

PRINCIPAIS MÉTODOS PARA ANÁLISE DO ANTI-INCRUSTANTE IRGAROL EM AMBIENTES MARINHOS E AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE*

THE MOST IMPORTANT METHODS FOR ANALYSIS OF ANTIFOULING IRGAROL IN SEA ENVIRONMENT AND ITS ECOTOXICITY EVALUATION

MÉTODOS PRINCIPALES PARA EL ANÁLISIS DEL ANTI-INCRUSTANTE IRGAROL EN AMBIENTES MARINOS Y EVALUACIÓN DE SU ECOTOXICIDAD

Lia Gracy Rocha Diniz
Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco
Marcelle Silva de Jesus

Resumo: Irgarol 1051 (2-metiltio-4-terbutilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) é um biocida comumente utilizado em pinturas anti-incrustantes de embarcações marítimas. A despeito da toxicidade, seu uso frequente tem levado a registros da substância em diversos ambientes portuários. Recentemente, em estudos realizados pelos autores deste trabalho, Irgarol foi identificado em região portuária maranhense, em concentrações da mesma ordem de grandeza da fitotoxicidade apresentada para a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Os estudos demonstram a necessidade de maiores investigações sobre o Irgarol, uma vez que não se conhece exatamente o prejuízo que possa vir a causar em regiões tropicais, caracterizadas pela rica diversidade de manguezais. Considerando, assim, a importância do monitoramento sistemático do anti-incrustante, este trabalho apresenta um levantamento dos registros do Irgarol em várias partes do mundo e os principais métodos analíticos usados para identificação do composto

Palavras-chave: Pinturas anti-incrustantes. Biocidas. Irgarol 1051. Contaminação marinha.

Abstract: Irgarol 1051 (2-metiltio-4-terbutilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) is a booster biocide commonly used in antifouling paintings for ships. Despite the toxicity its frequent usage showed records of the substance in several port environments. A recent study performed by the authors of this paper identified Irgarol in port region of São Luís (Maranhão) under concentrations at the same level of phytotoxicity which was observed for micro algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Referred research shows the need for more investigations about Irgarol, since there is little knowledge about possible damages on tropical regions, characterized by rich diversity of mangroves. Regarding the importance of systematic monitoring, the present research shows a survey of Irgarol records around the world and the main analytical methods used for identification of the compound.

Keywords: Antifouling paintings. Booster biocides. Irgarol 1051. Sea contamination.

Resumen: Irgarol 1051 (2-metiltio-4-terbutilamino-6-ciclopropilamino-S-triazina) es un biocida comúnmente utilizado en pinturas anti-incrustantes de embarcaciones marítimas. A pesar de su toxicidad, su uso frecuente ha mostrado registros de la substancia en diversos ambientes portuarios. Recientemente, en estudios realizados por los autores del presente trabajo, Irgarol fue identificado en la región portuaria de São Luís (Maranhão), en concentraciones del mismo orden de magnitud de la fitotoxicidad para la micro alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Los estudios demuestran la necesidad de mayores investigaciones sobre Irgarol, ya que no se conocen exactamente los perjuicios que podrían causar en regiones tropicales, caracterizadas por la rica diversidad de mangues. Considerando la importancia del monitoramiento sistemático del anti-incrustante, este trabajo presenta un estudio bibliográfico de los registros del Irgarol en varias partes del mundo y de los principales métodos analíticos usados para la identificación del compuesto..

Palabras clave: Pinturas anti-incrustantes. Biocidas. Irgarol 1051. Contaminación marina.

1 INTRODUÇÃO

Pinturas anti-incrustantes, também designadas anti-vegetativas, são utilizadas desde épocas remotas em embarcações de passeio ou uso comercial, para prevenir o crescimento de bactérias, macro-algas, mexilhões, cracas e

outros invertebrados que possam aumentar a resistência mecânica das embarcações e comprometer a mobilidade do transporte sobre as águas (PARADAS; A. FILHO, 2007) (Figura 1). Também utilizadas em comportas de represas,

*Artigo recebido em outubro 2011
Aprovado em dezembro 2011

plataformas petrolíferas e outras estruturas portuárias, as tintas anti-incrustantes originalmente eram feitas com misturas de enxofre, arsênio e mercúrio ou também com óxidos de cobre e zinco. Devido à rápida perda de eficiência, tais substâncias passaram a ser gradativamente substituídas por compostos organoestânicos (tintas de "segunda-geração") e depois por outras classes de compostos (tintas de "terceira-geração"). Muitos estudos, entretanto, têm comprovado o efeito deletério que tintas anti-incrustantes podem causar em áreas de portos e marinas, nos quais têm sido frequentemente encontrados resíduos dos biocidas, em níveis de concentração capazes de causar efeitos tóxicos em várias espécies marinhas, nativas desses ambientes (FERNANDEZ-ALBA et al., 2002; GATIDOU; THOMADIS, 2007; OKAMURA et al., 2000).

Figura 1- Exemplo de incrustação em casco de embarcação



Fonte: (CLARE, 2011)

As primeiras tintas organometálicas, substitutas das misturas metálicas, surgiram por volta de 1950 (GODOI; FAVORETO; SILVA, 2003) e, em 1961, tintas a base de tributilestanho (TBT) e outros derivados organoestânicos, como o trifenilestanho (TPHT), já eram utilizadas (ALMEIDA; DIAMANTINO; SOUSA,

2007). O uso difundido de TBT, entretanto, resultou em sérios problemas devido à alta toxicidade observada em moluscos e ostras (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SOSA-FERRERA; SANTANA-RODRÍGUEZ, 2011), que passaram a apresentar mutações. Em especial, ficou comprovada a relação entre a presença dos compostos organoestânicos e alterações denominadas de imposex, em moluscos (CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011). Diante disso, em 1989, a União Européia proibiu o uso de organoestânicos em embarcações maiores que 25 metros de comprimento (KONSTANTINOU; ALBANIS, 2004). Mais tarde, a Organização Marítima Internacional - International Maritime Organization (IMO) propôs o banimento mundial do uso do TBT, proposta que entrou em vigor em 2003, quando a Convenção para Sistemas Anti-Incrustantes estabeleceu que fosse proibido o uso em novas pinturas e o prazo máximo (setembro de 2008) para a presença do TBT em cascos de embarcações (CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SOSA-FERRERA; SANTANA-RODRÍGUEZ, 2011).

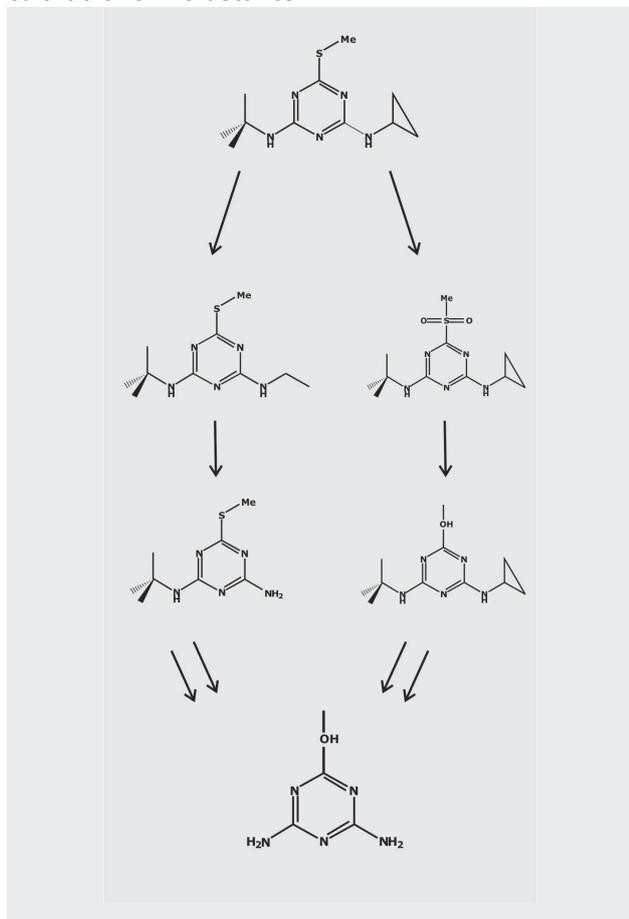
Como consequência da restrição ao uso dos organoestânicos, a indústria de tintas anti-incrustantes buscou novas alternativas surgindo, então, uma terceira geração de biocidas, na qual se incluem 16 substâncias, entre compostos orgânicos não metálicos (Irgarol, Diuron, Sea-Nine 211, Diclofluanida, Clorotalonil, Tiram, Busan, Densil e Trifenilborano Piridina), compostos organometálicos (Cobre Piritiona, Naftenato de Cobre, Zinco Piritiona, Ziram e Maneb) e substâncias inorgânicas (Óxido e Tiocianato de Cobre) (BASHEER; TAN; LEE, 2002; MANZO et al., 2006; SAPOZHNIKOVA et al., 2008; THOMAS et al., 2001). Tais substâncias, em alguns casos, são utilizadas simultaneamente em uma mesma formulação comercial, com intuito de potencializar a ação da pintura. É o caso, por exemplo, do Irgarol e Diuron, dois dos compostos mais frequentemente usados e que apresentam, entretanto, efeitos tóxicos sobre macrófitas e comunidades de fitoplâncton, em níveis de concentração de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (KONSTANTINOU; ALBANIS, 2004).

A tinta anti-incrustante contendo a substância química denominada Irgarol 1051 (2-metil-4-terbutilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) foi registrada em 1998, nos Estados Unidos. Desde então, seu uso vem aumentando consideravelmente e, atualmente, Irgarol é um dos biocidas mais empregados em pinturas

anti-incrustantes devido à elevada eficiência no combate de incrustações em cascos de navios (MOHR et al., 2008). Em menor extensão e quantidades, têm sido também usados Diuron, Sea-Nine 211, Zinco Piritiona e Zineb (KOUTSAFTIS; AOYAMA, 2006).

Irgarol pertence ao grupo das s-triazinas, cuja ação ocorre pela inibição do fotosistema-II (PSII), inibindo o transporte de elétrons no sistema fotossintético nos cloroplastos. De acordo com vários estudos, a biodegradação, fotodegradação e hidrólise química de Irgarol 1051 resultam na desalquilação da molécula original, formando como produto de degradação M1 (2-metiltio-4-terc-butilamino-6-amino-s-triazina), M2 (2-amino-propanal-4-terc-butilamino-6-metiltio-s-triazina) e M3 (2,4(diamino-di-terc-butil)-6-metiltio-s-triazina) (GATIDOU et al., 2004; OKAMURA et al., 2000; THOMAS; MCHUGH; WALDOCK, 2002). Um mecanismo para a reação de degradação é proposto SAKKAS et al. (2002) (Figura 2), sendo a via de degradação predominante em água a ruptura e desmetilação do anel N-ciclopropil.

Figura 2 - Irgarol e seu principal produto de transformação, M1, formado pela desalquilação da molécula do anti-incrustante



Fonte: (SAKKAS et al., 2002)

Pesquisas indicam que, dentre os produtos de degradação, o M1, também denominado GS26575, é o principal composto formado. A despeito disso, o composto tem sido observado em concentrações inferiores ao Irgarol em ambientes marinhos, o que aponta para uma baixa taxa de transformação do Irgarol em M1 e/ou rápida transformação do produto de degradação (OKAMURA et al., 2000; THOMAS; MCHUGH; WALDOCK, 2002).

Em função da ampla utilização do Irgarol em todo o mundo, o desenvolvimento de metodologias de análise que permitam detecção e quantificação do composto em ambientes marinhos é de suma importância. Apresentam-se, assim, os principais métodos de extração e determinação do Irgarol que são citados na literatura, comparando-se sensibilidades e modificações metodológicas para o adequado monitoramento ambiental para o algicida. São citados também os principais registros de Irgarol em amostras ambientais e os ensaios ecotoxicológicos feitos com distintos organismos aquáticos.

2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE IRGAROL E REGISTROS DO ANTI-INCURSTANTE EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE VÁRIOS AMBIENTES MARÍTIMOS

Assim como a grande maioria dos contaminantes ambientais, anti-incrustantes estão geralmente presentes em concentrações muito baixas, logo, devem ser separados de outros componentes da matriz de acompanhamento e enriquecidos antes da análise. Desta forma, a seleção do método de extração e o procedimento completo da pré-concentração do Irgarol são de suma importância para a medição confiável do composto (Tabela 1). As técnicas mais utilizadas têm sido a extração em fase sólida (EFS), usando-se preferencialmente cartuchos de adsorção de fase-reversa (CAI et al., 2006; GATIDOU et al., 2005; LANDA et al., 2006; YUN; HAO, 2004), a micro-extração em fase sólida (MEFS) (LAM et al., 2005; LAMBROPOULOU; SAKKAS; ALBANIS, 2002) e, em menor extensão, a extração líquido-líquido (ELL) (GIMENO; MARC; BORRULL, 2004; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Basheer et al. (2002), por exemplo, procederam a extração de Irgarol e compostos organoestênicos usando pequenos volumes de acetato de etila e hexano, em presença de cloreto de sódio. Recuperações de 88%, com coeficientes de variação de 6%, foram obtidos

para Irgarol. Entretanto, foi necessário incluir uma etapa de derivatização com tetraetilborato de sódio para garantir melhores recuperações do anti-incrustante. Microextração em fase sólida (MEFS) é outra técnica adequada para a extração do Irgarol, principalmente quando associada à separação por cromatografia gasosa. No modo headspace (HS-MEFS), usando-se fibra de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) de 65µm, Irgarol e sea nine foram satisfatoriamente analisados em amostras de água naturais. A presença de ácidos húmicos na água foi um fator relevante na eficiência da extração, ao contrário do que poderia ocorrer na microextração em fase-sólida direta tornando, assim, a técnica HS-MEFS mais adequada para a determinação dos anti-incrustantes em níveis residuais (GIMENO; MARC; BORRULL, 2004; LAMBROPOULOU; SAKKAS; ALBANIS, 2002).

Tabela 1 - Métodos de pré-concentração e análise do Irgarol em amostras de água marinha

Pré-concentração	Método cromatográfico	LD (ng L ⁻¹)	Referências
EFS (C18)	CG-EM	< 5,0	READMAN et al., 1993
EFS (C18)	CL-DAD	1,0	FERRER et al., 1997
EFS (C18)	CL-DAD	2-10	FERRER; BARCELÓ, 1999
LLE (Acetato de etila:hexano)	CG-EM	10,0	BASHEER; TAN; LEE, 2002
MEFS (PDMS-DVB)	CG-DCE GC-DIC, CG-EM	- 15,0, 30,0	LAMBROPOULOU; SAKKAS; ALBANIS, 2002
EFS (Lichrolut-EN)	CL-EM-EM	0,2	LAMOREE et al., 2002
EFS (C18)	CG-DIC, CG-EM	2,2 0,54	SAKKAS et al., 2002
EFS (C18)	CG-EM	960,0	BOWMAN; READMAN; ZHOU, 2003
EFS (C18)	CL-EM	0,6	YUN; HAO, 2004
EFS (C18)	CL-DAD	11,0	GATIDOU et al., 2005
MEFS (PDMS)	CG-EM	50,0	LAM et al., 2005
EFS (C18)	CL-EM	0,2	CAI et al., 2006
EFS (C18)	CG-EM	17,0	KNUTSON et al., 2006
EFS(LiChrolut-EN)	CL-EM	0,2	LANDA et al., 2006
EFS (LiChrolut-EN)	CL-EM	50	GIMENO et al., 2001
EFS (C18)	CL-EM	1,0	SAPOZHNIKOVA et al., 2007
EFS (C18)	CL-EM-EM	1,0	SAPOZHNIKOVA et al., 2008

Legenda: ELL (Extração Líquido-Líquido); EFS (Extração em Fase Sólida); MEFS (Micro Extração em Fase Sólida); CG (Cromatografia Gasosa) com distintos tipos de detectores: EM (Espectrometria de Massas), DIC (ionização em Chama), DCE (Captura Eletrônica); CL (Cromatografia Líquida) com detectores: DAD (Conjunto de Diodos), EM (Espectrometria de Massas).

Para amostras aquosas, entretanto, a técnica de pré-concentração mais efetiva é, de fato, a extração em fase sólida (EFS) devido às várias vantagens que apresenta, dentre as quais o uso de menores volumes de solventes orgânicos e a facilidade de automatização com a cromatografia líquida, o que torna a técnica mais acessível e com menor produção de resíduos perigosos. Irgarol possui uma tendên-

cia considerável de adsorção em substâncias orgânicas devido ao coeficiente de partição octanol/água (Log Kow) de 3,95, o que possibilita uma pré-concentração em materiais mais apolares, como cartuchos contendo material adsorvente de fase reversa de C18 ou, ainda, fases poliméricas, como PLRP-s e LiChrolut EN (GIMENO; MARC; BORRULL, 2004; KNUTSON et al., 2006). Para estes materiais, recuperações superiores a 85% e tempos de extração satisfatórios têm sido observadas, em geral, utilizando-se prévio condicionamento com acetona, metanol e água e eluição com metanol (KNUTSON et al., 2006; GIMENO et al., 2004). Uma vantagem adicional na extração em fase sólida, quando comparada com a extração líquido-líquido ou micro-extração em fase sólida é que permite a extração do composto de interesse, no próprio local da coleta das amostras, facilitando o transporte das amostras até o laboratório e reduzindo a possibilidade de degradação da substância entre o momento da coleta e a análise propriamente dita (MAJORS, 2001).

Vários métodos de determinação do Irgarol e seus produtos de degradação têm sido desenvolvidos. Utiliza-se, por exemplo, a cromatografia a gás (CG) com detecção por espectrometria de massas (CG-EM) por ser um método extremamente sensível e que propicia informações de natureza tanto qualitativa quanto quantitativa. Por meio do método, os analitos e seus produtos de degradação podem ser adequadamente separados e, em seguida, detectados com seletividade e sensibilidade satisfatórias. Outros sistemas de detecção como o de ionização de chama (DIC) são também adequadamente sensíveis para a determinação de Irgarol. Embora a cromatografia gasosa com detecção por captura eletrônica (CG- DCE) seja extremamente sensível, o método não apresenta sensibilidade satisfatória para Irgarol devido à falta de haletos na molécula do biocida (GODOI; FAVORETO; SILVA, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou simplesmente CL) é muitas vezes preferida na determinação do Irgarol devido não haver necessidade de derivação do composto. O desenvolvimento de novas interfaces para o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massa (EM) (GIMENO; MARC; BORRULL, 2004) também tornaram a técnica mais usada na detecção da substância e seu principal produto de transformação. A dupla fragmentação propiciada por equipamen-

tos mais sofisticados, como LC-MS-MS, tem resultado em confirmações inequívocas, tanto do composto quanto do seu principal produto de degradação, em níveis de concentrações significativamente mais baixos (SAPOZHNIKOVA et al., 2008). Outro detector também utilizado é o de arranjo de diodos (DAD), cuja detecção baseia-se na absorção de luz ultravioleta ou visível (UV-Vis) frente à emissão de radiação eletromagnética por uma lâmpada de deutério (UV) e tungstênio (Vis) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Para a cromatografia líquida com detecção por fluorescência, embora bastante sensível e considerada bastante seletiva, uma vez que dois comprimentos de onda (de absorção e emissão) são usados para identificação do Irgarol, não se observou na literatura o uso para a análise do Irgarol, certamente devido à necessidade de derivação da molécula (DINIZ; FRANCO; SANTOS, 2011).

A Tabela 1 apresenta as principais identificações do Irgarol utilizando-se distintos métodos de pré-concentração e de análise cromatográfica. Comparando-se os métodos, pode-se observar que maiores sensibilidades puderam ser obtidas pela cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas.

Como resultado da frequente utilização e da relativa estabilidade em ambiente natural, a substância e seu principal produto de degradação M1 (2-metil-4-terc-butilamina-s-triazina) têm sido mundialmente detectados em amostras de ambientes marinhos (Tabela 2). No que se refere aos registros de Irgarol em águas de ambientes marítimos, principalmente para amostras coletadas de marinas e portos, vários são os casos de detecção da substância e seu produto de transformação (FERRER et al., 1997; GATIDOU et al., 2005; LEE et al., 2011).

Tabela 2 - Concentrações de Irgarol detectadas em amostras de água de diversos ambientes costeiros

Local	Conc. encontradas ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referências
Côte d'Azur - França	0,1 - 1,7	READMAN et al., 1993
Barcelona - Espanha	0,007 - 0,3	FERRER et al., 1997
Delta do Ebro - Espanha	0,015 - 0,3	FERRER; BARCELÓ, 1999
Tarragona - Espanha	0,05	POCURELL et al., 2000
Reino Unido	1,4	THOMAS et al., 2001
Cingapura	3,2 - 4,0	BASHEER; TAN; LEE, 2002
Andaluzia - Espanha	0,05 - 1,0	MEZCUA et al., 2002
Epirus - Grécia	0,02 - 0,03	LAMBROPOULOU; SAKKAS; ALBANIS, 2002
Duch - Holanda	0,008 - 0,09	LAMOREE, et al., 2002
Piræus, Thessaloniki e Patras - Grécia	0,01 - 0,09	SAKKAS et al., 2002
Japão (oeste)	0,26	OKAMURA et al., 2003
Florida - Estados Unidos	0,001 - 0,182	GARDINALI; PLASENCIA; MAXEY, 2004
Hong Kong	0,006 - 0,1	YUN; HAO, 2004
Hong Kong (Costa Sul)	0,1 - 1,6	LAM et al., 2005
Levos - Grécia	0,04 - 0,12	GATIDOU et al., 2005
Hong Kong	0,006 - 0,01	CAI et al., 2006
Hawaii	0,048	KNUTSON et al., 2006
Nápoles - Itália	0,003 - 0,029	LANDA et al., 2006
San Diego - Est. Unidos	0,001 - 0,3	SAPOZHNIKOVA et al., 2007
Califórnia - Est. Unidos	0,012 - 0,712	SAPOZHNIKOVA et al., 2008
Okinawa - Japão	0,001 - 0,035	SHEIKH et al., 2009

Ferrer et al. (1997), por exemplo, detectaram Irgarol, em concentração variando de 0,07 a 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, para amostras de água coletadas do litoral de Masnou (Barcelona). O método utilizado foi extração em fase sólida seguida de análise por cromatografia líquida e detecção por conjunto de diodos, tendo sido obtido um limite de detecção de 1,0 ng L^{-1} . Valores aproximados aos obtidos na Espanha foram encontrados em águas costeiras da França por Readman et al. (1993). Naquele estudo, utilizando metodologia EFS-CG-EM e com limite de detecção inferior a 5 ng L^{-1} , foi possível registrar concentrações de Irgarol entre 0,1 e 1,7 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Gatidou et al. (2005) e outros estabeleceram e aplicaram um método para extração e determinação simultânea de Irgarol e diuron, bem como seus principais metabólitos em água do mar. O método baseou-se em extração em fase sólida, seguida de cromatografia líquida e detecção por conjunto de diodos, EFS-CL-DAD. Foram comparadas as eficiências de extração com três diferentes cartuchos, C18 e dois cartuchos de fases adsorventes poliméricas, e usando três diferentes solventes orgânicos (diclorometano, acetoneitrila e metanol) para condicionamento e eluição. As recuperações de Irgarol obtidas na extração com C18 foram entre 80 e 107%, e entre 70 e 95% para extrações usando os cartuchos poliméricos, demonstrando, assim, a melhor eficiência do primeiro cartucho EFS. Quanto aos solventes orgânicos, a melhor recuperação foi obtida com o uso de metanol neutro (recuperações de 107%). O método estabelecido apresentou limite de detecção de 11 ng L^{-1} e, para amostras coletadas de regiões portuárias da Grécia, Irgarol foi detectado em concentrações variando de 0,04 a 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Amostras de água do mar da Califórnia apresentaram concentrações entre 0,012 e 0,712 $\mu\text{g L}^{-1}$, resultado acima do valor de referência para toxicidade obtida por meio de uma escala Benchmark, sugerindo que as concentrações de Irgarol encontradas foram altas o suficiente para provocar alterações na comunidade fitoplanctônica, no ambiente amostrado. A metodologia utilizada foi extração em fase sólida, seguida de cromatografia líquida e detecção por espectrometria de massas com dupla fragmentação, EFS-CL-EM-EM, com a qual foi possível um limite de detecção de 1,0 ng L^{-1} (SAPOZHNIKOVA et al., 2008).

Dos registros de Irgarol em vários ambientes portuários, as maiores concentrações foram registradas na costa marítima de Cingapura. Pré-concentrando amostras de água do mar, Basheer, Tan e Lee (2002) identificaram concentrações médias de Irgarol de $2,0 \pm 1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para 13 das 26 localidades amostradas. O método de pré-concentração utilizado foi extração líquido-líquido (ELL, com acetato de etila e hexano).

3 ECOTOXICIDADE DE IRGAROL FRENTE A DIFERENTES ORGANISMOS

Um dos aspectos mais importantes na avaliação da toxicidade de uma substância antropogênica é o estudo dos seus efeitos sobre organismos vivos e as conseqüências ecológicas decorrentes da presença da substância, o que se denomina Ecotoxicologia. Tal avaliação é um recurso amplamente utilizado na determi-

nação da qualidade de um ecossistema sendo feito, em condições previamente estabelecidas, o monitoramento de um ou mais organismos que sejam sensíveis à presença do poluente ou outros distúrbios ambientais (FERNICOLA et al., 2004). Os organismos vivos selecionados para os ensaios ecotoxicológicos são denominados organismos-teste.

Os organismos-testes são indivíduos, padronizados ou não, cultivados em laboratório ou coletados no campo, utilizados para avaliar os efeitos do agente tóxico. Esses organismos podem fornecer indicações sobre as condições de um ecossistema frente a um impacto ambiental. Sua utilização fundamenta-se na exposição dos organismos teste, representativos do ambiente estudado, em várias concentrações de uma ou mais substâncias ou fatores ambientais, durante um determinado período de tempo (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990). Como espécies representativas dos produtores

Tabela 3 - Ecotoxicidade do anti-incrustante irgarol sobre algumas espécies de algas, plantas aquáticas e invertebrados

	Organismos-teste	Efeito Tóxico	Concentração	Tempo	Referências
ALGAS E PLANTAS AQUÁTICAS	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	CE ₅₀	2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	72h	SCARLETT et al., 1997
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	CEb ₅₀	1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$	72h	OKAMURA et al., 2000
		CEr ₅₀	2,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	72h	OKAMURA et al., 2000
	<i>Lactuca sativa</i>	CE ₅₀	> 50 mg L ⁻¹	5 dias	OKAMURA et al., 2000
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	CE ₅₀	10,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	72h	FERNÁNDEZ-ALBA et al., 2002
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	CE ₅₀	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	72h	MEZCUA et al., 2002
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CE ₅₀	1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	96h	GATIDOU; THOMADIS, 2007
	<i>Navicula forcipata</i>	CE ₅₀	0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$	96h	GATIDOU; THOMADIS, 2007
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CE ₅₀	0,41 $\mu\text{g L}^{-1}$	96 h	ZHANG, 2008
INVERTEBRADOS	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀	8,1 mg L ⁻¹	48h	TÓTH et al., 1996
	<i>Mysid shrimp</i>	CE ₅₀	0,4 mg L ⁻¹	96h	TÓTH et al., 1996
	<i>Crassostrea virginica</i>	CE ₅₀	3,2 mg L ⁻¹	48h	TÓTH et al., 1996
	<i>Artemia salina</i>	CL ₅₀	> 40 mg L ⁻¹	24h	PANAGOULA; PANAYIOTA; ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, 2002
	<i>Daphnia magna</i>	CL ₅₀	1,6 mg L ⁻¹	24h	OKAMURA et al., 2000
	<i>Daphnia pulex</i>	CL ₅₀	5,7 mg L ⁻¹	24h	OKAMURA et al., 2000
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	CL ₅₀	12 mg L ⁻¹	214h	OKAMURA et al., 2000
	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀	10 mg L ⁻¹	24h	FERNÁNDEZ-ALBA et al., 2002
	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀	7,3 mg L ⁻¹	48h	FERNÁNDEZ-ALBA et al., 2002
	<i>Artemia salina</i>	CL ₅₀	1,62 mg L ⁻¹	24h	PANAGOULA; PANAYIOTA; ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, 2002
	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀	7,3 \pm 1,24 mg L ⁻¹	48h	HERNANDO et al., 2003
	<i>Mytilus edulis</i>	CE ₅₀	1.540 $\mu\text{g L}^{-1}$	48h	BELLAS, 2006
	<i>Paracentrotus lividus</i>	CE ₅₀	4.021 $\mu\text{g L}^{-1}$	48h	BELLAS, 2006

primários, as algas são organismos ecologicamente importantes que sustentam a vida nos mares e oceanos e desempenham, assim, um papel fundamental na manutenção destes ecossistemas, como fonte de energia para um grande número de organismos marinhos (GATIDOU; THOMAIDIS, 2007; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Vários estudos têm apresentado a toxicidade aguda e crônica do Irgarol com diferentes espécies aquáticas e marinhas (Tabela 3).

Devido à relevância ecológica e à sensibilidade, bioensaios com organismos que possuam ciclo de vida curto são de grande importância, particularmente quando usados em testes com amostras ambientais de pouca estabilidade. Algas, bactérias e invertebrados aquáticos são atrativos porque possuem ciclos reprodutivos rápidos. O aumento de suas gerações ocorre em curto período, se comparados com organismos superiores como peixes (RADIX et al., 2000). A utilização de algas em bioensaios tem por base a rápida resposta fisiológica, exatamente pelo ciclo de vida curto, facilitando os estudos de exposição com várias gerações. Além disso, apresentam altas taxas de crescimento, o que facilita manter culturas em laboratório, assim como capacidade de crescimento em meios sintéticos bem definidos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Nesse sentido, efeitos da ecotoxicidade do Irgarol têm sido demonstrados para espécies aquáticas nas quais a inibição do crescimento é significativa, ainda que em baixas concentrações da substância estudada. Por exemplo, para a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi relatada para o Irgarol uma concentração média de inibição (CI_{50}) de $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Outras espécies, entretanto, mostraram-se ainda mais sensíveis ao Irgarol, tendo sido observadas toxicidades crônicas para baixas concentrações, com parâmetros de concentrações efetivas médias durante 96 horas de $0,29$; $0,4$ e $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para as microalgas marinhas *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana* e *Navicula forcipata*, respectivamente (GATIDOU; THOMADIS, 2007; ZHANG, 2008).

Para invertebrados, em geral, o que tem se observado são toxicidades menores e, portanto, maiores tolerâncias de diversas espécies em relação ao Anti-incrustante Irgarol. Para o microcrustáceo marinho *Artemia salina*, por exemplo, a toxicidade é considerada moderada, tendo sido relatados parâmetros de concentração média letal ($CL_{50-24 h}$) superiores a 40 mg L^{-1} (OKAMURA et al., 2000). Dados de toxicidade aguda e crônica foram relatados

por Fernández-Alba et al. (2002) para o microcrustáceo *Daphnia Magna* e também para a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*), CE_{50-24h} de 10 mg L^{-1} e CE_{50-72h} de $0,0108 \text{ mg L}^{-1}$.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

São diversas as fontes de poluição marinha, dentre elas, as pinturas de embarcações contendo substâncias anti-incrustantes, por exemplo, Irgarol, Diuron, Sea-Nine 211, Zinco Piritiona e Zineb, dentre outros, o primeiro destes sendo o de maior uso e, provavelmente, o de maior efeito tóxico sobre determinados organismos vivos.

Irgarol é frequentemente aplicado junto com compostos metálicos, como dióxido de cobre ou tiocianato de cobre potencializando, assim, a ação da pintura. O uso destes tipos de tintas pode levar à necessidade de monitoramento de ambientes costeiros, bem como a avaliação ecotoxicológica de diferentes combinações de princípios ativos presente nas tintas anti-incrustantes.

Considerando que Irgarol em ambientes marinhos apresenta toxicidade comprovada que, entretanto, depende de vários fatores relacionados com as propriedades do composto, dos processos de transporte e das características do meio, como salinidade, pH, temperatura, entre outros, a avaliação e monitoramento do anti-incrustante em organismos nativos de ambientes marinhos e estuarinos é de fundamental importância para garantir a preservação de tais regiões.

Em amostras de água a análise, em geral, envolve a pré-concentração por extração em fase sólida (EFS) usando-se, preferencialmente, cartuchos C18, com os quais é possível obter recuperações satisfatórias. Embora a cromatografia gasosa com vários tipos de detecção também apresente sensibilidades apropriadas para a análise, cromatografia líquida acoplada a dois sistemas de detecção por espectrometria de massas é a que tem sido mais utilizada, apresentando melhores sensibilidade e seletividade para a determinação do Irgarol e do seu principal produto de transformação.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T.; SOUSA, O. de. Breve história das tintas antivegetativas. *Corrosão e Proteção de Materiais*, v. 26, n. 1, p. 6-12, 2007.
- BASHEER, C.; TAN, K.S.; LEE, H.K. Organotin

- and irgarol 1051 contamination in singapore coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, p. 697 -703, 2002.
- BELLAS, J. Comparative toxicity alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Science of Total Environment*, n. 367, p. 573-585, 2006.
- BOWMAN, J. C.; READMAN, J. W.; ZHOU, J. L. Seasonal variability in the concentrations of irgarol 1051 in brighton marina, UK; including the impact of dredging, *Marine Pollution Bulletin*, v. 46, p. 444-451, 2003.
- CAI, Z. et al. LC -MS analysis of antifouling agent irgarol 1051 and its decyclopropylated degradation product in seawater from marinas in Hong Kong. *Talanta*, n. 70, p. 91-96, 2006.
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction in liquid chromatography evaluation of pollution due to herbicides in surface and ground waters. *Journal of Chromatography A*, v. 950, p. 157-166, 2002.
- CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 2011.
- CLARE, A.S. *Newcastle university*. 2011. Disponível em: <http://research.ncl.ac.uk/barnacles/Site/Media_files/Ship%20hull%20fouling.JPG>. Acesso em: 27 set. 2011.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Ed. da UNICAMP, 2006.
- DINIZ, L. G. R.; FRANCO, T. C. R. S.; SANTOS, R. L. Identificação de resíduos de irgarol em amostras de água da região portuária de São Luís, MA, e avaliação da toxicidade aguda e crônica do algicida frente a organismos aquáticos. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. et al. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta*, n. 456, p. 303-312, 2002.
- FERNICOLA, N. A. G. G. de; BOHRER-MOREL, M. B. C.; BAINY, A.C. D. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Coord.). *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Carlos: Rima; Intertox, 2004. cap.7. p. 221-243.
- FERRER, I.; BARCELO, D. Simultaneous determination of antifouling herbicides in marina water samples by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 854, p. 197-206, 1999.
- FERRER, I. et al. Pilot survey for determination of the antifouling agent irgarol 1051 in enclosed seawater samples by a direct enzyme-linked immunosorbent assay and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Environmental Science & Technology*, n. 31, p. 3530-3535, 1997.
- GARDINALI, P. R.; PLASENCIA, M. D.; MAXEY, C. Occurrence and transport of Irgarol 1051 and its major metabolite in coastal waters from South Florida. *Marine Pollution Bulletin*, n. 49, p. 1072-1083, 2004.
- GATIDOU, G. et al. Determination of two antifouling booster biocides and their degradation products in marine sediments by high performance liquid chromatography-diode array detection. *Analytica Chimica Acta*, n. 505, p. 153-159, 2004.
- GATIDOU, G. et al. Determination of the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography-diode array detector. *Analytica Chimica Acta*, n. 528, p. 89-99, 2005.
- GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquatic Toxicology*, n. 85, p. 184-191, 2007.
- 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*, n. 33, p. 70 -77, 2007.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al. *Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. São Paulo: CETESB, 1990. 17p. (Série Manuais).
- GIMENO, R. A. et al. Monitoring of antifouling agents in water samples by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatography A*, n. 915, p. 139-147, 2001.
- GIMENO, R. A.; MARC, R. M.; BORRULL, F. Determination of organic contaminants in coastal water. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 341-350, 2004.

- GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SILVA, M. S. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. *Química Nova*, n. 26, p. 708-716, 2003.
- HERNANDO, M.D. et al. Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* bioassays. *Water Research*, n. 37, p. 4091-4098, 2003.
- KNUTSON, S. et al. Distribution, effects, and risk of irgarol on hawaiian coral reefs. *Report to the Hawaii Coral Reef Initiative Research Program*, June 2006. Disponível em: <http://www.hawaii.edu/ssri/hcri/files/research/pdf/ostrander_noaa_pgrs_1_2006.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2010.
- KONSTANTINOU, I. K.; ALBANIS, T. A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International*, n.30, p. 235-248, 2004.
- KOUTSAFTIS, A.; AOYAMA, I. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environmental Toxicology*, v. 21, p. 432-439, 2006.
- LAM, K. et al. Identification of a new Irgarol-1051 related s-triazine species in coastal waters. *Environmental Pollution*, n. 136, p. 221-230, 2005.
- LAMBROPOULOU, D. A.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Analysis of antifouling biocides irgarol 1051 and sea nine 211 in environmental water samples using solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A.*, v. 952, p. 215-227, 2002.
- LAMOREE, M. H. et al. Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in dutch marinas and coastal waters. *Journal of Chromatography A.*, n. 970, p.183-190, 2002.
- LANDA, G. et al. Occurrence of antifouling paint booster biocides in selected harbors and marinas inside the Gulf of Napoli: a preliminary survey. *Marine Pollution Bulletin*, n. 52, p. 1541-1546, 2006.
- LEE, S. et al. Analysis of antifouling agents after regulation of tributyltin compounds in Korea. *Journal of Hazardous Materials*, n. 185, p. 1318-1325, 2011.
- MAJORS, R. E. New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation. In: LCGC. Europa, 2001. Disponível em: <<http://www.lcgceurope.com>>. Acesso em: 22 jul. 2009.
- MANZO, S.; BUONO, S.; CREMISINI, C. Toxic effects of irgarol and diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 51, p. 61-68, 2006.
- MEZCUA, M. et al. Chromatography-Mass spectrometry and toxicity evaluation of selected contaminants in seawater. *Chromatographia*, n. 56, p. 199-206, 2002.
- MOHR, S. et al. Long-term effects of the antifouling booster biocide Irgarol 1051 on periphyton, plankton and ecosystem function in freshwater pond mesocosms. *Aquatic Toxicology*, n. 90, p. 109-120, 2008.
- OKAMURA, H. et al. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Marine Pollution Bulletin*, n. 47, p. 59-67, 2003.
- OKAMURA, H. et al. Phytotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 and a major degradation product. *Marine Pollution Bulletin.*,v. 40, n. 9, p. 754-763, 2000.
- PANAGOULA, B.; PANAYIOTA, M.; ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, J. Acute toxicity of TBT and Irgarol in *Artemia salina*. *International Journal of Toxicology*, n. 21, p. 231-233, 2002.
- PARADAS, W. C.; A. FILHO, G. M. Are metals of antifouling paints transferred to marine biota? *Brazil journal oceanography*, São Paulo, v. 55, n. 1, 2007.
- POCURULL, E. et al. Trace determination of antifouling compounds by on-line solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, n. 885. p. 361-368, 2000.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v. 24, p. 68-76, 2001.
- RADIX, P. et al. Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n. 47, p. 186-194, 2000.
- READMAN, J. W. et al. Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints. *Environmental Science & Technology*, n. 27, p. 1940-1942, 1993.
- SAKKAS, V. A. et al. Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of greece. *Environmental Science & Pollution Research*, n. 9, p. 327-332, 2002.

- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J.J. Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC-MS/MS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments. *Chemosphere*, n. 82, p. 96-102, 2011.
- SAPOZHNIKOVA, Y. et al. Antifouling pesticides in the coastal waters of Southern California. *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, p. 1962-1989, 2007.
- SAPOZHNIKOVA, Y. et al. Distribution of antifouling biocides in California marinas. *Journal of Environmental Monitoring*, n. 10. p. 1069-1075, 2008.
- SCARLETT, A. et al. Occurrence of the marine antifouling agent irgarol 1051 within the plymouth sound locality: implications for the green macroalga *Enteromorpha intestinalis*. *Marine Pollution Bulletin*, v. 34, n. 8, p. 645-651, 1997.
- SHEIKH, M. A. et al. Contamination and impacts of new antifouling biocide Irgarol-1051 on subtropical coral reef waters. *International Journal Environmental Science Technology*, v. 6, n. 3, p. 353-358, 2009.
- THOMAS, K. V.; MCHUGH, M.; WALDOCK, M. Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *The Science of the Total Environment*, v. 293, p. 117-127, 2002.
- THOMAS, K.V. et al. Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. *Marine Pollution Bulletin*, v. 42, n. 8, p. 677-688, 2001.
- TÓTH, S. et al. Irgarol 1051, am antifouling compound in freshwater, sediment, and biota of Lake Geneva. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, n. 57, p. 426-443, 1996.
- YUN, F.; HAO, X. High performance liquid chromatography – mass spectrometry determination of Irgarol 1051 and its degradation products. 2004. Disponível em: <<http://www.gs.whu.edu.cn/journal/nature/200404/20040414.pdf>>. Acesso em: 29 jun. 2009.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química Nova*, n. 27, p.139-145, 2004.
- ZHANG, A. Q. Toxicities of antifouling biocide Irgarol 1051 and its major degraded product to marine primary producers. *Marine Pollution Bulletin*, v. 57, p. 575-586, 2008.