



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA E LIMNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

DANIEL RICHARD LEMOS BRITO

**TOXICIDADE DOS BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DCOIT E
DICLOFLUANIDA PARA A *Testraselmis chuii* (Clorófitas)**

São Luís, MA/2022

DANIEL RICHARD LEMOS BRITO

**TOXICIDADE DOS BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DCOIT E
DICLOFLUANIDA PARA A *Tetraselmis chuii* (Clorófito)**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Grau de Bacharel em Oceanografia.

Orientador (a): Dra. Marianna Basso Jorge.

Coorientador (a): MSc. Débora Carolina Costa
Privado

São Luís, MA/2022

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

Lemos Brito, Daniel Richard.

TOXICIDADE DOS BIOCIDAS ANTIINCRUSTANTES DCOIT E
DICLOFLUANIDA PARA A CLOROFITA TETRASILMIS CHUII / Daniel
Richard Lemos Brito. - 2022.

31 f.

Coorientador(a): Débora Carolina Costa Privado.

Orientador(a): Marianna Basso Jorge.

Monografia (Graduação) - Curso de Oceanografia,
Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2022.

1. CLOROFIA A. 2. CRESCIMENTO ALGAL. 3. MICROALGAS
MARINHAS. 4. PESTICIDA. 5. VIABILIDADE CELULAR. I.
Basso Jorge, Marianna. II. Costa Privado, Débora
Carolina. III. Título.

DANIEL RICHARD LEMOS BRITO

**TOXICIDADE DOS BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DCOIT E
DICLOFLUANIDA PARA A *Tetraselmis chuii* (Clorófitas)**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Grau de Bacharel em Oceanografia.

Orientador (a): Dra. Marianna Basso Jorge.

Monografia aprovada em: 11/01/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Marianna Basso Jorge (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia (BICT)

Prof.^a Dra. Talita da Silva Espósito
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Departamento de Oceanografia e Limnologia (DEOLI)

Prof. Dr. Marco Valério Jansen Cutrim
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia (BICT)

São Luís, MA. / 2022

Dedico este trabalho em primeiro lugar a minha mãe, pois não mediu esforços, nada para que eu pudesse ter uma boa educação, a minhas duas irmãs e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente antes de tudo a Deus por cada fôlego de vida que me deu, pela fé e força, por cada pessoa que ele colocou na vida, para que de alguma forma me ajudasse nessa vida acadêmica que foi muito conturbada.

Agradeço a Universidade Federal do Maranhão e ao Departamento de Oceanografia e Limnologia e o curso de BICT pela infraestrutura dada e pelo conhecimento passado através dos professores e pela FAPEMA por cada bolsa cedida.

A professora Dra. Marianna Basso Jorge pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Ecotoxicologia (LabEcotox), por me orientar, pelas importantes contribuições científicas e profissionais, por confiar e ter me dado experiências de iniciações científicas durante esses anos, por ter aceitado minha inexperiência e confiado a mim este trabalho, obrigado por ter me aguentado desde 2017 no laboratório, por ser minha professora maravilhosa, por ser amiga, pelos conselhos, puxões de orelha e paciência, não tenho palavras para agradecer. Te amo mil, você será inesquecível.

Aos professores Marco Valério e Francisco José junto a Marianna Jorge pela ajuda, sem vocês eu não teria a experiência maravilhosa de estagiar no projeto lindo que é o Coral Vivo e ao Prof Ricardo Luvizotto também por todo ensinamento, obrigado por essa ajuda, nunca irei esquecer, todos vocês moram aqui no meu coração, obrigado pelos papos, conversas, conselhos e por me ensinar tanto na graduação.

A minha Coorientadora e amiga mestra Débora Carolina Costa Privado por toda ajuda durante os experimentos, por me ensinar tudo sobre as microalgas, tudo o que eu precisava para poder concluir minha monografia, só tenho que agradecer você também amiga.

A rainha da minha vida, minha mãe Carmem Almeida de Lemos que me educou, sempre me apoiou em tudo, apesar de todas as dificuldades que passamos, nunca deixou nada falta, sempre se esforçou para dar tudo, mesmos sendo pouco, eu amo você demais mãe. As minhas irmãs (Lizandra Brito e Liziane Brito) que me acompanharam nessa etapa da minha vida, sempre estavam ali me escutando, me aconselhando, acreditando e me ajudando de todas as formas possíveis, obrigado maninhas, amo vocês.

As amigas que sempre foram minha força na universidade, Paty (minha carne) amiga obrigado mesmo por ser minha amiga/irmã desde o ensino médio e de nunca ter soltado minha mão, Jacyara Correa e Thamires Torres por sempre confiar em mim, me

ajudado, ensinado tantas coisas, Lis maria não tenho nem palavras para te agradecer, você foi uma força pra mim, obrigado por tanto amiga, Jessica Araújo pela grande amizade, Ana Paula Tubarão e Gabis meus companheiros antigos do Lab, obrigado por me ajudarem tanto, pelos sorrisos, pela força, Thiago moreno por me ajudar, Juliana Aguiar e Kassandra Borges amo vocês nossa, Denise e Ju Borba, amigas obrigada por cada puxão de orelha, conselhos, avisos e pela amizade, Girlene Garcia minha amiga do início de curso, obrigado, Karla Guterres, Marcelly, Kalyne Cardoso, Monica Padilha, Alef Fontineli vocês são demais, me divertiam nos piores momentos, (Bonde das nectônicas: Fernanda marques, Yasmin Dutra, Yarinha por me ajudarem tanto no início do curso), Itala minha companheira de Lab, obrigado por tanto, Sarah Livia, Paula Melo, (Karol Duarte, Lisana Cavalcante, Taiza e Queidy minhas amigas do Labfic, que sempre estavam ali me alegrando, que me ajudaram muito durante minha escrita), a minha vizinha Dona Diana Guimarães, por todo apoio, ajuda e conselhos, aos amigos e colegas do Labecotox e do curso de oceanografia, agradeço a todos pelos bons momentos, sorrisos, alegrias, tristezas que passamos e pela troca de conhecimento durante a minha trajetória no curso.

As minhas amigas Thayná Santana e Camila Nogueira que estão comigo desde o ensino médio, obrigado pela amizade, contribuições e palavras de apoio e incentivo em toda reta, desde o início ao final do curso.

E agradeço a todos que de alguma forma me ajudou nessa etapa longa da minha vida, pois nem tudo foi só alegria e flores. Os choros, tristeza me fizeram mais forte.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>Tetraselmis chuii</i>	15
Figura 2. Esquema ilustrativo dos ensaios ecotoxicológicos realizados com DSS, DCOIT e Diclofluanida.....	16
Figura 3. A: fixação das células com lugol; B: Microscópio usado para a análise; C: Câmara de Neubauer; D: Grade de Contagem.....	17
Figura 4. A: Centrifugadora (Centribio); B: Adição do Metanol (Isofar); C: Espectrofotômetro usado para a análise da clorofila <i>a</i>	18
Figura 5. Viabilidade das células viáveis e não viáveis de <i>T.chuii</i> pelo método de VN. As células circuladas de verde são viáveis e as circuladas de vermelhos não são viáveis.....	18
Figura 6. Carta-controle com valores de CE ₅₀ -72h para cada ensaio com a <i>T.chuii</i> exposta ao DSS, assim como a média geral da CE ₅₀ -72h e o intervalo de confiança ($\pm 2\sigma$) dos 5 ensaios (n =5).....	19
Figura 7. Valores médios de inibição do crescimento celular da microalga <i>T.chuii</i> após exposição de 72 horas aos biocidas DCOIT (A) e Diclofluanida (B).....	20
Figura 8. Valores médios de inibição da concentração de clorofila <i>a</i> da microalga <i>T.chuii</i> após exposição de 72 horas aos biocidas DCOIT (A) e Diclofluanida (B).....	21
Figura 9. Viabilidade celular das microalgas após exposição aos biocidas DCOIT (A) e Diclofluanida (B). Dados expressos em médias e desvio padrão. * indica valor significativamente diferente do controle (Tukey, p<0,05).....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. CE50 do biocida DCOIT em microalgas marinhas após 72h de exposição.....	24
--	----

RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares, fotossintetizantes que vivem dispersos na coluna d'água, o fitoplâncton, que são a base da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos. São organismos de extrema importância ambiental, estando entre os mais recomendados para avaliação da toxicidade aquática (aguda ou crônica), pois fornecem informações sobre possíveis alterações quali-quantitativas das populações, tornando-se importantes no monitoramento ambiental. Dentre as substâncias que podem causar toxicidade aos organismos aquáticos destacam-se os biocidas contidos em sistemas anti-incrustantes, que são amplamente utilizados na indústria marítima, assim como na agricultura. Sendo assim, para avaliar o efeito desses biocidas sobre a base da cadeia trófica, a espécie de microalga marinha *Tetraselmis chuii* foi exposta cronicamente (72h) a dois biocidas (DCOIT e Diclofluanida) que compõem as tintas anti-incrustantes de última geração. Para tanto, foram feitos ensaios com a substância de referência dodecil sulfato de sódio (DSS) para avaliar a sensibilidade das cepas e construir cartas controle para a espécie, além dos ensaios com os biocidas. As microalgas foram então, expostas a um gradiente de concentrações para o DCOIT (10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$), e para a Diclofluanida (200 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$), além do controle somente com meio de cultivo F/2, e controle solvente (com F/2 e DMSO). De acordo com análises de densidade algal e clorofila *a*, foi possível observar que a microalga testada é sensível ao DCOIT e resistente a Diclofluanida. Entre os parâmetros de efeitos avaliados, pode-se identificar o crescimento algal como sendo a resposta mais sensível do organismo, seguido da clorofila *a* e viabilidade celular. Sendo assim, conclui-se que apesar da rápida degradação do DCOIT no ambiente, ele ainda é tóxico às microalgas em baixas concentrações e que o crescimento algal seria a análise mais indicada para avaliar efeitos em testes de toxicidades voltados para o monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Pesticidas, Microalgas Marinhas, Clorofila *a*, Viabilidade Celular, Crescimento Algal

ABSTRACT

Microalgae are unicellular, photosynthetic organisms that live dispersed in the water column, phytoplankton, which are the basis of the food chain of aquatic ecosystems. They are organisms of extreme environmental importance, being among the most recommended for the assessment of aquatic toxicity (acute or chronic), as they provide information on possible qualitative and quantitative changes in populations, making them important in environmental monitoring. Among the substances that can cause toxicity to aquatic organisms, biocides contained in antifouling systems stand out, which are widely used in the maritime industry, as well as in agriculture. Therefore, to evaluate the effect of these biocides on the base of the trophic chain, the marine microalgae species *Tetraselmis chuii* was chronically exposed (72 h) to two biocides (DCOIT and Dichlofluanid) that make up the latest generation antifouling paints. To this end, assays were performed with the reference substance sodium dodecyl sulfate (DSS) to assess the sensitivity of the strains and build control charts for the species, in addition to assays with biocides. The microalgae were then exposed to a concentration gradient for DCOIT (10 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$), and for Dichlofluanid (200 and 600 $\mu\text{g L}^{-1}$), in addition to the control only with F/2 culture medium, and solvent control (with F/2 and DMSO). According to algal density and chlorophyll a analyses, it was possible to observe that the tested microalgae are sensitive to DCOIT and resistant to Dichlofluanid. Among the parameters of effects evaluated, we can identify algal growth as the most sensitive response of the organism, followed by chlorophyll a and cell viability. Therefore, it is concluded that despite the rapid degradation of DCOIT in the environment, it is still toxic to microalgae at low concentrations and that algal growth would be the most suitable analysis to evaluate effects in toxicity tests aimed at environmental monitoring.

Keywords: Pesticides, Marine Microalgae, Chlorophyll a, Cell Viability, Algae Growth

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Cultivo e Manutenção da Microalga	14
3.2. Construção da Carta Controle com a Substância de Referência (Dodecil Sulfato de Sódio)	15
3.3. Ensaio Ecotoxicológicos	16
3.4. Análises de densidade algal, clorofila <i>a</i> e viabilidade celular	17
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Carta Controle	20
4.2. Efeito dos Biocidas sobre o crescimento algal	20
4.3. Efeito dos biocidas na concentração de clorofila <i>a</i>	21
4.4. Viabilidade Celular	22
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

O uso e a ocupação desenfreados dos ambientes aquáticos associados ao despejo de efluentes industriais, agrícolas e urbano vem contaminando esses ambientes de forma rápida, podendo trazer perda de habitats e biodiversidade (Baptista Neto, Wallner- Kerssanach e Patchineelam, 2008; Castello et al., 2015). Sabe-se que existem vários contaminantes orgânicos com potencial letal ou subletal aos organismos aquáticos, dentre eles os biocidas, que são utilizados como princípios ativos em sistemas anti-incrustantes. A aplicação dessas tintas serve como sistema de proteção em estruturas submersas e embarcações, com a finalidade de evitar a formação e o estabelecimento de organismos bioincrustantes.

A bioincrustação nada mais é que a colonização sucessiva de microrganismos em qualquer superfície sólida, natural, artificial, viva ou morta. No caso das embarcações os efeitos causados pela bioincrustação são: aumento no consumo de combustível, redução da velocidade, aumento da resistência ao atrito, aumento do peso do navio, perdas de eficiência da navegação e de atuação de mecanismos e sensores (Yebra et al., 2004). Devido aos prejuízos financeiros, com operações de manutenção e prevenção, há uma grande busca por soluções econômica e ecologicamente viáveis para evitar problemas causados pela bioincrustação (Silva, 2020), tais como o uso de tintas anti-incrustantes com composição química específica para evitar a bioincrustação.

Sendo assim, compostos como metais pesados, arsênio, chumbo, mercúrio e cobre foram os primeiros a serem utilizados na composição das tintas anti-incrustantes com a finalidade de evitar a bioincrustação em cascos de navios, e por isso foram classificados como anti-incrustantes da primeira geração (Santos, 2021). Com o passar do tempo, esses compostos foram proibidos devido aos riscos que apresentavam ao meio ambiente, com exceção do cobre, que ainda é permitido (Santos, 2021). Após a década de 50, foi agregado a várias formulações de revestimento anti-incrustantes um potente biocida de ampla visagem, o tributilestanho (TBT), que foi classificado como anti-incrustantes de segunda geração (Szeto et al., 2020). Entretanto, na década de 70, foram verificados os primeiros efeitos tóxicos do TBT a espécies de organismos

aquáticos que não estão diretamente associados ao processo de Bioincrustação, sendo seu uso proibido a partir de setembro de 2008 (Han et al., 2021).

No entanto, tendo em vista a necessidade crescente de desenvolver estratégias inovadoras para prevenir a deterioração da estrutura marinha, bioincrustação e ao mesmo tempo, de diminuir o impacto no ambiente marinho, surgem as tintas de terceira geração (Santo, 2021). Essa geração de tintas é composta por moléculas orgânicas (biocidas), livre de organoestânicos, e são atualmente utilizadas no mundo inteiros após homologação da Organização Marítima Internacional (IMO). São elas: Clorotalonil, Diuron, Irgarol, Tiram, Ziram, DCOIT, Diclofluanida, TPBP, Cobre piritiona, Óxido cuproso, Tiocianato cuproso, TCMTB (Busan), Densil, Maneb, Zinco piritiona, e Naftenato cúprico (Fernandez e Pinheiro, 2007).

O DCOIT (4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one) é um biocida do grupo dos isotiazóis (Fernández-Alba et al., 2002), que possui baixa solubilidade em água (0,0065mg/L) (Takahashi, 2009), elevada taxa de degradação na coluna d'água (8,5 dias) e elevado coeficiente de partição octanol-água (log K_{oc} de 4,2), característico de compostos lipofílicos com tendência a bioacumulação na biota (Callow, 1996). Já a Diclofluanida é um organoclorado que apresenta baixa solubilidade em água (0,006 mg/L) (Hamwijk et al., 2005) e, conseqüentemente, grande afinidade pelo sedimento e material particulado (Thomas e Langford, 2009).

Castro et al (2011), em uma revisão sobre as tintas anti-incrustantes de terceira geração, apresentaram dados toxicológicos de diversos biocidas a biota aquática. Dentre os organismos testados, os que sofreram os maiores efeitos tóxicos foram a alga *Skeletonema costatum* exposta ao Irgarol 1051 (CL₅₀ 120h = 0,43 µg/L), DCOIT (CL₅₀ 96h = 13,9 µg/L) e TPBP (CL₅₀ 72h = 2,2 µg/L), a alga *Dunaliella tertiolecta* exposta ao Diuron (CL₅₀ 96h = 0,7 µg/L), o peixe *Pimephales promelas* exposta ao Clorotalonil (CL₅₀ 96h = 22,6 µg/L), a bactéria *Vibrio fisheri* exposta a Diclofluanida (CL₅₀ 15 min = 15,7 µg/L), o peixe *Oncorhyncus mykiss* exposto ao Tiram (CL₅₀ 60dias= 0,64 µg/L) e Ziram (CL₅₀ 60dias= 1,5 µg/L), e o crustáceo *Daphnia magna* exposto ao TCMTB (CL₅₀ 48h = 6,8 µg/L), evidenciando a sensibilidade das microalgas a alguns compostos.

As microalgas fazem parte de um grupo muito heterogêneo de organismos. São aquáticas, geralmente unicelulares, microscópicas, podendo formar colônias, e possuem pouca ou nenhuma diferenciação celular (Schmitz et al., 2012). As cores características devem-se a existência de pigmentos e mecanismos fototróficos (presença de clorofila em cloroplastos), responsáveis pela fotossíntese (Hoek et al., 1995). A composição bioquímica das microalgas, lipídeos, carboidratos e concentração total de proteínas, podem variar com as espécies e com as condições de cultivo, como temperatura, a intensidade da luz, agitação, nutrientes, pH e fase de crescimento (Brown et al., 1997; Miao e Xu, 2004). Compõem, juntamente com outros organismos fotossintetizantes, que vivem dispersos na coluna d'água (cianofíceas), o fitoplâncton, que são a base da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos (Nybakken, 2001). Além disso o fitoplâncton é capaz de absorver 1,8 Gt/ano de carbono através do processo de fotossíntese (Hallegraeff, 2010) e produzem cerca de 50% do oxigênio da terra (ONU, 2012). Sendo assim, são organismos de extrema importância ambiental, estando entre os organismos mais recomendados para avaliação de toxicidade aquática (aguda ou crônica), pois fornecem informações sobre possíveis alterações quali-quantitativas das populações, tornando-se importantes no monitoramento ambiental (Aragão e Araújo, 2006).

A microalga *T.chuii* é uma alga marinha unicelular, pertencente ao filo Chlorophyta, a Classe Prasinophyceae, Ordem Chlorodendrales e Família Chlorodendraceae (Hoek et al., 1995; Tomaselli, 2004). Possuem 4 flagelos, apresentando alta mobilidade, abundância e frequência de ocorrência nos ambientes marinhos (Davarpanah e Guilhermino, 2015), sendo assim muito utilizadas em cultivo de larvicultura (Laing e Ayala, 1990) e em ensaios ecotoxicológicos (Rodrigues e Rodrigues, 2006).

A ecotoxicologia aquática é uma importante ferramenta de monitoramento ambiental utilizada para prevenção e mitigação de impactos ambientais. De acordo com Azevedo e Chasin (2003), a ecotoxicologia estuda a interação dos organismos com os agentes tóxicos presentes no ambiente, permitindo a identificação de respostas biológicas associadas aos impactos dos mesmos. Sendo assim, no presente estudos serão investigados os efeitos e a sensibilidade da microalga marinha *T.chuii* aos

biocidas DCOIT e Diclofluanida empregados em tintas anti-incrustantes através de testes de toxicidade crônica segundo a norma da ABNT NBR 16181:2013 (ABNT, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a toxicidade crônica dos biocidas anti-incrustantes DCOIT e Diclofluanida para a clorófito *T. chuii*.

2.2. Objetivos específicos

- Construção da carta controle para avaliar a qualidade e sensibilidade dos cultivos;
- Determinar a CE_{50} (concentração de efeito observado em 50% dos indivíduos expostos), após 72h de exposição às diferentes concentrações dos biocidas;
- Determinar o efeito dos biocidas sobre a taxa de crescimento, viabilidade celular e teores de clorofila *a* da microalga, após 72h de exposição às diferentes concentrações dos biocidas;
- Determinar a sensibilidade da espécie testada frente a outros estudos descritos na literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo e Manutenção da Microalga

A cepa da microalga *T.chuui* (BMAK) (Figura 1) foi cedida pelo Banco de



Cultivo de Microalgas do Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos/IO-FURG da Universidade Federal do Rio Grande.

Os procedimentos de cultivo e manutenção da cepa de microalga para a utilização nos ensaios ecotoxicológicos seguiram a norma ABNT NBR 16181 (ABNT, 2013). Para tanto, as microalgas foram cultivadas em soluções nutritivas (Guillard F/2), preparadas em água marinha reconstituída com adição de sal marinho sintético (35g/kg). Após preparo, os meios foram autoclavados, ajustados o pH (7.0 e 8.5) e armazenada em frascos estéreis para posterior utilização.

Figura 1. Células de *Tetraselmis chuui*.

Fonte: Laboratório de Ficologia- UFMA.

Os cultivos foram mantidos em ambientes controlado (câmara germinadora SP Labor) sob temperatura de 24 °C, luminosidade com lâmpadas brancas tipo led (6500 k) com fotoperíodo 12h C:12h E, e intensidade luminosa de aproximadamente 8000 lux. As microalgas destinadas para os ensaios, eram retiradas da câmara germinadora e colocadas em um espaço, onde a temperatura era de 24°C, luminosidade contínua com lâmpadas branca tipo led (6500 k) com intensidade luminosa de aproximadamente 8000 lux, para que elas se adaptassem as condições dos ensaios. Os meios contendo as microalgas foram agitados (manualmente) 2 vezes ao dia, sendo os cultivos repicados periodicamente a cada 7 dias (fase exponencial de crescimento), com uma densidade inicial de 10⁴ células/ml. Todo o material e soluções utilizadas para os cultivos e ensaios foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min.

3.2. Construção da Carta Controle com a Substância de Referência (Dodecil Sulfato de Sódio)

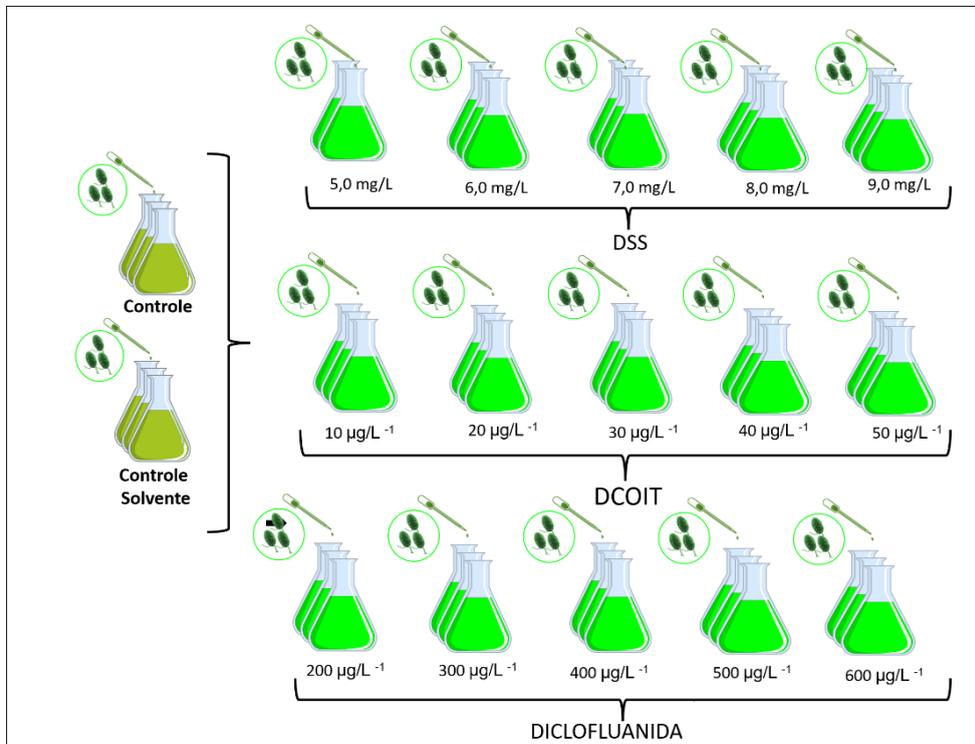
A sensibilidade dos cultivos e o controle de qualidade foi avaliada através da de uma carta-contrôle, construída a partir de ensaios ecotoxicológicos com a substância de referência dodecil sulfato de sódio – DSS (ISO FAR). Para tanto, foram realizados 5 ensaios, de acordo com a norma ABNT NBR 16181 (ABNT, 2013), onde foram testadas 5 concentrações de DSS (5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 mg L⁻¹), além do controle somente com o meio F/2, todas em triplicata. A CE₅₀ (72h) foi determinada através da análise de probitos (FINNEY, 1952), obtidos a partir das taxas de inibição de crescimento da microalga em cada experimento. Para a construção da carta controle (Figura 6), utilizou-se a média geral dos valores de CE₅₀ e o desvio de $\pm 2\alpha$ dos cinco ensaios realizados. Sendo assim, foram utilizados para os ensaios definitivos, somente os cultivos que apresentaram sensibilidade adequada, com suas CE₅₀ dentro do desvio apresentado na carta controle (ABNT, 2013).

3.3. Ensaio Ecotoxicológicos

Os ensaios ecotoxicológicos também seguiram a norma ABNT NBR 16181 (ABNT, 2013). Para tanto, a concentração inicial das microalgas foi ajustada para 10⁴ células mL⁻¹, com auxílio de contagem do número de células em câmara de Neubauer e posterior diluição nos meios de exposição. As concentrações de DCOIT (10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 µg/L) e Diclofluanida (200,0; 300,0; 400,0; 500,0 e 600,0 µg/L) a serem testadas, foram definidas depois de ensaios preliminares. Os biocidas foram diluídos em solvente DMSO (Dimetil Sulfoxido- ISO FAR) de forma que a porcentagem de solvente ficasse em 0,01%, em decorrência da toxicidade do DMSO para as algas. As soluções (50 mL) de exposição e os controles (solução nutritiva de Guillard F/2, e solução nutritiva mais DMSO 0,01%) foram preparadas em triplicata e acondicionadas em erlenmeyers de 100 ml para inoculação das microalgas. Após 72h, foram determinadas a densidade algal, os teores de clorofila *a*, e a viabilidade celular para determinar os efeitos dos biocidas. A CE₅₀ (72h) foi determinada através da análise de

probióticos (FINNEY, 1952), obtidos a partir das taxas de inibição de crescimento da microalga em cada experimento. A figura 2 mostra o esquema dos ensaios definitivos.

Figura 2. Esquema ilustrativo dos ensaios ecotoxicológicos realizados com DSS, DCOIT e Diclofluanida.



Fonte: Autoria Própria

3.4. Análises de densidade algal, clorofila *a* e viabilidade celular

Para a análise de densidade celular (Figura 3), amostras (1 ml) foram fixadas em lugol (Lourenço, 2006) para contagem em microscópio, com auxílio de câmara de Neubauer e aumento de 400x. Após a contagem, foi calculada a inibição do crescimento para cada uma das concentrações através da seguinte fórmula:

$$IC (\%) = \left(1 - \frac{T_{final} - T_{inicial}}{C_{final} - C_{inicial}} \right) \times 100\%$$

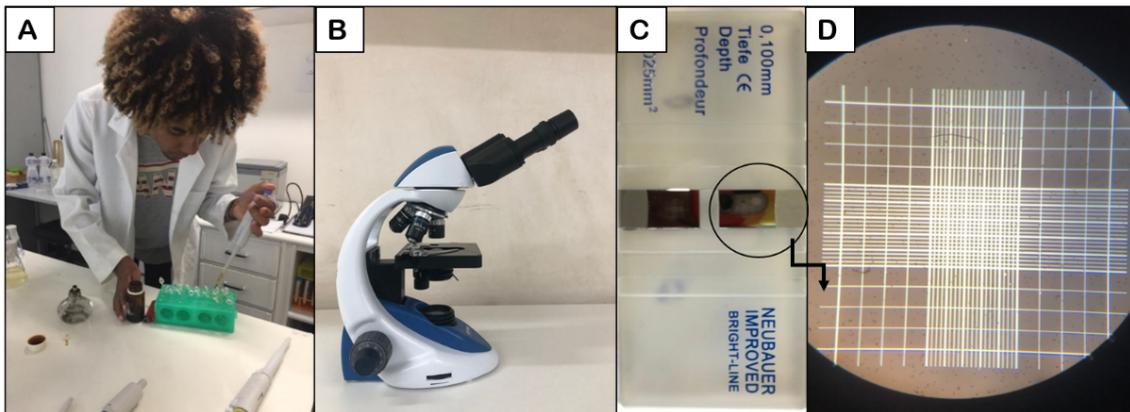
Onde:

IC = Inibição de crescimento

T = Densidade celular da concentração teste

C = Densidade celular do controle

Figura 3. A: fixação das células com lugol; B: Microscópio usado para a análise; C: Câmara de Neubauer; D: Grade de Contagem.



Fonte: Autoria Própria

Já para a análise de clorofila *a* (Figura 4) (Puerta et al., 2020), retirou-se uma alíquota de 5 ml de cada meio experimental, que foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min, em tubos revestidos com papel alumínio. Em seguida, foi realizado o descarte do sobrenadante cuidadosamente, e então adicionados 3 ml de metanol para extração do pigmento no escuro, por 24h, a 5°C. Posteriormente, foi realizado uma nova centrifugação (4.000 rpm por 10 min) e o sobrenadante destinado ao espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific - Spectronic 200), cedido pelo Laboratório de Ficologia (Labfic) da Universidade Federal do Maranhão, para leitura dos pigmentos fotossintéticos nos comprimentos de onda de 663 nm e 750 nm de acordo com Mackiney (1941).

Figura 4. A: Centrifugadora (Centribio); B: Adição do Metanol (Isofar); C: Espectrofotômetro usado para a análise da clorofila *a*.



Fonte: Autorial Própria

A viabilidade celular foi avaliada através do corante Vermelho Neutro (ISO FAR), adicionando-se 100 μL do corante em 1ml de amostra. Após o intervalo de 2 horas (para a absorção do reagente no escuro), as células foram fixadas com 100 μL de formol 4%, e a identificação e contagem das células coradas (viáveis) e não coradas (não viáveis) foram feitas em microscópio óptico (400X), onde foram contadas 200 células em câmara de Neubauer (Figura 5). A porcentagem de células viáveis foi obtida de acordo com Da Luz et al., (2016).

Figura 5. Viabilidade das células viáveis e não viáveis de *T.chuii* pelo método de Vermelho Neutro. As células circundadas de verde são viáveis e as circundadas de vermelhos não são viáveis.



Fonte: Laboratório de Ficologia - UFMA

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

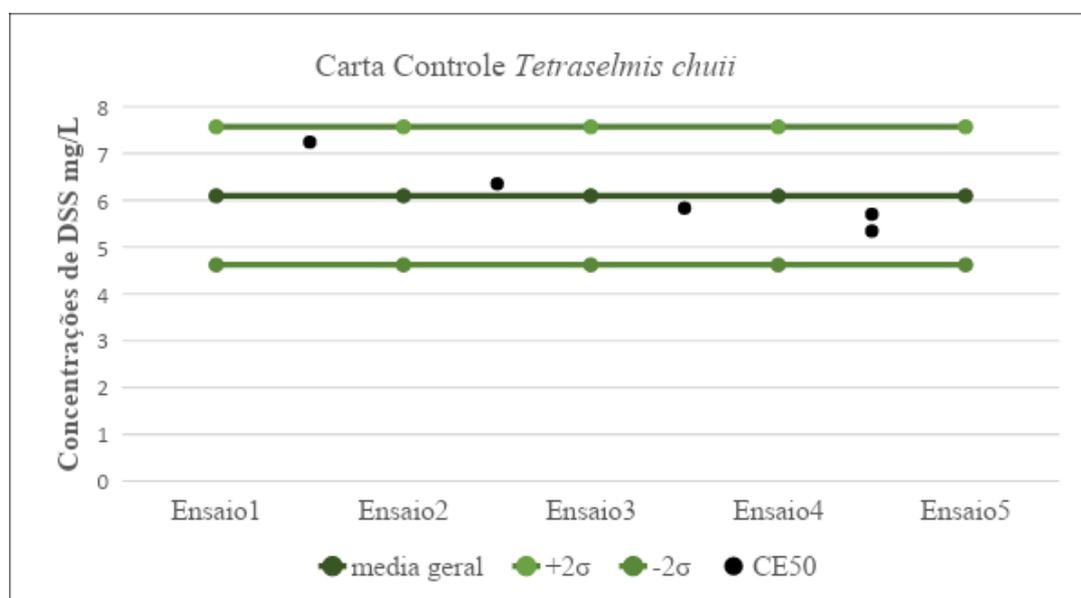
Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, porcentagem de inibição e coeficiente de variação (CV). Os dados foram testados quanto a normalidade (Kolmogorov Smirnov) e homogeneidade (Levene). Os dados não paramétricos (viabilidade celular e clorofila *a* oriundos da exposição ao DCOIT, e a carta controle), foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e os paramétricos (densidade celular, viabilidade e clorofila *a* da exposição a Diclofluanida, e densidade celular da exposição ao DCOIT) a ANOVA. Para o teste com os dados de viabilidade das algas expostas ao DCOIT foi usado o Teste Tukey para comparação das médias, afim de saber se em alguma das concentrações eram iguais as demais. O software usado para a criação dos gráficos foi o SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc.) e para a análise estatísticas foi o IBM SPSS STATISTICS 24.

4. RESULTADOS

4.1. Carta Controle

A carta controle (Figura 6) foi construída com base em 5 ensaios com DSS, revelando um valor médio de CE_{50-72h} igual a $6,09 \text{ mg/L}^{-1}$ com desvio de $1,31 (\pm 2\sigma)$.

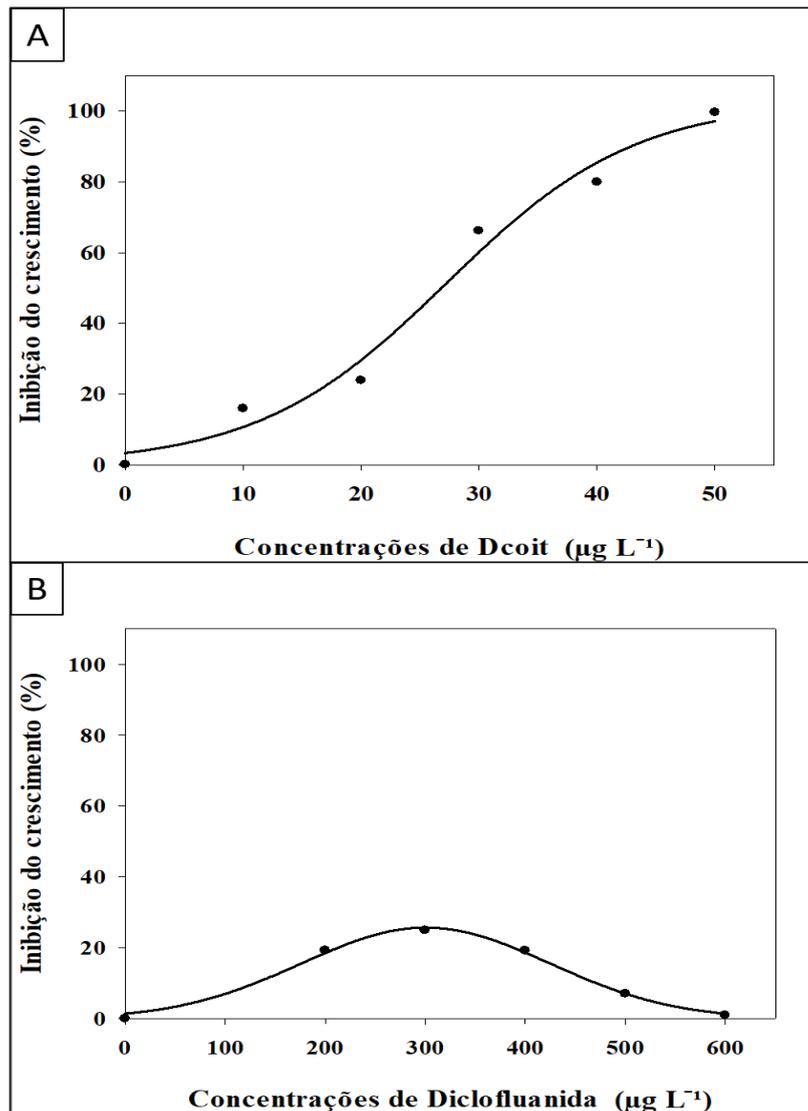
Figura 6. Carta-controle com valores de CE_{50-72h} para cada ensaio com a *T.chuii* exposta ao DSS, assim como a média geral da CE_{50-72h} e o intervalo de confiança ($\pm 2\sigma$) dos 5 ensaios ($n=5$).



4.2.Efeito dos Biocidas sobre o crescimento algal

O biocida DCOIT teve um aumento gradativo na inibição do crescimento algal com o aumento das concentrações testadas (Figura 7A), com diferença significativa nas 3 últimas concentrações (ANOVA $p < 0,05$), apresentando valor de CE_{50} de $21,33 \mu\text{g/L}^{-1}$. Já a Diclofluanida apresentou baixas inibições no crescimento algal, não apresentando diferença significativa (ANOVA $p > 0,05$) entre as concentrações testadas (Figura 7B), impossibilitando assim o cálculo da CE_{50} . Sendo assim, através dos resultados é possível verificar que a microalga *T.chuii* é sensível somente ao biocida DCOIT, com quase 100% de inibição na maior concentração testada ($50 \mu\text{g/L}^{-1} = 99,6\%$), e resistente a Diclofluanida.

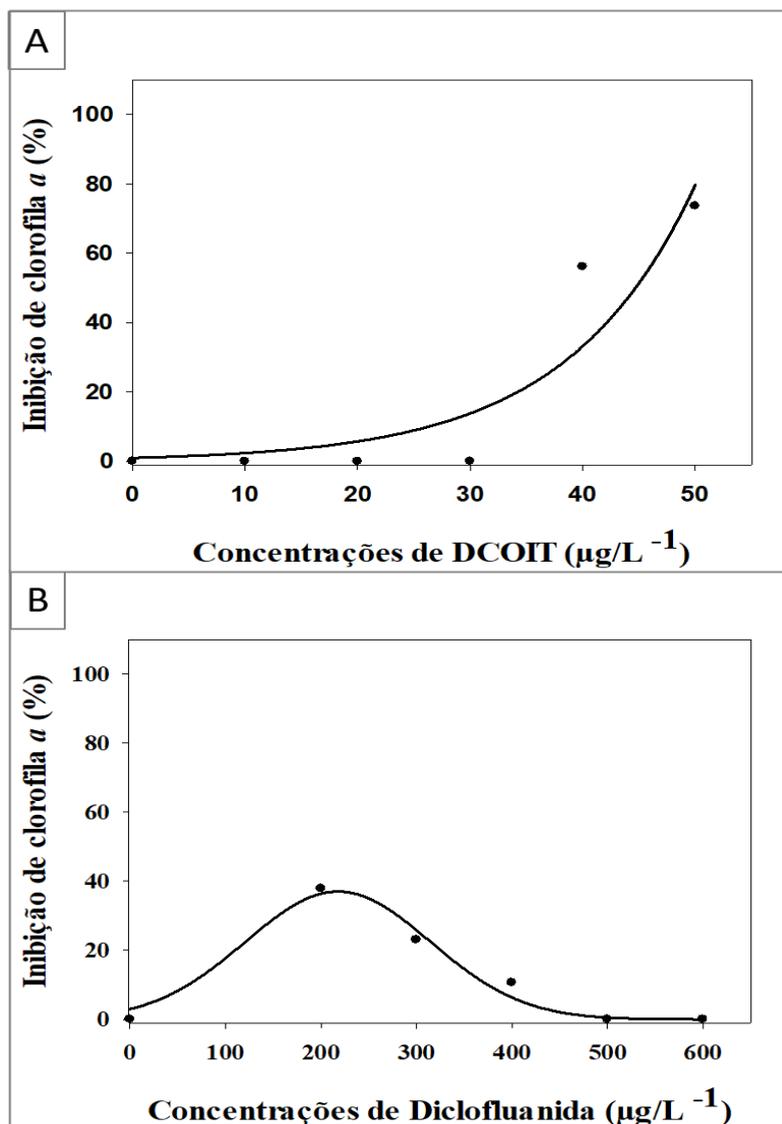
Figura 7. Valores médios de inibição do crescimento celular da microalga *T.chuii* após exposição de 72 horas aos biocidas DCOIT (A) e Diclofluanida (B).



4.3.Efeito dos biocidas na concentração de clorofila *a*

Quanto a clorofila *a* (Figura 8), foi possível observar que, apesar de o DCOIT ter inibido o crescimento algal desde as primeiras concentrações testadas (10, 20 e 30 µg/L⁻¹) (Figura 7A), seus teores foram inibidos (56,14 e 73,68%) somente nas maiores concentrações deste biocida (40 e 50 µg/L⁻¹, respectivamente) (Figura 8A), mostrando diferença significativa (Kruskal-walls $p < 0,05$) dessas concentrações com as demais. Acompanhando os resultados de inibição do crescimento algal, a Diclofluanida mostrou baixa inibição nos teores de clorofila *a* em todas as concentrações testadas com máximo de inibição (37,87%) observada na concentração de 200 µg/L⁻¹ (Figura 8B), no entanto não houve diferença significativa entre as concentrações testadas (ANOVA $p > 0,05$).

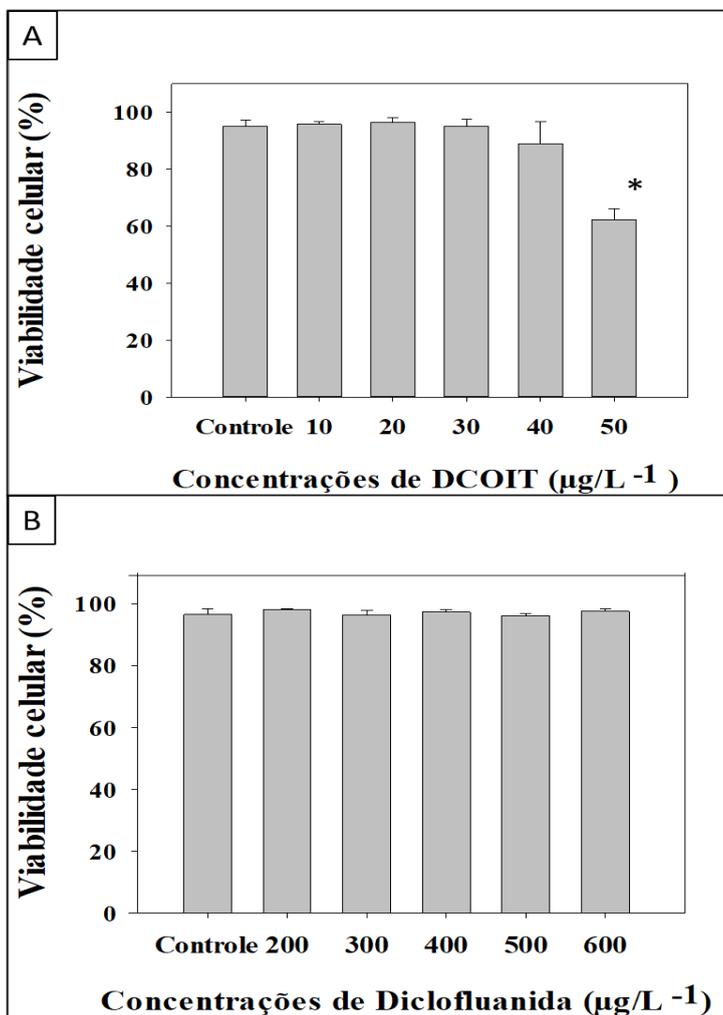
Figura 8. Valores médios de inibição da concentração de clorofila *a* da microalga *T.chuui* após exposição de 72 horas aos biocidas DCOIT (A) e Diclofluanida (B).



4.4. Viabilidade Celular

A viabilidade celular frente a exposição ao DCOIT apresentou redução significativa (Teste Tukey $p < 0,05$) em relação ao controle somente na maior concentração testada ($50 \mu\text{g/L}^{-1}$) (Figura 9A). Para a Diclofluanida não foi possível observar diferença significativa (ANOVA $p > 0,05$) na viabilidade celular das microalgas expostas e o controle (Figura 9B).

Figura 9. Viabilidade celular das microalgas após exposição aos biocidas DCOIT (A) e Diclofluanida (B). Dados expressos em médias e desvio padrão. * indica valor significativamente diferente do controle (Tukey, $p < 0,05$).



5. DISCUSSÃO

As substâncias de referência são e devem ser utilizadas para avaliar, as condições nas quais o teste foi executado e a sensibilidade do lote de organismos utilizados no mesmo (Zagatto, 2006). Apesar da norma da ABNT NBR 16181 (ABNT, 2013) prever testes de toxicidade crônica com microalgas de 72 e 96h, só foi encontrado na literatura carta-controle de 96h para a espécie *T.chuii*. Pereira et al., (2010) em

exposição a microalga *T.chuii* ao DSS, observou uma concentração inibitória mediana de ($CI_{50-96h}=27,41 \text{ mg/L}^{-1}$). No presente estudo foi observado uma maior sensibilidade das cepas ($CE_{50-72h}= 6,09 \text{ mg/L}^{-1}$), que podem ser atribuídas às variações genéticas das cepas de organismos utilizadas (Zagotto, 2006).

A comunidade fitoplanctônica, em geral, são vulneráveis a diversos biocidas em função de suas propriedades herbicidas (Scarlet et al., 1999; Yamada, 2007), podendo sofrer impactos diretos sobre suas taxas de crescimento, teores de clorofila-a e viabilidade celular, produzindo assim efeitos potenciais sobre a produtividade primária local e consequentemente toda a cadeia trófica aquática (Scarlet et al., 1999; Yamada, 2007). Sabe-se que o DCOIT causa a inibição do transporte de elétrons no PSII (fotossistema II) em organismos fotossintetizantes (Guardiola et al., 2012; Petsas e Vagi, 2017), e que a Diclofluanida apresenta elevados efeitos carcinogênicos e mutagênicos nos organismos expostos (Castro et al., 2011).

Os testes de exposição feitos nesse estudo, revelaram que apenas o biocida DCOIT casou efeitos significativos na espécie de microalga estudada, apresentando valor de $CE_{50} 72h$ de $21,33 \text{ } \mu\text{g/L}^{-1}$. Em comparação com outros estudos na literatura (Tabela 1), é possível observar que a *T. chuii*, apesar de sensível ao biocida, apresentou menor sensibilidade (CE_{50}) que outras espécies de chlorophyta e diatomáceas estudadas (Privado, 2021; Onduka et al., 2013). De forma geral observa-se uma maior sensibilidade das espécies de diatomáceas (CE_{50} entre 0,22 e $11,5 \text{ } \mu\text{g/L}^{-1}$) estudadas em comparação com as chlorophyta (CE_{50} entre 1,6 e $21,3 \text{ } \mu\text{g/L}^{-1}$) (Tabela 1). Em ordem decrescente de sensibilidade pode-se apontar as seguintes espécies como as mais sensíveis *Skeletonema costatum* > *Chaetoceros calcitrans* > *Tetraselmis tetrathele* > *Chaetoceros muelleri* > *Dunaliella terctiolecta* > *Chlorella minutissima* > *Thalassiosira pseudonana* > *Dunaliella salina* > *Tetraselmis chuii*. (Autoria própria).

Tabela 1. CE_{50} do biocida DCOIT em microalgas marinhas após 72h de exposição.

Agrupamento Taxonômico	Espécies	$CE_{50} 72h$ ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	Referência
Chlorophyta	<i>Tetraselmis chuii</i>	21,3	Presente Estudo
Chlorophyta	<i>Dunaliella salina</i>	12,0	Privado, (2021)
Chlorophyta	<i>Chlorella minutissima</i>	7,4	Privado, (2021)

Chlorophyta	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3,9	Onduka et al. (2013)
Chlorophyta	<i>Tetraselmis tetrahele</i>	1,6	Onduka et al. (2013)
Bacillariophyta	<i>Chaetoceros muelleri</i>	3,4	Privado, (2021)
Bacillariophyta	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	11,5	Privado, (2021)
Bacillariophyta	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0,32	Onduka et al. (2013)
Bacillariophyta	<i>Skeletonema costatum</i>	0,22	Onduka et al. (2013)

Quanto ao teor de clorofila *a* os resultados revelam efeito significativo do DCOIT somente nas concentrações mais altas testadas (40 e 50 $\mu\text{g/L}^{-1}$), com inibição de 56,14 e 73,68%, revelando que apesar do efeito significativo sobre o crescimento celular (inibição de 66,1%) iniciar na concentração de 30 $\mu\text{g/L}^{-1}$, somente a partir de 40 $\mu\text{g/L}^{-1}$ (inibição de 56,14% do crescimento celular) se observa efeito sobre a clorofila *a*. Sendo assim, podemos concluir que o crescimento celular é um parâmetro mais sensível aos efeitos do DCOIT que a clorofila *a*. Privado (2021), observou na exposição ao biocida DCOIT que a redução do conteúdo de clorofila *a* apresentou menores valores de CE_{50} do que a inibição do crescimento para as 4 microalgas estudadas, principalmente *C. muelleri* e *C. minutissima*.

Em relação a viabilidade celular, observa-se efeito significativo do DCOIT (redução de 37,8%) somente na concentração mais elevada (50 $\mu\text{g/L}^{-1}$), revelando que apesar dos efeitos observados sobre o crescimento algal e os teores de clorofila *a* em concentrações mais baixas de exposição, as microalgas sobreviventes ainda estavam viáveis. Privado, 2021 em relação a viabilidade celular das 4 microalgas estudadas, revela que houve a diminuição ou ausência de células nas maiores concentrações dos biocidas em estudo (DCOIT e Diclofluanida) mas que também todas as células estavam viáveis.

Quanto ao biocida Diclofluanida não foi possível observar efeitos significativos das concentrações testadas sobre nenhum dos parâmetros analisados, crescimento algal, clorofila *a*, e viabilidade celular. Privado (2021), em estudo de exposição de microalgas do grupo Chlorophyta a Diclofluanida, observou valores de CE_{50} 72h para a *Chlorella minutissima* e *D.salina* de 75,7 e 101,9 $\mu\text{g/L}^{-1}$, respectivamente. No presente estudo, o máximo de inibição observado no crescimento algal e nos teores de clorofila *a*, foi de 24,9% (na concentração de 300 $\mu\text{g/L}^{-1}$ e 37,87% (na concentração de 200 $\mu\text{g/L}^{-1}$), respectivamente. Cabe salientar que ambos os parâmetros tiveram curvas resposta

semelhantes, com aumento de inibição nas concentrações intermediárias (200, 300 e 400 $\mu\text{g/L}^{-1}$), com redução nas concentrações mais altas (500 e 600 $\mu\text{g/L}^{-1}$), evidenciando a resistência da espécie ao composto e sua capacidade de homeostase. Somado a isso, não foi observado nenhum efeito sobre a viabilidade algal.

Stachowski-Haberkorn et al (2013), em um estudo de exposição a longo prazo (exposição de 43 gerações) da microalga *Tetraselmis suecica* ao biocida Diuron, identificou que a microalga estudada apresentou mutações, tais como: (1) mutação adaptativa induzida pelo herbicida durante a exposição crônica; (2) mutação do tipo que gera diversidade genética, que possibilitou a adaptação e resistência da espécie ao biocida. No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo relacionado a capacidade adaptativa da *T. chuii*. Estudos com metais (Yilmaz et al., 2005; Levey et al., 2007 e 2008; e Debelius et al., 2009) também revelaram tolerância do gênero *Tetraselmis* e da espécie *T.chui* aos elementos cobre e chumbo em elevadas concentrações, eles explicam que apesar das microalgas acumularem o metal, não houve inibição do crescimento da alga.

Os biocidas são compostos poderosos que agem em diversos organismos como: bivalves, macro e microalgas, poliquetas, crustáceos, peixes e outros, podendo, na maioria das vezes, ter efeitos adversos intensos como alterações bioquímicas, fisiológicas, letalidade e também efeitos comportamentais (movimentação, locomoção, reprodução) (Abreu et al., 2016). Sendo assim, estudos ecotoxicológicos com esses compostos são de extrema importância para identificação de efeitos a diferentes espécies visando assim um melhor monitoramento e gestão dos recursos aquáticos.

6. CONCLUSÃO

Com base nos bioensaios que foram realizados nesse estudo, pudemos concluir que o biocida DCOIT se mostrou mais tóxicos para a espécie de microalga *T.chuii* que a Diclofluanida. Dentre os efeitos analisados, crescimento algal, teor de clorofila *a*, e viabilidade algal, foi possível observar que os três parâmetros apresentaram respostas diferentes, sendo o crescimento algal a análise mais sensível para detectar o efeito precoce do DCOIT sobre a microalga estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR 16181: **Ecotoxicologia Aquática –Toxicidade crônica- Método de ensaio com microalgas marinhas.** Rio de Janeiro. 27 p, 2013.
- Abreu, F. E. L. **Biocidas anti-incrustantes de Terceira geração em sedimentos superficiais da costa brasileira.** Tese de Mestrado Universidade Federal do Rio Grande, p. 104, 2016.
- Aragão, M. A. e Araújo, R. P. A. 2006. **Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos.** In: Zagato, P.A. e Bertoletti, E. 2006. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações.** Zagatto e Bertoletti (org.) São Carlos: Rima, cap. 6, p. 117 – 152. 2006.
- Azevedo, F. D. e Chasin, A. D. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos, SP: RiMa, 2004, p. 30-36, 2003.
- Baptista Neto, A.; Wallner-kersanack, M.; Patchineelam, S. M. **Poluição Marinha.** Rio de Janeiro: Interciência. p. 440, 2008.
- Brown, M. R.; Jeffrey, S. W.; Volkman, J. K.; Dunstan, G. A. **Nutritional properties of microalgae for mariculture, Aquaculture,** v.151, p.315–331, 1997.
- Callow, M. E, e Willingham, G. L. **Degradation of antifouling biocides. biofouling,** v 10, n. 1-3, p. 239-249, 1996.
- Castello, J. P.; Perez, J. A. A.; DE ABREU, P. C. O. V. **Recursos Marinhos Vivos. Introdução às ciências do mar.** Editora Textos. 2015.
- Castro, Í. B.; WestphaL, E.; Fillmann, G. **Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático.** Quím. Nova, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 2011.

- Da Luz, D.S.; da Silva, D.G.; Souza, M.M.; Giroldo, D.; Martins, C.D.M.G. **Efficiency of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum***. *Phycological Research* 64, p. 56–60, <https://doi.org/10.1111/pre.12114>, 2016.
- Davarpanah e Guilhermino. L. **Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii***. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2015.
- Debelius, B; Forja, J. M; Delvalls, Á; Lubián, L. M. **Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae**. In: *Ecotoxicology and Environmental safety* n. 72, v. 5, p. 1503-1513, 2009.
- Fernandez, M. A. e Pinheiro, F. **New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints**. *Int. J. Environ. Health* 1, p. 427-448, 2007.
- Fernández-alba, A. R.; Hernando, M. D.; Piedra, L.; Chisti, Y. **Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays**. *Analytica chimica acta*, 456(2), p. 303-312, 2002.
- Finney, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 1952.
- Fränze, O. **Complex bioindication and environmental stress assessment. ecological indicators**, v. 6, n. 1, p. 114-136, 2006.
- Guardiola, F. A.; Cuesta, A.; Meseguer, J.; Esteban, M.A. **Risks of using antifouling biocides in aquaculture**. *International Journal of Molecular Sciences* 13, p. 1541-1560, <https://doi.org/10.3390/ijms13021541>, 2012.
- Hallegraeff e Gustaaf M. **Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge 1**. *Journal of phycology*, v. 46, n. 2, p. 220-235, 2010.
- Hamwijk, C.; Schouten, A.; Foekema, E. M.; Ravensberg. J. C.; Collombon, M. C.; Schmid, T. K.; Kugle, M. **Monitoring of dichlofluanid biocide in water and marine sediments of the marine greek**. *Chemosphere* 60, p. 1316-1324, 2005.

- Han, X.; Wu, J.; Zhang, X.; Shi, J.; Wei, J.; Yang, Y.; Wu, B.; Feng, Y. **Special issue on advanced corrosion-resistance materials and emerging applications. The progress on antifouling organic coating: From biocide to biomimetic surface.** Journal of Marine Science and Technology, v. 61, p. 46-62, 2021.
- Hoek, V. D.; Mann, D. G.; Jahns, H. M. **Algae: Introduction to phycology.** Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 626, 1995.
- Laing, I. e Ayala, F. **Commercial mass culture techniques for producing microalgae.** In: Akatsuka, I. (ed) Introduction to Applied Phycology. SPB, The Hague, The Hague, Netherlands, p.447-477, 1990.
- Levy, J. L.; Angel, B. M.; Stauber, J. L.; Poon, W. L.; Simpson, S. L.; Cheng, S. H.; Jolley, D.F. **Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: Comparison of copper sensitive and copper tolerant species.** In: Aquatic Toxicology, v. 89, n. 2, p. 82-93, 2008.
- Levy, J. L.; Stauber, J. L.; Jolley, D. F. **Sensitivity of marine microalgae to copper: the affect biotic factors on copper adsorption and toxicity.** In: Science of the Total Environment. n. 387, p. 141-154, 2007.
- Lourenço, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e Aplicações.** São Carlos: RiMa, p. 606, 2006.
- Machiney, G. **Absorption of light by Chlorophyll solutions.** Journal of Biological Chemistry. V. 140, p. 315-322, 1941.
- Miao, X.; Wu, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of Chlorella protothecoides. Journal of Biotechnology, v. 110, p.85-93, 2004.
- Nybakken, J. W. **Marine biology: an ecological approach.** Benjamin Cummings (ed). 5ª edição. Estados Unidos, p. 516. 2001.
- Onduka, T.; Ojima, D.; Ito, M.; Ito, K.; Mochida, K.; Fujii, K.; **Sea-Nine 211 anti-fouling biocide toxicity for marine algae, crustaceans and polychaetes.** *Fisheries science*, 79 (6), p. 999-1006. 2013.

ONU- **Organização da Nações Unidas. Dia Internacional da Biodiversidade Biológica,**

<https://brasil.un.org/pt-br/57004-dia-internacional-da-diversidade-biologica-22-de-maio-de-2012>, 2012.

Pereira, S. A.; Nascimento, I. A.; Leite, M. B. N.; Cruz, A. C.; Barros, D. A.; Araújo, V. Q.; Nascimento, N. C. **Sensibilidade de Quatro Organismos-teste (*Skeletonema costatum*, *Tetraselmis chuii*, *Crassostrea rhizophorae* e *Echinometra lucunter*) ao Dodecil Sulfato de Sódio: Elaboração das Cartas-controle.** *Revista da Faculdade de Tecnologia e Ciências*, 8(24). 2010.

Petsas, A. S. e Vagi, M. C. **Effects on the Photosynthetic Activity of Algae after Exposure to Various Organic and Inorganic Pollutants: Review.** In: Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q., Queiroz, M.I. Chlorophyll. IntechOpen. p. 37-77, 2017.

Privado, D. C. C. **Efeitos dos Biocidas DCOIT e DICLOFLUANIDA nas microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlorella minutissima* e *Dunaliella salina*.** Dissertação (Mestrado em Oceanografia) UFMA- Campus Bacanga, São Luís. 28/05/2021
https://sigaa.ufma.br/sigaa/public/programa/defesas_stricto.jsf, 2021.

Puerta, YT.; Guimarães, PS.; Martins, SE.; e Martins, CDMG. **Toxicidade do metilparabeno para espécies de microalgas verdes e derivação de uma concentração sem efeito previsto (PNEC) em ecossistemas de água doce.** *Ecotoxicologia e segurança ambiental*, 188, 109916. 2020.

Rodrigues, A, e Rodrigues, R. **Influência do manganês em ensaios de toxicidade com algas em amostras ambientais.** *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v.1, p.7-11, 2006.

Santos, V. C. T. **Caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanomateriais engenheirados com propriedade anti-incrustante sobre microrganismos isolados de ambiente marinho.** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade em ambientes costeiros) São Vicente - UNESP. <<http://hdl.handle.net/11449/213733>>, 25/06/2021. 2021.

- Scarlett, A.; Donkin, P.; Fileman, T. W.; Evans, S. V.; Donkin, M. E. Risk posed by the antifouling agent Irgarol 1051 to the seagrass, *Zostera marina*. *Aquatic toxicology*, 45 (2-3), 159-170. 1999.
- Silva, A. C. D. **Estudo quantitativo da bioincrustação marinha em superfícies de compósitos à base de resina poliéster reforçados com fibra de vidro**. TCC (Graduação) UFSC – Campus Joinville. Engenharia Naval <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/218397>. 04/12/2020. 2020.
- Schmitz, R; Magro, C. D.; Colla, L. M. **Aplicações ambientais de microalgas**. Revista CIATEC–UPF, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.
- Stachowski-Haberkorn, S., Jérôme, M., Rouxel, J., Khelifi, C., Rincé, M., & Burgeot, T. **Multigenerational exposure of the microalgae *Tetraselmis suecica* to diuron leads to long-term spontaneous adaptation of the strain**. *Aquatic toxicology*, 140, 380-388. 2013
- Szeto, W.; Leung, M.K.; Leung, D.Y. **Recent developments of titanium materials for aquatic antifouling application**. *Journal of Marine Science and Technology*, v.26, p. 301-321, 2020.
- Thomas, K.V. e Langford, K. H. **Ecotoxicologia de biocidas anti-incrustantes**. Springer, Tokyo. p. 331-344. 2009.
- Tomaselli, L. **The microalgal cell**. In: Richmond, A. (ed). **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing, Oxford, USA, p. 3-19, 2004.
- Yamada, H. **Behaviour, occurrence, and aquatic toxicity of new antifouling biocides and preliminar assesment of risk to aquatic ecosystems**. *Bulletin fishery research agenceie*, v. 21, p. 31-45, 2007.
- Yebra, D. M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. **Tecnologia anti-incrustação: passado, presente e as etapas futuras em direção a um anti-incrustante eficiente e ecologicamente correto revestimentos**. *Prog. Org. Casaco*. 50, p. 75–104, 2004.

Yilmaz, A. B.; Isik, O.; Sayin, S. **Bioaccumulation and Toxicity of different copper concentrations in *Tetraselmis chuii***. In: E.U. Journal of Fisheries & aquatic Sciences. v. 22, n. 3-4, p. 297-301, 2005.

Zagatto, P.A. **Ecotoxicologia. In: Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. Zagatto, P.A. & Bertolotti, E. Eds. Ed.RiMa, p.1-13, 2006.