

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

JOSÉ LUCAS MARTINS VIANA

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE
DE TRAÇOS DE BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO
EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS VIA HPLC-MS**

São Luís

2017

JOSÉ LUCAS MARTINS VIANA

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE
DE TRAÇOS DE BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO
EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS VIA HPLC-MS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Maranhão como requisito
para obtenção do título de Bacharel em Química
Industrial.

Orientador: Dr. Nestor Everton Mendes Filho

Co-orientador: Dr. Raphael Teixeira Verbinnen

São Luís

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Viana, José Lucas Martins.

VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE TRAÇOS DE BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS VIA HPLC-MS / José Lucas Martins Viana. - 2017.

64 f.

Coorientador(a): Raphael Teixeira Verbinnen.

Orientador(a): Nestor Everton Mendes Filho.

Monografia (Graduação) - Curso de Química Industrial, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

1. Anti-incrustantes. 2. Diuron. 3. HPLC-ESI-SQ-MS. 4. Irgarol® 1051. 5. Sedimentos. I. Mendes Filho, Nestor Everton. II. Verbinnen, Raphael Teixeira. III. Título.

JOSÉ LUCAS MARTINS VIANA

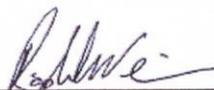
**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
ANÁLISE DE TRAÇOS DE BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA
GERAÇÃO EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS VIA HPLC-MS**

Data de Aprovação: 19/01/2017



Nestor Everton Mendes Filho

Universidade Federal do Maranhão



Raphael Teixeira Verbinnen

Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão



Cláudia Quintino da Rocha

Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha mãe e minha irmã, pelo incentivo e apoio dados a qualquer aspecto relacionado à minha vida acadêmica. Sem vocês tudo isso seria não menos do que impossível. Agradeço à Universidade Federal do Maranhão pela minha formação e pela disponibilidade de equipamentos e espaço físico para o desenvolvimento deste trabalho. Um obrigado mais do que especial à minha queridíssima, Prof^a Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco, primeiro por ter me dado oportunidade de ingressar na pesquisa desde o início da graduação, segundo por ter tido confiança em momentos de dificuldade e de sempre ter me dado autonomia suficiente, o que contribuiu muito para meu crescimento como profissional da química. Só tenho a agradecer aos meus companheiros do LAEC: Marisa, Virgínia, Heloana e Marta por todo o apoio até aqui. Agradeço ao professor Dr. Nestor Everton, por ter aceitado ser meu orientador neste trabalho. Agradeço ainda ao meu co-orientador, Dr. Raphael Teixeira Verbinnen, pela ajuda essencial e paciência no decorrer deste trabalho, sem dúvida sua ajuda foi capital para o resultado obtido. Agradeço aos meus queridos amigos que fiz durante esses quatro anos de graduação, especialmente Elaine, Wemerson, Manoel e Carol. Sem vocês a caminhada nada glamourosa para me tornar o maior químico da história que vocês respeitam teria sido bem mais dura e, obviamente, bem menos divertida.

No mais, agradeço ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas durante os três anos de iniciação científica, à EMAP pela autorização para a coleta de amostras no perímetro do Porto do Itaqui e Terminal da Ponta da Espera, ao Grupo Nacional de Estudos em Sistemas Anti-incrustantes, ao Laboratório de Estudos em Oceanografia Geológica (DEOLI – UFMA), coordenado pelo Prof. Dr. Leonardo Gonçalves, pelo suporte integral dado à realização das análises granulométricas das amostras utilizadas neste trabalho e ao Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (DEOLI – UFMA), coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Luvizzotto, pela coleta de amostras no Porto do Itaqui.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método analítico para análise de traços dos biocidas irgarol[®] 1051 e diuron em amostras de sedimentos via HPLC-ESI-SQ-MS. Foram escolhidos dez pontos de coleta de sedimentos distribuídos na Ilha de São Luís (Porto da Vovó, Raposa, Terminal da Ponta da Espera, Rampa C. Melo, Estaleiro-escola, Espigão Costeiro, Ponte José Sarney, Porto do Itaqui - Berço 100, Área de Despejo 1 e Igarapé Argentina). O teor de matéria orgânica das amostras variou entre 0,070% e 4,80% e análises granulométricas mostraram composições texturais de areia fina, areia muito fina e silte/argila. Os analitos foram extraídos via ultrassom combinado com extração em fase sólida (SPE). O método apresentou linearidade adequada na faixa de concentrações estudada e limites de detecção e quantificação suficientemente baixos (0,20 ng g⁻¹ e 5,0 ng g⁻¹ para irgarol[®] 1051 e diuron, respectivamente), porém devido a deficiências no processo para diuron, este foi excluído desta metodologia. As análises dos extratos de sedimentos revelaram níveis de irgarol[®] 1051 acima do LOQ em amostras de cinco pontos de coleta: Estaleiro-escola (4,66 ± 5,04 ng g⁻¹) > Terminal da Ponta da Espera (1,36 ± 1,26 ng g⁻¹) > Porto do Itaqui (Área de despejo 1) (1,13 ± 0,0459 ng g⁻¹) > Porto do Itaqui (Igarapé Argentina) (0,69 ± 0,0389 ng g⁻¹) > Espigão Costeiro (0,54 ± 0,210 ng g⁻¹), ou seja, estaleiros e áreas de intenso fluxo de embarcações apresentaram as maiores concentrações do biocida. Os resultados relatados neste trabalho são as primeiras informações acerca da ocorrência de biocidas anti-incrustantes de terceira geração em amostras de sedimentos provenientes da Ilha de São Luís.

Palavras-chave: Irgarol[®] 1051. Diuron. Anti-incrustantes. Sedimentos. HPLC-ESI-SQ-MS.

ABSTRACT

This work aimed at the development of an analytical method to analyze trace of biocides irgarol[®] 1051 and diuron in sediment samples via HPLC-ESI-SQ-MS. Ten sediment collection points were chosen in São Luís Island (Porto da Vovó, Raposa, Terminal da Ponta da Espera, Rampa C. Melo, Estaleiro-escola, Espigão Costeiro, Ponte José Sarney, Porto do Itaqui - Berço 100, Área de Despejo 1 and Igarapé Argentina). The organic matter content of the samples varied between 0.070% and 4.80% and the granulometric analyzes showed texture compositions of fine sand, very fine sand and silt/clay. The validation of the methodology was based on the evaluation of selectivity, linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy of the method. The analytes were extracted by ultrasound and solid phase extraction (SPE). The method presented adequate linearity in the studied range of concentrations and sufficiently low limits of detection and quantification (0.20 ng g⁻¹ and 5.0 ng g⁻¹ for irgarol[®] 1051 and diuron, respectively) but due to process deficiencies for diuron, it was excluded of this methodology. Analyzes of sediment extracts revealed levels of irgarol[®] 1051 above LOQ in samples from five collection points: Estaleiro-escola (4.66 ± 5.04 ng g⁻¹) > Terminal da Ponta da Espera (1.36 ± 1.26 ng g⁻¹) > Porto do Itaqui (Área de despejo 1) (1.13 ± 0.0459 ng g⁻¹) > Porto do Itaqui (Igarapé Argentina) (0.69 ± 0.0389 ng g⁻¹) > Espigão Costeiro (0.54 ± 0.210 ng g⁻¹), i.e., shipyards and areas of intense flow of vessels presented the highest concentrations of the biocide. The results reported in this work are the first information about the occurrence of third-generation anti-fouling biocides in sediment samples from São Luís Island.

Keywords: Irgarol[®] 1051. Diuron. Anti-fouling. Sediments. HPLC-ESI-SQ-MS.

*“(...) You wanna hot body?
You wanna Bugatti?
You wanna Maserati?
You better work, bitch! (...)”*

(Britney Spears)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Organismos incrustantes em cascos de navios.....	16
Figura 2: Estrutura química do irgarol® 1051.	21
Figura 3: Estrutura química do diuron.....	22
Figura 4: Relação entre os parâmetros relacionados à exatidão do método: efeito de matriz, recuperação e eficiência do processo.	31
Figura 5: Mapa dos pontos de amostragem de sedimentos em São Luís, MA.....	34
Figura 6: Locais de coleta de sedimentos em São Luís: a) Porto da Vovó; b) Raposa; c) Estaleiro-escola.....	35
Figura 7: Terminal da Ponta da Espera.	36
Figura 8: Gradiente de eluição dos analitos no sistema HPLC..	38
Figura 9: Esquema resumido do processo de extração, adaptado de Abreu (2016), dos biocidas irgarol® 1051 e diuron de amostras de sedimentos costeiros.....	39
Figura 10: Teor de Matéria Orgânica (%) (\pm desvio-padrão) nas amostras de sedimentos analisadas pelo método de Walkley-Black.....	44
Figura 11: Cromatogramas obtidos a partir de injeção de solução-padrão a 50 ng mL ⁻¹ de irgarol® 1051 e diuron.	46
Figura 12: Cromatogramas obtidos pela injeção de extratos em branco e fortificados com irgarol 1051 da matriz P01.	47
Figura 13: Cromatogramas obtidos pela injeção de extratos em branco e fortificados com diuron da matriz P01.....	47
Figura 14: Curvas analíticas construídas para: a) Irgarol® 1051 em solvente puro (ACN) e b) por meio de adição de padrão antes da extração; c) Diuron em solvente puro (ACN) e d) por meio de adição de padrão antes da extração.	48
Figura 15: Quantificação de irgarol® 1051(ng g^{-1}) (\pm desvio-padrão; N=4) em amostras de sedimentos coletadas nos dez pontos amostrais no entorno de São Luís, MA.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do irgarol® 1051.....	21
Tabela 2: Propriedades físico-químicas do diuron.	23
Tabela 3: Identificação das áreas de amostragem de sedimentos em São Luís, MA.	33
Tabela 4: Resultado das análises granulométricas de sedimentos coletados em São Luís, MA, de acordo com o software <i>SysGran</i>	45
Tabela 5: Parâmetros otimizados para a detecção de irgarol® 1051 e diuron por espectrometria de massas.....	46
Tabela 6: Tabela ANOVA gerada a partir da análise dos dados de regressão da curva analítica em matriz de irgarol® 1051.	48
Tabela 7: Tabela ANOVA gerada a partir da análise dos dados de regressão da curva analítica em matriz de diuron.	49
Tabela 8: Equações das retas calculadas para irgarol® 1051 e diuron em solvente puro e em matriz.	49
Tabela 9: Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para irgarol® 1051 e diuron, baseados nos estudos realizados a partir da curva analítica de adição-padrão.	50
Tabela 10: Testes de precisão para irgarol® 1051 e diuron a níveis de repetibilidade, realizados num mesmo dia, sob as mesmas condições; e precisão intermediária, calculada com base em injeções realizadas em três dias distintos, no mesmo equipamento. DPR (%) = Desvio-padrão relativo (N=3).....	50
Tabela 11: Eficiência do processo (EP) % ± desvio-padrão (N=3) calculada em três níveis de concentração para irgarol® 1051 e diuron.....	51
Tabela 12: Efeito matriz (EM) % ± desvio-padrão (N=3) calculada em três níveis de concentração para irgarol® 1051.	52
Tabela 13: Recuperação (R) % ± desvio-padrão (N = 3) calculada em três níveis de concentração para irgarol® 1051.	53
Tabela 14: Concentrações de irgarol® 1051 encontrados em amostras de sedimentos costeiros estudos realizados em diversos países.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – *Analysis of variance*

ANTAQ – Agência nacional de transportes aquaviários

API – Ionização à pressão atmosférica

ASE – Extração acelerada por solvente

a.C. – Antes de Cristo

CE₅₀ – Concentração de efeito sobre 50 % da população de organismos

CL₅₀ – Concentração letal para 50 % da população de organismos

CLP - *Classification, Labelling and Packaging*

CMMA – Costa de Manguezais Macromaré da Amazônia

CPSL – Complexo Portuário de São Luís

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPR – Desvio-padrão relativo

EM – Efeito de matriz

EMAP – Empresa Maranhense de Administração Portuária

EP – Eficiência do processo

ESI – Ionização por *Electrospray*

GC – Cromatografia gasosa

GC-MS – Cromatografia gasosa – Espectrometria de massas

HPLC-DAD – Cromatografia líquida - Detecção por arranjo de diodos

HLC-MS – Cromatografia líquida com detecção por Espectrometria de Massas

HPLC-ESI-SQ-MS – Cromatografia líquida com detecção por Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização em *Eletrospray* e Analisador de Massas Quadrupolar Simplex

ICH – *International Conference on Harmonisation*

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

MAE-SPE – Extração Assistida por Micro-ondas – Extração em Fase Sólida

MO – Matéria orgânica

MS – Espectrometria de Massas

OMI – Organização Marítima Internacional

OTs - Organoestênicos

PSII – Fotossistema II

R – Taxa de Recuperação (%)

REACH - *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*

SPC – Copolímero de Auto Polimento

SPE – Extração em Fase Sólida

TBT - Tributilestanho

TPT - Trifenilestanho

UAE – Extração Assistida por Ultrassom

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Bioincrustação	16
2.2	Tintas anti-incrustantes	17
2.2.1	TINTAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO.....	20
2.2.1.1	Irgarol® 1051	20
2.2.1.1	Diuron.....	22
2.3	Validação de metodologias analíticas em HPLC-ESI-MS	24
2.3.1	SELETIVIDADE	25
2.3.2	CURVA ANALÍTICA / FAIXA LINEAR	26
2.3.3	LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)	26
2.3.4	PRECISÃO.....	27
2.3.5	EXATIDÃO	28
2.3.5.1	Efeito Matriz (EM).....	28
2.3.5.2	Recuperação (R) e Eficiência do Processo (EP)	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Descrição das áreas de amostragem e coletas de sedimentos	33
4.2	Análises granulométricas dos sedimentos	36
4.3	Avaliação do teor de matéria orgânica em sedimentos	37
4.4	Condições instrumentais de análise por HPLC-ESI-SQ-MS	37
4.5	Método de extração de irgarol® 1051 e diuron de sedimentos	38
4.6	Validação analítica	39
4.6.1	SELETIVIDADE	40
4.6.2	LINEARIDADE DO MÉTODO E FAIXA DE TRABALHO	40
4.6.3	LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	40
4.6.4	PRECISÃO.....	41
4.6.5	EXATIDÃO	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Determinação do teor de matéria orgânica de sedimentos	43

5.2	Análises granulométricas de sedimentos	44
5.3	Condições de análise via HPLC-ESI-SQ-MS	45
5.4	Validação analítica	47
5.4.1	SELETIVIDADE	47
5.4.2	LINEARIDADE	47
5.4.2	LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	49
5.4.3	PRECISÃO	50
5.4.4	EXATIDÃO	51
5.5	Biocidas de terceira geração em amostras de sedimentos	53
6	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A bioincrustação marinha pode ser descrita como a comunidade de organismos que se fixam e crescem nas superfícies externas de objetos submersos ou semi-submersos, tais como plataformas petrolíferas e cascos de navios. Esse é um processo indesejável, uma vez que a presença de lodo, algas e animais, como mexilhões, provoca aumento na resistência à fricção de embarcações em movimento na água, resultando em um decréscimo de velocidade, incremento no consumo de combustível, manobrabilidade mais pobre, além de desencadear processos de corrosão, bem como tem potencial para a introdução de espécies estranhas em novos ecossistemas. Além disso, as bioincrustações em estruturas estáticas podem comprometer a segurança pela redução da estabilidade e por esconder defeitos estruturais (TURNER, 2009; YEBRA *et al.*, 2004; DAFFORN *et al.*, 2011).

Para combater esse problema, o artifício mais utilizado é o revestimento dessas estruturas com tintas contendo compostos com propriedades anti-incrustantes, que com o tempo se mostraram tóxicos a organismos não-alvo. Apesar do caráter deletério que apresentam à biota marinha, diversas formulações, cada vez mais potentes e letais, foram desenvolvidas, destacando-se aquelas à base de compostos organoestânicos, tais como tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT), que foram rapidamente difundidas devido à sua alta eficácia. No entanto, constatou-se a alta toxicidade do TBT, considerado uma das substâncias mais tóxicas já introduzidas no ambiente marinho (BERTO *et al.*, 2007; SONAK, 2009). Como consequência da sua elevada toxicidade a espécies não-alvo, o composto foi banido dos cascos dos navios pela Organização Marítima Internacional (OMI) desde 2008 (CASTRO *et al.*, 2011), o que resultou no desenvolvimento de compostos alternativos para a proteção de cascos de navios. Tais compostos são conhecidos como biocidas de reforço (GATIDOU e THOMAIDIS, 2007; SANTANA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011). São cerca de vinte compostos, entre metálicos e não metálicos homologados pela OMI em substituição ao TBT. Dentre os não metálicos incluem-se o diuron e o irgarol[®] 1051, herbicidas frequentemente usados na agricultura.

A importância da determinação de biocidas anti-incrustantes é ambientalmente relevante, considerando-se as propriedades tóxicas e o risco potencial dessas substâncias para a biota marinha. Devido à sua ocorrência em baixas concentrações, a comunidade científica é forçada a desenvolver procedimentos analíticos que possam ser usados para determinar não somente a presença desses biocidas em ambientes marinhos, mas também suas concentrações com grande acurácia. Esses métodos precisam ser robustos, precisos e sensíveis para serem

usados em situações regulatórias (ALBANIS *et al.*, 2003). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) é atualmente usada para a análise de pesticidas polares, como carbamatos, organofosforados, triazinas e ácidos fenóxiclorados entre outros, apresentando limites de detecção adequados para análises de resíduos. Esta técnica é especialmente poderosa para a análise direta de compostos polares, que são sujeitos à decomposição térmica ou não têm uma pressão de vapor adequada para separações por cromatografia gasosa (GC). Baseado no tipo de interface, HPLC-MS também é capaz de fornecer informações estruturais para a confirmação de analitos na amostra (CHAVES *et al.*, 2007).

A validação é uma etapa essencial para definir se métodos desenvolvidos estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Deve-se ressaltar que o método pode ser considerado validado, mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, mas que sejam criteriosamente conhecidos e, portanto, adequados aos objetivos do estudo a ser realizado (BRITO *et al.*, 2003).

Estudos sobre as concentrações ambientais de biocidas de reforço são frequentemente realizados em amostras de água. No entanto, o número de artigos que se referem à presença dessas substâncias em sedimentos marinhos é reduzido (SANTANA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011). Os sedimentos são importantes no estudo de monitoramento, pois podem ser matrizes de acúmulo de substâncias tóxicas que podem ser liberadas ao corpo aquático por períodos prolongados, representando perigo em potencial para as espécies marinhas.

Nesse contexto, a Ilha de São Luís, por estar localizada em uma vasta área de manguezal, pode sofrer prejuízos pelo uso de biocidas anti-incrustantes em suas áreas portuárias. A região, juntamente com o nordeste do estado do Pará, constitui-se na Costa de Manguezais de Macromaré da Amazônia (CMMA) (FORTES *et al.*, 2009; TEIXEIRA e SOUZA FILHO, 2009), maior faixa contínua de manguezais da costa brasileira. Manguezais são caracterizados pela elevada produtividade primária, sendo os berçários naturais de diversas espécies devido à elevada quantidade de matéria orgânica, gerada ou depurada em suas áreas. São zonas de grande relevância ecológica e que, devido à atividade portuária, são foco potencial para compostos anti-incrustantes, o que justifica o estudo realizado nessa região.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bioincrustação

A bioincrustação marinha (ou biofouling) é vista atualmente como um processo resultante da colonização ou do crescimento de bactérias, algas e/ou invertebrados sésseis sobre superfícies submersas, sejam elas naturais (tais como rochas, madeira, outros organismos, etc.) ou feitas pelo homem (cais, plataformas, cascos de navios, boias, cabos, etc.) (Figura 1). Esse processo se inicia após um tempo de imersão relativamente curto (GAMA *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2007).

A ligação e o crescimento desses organismos em cascos de embarcações originam efeitos indesejáveis. Em instalações fixas, como plataformas de exploração de petróleo, piers, docas, etc., a incrustação estimula a corrosão, aumenta a massa da instalação, além de conferir uma distorção da configuração inicial da estrutura. Em tubulações marítimas, como as de resfriamento de plataformas e usinas nucleares, a incrustação provoca entupimento e alteração do hidrodinamismo das tubulações, provocando assim uma maximização do desgaste pela erosão (GAMA *et al.*, 2009).

Em embarcações, como navios, ocorre aumento da resistência à fricção devido à rugosidade gerada, o que leva a um aumento de peso e conseqüente redução de velocidade potencial e perda de manobrabilidade. Para compensar isso, maior consumo de combustível é necessário, o que provoca um aumento das emissões de compostos nocivos, custos de manutenção mais elevados e maior frequência de operações de ancoragem a seco, isto é, tempo é perdido e recursos são desperdiçados quando são aplicadas medidas de reparação.

Figura 1: Organismos incrustantes em cascos de navios.



Fonte: a) DAFFORN *et al.* 2007; b) YEBRA, 2004.

Estima-se que um aumento de 10 μm (1/1000 cm) na rugosidade média do casco de um barco, resulta também em um incremento de 0,3 a 1,0% do consumo de combustível. Além disso, pode provocar deterioração do revestimento de modo a favorecer a descoloração e a alteração da condutividade elétrica do material (YEBRA, 2004; SONAK, 2007; GAMA *et al.*, 2009). Além dos inconvenientes financeiros e estruturais citados anteriormente, alguns estudos demonstram que a bioincrustação é tão ou mais importante que a água de lastro enquanto vetor de introdução de espécies exóticas (GAMA *et al.*, 2009).

A gravidade local da bioincrustação depende de um grande número de parâmetros. Alguns deles são dados pelas condições da água e dependem da localização geográfica e do padrão operacional do navio (YEBRA, 2004). O grau de incrustação depende não só do tempo que o navio permanece no porto ou da sua velocidade de cruzeiro no mar, mas também muito especialmente da natureza da água nas diferentes regiões do mundo (ALMEIDA *et al.*, 2007). A enorme diversidade de organismos incrustantes, com origens filogenéticas, estratégias de vida, nutrição e habilidades competitivas distintas tornam o estudo da bioincrustação extremamente importante na compreensão de modelos e processos ecológicos de interesse geral, tais como as formas de prevenção da incrustação em superfícies feitas pelo homem e a bioinvasão, por exemplo (GAMA *et al.*, 2009).

A necessidade de proteger as superfícies submersas, em especial os cascos dos navios contra as “impurezas” marinhas é tão antiga quanto o uso que os homens fazem dos navios como meio de locomoção (ALEMIDA *et al.*, 2007). Algumas das desvantagens da bioincrustação têm sido reconhecidas e combatidas há mais de 2000 anos (YEBRA, 2004) e o revestimento das superfícies submersas com algum material com características que impeçam o estabelecimento dessas comunidades sempre foi o principal meio de controlá-la e, conseqüentemente, uma das principais formas de contaminação do meio aquático.

2.2 Tintas anti-incrustantes

As medidas anti-incrustantes incluem o uso de revestimentos em cascos de embarcações para inibir a colonização de organismos marinhos. Estes têm tradicionalmente incorporado substâncias tóxicas, incluindo cobre e tributilestanho, numa matriz de tinta que gradualmente lixivia o biocida da camada superficial para evitar a sedimentação (DAFFORN *et al.*, 2011). Estima-se que, em escala global, sejam gastos pelo menos 450 milhões de dólares ao ano com a prevenção da bioincrustação e que se este montante não fosse gasto os prejuízos anuais seriam da ordem de 7 bilhões de dólares por ano (GAMA *et al.*, 2009).

Desde a antiguidade muitos tipos de revestimentos foram utilizados para conter a bioincrustação em cascos de embarcações. Segundo Yebra (2004), os primeiros fenícios e cartagineses teriam usado piche e, possivelmente, revestimento de cobre no fundo dos navios, enquanto cera, alcatrão, asfalto e chumbo foram usados por outras culturas antigas. No século V a.C., os historiadores relatam que os revestimentos de arsênio e enxofre misturados com óleo também foram usados para combater a bioincrustação. Romanos e gregos utilizaram o revestimento de chumbo com pregos de cobre, que era o mais difundido naquela época, sendo adotado oficialmente pela Espanha, França e Inglaterra. Esse sistema de chumbo foi talvez o mais procurado antes do século XVIII, porém causou a corrosão nos componentes de ferro dos navios, e foi abandonado pelo almirantado britânico em 1682. O primeiro registro sobre o uso de cobre como um anti-incrustante está na patente britânica de William Beale em 1625, que pode ter usado uma mistura de cimento, ferro em pó e, provavelmente, um composto de cobre (sulfureto de cobre ou minério de arsênio e cobre) (YEBRA, 2004).

A utilização de sistemas anti-incrustantes incorporados às tintas passou a ser comum, e cada vez mais frequente, na medida em que os cascos de madeira das embarcações foram substituídos por cascos metálicos, fato ocorrido em meados do século XVIII (CASTRO *et al.*, 2011). Uma variedade de tintas foi desenvolvida meados de 1800 com base na ideia de dispersar um agente tóxico em um veículo polimérico. Óxidos de cobre, arsênio e de mercúrio eram anti-incrustantes populares. Os solventes incluíam óleo de terebintina, nafta e benzeno (ALMEIDA, *et al.*, 2007).

Após a Segunda Guerra Mundial, mudanças importantes ocorreram na indústria, como o aparecimento de novas resinas sintéticas à base de petróleo, que apresentam características mecânicas melhoradas, e o aumento da preocupação com a segurança e a saúde (causando o abandono de compostos organomercurosos e organoarsênicos). Também durante este período, o surgimento de compostos organoestânicos (OTs), especialmente o TBT melhorou o desempenho dessas tintas e pareceu resolver definitivamente o problema da incrustação (YEBRA, 2004). Essas tintas, conhecidas como de segunda geração, utilizavam como princípio ativo TBT e/ou TPT (CASTRO *et al.*, 2011).

Os OTs foram inicialmente utilizados como co-biocidas em tintas de cobre de alto desempenho, mas gradualmente passou a ser usado na maioria dos sistemas anti-incrustantes. Embora o TBT e seus derivados ofereçam ampla proteção contra a contaminação de organismos marinhos, estes foram frequentemente utilizados em conjunto com o cobre porque as algas marrons e verdes e certas diatomáceas são tolerantes ao TBT, enquanto microalgas e

ânforas são tolerantes ao cobre. Inicialmente estes biocidas existiram na chamada "forma de associação livre", não reagidos a um ligante (YEBRA, 2004). Essas tintas de livre associação tiveram uma vida útil limitada de cerca de dois anos e foram substituídas na década de 1970 por tintas de copolímero de auto-polimento (SPC) (vida > 5 anos) (DAFFORN *et al.*, 2011). A partir daquela década, as tintas à base de copolímero de TBT substituíram as tintas à base de cobre devido a sua maior eficácia e duração (SONAK, 2007).

Os derivados de OTs foram amplamente utilizados, ganhando notoriedade devido ao seu amplo espectro de atividade, não causando corrosão galvânica em cascos de alumínio e sendo incolores. Na década de 1980, chegaram a revestir 90% dos cascos dos navios em operação no mundo (YEBRA, 2004; CASTRO *et al.*, 2011). No entanto, o TBT tem sido descrito como uma das substâncias mais tóxicas já introduzidas no ambiente marinho. Após sua liberação no ambiente aquático, o TBT acumula-se em material particulado e afunda-se no solo como sedimento (SONAK, 2007).

As primeiras evidências de danos ambientais causados pelo TBT liberado por tintas anti-incrustantes apareceram em explorações aquícolas em Arcachon (França). Durante 1975-1982, a produção de ostras foi severamente reduzida devido à falta de reprodução e ao aparecimento de anomalias de calcificação de conchas em ostras adultas, o que resultou em elevadas perdas econômicas (SONAK, 2007). Os organoestânicos são tóxicos devido ao seu aumento de solubilidade em gordura (em comparação com o estanho inorgânico), o que lhes permite penetrar nas membranas biológicas e seu modo de ação como um potente disruptor endócrino dentro da célula (DAFFORN *et al.*, 2011).

Os organismos aquáticos podem ser contaminados de diferentes formas: através de efeitos diretos no organismo, suas funções ou seu comportamento; ou por efeitos indiretos na comunidade, através da ruptura de relações predador-presa e fluxo de energia, por exemplo (GAMA *et al.*, 2009). Dafforn *et al.* (2011), enumeram uma série de estudos relatando efeitos nocivos causados por TBT a várias espécies da fauna aquática.

Devido aos enormes problemas ambientais causados pelo intenso uso de tintas anti-incrustantes à base de compostos organoestânicos, em outubro de 2001 foi decretada a proibição do uso deste tipo de biocidas no fabrico de tintas anti-incrustantes a partir de 1 de janeiro de 2003 e a presença destas tintas nas superfícies dos navios a partir de 1 de janeiro de 2008 (ALMEIDA *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2011).

Desde a proibição do TBT, o cobre voltou a ser o biocida predominante utilizado em sistemas anti-incrustantes (DAFFORN *et al.*, 2011). Assim, as empresas de tintas marinhas foram solicitadas a encontrar um substituto adequado capaz de complementar a sua ação, uma vez que esse metal mostra ineficiência contra algumas espécies de algas e diatomáceas generalizadas (YEBRA, 2004; TURNER, 2010). Assim, as propriedades anti-incrustantes das formulações contemporâneas são melhoradas pela adição de um ou mais co-biocidas secundários (ou de reforço) (TURNER, 2010), sendo reconhecidas como uma terceira geração de tintas anti-incrustantes (CASTRO *et al.*, 2011).

2.2.1 TINTAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO

A maioria das tintas anti-incrustantes de cobre é fortificada com biocidas adicionais de “reforço”, frequentemente herbicidas, tendo em vista que estes provocam efeitos negativos na taxa de crescimento de organismos fotossintéticos. Entre os biocidas de reforço atualmente disponíveis, pode-se citar irgarol® 1051, diuron, cobre piritiona, zinco piritiona, sea-nine™ 211 e zineb. Embora seus efeitos ainda estejam sob investigação, piritionato de zinco e zineb parecem ser os menos nocivos para o meio ambiente, enquanto irgarol® 1051 e diuron são vistos como mais prejudiciais (ALMEIDA *et al.*, 2007). Estes compostos pertencem a diferentes grupos químicos e, em alguns casos, podem ser utilizados concomitantemente (até 4 deles) em uma mesma formulação comercial (DAFFORN *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2011). Segundo Ackha *et al.* (2012), o uso continuado desses “biocidas de reforço” em tintas anti-incrustantes aumenta a probabilidade de que as comunidades microbianas possam desenvolver tolerância aumentada e, portanto, reduzir a sua eficácia na prevenção de bioincrustação.

As concentrações ambientais elevadas destes produtos químicos são mais significativas em sistemas marinhos semifechados, tais como portos, marinas e estuários, onde o transporte e atracação de navios são importantes (TURNER, 2010).

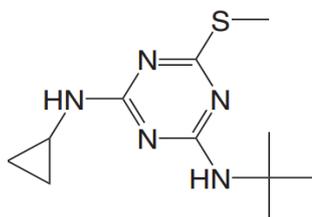
2.2.1.1 Irgarol® 1051

É um herbicida fotoinibidor utilizado como biocida anti-incrustante. Sua eficácia em prevenir a incrustação de algas se dá por sua ação na diminuição do transporte de elétrons nos cloroplastos do fotossistema II (DAFFORN *et al.*, 2011; YEBRA, 2004).

Irgarol® 1051 é o composto mais hidrofóbico da família das triazinas devido à presença tanto do grupo terc-butil como do grupo ciclopropil (Figura 2). Assim, espera-se que

este composto seja detectado em concentrações mais elevadas em amostras de sedimentos do que na fase aquosa (KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004).

Figura 2: Estrutura química do irgarol® 1051.



Fonte: Castro, *et al.*, 2011.

Irgarol® 1051 é encontrado em concentrações significativas tanto na coluna de água como no sedimento (YEBRA, 2004). A degradação deste biocida em sedimentos de água doce e de mar é bastante lenta, com meias-vidas de cerca de 100 e 200 dias, respectivamente. Em condições anaeróbias, a degradação nos sedimentos é consideravelmente mais lenta (YEBRA, 2004). Suas propriedades físico-químicas estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do irgarol® 1051. P.V (pressão de vapor); P.E. (ponto de ebulição); LogK_{ow} = Logaritmo da constante de partição octanol-água; K_H = constante de Henri.

Solubilidade em água (mg L⁻¹)	P.V (Pa)	P.E. (°C)	LogK_{ow}	K_H
7,0	1,5.10 ⁻⁵	428,0	3,95	5,1.10 ⁻⁵

Fonte: CASTRO *et al.*, 2011.

Diversos países já possuem regulações para os níveis de irgarol® 1051 no ambiente. Seu uso como agente anti-incrustante é proibido na Austrália e Dinamarca (DAFFORN *et al.*, 2011). Tintas contendo este biocida foram totalmente retiradas do mercado para uso em pequenas embarcações no Reino Unido (CRESSWELL *et al.*, 2006). No Brasil, não há legislação específica que limite os níveis ambientais de irgarol® 1051.

Os efeitos tóxicos mais pronunciados ocorrem em organismos fitoplanctônicos. Burma *et al.* (2009), determinaram os valores de concentração de efeito (CE₅₀) de irgarol® 1051 para a taxa de crescimento das algas *Tetraselmis sp.*, *Thalassiosira weissflogii*, *Emiliania huxleyi* e *Fibrocapsa japonica* e obtiveram valores extremamente baixos (0,116, 0,303, 0,406 e 0,618 µg L⁻¹ respectivamente). Ali *et al.* (2015) estudaram a toxicidade aguda de irgarol® 1051 à espécie de peixe *Lates calcarifer*. Seus resultados revelaram que este composto é tóxico, com concentração letal (CL₅₀ (96 h)) de 0,535 (± 0,011) mg L⁻¹, além de reduzir a composição de

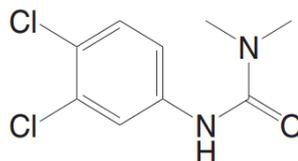
ácidos graxos dos peixes mesmo com baixos níveis de exposição (valores de CL₅₀ a 10% e 30%) que são considerados normais como valores de exposição seguros.

A presença desse biocida tem sido bastante reportada em diversas matrizes ambientais ao redor do mundo, principalmente água em marinha e sedimentos, com o emprego de diferentes métodos de extração e técnicas analíticas. Em amostras de água marinha, a maioria dos trabalhos utiliza extração em fase sólida (SPE) e análise por HPLC-MS (ALI *et al.*, 2013; BATISTA-ANDRADE *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2014; SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013), GC-MS (SHEIKH *et al.*, 2016; ZHOU, 2008) e ainda por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) (DINIZ *et al.*, 2014). Em sedimentos, os métodos mais comuns empregam extração assistida por ultrassom (UAE) (SALEH *et al.*, 2016), extração assistida por micro-ondas seguido de extração em fase sólida (MAE-SPE) (SANTANA-RODRIGUEZ *et al.*, 2011; ZHOU, 2008) e extração acelerada por solventes (ASE) (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013). As análises são frequentemente realizadas por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) (SALEH *et al.*, 2016; ZHOU, 2008) e HPLC-MS (SANTANA-RODRIGUEZ *et al.*, 2011; SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013).

2.2.1.1 Diuron

É um herbicida pertencente à família das fenilamidas e da subclasse das fenilureias (COCHET e GIACOMAZZI, 2004). Em microrganismos e em plantas atua inibindo a fotossíntese, prevenindo a produção de oxigênio e a transferência de elétrons na segunda etapa fotossintética. Sua estrutura química está representada na Figura 3:

Figura 3: Estrutura química do diuron.



Fonte: Castro *et al.*, 2011.

A frequente detecção do diuron se deve ao seu emprego na composição de tintas anti-incrustantes, assim como sua ampla utilização em outras áreas de aplicação, principalmente no controle de ervas daninhas em atividades agrícolas (KONSTANTINOUS e ALBANIS, 2004). Sua taxa de hidrólise é insignificante em pH neutro, mas aumenta sob circunstâncias fortemente ácidas ou alcalinas (CASTRO *et al.*, 2011).

Diuron pode ser encontrado em muitos compartimentos ambientais, como solo, sedimentos e água. Um aumento na concentração de partículas aumenta sua sorção para sedimentos marinhos (em comparação com os outros biocidas). O composto tem uma taxa muito lenta de hidrólise natural numa solução neutra a 25 °C e a biodegradação parece ser sua principal causa da degradação (COCHET e GIACOMAZZI, 2004). Suas principais propriedades físico-químicas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas do diuron. . P.V (pressão de vapor); P.E. (ponto de ebulição); LogK_{ow} = Logaritmo da constante de partição octanol-água; K_H = constante de Henri.

Solubilidade em água (mg L⁻¹)	P.V (mPa)	P.E. (°C)	LogK_{ow}	K_H
42	9.10 ⁻⁶	385,2	2,6	5,1.10 ⁻⁵

Fonte: COCHET e GIACOMAZZI, 2004; CASTRO *et al.*, 2011.

Diuron é regulado na Europa pela legislação química: *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* (REACH), pela legislação de classificação, rotulagem e embalagem de substâncias: *Classification, Labelling and Packaging* (CLP) e também pela legislação sobre produtos fitofarmacêuticos e biocidas da Agência Finlandesa de Segurança e Produtos Químicos, sendo proibido em alguns lugares, como Países Baixos, Dinamarca e Reino Unido. A Agência de Proteção Ambiental dos EUA listou diuron como um carcinógeno humano provável (HUOVINEN, 2015). No Brasil, a Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, dispõe sobre a concentração máxima de diuron em água potável, estabelecendo o limite de 90 µg L⁻¹.

Esse biocida tem mostrado alta toxicidade a espécies não-alvo por meio de inúmeros testes de toxicidade com uma série de plantas e animais. O estudo da sua toxicidade crônica em ratos Wistar induziu tumores uroteliais na bexiga urinária em grupos alimentados com 2,5 g L⁻¹, durante um período de 20 semanas. Hiperplasia simples urotelial e o índice de proliferação celular aumentaram significativamente em grupos alimentados com diuron a 1,25 e 2,5 g L⁻¹ (CARDOSO *et al.*, 2013). Exposições de ostras *Crassostrea gigas* machos a concentrações de 0,3 g L⁻¹ do biocida durante a gametogênese gerou danos estruturais ao DNA, além da transmissão parental desses danos para a próxima geração, demonstrada pela detecção de uma alta taxa de aneuploidia de DNA (até 15%) (BARRANGER *et al.*, 2014). Testes de toxicidade aguda com *Artemia salina*, conduzidos por Shaala *et al.*, (2015) revelaram que concentrações crescentes de diuron aumentam a mortalidade, bem como influenciam o desenvolvimento morfológico e o comprimento total dos náuplios dessa

espécie. A CL_{50} de diuron foi identificada como 23,27 mg L⁻¹, 12,19 mg L⁻¹, 6,00 mg L⁻¹ após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente. Além disso, o diuron demonstrou ter efeitos embriotóxicos e genotóxicos no esperma de ostras em concentrações ambientalmente realistas, a partir de 0,05 g L⁻¹ (AKCHA *et al.*, 2012).

Assim como o irgarol[®] 1051, diuron é frequentemente detectado em diversas matrizes ambientais. A maioria dos estudos é focada em água marinha e sedimentos. Extração em fase sólida é o método mais utilizado em água marinha (ALI *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2014; SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013; BATISTA-ANDRADE *et al.*, 2016). Em sedimentos, os métodos mais comuns incluem extração assistida por ultrassom (UAE) (SALEH *et al.*, 2016), extração assistida por micro-ondas (SANTANA-RODRIGUEZ *et al.*, 2011) e extração acelerada por solventes (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013). As análises são realizadas com HPLC-MS (ALI *et al.*, 2014; BATISTA-ANDRADE *et al.*, 2016), GC-MS (SALEH *et al.*, 2016; SHEIKH *et al.*, 2016) e HPLC-DAD (DINIZ *et al.*, 2014).

2.3 Validação de metodologias analíticas em HPLC-MS

A cromatografia está entre as principais técnicas de separação, especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio e outras (LANÇAS, 2009). Devido à sua universalidade, seletividade e sensibilidade, a espectrometria de massas (MS) é considerada o detector de ouro para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (MARCHI *et al.*, 2009).

O sucesso da técnica de HPLC-MS surge da sua capacidade de fornecer dados tridimensionais. Primeiro, os compostos são separados em tempo por HPLC. Os íons gerados na fonte de ionização são então separados de acordo com as suas razões massa/carga (m/z) no analisador de massas. Finalmente, o detector (espectrômetro de massas) mede a abundância relativa de cada íon (KRUBE *et al.*, 2015a).

A fonte de ionização é um dispositivo que promove a ionização dos analitos da amostra antes da sua entrada no analisador de massas (DINIZ, 2011). O modo de ionização por *electrospray* (ESI) é, de longe, a forma mais empregada no acoplamento HPLC-MS. A ESI é um método de ionização suave, que permite a formação de íons em fase gasosa por meio de um processo delicado que torna possível a análise de compostos não voláteis e termolábeis. Os íons formados sofrem pouca ou nenhuma fragmentação. A formação dos íons se dá em pressão atmosférica, sendo preferível para análise de compostos polares ou iônicos, termolábeis, ou com massa molecular elevada (superior a 1.000 Da), além de proporcionar

melhores resultados para cromatografia em fase reversa (MANISALI *et al.*, 2006; KRUVE *et al.*, 2015a; LANÇAS, 2009).

Após serem gerados na fonte de ionização, os íons são transferidos para uma região do equipamento, conhecida como analisador de massas, onde sua razão m/z é medida. O analisador de massas do tipo quadrupolar simples é bastante popular devido a características como robustez e baixo custo. Sua exatidão de massas encontra-se, geralmente, entre 0,1 e 0,2 unidades de massa atômica (LANÇAS, 2009).

Sempre que um método analítico baseado em HPLC-MS é desenvolvido, seu desempenho deve ser cuidadosamente verificado e monitorado, sendo a validação uma atividade complexa e multifacetada, nem sempre facilmente separável do processo de desenvolvimento do método analítico (KRUVE *et al.*, 2015a). A validação do método é um processo necessário para demonstrar que um método analítico é adequado ao seu uso pretendido, assim, podendo oferecer resultados precisos e reprodutíveis (GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI *et al.*, 2004). Os parâmetros analíticos verificados durante a validação devem avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder (BRITO *et al.*, 2003).

2.3.1 SELETIVIDADE

Amostras complexas quase sempre contêm alguma substância com propriedades semelhantes às do analito e, por conseguinte, a identidade de um sinal presumivelmente pertencente ao analito tem de ser confirmada (KRUVE *et al.*, 2015a). A seletividade avalia o grau de interferência de espécies, tais como outros ingredientes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação, incluindo outros compostos de propriedades similares que possam estar, por ventura, presentes (RIBANI *et al.*, 2004).

Uma vez definidos e minimizados os interferentes provenientes de metabólitos e produtos de degradação durante o desenvolvimento do método analítico, a etapa seguinte consiste em avaliar a presença de substâncias não monitoradas e que são provenientes da matriz, afetando a detecção do analito, o qual é conhecido como efeito matriz (CASSIANO *et al.*, 2009).

2.3.2 CURVA ANALÍTICA / FAIXA LINEAR

A curva de calibração é o modelo matemático que relaciona a resposta do instrumento com as concentrações dos padrões de calibração em uma faixa de calibração definida (GONZÁLEZ *et al.*, 2014). A faixa linear pode ser determinada a partir de experiências de avaliação da linearidade com as concentrações mais baixas e superiores do analito na amostra para os quais tenha sido estabelecida precisão, exatidão e função de resposta (KRUIVE *et al.*, 2015b).

O termo “linearidade de sinal” pode, no contexto de LC-MS, ter dois significados estreitamente ligados: (1) relação linear entre o sinal do analito e sua concentração em amostras de calibração e (2) relação linear entre o sinal do analito e sua concentração em amostras contendo componentes de matriz. O último significado está se tornando cada vez mais utilizado. A razão é que se o sinal de analito nas amostras é linear, então possivelmente será linear em soluções de calibração, enquanto o contrário não é necessariamente verdadeiro (KRUIVE *et al.*, 2015b).

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida (RIBANI *et al.*, 2004). Para usar a regressão linear simples, o desvio-padrão do sinal deve ser constante na faixa de concentração escolhida (a exigência de homoscedasticidade). A homoscedasticidade pode ser avaliada por meio do teste F. O gráfico dos resíduos também é adequado para confirmar a regressão linear simples, tanto pela avaliação da distribuição aleatória dos resíduos quanto pela homoscedasticidade dos dados (KRUIVE *et al.*, 2015b).

2.3.3 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

O limite de detecção (LOD) é um importante parâmetro de desempenho que é usado tanto para caracterizar o método analítico, bem como a interpretação dos resultados da análise (EVARD *et al.*, 2016). É um dos parâmetros de validação fundamentais, representando a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada ou distinguida de um branco dentro de um nível de confiança indicado, não sendo necessariamente quantificada, constituindo fator de limitação de um sistema de detecção de substâncias químicas (RIBANI *et al.*, 2004; FONOLLOSA *et al.*, 2014). Existem diversas maneiras distintas descritas na literatura para mensurar este parâmetro analítico. Segundo Krueve *et al.* (2015b), diferentes

maneiras de determinação do LOD podem causar dificuldade de escolha da abordagem mais adequada. Evard *et al.* (2016) sugerem o uso da equação (1) para o cálculo do LOD:

$$LOD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (1)$$

Onde σ é o desvio-padrão residual da linha de regressão e S representa o coeficiente angular da curva de calibração obtida. A avaliação visual também pode ser usada para determinar o LOD. Isso é feito pela análise da substância de interesse em concentrações conhecidas pela avaliação visual do mínimo nível no qual o analito pode ser detectado com confiança (KRUBE *et al.*, 2015a).

O limite de quantificação (LOQ) é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis sob as condições experimentais adotadas (BRITO *et al.*, 2003). Assim como o limite de detecção, essa definição não é muito rigorosa, mas uma definição substituta, que seja amplamente aceita, ainda não está disponível (KRUBE *et al.*, 2015a). As abordagens para a determinação do LOD e LOQ são similares. Kruve *et al.*, (2015a) recomendam o uso da equação sugerida pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH) para a determinação do LOQ:

$$LOQ = 10 * \frac{\sigma}{S} \quad (2)$$

Onde σ é tomado como desvio-padrão dos resíduos da linha de calibração na faixa de baixa concentração e S é o coeficiente angular da curva de analítica obtida. A técnica da avaliação visual também se aplica à determinação do LOQ. Neste caso, LOQ é tido como a menor concentração testada no qual os parâmetros de precisão e exatidão são suficientemente adequados. De acordo com Ribani *et al.* (2004), tanto o LOD quanto o LOQ podem ser afetados por fatores como condições cromatográficas, largura dos picos e o tempo de uso da coluna.

2.3.4 PRECISÃO

A precisão é definida como o grau de concordância entre uma série de medições obtidas a partir de amostragem múltipla da mesma amostra homogênea nas condições prescritas e é expressa como desvio-padrão relativo ou coeficiente absoluto de variação (DPR) (GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Este parâmetro analítico está relacionado ao erro aleatório do sistema de medida e é um componente de medida da incerteza (KRUBE *et al.* 2015b).

A precisão pode ser avaliada de três maneiras: através da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (CASSIANO *et al.*, 2009; RIBANI *et al.*, 2004).

- a) Repetibilidade: É obtida pela análise repetida de subamostras independentemente preparadas a partir de uma amostra homogênea em laboratório, por um operador, usando um conjunto experimental e um conjunto de reagentes em um dia (KRUIVE *et al.*, 2015b)
- b) Precisão intermediária: Define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são realizadas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias, por diferentes analistas e diferentes equipamentos (Cassiano *et al.*, 2009). A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada (RIBANI *et al.*, 2004).
- c) Reprodutibilidade: Expressa a precisão entre os resultados de medições obtidos em diferentes laboratórios e é importante para avaliar se o método poderá ser utilizado em vários laboratórios (KRUIVE *et al.*, 2015b).

2.3.5 EXATIDÃO

A exatidão refere-se ao erro sistemático de um sistema de medição e, se rigorosamente definida, refere-se à concordância entre a média do número infinito de valores medidos replicados e o valor verdadeiro da quantidade medida (KRUIVE *et al.*, 2015b). Assim como a precisão, a exatidão também é um parâmetro que permite julgar a confiabilidade do método e deve ser investigada após a determinação da seletividade, linearidade e precisão do método analítico (CASSIANO *et al.*, 2009).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

2.3.5.1 Efeito Matriz (EM)

Em fontes de ionização à pressão atmosférica (API), especialmente em ESI, a eficiência de ionização dos analitos pode ser fortemente alterada pelos compostos coeluentes (compostos de matriz da amostra analisada ou compostos de eluição tardia de amostras anteriores). O efeito pode reduzir (supressão de ionização) ou aumentar (intensificação de ionização) o sinal do analito. Tanto os efeitos de supressão como de intensificação são

denominados efeito matriz (EM) (KRUIVE *et al.*, 2015a). O EM pode degradar seriamente a precisão dos resultados da análise por HPLC-ESI-MS, afetando fortemente a reprodutibilidade, linearidade e precisão do método, além de, eventualmente, levar a uma quantificação incorreta. A extensão do EM é amplamente variável e depende da natureza da amostra (KRUIVE *et al.*, 2009; TRUFELLI *et al.*, 2011). Os mecanismos fundamentais que levam a uma supressão ou aumento de sinal ainda estão sob investigação, embora muitos avanços tenham sido recentemente alcançados para uma compreensão mais profunda deste fenômeno (TRUFELLI *et al.*, 2011). Os compostos que produzem efeito matriz podem não ser visíveis, de modo que o método parece ser seletivo e ainda ser afetado pela supressão ou aumento do sinal (GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

Os efeitos de supressão/aumento de ionização teoricamente ocorrem tanto na fase líquida quanto na fase gasosa e a principal causa de alteração na eficiência de formação de gotículas carregadas é a presença de solutos não voláteis ou menos voláteis que o analito, o que, por sua vez, afeta a quantidade de íons carregados na fase gasosa que atingem o detector (ECKHAUT *et al.*, 2009). Diferentes espécies podem ser capazes de causar a supressão de íons, podendo ser espécies endógenas, já presentes como componentes da amostra, ou ainda presentes após o seu pré-tratamento ou extração, como espécies iônicas, moléculas orgânicas como hidratos de carbono, aminas, ureia, lipídios, peptídeos e, em geral, os compostos ou metabólitos caracterizados por uma estrutura química semelhante à do analito. Além disso, o processo de extração pode trazer para o extrato materiais interferentes como resíduos de polímeros e ftalatos libertados a partir de tubos de plástico ou de materiais usados na extração em fase sólida (GOSETTI *et al.*, 2010).

Com a difusão de métodos via espectrometria de massas, este fenômeno tem ganhado importância nos últimos anos, devido ao impacto que as substâncias coeluentes podem ter na eficiência de ionização, a ponto de tornar-se um parâmetro fundamental na validação do método. Porém, devido à imprevisibilidade do EM e, conseqüentemente, da variação nas respostas observadas em vários lotes da mesma amostra ou com o mesmo método, é impossível propor um protocolo unívoco que poderia totalmente contornar ou eliminar este efeito (GONZÁLEZ *et al.*, 2014; TRUFELLI *et al.*, 2011).

Existem dois métodos comuns para avaliar os efeitos da matriz: o método de adição pós-extração (a) e o método de infusão pós-coluna (b) (ECKHAUT *et al.*, 2009).

a) Na adição pós-extração, o sinal do analito numa solução-padrão é comparado com o de uma amostra fortificada pós-extração na mesma concentração (padrão

correspondente à matriz). Qualquer diferença na resposta indica supressão ou aumento de íons (TRUFELLI *et al.*, 2011). O efeito matriz observado por este método pode ser determinado pela Equação 3;

$$EM = \frac{Sinal\ analítico_{matriz\ fortificada\ pós-extração} - Sinal\ analítico_{solvente}}{Sinal\ analítico_{solvente}} * 100\% \quad (3)$$

b) O método de infusão pós-coluna fornece uma avaliação qualitativa dos efeitos da matriz, identificando as regiões cromatográficas mais propensas a experimentar efeitos de matriz. Uma bomba de infusão fornece uma quantidade constante do analito na corrente HPLC que entra na fonte de íons do espectrômetro de massas. O extrato de amostra em branco é injetado na coluna cromatográfica sob condições escolhidas para o ensaio. Qualquer composto endógeno eluído que provoca uma variação na resposta de ESI do analito infundido é visto como supressão ou aumento na resposta do analito (EECKHAUT *et al.*, 2009).

Assim como acontece com a recuperação, não há orientações a respeito de um valor admissível para o EM. Uma vez que o EM seja reprodutível não precisa necessariamente de ser eliminado, mas identificado e quantificado (GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

2.3.5.2 Recuperação (R) e Eficiência do Processo (EP)

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos e expressa a eficiência do passo de preparação da amostra: a proporção de um analito obtido a partir da amostra durante a preparação desta. Esta definição não leva em conta o efeito matriz. Em HPLC-MS, a recuperação é um parâmetro mais complexo do que no caso da maioria das outras técnicas analíticas. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO *et al.*, 2003; KRUBE *et al.*, 2015b). A recuperação (R) pode ser obtida pela equação:

$$R = \frac{Sinal\ analítico_{matriz\ fortificada\ pré-extração}}{Sinal\ analítico_{matriz\ fortificada\ pós-extração}} * 100\% \quad (4)$$

Na avaliação da recuperação geralmente deve-se utilizar concentrações em três níveis: baixo, médio e alto, de acordo com a curva de calibração obtida (CASSIANO *et al.*, 2009).

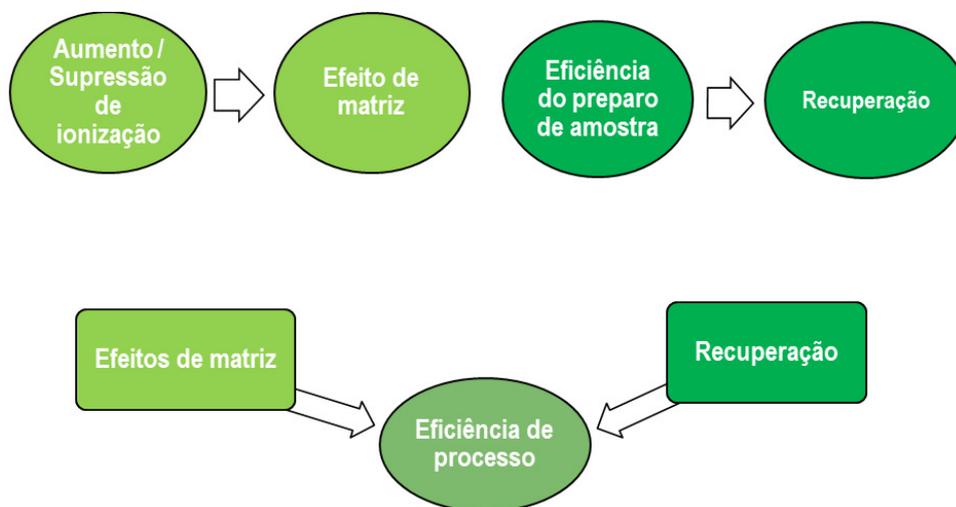
O termo “eficiência do processo” (EP) resume a eficiência da preparação da amostra (recuperação) e ionização do analito (efeito matriz). Portanto, a eficiência do processo é a

quantidade adequada para avaliar o desempenho geral de um método de análise (KRUIVE *et al.*, 2008). Baixa EP pode ser prejudicial para a precisão e sensibilidade do método (TRUFELLI *et al.*, 2011), enquanto valores próximos a 100% geralmente indicam que ambos EM e R estão próximos de 100%. A figura de mérito denominada neste trabalho como eficiência de processo seria, no contexto da maioria das outras técnicas analíticas, denominada recuperação (KRUIVE *et al.*, 2015b) e pode ser calculada segundo a equação (5):

$$EP = \frac{Sinal\ analítico_{matriz\ fortificada\ pré-extração}}{Sinal\ analítico_{padrão\ em\ solvente}} * 100\% \quad (5)$$

A relação entre esses três parâmetros de exatidão do método pode ser vista na Figura 4. Enquanto o efeito matriz considera somente a eficiência da ionização dos analitos e a recuperação somente os aspectos relacionados ao preparo de amostra, a eficiência de processo engloba essas duas variáveis e permite uma visão global acerca da eficiência do método.

Figura 4: Relação entre os parâmetros relacionados à exatidão do método: efeito de matriz, recuperação e eficiência do processo.



Fonte: Autoria própria.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação da ocorrência dos biocidas anti-incrustantes irgarol[®] 1051 e diuron em amostras de sedimentos provenientes do Porto do Itaqui e outras áreas costeiras de São Luís, MA.

3.2 Objetivos específicos

Validação de um método analítico para quantificação de irgarol[®] 1051 e diuron em sedimentos costeiros por HPLC-ESI-SQ-MS.

Estabelecimento de relação entre os portes e os fluxos de embarcações e as concentrações detectadas dos analitos.

\

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Descrição das áreas de amostragem e coletas de sedimentos

Para a realização das coletas de sedimentos foram escolhidos dez pontos de amostragem em áreas costeiras da Ilha de São Luís, MA (Tabela 3). Todos os eles estão em áreas de tráfego de embarcações dos mais variados portes e três situam-se dentro do Complexo Portuário de São Luís (Berço 100, Área de Despejo 1 e Igarapé Argentina).

Tabela 3: Identificação das áreas de amostragem de sedimentos em São Luís, MA.

Identificação	Amostra	Coordenadas	Tipo de atividade/tipo de embarcação
P01	Porto da Vovó	02°32.520'S 44°18.188'W	Vila de pescadores/pequeno porte
P02	Raposa	2°25'17.1"S 44°05'37.7"W	Atividade pesqueira/pequeno porte
P03	Terminal da Ponta da Espera (Terminal do Ferry Boat)	02°32.116'S 44°21.374'W	Tráfego de passageiros/grande porte
P04	Rampa Campos Melo	02°31.700'S 44°18.478'W	Tráfego de passageiros/pequeno e médio porte
P05	Estaleiro-Escola	2°32'29.95"S 44°18'42.40"W	Estaleiro e atividade pesqueira/pequeno porte
P06	Espigão Costeiro	2°30'9.01"S 44°19'13.71"W	Sem atividade/tráfego de embarcações quase inexistente
P07	Ponte José Sarney	02°31.095'S 44°18.166'W	Atividade pesqueira/pequeno porte
P08	Porto do Itaqui (Berço 100)	2°35'01.11"S 44°22'07.81"W	
P09	Porto do Itaqui (Área de Despejo 01)	2°35'41.94"S 44°25'19.33"W	Área portuária
P10	Porto do Itaqui (Igarapé Argentina)	2°34'53.53"S 44°21'44.34"W	

Fonte: Autoria própria. (As coordenadas foram obtidas por meio do software Google Earth).

O mapa dos pontos de amostragem de sedimentos está representado na Figura 3.

Figura 5: Mapa dos pontos de amostragem de sedimentos em São Luís, MA.



Fonte: Google Earth.

O Porto do Itaqui está localizado na Baía de São Marcos, em São Luís (MA), próximo ao limite da Região Nordeste e, atualmente, é administrado pela Empresa Maranhense de Administração Portuária (EMAP). O porto dispõe de 1.616 m de cais acostável com profundidade variando de 9 m e 21,5 m distribuídos em seis trechos distintos denominados berços 100, 101, 102, 103, 104 e 105 (ANTAQ). O Complexo Portuário de São Luís (CPSL) destaca-se entre grandes portos brasileiros, em termos de movimentação de cargas, devido aos dois atrativos importantes, que são: proximidade geográfica com os mercados americano e europeu e as condições favoráveis para atracação de navios de grande calado. O movimento marítimo no CPSL tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (FORTES *et al.*, 2009; TEIXEIRA e SOUZA FILHO, 2009). Considerando a costa maranhense, além do CPSL, outras atividades portuárias acontecem regularmente, com movimento de pequenas e médias embarcações que transportam materiais diversos e pessoas.

O Porto da Vovó (Figura 6 a) (02°32.520'S/44°18.188'W), localizado às margens do Rio Bacanga, em São Luís, é uma região de pouco movimento de embarcações. Há presença de moradores às margens da área de mangue, com criações de animais, e deposição de lixo, esgotos domésticos e dejetos humanos constantemente. O local serve como estaleiro para várias embarcações de pequeno porte pertencentes aos moradores, cuja pintura e raspagem dos cascos são realizadas no local. O tráfego de embarcações no local é quase exclusivo de pequenos pescadores. Essas características também são as predominantes na área de coleta no

Município de Raposa (Figura 6 b) ($2^{\circ}25'17.1''\text{S}/44^{\circ}05'37.7''\text{W}$), que não é utilizado para pinturas de embarcações, porém é observada a deposição de esgotos domésticos das áreas circunvizinhas. No Estaleiro-escola (Figura 6 c) ($2^{\circ}32'29.95''\text{S}/44^{\circ}18'42.40''\text{W}$) foi observado pintura, raspagem e conserto de pequenas embarcações, principalmente de pescadores, às margens do Rio Bacanga. A movimentação de embarcações é limitada e majoritariamente de pequeno porte.

Figura 6: Locais de coleta de sedimentos em São Luís: a) Porto da Vovó; b) Raposa; c) Estaleiro-escola.



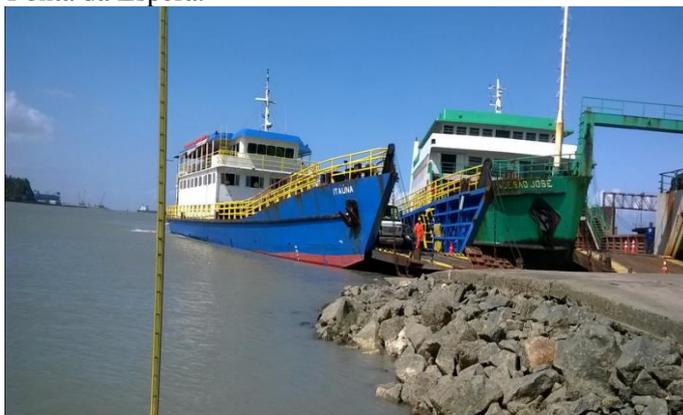
Fonte: Arquivo Pessoal.

O Espigão-costeiro ($2^{\circ}30'9.01''\text{S}/44^{\circ}19'13.71''\text{W}$), construído no ano de 2012, é localizado numa área de praia, na Baía de São Marcos, onde a hidrodinâmica é bastante intensa e o movimento de embarcações é quase inexistente. Por ser um ponto turístico de São Luís, o local é bastante movimentado por visitantes. Na área de coleta, nas proximidades da Ponte José Sarney ($02^{\circ}31.095'\text{S}/44^{\circ}18.166'\text{W}$), existe tráfego de pequenas embarcações e a região sofre influência direta dos dejetos vindos da comunidade vizinha à ponte.

Diferentemente das áreas anteriores, a Rampa Campos Melo (Terminal Hidroviário da Praia Grande) ($02^{\circ}31.700'\text{S}/44^{\circ}18.478'\text{W}$), localizada na Praia Grande possui constante movimento de embarcações de pequeno e médio porte, utilizadas majoritariamente para transporte de pessoas, assim como ocorre no Terminal da Ponta da Espera (Figura 7)

(02°32.116'S/44°21.374'W). Neste último, o movimento de embarcações de médio e grande porte é intensa, com viagens diárias entre os terminais de São Luís e de Cujupe, no município de Alcântara. Os ferryboats transportaram mais de 1,7 milhão de passageiros em 2014, além de ônibus, caminhões e veículos leves, sendo uma importante via de integração da ilha de São Luís com a baixada maranhense e com a região norte brasileira (dados fornecidos pela EMAP).

Figura 7: Terminal da Ponta da Espera.



Fonte: Arquivo pessoal.

Todas as amostras foram coletadas no mês de março de 2016, com a maré baixa, exceto as amostras do Porto do Itaqui, que foram obtidas em outubro de 2015. Os sedimentos foram retirados em duplicata, com distância média de 2 m entre os pontos, com a ajuda de uma espátula a uma profundidade de, no máximo, 3 cm para que a amostra fosse representativa de sedimentos recentes. No Porto do Itaqui as coletas foram realizadas superficialmente com draga Gibbs, em condição de maré baixa.

A armazenagem se deu em bandejas de alumínio previamente calcinadas a 450 °C por 4 horas para a remoção de contaminações de origem orgânica. As amostras foram levadas ao laboratório e acondicionadas sob temperatura de -18°C, sendo, em seguida, submetidas ao processo de liofilização, cujo programa de consistiu em vácuo de 0,065 µmHg, a -41°C durante 72 h num liofilizador LS 6000, TERRONI.

4.2 Análises granulométricas dos sedimentos

As análises de sedimentos foram realizadas no Laboratório de Estudos em Oceanografia Geológica (LEOG – UFMA). Cerca de 60 g de cada amostra liofilizada foram pesados e colocados em béqueres plásticos, sendo lavados diariamente com água corrente para a remoção dos sais presentes, os quais poderiam causar interferência nos resultados das

análises. A amostra era considerada “livre” de sais quando a adição de gotas de solução de nitrato de prata (AgNO_3) não levava à formação de cloreto de prata (AgCl), observado pela coloração esbranquiçada das gotas na amostra.

Após o processo de lavagem, as amostras foram secas em estufa e 50 g de cada uma foram pesados, sendo em seguida, novamente lavadas, desta vez sobre peneiras de 63 μm de diâmetro de malha, com exatamente 1 L de água destilada. Amostras com diâmetro maior do que 63 μm (retida na peneira depois da lavagem) foram levadas para a estufa até a secagem. Uma vez secas, foram peneiradas em uma série de peneiras Tyler, com aberturas de malha entre 2,0 mm e 63 μm . Cada peneiragem foi realizada com agitação manual por 5 minutos e as frações foram recolhidas e pesadas individualmente para a determinação da composição granulométrica total do sedimento.

4.3 Avaliação do teor de matéria orgânica em sedimentos

O teor de matéria orgânica das amostras de sedimento foi determinado conforme metodologia proposta por Walkley e Black (1934) e modificada por Frattini e Kalckmann (1967). Foi pesado 1 g de sedimento macerado de cada ponto de coleta em erlenmeyers de 250 mL, aos quais foram adicionados 10 mL de solução de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,1667 mol L^{-1} , seguido de 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (96%). Os frascos foram agitados suavemente por aproximadamente 1 minuto, para assegurar maior contato entre a solução e a amostra, e deixados em repouso por 30 minutos. Após isso, foram adicionados 200 mL de água, 10 mL de ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4) (85%) e 8 gotas do indicador difenilamina (1% em H_3PO_4) a cada amostra, que foram então tituladas com solução de sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 0,25 mol L^{-1} , recém preparada, até a viragem da cor azul escura para verde brilhante. Devido à sua instabilidade, a solução de $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ precisou antes ser titulada com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ para a correta determinação de sua concentração, utilizando-se o mesmo procedimento citado acima, porém sem adição de sedimento.

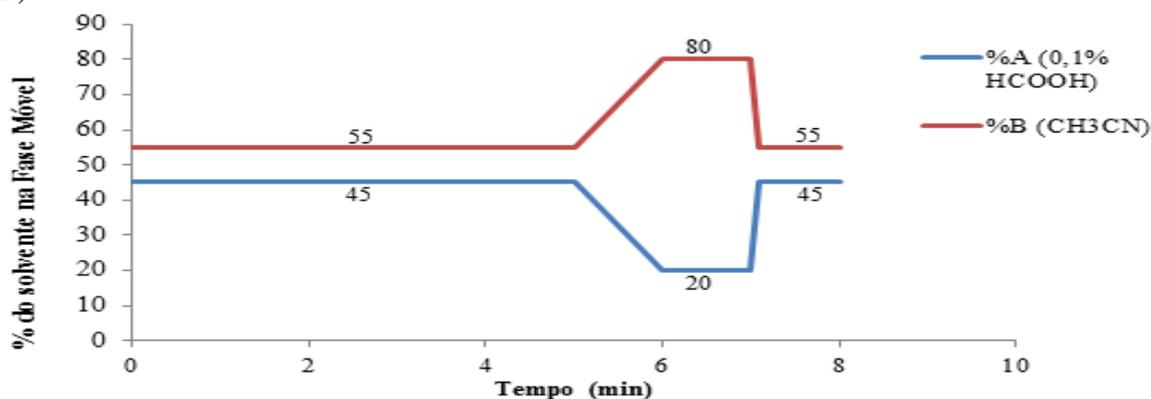
4.4 Condições instrumentais de análise por HPLC-ESI-SQ-MS

O processo de análise foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, com sistema de detecção por espectrometria de massas. O espectrômetro de massas utilizado para a validação desta metodologia foi um SQ Detector 2 (Waters®), que possui fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador de massas quadrupolar simples. A determinação dos

parâmetros de detecção foi realizada a partir da infusão direta de uma solução-padrão mista a 50 ng mL^{-1} na composição inicial da fase móvel utilizada na cromatografia (45% água ultrapura (0,1% HCOOH (Merck)) e 55% de acetonitrila (Merck)). O processo de infusão direta permitiu que fossem gerados sinais das substâncias em análise em tempo real com a modificação de algumas variáveis no método de aquisição dos dados. Com base nos sinais obtidos, com varreduras a cada modificação, foi possível determinar as condições ideais de detecção, cujos parâmetros principais observados foram: modo de ionização, voltagem do cone, voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma bomba HPLC binária 1525 μ (Waters®). A coluna usada possui 4,6x150 mm de dimensões, com fase estacionária C-18 (octadecilsilano) (WATERS XSELECT™ HSS T3), cujas partículas apresentam diâmetro de 5 μm . O processo de eluição se deu no modo gradiente e foram utilizadas água ultrapura (MilliQ) (resistividade 18,2 M Ω .cm), acidificada com 0,1% de ácido fórmico (HCOOH) (A) e acetonitrila (CH₃CN), grau cromatográfico (B), como fases móveis. O fluxo de solvente foi mantido constante a 1,0 mL min⁻¹ e a temperatura foi mantida em 40 °C. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 8 minutos (Figura 8).

Figura 8: Gradiente de eluição dos analitos no sistema HPLC. As fases móveis utilizadas foram: Solução aquosa a 0,1% de Ácido Fórmico (HCOOH) e Acetonitrila grau HPLC (B).



Fo

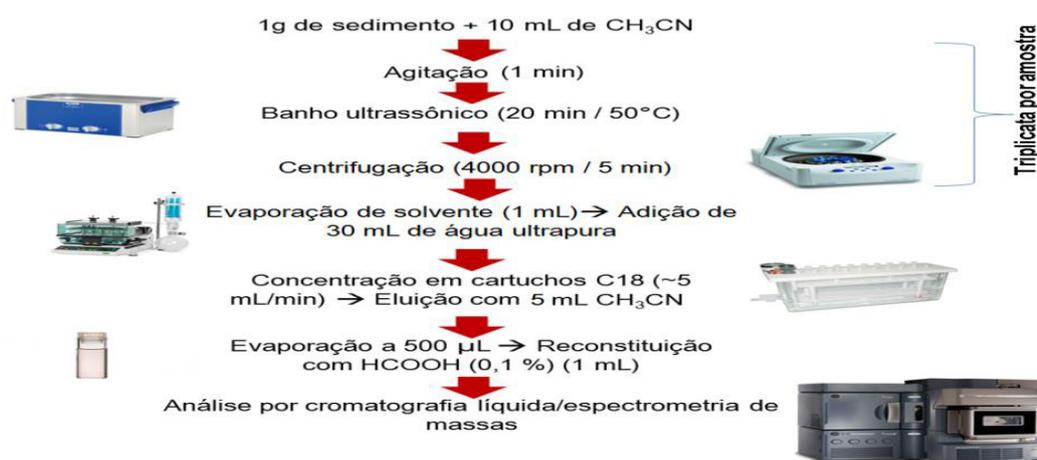
nte: Autoria própria.

4.5 Método de extração de irgarol® 1051 e diuron de sedimentos

O processo de extração dos analitos da matriz foi realizado tendo como base o método proposto por Abreu (2016), que utiliza a extração por ultrassom combinada com etapa de extração em fase sólida (SPE). O método consistiu na adição de 10 mL de acetonitrila a tubos de ensaio de vidro contendo 1 g de amostra de sedimento. Os tubos foram vigorosamente

agitados por cerca de 1 minuto, para tornar mais efetivo o contato entre o solvente extrator e a amostra, e levados ao banho ultrassônico (Unique USC-1400A) por 30 minutos, a 50 °C. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi recolhido. Esses passos foram realizados em triplicata para cada uma das amostras, visando ao aumento de eficiência de extração. Os 30 mL de cada amostra foram evaporados em sistema Syncore® Analyst (BÜCHI) a 1,0 mL. 30 mL de água ultra pura foram adicionados a cada extrato, que então foram concentrados em cartuchos SPE contendo C-18 (Strata C1-E, 55 µm, 70 A, 500 mg, 6 mL) como fase adsorvente. O condicionamento dos cartuchos antes da concentração foi realizado pela passagem de 5 mL de metanol (Merck), seguidos de 5 mL de água ultrapura a ~5 mL min⁻¹ pela fase adsorvente. O processo de eluição foi realizado utilizando-se 5 mL de acetonitrila (~5 mL/min). Os extratos foram secos até 500 µL e o volume foi completado a 1 mL com solução a 0,1 % de ácido fórmico (composição inicial da fase móvel utilizada no sistema cromatográfico). Foram extraídos dois extratos independentes para cada amostra, que foram injetados no sistema LC-MS em duplicata. O volume de injeção foi de 20 µL para cada extrato. A Figura 9 mostra um esquema simplificado do método de extração proposto.

Figura 9: Esquema resumido do processo de extração, adaptado de Abreu (2016), dos biocidas irgarol® 1051 e diuron de amostras de sedimentos costeiros.



Fonte: Autoria própria.

4.6 Validação analítica

Neste trabalho, os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (eficiência do processo, efeito matriz e recuperação). A amostra utilizada para os testes foi a do ponto P01.

4.6.1 SELETIVIDADE

A seletividade do método foi avaliada a partir da comparação entre os cromatogramas obtidos a partir da injeção (em triplicata) de três réplicas independentes do extrato da amostra P01 não fortificada com nenhum dos analitos e aqueles obtidos a partir da injeção de extratos fortificados com irgarol[®] 1051 e diuron nos níveis de concentração utilizados para a construção da curva analítica de adição-padrão. A ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos ($4,96 \pm 0,10$ minutos para irgarol[®] 1051 e $3,92 \pm 0,10$ minutos para diuron) foi parâmetro de aceitação ou não da seletividade.

4.6.2 LINEARIDADE DO MÉTODO E FAIXA DE TRABALHO

A linearidade foi avaliada com base na construção de duas curvas analíticas para cada analito: a primeira, a partir de soluções-padrão dos analitos em solvente puro (acetonitrila), para a determinação da linearidade e dos limites instrumentais; sendo a segunda preparada a partir de extratos provenientes da fortificação da matriz antes do processo de extração (curva analítica de adição-padrão).

Para a construção da curva analítica em solvente puro foram utilizadas nove concentrações diferentes, na faixa entre 0,1 e 100 ng mL⁻¹, com três réplicas independentes para cada concentração, injetadas em duplicata. A partir da determinação da faixa linear do equipamento, foi preparada uma curva analítica de adição-padrão pela fortificação pré-extração da amostra P01 em concentrações diferentes para cada analito (5, 10, 25, 50, 75 e 100 ng g⁻¹ para diuron e 0,25, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 e 100 ng g⁻¹ para irgarol[®] 1051), com duas réplicas independentes para cada concentração, além de uma amostra em branco (sem fortificação) para cada nível. Todas as extrações e injeções foram realizadas em duplicata. A linearidade foi avaliada por meio do modelo de regressão linear simples, baseado no método dos mínimos quadrados e teste F, além da avaliação via gráficos de resíduos da confirmação do modelo linear proposto.

4.6.3 LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção e de quantificação foram avaliados com base nos dados obtidos na curva analítica de adição-padrão, que considera todo o processo de preparo de amostra e ainda os efeitos de supressão ou aumento de eficiência de ionização (efeito matriz). LOD e LOQ foram determinados para ambos os analitos com base na avaliação visual. LOD foi a

menor concentração detectada suficientemente distinguível dos sinais obtidos por amostras em branco e o LOQ foi fixado como a menor concentração na qual os critérios de precisão ($DPR \leq 20\%$) e exatidão (EP reprodutível) foram atendidos.

4.6.4 PRECISÃO

A precisão foi expressa como uma estimativa do desvio-padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação, calculado pela fórmula:

$$DPR = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (6)$$

Onde s é o valor do desvio-padrão amostral e \bar{x} é a média do conjunto. A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi medida por meio do DPR, calculado para injeções em triplicata de três níveis de concentração da curva analítica em solvente puro (0,5, 25 e 50 ng g⁻¹ para irgarol® 1051 e 10, 50 e 100 ng g⁻¹ para diuron), num único dia, enquanto a precisão intermediária foi obtida por meio da injeção em triplicata das mesmas concentrações, em três dias não consecutivos, no mesmo equipamento.

4.6.5 EXATIDÃO

Neste trabalho, para a avaliação da exatidão, foram determinados a eficiência do processo (EP), o efeito matriz (EM) e a recuperação (R). A EP foi avaliada a partir das respostas instrumentais obtidas pela injeção de extratos da amostra P01 fortificados antes do processo de extração em três níveis de concentração, em triplicata, abrangidos pela curva analítica: 0,5, 25 e 50 ng g⁻¹ para irgarol® 1051 e 10, 50, e 100 ng g⁻¹ para diuron. A relação entre as concentrações para os extratos fortificados em cada nível (em triplicata) e as respostas para as amostras preparadas em solvente puro, multiplicada por 100, forneceu a EP (%), de acordo com a Equação (5).

O efeito matriz (cujo valor está embutido na EP) foi calculado por meio do ensaio de fortificação pós-extração. Os extratos “brancos” da matriz P01 foram fortificados após o processo de extração com concentrações conhecidas de irgarol® 1051 e diuron em três níveis (0,5, 25 e 50 ng g⁻¹ para irgarol® 1051 e 10, 50 e 100 ng g⁻¹ para diuron). Cada teste foi realizado a partir de injeções em duplicata de três réplicas independentes. A relação entre as

respostas obtidas pelas injeções dos extratos fortificados e das soluções-padrão em solvente, multiplicada por 100%, conforme a Equação (3), forneceu o valor de EM (%).

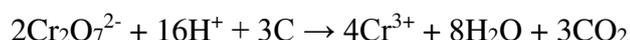
Após a determinação do EM e do EP, a recuperação (R) foi obtida por meio da relação entre a eficiência do processo e o efeito matriz, de acordo com a equação 7:

$$R (\%) = \frac{EP}{EM} * 100\% \quad (7)$$

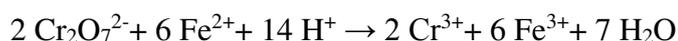
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do teor de matéria orgânica de sedimentos

O método Walkley-Black utiliza o carbono orgânico total como parâmetro para estimar o teor de matéria orgânica presente no solo. Baseia-se em uma titulação de oxirredução envolvendo um agente oxidante enérgico ($K_2Cr_2O_7$) em meio ácido, que atua sobre a matéria orgânica (agente redutor, sob análise). O catalisador da reação é o calor despreendido na diluição do ácido sulfúrico. O excesso de $K_2Cr_2O_7$ é titulado com $Fe(SO_4)_2(NH_4)_2 \cdot 6H_2O$ usando-se como indicador a difenilamina (1% em H_3PO_4) (GELMAN et al., 2011; DIAS e LIMA, 2004). A reação de oxidação do carbono presente na amostra (considera-se que este esteja na forma C^0) se dá conforme a equação a seguir:



A titulação da quantidade remanescente de $Cr_2O_7^{2-}$ presente na amostra segue a seguinte reação:



A partir da titulação em triplicata da solução a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato ferroso amoniacal antes da titulação das amostras, devido à sua alta instabilidade, foi determinado o fator (f) da solução, obtido pela equação.

$$f = \frac{\text{n}^\circ \text{ de mols de } K_2Cr_2O_7}{\text{n}^\circ \text{ de mols de } Fe(SO_4)_2(NH_4)_2 \cdot 6H_2O} = \frac{10 * 1}{V_1 * 0,5} \quad (8)$$

Onde V_1 representa o volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação. O valor obtido para o fator f foi 0,9259. Todas as amostras de sedimentos também foram tituladas em triplicata. Segundo SCHUMACHER (2002), a recuperação obtida pelo método varia em torno de 60 a 86%, devendo o teor de carbono orgânico obtido ser multiplicado pelo fator 1,33 para correção. Na composição do solo estão presentes de 48 a 58% de matéria orgânica, composta principalmente do elemento carbono (C). Alguns autores utilizam o valor 1,725 como fator multiplicativo do teor de C elementar encontrado, para que se obtenha o valor de matéria orgânica presente na amostra, padronizando o teor presente de matéria orgânica no solo em 58% (LEITE, 2001). Assim, para a determinação do teor de percentual de carbono orgânico (%C) nas amostras, foi utilizada a equação:

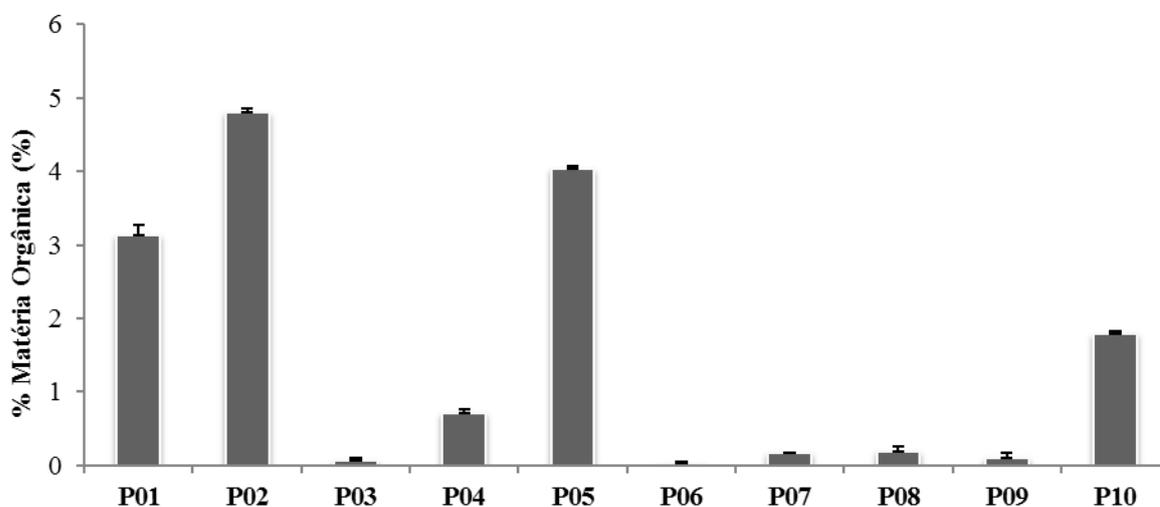
$$C = \frac{(10 - V_2 * f * 0,5) * 0,4}{p} \quad (9)$$

Onde V_2 é o volume de sulfato ferroso amoniacal gasto durante a titulação da amostra e p é a massa da amostra. Para a determinação do teor de matéria orgânica utilizou-se a equação:

$$\%MO = \%C * 1,725 \quad (10)$$

O teor de matéria orgânica encontrado para cada amostra está disposto na Figura 10.

Figura 10: Teor de Matéria Orgânica (%) (\pm desvio-padrão) nas amostras de sedimentos analisadas pelo método de Walkley-Black.



As amostras com os maiores teores de matéria orgânica foram P02 (4,79% \pm 0,0643%), P05 (4,05% \pm 0,0333%) e P01 (3,14% \pm 0,144%). As outras amostras analisadas forneceram valores abaixo de 2,0%. O ponto P06 apresentou o menor percentual (0,01% \pm 0,0313%).

A importância da estimativa do teor de matéria orgânica reside no fato de que este parâmetro pode afetar significativamente a disponibilidade de contaminantes orgânicos na matriz, pela maior facilidade de adsorção em solos com quantidades crescentes de MO.

5.2 Análises granulométricas de sedimentos

Os resultados das análises granulométricas estão dispostos na Tabela 4. Estes foram obtidos a partir do programa *SysGran* para Windows, com método gráfico de análise de Folk e Ward (CAMARGO, 2006), o qual utiliza a escala de Wentworth. Foi realizado o peneiramento à seco, adotando o conceito de ϕ (ϕ) correspondendo ao logaritmo negativo na base 2 do valor da granulometria expressa em milímetros:

$$\phi = -\log_2(d) \quad (8)$$

Tabela 4: Resultado das análises granulométricas de sedimentos coletados em São Luís, MA, de acordo com o software *SysGran* (Camargo, 2006).

Ponto	Classificação	% Silte+Argila
P01	Silte/argila	69,38
P02	Silte/argila	73,02
P03	Areia fina	5,272
P04	Areia muito fina	40,89
P05	Silte/argila	95,44
P06	Areia fina	0
P07	Areia fina	2,848
P08	Areia fina	7,670
P09	Areia muito fina	5,618
P10	Silte/argila	64,84

Fonte: Autoria própria.

Nas amostras P01, P02, P05 e P10 foram encontrados os maiores percentuais de finos (silte e argila). O domínio de partículas finas (silte e argila) está associado a uma maior área superficial do sedimento, permitindo um acúmulo de matéria orgânica e, conseqüentemente, favorecendo adsorção de compostos orgânicos hidrofóbicos e de metais (FROEHNER, 2008). De fato, as análises mostraram que as amostras com os maiores teores de MO são as mesmas com os maiores percentuais de finos.

5.3 Condições de análise via HPLC-ESI-SQ-MS

A infusão direta dos analitos no espectrômetro de massas forneceu os melhores resultados utilizando-se o modo de ionização positivo (ES^+) para ambas as moléculas, o que é consistente com outros estudos (ALI *et al.*, 2014; DOMINGUEZ *et al.*, 2014; Batista-Andrade, *et al.*, 2016). Este era um resultado esperado, uma vez que geralmente substâncias contendo grupamentos básicos, tais como aminas, amidas e ésteres, são analisadas no modo positivo dada a relativa facilidade com que são protonadas (CROTTI *et al.*, 2006). A razão massa/carga de irgarol[®] 1051 monitorada foi 254,1, correspondente à molécula protonada $[M+H]^+$. A m/z de diuron, correspondente à molécula protonada, foi 233,0.

A energia (V) aplicada ao cone, que direciona os íons para dentro do espectrômetro de massas, assim como também pode provocar sua fragmentação (CABRAL, 2010), forneceu os melhores resultados em 37 V para irgarol[®] 1051 e 41 V para diuron. Uma ampla faixa de

voltagens para o capilar metálico, que está intimamente ligada à ionização das espécies de interesse (CABRAL, 2010), foi testada, sendo o valor de 3,72 kV o que forneceu as melhores respostas observadas nos espectros de massa gerados. O gás nebulizador utilizado (N_2) foi mantido a $650 L h^{-1}$, à temperatura de $500 ^\circ C$. A Tabela 5 apresenta os parâmetros ajustados no espectrômetro de massas para detecção simultânea dos compostos em estudo:

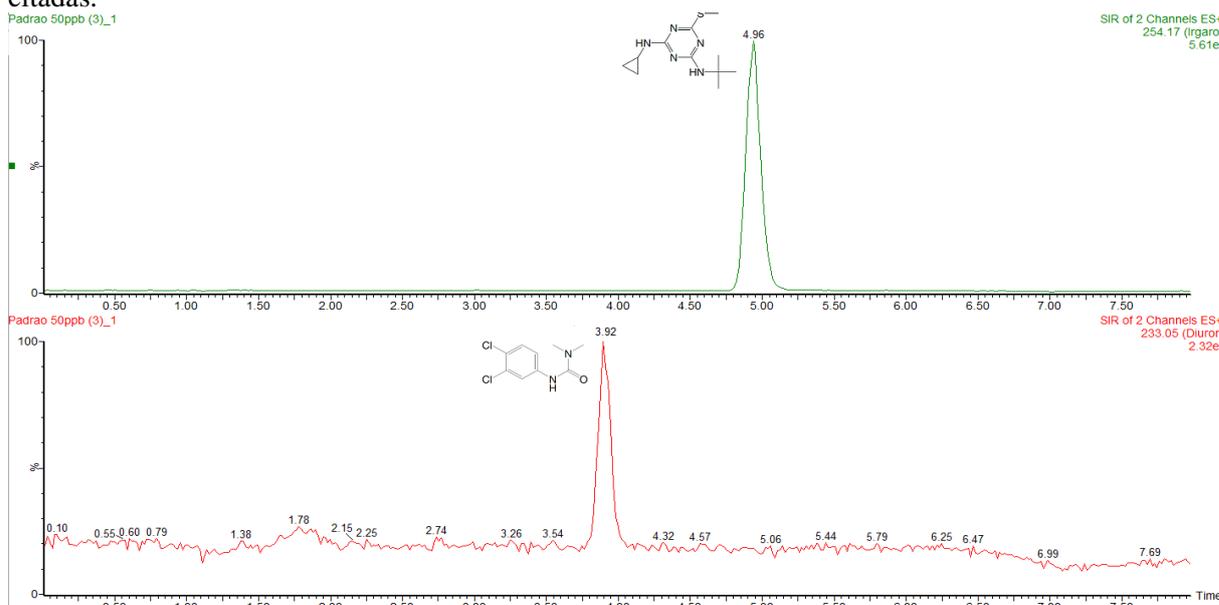
Tabela 5: Parâmetros otimizados para a detecção de irgarol[®] 1051 e diuron por espectrometria de massas.

Parâmetro Ajustado	Valor Ideal
Temperatura da fonte ($^\circ C$)	150
Voltagem do capilar (kV)	3,72
Temperatura de dessolvatação ($^\circ C$)	500
Voltagem do Cone	Irgarol [®] 1051: 37 V Diuron: 41 V

Fonte: Autoria própria.

O tempo de retenção de irgarol[®] 1051 foi 4,96 minutos, enquanto diuron levou 3,92 minutos para ser eluído da coluna cromatográfica. Os cromatogramas obtidos com injeções de soluções-padrão a $50 ng g^{-1}$ dos dois analitos estão representados na Figura 11.

Figura 11: Cromatogramas obtidos a partir de injeção de solução-padrão a $50 ng mL^{-1}$ de irgarol[®] 1051 e diuron, utilizando-se as condições de separação e detecção citadas.



Fonte: Autoria própria.

5.4 Validação analítica

5.4.1 SELETIVIDADE

Os cromatogramas correspondentes às adições de concentrações crescentes de irgarol[®] 1051 e diuron à matriz (amostra P01) comparados aos cromatogramas obtidos pela injeção de extratos não fortificados mostram que os picos avaliados nas quantificações são exclusivos desses compostos, havendo nível mínimo de interferentes no tempo de retenção dos analitos ($\pm 0,10$ minutos) (Figura 12). A quantificação das áreas dos picos obtidos foi realizada pelo software MassLynx[®] V 4.1 (Waters[®]).

Figura 12: Cromatogramas obtidos pela injeção de extratos em branco e fortificados com irgarol 1051 da matriz P01. Não há picos interferentes no tempo de retenção do analito.

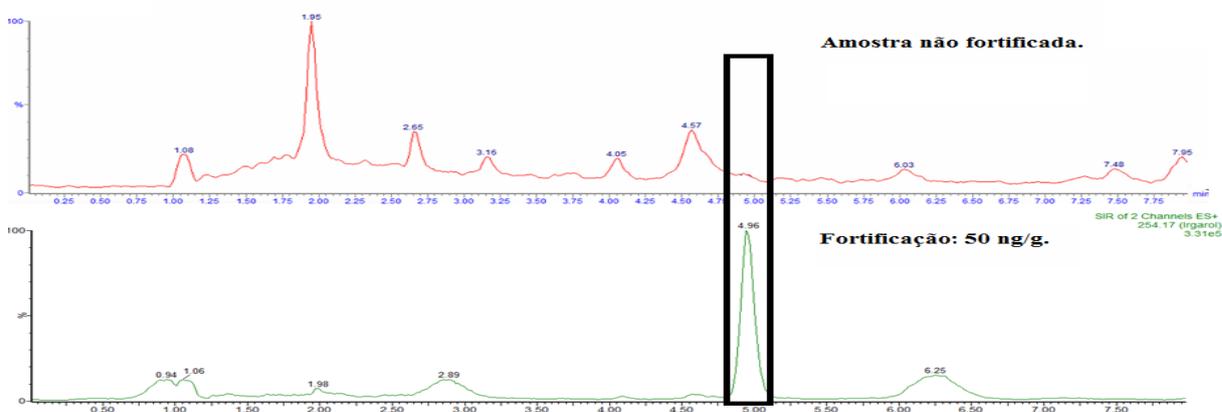
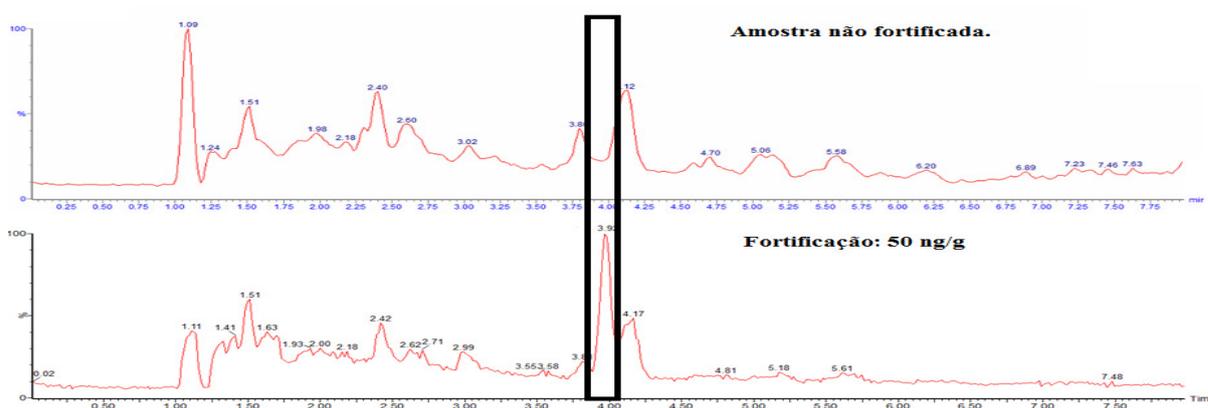


Figura 13: Cromatogramas obtidos pela injeção de extratos em branco e fortificados com diuron da matriz P01. Não há picos interferentes no tempo de retenção do analito.



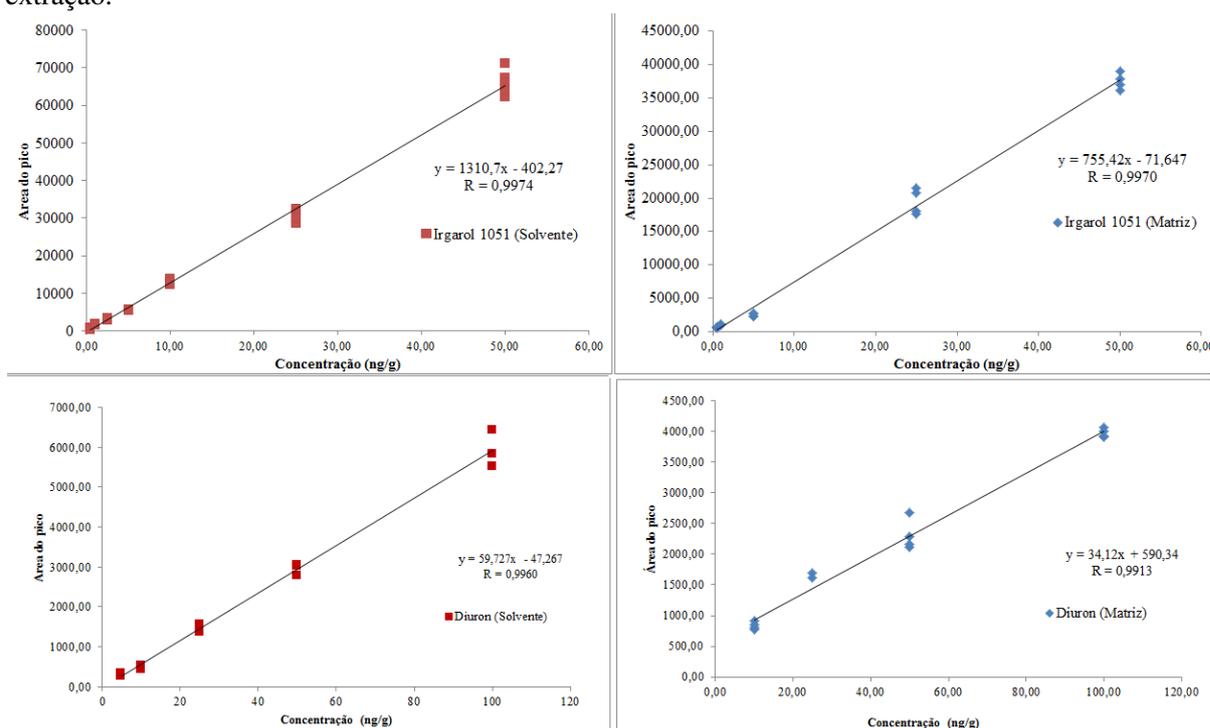
Fonte: Autoria própria.

5.4.2 LINEARIDADE

Os coeficientes de correlação calculados a partir das curvas analíticas de irgarol[®] 1051 ($R^2 = 0,9948$, em solvente puro, e $R^2 = 0,9940$, em matriz) e diuron ($R^2 = 0,9920$, em solvente

puro, e $R^2 = 0,9827$, em matriz) são indícios de comportamento linear entre as concentrações dos biocidas e os sinais analíticos obtidos. As curvas analíticas obtidas pela injeção de amostras em solvente puro e as curvas de adição-padrão para cada analito estão representadas na Figura 14.

Figura 14: Curvas analíticas construídas para: a) Irgarol® 1051 em solvente puro (ACN) e b) por meio de adição de padrão antes da extração; c) Diuron em solvente puro (ACN) e d) por meio de adição de padrão antes da extração.



Fonte: Autoria própria.

Para confirmar o modelo linear proposto na faixa considerada, foi realizada a análise de regressão por meio do software Microsoft Excel® para cada um dos dois conjuntos de dados (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6: Tabela ANOVA gerada a partir da análise dos dados de regressão da curva analítica em matriz de irgarol® 1051. gl = graus de liberdade (n-1); SQ = soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados; $F = MQ(\text{regressão})/MQ(\text{resíduos})$; F tabelado = valor de F com 1 grau de liberdade no numerador e 18 graus de liberdade no denominador.

Irgarol	gl	SQ	MQ	F	F (Tabelado)	F de significação
Regressão	1	$4,16 \cdot 10^9$	$4,16 \cdot 10^9$	3033,31	4,41	$1,61 \cdot 10^{-21}$
Resíduo	18	$2,47 \cdot 10^7$	$1,37 \cdot 10^6$	-	-	-
Total	19	$4,18 \cdot 10^9$	-	-	-	-

Fonte: Microsoft Excel®.

Tabela 7: Tabela ANOVA gerada a partir da análise dos dados de regressão da curva analítica em matriz de diuron. gl = graus de liberdade (n-1); SQ = soma dos quadrados; MQ = média dos quadrados; F = MQ (regressão)/MQ (resíduos); F tabelado = valor de F com 1 grau de liberdade no numerador e 18 graus de liberdade no denominador.

Diuron	gl	SQ	MQ	F	F (tabelado)	F de significação
Regressão	1	1,81.10 ⁷	1,81.10 ⁷	6,07.10 ²	4,11.10 ⁻³	5,67.10 ⁻¹¹
Resíduo	11	3,29.10 ⁵	2,99.10 ⁴	-	-	-
Total	12	1,85.10 ⁷		-	-	-

Fonte: Microsoft Excel[®].

Os valores de F , nas tabelas geradas por meio da análise de variância (ANOVA) foram, em ambos os casos, maiores do que o valor de F tabelado, o que é indicativo da aceitação da correlação entre as variáveis X e Y . Os baixos valores de F de significação ($F < 0,05$) também atestam a validade da regressão linear obtida, ou seja, há uma ínfima probabilidade de que a correlação entre as variáveis tenha se dado ao acaso. A inspeção do gráfico de resíduos plotado pelo programa também mostrou distribuição aleatória dos resíduos em relação à concentração. A faixa linear de irgarol[®] 1051 variou entre 0,5 e 50 ng g⁻¹, tanto em solvente quanto na matriz utilizada. Diuron mostrou linearidade entre 10 e 100 ng g⁻¹ na curva de adição-padrão e entre 5,0 e 100 ng g⁻¹ em solvente puro (Tabela 8).

Tabela 8: Equações das retas calculadas para irgarol[®] 1051 e diuron em solvente puro e em matriz.

Analito	Equação da reta em solvente	Equação da reta na matriz
Irgarol [®] 1051	$y = 1310,7x - 402,27$	$y = 755,42x - 71,65$
Diuron	$y = 59,727x - 47,27$	$y = 34,12x + 590,34$

Fonte: Autoria própria.

5.4.2 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Irgarol[®] 1051 teve limite de detecção de 0,25 ng g⁻¹ e limite de quantificação fixado em 0,50 ng g⁻¹, que foi o menor valor trabalhado na curva analítica de adição-padrão no qual se observou desvio-padrão relativo menor que 20%. Diuron apresentou limite de detecção de 5,0 ng g⁻¹ e limite de quantificação de 10 ng g⁻¹.

Tabela 9: Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para irgarol® 1051 e diuron, baseados nos estudos realizados a partir da curva analítica de adição-padrão.

Analito	LOD (ng g⁻¹)	LOQ (ng g⁻¹)
Irgarol® 1051	0,20	0,50
Diuron	5,0	10

Fonte: Autoria própria.

Nas análises destes analitos no mesmo tipo de amostra, autores determinaram valores de LOD e LOQ bastante variados. Saleh *et al.* (2016) relatam LOD de 2,04 e LOQ de 6,80 ng g⁻¹ para irgarol® 1051, enquanto Santana-Rodriguez *et al.* (2011) encontraram, para o mesmo analito, LOD e LOQ de 0,1 e 0,4 ng g⁻¹, respectivamente. Diuron costuma ter LOD e LOQ mais elevados do que irgarol® 1051, como relatado por Santana-Rodríguez *et al.* (2011), que determinaram valores em 0,2 e 0,7 ng g⁻¹, respectivamente para esse analito. No Brasil, estudos realizados por Abreu (2016) em sedimentos, utilizando o método de extração base para este trabalho, forneceram LOD de 0,1 e LOQ de 1,0 ng g⁻¹ para ambos os analitos.

5.4.3 PRECISÃO

A precisão das medidas foi avaliada nos níveis de repetibilidade e de precisão intermediária. Em ambos os casos, os valores de DPR (%) estavam abaixo de 20% no LOQ e abaixo de 15% nas demais concentrações para as duas substâncias analisadas, conforme recomendação da maioria dos guias de validação (Kruve *et al.*, 2015b). A Tabela 10 mostra o comportamento dos desvios-padrão relativos nas amostras de diuron e irgarol® 1051.

Tabela 10: Testes de precisão para irgarol® 1051 e diuron a níveis de repetibilidade, realizados num mesmo dia, sob as mesmas condições; e precisão intermediária, calculada com base em injeções realizadas em três dias distintos, no mesmo equipamento. DPR (%) = Desvio-padrão relativo (N=3).

Irgarol® 1051			Diuron		
Repetibilidade		Precisão Intermediária	Repetibilidade		Precisão Intermediária
Concentração (ng g⁻¹)	DPR (%)	DPR (%)	Concentração (ng g⁻¹)	DPR (%)	DPR (%)
0,50	16,71	13,20	10	1,584	6,792
25	6,652	10,09	50	4,935	5,664
50	2,575	10,23	100	11,16	7,329

Fonte: Autoria própria.

A baixa dispersão entre os valores dos sinais analíticos obtidos em dias distintos, representados pelo DRP (%), demonstra a estabilidade do equipamento e do método como um todo, conferindo confiabilidade aos resultados.

5.4.4 EXATIDÃO

As curvas de calibração em solvente puro e de adição-padrão construídas para cada analito foram empregadas para a determinação da exatidão associada ao método: eficiência de processo (EP), efeito matriz (EM) e recuperação (R). O primeiro parâmetro determinado foi a eficiência do processo, calculada de acordo com a Equação (5) nas concentrações de 0,5, 25 e 50 ng g⁻¹ para irgarol® 1051 e 10, 50 e 100 ng g⁻¹ para diuron. Os resultados estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11: Eficiência do processo (EP) % \pm desvio-padrão (N=3) calculada em três níveis de concentração para irgarol® 1051 e diuron. Os valores mostram a precisão e a repetibilidade do processo para irgarol® 1051, mas não para diuron.

Irgarol® 1051		Diuron	
Concentração (ng g⁻¹)	Eficiência do Processo (%)	Concentração (ng g⁻¹)	Eficiência do Processo (%)
0,50	60,41 \pm 7,794	10	172,14 \pm 4,20
25	63,74 \pm 6,372	50	79,72 \pm 11,22
50	56,64 \pm 1,854	100	68,61 \pm 4,17

Fonte: Autoria própria.

A eficiência do processo foi em torno de 60% para irgarol® 1051 e variou em mais de 100% dentro da faixa de concentração estudada para diuron. Guias de validação recomendam que os valores de EP (citada como recuperação) estejam na faixa entre 70% e 120%, porém, apesar de os valores encontrados neste trabalho, para irgarol® 1051, não estarem nesta faixa, outras figuras de mérito, tais como limite de detecção ou limite de quantificação não foram comprometidas. Além disso, a EP se mostrou reprodutível, consistente e precisa para este biocida, o que a torna adequada para os fins propostos neste trabalho. Diuron apresentou eficiência de processo de comportamento decrescente ao longo da faixa de concentrações estudada: no LOQ a EP calculada apresentou valor de 170%, diminuindo para cerca de 68% em 100 ng g⁻¹. A hipótese mais provável para este comportamento é que nesta região haja um forte efeito de incremento de sinal (EM elevado) causado por coeluentes, sendo esse efeito mais pronunciado em baixas concentrações, tornando-se menos relevante na medida em que a

concentração do biocida aumenta. Devido aos problemas de não reprodutibilidade da EP (mais de 100% de variação), especialmente nas concentrações mais baixas, optou-se por não continuar os testes com diuron, mantendo apenas irgarol[®] nesta metodologia.

A EP, embora muitas vezes reportada como “recuperação”, demonstra a eficiência global do método, o que inclui a recuperação dos analitos e os efeitos de matriz de forma combinada. Krueve *et al.* (2015b) relatam que ainda há divergências na literatura a respeito do cálculo desses parâmetros, uma vez que diferentes guias de validação analítica se referem à eficiência do processo do ponto de vista da preparação da amostra (recuperação).

O efeito matriz para irgarol[®] 1051 foi calculado pela Equação (3), nos mesmos níveis de concentração utilizados para os cálculos da EP, cujos resultados estão compilados na Tabela 12.

Tabela 12: Efeito matriz (EM) % \pm desvio-padrão (N=3) calculada em três níveis de concentração para irgarol[®] 1051.

Irgarol[®] 1051	
Concentração (ng g⁻¹)	Efeito matriz (EM) (%)
0,50	-17,24 \pm 1,832
25	-21,08 \pm 10,05
50	-5,296 \pm 2,820

Fonte: Autoria própria.

Os valores calculados indicaram supressão de ionização em toda faixa de concentração estudada. Não se observou tendência de aumento ou diminuição de eficiência de ionização com a variação da concentração e os valores encontrados para o EM (%) tiveram máximo de 21%. Os coeficientes de variação estiveram abaixo de 15%, nível máximo recomendado por Cassiano *et al.* (2009).

A variação do EM é relatada na literatura por Pizzuti *et al.* (2009), que recomendam o uso da supressão/realce de ionização a partir de dados de validação apenas como uma ferramenta indicativa do efeito matriz, uma vez que a variação intra-dia costuma ser elevada. Este efeito poderia ser entendido, se não fossem realizados os testes para a avaliação do EM, como precisão baixa ou deficiente (CASSIANO *et al.*, 2009). Segundo González *et al.* (2014), devido à expansão do uso de LC-MS, os guias de validação passaram a considerar o EM como parte essencial da validação analítica, porém não há um protocolo único para sua avaliação.

A recuperação, calculada pela razão entre a eficiência do processo e o efeito de matriz forneceu valores entre 60 e 80 % para irgarol® 1051. Este parâmetro não foi calculado para diuron devido a baixa reprodutibilidade da EP.

Tabela 13: Recuperação (R) % \pm desvio-padrão (N = 3) calculada em três níveis de concentração para irgarol® 1051.

Irgarol® 1051	
Concentração (ng g⁻¹)	Recuperação (R) (%)
0,50	84,10 \pm 0,211
25	79,43 \pm 0,756
50	60,01 \pm 2,81

Fonte: Autoria própria.

Os baixos desvios-padrão da recuperação mostram a boa reprodutibilidade do método de extração. A menor recuperação obtida com a concentração de 50 ng g⁻¹ se deve ao fato de os efeitos de matriz calculados nesta concentração serem mais baixos quando comparados aos efeitos nas demais concentrações, não comprometendo o método de extração.

Segundo Cassiano *et al.* (2009), embora altos valores de recuperação sejam desejáveis para maximizar a sensibilidade do método, não é necessário que este valor seja de 100% e, sim, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva, o que foi demonstrado nos testes realizados aqui.

5.5 Biocidas de terceira geração em amostras de sedimentos

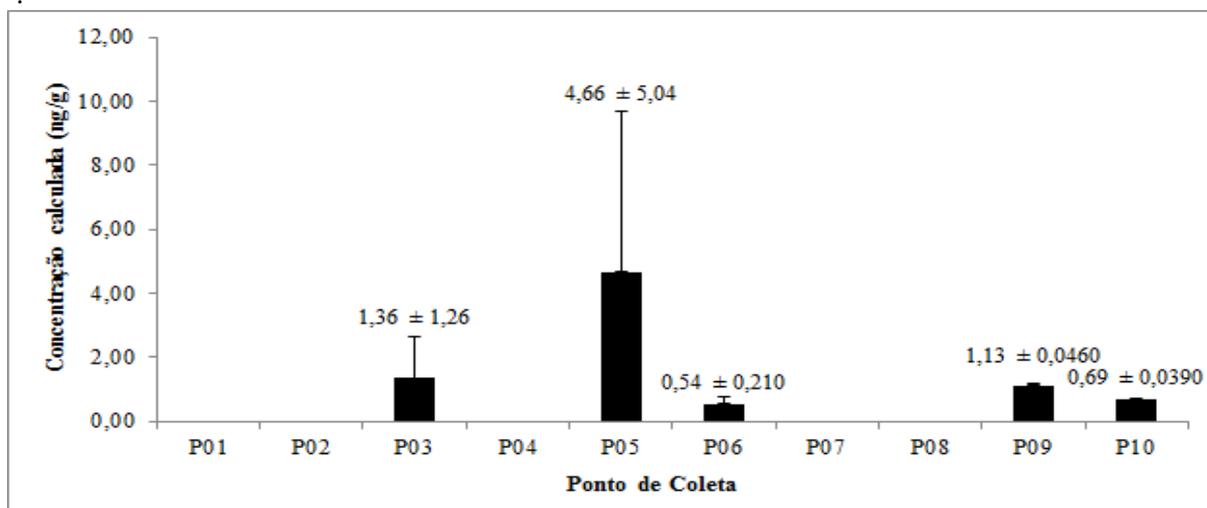
As concentrações obtidas a partir da injeção dos extratos no sistema LC-MS foram calculadas a partir da curva de adição-padrão, uma vez que considera todos os fatores interferentes na quantificação dos analitos, como recuperação e efeitos de matriz. O biocida diuron não pôde ser quantificado em nenhuma das amostras coletadas, uma vez que o procedimento não apresentou eficiência de processo adequada para este analito na faixa de concentração considerada.

Irgarol® 1051 foi detectado em amostras de todos os pontos de coletas pesquisados, porém em apenas 50% delas as concentrações estiveram acima do limite de quantificação (0,50 ng g⁻¹). Os níveis do biocida variaram entre 0,540 \pm 0,210 e 4,66 \pm 5,04 ng g⁻¹, que são concentrações ambientalmente relevantes, pois já são suficientes para afetar a taxa de crescimento de microalgas como *Tetraselmis sp.*, *Thalassiosira weissflogii* e *Emiliania*

huxleyi (BURMA *et al.*, 2009), além causar mortalidade de *Lates calcarifer* (ALI *et al.*, 2015).

As maiores concentrações foram quantificadas na amostra P05 (Estaleiro-escola) ($4,66 \pm 5,04 \text{ ng g}^{-1}$) (Figura 15), coletada no local onde são realizadas manutenções, pintura e raspagem de cascos de pequenas e médias embarcações, o que pode ser fator decisivo para a ocorrência desse tipo de biocida, por estar presente majoritariamente em tintas anti-incrustantes. Além disso, as amostras retiradas deste ponto apresentaram altos teores de matéria orgânica e sua composição textural se mostrou basicamente formada por partículas de silte e argila, o que pode ser um facilitador da adsorção das moléculas do analito à matriz. Amostras obtidas no Terminal da Ponta da Espera (P03) também apresentaram concentrações acima do limite de quantificação ($1,36 \pm 1,26 \text{ ng g}^{-1}$). A intensa movimentação diária de grandes e médias embarcações de transporte de passageiros no local (mais de 1,7 milhão em 2014, segundo dados da EMAP) são fontes potenciais de contaminação por tintas anti-incrustantes e corroboram a detecção desse biocida na área. Segundo Konstantinou e Albanis (2004), locais com maior densidade e residência de embarcações ao longo do ano, bem como taxas de troca de água inferiores, geralmente apresentam maior concentração de irgarol® 1051 e outros biocidas, apesar da amostra coletada neste ponto possuir baixo teor de matéria orgânica na sua composição, o que é torna menos provável a adsorção de substâncias orgânicas, tais como irgarol® 1051.

Figura 15: Quantificação de irgarol® 1051(ng g^{-1}) (\pm desvio-padrão; N=4) em amostras de sedimentos coletadas nos dez pontos amostrais no entorno de São Luís, MA. LOD = $0,50 \text{ ng g}^{-1}$.



Fonte: Autoria própria.

Irgarol[®] 1051 foi ainda quantificado em dois dos três pontos de coleta na área do Porto do Itaqui (P09 e P10, em concentrações de 1,13 (\pm 0,0459) e 0,69 (\pm 0,039) ng g⁻¹, respectivamente), ficando abaixo do limite de quantificação no ponto P08. Por ser uma área de intensa movimentação de embarcações de grande porte vindas dos mais diversos países, o Porto do Itaqui é um foco potencial de contaminantes relacionados às tintas anti-incrustantes.

Este trabalho relata o primeiro estudo sobre a ocorrência de agentes anti-incrustantes de terceira geração em sedimentos provenientes do Porto do Itaqui, porém Diniz *et al.* (2014) já reportaram níveis de irgarol[®] 1051 na faixa entre 0,01 a 4,80 ng mL⁻¹ em água marinha coletada neste porto.

Níveis quantificáveis de irgarol[®] 1051 (0,54 \pm 0,210 ng g⁻¹) também foram encontradas no Espigão costeiro (P06), apesar de esta ser uma área que possui movimento de embarcações quase nulo, além de os sedimentos coletados nesta região serem os mais pobres em matéria orgânica e teor de finos e a hidrodinâmica da região ser mais intensa do que em outras áreas estudadas. Nos demais pontos as concentrações obtidas se mostraram abaixo do limite de quantificação do método, porém todas acima do limite de detecção (0,25 ng g⁻¹).

Irgarol[®] 1051 tem sido um dos principais biocidas detectados em água e sedimentos ao redor do mundo, com ocorrência atribuída ao uso como agente anti-incrustante. As concentrações máximas detectadas neste trabalho, apesar de serem suficientes para causar efeitos ambientais, são mais baixas do que as concentrações frequentemente encontradas em outros portos e marinas. Voulvoulis *et al.* (2000) quantificaram esse biocida em amostras de sedimentos do Reino Unido em até 222,30 ng g⁻¹. Anos mais tarde, concentrações de até 49,3 ng g⁻¹ foram reportadas por Gatidou *et al.* (2007b) na mesma região. Mais recentemente Saleh *et al.* (2016) relataram concentrações de até 35,4 ng g⁻¹ em sedimentos provenientes da região do Golfo Pérsico. Altas concentrações do biocida também estiveram presentes em sedimentos coletados na Ásia, como mostrado no estudo realizado por Balakrishnan *et al.* (2012), que detectaram concentrações de até 68 ng g⁻¹ no Japão.

No Brasil a quantidade de estudos que abordam a presença desses biocidas em amostras de sedimentos é bastante limitada quando comparada ao número de estudos que utilizam água marinha como matriz. Dentre os trabalhos realizados a fim de avaliar a ocorrência de biocidas anti-incrustantes de terceira geração em sedimento, Abreu (2016) relata concentrações de irgarol[®] 1051 de até 17,7 ng g⁻¹ no Estuário da Lagoa dos Patos (RS) e, no mesmo estudo, concentrações elevadas de diuron também são detectados nesse estuário.

A Tabela 14 traz uma compilação de relatos de detecção de irgarol[®] 1051 em diversos estudos pelo mundo.

Tabela 14: Concentrações de irgarol[®] 1051 encontrados em amostras de sedimentos costeiros estudos realizados em diversos países.

Local	Faixa de concentrações (ng g⁻¹)	Fonte
Reino Unido	<1,0 – 110	Thomas <i>et al.</i> (2000)
Grécia	<0,50 – 43	Albanis <i>et al.</i> (2003)
Espanha	<0,10 - 23,9	Santana-Rodriguez <i>et al.</i> (2011)
Estados Unidos	<0,8 – 8,9	Sapozhnikova <i>et al.</i> (2013)
Reino Unido	< 1,7 – 49,3	Gatidou <i>et al.</i> (2007b)
Reino Unido	< 3,1 – 222,30	Voulvoulis <i>et al.</i> (2000)
Japão	< 0,176- 68	Balakrishnan <i>et al.</i> (2011)
Golfo Pérsico	< 2,04 – 35,40	Saleh <i>et al.</i> (2016)
Brasil (RS)	<1,0 - 17,7	Abreu (2016)
Brasil (MA)	< 0,50 – 4,66	Este trabalho

Fonte: Autoria própria.

Todos esses estudos, em conjunto, demonstram que os biocidas anti-incrustantes de terceira geração, especialmente irgarol[®] 1051 e diuron, se mostram presentes em praticamente todo o mundo, sendo considerados grandes fontes de contaminação química proposital do meio aquático.

6 CONCLUSÃO

Com base no estudo realizado, pode-se inferir que irgarol[®] 1051 foi quantificado em 50% dos pontos de amostragem de sedimentos em São Luís. O método analítico desenvolvido se mostrou eficiente para análise em nível de traços do biocida irgarol[®] 1051 em amostras de sedimentos, porém parâmetros metodológicos devem ser ajustados para permitir a análise conjunta de diuron, que apresentou eficiência de processo inadequada em toda a faixa de concentrações estudada.

A validação analítica forneceu níveis suficientemente baixos para o limite de detecção (0,20 ng g⁻¹) e de quantificação (0,5 ng g⁻¹) de irgarol[®] 1051, com valores mais baixos do que o recomendado para precisão (repetibilidade e precisão intermediária). A eficiência do processo em torno de 60% e com excelente repetibilidade garante a sua adequação para a substância em análise. O efeito matriz calculado mostrou tendência de supressão de ionização, apresentando um máximo de 21% de supressão de ionização para o analito.

As análises dos extratos de sedimentos revelaram níveis acima do LOQ em cinco das dez amostras estudadas: Estaleiro-escola (4,66 ± 5,04 ng g⁻¹) > Terminal da Ponta da Espera (1,36 ± 1,26 ng g⁻¹) > Porto do Itaqui (Área de despejo 1) (1,13 ± 0,0459 ng g⁻¹) > Porto do Itaqui (Igarapé Argentina) (0,69 ± 0,0389 ng g⁻¹) > Espigão Costeiro (0,54 ± 0,210 ng g⁻¹), ou seja, estaleiros e áreas de intenso fluxo de embarcações, como o Porto do Itaqui, apresentaram as maiores concentrações do biocida.

Os resultados relatados neste trabalho são as primeiras informações acerca da presença de biocidas anti-incrustantes de terceira geração em amostras de sedimentos provenientes da Ilha de São Luís e mostram que irgarol[®] 1051 provavelmente está sendo utilizado como biocida de reforço em tintas anti-incrustante nas embarcações que trafegam por São Luís, MA, especialmente em áreas de intensa movimentação, como o Porto do Itaqui.

REFERÊNCIAS

ABREU, F. L. **Biocidas Anti-Incrustantes De Terceira Geração Em Sedimentos Superficiais Da Costa Brasileira**. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

AKCHA, F.; SPAGNOL, C.; ROUXEL. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. **Aquatic Toxicology**, v.106-107, p.104-113, 2012.

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

ALI, H.R. *et al.* Toxicological studies of Irgarol-1051 and its effects on fatty acid composition of Asian sea-bass, *Lates calcarifer*. **Regional Studies in Marine Science**, V.2, p.171-176, 2015.

ALBANIS, T. A.; SAKKAS, V. A.; LAMBROPOULOU, D. A. Determination Of Antifouling Compounds In Marine Sediments By Solid-Phase Microextraction Coupled To Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, n.1010, p. 1-8, 2003.

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

ANTAQ (Agência Nacional de Transportes Aquaviários). **Porto de Itaqui**. Disponível em: <<http://www.antaq.gov.br/Portal/pdf/Portos/Itaqui.pdf>> Acessado em: 11 de Novembro de 2016.

BALAKRISHNAN, S.; TAKEDA, K.; SAKUGAWA, H. Occurrence of Diuron and Irgarol in seawater, sediments and planktons of Seto Inland Sea, Japan. **Geochemical Journal**, v.46, p.168-177, 2012.

BARRANGER, A. *et al.* Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. **Aquatic Toxicology**, v.6, p.93-104, 2014.

BATISTA-ANDRADE, J.A. *et al.* Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones. **Marine Pollution Bulletin**, v.112, p.415-419, 2016.

BERTO, D. *et al.* Organotins (TBT and DBT) in water, sediments, and gastropods of the southern Venice lagoon (Italy). **Marine Pollution Bulletin**, v.55, p.425-435, 2007.

BRASIL. Portaria nº 2.914/, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html Acessado em: 10 de novembro de 2016.

BRITO, N.M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BURMA, A.G.J. Impact of the antifouling agent Irgarol[®] 1051 on marine phytoplankton species. **Journal of Sea Research**, v.61, p.133–139, 2009.

CABRAL, E. C. **Utilização Da Técnica De Fingerprint Por Espectrometria De Massas Para A Análise De Extratos De Produtos Naturais**. Tese de Doutorado, Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CAMARGO, M.G. Sysgran: um sistema de código aberto para análises granulométricas do sedimento. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 2, p.371-378, 2006.

CARDOSO, A.P.F. *et al.* Dose–response of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] in the urothelial mucosa of Wistar rats. **Toxicology**, v.313, p.1-5, 2013.

CASSIANO, N. M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**. v. 32, v. 4, p. 1021–1030, 2009.

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

CHAVES, A.; SHEA, D.; DANEHOWER, D. Analysis of chlorothalonil and degradation products on soil and water by GC/MS and LC/MS. **Chemosphere**, v.71, p.629-638, 2007.

COCHET, N.; GIACOMAZZI, S. Environmental impact of diuron transformation: a review. **Chemosphere**, v.56, p.1021-1032, 2004.

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, p.1169–1175, 2006.

CROTTI, A. E. M. *et al.* Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v.29, n.2, p.287-292, 2006.

DAFFORN, K.A.; LEWIS, J.A.; JOHNSTON, E.L. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.453-465, 2011.

DIAS, J.C.; LIMA, W.N. Comparação de métodos para a determinação de matéria orgânica em amostras ambientais. **Revista Científica da UFPA**, v. 4, 2004. Disponível em: http://www.ufpa.br/rcientifica/ed_anteriores/pdf/ed_04_jcd.pdf Acessado em: 25 de julho de 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.

DINIZ, M.E.R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

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

EECKHAUT, A.V. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.2198-2207, 2009.

EVARD, H.; KRUBE, A.; LEITO, I. Tutorial on estimating the limit of detection using LC/MS analysis, part I: Theoretical review. **Analytica Chimica Acta**, v.942, p.23-39, 2016.

FORTES, L. F.; LABIDI, S.; NETA, R. F. C. Projeto e construção de bio-ontologia para suporte a sistema multiagente de monitoramento ambiental do Complexo Portuário da Ilha de São Luís do Maranhão. **Cadernos de Pesquisa**, v. 16.p. 43-52, 2009.

FONOLLOSA, J.; VERGARA, A.; HUERTA, R.; MARCO, S. Estimation of the limit of detection using information theory measures. **Analytica Chimica Acta**, v. 810, p.1-9, 2014.

FRATTINI, C.T.A.; KALCKMANN, R.E. Correlação entre alguns métodos de determinação de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.2, p.259-261, 1967.

FROEHNER, S.; MARTINS, R. F. Avaliação da composição química de sedimentos do Rio Barigüi na região metropolitana de Curitiba. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2020-2026, 2008.

GAMA, B.A.P.; EPREIRA, R.C.; COUTINHO, R. Bioincrustação marinha. In: Pereira, R.C. e Soares-Gomes, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. cap.12, p. 299-318.

GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N.S. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. **Aquatic Toxicology**, v. 85, p. 184-191, 2007a.

GATIDOU G.;THOMAIDIS, N.S.; ZHOU, J.L. Fate of Irgarol® 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. **Environment International**, v.33, p.70-77, 2007b.

GELMAN, F.; BINSTOCK, R.; HALICZ, L. Application of the Walkley-Black titration for organic carbon quantification in organic rich sedimentary rocks. **Fuel**, v. 96, p. 608-610, 2011.

GONZÁLEZ, O. *et al.* Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v.1353, p.10-27, 2014.

GOSETTI, F. *et al.* Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.3929–3937, 2010.

HUOVINEN, M. *et al.* Toxicity of diuron in human cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v.29, p.1577-1586, 2015.

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

KRUVE, A. *et al.* Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015a.

KRUVE, A., *et al.* Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part II. **Analytica Chimica Acta**, v.870, p.8-28, 2015b.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, n.2, 2009.

LEITE, C.M.B. **Uso do método titulação após oxi-redução por via úmida e do método refluxo aberto para determinação da matéria orgânica em solos contaminados por chorume de resíduos sólidos domésticos.** 2001. 103 f. Dissertação (Mestrado Em Tecnologia Ambiental E Recursos Hídricos) – Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

LESTER, J. N.; SCRIMSHAW, M. D.; VOULVOULIS, N. Occurrence of four biocides utilized in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. **Marine Pollution Bulletin**, v.40, n. 11, p.938-946, 2000.

MANISALI, I.; CHEN, D. D. Y.; SCHNEYDER, B. B. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n.3, 2006.

MARCHI, I.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.L. Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: A review. **Talanta**, v.78, p.1-18, 2009.

PIZZUTTI, I.R. *et al.* Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p.4539–4552, 2009.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 05, p. 771-780, 2004.

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, p.367-372, 2016.

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

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

SCHUMACHER, B.A. Methods for the determination of total organic carbon (toc) in soils and sediments. **United States Environmental Protection Agency**, 2002.

SHAALA, N.M.A. *et al.* Lethal concentration 50 (LC50) and effects of Diuron on morphology of brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) Nauplii. **Procedia Environmental Sciences**, v.30, p.279-284.

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

SONAK, S. Implications of organotins in the marine environment and their prohibition. [Editorial]. *Journal of Environmental Management*, v.90, p.S1-S3, 2009.

TAYLOR, T.J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v.38, p.328-334, 2005.

TEIXEIRA, S. G.; SOUZA FILHO, P. W. M. Mapeamento de ambientes costeiros tropicais (Golfão Maranhense, Brasil) utilizando imagens de sensores remotos orbitais. **Revista Brasileira de Geofísica**. v. 27, p. 69-82, 2009.

THOMAS, K.V.; BLAKE, S.J.; WALDOCK, M.J. Antifouling Paint Booster Biocide Contamination in UK Marine Sediments. **Marine Pollution Bulletin**. v. 40, n. 09, p. 739-745, 2000.

TRUFELLI, H. *et al.* An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v.30, p.491-509, 2011.

TURNER, A. Marine Pollution From Antifouling Paint Particles. **Marine Pollution Bulletin**, v.60, p.159-171, 2009.

VOULVOULIS, N.; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J.N. Occurrence of Four Biocides Utilized in Antifouling Paints, as Alternatives to Organotin Compounds, in Waters and Sediments of a Commercial Estuary in the UK. **Marine Pollution Bulletin**, v.11, p.938-946, 2000.

WALKLEY, A.; BLACK, I. A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v. 37, p. 29-38, 1934.

WENTWORTH, C. K. A scale of grade and class terms for clastic sediments. **J. Geology**, v.30, p. 377–392, 1922.

YEBRA, D. M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress In Inorganic Coatings**, v.50, 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, p.239-246, 2008.