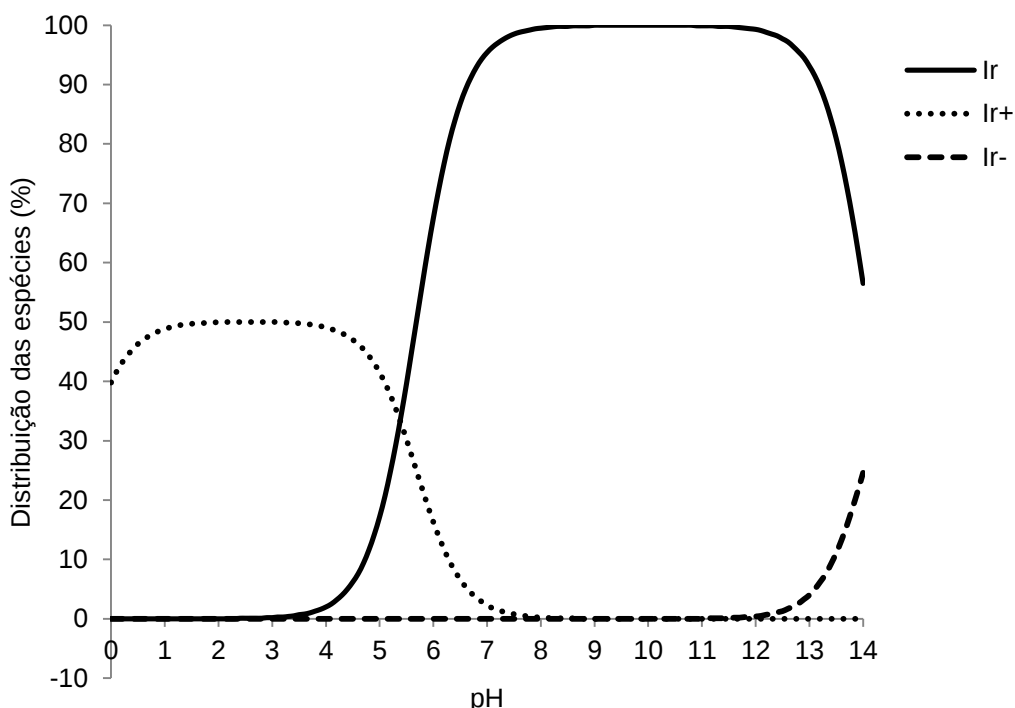
composto diuron tem um pKa de 13,18 (CHEMICALIZE, 2016a) e a espécie neutra é predominante na faixa de pH <13. Em contraste, o irgarol 1051 tem quatro valores de pKa devido a presença de cinco átomos de nitrogênio na sua estrutura molecular. Estes átomos podem atuar como base ou ácido de Lewis (doando ou recebendo prótons) conforme o pH do meio. Portanto, o valor de pKa ácido mais forte para o irgarol 1051 é de 5,68, enquanto o valor de pKa básico mais forte é de 14,13 (CHEMICALIZE, 2016b). Na Figura 11 são apresentadas três das espécies do irgarol 1051, sendo identificadas como a espécie neutra (Ir), ácida (Ir+) e básica (Ir-).

Figura 11. Espécies neutra (Ir), ácida (Ir+) e básica (Ir-) do irgarol 1051.



Na Figura 15 pode-se observar que a espécie neutra do irgarol 1051 (Ir) é predominante na faixa de pH de 7 a 12. Em faixas de pH menores que 6 é predominante a espécie ácida (Ir+) e acima de 13 a espécie básica (Ir-). Estas espécies ionizáveis têm maior interação com a água e pouca retenção pelo sorvente C18-E. Consequentemente, para que ocorra uma maior interação do irgarol 1051 e do diuron no C18-E, o meio deve estar em pH neutro a levemente básico, como foi verificado pelo ensaio realizado.

Figura 12. Distribuição das espécies predominantes do Irgarol 1051 em função do pH.



Fonte: Adaptado de CHEMICALIZE, 2016b.

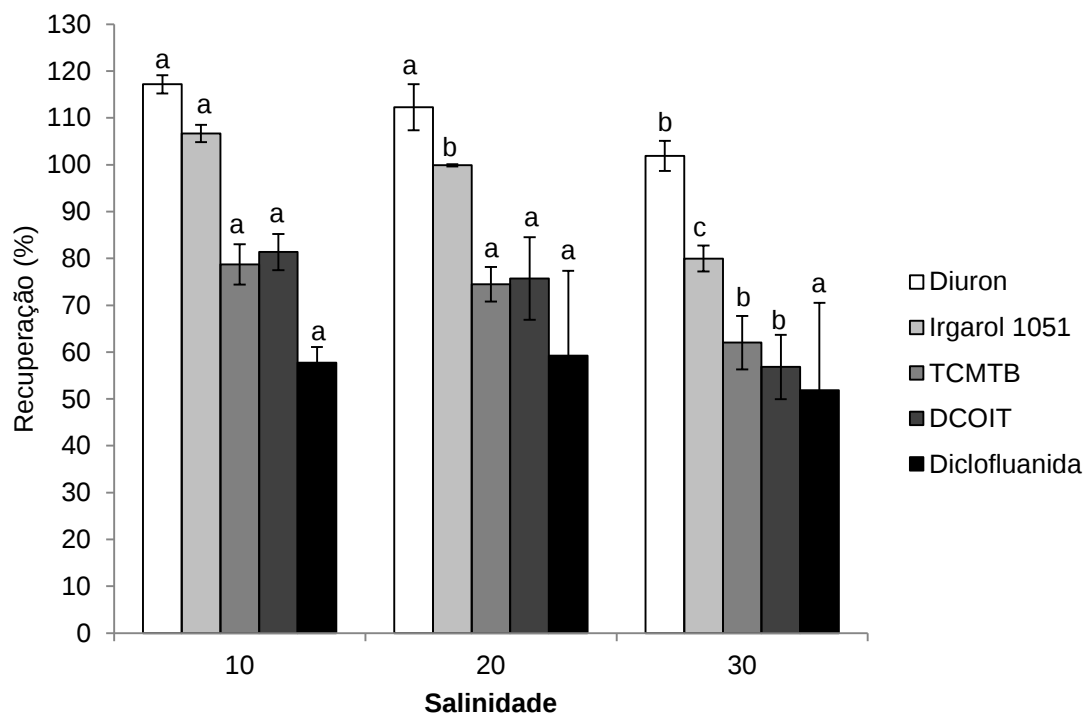
5.1.3. Efeito da salinidade

Considerando as diferentes salinidades encontradas em ambientes marinhos e estuarinos, a influência desse parâmetro sobre a eficiência de recuperação foi avaliada. Neste contexto, foram utilizadas amostras de águas com salinidades de 10, 20 e 30 conforme indicado na Figura 13.

A análise estatística demonstrou diferenças significativas na eficiência da extração do irgarol 1051 quando a salinidade foi modificada ($p < 0,05$), mostrando maior recuperação em salinidade 10. Para os outros compostos, entre salinidade 10 e 20 não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$). Para salinidade 30, as recuperações dos compostos foram significativamente mais baixas ($p < 0,05$) que as outras salinidades, com exceção da diclofluanida. No entanto, as recuperações dos analitos fortificados em água com diferentes salinidades variaram de 52 a 117% com desvios padrões relativos menores de 19%. Estes valores de recuperação são aceitáveis em procedimentos analíticos para extração em baixas concentrações e em matrizes complexas (SANTE, 2015). Portanto, amostras com salinidades entre 10 e 30 podem ser extraídas com eficiência.

Figura 13. Efeito da salinidade na eficiência de extração dos biocidas (n=3).

Condições: 250 mL de amostra de água sintética com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada biocida, sorvente Strata C18-E e 2 mL de metanol como solvente de eluição. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada analito.



5.1.4. Procedimento SPE padronizado

No procedimento SPE padronizado, as amostras de água do mar foram filtradas com membranas de acetato de celulose ($0,45 \mu\text{m}$) e os parâmetros de pH e salinidade foram medidos. Após isso, 250 mL da fração dissolvida da amostra foi fortificada com $100 \mu\text{L}$ de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de diuron- d_6 (padrão de recuperação). Os sorventes de SPE (Strata C18-E) foram condicionados com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultrapura. A amostra foi percolada através dos cartuchos de SPE a uma vazão de 10 mL min^{-1} e depois da secagem total do cartucho 2 mL de metanol foi utilizado para eluir os analitos. Uma alíquota de 1 mL do extrato final foi retirada para análise cromatográfica.

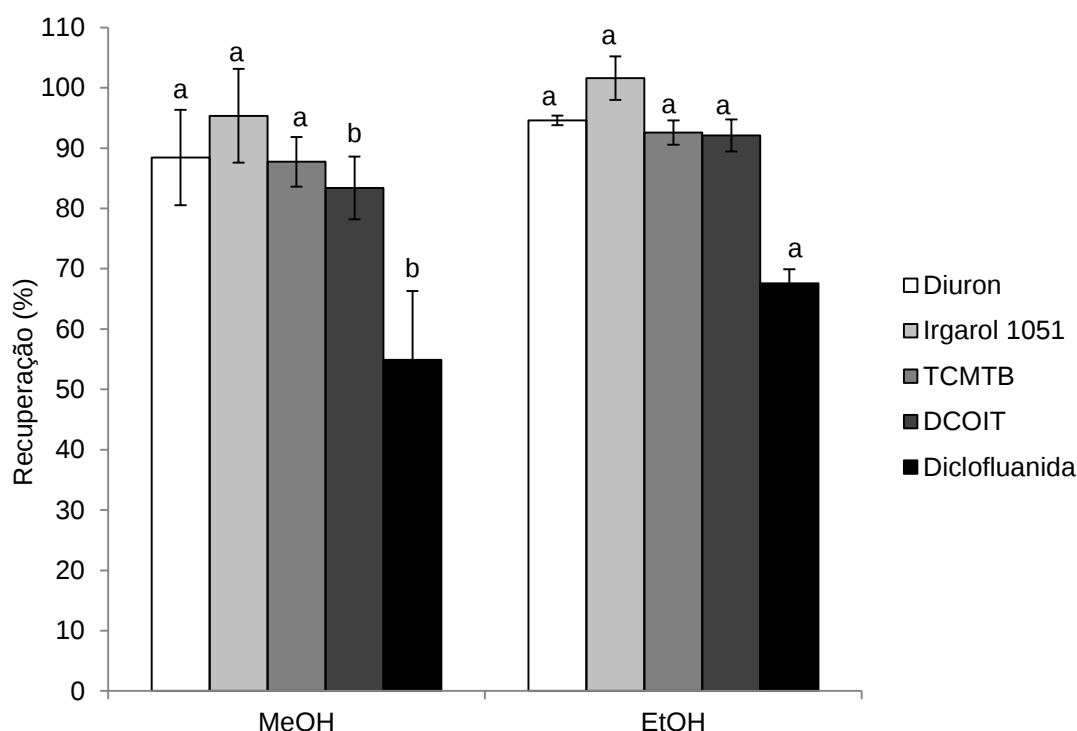
O método apresentou vantagens para a realização deste estudo, destacando-se o alto grau de concentração dos analitos (125 vezes) e a possibilidade de extração no local de amostragem para posterior análise cromatográfica no laboratório.

5.2. Preparo de amostra por VA-MSPD

5.2.1. Etanol como solvente extrator

Na Figura 14 são apresentados os resultados obtidos ao utilizar metanol e etanol como solvente extrator na VA-MSPD. A comparação entre estes solventes não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) para o irgarol 1051, diuron e TCMTB. No entanto, para o DCOIT e a diclofluanida recuperações significativamente maiores ($p<0,05$) foram obtidas empregando etanol como solvente extrator. Neste contexto, pode-se comprovar que o etanol apresentou uma ótima eficiência de extração e pode ser utilizado na VA-MSPD.

Figura 14. Efeito do tipo de solvente na eficiência de extração ($n=3$). Condições: 2 g de sedimento fortificado com 25 ng g^{-1} de cada biocida foi macerado com 0,25 g de C18, seguido da extração com 10 mL de solvente (metanol ou etanol) em tubo de fundo cônico por vórtex durante 1 min e centrifugado por 5 min a 7000 rpm. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) para cada analito.



O etanol é considerado um solvente verde já que apresenta menor toxicidade para o analista que solventes convencionais como o hexano, metanol e acetonitrila.

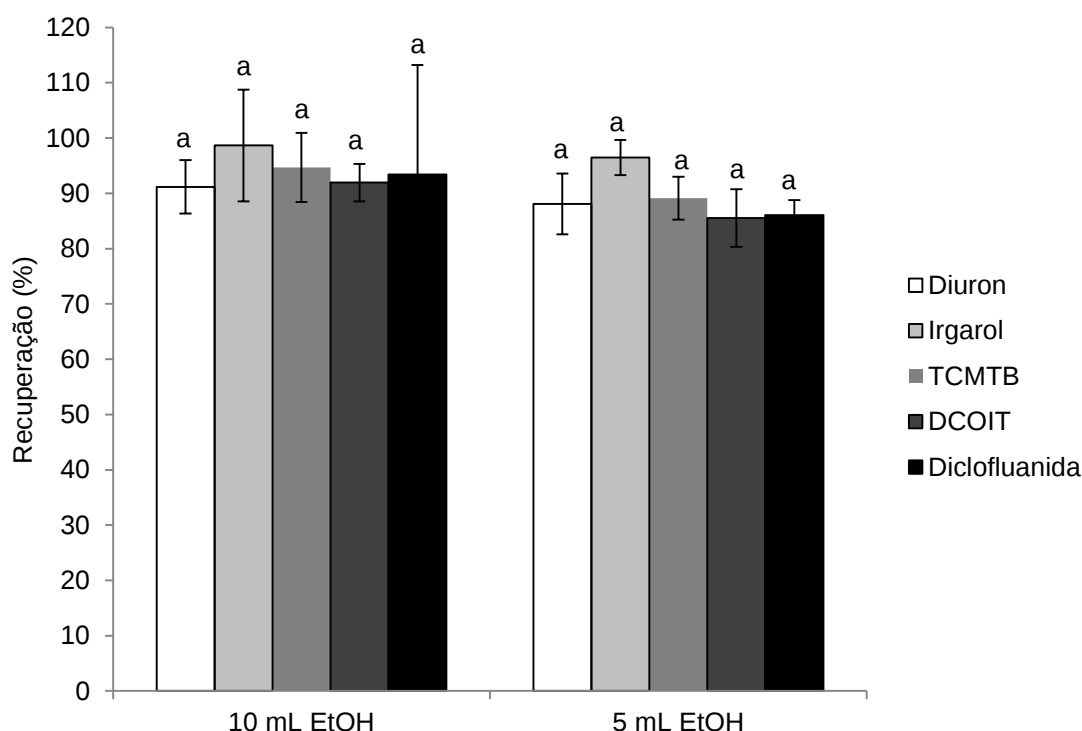
Além disso, a facilidade do seu descarte e sua produção através de ferramentas biotecnológicas favorece sua escolha como solvente extrator na VA-MSPD (RIBEIRO *et al.*, 2004; JESSOP, 2011).

5.2.2. Volume de etanol como solvente extrator

Uma vez comprovado que o etanol pode ser utilizado como solvente extrator na VA-MSPD, testou-se a eficiência de extração utilizando 5 e 10 mL (Figura 15). A comparação entre 5 e 10 mL não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) na eficiência da extração. Porém, para se obter menores limites de quantificação do método e gerar menos resíduos no trabalho, foi escolhido o uso de 5 mL de etanol.

Figura 15. Efeito do volume de etanol (EtOH) na eficiência de extração ($n=3$).

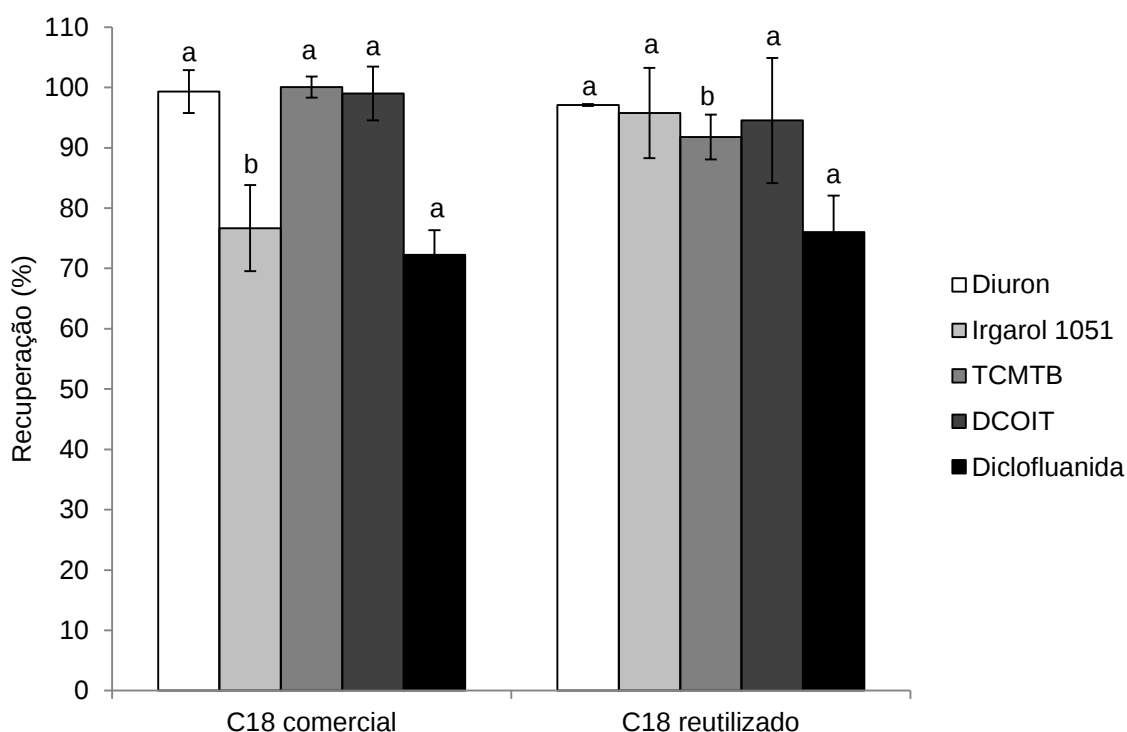
Condições: 2 g de sedimento fortificado com 25 ng g⁻¹ de cada biocida foi macerado com 0,25 g de C18, extraído com etanol (5 ou 10 mL) em tubo de fundo cônico por vórtex durante 1 min e centrifugado por 5 min a 7000 rpm. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada analito.



5.2.3. Avaliação do C18 reutilizado como suporte sólido

C18 comercial e C18 reutilizado de cartuchos de SPE foram avaliados como suporte sólido na VA-MSPD e as recuperações obtidas são apresentadas na Figura 16.

Figura 16. Efeito do tipo de suporte sólido na eficiência de extração (n=3). Condições do teste: 2,0 g de sedimento fortificado com 25 ng g⁻¹ de cada biocida foi macerado com 0,25 g de C18 (comercial e reutilizado), seguido da extração com 5 mL de etanol em tubo de fundo cônico por vórtex durante 1 min e centrifugado por 5 min a 7000 rpm. Barras de erros indicam valores de RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) para cada analito.



A comparação entre C18 comercial e reutilizado não apresentou diferença significativa (p>0,05) para os compostos diuron, DCOIT e diclofluanida. Porém, para o irgarol 1051 houve uma recuperação significativamente maior (p<0,05) utilizando o C18 reutilizado, enquanto que para o TCMTB maior recuperação foi encontrada utilizando o C18 comercial (p<0,05). Cabe ressaltar que os valores de recuperação para todos os analitos estão dentro da faixa recomendada pelos guias de validação (70 – 120%). Por isso, foi padronizado o uso de C18 reutilizado para a aplicabilidade do método, uma vez que o uso de materiais reciclados atende os princípios da química verde, reduz os

custos do método e está de acordo com o conceito dos 3 R's, ou seja, reutilizar, reduzir e reciclar (replace, reduce and recycle).

5.2.4. Procedimento VA-MSPD padronizado

No procedimento VA-MSPD padronizado, 2,0 g de amostra previamente liofilizada foi fortificada com 50 µL de 1 mg L⁻¹ de diuron-d₆ e deixado em equilíbrio por 40 minutos. A amostra foi dispersa com 0,25 g de C18 reutilizado por 5 minutos. O macerado foi transferido para um tubo de fundo cônico onde foram adicionados 5 mL de etanol, o tubo foi agitado em vórtex por 1 min e centrifugado a 7000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 1 mL do extrato final foi retirada para análise cromatográfica.

O método padronizado apresentou muitas vantagens em comparação às técnicas convencionais de extração por ultrassom, soxhlet ou agitação mecânica. Dentre as vantagens pode-se destacar um menor tempo de extração, utilização de um sorvente reutilizável (C18 proveniente de cartuchos de SPE usados, previamente descontaminados), uso de um solvente extrator menos tóxico (etanol) e a obtenção de baixos limites de quantificação para a determinação de biocidas anti-incrustantes em amostras de sedimentos marinhos. Na Figura A1 do apêndice apresenta-se um cromatograma de íons totais (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) de um padrão da mistura de biocidas em etanol e no extrato da matriz.

5.3. Validação dos métodos

5.3.1. Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)

Na Tabela 8 são apresentados os valores do LOD e LOQ instrumental e do método para a SPE e a VA-MSPD.

O documento nº 11945 de 2015 do guia de validação para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos da Comissão Europeia (SANTE) recomenda que os limites de quantificação dos métodos desenvolvidos sejam menores ou iguais aos limites máximos permitidos pelos padrões de qualidade ambiental. Neste contexto, devido ao fato de que no Panamá ou na América latina não se tem padrões de qualidade ambiental em relação aos biocidas anti-incrustantes em estudo, neste trabalho foram consideradas como ponto de referência os do Reino Unido, da Holanda e da Noruega (Tabelas 2 e 3). Assim, os métodos desenvolvidos neste estudo são adequados para o monitoramento de biocidas anti-incrustantes estudados em amostras

de água do mar e sedimentos superficiais marinhos, pois os valores de LOQ obtidos estão abaixo dos limites estabelecidos pelos padrões ambientais europeus.

Tabela 8. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumental dos métodos e legislações europeias (ERL/MPC) dos biocidas em estudo.

Biocida	Instrumental		Métodos				ERL/MPC	
	(µg L ⁻¹)		SPE (ng L ⁻¹)		VA-MSPD (ng g ⁻¹)		Água (ng L ⁻¹)	Sedimento (ng g ⁻¹)
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ		
Diuron	0,3	1,0	2,4	8,0	0,75	2,50	100	9,0
TCMTB	0,3	1,0	2,4	8,0	0,75	2,50	380	n.a
Irgarol 1051	0,03	0,1	0,2	0,8	0,08	0,25	24	1,4
Diclofluanida	0,3	1,0	2,4	8,0	0,75	2,50	n.a	n.a
DCOIT	0,15	0,5	1,2	4,0	0,38	1,25	n.a	n.a

ERL: limites de risco ambiental do Reino Unido, e MPC: concentração máxima permitida da Holanda (CROMMENTUIJN *et al.*, 2000; VAN WEZEL e VAN VLAARDINGEN, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2009).
n.a: não aplicável.

5.3.2. Curva analítica e linearidade

A faixa linear de todas as curvas analíticas foi avaliada a partir do LOQ do método em cinco níveis de concentração (LOQ, 5, 10, 20 e 50 vezes superior ao LOQ) para os métodos da SPE e VA-MSPD. Nas Tabelas 9 e 10 estão apresentadas as equações das retas e os valores de coeficiente de correlação linear (*r*) para as curvas no solvente e no extrato por padronização externa, as quais foram avaliadas neste estudo para ambos os métodos.

A partir dos resultados obtidos pelas equações das retas para o método da SPE e da VA-MSPD, pode-se concluir que o modelo linear é adequado, já que os coeficientes de correlação (*r*) foram maiores que 0,99 para todas as curvas analíticas construídas.

Tabela 9. Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas no solvente e no extrato para o método SPE LC-MS/MS.

Biocida	Curva no solvente (MeOH)	r	Curva no extrato	r
Diuron	$y=76387x+18,51$	0,9995	$y=89094x+20,25$	0,9972
TCMTB	$y=214771x+175,67$	0,9993	$y=210633x+4,36$	0,9989
Irgarol 1051	$y=3 \times 10^6 x+213,42$	0,9912	$y=2,9 \times 10^6 x+248,33$	0,9973
Diclofluanida	$y=36935x+31,47$	0,9991	$y=34378x+28,05$	0,9937
DCOIT	$y=67582x+28,64$	0,9968	$y=83255x+2,81$	0,9978

Tabela 10. Equações das retas e coeficiente de correlação das curvas analíticas no solvente e no extrato para o método VA-MSPD LC-MS/MS.

Biocida	Curva no solvente (EtOH)	r	Curva no extrato	r
Diuron	$y=71487x+23,23$	0,9981	$y=68855x+11,37$	0,9996
TCMTB	$y=237144x+63,70$	0,9982	$y=221146x+42,38$	0,9993
Irgarol 1051	$y=2,2 \times 10^6 x+98,07$	0,9987	$y=2,1 \times 10^6 x+376,12$	0,9979
Diclofluanida	$y=49637x+6,91$	0,9981	$y=43075x+17,94$	0,9991
DCOIT	$y=100837x+17,74$	0,9981	$y=87205x+28,39$	0,9981

5.3.3. Exatidão

Para ambos os métodos, a exatidão foi avaliada em termos de recuperação (R) ao nível do LOQ, 5 e 10 vezes maior que o LOQ de cada composto. Na Tabela 11 são apresentados os valores de recuperação para cada nível de concentração.

As recuperações para os biocidas em estudo foram entre 75 e 117% com RSD menores que 15% para o método da SPE e recuperações entre 72 e 119% com RSD menores que 18% para a VA-MSPD. Estes valores indicam que ambos os métodos propostos apresentaram resultados satisfatórios e estão de acordo com a faixa estabelecida (de 70 a 120% com precisão <20%) (SANTE, 2015).

Além disso, os resultados obtidos são semelhantes aos obtidos em outros métodos desenvolvidos para análise de biocidas anti-incrustantes em amostras ambientais. SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.* (2011a) e SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*

(2011c) desenvolveram métodos para a extração de biocidas anti-incrustantes (diuron, irgarol 1051, TCMTB e diclofluanida) em amostras de água do mar e sedimento marinho, respectivamente. Valores de recuperação entre 73 e 101% com desvio padrão menores que 7% foram obtidos empregando a SPE para amostras de água do mar. Para amostras de sedimentos marinhos, os valores de exatidão ficaram 76 e 100% e precisão entre 2,5 e 6,5% aplicando um método baseado na extração assistida por micro-ondas.

Tabela 11. Recuperação (R%) e desvio padrão relativo (RSD) de cada analito para SPE e VA-MSPD nos três níveis de fortificação.

Biocida	Nível de fortificação (ng L ⁻¹)	SPE		Nível de fortificação (ng g ⁻¹)	VA-MSPD	
		R (%)	RSD (%)		R (%)	RSD (%)
Diuron	8,0	106	12	2,5	98	2
	40,0	111	9	12,5	99	4
	80,0	117	2	25,0	106	9
TCMTB	8,0	89	10	2,5	97	2
	40,0	81	8	12,5	100	2
	80,0	88	15	25,0	98	2
Irgarol 1051	0,8	116	3	0,25	84	18
	4,0	81	8	1,25	77	7
	8,0	88	15	2,5	70	4
Diclofluanida	8,0	92	9	2,5	109	16
	40,0	83	7	12,5	72	4
	80,0	75	1	25,0	104	2
DCOIT	4,0	113	13	1,25	119	8
	20,0	88	8	6,25	99	4
	40,0	88	5	12,5	101	7

5.3.4. Precisão

Os valores de RSD para os estudos de repetitividade (RSDr) ficaram na faixa de 1 – 15% e 2 – 18% para o método empregando SPE e VA-MSPD, respectivamente

(Tabela 12). Para a precisão intermediária os valores de (RSDpi) variaram de 1 – 15% e 1 – 12% para o método da SPE e da VA-MSPD, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12. Nível de fortificação, recuperação (R) e precisão intermediária (RSDpi) para os analitos.

Biocida	Nível de fortificação (ng L ⁻¹)	SPE		Nível de fortificação (ng g ⁻¹)	VA-MSPD	
		R (%)	RSDpi (%)		R (%)	RSDpi (%)
Diuron	40,0	94	10	12,5	75	4
	80,0	100	7	25,0	72	1
TCMTB	40,0	94	11	12,5	70	4
	80,0	76	13	25,0	74	1
Irgarol 1051	4,0	107	15	1,25	94	9
	8,0	73	5	2,5	117	12
Diclofluanida	40,0	97	10	12,5	91	2
	80,0	74	1	25,0	87	11
DCOIT	20,0	72	7	6,25	81	4
	40,0	71	11	12,5	76	1

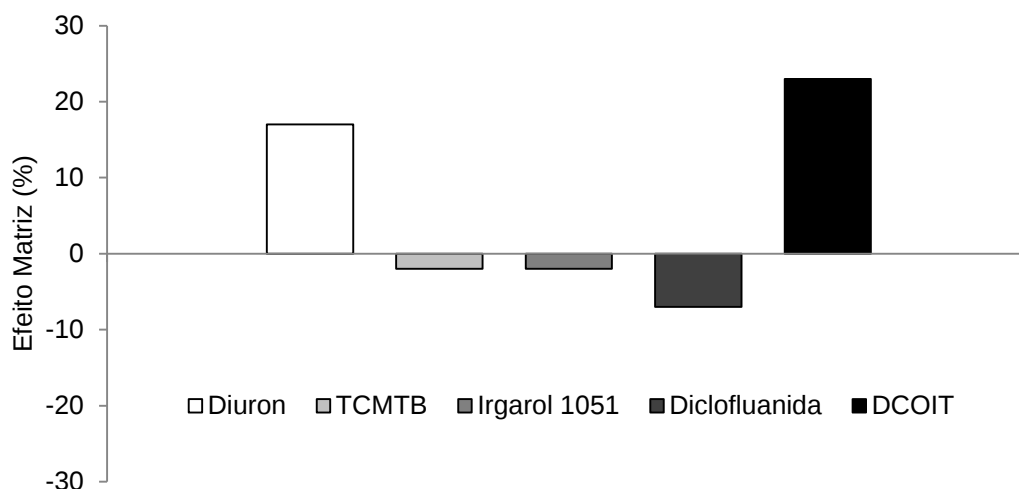
De acordo com os resultados obtidos verificou-se que a repetitividade e a precisão intermediária foram adequadas para as determinações analíticas em estudo. Os métodos estão de acordo com os parâmetros sugeridos por SANTE (2015) (RSDr e RSDpi ≤ 20%).

5.3.5. Efeito Matriz

A existência de efeito matriz para ambos os métodos da SPE e VA-MSPD foi avaliado através das inclinações das curvas de calibração no solvente e no extrato na matriz, de acordo com a equação descrita por ECONOMOU *et al.* (2009) (Equação 4).

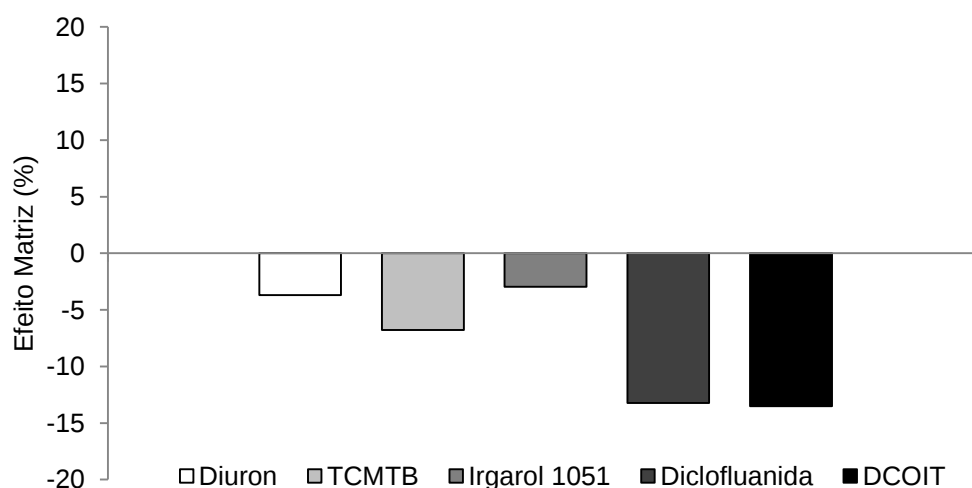
Na Figura 20 é apresentado o efeito matriz para o método da SPE para cada analito, sendo observado o maior enriquecimento de sinal para o DCOIT (+23%) e maior supressão para a diclofluanida (-7%). Para os demais compostos observa-se um efeito matriz de +17% para a diuron, e -2% para o irgarol 1051 e TCMTB.

Figura 17. Efeito matriz (%) nas amostras de água do mar dos biocidas anti-incrustantes em estudo utilizando o método SPE e LC-MS/MS.



Na Figura 21 é apresentado o efeito matriz para o método da VA-MSPD para cada analito, sendo observada supressão de sinal para todos os analitos na faixa de -14 até -3%. De acordo com ECONOMOU *et al.* (2009) os valores de efeito matriz entre -20% e +20% são considerados baixos.

Figura 18. Efeito matriz (%) nas amostras de sedimentos superficiais dos biocidas anti-incrustantes em estudo utilizando o método VA-MSPD e LC-MS/MS.



Como indicado nas Figuras 20 e 21, os valores calculados para todos os analitos indicam um baixo efeito matriz (-20 a +20%), com exceção do DCOIT na SPE que foi

de +23%. Valores baixos de efeito matriz indicam que os componentes presentes no extrato de água do mar e dos sedimentos superficiais não interferem significativamente na análise cromatográfica.

Dessa maneira, para a quantificação dos biocidas anti-incrustantes em estudo em amostra de água do mar e nos sedimentos superficiais por LC-MS/MS utilizando a SPE e VA-MSPD, respectivamente, não é necessário utilizar a curva analítica preparada por padronização externa no extrato da matriz.

5.4. Amostras de água

5.4.1. Salinidade e pH

As amostras de água do mar obtidas no litoral panamenho foram caracterizadas com relação à salinidade e o pH. Esta caracterização foi feita no laboratório, após uma ou duas horas da coleta, para efeito do método de extração por SPE. Os resultados são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Salinidade e pH das amostras de água do mar

Ponto		Salinidade	pH
PA1a	Marina Shelter	32	7,9
PA1b	Marina Shelter saída do mar	33	7,9
PA2	Porto do <i>Colón</i>	32	8,0
PA3	Porto do Panamá	32	7,3
PA4	Ponte das Américas	33	7,2
PA5	<i>La Playita</i> saída do mar	36	7,7
PA6	Porto de Vacamonte	35	7,7
PA7	Flamenco	36	7,8
PA8	Mercado de Mariscos	34	7,8
PA9	<i>Chiriquí Grande</i>	30	7,7
PA10	Almirante	20	7,4
PA11	<i>Bocas del Toro</i>	25	7,7
PA12	<i>Puerto Armuelles</i>	22	7,8

Estes resultados estão dentro dos valores para os quais o procedimento foi padronizado. Sendo assim, foi possível realizar a extração dos biocidas anti-incrustantes nas amostras de água sem necessidade de ajustes nesses parâmetros.

5.4.2. Biocidas anti-incrustantes na fração dissolvida na água do mar

Neste estudo, DCOIT, TCMTB e diclofluanida não foram detectados (<LOD) em nenhuma amostra de água do mar coletada nas áreas costeiras do Panamá. Porém, concentrações dos biocidas irgarol 1051 e diuron variaram entre <0,8 a 5,0 ng L⁻¹ e <8,0 a 70 ng L⁻¹, respectivamente, em quatro dos treze pontos amostrados. Para todas as amostras de água do mar as recuperações do padrão diuron-d₆ foram na faixa de 81% a 117%, com desvio padrão <10% (Tabela 14).

Tabela 14. Níveis de biocidas anti-incrustantes detectados nas amostras de água do mar das áreas costeiras do Panamá e percentual de recuperação do diuron-d₆.

Ponto	Costa	Média (N=2) ± desvio padrão (ng L ⁻¹)		R (%) ± RSD (%)	
		Irgarol 1051	Diuron	Diuron-d ₆	
PA1a	Marina Shelter	Caribe	5,0 ± 0,3	35,3 ± 3,3	117 ± 7
PA1b	Marina Shelter (saída)	Caribe	<0,8	<8,0	103 ± 4
PA2	Porto de Colón	Caribe	<0,8	<8,0	110 ± 5
PA3	Porto do Panamá	Pacífico	n.d	n.d	104 ± 8
PA4	Ponte das Américas	Pacífico	n.d	n.d	97 ± 6
PA5	La Playita saída do mar	Pacífico	n.d	n.d	115 ± 8
PA6	Porto de Vacamonte	Pacífico	n.d	n.d	103 ± 8
PA7	Flamenco	Pacífico	2,2 ± 0,2	70,0 ± 4,1	101 ± 8
PA8	Mercado de Mariscos	Pacífico	n.d	n.d	105 ± 6
PA9	Chiriquí Grande	Caribe	n.d	n.d	104 ± 7
PA10	Almirante	Caribe	n.d	n.d	93 ± 8
PA11	Bocas del Toro	Caribe	n.d	n.d	87 ± 9
PA12	Puerto Armuelles	Pacífico	n.d	n.d	81 ± 10

n.d: não detectado (<LOD), R: percentual de recuperação (%), RSD: desvio padrão relativo (%)

Na costa do Pacífico, a concentração mais elevada de diuron (70,0 ± 4,1 ng L⁻¹) (Apêndice, Figura A4) e irgarol 1051 (2,2 ± 0,2 ng L⁻¹) foi detectada na marina do Flamenco (PA7). Essa marina está localizada em uma das três ilhas do *Amador* (Baía do Panamá), perto da entrada do Canal do Panamá. A área está rodeada por marinas e estaleiros e é um ponto estratégico para vários destinos do Oceano Pacífico. Assim, é provável que a fonte de contaminação neste ponto esteja associada às embarcações de lazer, uma vez que as amostras de água foram coletadas na parte interna dessa marina próxima à área de atracação.

Em contraste, o irgarol 1051 e o diuron não foram detectados (<LOD) nos outros seis pontos da costa do Pacífico, os quais incluem áreas na entrada (PA5) e mais próximas (PA3 e PA4) do Canal do Panamá, e pontos associados com portos comerciais (PA12) e portos pesqueiros (PA8 e PA6). Portanto, estes resultados indicam que os navios que atravessam o Canal do Panamá não estão contribuindo com níveis significativos de biocidas anti-incrustantes à fração dissolvida da coluna d'água, ou a hidrodinâmica nessas áreas é suficientemente elevada para diluir os analitos abaixo dos limites de detecção do método aplicado. Resultados semelhantes foram obtidos em zonas costeiras europeias, onde os níveis de contaminação por biocidas anti-incrustantes em marinas foram mais elevadas do que em áreas influenciadas por navios comerciais (THOMAS *et al.*, 2001; LAMOREE *et al.*, 2002).

Na costa do Caribe, níveis do diuron ($35,6 \pm 3,3 \text{ ng L}^{-1}$) e do irgarol 1051 ($5,0 \pm 0,3 \text{ ng L}^{-1}$) (Apêndice, Figura A6) foram detectados em amostras de água coletadas na parte mais interna da marina Shelter (PA1a), uma marina particular localizada no *Fuerte de San Lorenzo*, província do *Colón*. Esses contaminantes também foram detectados, embora abaixo do limite de quantificação <LOQ, na saída da marina Shelter (PA1b). Porém, níveis de biocidas anti-incrustantes foram maiores dentro da marina devido à hidrodinâmica menos intensa e ao elevado tempo de residência dos contaminantes nessa área confinada. Além disso, embarcações sob manutenção e reparação e embalagens de tintas anti-incrustantes foram observadas dentro da área da marina durante a amostragem. Estas observações indicam que a marina Shelter é uma fonte de irgarol 1051 e diuron ao ambiente costeiro circundante. De fato, marinas têm sido reportadas como focos relevantes de contaminação por biocidas anti-incrustantes (GOUGH *et al.*, 1994; BOWMAN *et al.*, 2003; SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013).

Irgarol 1051 e diuron também foram detectados abaixo do limite de quantificação (<0,8 e <8,0 ng L^{-1} , respectivamente) em amostras coletadas no porto do *Colón*. Por outro lado, diuron e irgarol 1051 não foram detectados em locais próximos da linha da fronteira com a Costa Rica (PA9, PA10 e PA11). Portanto, níveis ambientais destes contaminantes são aparentemente influenciados pelo tipo e intensidade de embarcações, uma vez que apenas poucas embarcações de lazer foram observadas nestes locais em comparação com a marina Shelter. Além disso, o tráfego local nessa

região é composto principalmente por embarcações de passageiros, as quais possuem cascos de alumínio ou fibra de vidro que normalmente não utilizam tintas anti-incrustantes.

Equipamentos pesados e de dragagem foram observados trabalhando no projeto de expansão do Canal do Panamá durante o período de estudo, deixando a coluna de água em constante movimento e consequentemente produzindo resuspensão dos sedimentos. Apesar disso, o TCMTB, DCOIT e diclofluanida não foram detectados na coluna de água provavelmente devido a suas propriedades físico-químicas, como a baixa solubilidade na água do DCOIT e diclofluanida ($0,0065$ e $0,0060$ mg L^{-1} , respectivamente) (CASTRO *et al.*, 2011) e um elevado coeficiente de partição entre a água e o carbono orgânico do solo do TCMTB, DCOIT e diclofluanida ($\log K_{oc}$ – 2,7; 4,2; 3,2, respectivamente). Essas características sugerem o particionamento preferencial destes biocidas no material particulado (material em suspensão e sedimentos) (YEBRA *et al.*, 2004). Além disso, o tempo de meia vida relativamente curto do TCMTB, DCOIT e diclofluanida na água do mar (<3,9 h, <24 h e <53 h, respectivamente) indica uma rápida degradação dos compostos por hidrólise ou fotólise (SAKKAS *et al.*, 2001; SAKKAS *et al.*, 2002a; CASTRO *et al.*, 2011). Adicionalmente, estes compostos podem não ser os biocidas mais comumente utilizados nas formulações de tintas anti-incrustantes. Mesmo assim, é de suma importância avaliar a ocorrência destes biocidas na coluna d'água para verificar os níveis de contaminação e especialmente os aportes recentes no meio ambiente.

Apesar do fato que o DCOIT, TCMTB e diclofluanida não foram detectados nas amostras de água do mar, alguns estudos em diferentes partes do mundo reportaram níveis consideráveis. Um estudo feito na Grécia detectou os compostos DCOIT e diclofluanida em amostras de água do mar, nas concentrações entre <0,64 a 49 ng L^{-1} e <1,0 a 284 ng L^{-1} , respectivamente (SAKKAS *et al.*, 2002a). STEEN *et al.* (2004) detectaram concentrações do DCOIT entre 5 e 283 ng L^{-1} em um porto na Dinamarca, onde as amostras foram coletadas na proximidade de dois navios recém pintados e as concentrações foram medidas imediatamente após a amostragem devido à rápida taxa de degradação do DCOIT na coluna d'água. MOCHIDA *et al.* (2015) analisaram a distribuição espacial do DCOIT na baía do Hiroshima (Japão) para determinar o risco ambiental em organismos marinhos, e concentrações entre 0,1 e 11 ng L^{-1} foram

detectadas. Além disso, diversos estudos desenvolveram métodos analíticos para determinar TCMTB, diclofluanida e DCOIT em amostras de água do mar, mas os níveis ambientais são baixos e a detecção é geralmente abaixo dos limites de detecção (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011b; KIM *et al.*, 2014).

Os compostos diuron e irgarol 1051 são os biocidas anti-incrustantes de reforço mais comumente detectados em ambientes aquáticos influenciados por atividades marítimas no mundo (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013; SALEH *et al.*, 2016; SHEIKH *et al.*, 2016) e, paralelamente, foram os biocidas mais detectados nas amostras de água do mar coletadas no Panamá, com marinas e portos atuando como principais fontes de contaminação. Apesar disso, as concentrações do irgarol 1051 e de diuron na fração dissolvida das amostras de água do mar foram menores do que os limites estabelecidos pelo Reino Unido (CRESSWELL *et al.*, 2006) e pela autoridade holandesa (LAMOREE *et al.*, 2002).

Os níveis de irgarol 1051 detectados neste estudo foram menores que outros reportados nas áreas costeiras da Malásia (5 – 2021 ng L⁻¹) (ALI *et al.*, 2013), dos Estados Unidos (2 – 254 ng L⁻¹) (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013), e da Espanha (2,4 – 147 ng L⁻¹) (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011b); e comparáveis a valores reportados na Coreia do Sul (<0,2 – 14 ng L⁻¹) (KIM *et al.*, 2014) e no Brasil (<1,3 – 6 ng L⁻¹) (DOMINGUEZ *et al.*, 2014). Locais onde o irgarol 1051 excedeu o limite de 24 ng L⁻¹ (MPC proposto pelas autoridades holandesas e EQS do Reino Unido) são considerados altamente contaminados (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011b; ALI *et al.*, 2013).

Resultados similares têm sido reportados em diferentes partes do mundo. SHEIKH *et al.* (2016) estudaram a variação espacial do biocida irgarol 1051 em amostras de água do mar oriundas de ecossistemas de recifes de corais em Zanzibar, África, onde níveis entre 1,35 a 15,44 ng L⁻¹ foram detectos. Estes autores concluem que atividades de embarques em portos e estaleiros, e atividades de turismo são as principais fontes de contaminação por irgarol 1051 nestes ecossistemas. No entanto, os níveis não foram considerados alarmantes em termos de toxicidade aguda para os corais da região.

Por outro lado, níveis de diuron detectados na marina do Flamenco (PA7, 70,0 ± 4,1 ng L⁻¹) foram maiores que as concentrações detectadas no Irã (<4,8 – 29 ng L⁻¹)

(SALEH *et al.*, 2016) e no Brasil ($<1,3 - 21 \text{ ng L}^{-1}$) (DOMINGUEZ *et al.*, 2014); comparáveis com os dos Estados Unidos ($<2 - 68 \text{ ng L}^{-1}$) (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013); e menores que os da Espanha ($2,3 - 203 \text{ ng L}^{-1}$) (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011b), da Malásia ($1 - 285 \text{ ng L}^{-1}$) (ALI *et al.*, 2014) e da Coreia do Sul ($13 - 1360 \text{ ng L}^{-1}$) (KIM *et al.*, 2014). Conforme aos padrões de qualidade ambiental do Reino Unido, locais onde o diuron excedeu o valor de 100 ng L^{-1} foram considerados altamente contaminados.

Entre alguns estudos onde reportaram elevadas concentrações de diuron ressalta aquele realizado em locais sob a influência de portos pesqueiros na Coreia do Sul ($13 - 1360 \text{ ng L}^{-1}$) (KIM *et al.*, 2014), sendo níveis muito maiores que os reportados no presente estudo. O estudo temporal na Coreia do Sul foi avaliado durante o período de um ano e o 73% das amostras analisadas excederam o padrão de qualidade ambiental do Reino Unido (100 ng L^{-1}) e da Holanda para o diuron (430 ng L^{-1}). Além disso, concentrações deste composto foram maiores no inverno, sugerindo um menor tempo de residência na coluna d'água no verão. Os autores concluem que o diuron tornou-se o biocida anti-incrustante de terceira geração de maior preocupação nas águas costeiras coreanas desde o banimento regional do TBT em 2000.

Deve ser salientado que, apesar dos resultados terem demonstrado a ampla utilização de alguns destes biocidas em marinas, os níveis podem variar significativamente com os pontos de amostragens e sua proximidade relativa com fontes diretas de contaminação. Assim, os contaminantes podem ser diluídos e/ou degradados a níveis menores, tal como pode ser observado em PA1a ($35,6 \pm 3,3 \text{ ng L}^{-1}$) e PA1b ($<8,0 \text{ ng L}^{-1}$) na Marina Shelter. Além disso, níveis ambientais podem variar conforme a temporada de aplicação das tintas anti-incrustantes nas embarcações, e a exposição em longo prazo de misturas complexas de contaminantes podem desencadear efeitos biológicos adversos para os organismos marinhos.

5.5. Sedimentos superficiais

5.5.1. Teor de finos e carbono orgânico total

A presença de carbono orgânico nos sedimentos marinhos e estuarinos favorece a absorção de contaminantes com características hidrofóbicas em sedimentos (RÜDEL, 2003). Sendo assim, biocidas anti-incrustantes tendem a se acumular

preferencialmente na fração fina deste compartimento (<63 µm) (RADKE *et al.*, 2012). Portanto, estes parâmetros são de suma importância para a avaliação da qualidade ambiental dos sedimentos marinhos e estuarinos (HALL e ANDERSON, 2014).

Os valores de carbono orgânico total e teor de finos foram determinados nas amostras de sedimentos do Panamá (Tabela 15). O teor de finos (<63 µm) variou entre 6,49 e 69,18%, sendo os maiores teores dessa fração encontrados na entrada do Canal do Panamá (PA3, PA4 e PA5), em marinas (PA1 e PA7), e em um porto (PA8). A distribuição do carbono orgânico total (COT) variou entre 0,35 e 2,06%, com exceção no sítio PA10 (Almirante) com um valor de 5,15%, onde foi observada uma elevada influência de descarga de esgoto doméstico.

Tabela 15. Percentual de carbono orgânico total (COT) e de finos das amostras de sedimentos coletadas no Panamá e da amostra utilizada como referência nos testes de padronização e validação.

Ponto		COT (%)	Finos (%)
*RG1	Estaleiro Irmãos Fernandez	1,14	16,23
PA1a	Marina Shelter	0,99	55,61
PA2	<i>Colón</i>	0,98	38,90
PA3	Porto do Panamá	0,86	47,98
PA4	Ponte das Américas	1,18	69,18
PA5	<i>La Playita</i> saída do mar	0,88	52,81
PA6	Porto de Vacamonte	1,33	39,79
PA7	Marina Flamenco	0,35	59,14
PA8	Mercado de Mariscos	1,59	55,89
PA9	<i>Chiriqui Grande</i>	0,49	6,49
PA10	<i>Almirante</i>	5,15	23,68
PA11	<i>Bocas del Toro</i>	2,06	27,53

*RG1: amostra utilizada para padronização e validação do método por VA-MSPD e LC-MS/MS

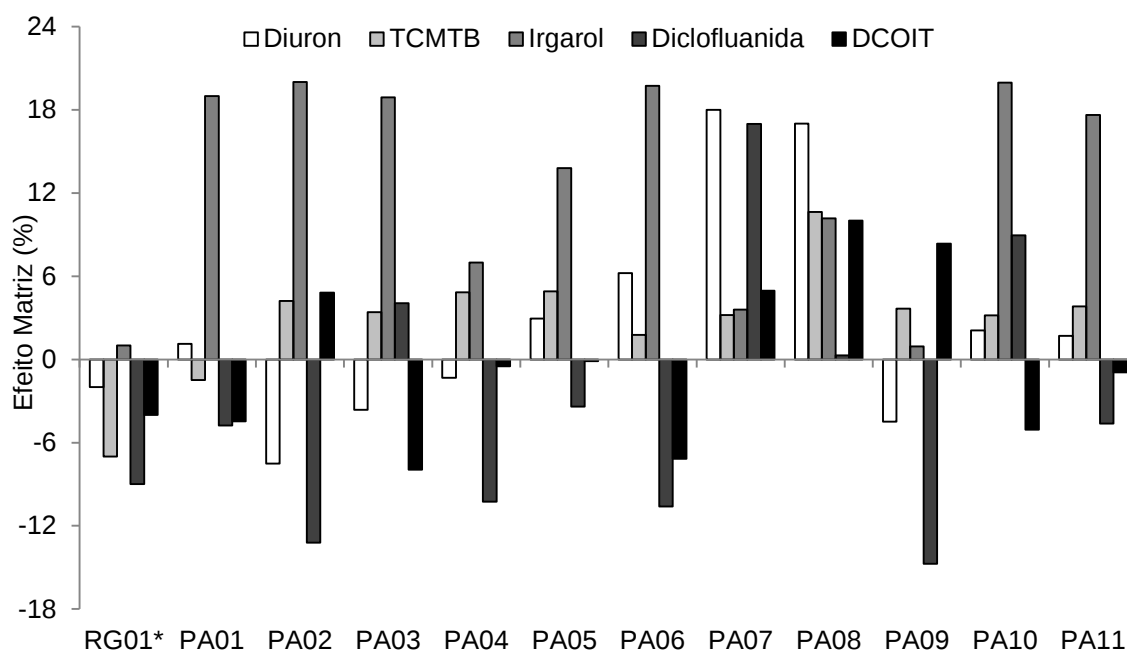
Apesar de COT e teor de finos normalmente apresentarem uma boa correlação, uma vez que a fração de finos dos sedimentos apresenta uma maior capacidade de adsorção da fração orgânica (HALL e ANDERSON, 2014), nenhuma correlação significativa foi observada nesses parâmetros ($r = -0,334$, $p > 0,05$). Esta baixa correlação no presente estudo pode estar relacionada aos aportes distintos de matéria orgânica de cada local, interações de natureza antrópica (navios, dragagem) em portos e marinas, circulação distinta em cada sítio e perturbações durante a deposição que ocorrem no ambiente marinho natural (RADKE *et al.*, 2012).

Diferentes correlações entre finos e COT têm sido relatadas na literatura. Estudos em sedimentos estuarinos da Califórnia ($r=0,48$) (HALL e ANDERSON, 2014); sedimentos estuarinos da Lagoa dos Patos, Brasil ($r=0,42$) (ABREU, 2016); áreas costeiras do Chile ($r=0,23$) (BATISTA *et al.*, 2016); e sedimentos de marinas e portos do Irã ($r=-0,44$) (SALEH *et al.*, 2016), por exemplo, encontraram baixas correlações entre COT e teor de finos. Por outro lado, correlações mais significativas foram encontradas em sedimentos do sistema estuarino de Santos e São Vicente, Brasil ($r=0,78$) (ABREU, 2016); e da Baía de Todos os Santos, Brasil ($r=0,65$) (ARTIFON *et al.*, 2016).

5.5.2. Efeito matriz nas amostras de sedimento

As amostras de sedimento do presente estudo apresentam uma composição granulométrica e de carbono orgânico diferente a amostra em que o método foi padronizado e validado (Tabela 15) e, possivelmente, sua constituição orgânica e inorgânica do sedimento seja igualmente distinta, pode assim existir uma influência da matriz (efeito matriz) sobre a resposta instrumental aos analitos de interesse (HAJŠLOVÁ e ZROSTLÍKOVÁ, 2003; SAARI *et al.*, 2007; ABREU, 2016). Portanto, o possível efeito matriz (EM) sobre os analitos de interesse (diuron, irgarol, TCMTB, DCOIT e diclofluanida) foi avaliado para cada amostra coletada no Panamá através de padronização externa no solvente e na matriz fortificadas em um nível intermediário 5xLOQ como descrito no item 4.10.3 (Figura 19).

Figura 19. Efeito matriz (%) das amostras de sedimento fortificadas com os biocidas em um nível intermediário (5xLOQ).



Os analitos apresentaram efeito matriz distintos, sendo observada tanto supressão como enriquecimento do sinal. O EM variou de -8 a +18% para o diuron, +1 a +20% para o irgarol 1051, -1 a +11% para o TCMTB, -7 a +10% para o DCOIT, e -15 a +17% para a diclofluanida. No entanto, todos os valores estão dentro de uma faixa onde o efeito é considerado baixo (-20% a +20%) (ECONOMOU *et al.*, 2009).

O efeito matriz tem sido amplamente estudado e reconhecido como uma importante fonte de erro na análise quantitativa por espectrometria de massas em amostras ambientais e de alimentos (NIESSEN *et al.*, 2006). GATIDOU *et al.* (2004) desenvolveram um método para análise de irgarol 1051 e o seu composto de degradação M₁ utilizando a extração assistida por micro-onda e GC-MS, onde observaram um aumento nas respostas cromatográficas dos analitos quando comparado a curva feita no solvente e no extrato da matriz. Por isso, utilizaram a curva preparada no extrato da matriz para a quantificação dos analitos, a fim de diminuir as interferências oriundas do extrato das amostras.

ABREU (2016) investigou o efeito matriz sobre a quantificação de quatro biocidas anti-incrustantes (irgarol 1051, diuron, DCOIT e TCMTB) em amostras de sedimentos oriundas do sistema estuarino de Santos e São Vicente e do estuário da

Lagoa dos Patos (Brasil). Nesse estudo utilizaram a extração por ultrassom, purificação por SPE e análise por LC-MS/MS para determinação dos analitos. O efeito matriz mostrou intensidades distintas quando analisado nas matrizes do estuário da Lagoa dos Patos (EM: +16 – +53%) e do sistema estuarino de Santos e São Vicente (EM: +49 – +82%) para os biocidas anti-incrustantes analisados. Estes elevados valores de efeito matriz foram atribuídos a diferentes fatores, entre eles as diferentes propriedades físico-químicas dos biocidas, diferente composição química de cada local, e a interação que pode existir entre matriz – analito – equipamento (ABREU, 2016).

Em ambos os casos mencionados, o efeito matriz observado foi maior do que o obtido pelo método analítico proposto neste estudo. De maneira geral, o método proposto por VA-MSPD e LC-MS/MS apresentou uma elevada robustez para determinar simultaneamente cinco biocidas anti-incrustantes de terceira geração em amostras de sedimentos com diferente conteúdo de carbono orgânico e teor de finos, com quantificação por padronização externa no solvente, sendo esta uma vantagem do método proposto (VA-MSPD e LC-MS/MS) em comparação com os estudos citados anteriormente e outros reportados na literatura.

5.5.3. Biocidas anti-incrustantes no sedimento

Irgarol 1051, diuron e DCOIT foram detectados em marinas, portos e na entrada do Canal do Panamá, enquanto TCMTB e diclofluanida não foram detectados (<LOD) em nenhuma das amostras coletadas de sedimento (Tabela 16). Cada amostra foi analisada em triplicata (n=3), sendo que os resultados são expressos como a média das duas amostras coletadas em cada ponto (N=2) $\pm$ desvio padrão (ng g⁻¹). As recuperações do padrão diuron-d₆ variaram entre 88 e 106%, com desvio padrão <10%.

Tabela 16. Níveis de biocidas anti-incrustantes detectados nas amostras de sedimentos e percentuais de recuperação do diuron-d₆

Local	Média (N=2) ± desvio padrão (ng g ⁻¹)			R (%) ± RSD (%)
	Irgarol 1051	Diuron	DCOIT	Diuron-d ₆
PA1a	0,55 ± 0,11	3,04 ± 0,81	n.d	94 ± 7
PA2	n.d	n.d	81,60 ± 41,81	94 ± 10
PA3	0,35 ± 0,05	14,06 ± 1,26	n.d	94 ± 6
PA4	0,39 ± 0,04	n.d	n.d	105 ± 5
PA5	0,45 ± 0,23	n.d	n.d	101 ± 3
PA6	n.d	n.d	n.d	102 ± 5
PA7	2,83 ± 0,82	2,47 ± 0,04	5,72 ± 2,68	106 ± 3
PA8	<0,25	5,92 ± 1,24	n.d	100 ± 4
PA9	0,52 ± 0,10	n.d	2,42 ± 0,53	93 ± 3
PA10	n.d	n.d	n.d	88 ± 5
PA11	<0,25	n.d	n.d	88 ± 4

n.d: não detectado (<LOD), R: percentual de recuperação (%), RSD: desvio padrão relativo (%).

5.5.3.1. Irgarol 1051

Irgarol 1051 foi detectado em 72% das amostras de sedimentos superficiais na faixa de <0,25 a 2,83 ng g⁻¹. Essa observação indica um provável uso contínuo desse composto em tintas anti-incrustantes nas áreas costeiras do Panamá. A maior concentração deste biocida foi detectada na Marina Flamenco (PA7 - 2,83 ± 0,82 ng g⁻¹), na costa do Pacífico e a segunda maior foi detectada na Marina Shelter (PA1a - 0,55 ± 0,11 ng g⁻¹) na costa caribenha. Nestes dois locais o irgarol 1051 também foi detectado na fração dissolvida da amostra de água do mar (2,2 e 5,0 ng L⁻¹, respectivamente). Estas concentrações podem ser explicadas devido ao baixo hidrodinamismo desses locais, gerando uma menor renovação de água e consequentemente uma menor diluição dos analitos. Da mesma maneira, este fenômeno favorece uma maior taxa de sedimentação do material particulado no qual os biocidas vão se adsorver naturalmente. Além disso, as propriedades físico-químicas do irgarol 1051, como o coeficiente de partição entre a água e o carbono orgânico (log K_{oc} 3,3) e a baixa solubilidade na água (7 mg L⁻¹), favorecem o seu processo de partição no material em suspensão e na fração orgânica dos sedimentos (KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004).

Irgarol 1051 também foi detectado nas amostras da *La Playita* (PA5 - $0,45 \pm 0,23$ ng g⁻¹), no Porto do Panamá (PA3, $0,35 \pm 0,05$ ng g⁻¹) e na Ponte das Américas (PA4, $0,30 \pm 0,04$ ng g⁻¹), que estão localizados na entrada do Canal do Panamá pela costa do Pacífico. Estes resultados indicam que os navios que atravessam o Canal e aqueles que atracam no porto do Panamá estão contribuindo com quantidades significativas deste contaminante no sedimento. Em contrapartida, este composto não foi detectado na fração dissolvida das amostras de água do mar obtidas nos mesmos locais. Isto pode ser explicado devido ao fato de que as amostras de água do mar representam uma fotografia do momento da coleta e, provavelmente, as concentrações deste contaminante poderiam estar abaixo do limite de detecção do método aplicado. Além disso, como mencionado anteriormente, o irgarol 1051 além de sofrer partição no sedimento, também sofre partição no material em suspensão, e este compartimento ambiental não foi avaliado no presente trabalho.

Níveis de irgarol 1051 também foram detectados em *Chiriqui Grande* (PA9 - $0,52 \pm 0,11$ ng g⁻¹) localizado perto da fronteira com a Costa Rica pela costa Caribenha. Neste local, embarcações de transporte de passageiros e comerciais foram observadas em constante movimento, podendo ser considerados fontes de contaminação de irgarol 1051 para os ambientes costeiros dessa região. Além disso, este contaminante também foi detectado em concentrações menores que o limite de quantificação (<LOQ) nas amostras coletadas no *Mercado del Marisco* (PA8) e em *Bocas del Toro* (PA11). Estes baixos níveis podem ser atribuídos à direta conexão destes locais com o mar aberto que, possivelmente, favorecem uma maior diluição das concentrações locais. Os locais PA9 e PA11 são regiões caribenhas ricas em recifes de corais que dependem de algas zooxantelas como fonte de alimentação. Como o irgarol 1051 inibe a atividade fotossintética, existe o risco que mesmo em baixos níveis esse biocida possa representar uma ameaça para as comunidades recifais.

A maior concentração do irgarol 1051 detectada neste estudo ($2,83$ ng g⁻¹) foi menor que as máximas concentrações reportadas em alguns estudos realizados na última década. HARINO *et al.* (2012) reportaram concentrações de até 76 ng g⁻¹ de irgarol 1051 nas áreas costeiras da Indonésia onde a fonte principal foi atribuída a embarcações comerciais. No Irã, SALEH *et al.* (2016) reportaram uma concentração máxima de $35,4$ ng g⁻¹ de irgarol 1051, sendo que os locais de coleta foram em áreas

costeiras sob a influência de embarcações tipo *dhow*s, nome genérico dado aos tradicionais veleiros (AGIUS, 2008). E na Califórnia, EUA, SAPOZHNIKOVA *et al.* (2013) reportaram que o 35% das amostras (níveis entre <0.3 até 8.9 ng g^{-1}) excederam o limite de risco ambiental sugerido pela autoridade holandesa ($1,4 \text{ ng g}^{-1}$), apontando as embarcações de lazer como principal fonte de contaminação.

Conforme apresentado, o irgarol 1051 tem sido reportado principalmente em áreas sob a influência de embarcações de lazer, em concordância aos locais analisados no presente estudo. No entanto, a presença do irgarol 1051 também tem sido relacionada com outras fontes de contaminação. O estudo feito por LEE *et al.* (2015) detectaram o biocida irgarol 1051 em 27% das amostras coletadas na costa oeste da Coreia do Sul, e a fonte de contaminação deste composto nessas áreas foi atribuído ao uso deste biocida como agrotóxico. Esta atribuição foi ponderada levando em consideração as características geográficas da região oeste da Coreia, que tem sucessivas cordilheiras que atuam como filtro deste biocida até chegar às áreas costeiras.

Cabe destacar que a maior concentração reportada no presente estudo ($2,83 \text{ ng g}^{-1}$) excedeu o limite de risco ambiental (ERLs) proposto pela autoridade holandesa ($1,4 \text{ ng g}^{-1}$) (VAN WEZEL e VAN VLAARDINGEN, 2004) e pela autoridade norueguesa ($2,5 \text{ ng g}^{-1}$) (BAKKE *et al.*, 2010), representando assim um potencial risco tóxico ao ecossistema aquático na Marina Flamenco.

5.5.3.2. Diuron

O diuron foi detectado em quatro locais (36% das amostras de sedimentos) na faixa de $2,47 - 14,05 \text{ ng g}^{-1}$. A maior concentração do diuron foi detectada em uma amostra coletada no Porto do Panamá (PA3 - $14,06 \pm 1,26 \text{ ng g}^{-1}$). Neste porto internacional, grandes navios comerciais e pequenas embarcações de pesca foram observados em constante movimento. A segunda maior concentração do diuron foi mensurada no *Mercado del Marisco* (PA8 - $5,92 \pm 1,24 \text{ ng g}^{-1}$) onde se tem um intenso tráfego de embarcações de passageiros e de pesca. Nas marinas Flamenco e Shelter o diuron também foram detectados nos níveis de $3,04 \pm 0,81 \text{ ng g}^{-1}$ e $2,47 \pm 0,04 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. Estas observações, juntamente com os níveis detectados na fração dissolvida das amostras de água, indicam que as marinas e portos atuam como uma fonte de contaminação de diuron aos ambientes aquáticos.

As concentrações de diuron detectadas nos locais PA1a, PA7, e PA8, estão dentro do nível III, 0,71 – 6,40 ng g⁻¹ (*Moderate*), segundo o padrão de qualidade ambiental da Noruega (BAKKE *et al.*, 2010), que representa a faixa de concentração onde este composto pode causar efeitos tóxicos aos organismos após exposição crônica. Além disso, o nível de diuron detectado no Porto do Panamá (PA3, 14,06 ng g⁻¹) foi maior que a concentração máxima permissível proposta pela autoridade holandesa (9 ng g⁻¹) (CROMMENTUIJN *et al.*, 2000) e acima do da Noruega (13 ng g⁻¹). Baseados no guia norueguês, esta concentração está dentro do nível V (*very bad*), e representa o nível onde o biocida produz efeitos tóxicos graves nos ecossistemas aquáticos.

Assim como o irgarol 1051, o diuron inibe a fotossíntese de organismos autótrofos. Sendo assim, os níveis detectados no presente estudo podem ser suficientemente elevados para causar um impacto negativo sobre a produtividade primária (BAO *et al.*, 2011), assim como para comunidades bentônicas e de recifes que tem como fonte de alimentação algas fotossintéticas.

A concentração de diuron detectada no Porto do Panamá (PA3 - 14,06 ng g⁻¹) foi maior que as faixas reportadas nas marinas da Califórnia (<0,3 – 4,2 ng g⁻¹) (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013), em áreas costeiras da Malásia (<0,02 – 5 ng g⁻¹) (HARINO *et al.*, 2009), e do Vietnã (0,11 – 3,0 ng g⁻¹) (HARINO *et al.*, 2006a); no entanto, foi menor que os maiores níveis detectados na Tailândia (25 ng g⁻¹) (HARINO *et al.*, 2006b), no Japão (530 ng g⁻¹) (HARINO *et al.*, 2006c), na Indonésia (740 ng g⁻¹) (HARINO *et al.*, 2012), e na Coreia do Sul (46 ng g⁻¹) (LEE *et al.*, 2015).

HARINO *et al.* (2006b) detectaram concentrações de diuron na faixa de 0,07 – 25 ng g⁻¹ em sedimentos coletados na Tailândia. A possível fonte de diuron foi associada a áreas sob a influência de atividades industriais, embarcações de pesca, e a uma base da marinha real tailandesa. No estudo de HARINO *et al.* (2012) o diuron foi detectado em um dos mais elevados níveis registrados na literatura em sedimentos (740 ng g⁻¹) em uma região da costa da Indonésia, e foi relacionada diretamente com o tráfego de grandes navios oriundo de países do sudeste asiático (Malásia e Tailândia). De maneira similar, este estudo relaciona as concentrações de diuron com aquelas embarcações oriundas de um porto comercial, um porto pesqueiro e duas marinas,

sendo consideradas como focos de contaminação deste biocida para as áreas costeiras do Panamá.

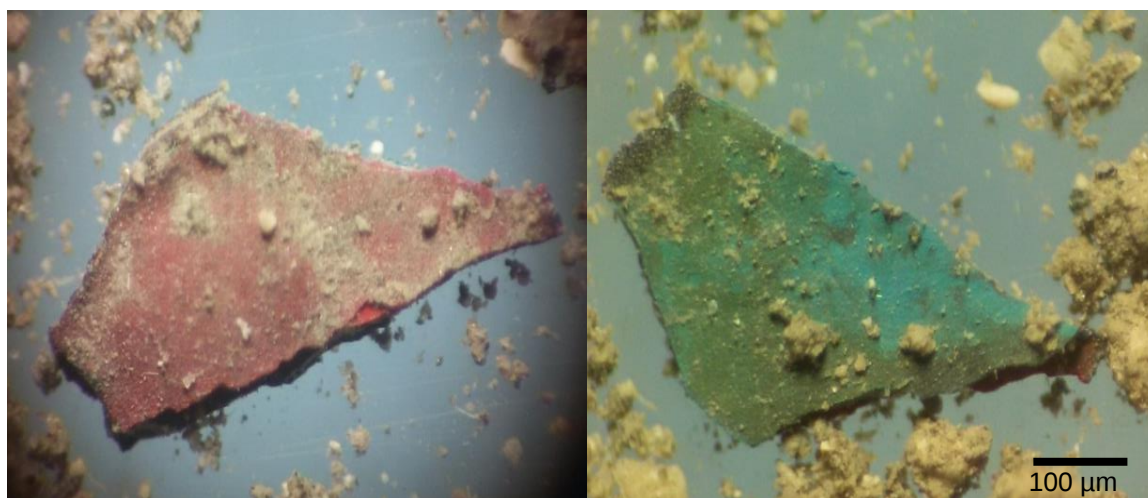
5.5.3.3. DCOIT e partículas de tintas anti-incrustantes

Neste estudo, o biocida DCOIT foi detectado em três amostras de sedimentos superficiais: Porto de *Colón* (PA2 - $81,60 \pm 41,81 \text{ ng g}^{-1}$), Marina Flamenco (PA7 - $5,72 \pm 2,68 \text{ ng g}^{-1}$), e *Chiriqui Grande* (PA9 - $2,42 \pm 0,53 \text{ ng g}^{-1}$).

A maior concentração de DCOIT foi determinada no Porto de *Colón* (Apêndice, Figura A8), onde um intenso tráfego de embarcações comerciais e um estaleiro com navios em manutenção e reparação foram observados. Na primeira amostra coletada neste local PA2 (1) os resultados de DCOIT na extração em triplicata ($n=3$) foram de 46,05; 273,34; e $14,10 \text{ ng g}^{-1}$ tendo como média $111,16 \text{ ng g}^{-1}$. De maneira similar, na segunda amostra coletada PA2 (2) os resultados da extração em triplicata ($n=3$) foram de 14,37; 135,92; e $5,81 \text{ ng g}^{-1}$ tendo como média $52,03 \text{ ng g}^{-1}$. Como resultados destas duas amostras coletadas e analisadas, obteve-se uma média total ($N=2$) de $81,60 \text{ ng g}^{-1}$ e desvio padrão de $41,81 \text{ ng g}^{-1}$ para o biocida DCOIT. Comportamento análogo foi obtido para este composto na amostra da Marina Flamenco (PA7), com um valor médio de $5,72 \text{ ng g}^{-1}$ e desvio padrão de $2,68 \text{ ng g}^{-1}$.

Os altos valores de desvio padrão obtidos nestes locais podem ser explicados devido à alta heterogeneidade das amostras de sedimento, uma vez que partículas de tintas anti-incrustantes foram observadas nas amostras PA2 e PA7 (Figura 20).

Figura 20. Imagem de partículas de tintas anti-incrustantes, obtida por microscopia óptica, encontradas na amostra de sedimento PA2. Aumento de 5x.

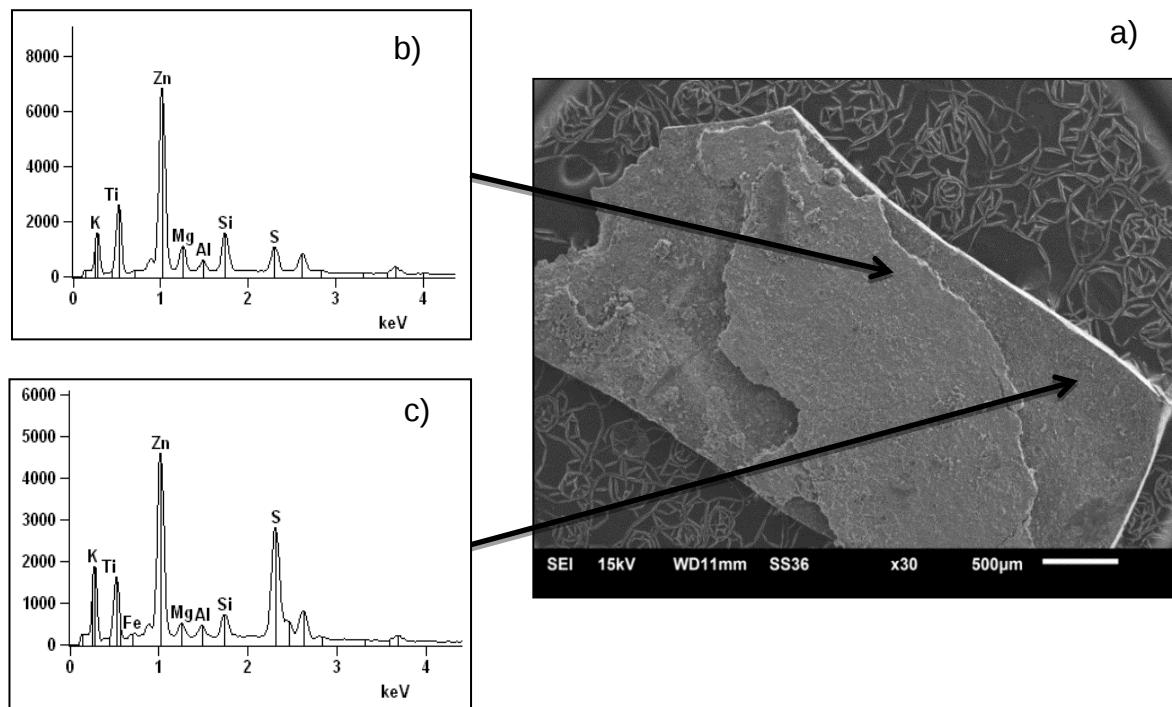


De fato, sedimentos contaminados por partículas de tintas são caracterizados por uma composição química heterogênea, onde as concentrações de um biocida de uma sub-amostra do mesmo ponto geralmente apresenta alta variabilidade (elevado desvio padrão) (TURNER, 2010). Resultados similares foram reportados por SINGH e TURNER (2009b), em amostras de fragmentos de tintas anti-incrustantes oriundas de Plymouth, sudoeste da Inglaterra, onde a análise de metais apresentaram elevados desvios padrões.

A Figura 21 apresenta uma imagem obtida por MEV (microscopia eletrônica de varredura) e dois espectros de EDS (energia dispersiva de raios x) de uma micropartícula encontrada na amostra de sedimento coletada no Porto de Colón (PA2), demonstrando duas camadas diferentes na micropartícula contendo principalmente zinco, titânio, e enxofre. Em contrapartida, apesar do cobre estar presente na maioria das tintas anti-incrustantes, a sua presença não foi verificada nas partículas analisadas neste trabalho. Este comportamento pode estar associado ao fato que o mesmo pode ser lixiviado mais facilmente da matriz da tinta em ambientes anóxicos e/ou óxicos (TAKAHASHI *et al.*, 2012).

O sinal do zinco no espectro EDS pode ser explicado por diferentes razões. As tintas anti-incrustantes, além de biocidas na sua composição, geralmente contêm ligantes, solventes, pigmentos, e conservantes (KARLSSON *et al.*, 2010; AZEMAR *et al.*, 2015). O óxido de zinco é comumente empregado como ligante em algumas tintas anti-incrustantes (FAY *et al.*, 2013; GAO *et al.*, 2016) e, por definição, não é considerado um biocida. Além disso, o zinco integra a molécula de zinco piritona, que pode ser usado como biocida e/ou conservante em algumas tintas (KARLSSON *et al.*, 2010). Por outro lado, o sinal do titânio pode ser relacionado à sua utilização como pigmento em tintas comerciais (RENTSCHLER *et al.*, 2003).

Figura 21. Imagem por MEV (a) e espectros EDS (b/c) de uma micropartícula de tinta anti-incrustante coletada no Porto de Colón (PA2), mostrando duas camadas na micropartícula. Aumento de 30x



O pico do enxofre no espectro poderia estar associado com a presença do biocida DCOIT na partícula, já que o mesmo é um composto isotiazol com um átomo de enxofre na sua estrutura molecular (Figura 2). Além do seu uso como princípio ativo em diversas tintas anti-incrustantes, um estudo recente demonstrou a utilização de moléculas de DCOIT encapsuladas em nanopartículas de sílica como uma alternativa aos convencionais sistemas anti-incrustantes (MAIA *et al.*, 2015).

Com base nos resultados obtidos das partículas de tintas anti-incrustantes presente nos sedimentos, pode se concluir que as mesmas foram removidas dos cascos dos navios durante os processos de raspagem e manutenção.

Níveis de DCOIT têm sido reportados em amostras de sedimentos em diferentes regiões, especialmente em países do leste da Ásia, onde a tinta comercial *Sea Nine 211*, que contém 30% de DCOIT em xileno (MAIA *et al.*, 2015), é comercializada como tinta anti-incrustante (LEE *et al.*, 2015; MOCHIDA *et al.*, 2015).

A faixa de concentração de DCOIT detectada no porto de *Colón* (valores desde 5,81 até 273,34 ng g⁻¹) foi maior que as concentrações reportadas na Tailândia (0,051 – 0,094 ng g⁻¹) (HARINO *et al.*, 2006b), e no Vietnã (0,09 – 1,3 ng g⁻¹) (HARINO *et al.*,

2006a); e comparável com valores detectados na Indonésia ($<0,04 - 150 \text{ ng g}^{-1}$) (HARINO *et al.*, 2012), na Coreia do Sul ($30 - 281 \text{ ng g}^{-1}$) (LEE *et al.*, 2015), e no Brasil ($<0,1 - 214 \text{ ng g}^{-1}$) (ABREU, 2016).

ABREU (2016) reportou concentrações de DCOIT em amostras de sedimentos coletadas próximo a estaleiros no sistema estuarino da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. A maior concentração de DCOIT reportada nesse estudo (214 ng g^{-1}) foi relacionada com a intensa atividade de manutenção de embarcações e com a localização de um estaleiro localizado em uma zona mais abrigada, onde a influência de correntes é mínima. Além disso, a autora ressalta a presença de partículas de tintas anti-incrustantes decorrente da atividade de manutenção das embarcações, e consequentemente relacionados aos elevados níveis de biocidas detectados.

LEE *et al.* (2015) detectaram níveis de DCOIT na faixa de $30 - 281 \text{ ng g}^{-1}$ nas baías de Busan e Ulsan na Coreia do Sul, as quais foram relacionadas a áreas sob a influência da urbanização e industrialização com elevado fluxo de embarcações comerciais e de lazer. Estes autores confirmam que o DCOIT tem sido amplamente utilizado como princípio ativo em tintas anti-incrustantes.

O DCOIT tem sido considerado um biocida anti-incrustante menos prejudicial aos ambientes aquáticos devido à rápida degradação na água e baixo fator de bioacumulação (KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004; CASTRO *et al.*, 2011). No entanto, biocidas associados a partículas de tintas anti-incrustantes podem aumentar sua persistência no meio ambiente. THOMAS *et al.* (2003) reportaram o incremento da meia vida do DCOIT de $<0,5$ dias no sedimento até 9,9 dias quando associado à partículas de tintas. Esse incremento sugere um aumento na exposição de organismos aquáticos a este contaminante. Além disso, estudos recentes têm demonstrado uma elevada toxicidade e o efeito em longo prazo do DCOIT sobre organismos marinhos (MOCHIDA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2014a; CHEN *et al.*, 2014b; WENDT *et al.*, 2016).

CHEN *et al.* (2014a) estudaram os efeitos tóxicos do DCOIT sobre a espécie *Oryzias melastigma*, peixe utilizado como modelo para ensaios ecotoxicológicos marinhos. Entre os efeitos observados, destacaram a inibição significativa da atividade da acetilcolinesterase no cérebro, a diminuição dos níveis de testosterona em machos (potente desregulador endócrino), e a diminuição da produção de ovos. Outro estudo investigou a toxicidade do DCOIT para a espécie bentônica *Acartia tonsa* (WENDT *et*

al., 2016), que é um crustáceo de ambientes estuarinos e marinhos (CHEN e HARE, 2008). Os autores reportaram uma concentração letal (CL_{50} , 48 h) de 57 nmol L^{-1} e uma concentração efetiva (CE_{50} , 48 h) de 72 nmol L^{-1} (WENDT *et al.*, 2016). Com base nestes estudos, os resultados do presente trabalho indicam que os níveis de contaminação por DCOIT no porto de Colón e na Marina Flamenco (PA2 e PA7) podem ocasionar efeitos adversos sobre organismos bentônicos e peixes marinhos.

6. CONCLUSÕES

Dois métodos analíticos baseados nas técnicas da SPE e VA-MSPD com análise por LC-MS/MS foram devidamente padronizados e validados segundo os guias de validação da INMETRO (2011) e SANTE (2015), mostrando-se adequados para determinação simultânea de cinco biocidas anti-incrustantes de terceira geração irgarol 1051, diuron, TCMTB, DCOIT e diclofluanida em amostras de água do mar e sedimentos marinhos.

Os efeitos das duas matrizes estudadas sobre a determinação dos biocidas foram baixos, representando uma vantagem em comparação com os métodos reportados na literatura.

O estudo pontual realizado nas áreas costeiras do Panamá demonstrou que os principais focos de contaminação por irgarol 1051, diuron e DCOIT estão associados às regiões sob a influência de marinas e portos, sendo essas fontes de contaminação comparáveis com estudos reportados na última década em áreas costeiras do mundo.

Níveis detectados na fração dissolvida das amostras de água de mar foram menores do que os limites estabelecidos pelas autoridades ambientais do Reino Unido e da Holanda, no entanto, níveis relativamente elevados de diuron foram detectados na Marina Flamenco (PA7 - 70,0 ng L⁻¹) e na Marina Shelter (PA1a - 35,6 ng L⁻¹). Considerando os sedimentos analisados, o irgarol foi detectado em oito das onze amostras coletadas, e o diuron em quatro. Os níveis de irgarol 1051 na Marina Flamenco (PA7 - 2,83 ng g⁻¹) e de diuron no Porto do Panamá (PA3 - 14,06 ng g⁻¹) foram maiores do que os limites ambientais propostos pelas autoridades holandesas e norueguesas, o que sugere que efeitos tóxicos podem estar ocorrendo em organismos marinhos, especialmente em comunidades de recifes e organismos bentônicos.

O biocida DCOIT foi detectado em três amostras de sedimentos, especificamente na proximidade de estaleiros no Porto de Colón e na Marina Flamenco. A ampla faixa de concentração do DCOIT foi relacionada com a presença de partículas de tintas anti-incrustantes nas amostras. Essa observação sugere que as mesmas são liberadas na coluna d'água e se acumulam no sedimento, contribuindo assim com aportes de biocidas que são lixiviados das partículas. Além disso, a presença desses resíduos em

sedimentos é consequência direta das más práticas de manutenção e limpeza de embarcações nas áreas estudadas.

Conclui-se que o diagnóstico preliminar de contaminação por biocidas anti-incrustantes de terceira geração demonstrou que as áreas sob a influência de atividades marítimas no Panamá estão em um nível de contaminação moderado na fração dissolvida da coluna d'água e elevado nos sedimentos superficiais, considerando os padrões de qualidade ambiental da Holanda e da Noruega. Neste contexto, este estudo possibilitará uma avaliação mais abrangente do status da contaminação por estes contaminantes, subsidiando assim a implementação de medidas restritivas quanto ao uso e impacto de biocidas anti-incrustantes de terceira geração, assim como também ao descarte de resíduos de tintas oriundo da manutenção e limpeza de embarcações.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Validar e aplicar métodos analíticos para quantificar outros biocidas que estão presentes em tintas anti-incrustantes, como o zinco piritona, clorotalonil, tiram, em amostras ambientais.

Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação de biocidas anti-incrustantes no material em suspensão da coluna d'água, em partículas de tintas, e em biota para conhecer melhor as interações dos biocidas com estes compartimentos ambientais.

Realizar estudos de monitoramento nas áreas costeiras do Panamá, para determinar a variabilidade sazonal e espacial de biocidas estudados no presente trabalho, bem como outros biocidas que podem estar em uso, e a avaliar a presença de partículas de tintas anti-incrustantes nos sedimentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. Biocidas anti-incrustantes de terceira geração em sedimentos superficiais da costa brasileira. **Dissertação (Mestrado)**. Programa de pós-graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica (PPGOFQG), Instituto de Oceanografia (IO). Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brasil, 2016.

AGIUS, D. A. **Classic ships of Islam: from Mesopotamia to the Indian Ocean**. Boston: Brill Publisher, 2008.

ALBANIS, T. A. et al. Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. **Chemosphere**, v. 48, n. 5, p. 475-485, 2002.

ALI, H. R. et al. Occurrence and distribution of antifouling biocide Irgarol-1051 in coastal waters of Peninsular Malaysia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 70, n. 1–2, p. 253-257, 2013.

ALI, H. R. et al. Contamination of diuron in coastal waters around Malaysian Peninsular. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 1, p. 287-291, 2014.

ALMEIDA, E. et al. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 59, n. 1, p. 2-20, 2007.

ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of The Total Environment**, v. 258, n. 1–2, p. 99-102, 2000.

ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641-654, 2016.

ARTIFON, V. et al. Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-9, 2016.

AZEMAR, F. et al. Development of hybrid antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 87, p. 10-19, 2015.

BAKKE, T. et al. Development of sediment quality criteria in Norway. **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, n. 2, p. 172-178, 2010.

BALAKRISHNAN, S. et al. Occurrence of Diuron and Irgarol in seawater, sediments and planktons of Seto Inland Sea, Japan. **Geochemical Journal**, v. 46, n. 3, p. 169-177, 2012.

BANGKEDPHOL, S. et al. The partition behavior of tributyltin and prediction of environmental fate, persistence and toxicity in aquatic environments. **Chemosphere**, v. 77, n. 10, p. 1326-1332, 2009.

BAO, V. W. W. et al. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 5, p. 1147-1151, 2011.

BAPTISTA NETO, J. et al. Poluição Marinha. **Rio de Janeiro: Editora Interciência**, 2008.

BARKER, S. A. et al. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, n. 2, p. 353-361, 1989.

BASHEER, C. et al. Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 7, p. 697-703, 2002.

BATISTA, R. M. et al. Imposex and butyltin contamination still evident in Chile after TBT global ban. **Science of The Total Environment**, v. 566–567, p. 446-453, 2016.

BOWMAN, J. C. et al. Seasonal variability in the concentrations of Irgarol 1051 in Brighton Marina, UK; including the impact of dredging. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 4, p. 444-451, 2003.

BRATKOWSKA, D. et al. Hydrophilic hypercrosslinked polymeric sorbents for the solid-phase extraction of polar contaminants from water. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 19, p. 3238-3243, 2010.

CALDAS, S. Desenvolvimento de métodos baseados na DLLME com demulsificante água para determinação multiresíduo de agrotóxicos e fármacos e produtos de cuidado pessoal em amostras de água. **Tesis (Doutorado)**. Programa de pós-graduação em Química Tecnológica e Ambiental (PPGQTA), Escola de Química e Alimentos (EQA). Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil, 2015.

CALDAS, S. et al. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC–MS. **Talanta**, v. 112, p. 63-68, 2013a.

CALDAS, S. et al. Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 3, p. 190-213, 2013b.

CALDAS, S. S. et al. Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: Method development and survey. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 8, p. 5855-5863, 2013c.

CALDAS, S. S. et al. Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CANAL DE PANAMÁ, C. **Estadísticas de Tránsito del Canal de Panamá**. Panamá, Canal de Panamá, 2016. <http://micanaldepanama.com/servicios/canal-servicios-maritimos/estadisticas-de-transito/>. Acessado em: 04/04/2016.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 186-193, 2015.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 0, p. 53-66, 2013.

CARBERRY, K. et al. Contamination of Caribbean coastal waters by the antifouling herbicide Irgarol 1051. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 6, p. 635-644, 2006.

CARRASCO, P. B. et al. Determination of Irgarol 1051 in Western Mediterranean sediments. Development and application of supercritical fluid extraction–immunoaffinity chromatography procedure. **Water Research**, v. 37, n. 15, p. 3658-3665, 2003.

CASTRO, I. B. et al. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 2011.

CASTRO, Í. B. D. Impactos e tendências do uso de tintas anti-incrustantes na América do Sul. **Tesis (Doutorado)**. Programa de pós-graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica (PPGOFQG), Instituto de Oceanografia (IO). Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS. Brasil, 2011.

COLE, R. F. et al. Trends in the analysis and monitoring of organotins in the aquatic environment. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 8, n. 0, p. 1-11, 2015.

COLLINS, C. H. et al. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP, Brasil: UNICAMP, 2006.

CRESSWELL, T. et al. The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 10, p. 1169-1175, 2006.

CROMMENTUIJN, T. et al. Maximum permissible and negligible concentrations for some organic substances and pesticides. **Journal of Environmental Management**, v. 58, n. 4, p. 297-312, 2000.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. et al. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 620-636, 2001.

CHEMICALIZE. **Basic properties of Diuron**. ChemAxon, 2016a. <http://chemicalize.com>. Acessado em: 7 de Novembro de 2016.

CHEMICALIZE. **Basic properties of Irgarol 1051**. ChemAxon, 2016b. <http://chemicalize.com>. Acessado em: 7 de Novembro de 2016.

CHEN, G.; HARE, M. P. Cryptic ecological diversification of a planktonic estuarine copepod, *Acartia tonsa*. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 6, p. 1451-1468, 2008.

CHEN, L. et al. Comparative safety of the antifouling compound butenolide and 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) to the marine medaka (*Oryzias melastigma*). **Aquatic Toxicology**, v. 149, p. 116-125, 2014a.

CHEN, L. et al. Proteomic changes in brain tissues of marine medaka (*Oryzias melastigma*) after chronic exposure to two antifouling compounds: Butenolide and 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT). **Aquatic Toxicology**, v. 157, p. 47-56, 2014b.

CHENG, C.-L. et al. Optimisation of matrix solid-phase dispersion for the determination of Dechlorane compounds in marketed fish. **Food Chemistry**, v. 164, p. 286-292, 2014.

CHIARADIA, M. C. et al. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

DAFFORN, K. A. et al. Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 3, p. 453-65, 2011.

DEL BRIO, F. et al. Distribution and bioaccumulation of butyltins in the edible gastropod *Odontocymbiola magellanica*. **Marine Biology Research**, v. 12, n. 6, p. 608-620, 2016.

DINIZ, L. G. R. et al. First appraisal of water contamination by antifouling booster biocide of 3rd generation at Itaqui Harbor (São Luiz-Maranhão-Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 2, p. 380-388, 2014.

DOMINGUEZ, L. A. E. et al. The influence of salinity and matrix effect in the determination of antifouling biocides in estuarine waters of Patos Lagoon (Southern Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1302-1310, 2014.

DUARTE, C. M. et al. Is Ocean Acidification an Open-Ocean Syndrome? Understanding Anthropogenic Impacts on Seawater pH. **Estuaries and Coasts**, v. 36, n. 2, p. 221-236, 2013a.

DUARTE, F. A. et al. Assessment of modified matrix solid-phase dispersion as sample preparation for the determination of CH₃Hg⁺ and Hg₂⁺ in fish. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 10, p. 5015-5022, 2013b.

ECONOMOU, A. et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

FAY, E. F.; SILVA, C. Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água. **Agrotóxicos e ambiente.**, p. 108-143, 2004.

FAY, F. et al. Joint-action of antifouling substances in copper-free paints. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 569-577, 2013.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. et al. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. **Analytica Chimica Acta**, v. 456, n. 2, p. 303-312, 2002.

GAO, D. et al. "Soft" polymer latexes stabilized by a mixture of zinc oxide nanoparticles and polymerizable surfactants: Binders for pigment printing. **Progress in Organic Coatings**, v. 101, p. 262-269, 2016.

GATIDOU, G. et al. Microwave-assisted extraction of Irgarol 1051 and its main degradation product from marine sediments using water as the extractant followed by gas chromatography–mass spectrometry determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, n. 1–2, p. 41-48, 2004.

GOUGH, M. A. et al. A survey of southern England coastal waters for the s-triazine antifouling compound irgarol 1051. **Marine Pollution Bulletin**, v. 28, n. 10, p. 613-620, 1994.

GRAY, J. S.; ELLIOT, M. **Ecology of Marine Sediments: From Science to Management**. United States: Oxford University Press Inc, 2009. 249

HAJŠLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 181-197, 2003.

HALL, L. W.; ANDERSON, R. D. Relationship of Bifenthrin Sediment Concentrations to Grain Size and Total Organic Carbon in California Waterbodies: Implications for Ecological Risk. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 6, p. 764-768, 2014.

HAMWIJK, C. et al. Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas. **Chemosphere**, v. 60, n. 9, p. 1316-1324, 2005.

HARINO, H. et al. Contamination Profiles of Antifouling Biocides in Selected Coastal Regions of Malaysia. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 3, p. 468-478, 2009.

HARINO, H. et al. Distribution of Antifouling Biocides and Perfluoroalkyl Compounds in Sediments From Selected Locations in Indonesian Coastal Waters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 1, p. 13-21, 2012.

HARINO, H. et al. Antifouling biocides contamination in sediment of coastal waters from Japan. **Coastal Marine Science**, v. 31, n. 1, p. 230-235, 2010.

HARINO, H. et al. Concentrations of booster biocides in sediment and clams from Vietnam. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 86, n. 05, p. 1163-1170, 2006a.

HARINO, H. et al. Occurrence of Antifouling Biocides in Sediment and Green Mussels from Thailand. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 400-407, 2006b.

HARINO, H. et al. Concentrations of Antifouling Biocides in Sediment and Mussel Samples Collected from Otsuchi Bay, Japan. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 2, p. 179-188, 2006c.

HASAN, C. K. et al. Environmental Risks Associated with Booster Biocides Leaching from Spent Anti-Fouling Paint Particles in Coastal Environments. **Water Environment Research**, v. 86, n. 12, p. 2330-2337, 2014.

HAWTHORNE, S. B. et al. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 892, n. 1–2, p. 421-433, 2000.

IMO. 2008. Summary of the status of conventions as at 31 May 2007. **ORGANIZATION, I. M.** United Kingdom.

INMETRO. 2011. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, N. E. Q. I.** Brasília.

ISO/IEC17025. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. **International Organization for Standardization**, 2005.

JESSOP, P. G. Searching for green solvents. **Green Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 1391-1398, 2011.

KAONGA, C. C. et al. Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion contamination for a river passing through an agricultural and urban area in Higashi Hiroshima City, Japan. **Science of The Total Environment**, v. 518–519, p. 450-458, 2015.

KARLSSON, J. et al. Toxicity of anti-fouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organisms representing three trophic levels. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 3, p. 681-687, 2010.

KETATA, I. et al. Endocrine-related reproductive effects in molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 3, p. 261-270, 2008.

KIM, N. S. et al. Distribution of butyltins and alternative antifouling biocides in sediments from shipping and shipbuilding areas in South Korea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, n. 1, p. 484-490, 2015.

KIM, N. S. et al. Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater from coastal areas of South Korea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 78, n. 1–2, p. 201-208, 2014.

KNUTSON, S. et al. Concentrations of Irgarol in selected marinas of Oahu, Hawaii and effects on settlement of coral larval. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2012.

KONSTANTINO, I. K.; ALBANIS, T. A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**, v. 30, n. 2, p. 235-248, 2004.

LAMOREE, M. et al. Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters. **Journal of Chromatography A**, v. 970, n. 1, p. 183-190, 2002.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009a.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna. HPLC/CLAE**. Campinas, SP, Brasil: 2009b. 382

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2013.

LEE, M.-R.-N. et al. Assessment of organotin and tin-free antifouling paints contamination in the Korean coastal area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 99, n. 1–2, p. 157-165, 2015.

LI, C.; COLLIN, R. Imposex in One of the World's Busiest Shipping Zones. **Smithsonian Contributions to the Marine Sciences**, n. 38, p. 189-196, 2009.

MAIA, F. et al. Incorporation of biocides in nanocapsules for protective coatings used in maritime applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 270, p. 150-157, 2015.

MARION, G. M. et al. pH of seawater. **Marine Chemistry**, v. 126, n. 1–4, p. 89-96, 2011.

MENESES, E. S. et al. Electroreduction of the antifouling agent TCMTB and its electroanalytical determination in tannery wastewaters. **Talanta**, v. 67, n. 4, p. 682-685, 2005.

MITRA, S. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons, Inc, 2003.

MOCHIDA, K. et al. Toxicity of 4,5-dichloro-2-n-octyl-3 2H -isothiazolone Sea-Nine 211 to two marine teleostean fishes. **Japanese Journal of Environmental Toxicology**, v. 13, n. 2, p. 105-116, 2010.

MOCHIDA, K. et al. Spatial analysis of 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (Sea-Nine 211) concentrations and probabilistic risk to marine organisms in Hiroshima Bay, Japan. **Environmental Pollution**, v. 204, p. 233-240, 2015.

MOLINER-MARTÍNEZ, Y. et al. Cleaning sorbents used in matrix solid-phase dispersion with sonication: Application to the estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons at ng/g levels in marine sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1263, p. 43-50, 2012.

MONTERO LLÁCER, F. J. Panamanian maritime sector management. **Marine Policy**, v. 28, n. 4, p. 283-295, 2004.

MUKHERJEE, A. et al. Predicted concentrations of biocides from antifouling paints in Visakhapatnam Harbour. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 0, p. S51-S59, 2009.

NIENCHESKI, L. F. H. Propriedades Químicas da Água de Mar. In: KRUG, J. P. C. E. L. C. (Ed.). **Introdução às Ciências do Mar**. Pelotas, RS, Brasil: Editora Textos, 2015. cap. 6, p.602. ISBN 978-85-68539-00-2.

NIESSEN, W. M. A. et al. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, n. 6, p. 881-899, 2006.

OKAMURA, H. et al. Phytotoxicity of the New Antifouling Compound Irgarol 1051 and a Major Degradation Product. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 754-763, 2000.

OWEN, R. et al. Inhibition of coral photosynthesis by the antifouling herbicide Irgarol 1051. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 7, p. 623-632, 2002.

PARKS, R. et al. Antifouling biocides in discarded marine paint particles. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 8, p. 1226-1230, 2010.

RADKE, B. et al. Seasonal changes in organotin compounds in water and sediment samples from the semi-closed Port of Gdynia. **Science of The Total Environment**, v. 441, p. 57-66, 2012.

RENTSCHLER, T. et al. **Anti-corrosive white pigments.**: Google Patents 2003.

RIBEIRO, R. L. V. et al. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLC-RP mobile phases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 300-306, 2004.

RODRIGUES, S. A. et al. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, n. 1, p. 82-89, 2010.

ROSENBERG, E. The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 841-889, 2003.

ROSSMARE, H. W. **Handbook of Biocide and Preservative Use.** Sprrienger Netherlands, 1995. 425

RÜDEL, H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 1, p. 180-189, 2003.

SAARI, E. et al. Effect of sample matrix on the determination of total petroleum hydrocarbons (TPH) in soil by gas chromatography–flame ionization detection. **Microchemical Journal**, v. 87, n. 2, p. 113-118, 2007.

SAKKAS, V. A. et al. Photodegradation study of the antifouling booster biocide dichlofluanid in aqueous media by gas chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 930, n. 1–2, p. 135-144, 2001.

SAKKAS, V. A. et al. Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 9, n. 5, p. 327-332, 2002a.

SAKKAS, V. A. et al. Photochemical degradation study of irgarol 1051 in natural waters: influence of humic and fulvic substances on the reaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 147, n. 2, p. 135-141, 2002b.

SALEH, A. et al. Antifouling paint booster biocides (Irgarol 1051 and diuron) in marinas and ports of Bushehr, Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 105, n. 1, p. 367-372, 2016.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Á. et al. An evaluation of antifouling booster biocides in Gran Canaria coastal waters using SPE-LC MS/MS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 91, n. 12, p. 1166-1177, 2011a.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Probabilistic risk assessment of common booster biocides in surface waters of the harbours of Gran Canaria (Spain). **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 5, p. 985-991, 2011b.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Analytical methods for the determination of common booster biocides in marine samples. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 521-533, 2012.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Á. et al. Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC–MS/MS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments. **Chemosphere**, v. 82, n. 1, p. 96-102, 2011c.

SANTE. 2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015. European Commission.

SAPOZHNIKOVA, Y. et al. Antifouling biocides in water and sediments from California marinas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 69, n. 1–2, p. 189-194, 2013.

SEBASTIÀ, N. et al. Occurrence of aflatoxins in tigernuts and their beverages commercialized in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2609-2612, 2010.

SHEIKH, M. A. et al. Contamination and impacts of new antifouling biocide Irgarol-1051 on subtropical coral reef waters. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 6, n. 3, p. 353-358, 2009.

SHEIKH, M. A. et al. Occurrence and distribution of antifouling biocide Irgarol-1051 in coral reef ecosystems, Zanzibar. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, n. 1, p. 586-590, 2016.

SILVA, M. G. D. et al. Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. **Talanta**, v. 76, n. 3, p. 680-684, 2008.

SINGH, N.; TURNER, A. Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 2, p. 371-376, 2009a.

SINGH, N.; TURNER, A. Trace metals in antifouling paint particles and their heterogeneous contamination of coastal sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 4, p. 559-564, 2009b.

SOUZA, M. R. D. R. et al. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 395-401, 2013.

STEEN, R. J. C. A. et al. Monitoring and evaluation of the environmental dissipation of the marine antifoulant 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) in a Danish Harbor. **Chemosphere**, v. 57, n. 6, p. 513-521, 2004.

SWENNEN, C. et al. TBT-pollution in the Gulf of Thailand: A re-inspection of imposex incidence after 10 years. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 4, p. 526-532, 2009.

TAKAHASHI, C. K. et al. Persistence and metallic composition of paint particles in sediments from a tidal inlet. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 133-137, 2012.

THOMAS, K.; BROOKS, S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. **Biofouling**, v. 26, n. 1, p. 73-88, 2010.

THOMAS, K. V. et al. Antifouling Paint Booster Biocides in the UK Coastal Environment and Potential Risks of Biological Effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 677-688, 2001.

THOMAS, K. V. et al. Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. **Environmental Pollution**, v. 123, n. 1, p. 153-161, 2003.

TURNER, A. Marine pollution from antifouling paint particles. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 2, p. 159-171, 2010.

US-EPA. **Estuarine Science**. Rhode Island, USA, University of Rhode Island, 2015. <http://omp.gso.uri.edu/ompweb/doe/science/physical/chsal1.htm>. Acessado em: 23 de Novembro de 2016.

VAN WEZEL, A. P.; VAN VLAARDINGEN, P. Environmental risk limits for antifouling substances. **Aquatic Toxicology**, v. 66, n. 4, p. 427-444, 2004.

WELLS, M. J. Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**, p. 37, 2003.

WENDT, I. et al. The toxicity of the three antifouling biocides DCOIT, TPBP and medetomidine to the marine pelagic copepod *Acartia tonsa*. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 5, p. 871-879, 2016.

YEBRA, D. M. et al. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in organic coatings**, v. 50, n. 2, p. 75-104, 2004.

ZHOU, J. L. Occurrence and persistence of antifouling biocide Irgarol 1051 and its main metabolite in the coastal waters of Southern England. **Science of The Total Environment**, v. 406, n. 1–2, p. 239-246, 2008.

ZIARRUSTA, H. et al. Multiscreening determination of organic pollutants in molluscs using matrix solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 1391, p. 18-30, 2015.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

- **RESUMO EM EVENTOS**

BATISTA-ANDRADE, J. A.; VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; ARIAS, J. L. O.; CASTRO, I. B.; FILLMANN, G.; PRIMEL, E. G. Estudo de método para determinação de biocidas anti-incrustantes em sedimentos marinhos. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), 2016, Florianópolis, Santa Catarina. Apresentação na forma de pôster.

BATISTA-ANDRADE, J. A.; TAVELLA, R. A.; CALDAS, S. S.; ARIAS, J. L. O.; CASTRO, I. B.; FILLMANN, G.; PRIMEL, E. G. Antifouling booster biocides in coastal waters of panama. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), 2016, Florianópolis, Santa Catarina. Apresentação na forma de pôster. **DESTAQUE COMO MELHOR PÔSTER, ÁREA: QUÍMICA ANALÍTICA AMBIENTAL.**

BATISTA-ANDRADE, J. A.; CALDAS, S. S.; ARIAS, J. L. O.; CASTRO, I. B.; FILLMANN, G.; PRIMEL, E. G. Biocidas anti-incrustantes nas áreas costeiras do Panamá. In: 15º Mostra da Produção Universitária, 2016, Rio Grande – RS. Encontro de Pós-graduação.

- **ARTIGOS PUBLICADOS**

BATISTA-ANDRADE, J. A.; CALDAS, S. S.; ARIAS, J. L. O.; CASTRO, I. B.; FILLMANN, G.; PRIMEL, E. G. Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones. **Marine Pollution Bulletin**, v 112, n 1–2, p 415-419, 2016.

10. APÊNDICE

Figura A 1. Cromatograma de íons total (TIC) de um padrão da mistura de biocidas (Concentração 5LOQ) em etanol (a) e no extrato da matriz de sedimento (b)

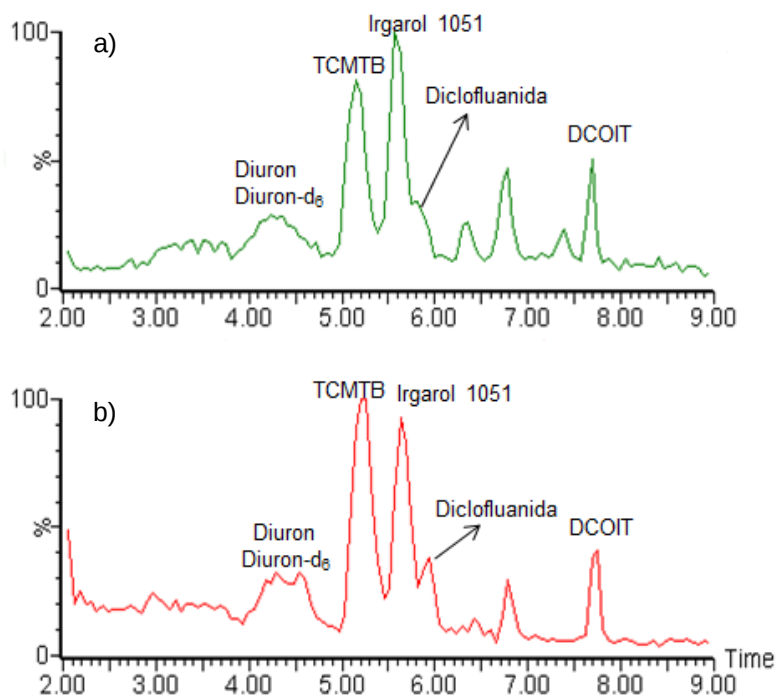


Figura A 2. Cromatograma de íons total (TIC) da amostra PA2

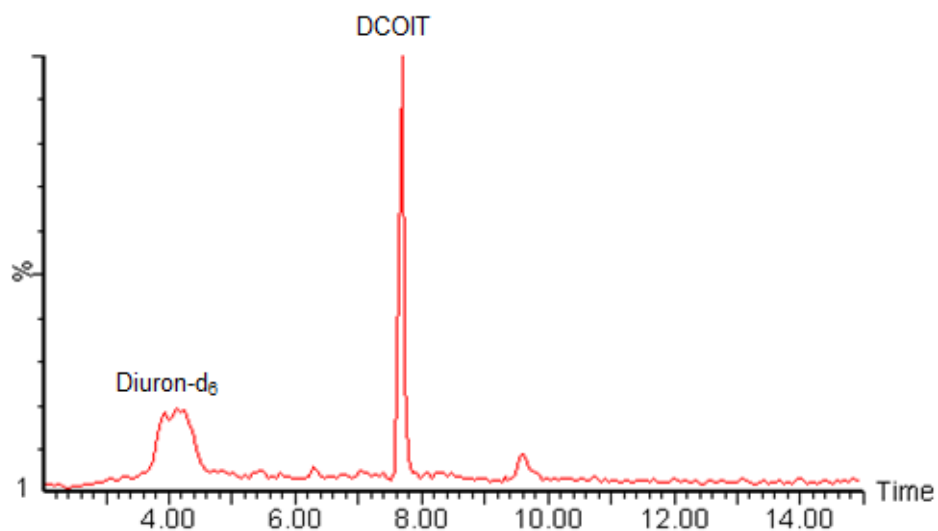


Figura A 3. Cromatograma MRM do padrão de diuron (0,01 mg L⁻¹) em MeOH

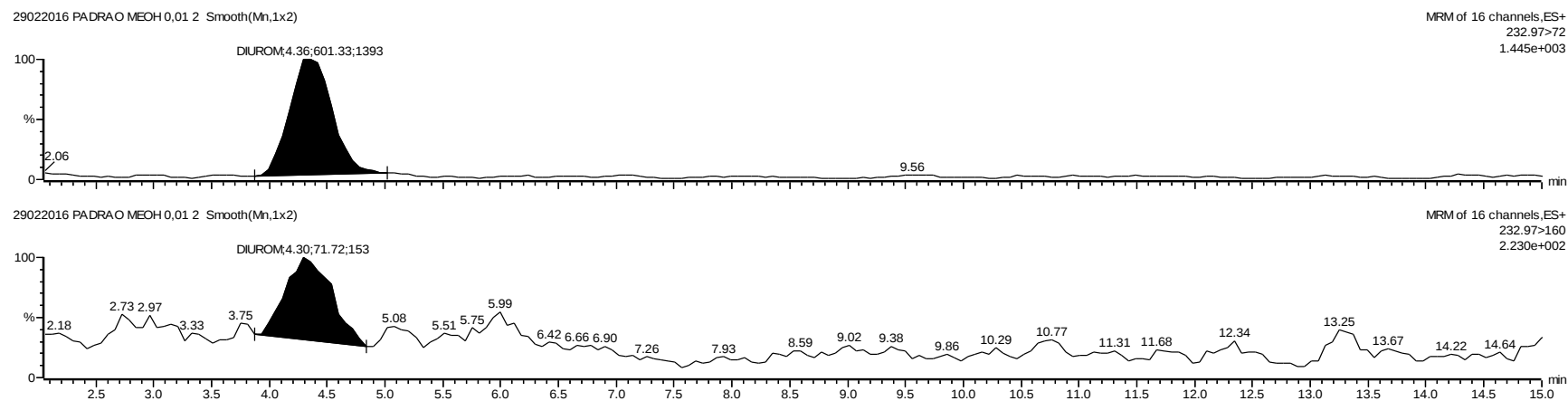


Figura A 4. Cromatograma MRM de diuron na amostra de água do mar PA7

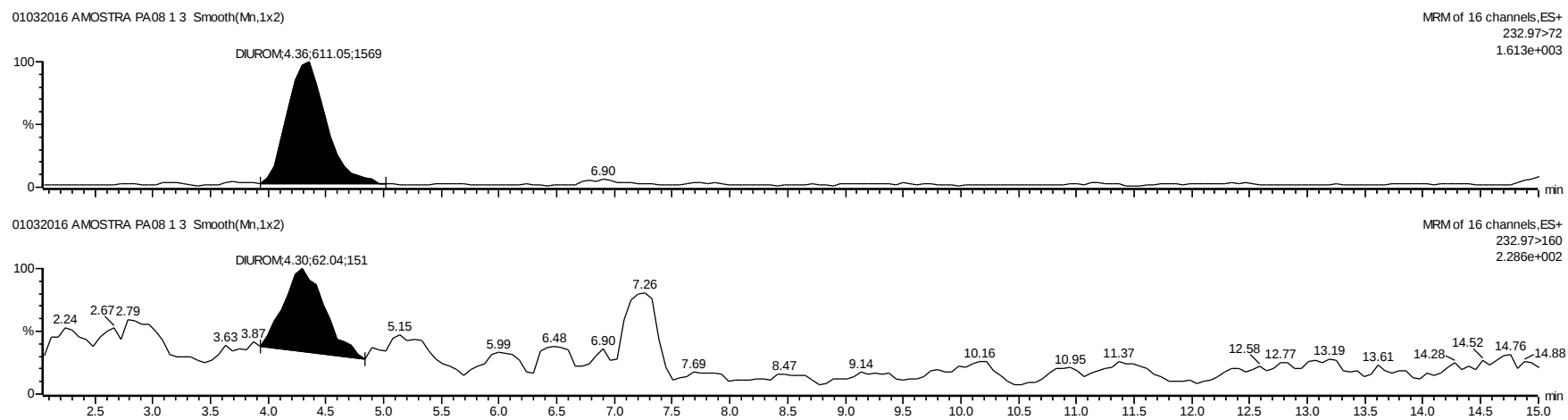


Figura A 5. Cromatograma MRM do padrão de irgarol 1051 (0,0005 mg L⁻¹) em MeOH

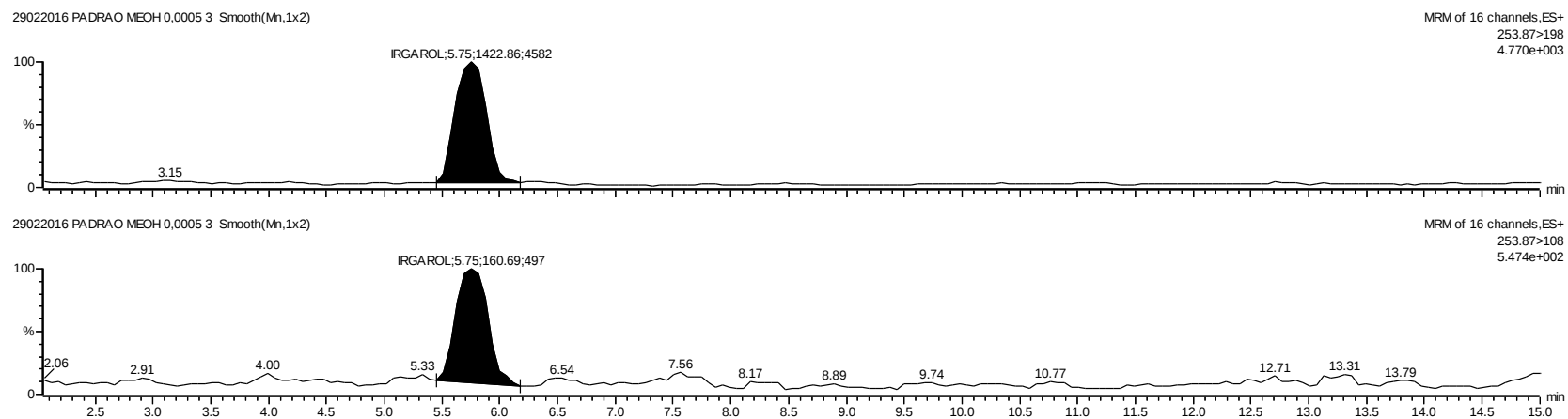


Figura A 6. Cromatograma MRM de irgarol 1051 na amostra de água do mar PA1a

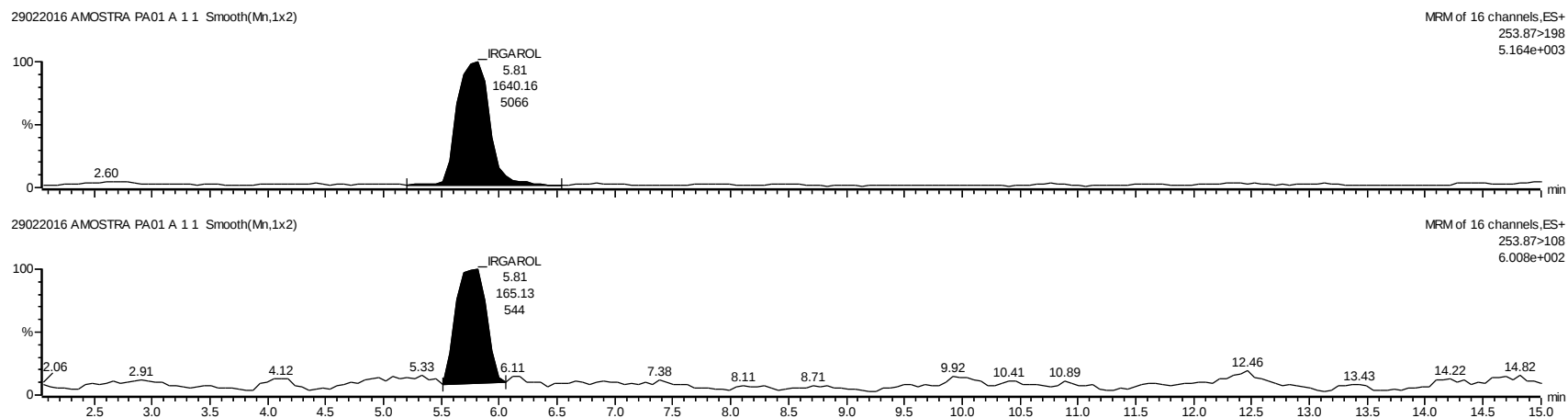


Figura A 7. Cromatograma MRM do padrão do DCOIT ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$) em EtOH

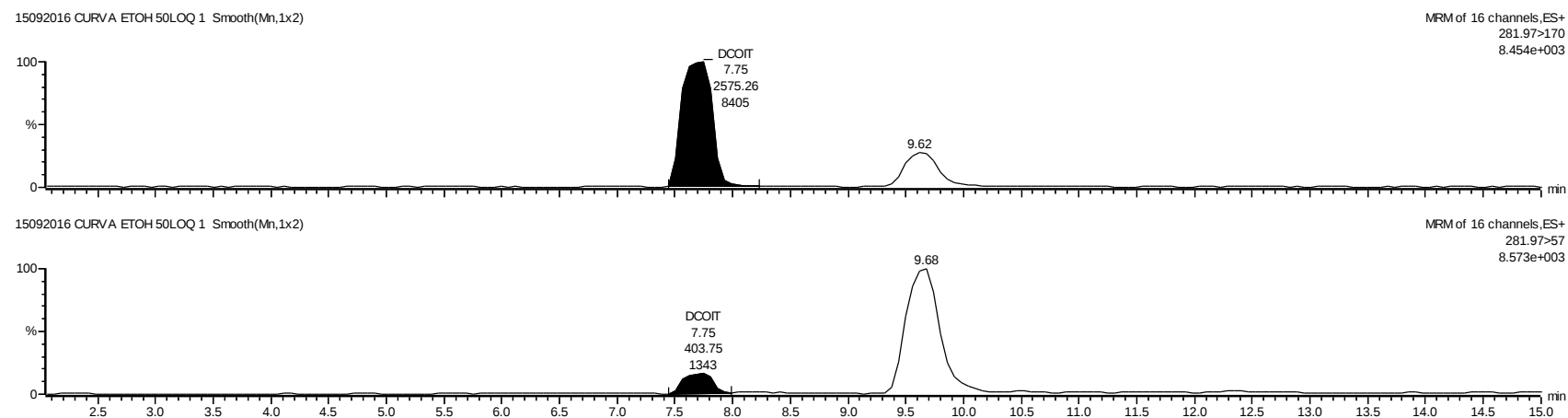


Figura A 8. Cromatograma MRM do DCOIT na amostra de sedimento PA2

