

Guilherme Teruaki Kuwahara de Toledo

Determinação do biocida anti-incrustante clorotalonil em amostras de água do sistema estuarino de Santos de São Vicente, SP e da represa do Broa Itirapina, SP.

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Bacharelado em Química

Orientadora: Profª. Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos
2015

"A química é absolutamente encantadora. Uma ciência que está de braços eternamente abertos a quem se dispuser a tentar compreendê-la. Uma fonte inesgotável de inspiração e de beleza, que vem caminhando lado a lado com a evolução da humanidade, fornecendo respostas e alternativas a seus questionamentos"

Aldo José Gorgatti Zarbin

21 de agosto de 2014

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a professora Eny Maria Vieira pela oportunidade de ter trabalhado em seu laboratório e agradecer por todo conhecimento passado, tanto quanto professora durante a graduação como orientadora durante a iniciação científica.

Agradeço imensamente a Lia Gracy Diniz por toda a ajuda e orientação fornecida, sem sua ajuda este projeto não teria sido possível.

Aos colegas de laboratório, por toda ajuda, companheirismo e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de graduação, pela amizade e companheirismo.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Química de São Carlos.

E por último e não menos importante agradeço a minha família que me apoiou e sustentou durante todos os anos de graduação

Resumo

Guilherme Teruaki K. de Toledo, Determinação do biocida anti-incrustante clorotalonil em amostras de água do sistema estuarino de Santos de São Vicente, SP e da represa do Broa Itirapina, SP. Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo

As tintas anti-incrustantes são pinturas utilizadas para tentar impedir o crescimento de organismos bioincrustantes, quando não são utilizadas a incrustação pode acarretar em um aumento de custo operacional para as embarcações de até 77%. Estudos sobre a toxicidade dessas tintas relatam sua ação em organismos não alvo, desse modo, neste estudo avaliou-se a presença do biocida clorotalonil em amostras de água coletadas no sistema estuarino de Santos de São Vicente. O método utilizado para o trabalho apresentou fator de linearidade de $R^2=0.98$ e uma recuperação de 97,8%. Também foi estudada a presença do biocida clorotalonil para amostras de água da represa do Broa em Itirapina-SP. O método mostrou-se promissor quando utilizado em matrizes de água doce, apresentando linearidade de $R^2=0,984$ e recuperação de 61%. Para ambas as amostras de Santos e de Itirapina as concentrações de clorotalonil encontraram-se abaixo do limite de detecção do método, não sendo possível sua determinação.

Abstract

Guilherme Teruaki K. de Toledo, Determination of the antifouling agent chlorothalonil in water samples collected from the estuary of Santos, São Vicente, SP and samples from the Broa dam in Itirapina, SP.

The antifouling paints are used to prevent the growth of biofouling organisms, when they are not used, the total operation cost of ships may increase up to 77%. Researchers have shown the toxic effects of these paints to non-target organisms, thus, in this study the aim was to evaluate the presence of the biocide chlorothalonil in water samples collected from the estuary system of Santos São Vicente, SP. The methodology used in this work showed a linear factor of $R^2=0,98$ and a recovery of 97,8%. The method was also used in samples from the Broa dam giving promising results of linear factor $R^2=0,984$ and a recovery of 61%. All the samples studied had their concentration of chlorothalonil below the detection limit of the method.

Lista de Figuras

Figura 1 - Formula estrutural do Diuron Fonte: Sigma-Aldrich.

Figura 2 - Formula estrutural do Irgarol 1051 Fonte: Sigma-Aldrich.

Figura 3 - Formula estrutural do Clorotalonil Fonte: Cox, C.; Anvisa.

Figura 4 - Figura 4 Esquema de extração líquido-líquido Fonte: Wikipedia.

Figura 5 - Fluxograma de tratamento de amostra.

Figura 6 - Gráfico da curva analítica em água doce.

Figura 7 - Gráfico das áreas do pico cromatográfico das amostras de água do Broa fortificadas

Figura 8 - Gráfico das áreas de pico cromatográfico das amostras de água do Broa.

Figura 9 - Curva analítica para as amostras de água de Santos.

Figura 10 - Valores de área de pico cromatográfico para as amostras coletadas de água em Santos.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Local de coleta das amostras de água do Broa.

Tabela 2 - Local de coleta das amostras de água de Santos.

Tabela 3 - Dados para a construção da curva de calibração para amostras de água coletadas do Broa.

Tabela 4 - Resultados das amostras do Broa.

Tabela 5 - Concentração do clorotalonil presente nas amostras fortificadas.

Tabela 6 - Dados para a curva analítica para as amostras de água coletadas em Santos

Tabela 7 - Área e tempo de retenção das amostras de água coletadas em Santos.

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas.....	7
Sumário.....	8
1 Contextualização	9
1.1 Tintas Anti-incrustantes	9
1.2 Clorotalonil.....	10
1.3 Impacto Ambiental	11
1.4 Preparo da amostra	11
1.5 Análise cromatográfica.....	13
1.6 Objetivos.....	14
2 Parte Experimental.....	14
2.1 Materiais e Reagentes.....	14
2.2 Pontos de coleta das amostras	15
2.3 Extração e pré-concentração da amostra.....	17
2.4 Análise cromatográfica.....	17
3 Resultados e Discussão	18
4 Conclusão	27
Referências	28
Glossário	30

1 Contextualização

1.1 Tintas Anti-incrustantes

O crescimento de microrganismo, plantas e animais é um fenômeno natural denominado bioincrustação que ocorre em todas as superfícies imersas¹. Quando essa incrustação ocorre em navios o aumento do atrito da água com o casco da embarcação acarreta em um maior consumo de combustível e maior custo de operação. Abbott, A. mostrou por meio de suas pesquisas que o custo operacional de uma embarcação pode aumentar em até 77% quando há incrustação².

As tintas anti-incrustantes são pinturas utilizadas para tentar impedir a deposição e crescimento de organismos bioincrustantes em superfícies imersas, o primeiro registro da utilização desse sistema data de dois mil anos atrás, onde os cascos das embarcações eram revestidos com chumbo e uma mistura de óleos de baleia, enxofre e arsênio³. Porém foi apenas no século XX que as denominadas tintas de primeira geração foram criadas, eram tintas feitas a base de óxidos de cobre e zinco que possuíam uma vida útil de apenas um ano, por esse motivo em 1961 começou-se a utilizar as tintas à base de compostos organoestânicos (COEs). Essas tintas conhecidas como segunda geração tinham como principal componente o tributilestanho (TBT) ou o trifenilestanho (TPT). Essas tintas foram utilizadas amplamente até a década de 80 quando começaram a surgir relatos dos problemas ambientais relacionados a toxicidade desses compostos. Devido a essa toxicidade em 2003 começou o processo de banimento desses compostos pela organização marítima internacional (IMO)^{3, 4}.

Apesar das tintas de terceira geração existirem desde 1987³, foi com o banimento das COEs que elas começaram a ser utilizadas como principal agente biocida, essas tintas são baseadas em sua maioria em substâncias orgânicas não metálicas como o diuron Figura 1, irgarol 1051 Figura 2 e o clorotalonil Figura 3. Mesmo não possuindo estanho em sua composição, estudos mostraram que compostos como o Irgarol 1051 são extremamente tóxicos para algas marinhas não alvo⁵, portanto é importante o seu monitoramento em zonas de tráfego intenso de embarcações³.

As Figuras 1 e 2 apresentam as fórmulas estruturais dos compostos diuron e Irgarol 1051.

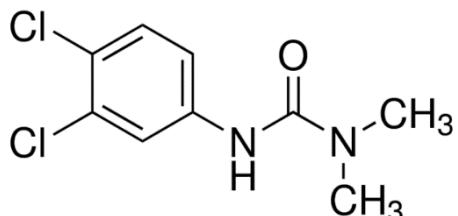


Figura 1. Formula estrutural do Diuron
Fonte: Sigma-Aldrich.

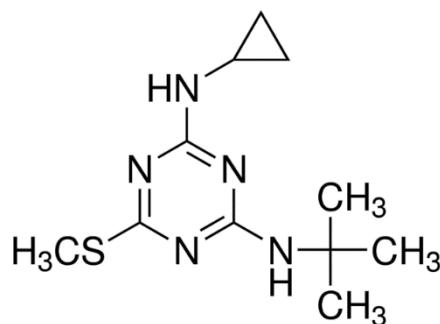


Figura 2. Formula estrutural do Irgarol 1051
Fonte: Sigma-Aldrich

1.2 Clorotalonil

O composto foco deste estudo é o biocida 2,4,5,6-tetracloroisoftalonitrila ($C_8Cl_4N_2$) que possui massa molar de 265,9 g mol⁻¹ também conhecido como clorotalonil Figura 3, um fungicida pertencente à família das isoftalonitrilas, esse composto é foto sensível, ou seja, em presença de luz o seu processo de degradação é acelerado⁶. O clorotalonil é utilizado a mais de 30 anos, principalmente para a agricultura e uso doméstico, chegou a ser um dos fungicidas mais utilizados nos EUA ficando atrás apenas do enxofre⁷, a Figura 3 apresenta a formula estrutural do clorotalonil.

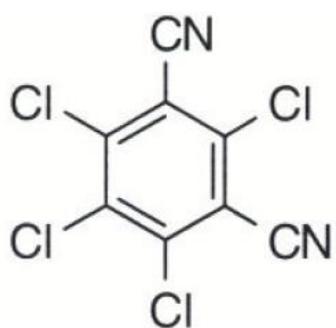


Figura 3. Formula estrutural do Clorotalonil
Fonte: Cox, C.; Anvisa.

1.3 Impacto Ambiental

Efeitos tóxicos de biocidas anti-incrustantes são particularmente evidentes para espécies marinhas. A inibição do crescimento de organismos marinhos em cascos de embarcações é significante em concentrações de até $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb)⁸.

O clorotalonil age principalmente inibindo a ação de enzimas glicolíticas e de respiração do ciclo de Krebs que são dependentes de grupos tiols⁹, acarretando em morte celular. Por causa do seu mecanismo de ação, estudos mostraram que o clorotalonil tem efeitos tóxicos em outras espécies que não são alvo, como a alga *Dunaliella tertiolecta* e o peixe *Pimephales promelas* em concentração de $64\mu\text{g L}^{-1}$ (EC50) e $22,6 \mu\text{g L}^{-1}$ (LC50) respectivamente¹⁰

Devido a seus efeitos, estudos sobre a concentração desses compostos é de extrema importância, porém na América do Sul existem poucos dados da presença desses compostos nas águas do país ou estudos sobre os compostos de degradação sendo que o clorotalonil é fotossensível. Sem esses estudos não é possível criar regras normativas para controle dessas substâncias para evitar possíveis danos permanentes ao meio ambiente, apenas dois anos depois do banimento pela IMO que o Brazil incluiu uma resolução para o controle do TBT (CONAMA Resolução 357 de 2005)¹¹

1.4 Preparo da amostra

A preparação de amostra é a etapa mais importante de um método analítico, é nesta etapa que se encontram a maior parte das fontes de erro em uma metodologia, quando não realizada corretamente os resultados obtidos podem se tornar inexatos e imprecisos.

A metodologia desenvolvida pelo grupo⁶ utiliza-se de cromatografia líquida, técnica que analisa volumes muito pequenos, por esse motivo as amostras precisam passar por um processo de pré-concentração, esse método também facilita a detecção do analito. Quando se utiliza métodos de concentração do analito na própria matriz também se concentra outros compostos que podem vir a interferir na análise,

por isso é necessário o uso de método de extração que remova o analito da matriz estudada.

O princípio da extração líquido-líquido (liquid–liquid extraction - LLE) baseia-se na utilização de dois solventes imiscíveis onde a extração ocorre devida a afinidade do analito nesses dois solventes, porém a eficiência da extração depende principalmente da afinidade do analito pelo solvente de extração, quanto maior for a diferença entre a afinidade matriz/extrator (conhecido como coeficiente de distribuição) melhor será o rendimento da extração.

O método de extração LLE é de simples execução podendo ser feita com equipamentos simples como funis de separação ou béqueres. A Figura 4 apresenta um esquema de extração líquido-líquido.

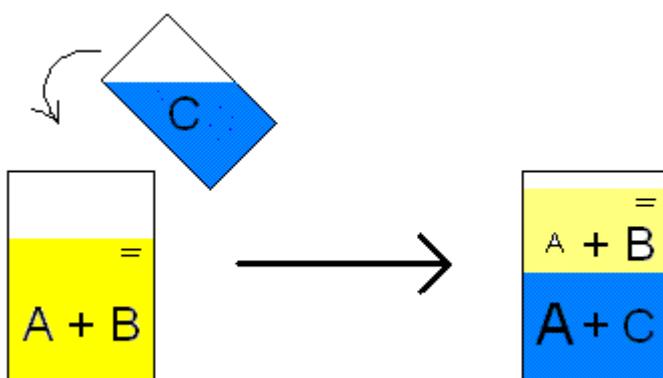


Figura 4 Esquema de extração líquido-líquido Fonte: Wikipedia

De acordo com a ficha de informação de segurança de produtos químicos (FISPQ) o clorotalonil apresenta uma baixa solubilidade em água e alta solubilidade em ciclohexano^{7, 12}, como esse solvente é imiscível com a água ele torna-se um solvente melhor para ser utilizado na extração LLE.

1.5 Análise cromatográfica

O princípio cromatográfico foi desenvolvido no começo do século pelo botânico russo Mikhael S. Tswett que empregou a técnica para separar pigmentos presentes em folhas por meio da passagem de extratos de folha arrastados por éter de petróleo por leitos de carbonato de cálcio, o nome dado a técnica vem do grego *chroma* (cor) e *graphein* (escrever). Em 1993 a IUPAC (international union of pure and applied chemistry) definiu que o termo cromatografia seria definido como: “cromatografia é o método físico de separação no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma das quais estacionária (FE), enquanto a outra se movimenta numa direção definida (fase móvel FM)”¹³.

Pode-se definir a cromatografia em algumas técnicas diferentes, as 3 mais utilizadas são, a cromatografia gasosa, onde tem-se uma fase móvel que é um gás que arrasta o analito (gasoso ou vaporizado) por uma coluna oca, fina e revestida com a fase estacionaria; tem-se a cromatografia de camada delgada, onde a fase estacionária é suportada em uma superfície plana como um papel e a fase móvel se desloca por efeito de gravidade ou capilaridade. O terceiro tipo é a cromatografia líquida onde a fase móvel é um líquido e o analito pode ser um líquido ou pode estar dissolvido na fase móvel, nesse método uma coluna é preenchida com a fase estacionária¹³.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC do seu nome em inglês) é uma técnica similar a cromatografia líquida, nesta técnica a fase estacionária é constituída de um material bastante particulado, aumentando assim a área de contato disponível para o analito interagir. Além disso a coluna encontra-se bastante compactada criando assim um impedimento físico à passagem do solvente da FM, esse impedimento é contornado aplicando-se pressão na fase móvel com o auxílio de uma bomba. Existem vários processos de interação do analito com a fase estacionaria, dependendo das propriedades físico-químicas do composto que queremos estudar escolhe-se a técnica que melhor se aplica para a separação do analito e dos interferentes presentes na solução, nesse projeto utilizamos o processo de adsorção que se baseiam em interações “fracas” entre o analito e os grupos

funcionais que são incorporados na FE, essas interações podem ser eletrostáticas, dipolares ou ligação de hidrogênio^{13, 14}.

Como cada composto tem uma força de interação diferente com os grupos funcionais que se encontram na FE, assim quando a fase móvel arrasta esses compostos pela FE os que tiverem uma força maior são atrasados em relação aos compostos com interação fraca, com o tempo se cria um gradiente de separação cujo os primeiros compostos a serem eluidos são os compostos com interação fraca ou inexistente^{13, 14}.

Para a detecção dos componentes separados em HPLC, normalmente utiliza-se detectores de ultravioleta (UV), em um único comprimento de onda, ou em varredura, lançando mão do arranjo de fotodiodos (DAD), ou ainda, um detector de fluorescência.

1.6 Objetivos

Determinar a concentração do biocida anti-incrustante clorotalonil em amostras de águas do Sistema Estuarino de Santos, de São Vicente, SP e da represa do lobo (Broa) em Itirapina-SP.

2 Parte Experimental

2.1 Materiais e Reagentes

Todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com solução Extran® alcalino à 5%, em seguida enxaguados com água e água livre de compostos orgânicos e em seguida lavados com acetona e secados em estufa à 40°C, vidrarias de medição foram secas ao ar livre.

Para o padrão do clorotalonil foi utilizado produto da Flukar Analytical, pureza 99%; metanol grau cromatográfico (Panreac); acetona grau cromatográfico (Panreac); acetonitrila grau cromatográfico (Tedia Company); ciclohexano (Synth); água ultrapura (Milli-Q), sistema Millipore. Como o padrão de clorotalonil é um composto sólido uma solução estoque foi preparada com concentração de 1000 mg L⁻¹ em

metanol. A partir dessa solução foram preparadas as soluções de trabalho através de diluição, todas as soluções preparadas foram armazenadas em geladeira, protegidas da luz e em temperatura média de 4ºC

Os equipamentos utilizados foram: pHmetro (Hanna Instruments); balança analítica eletrônica, (Shimadzu), faixa de precisão de 0,0001 g; refratômetro manual portátil (Instrutherm); funil de separação de 100 mL (Roni Alzi); balões volumétricos de 5, 10 e 25 mL (Hexitis) e micropipetas com faixas de 0,2 a 200 e de 100 a 1000 µL (HT Lab).

As análises foram feitas utilizando cromatógrafo à líquido de alta eficiência, marca Agilent Technologies, modelo 1200 Series (USA), com desgaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, amostrador automático ALS G1329A, compartimento da coluna termostatizado G1315A e detector de arranjo de diodos G1315D e; Microcomputador, com programa ChemStation, ver. B.03.01, para controle do equipamento e obtenção dos dados. Utilizou-se uma coluna C18, Macherey-Nagel Nucleosil, 150 x 4,6 mm, endcaped, 5 µm de tamanho de partícula.

Quando necessário a água sintética foi preparada com sal marinho comercial da marca Blue Tresure® ficando com salinidade 30 e pH 8,0, o sal foi dissolvido em água ultrapura.

2.2 Pontos de coleta das amostras

O método analítico desenvolvido por Zanuto, G.⁶ é aplicado para águas salgadas, porém como a movimentação de embarcações em lagos e rios também é relevante aplicou-se o método para águas da represa do Broa. As Tabelas 1 e 2 apresentam os pontos de coleta das amostras.

Tabela 1 Local de coleta das amostras de água do Broa

Número da amostra	Descrição do local	Coordenadas do local	Temperatura °C	Horário da coleta
1	Pier USP	S22°10'18" W47°54'3"	24	15:56h
2	Ilate Club	S22°10'46" W47°54'11"	24	16:38h
3	Prainha	S22°10'45" W47°53'22"	24	16:55h

Tabela 2 Local de coleta das amostras de água em Santos *

Número Amostra	Descrição do local	Horário da coleta	T °C	pH	OD, %	Salinidade	Obs
4	Balsa-Ponta da Praia	9:20	22	8,04	33,1 (2,37mg L ⁻¹)	40	
5	Terminal 1	9:36	22,1	8,22	62,4	40	Prox. a navio; Cogel
6	Terminal 2	9:59	22,1	8,27	-	40	Vicente Carvalho; Presença de cracas
7	Terminal 3	10:15	22,2	8,22	47,6	40	Prox. a navio
8	Caisa da Alemao	10:40	21,7	8,20	56	40	
9	São Vicente 1	11:01	22,2	8,09	36,5	30	Ponte Anchieta
10	São Vicente 2	11:25	21,6	8,04	51,6	30	Poção de pesca; Favela México 70
11	São Vicente 3	11:54	21,6	8,11	56	30	Marina;

*Coleta realizada pela doutoranda Lia Gracy Rocha Diniz no dia 06/09/2015

2.3 Extração e pré-concentração da amostra

Para a extração do analito de interesse empregou-se a extração líquido-líquido transferindo-se 50 mL da amostra para um funil de separação de 60 mL e em seguida adicionou-se 5 mL do solvente ciclohexano. A mistura foi agitada manualmente deixando-a descansar até completa separação, a parte orgânica foi coletada e o processo repetido duas vezes.

Foi coletada a fase orgânica e transferida para frascos âmbar de 20 mL que foram colocados em fluxo suave de nitrogênio até secagem completa, em seguida o extrato foi reconstituído com 1 mL de metanol obtendo-se assim um fator de concentração de 50 vezes na amostra/extrato. A Figura 5 mostra um esquema do tratamento da amostra.

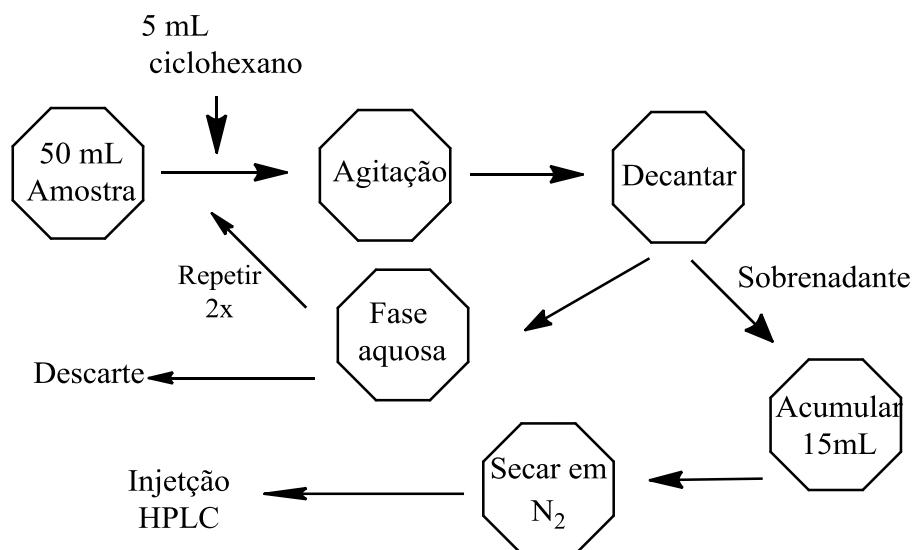


Figura 5 Fluxograma de tratamento de amostra

2.4 Análise cromatográfica

As amostras foram analisadas em cromatógrafo à líquido com coluna de C18 a 25 °C. A fase móvel foi composta pela mistura de acetonitrila e água na proporção de 70/30 com vazão de 1 mL min^{-1} no modo isocrático, com tempo total de análise de 5

min e injeção automática de 10 µL. Para a detecção foi utilizado comprimento de onda de 231nm.

3 Resultados e Discussão

Para a análise das amostras de água coletadas na represa do Broa foi feita uma curva de calibração através da diluição da solução de clorotalonil em soluções de trabalho nas concentrações 0,1; 0,5; 1; 2; 3 e 4 mg L⁻¹, como o processo de extração concentra a amostra em um fator de 50 vezes as concentrações equivalentes na matriz são de 0,002; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06 e 0,08 mg L⁻¹. Os resultados obtidos na análise por HPLC são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 Dados para a construção da curva de calibração para amostras de água coletadas do Broa.

Conc. mg/L	Área do Pico (mAU.S)	Média Área	Desvio padrão % da Área	Tempo Retenção	Média Tempo
0,1	8,458	9,735	12,617	3,591	3,622
	10,908			3,624	
	9,838			3,65	
0,5	60,2626	55,834	7,047	3,654	3,651
	52,7424			3,651	
	54,496			3,648	
1	114,119	113,238	3,25	3,647	3,646
	109,198			3,644	
	116,398			3,646	
2	209,57	209,356	0,1	3,64	3,635
	209,337			3,633	
	209,161			3,631	
3	257,709	256,567	0,62	3,633	3,633
	257,24			3,633	
	254,753			3,634	
4	373,106	372,746	0,09	3,632	3,634
	372,468			3,633	
	372,663			3,637	

Para melhor visualização dos resultados, os valores obtidos foram plotados em um gráfico, Figura 6, com esses dados observou-se que uma equação que relaciona a concentração com a área do pico cromatográfico pode ser descrita como:

$$Y = 13,9774 + 88,6205 * 50 * C \text{ (mg L}^{-1}\text{)} \quad \text{Equação 1}$$

O fator de 50 vezes já é considerado na equação assim, ao colocar-se um valor de área de pico (Y) encontra-se diretamente a concentração (C) do biocida na matriz original, antes da extração. A equação apresenta um bom fator de linearidade R^2 0,984, esse fator indica o quanto linear é a relação entre a área e a concentração. Segundo a ANVISA¹⁵ valores acima de $R^2 = 0.99$ são considerados aceitáveis

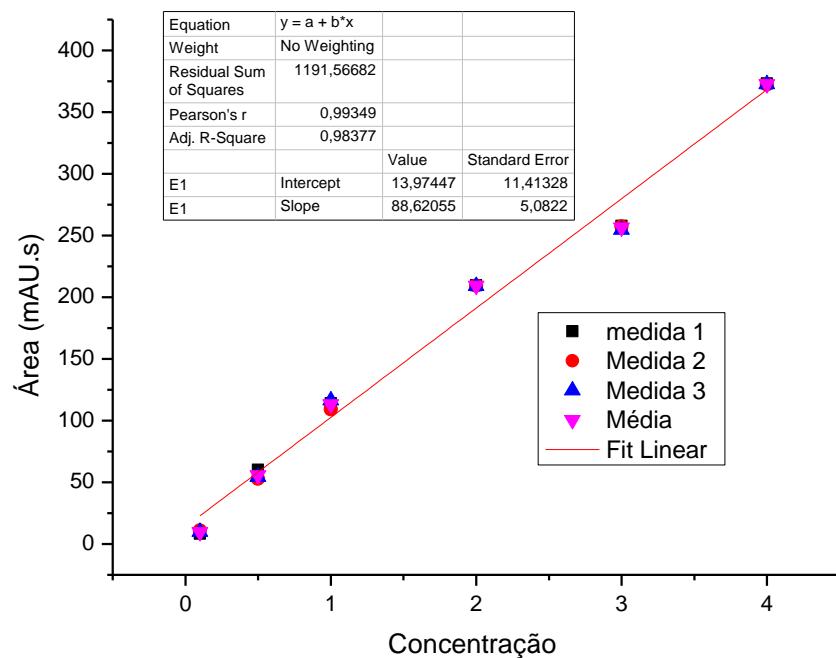


Figura 6 Gráfico da curva analítica em água doce.

A partir da curva analítica pode-se analisar as amostras para determinar a concentração do biocida, e avaliar se algum contaminante presente na matriz influenciam o resultado. Foram fortificadas três amostras com concentração conhecida de 0,5; 2 e 4 mg L⁻¹ do clorotalonil antes de ser feita a extração. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Resultados das amostras do Broa.

Amostras	Área do pico (mAU.s)			Desvio padrão dos valores de área	Tempo de retenção (min.)		
	1	2	3		3,665	3,660	3,655
1	0,78	1,68	0,8	47,3	3,648	3,639	3,637
2	1,029	0,547	1,027	32	3,639	3,708	3,638
3	0,788	1,218	1,07	21,31	3,635	3,65	3,652
Fortificada 1 (0,5 mg L ⁻¹)	38,06	38,46	39,42	4,99	3,353	3,647	3,642
	39,04	42,12	42,7		3,639	3,636	3,633
Fortificada 2 (2 mg L ⁻¹)	124,035	124,09	121,233	1	3,639	3,636	3,639
	122,94	123,3	120,251		3,633	3,636	3,639
Fortificada 3 (4 mg L ⁻¹)	291,608	280,66	264,3	4,38	3,632	3,651	3,636
	291,822	279,73	264,5		3,644	3,65	3,654
Branco	1,19	1,337	1,364	7,81			

Observa-se que, nas amostras fortificadas obteve-se valores baixos de desvio padrão, isso significa que o valor de área de cada replicata não variou muito quando comparadas com a média, conforme observa-se para valores mais baixos de área.

Pela Figura 7 é possível notar que as amostras fortificadas apresentam um padrão linear. Assim pode-se utilizar o valor da média das áreas na equação 1 para determinar a concentração do biocida encontrada pelo método, Tabela 5.

Tabela 5 Concentração do clorotalonil presente nas amostras fortificadas

Concentração de clorotalonil adicionada	Área encontrada	Concentração encontrada
0,5	40,057	0,294
2	122,642	1,226
4	278,820	2,99

Quando se analisa os resultados percebe-se que a concentração encontrada foi baixa, o valor da recuperação foi apenas de 61% em média. A recuperação do método quando utilizado em água salgada é de 90%⁶. Recuperação com baixo valor pode significar que o analito possui mais afinidade com a água doce. Pode ser que a presença de sais dissolvidos em água do mar diminui a interação do clorotalonil com a água, quando sais estão presentes na água pode ocorrer a saturação da mesma, e dessa forma o analito passa a ter preferência pela fase orgânica facilitando assim a extração com o solvente ciclohexano. Como a água doce não possui tantos sais dissolvidos a afinidade pela água é maior e com isso a extração é menos eficiente A Figura 7 apresenta os resultados para as amostras fortificadas.

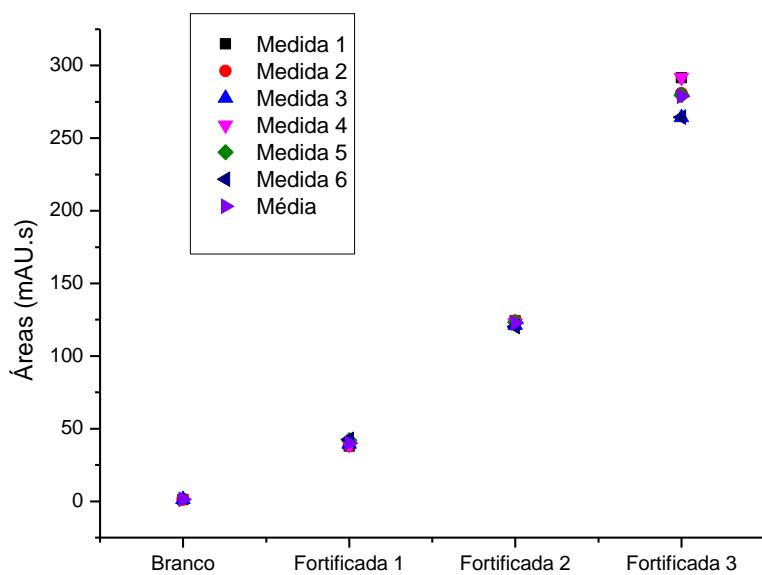


Figura 7 Gráfico das áreas do pico cromatográfico das amostras de água do Broa fortificadas.

A Figura 8 apresenta a área dos picos cromatográficos referentes ao clorotalonil presente nas amostras de água coletadas do Broa. Observa-se que o valor obtido para o desvio padrão é alto, chegando a 47%. Esse alto valor de desvio padrão ocorre porque as concentrações observadas para as amostras de água do Broa encontram-se abaixo do limite de detecção do equipamento.

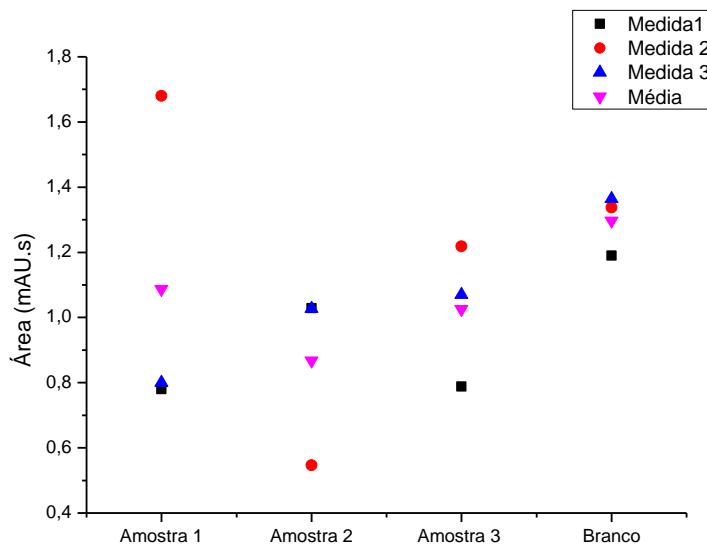


Figura 8 Gráfico das áreas de pico cromatográfico das amostras de água do Broa

Apesar do método ter sido desenvolvido para águas do mar ele não apresentou resultados ruins quando utilizado para águas doces, já as amostras de água coletadas na lagoa do Broa não apresentaram concentração apreciável do biocida estudado.

Para analisarmos as amostras de água coletadas em Santos foi feita uma curva de analítica de modo similar a curva construída para as amostras de água doce, os valores obtidos para a curva são apresentados na Tabela 6 e na Figura 9.

Tabela 6 Dados para a curva analítica para as amostras de água coletadas em Santos

Concentração (mg L^{-1})	Média Área do pico cromatográfico (mAU.s)
0,1	10,744
0,5	54,798
1	110,221
2	215,455
3	256,451
4	380,981

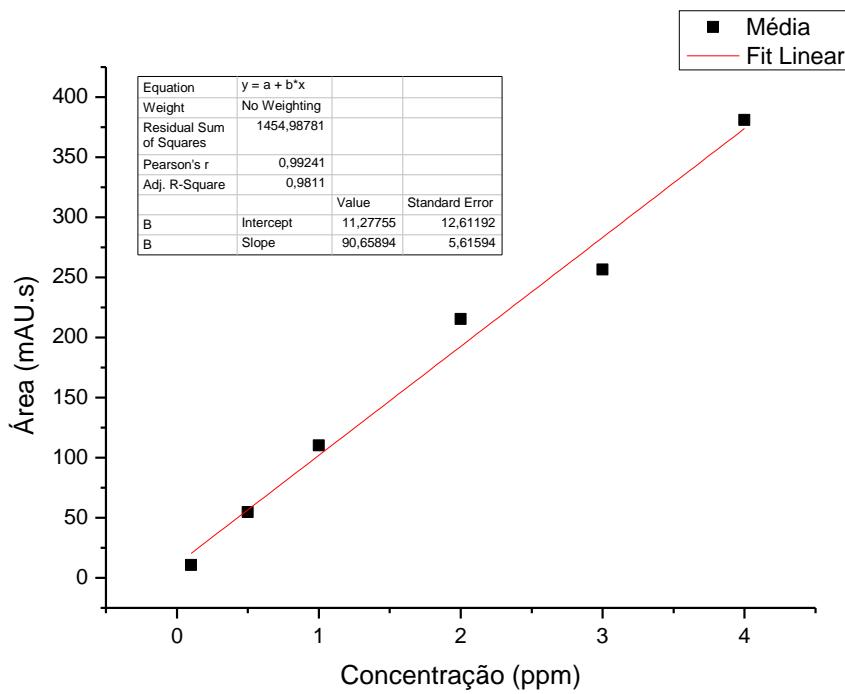


Figura 9 Curva analítica para as amostras de água de Santos

Com o auxílio dos dados contidos no gráfico consegue-se determinar a relação entre a área e a concentração por meio da equação 2 que apresentou um fator de linearidade de R^2 0,98; com essa equação permite-se analisar a concentração de clorotalonil encontrado nas amostras de água coletadas em Santos, Tabela 7.

$$Y = 11,2778 + 90,659 * C * 50 \text{ (mg L}^{-1}\text{)} \quad \text{Equação 2}$$

Tabela 7 Área e tempo de retenção das amostras de água coletadas em Santos.

Amostras	Área do pico (mAU.s)			Desvio padrão	Tempo de retenção (min.)		
4	0,9764	5,6962	6,555	68,124	3,641	3,637	3,634
5	2,99	3,7	0,968	55,53	3,637	3,643	3,634
6	3,027	2,109	4,964	43,29	3,615	3,644	3,647
7	1,044	0,829	2,654	66,09	3,644	3,638	3,636
8	1,452	2,043	0,798	43,51	3,632	3,642	3,639
9	1,612	1,445	1,07	20,18	3,644	3,641	3,642
10	0,676	1,046	2,131	60,15	3,632	3,643	3,634
11	0,501	1,22	0,441	58,88	3,615	3,624	3,596
Padrão	98,628	99,1387	100,017	0,71	3,613	3,614	3,614
Branco	0,718	0,724	0,676	3,7	3,643	3,638	3,619

Pela área do pico referente ao padrão a equação demonstra que a concentração equivalente de biocida clorotalonil é de $0,978 \text{ mg L}^{-1}$. Considerando que a solução do padrão foi feita com uma concentração de 1 mg L^{-1} , então a recuperação do método foi de 97,8%. A Figura 10 apresenta as áreas dos picos cromatográficos relativo as amostras de água coletadas de Santos, observa-se que novamente a concentração do biocida clorotalonil ficou abaixo do limite de detecção do método.

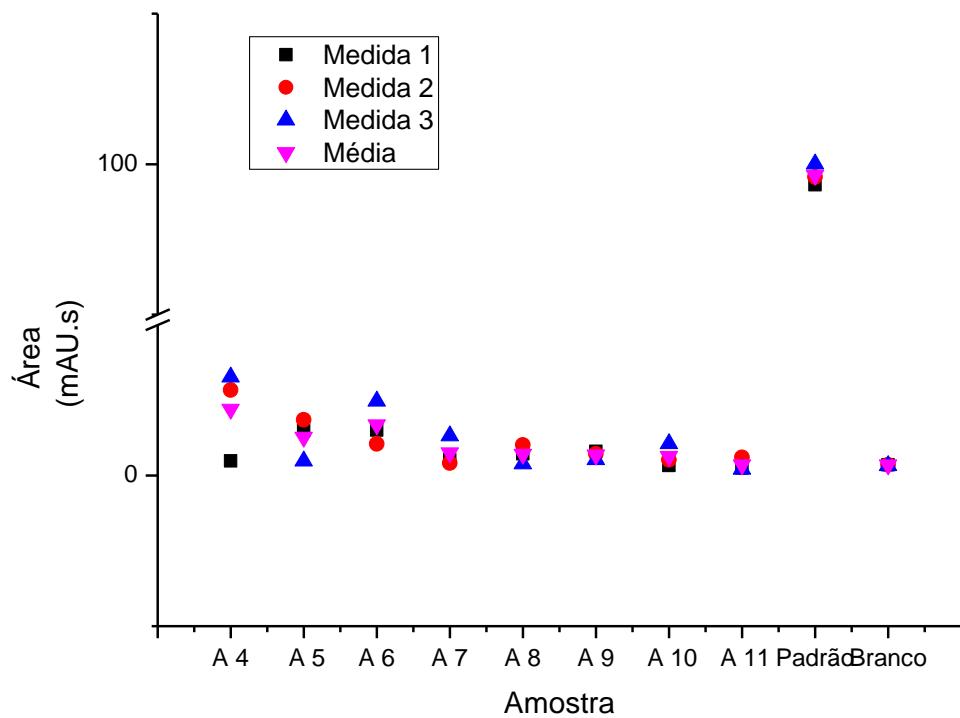


Figura 10 Valores de área de pico cromatográfico para as amostras coletadas de água em Santos.

Pelo método utilizado neste estudo não foi possível detectar o biocida clorotalonil, Figura 10, tanto em amostras de água de Santos quanto nas amostras coletadas do Broa. As baixas concentrações podem ser causadas pelo fato do biocida clorotalonil ser degradado pela ação da luz além de possuir baixa solubilidade em água.

4 Conclusão

O método de determinação do biocida clorotalonil foi desenvolvido para a análise de água salgada, mas o método foi aplicado para amostras de água doce coletadas na lagoa do Broa em Itirapina-SP. Os resultados obtidos foram satisfatórios, apesar da recuperação ter sido apenas de 61% e fator de linearidade de 0,984. O método apresentou-se promissor na análise de águas doces, sendo que algumas adaptações devem ser feitas para que ele se torne adequado para a análise desse tipo de matriz.

O biocida clorotalonil não foi detectado pelo método analítico utilizado nesse estudo, tanto nas amostras de águas da represa do Broa quanto nas coletadas em Santos. Para averiguar a presença dessa substância nas amostras se faz necessário a utilização de equipamentos mais sensíveis, além de uma modificação no método para que ele possua um maior fator de concentração. Essas modificações se fazem necessárias devido ao fato do clorotalonil possuir baixa solubilidade em água e ser degradado pela luz.

Referências

- 1 Guardiola, F. A.;Cuesta, A.;Meseguer, J. and Esteban, M. A. Risks of using antifouling biocides in aquaculture. **International Journal of Molecular Sciences**, V 13, 1541-1560, 2012.
- 2 Abbott, A.;Abel, P. D.;Arnold, D. W. and Milne, A. Cost–benefit analysis of the use of TBT: the case for a treatment approach. **Science of the Total Environment**, V 258, 1–2, 5-19, 2000.
- 3 Castro, I. B.;Westphal, E. and Fillmann, G. Third generation antifouling paints: New biocides in the aquatic environment. **Química Nova**, V 34, 6, 1021-1031, 2011.
- 4 Almeida, E.;Diamantino, T. and de Sousa, O. Brief history of antifouling paints. **Corrosão e Proteção de Materiais**, V 26, 1, 6-12, 2007.
- 5 Basheer, C.;Tan, K. S. and Lee, H. K. Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, V 44, 7, 697-703, 2002.
- 6 Zanuto, G. M. Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para análise do biocida anti-incrustante clorotalonil em água marinha. Monografia. Instituto de Química de São Carlos Universidade de São Paulo, 2015
- 7 Cox, C. Chlorothalonil. **JOURNAL OF PESTICIDE REFORM**, V 17, 4, 14-20, 1997.
- 8 Caux, P. Y.;Kent, R. A.;Fan, G. T. and Stephenson, G. L. Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, V 26, 1, 45-93, 1996.
- 9 Long, J. W. and Siegel, M. R. Mechanism of action and fate of the fungicide chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) in biological systems: 2. In vitro reactions. **Chemico-Biological Interactions**, V 10, 6, 383-394, 1975.
- 10 Arai, T.;Harino, H.;Ohji, M. and Langston, W. J. **Ecotoxicology of antifouling biocides**:Ecotoxicology of Antifouling Biocides.Springer Japan, 2009,
- 11 CONSELHO_NACIONAL_DO_MEIO_AMBIENTE_(CONAMA), Resolução N. 357, 2005, **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**, Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, 58-63, Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> Acesso em 18/11/2015

12 Planitox, **FISPQ Clorotalonil**, Disponível em:
https://www.extrapratica.com.br/BR_Docs/Portuguese/FISPQ/Chlorothalonil%20T%C3%A9cnico.pdf Acessado em: 18/11/2015

13 COLLINS, C. H.;BRAGA, G. L. and BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**.Campinas:Editorada Unicamp, 2006, 453

14 Skoog, D. A.;Holler, F. J. and Crouch, S. R. **Principles of instrumental analysis**.Australia:Brooks/Cole : Thomson Learning, 2007,

15 Sanitária, A.-A. N. d. V., Resolução N. 899, **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**, Publicada no D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003,

Glossário

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária.

Analito – Substância ou componente químico, em uma amostra, que é alvo de análise em um ensaio.

Biocida – Substância que possua ação letal sobre organismos vivos.

Bioincrustação – Acúmulo indesejável de micro-organismos, plantas, algas e/ou animais sobre as estruturas molhadas.

COEs – Compostos organoestânicos.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente.

FE – Fase estacionária.

FM – Fase móvel.

HPLC – High performance liquid cromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência).

IMO – International Marine Organization (Organização Marítima internacional).

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de química pura e aplicada)

LLE – Liquid-liquid Extraction (Extração líquido-Líquido).

Matriz – Todos os constituintes da amostra com exceção dos analitos.

OD% - Porcentagem de oxigênio dissolvido na água.

PPB – Parte por bilhão $\mu\text{g L}^{-1}$

PPM – Parte por milhão mg L^{-1}

TBT – Tributilestanho.

TPT – Trifenilestanho.