

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA - PPGOceano

DEBORA CAROLINA COSTA PRIVADO

**EFEITOS DOS BIOCIDAS DCOIT E DICLOFLUANIDA PARA AS
MICROALGAS *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlorella
minutissima* e *Dunaliella salina***

São Luís, MA
2021

DEBORA CAROLINA COSTA PRIVADO

**EFEITOS DOS BIOCIDAS DCOIT E DICLOFLUANIDA PARA AS
MICROALGAS *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlorella
minutissima* e *Dunaliella salina***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia – PPGOceano, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos
Coorientadora: Profa. Dra. Marianna Basso Jorge

São Luís, MA

2021

DEBORA CAROLINA COSTA PRIVADO

**EFEITOS DOS BIOCIDAS DCOIT E DICLOFLUANIDA PARA AS
MICROALGAS *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlorella
minutissima* e *Dunaliella salina***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Oceanografia – PPGOceano, da
Universidade Federal do
Maranhão - UFMA, como
requisito parcial à obtenção do
título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo
Luvizotto Santos
Coorientadora: Profa. Dra.
Marianna Basso Jorge

Aprovada em ____ de ____ de 2021

Banca Examinadora

Dr. Ricardo Luvizotto Santos
(Orientador/UFMA)

Dr^a. Camila de Martinez Gaspar Martins
(Universidade Federal do Rio Grande - FURG)

Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
(Universidade Federal do São Carlos - UFSCar)

São Luís, MA

2021

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

Privado, Debora Carolina Costa.

EFEITOS DOS BIOCIDAS DCOIT E DICLOFLUANIDA PARA AS
MICROALGAS *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*,
Chlorella minutissima e *Dunaliella salina* / Debora
Carolina Costa Privado. - 2021.

67 f.

Coorientador(a): Marianna Basso Jorge.

Orientador(a): Ricardo Luvizotto Santos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Oceanografia/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São
Luís - MA, 2021.

1. Anti-incrustante. 2. CE50. 3. Fitoplâncton. 4.
Fitotoxicidade. I. Basso Jorge, Marianna. II. Luvizotto
Santos, Ricardo. III. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu tio e agora anjo da guarda Arão Pereira da Costa Filho, pelo apoio, incentivo e por sempre ter sido minha grande inspiração no meio acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, meus pais Ana Célia e Wilson por todo acolhimento, paciência, torcida e apoio incondicional durante esse processo. Tudo isso é por vocês!

À minha irmã Daniela, por ser meu braço direito e sempre me ajudar de todas as formas possíveis, seja corrigindo meu texto, me dando carona, escrevendo nos vários frasquinhos antes dos experimentos, indo à UFMA comigo em fins de semana me ajudar, além de todas as conversas, apoio e muitos empurrões para que eu não estagnasse.

Agradeço ao meu tio, Dr. Arão Filho, professor de química, que deixou além de saudades, muita inspiração sobre o tipo de profissional que quero ser no futuro. Agradeço também a sua companheira, minha tia Sílvia, por todo apoio, torcida, e por me auxiliar na principal ideia para meu primeiro projeto de mestrado. Desde pequena, por causa de vocês, eu soube de todo o sacrifício que era necessário para ser cientista, ter uma graduação, pós-graduação e ser docente. Graças a isso, eu soube valorizar cada passo meu nessa caminhada.

Agradeço a toda minha família, incluindo avós, tias, tio, primas e primos por todo apoio e torcida, em especial à minha prima Camila por ter ido comigo à UFMA me ajudar em um ensaio, quando precisei. Apesar de não conseguir colocar o nome de todos, vocês sabem quem são.

Ao meu orientador, prof. Ricardo Luvizotto principalmente por toda paciência, dicas, ensinamentos e principalmente disponibilidade, mesmo que distante. Obrigada por entender e me ajudar com a dificuldade da escrita

Agradeço muito à minha co-orientadora, professora, coordenadora e parceira profa. Marianna Jorge. Obrigada por todo apoio logístico, por estar sempre presente quando eu precisava de auxílio no laboratório. Agradeço por todos os conselhos, conversas, acolhimento e compreensão durante todo esse período. Você foi fundamental para que eu achasse novamente meu caminho, quando estive perdida e sem saber para onde seguir com meu trabalho e com o mestrado.

Agradeço imensamente os estagiários do Labecotox, especialmente Dandan, Ítala e Mateus, por serem meu braço direito e esquerdo durante meu trabalho e pela amizade. Sem

vocês eu ainda estaria até agora lá no laboratório fazendo experimentos. Contem comigo para tudo!

Agradeço a todos os membros do Labecotox pelo apoio durante esses 3 anos de laboratório, às pesquisadoras Lise, Elaine e Lisandra, por me ensinarem e ajudarem com a parte de cultivo de microalgas. Um muito obrigada em especial aos amigos que fiz e levarei comigo: Ana Paula, Thamires, Cadija, Rômulo e Julliana. Assim como eu sigo torcendo por cada um de vocês e celebrando cada conquista, eu sei que vocês também torcem por mim. Sem vocês não teria sido tão divertido.

À minha turma de mestrado, pois foi incrível compartilhar com vocês todos os momentos alegres, tristes, esperançosos, além de ter sido incrível ver cada um de vocês saírem da sua concha e conquistarem tudo o que conquistaram. Agradeço especialmente aos amigos que levo: Cadija, Juliana, Milene, Denise, Marcos, Walterly, Erlik e Cleynice.

Agradeço a todos do Laboratório de Ficologia pelo apoio durante o projeto, ao coordenador do laboratório, prof. Marco, e especialmente às minhas amigas Karol, Fran, Nágela, Amanda, Jordana, Lisana e Bethânia pelo apoio, conversas, café e auxílio durante essa transição de laboratório.

Ao Laboratório de Ecotoxicologia Aplicada a Organismos Aquáticos (EcoBiotox) da FURG pela parceria, especialmente à coordenadora do laboratório, professora Camila por ter topado a parceria e disponibilizado dados dos ensaios feitos no laboratório. Ao Pablo Guimarães, técnico do laboratório por ter sempre prontamente respondido às minhas dúvidas e me ajudado, ao doutorando Muryllo por se dispor a me ajudar quando precisei e por fim aos estagiários que realizaram os ensaios.

Às minhas companheiras de vida Mariana Azevedo, Bruna Rodrigues, Carol Borges, Larissa Baldez e Elis Godinho por sempre me escutarem, aconselharem, me darem o ombro pra chorar nos momentos difíceis, segurarem minha mão nos momentos de dúvida e por serem as pessoas que eu sei que posso contar. Vocês estiveram presentes do começo ao fim dessa minha jornada de altos e baixos e não poderia deixar de agradecer a vocês. Aos meus demais amigos e colegas da biologia, oceanografia, escola, da vida, aos meus mestres e ao universo e Deus pela oportunidade de estar aqui.

RESUMO

A bioincrustação é um fenômeno que pode trazer prejuízos para a indústria marítima. Atualmente uma terceira geração de tintas anti-incrustantes é amplamente utilizada para conter esse fenômeno, empregando vários compostos biocidas como ingredientes ativos. Entretanto, mesmo com esses compostos possuindo rápida degradação, sua presença no ambiente pode trazer riscos para organismos não-alvo e de importância ecológica como as microalgas. O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade dos biocidas DCOIT e diclofluanida em diferentes espécies de microalgas marinhas (*Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlorella minutissima* e *Dunaliella salina*), analisando crescimento, teor de clorofila *a* e viabilidade celular. Como resultado, foi possível observar que todas as microalgas foram mais sensíveis ao DCOIT do que ao diclofluanida, sendo observado efeitos em concentrações já detectadas ambientalmente. Com base nos valores de CE₅₀ (72 h), a ordem de sensibilidade das microalgas aos biocidas foi: *C. muelleri* > *C. minutissima* > *T. pseudonana* > *D. salina*, sendo que todas as espécies se mostraram eficientes para uso em ensaios de exposição crônica aos biocidas. Tanto o teor de clorofila *a*, quanto o crescimento algal, se mostraram ferramentas eficazes para a avaliação de efeitos, entretanto, não foi possível avaliar de forma precisa os efeitos dos biocidas sobre a viabilidade celular das microalgas. Com base em nossos resultados, observamos que apesar da terceira geração de biocidas ser considerada menos prejudicial aos ecossistemas devido a rápida degradação no ambiente natural, a intensidade do uso de biocidas em sistemas anti-incrustantes, principalmente DCOIT, pode causar efeitos negativos para o meio ambiente por afetarem espécies de relevância ecológica que compõe o fitoplâncton marinho.

Palavras-chave: Anti-incrustante; CE₅₀; fitoplâncton; fitotoxicidade.

ABSTRACT

Biofouling is a phenomenon that can impair the maritime industry. Currently, a third generation of antifouling paints is widely used to prevent this phenomenon, applying various biocidal compounds as active ingredients. However, even though the compounds having fast degradation, their presence in the environment can still pose risks to non-target and ecologically important organisms such as microalgae. The aim of this study was to evaluate the toxicity of the biocides DCOIT and dichlofluanid on different species of marine microalgae (*Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlorella minutissima* and *Dunaliella salina*), analyzing growth, chlorophyll *a* content and cell viability. It was possible to observe that all microalgae were more sensitive to DCOIT than to dichlofluanid, and its effects were observed at level previously detected on the environment. Based on the EC₅₀ (72 h) values, the order of sensitivity of microalgae to biocides was: *C. muelleri* > *C. minutissima* > *T. pseudonana* > *D. salina*, and all species proved to be efficient for use in chronic exposure tests to biocides. Chlorophyll *a* content and the algal growth proved to be effective tools for evaluating the effects, however, it was not possible to accurately assess the effects of biocides on the cell viability of microalgae. Based on our results, we observed that although third generation biocides are considered less harmful to ecosystems due to their fast degradation in the natural environment, the intensity of use of biocides in antifouling systems, especially DCOIT, can cause negative effects on the environment by affecting species of ecological importance to the marine phytoplankton.

Keywords: antifouling; EC₅₀; phytoplankton; phytotoxicity

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	11
Referencial Teórico	13
Objetivos	26
Objetivo Geral.....	26
Objetivos Específicos	26
Referências.....	27
Artigo Científico: Toxicidade dos biocidas DCOIT e diclofluanida para microalgas marinhas	41
Resumo	41
1- Introdução	42
2- Materiais e métodos	44
3- Resultados.....	47
4- Discussão.....	53
5- Conclusão.....	59
6- Agradecimentos.....	60
7- Referências Bibliográficas.....	60

INTRODUÇÃO GERAL

A poluição marinha tornou-se uma das principais questões ambientais das últimas décadas e seu constante aumento tem preocupado pesquisadores e ambientalistas, gerando um maior debate sobre a saúde dos nossos oceanos e formas de diminuir o impacto causado pelas atividades humanas. Ações como o estabelecimento da “Década do Oceano” (2021-2030) pela Organização das Nações Unidas (ONU) dão a oportunidade, através da interface ciência-política, de chamar atenção para o ciclo de declínio da saúde dos oceanos e fortalecer a sua gestão para o benefício da humanidade (Ocean Decade, 2019; UNESCO, 2021). Nesse contexto, o desenvolvimento de pesquisas acerca de potenciais poluentes e seus riscos aos ambientes costeiros e oceânicos é essencial para a mitigação de impactos e criação de políticas que visam a proteção do ecossistema marinho como um todo.

Décadas de poluição das águas marinhas e estuarinas, juntamente com a destruição do habitat costeiro pelo desenvolvimento industrial e tecnológico, resultaram em impactos devastadores na biodiversidade. Quantidades crescentes desses impactos são gerados no meio ambiente por rejeitos de indústrias químicas, lançamentos de esgoto, agricultura, entre outros (Weis, 2014). Algumas das principais consequências são: excesso de nutrientes e matéria orgânica em águas estuarinas e costeiras, patógenos, acúmulo de lixo (principalmente plásticos), produtos tóxicos incluindo metais, pesticidas, resíduos industriais, farmacêuticos, entre outros.

As poucas fontes de poluição marinha que não são terrestres, geralmente são relacionadas à indústria marítima, sendo uma delas a lixiviação de tintas anti-incrustantes de embarcações (Weis, 2014). Essas tintas contêm em sua composição substâncias com ação biocida, tóxicas para organismos incrustantes, de modo a impedir o fenômeno da bioincrustação. Entretanto, com o aumento da frequência e quantidade de uso, esses compostos passaram a ser detectados na água e sedimento, aumentando seu risco de toxicidade a outras espécies do ecossistema marinho que não são alvo dos tratamentos.

O fitoplâncton é altamente suscetível aos compostos anti-incrustantes (Devilla et al., 2005; Jung et al., 2016; Zhang et.al, 2019) e devido ao seu curto tempo de geração e suscetibilidade, esses organismos podem ser afetados em curta escala de tempo, levando a mudanças na estrutura de toda comunidade, podendo afetar toda teia trófica (Devilla et al., 2005). Considerando que as algas são a base da teia trófica marinha, bioindicadoras e

sensíveis às alterações ambientais, o seu uso como organismo-teste em ensaios de toxicidade é uma importante ferramenta para detecção de substâncias potencialmente nocivas aos ecossistemas. Sendo assim, esse estudo visou contribuir com informações acerca do efeito de dois biocidas DCOIT e diclofluanida em microalgas marinhas com importância econômica e ecológica.

REFERENCIAL TEÓRICO

Bioincrustação

A bioincrustação marinha consiste no acúmulo de organismos vivos, por adesão, crescimento e reprodução, em superfícies naturais ou artificiais submersas ou semi-submersas na água (Cao et al., 2011). Este processo de colonização ocorre em etapas (Figura 1): primeiro ocorre a formação de um filme abiótico condicionante na superfície, causado pela adsorção de proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos. Então, bactérias se aderem e, aos poucos, desenvolvem um biofilme através da secreção de substâncias extracelulares. Subsequentemente, diatomáceas e esporos de macroalgas se acumulam na superfície do biofilme, que disponibiliza nutrientes para esses organismos. Por último, larvas de invertebrados marinhos se aderem e crescem junto com as macroalgas (Amara, 2018; Xie et al., 2019).

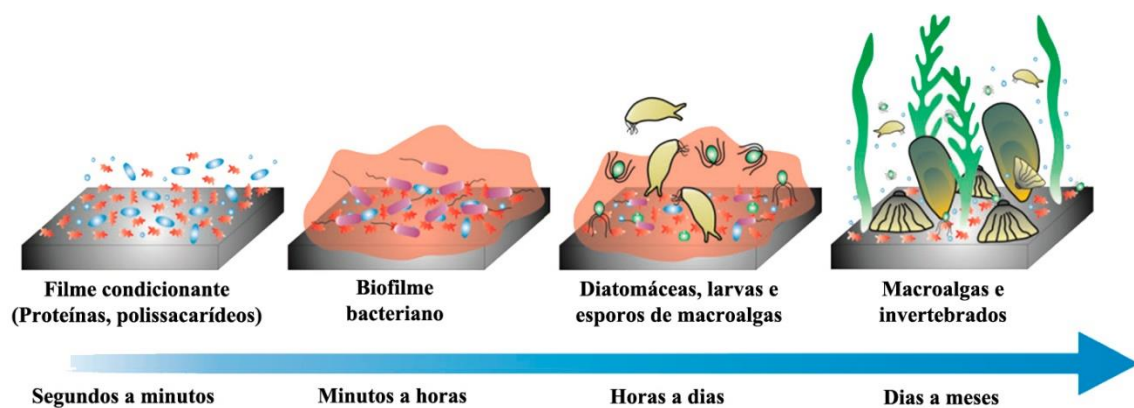


Figura 1. Típico processo de bioincrustação marinha (traduzido de Xie et al., 2019)

Onipresente no ambiente marinho, a bioincrustação pode trazer vários prejuízos para a indústria marítima e a aquicultura como: reduzir o desempenho de embarcações aumentando o arrasto da superfície reduzindo sua velocidade, capacidade de manobra, elevando o consumo de combustível e causando o aumento das emissões de gases de efeito estufa e material particulado; aceleração da corrosão de substratos metálicos; transporte de espécies marinhas invasoras; redução da troca de água, constrição e aumento do peso das redes de pesca, gaiolas e tanques-rede (Ferreira et al., 2004; Callow e Callow, 2011; Dafforn et al., 2011; Amara et al, 2018; Lewis, 2018). Até o momento, várias abordagens anti-incrustantes foram desenvolvidas para combater a bioincrustação, incluindo

revestimentos, limpeza mecânica, eletrólise da água do mar, irradiação ultravioleta (UV), tratamento ultrassônico, entre outros, sendo que uso de revestimentos (sistemas anti-incrustantes) é a estratégia mais eficaz, econômica e amplamente utilizada (Xie et al., 2019)

Tintas anti-incrustantes

Métodos de evitar a bioincrustação são desenvolvidos e aprimorados desde as civilizações mais antigas, como por exemplo, os povos fenícios que aplicavam uma mistura de arsênio, enxofre e óleo; e os gregos que aplicavam alcatrão e cera nas embarcações (Lewis, 2018). Entre o final do século XVIII e início do século XIX, tintas contendo cobre, arsênio e mercúrio foram amplamente aplicadas em embarcações. Os óxidos de cobre e de zinco foram os primeiros biocidas utilizados regularmente em tintas anti-incrustantes sendo, portanto, denominados de “primeira geração”, porém, apesar da eficácia, apresentavam baixa duração de aproximadamente 18 meses (Lewis, 1998; Godoi et al., 2003; Readman, 2006; Fernandez e Pinheiro, 2007; Hellio e Yebra, 2009; Dafforn et al., 2011).

Após a segunda guerra mundial, na década de 60, novas formulações à base de organoestânicos como o tributilestanho (TBT) mostraram-se mais duradouras e eficazes na prevenção de incrustações, sendo conhecidas como compostos de “segunda geração”. Estes sistemas anti-incrustantes continham óxido de bis-tributilestanho ou haletos de tributilestanho misturados às formulações de tintas e foram amplamente empregados na década de 80, chegando a revestir mais de 90% dos cascos de navio em operação no mundo (Readman, 2006; Castro et al., 2011).

No início da década de 80 descobriu-se que as tintas anti-incrustantes a base de organoestânicos causavam efeitos prejudiciais na biota marinha e de água doce. Inicialmente, foi reportado na França um grande declínio do número de ostras em fazendas de cultivos, além de anomalias no seu desenvolvimento larval e malformação de concha, afetando 80-100% das ostras. Posteriormente o impossexo (o desenvolvimento de características masculinas em gastrópodes femininos) foi identificado como um dos principais e mais conhecido efeito negativo da contaminação por TBT, resultando no banimento desse composto, inicialmente em alguns países (Alzieu et al., 1986; Castro et al., 2011; Dafforn et al., 2011).

Somente em novembro de 2001, a Organização Marítima Internacional (IMO) banuiu o uso de TBT como anti-incrustante, proibindo sua aplicação em todas as embarcações após 1 de janeiro de 2003 e requeriu sua ausência como revestimento ativo em todas as embarcações após 1 de janeiro de 2008 (IMO, 2001). Conseqüentemente, questões ambientais e econômicas, além dos benefícios para a indústria naval, tiveram que ser consideradas (de Mora e Pelletier, 1997).

Segundo Hellio e Yebra (2009), após décadas de estudos ambientais e ecotoxicológicos, sabe-se que os organoestânicos pertencem aos poluentes mais tóxicos conhecidos para a vida aquática. Os efeitos ecotoxicológicos dependem da fração biodisponível de poluentes e das concentrações nos locais alvo (sítios de ação), que induzem efeitos moleculares que se propagam para uma variedade de manifestações tóxicas em organismos. As principais perturbações destacadas para o TBT foram: disfunção da homeostase do cálcio, inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e síntese de ATP, inibição da fotofosforilação em cloroplasto e de ATPases e monooxigenases do citocromo P450. Além disso, esse composto pode ser incorporado aos tecidos do zooplâncton filtrante, dos invertebrados que os consomem e, eventualmente, em organismos superiores, como peixes, aves aquáticas e mamíferos, onde se acumulam.

Desde o final da década de 80, após a descoberta dos danos do TBT ao meio ambiente, uma “terceira geração” de sistemas anti-incrustantes livres de organoestânicos tem sido aplicada, sendo que a expansão e uso mundial destes compostos ocorreu a partir do banimento do TBT, em 2003 (Hellio e Yebra, 2009; Castro et al, 2011). Esta nova geração inclui diferentes classes de ingredientes ativos, objetivando alta eficiência com menores impactos no ambiente do que as gerações anteriores (Fernandez e Pinheiro, 2007; Castro et al., 2011; Martins e Vargas, 2013). Exemplos destes biocidas empregados em sistemas anti-incrustantes são: Irgarol 1051, diuron, DCOIT, clorotalonil, diclofluanida, TCMTB, tiram, piritiona de zinco (ZnPT) e piritiona de cobre (CuPT) (Hellio e Yebra, 2009; Castro et al., 2011).

DCOIT

O DCOIT (4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one, CAS 64359-81-5) é o ingrediente ativo do sistema anti-incrustante SeaNine 211, um dos mais comercializados mundialmente (Chen e Lam, 2017). Pertence ao grupo das isotiazolinonas, compostos

orgânicos que tem grande importância industrial, devido principalmente às suas propriedades antifúngicas e antibacterianas (Silva et al., 2020). Produzido pela empresa Rohm and Haas (Dow Chemical Co.), o anti-incrustante foi anunciado na década de 90 como uma alternativa mais ecológica em comparação aos compostos organoestânicos devido à sua rápida degradação no ambiente (Jacobson e Willingham, 2000; Roberts, 2009; Castro et al, 2011; Chen e Lam, 2017).

Este biocida possui Kow de 2,85, baixa solubilidade em água (0,0065 mg/L), pressão de vapor 7.4×10^{-6} mmHg a 25 °C e uma rápida taxa de degradação na água do mar (Thomas e Brooks, 2010). Segundo Jacobson e Willingham (2000), a biodegradação do DCOIT é a principal responsável por sua rápida meia-vida, geralmente < 24h na água do mar e < 1h no sedimento, sob condições aeróbicas e anaeróbicas, sendo que uma vez lançado no ambiente aquático, o biocida rapidamente se particiona no sedimento, permanecendo imóvel e não disponível. No entanto, segundo Chen e Lam (2017), outros estudos documentados encontraram resultados contraditórios quanto à sua degradabilidade, com cinética biodegradativa mais lenta em amostras de água do mar natural de outras regiões do mundo, como 2,6 dias na Dinamarca (Larsen et al., 2003), > 4 dias em Hong Kong (Chen et al., 2015), 10 dias no Japão (Harino et al., 2005a), 8,5 dias no Reino Unido (Callow e Willingham, 1996) e 13,1 dias na Grécia (Sakkas et al., 2002). Além disso, o potencial degradativo do DCOIT depende de outros fatores ambientais, como pH, temperatura, luz solar e oxigênio dissolvido. Embora a biodegradação seja considerada a principal via de eliminação para DCOIT, outras condições ambientais também influenciarão marcadamente sua taxa de degradação no ambiente marinho. Portanto, a distinta cinética degradativa do DCOIT em diferentes áreas indica que o uso do DCOIT em todo o mundo pode levar à poluição do meio ambiente marinho em certos locais, onde o DCOIT não seja degradado com rapidez suficiente para evitar os riscos acumulativos (Chen e Lam, 2017). A biodegradação deste biocida envolve a clivagem do anel de isotiazolona e a subsequente oxidação dos metabólitos alquilados. Os principais produtos de degradação são o ácido N-octil oxâmico, 4,5-dicloro-tiazol e o ácido N-octil carbâmico, que apesar de serem relatados com toxicidades muito mais baixas (Thomas, 2009; Chen e Lam, 2017), observou-se que as soluções do DCOIT ainda eram altamente tóxicas para larvas da espécie de ouriço *Paracentrotus lividus* mesmo após exposição direta à luz solar (8 h) ou após 28 h de incubação no escuro (Bellás, 2007). Além disso, este autor registrou um pequeno

aumento na toxicidade do Sea-Nine no crescimento larval desses organismos em comparação com as soluções controle com o DCOIT sem degradação. Assim, embora a degradação na água do mar possa ser rápida, os produtos de degradação podem exercer alguns efeitos tóxicos nos estágios iniciais de desenvolvimento dos invertebrados marinhos.

Diclofluanida

O diclofluanida (N-dichlorofluoromethylthio-N0,N0-dimethyl-N-phenylsulphamide, CAS 1085-98-9) é um fungicida usado principalmente para controlar a proliferação de fungos na agricultura, mas também tem sua aplicação como biocida de tintas anti-incrustantes (Sakkas et al., 2001; Hamwijk et al., 2005). Este fungicida foi introduzido em 1965 pela Bayer AG (marcas registradas são "Euparen" e "Elvaron"), como um fungicida protetor com um amplo espectro contra o mofo cinza, oídio e outros, usado para controlar a deterioração de vegetais (Zhou et al., 2016). Com a proibição do TBT como biocida de tintas anti-incrustantes, o diclofluanida começou a ser introduzido também como biocida de reforço para evitar a bioincrustação em estruturas marítimas, fazendo parte da 3ª geração desses compostos (Sakkas et al., 2001). Pertencente ao grupo químico dos organoclorados, apresenta um Kow de 3,7 com baixa solubilidade em água (0,006 mg/L), e pressão de vapor $1,57 \times 10^{-7}$ mmHg a 25 °C. A sua taxa de fotodegradação é muito alta, com tempos de meia-vida na água variando de 8 a 83 horas em diferentes condições de luminosidade e meios aquosos (água marinha, de rio, lago e destilada) (Sakkas et al., 2001). Com base em estudos de laboratório, não é esperado nenhum acúmulo de diclofluanida nos sedimentos (Schouten et al., 2005).

Os principais produtos de degradação ocorridos por fotodegradação, hidrólise e degradação anaeróbia são N,N-dimetil-NV-fenil-sulfamida (DMSA), n-diclorofluorometiltio-anilina e anilina (Sakkas et al., 2001; Thomas et al., 2003), sendo o DMSA o principal subproduto. A um pH > 7, a diclofluanida é rapidamente hidrolisada em DMSA, sendo este metabólito mais estável, podendo permanecer longos períodos sem sofrer hidrólise. o DMSA tem toxicidade baixa para os organismos aquáticos, enquanto a diclofluanida é muito tóxica (Hamwijk et al., 2005). Segundo relatório da Agência Européia de Produtos Químicos (ECHA), em estudos de toxicidade aguda usando o microcrustáceo *Daphnia magna*, a CE₅₀ (48 h) foi 0,42 mg L⁻¹ para a diclofluanida, CE₅₀

(48 h) do metabólito principal DMSA foi $> 95,6 \text{ mg L}^{-1}$ e a toxicidade de N, N-DMS foi ainda mais baixa com CE_{50} (48 h) $> 100 \text{ mg L}^{-1}$, comprovando que os produtos de degradação da diclofluanida apresentam menor toxicidade (ECHA, 2016).

Contaminação ambiental por biocidas de sistemas anti-incrustantes

Apesar de apresentarem degradação mais rápida quando comparados a outros grupos de poluentes orgânicos de interesse ambiental, os biocidas de 3ª geração foram detectados no meio ambiente em diversos países nas últimas décadas. O biocida irgarol foi o primeiro a ganhar destaque como potencial contaminante ambiental, com Readman et al. (1993) encontrando concentrações acima de 1700 ng L^{-1} em marinas na França. Desde então, várias pesquisas analisaram amostras de água e sedimentos para a detecção de biocidas, incluindo DCOIT e diclofluanida. O Quadro 1 mostra concentrações máximas destes dois biocidas, além do DMSA (gerado pela decomposição da diclofluanida), encontradas desde o ano de 1996, tanto na água, quanto nos sedimentos.

Quadro 1. Concentrações ambientais dos biocidas DCOIT e diclofluanida (DCF).

Composto	País	Ano	Água (ng L ⁻¹) *	Sedimento (ng g ⁻¹) *	Referência	
DCOIT	Espanha	1996-1999	> 3700	-	Martinez et al. (2001)	
		2000	-	4	Martinez e Barceló (2001)	
		2010	ND	-	Giráldez et al. (2013)	
	Reino Unido	1998	ND	-	Thomas (1998)	
	Dinamarca	1998	283	-	Steen at al. (2004)	
	Grécia	1999-2000	49	-	Sakkas et al. (2002)	
	Japão	2002-2003	4	2,40	Harino et al. (2005b)	
		2004-2005	-	140	Tsunemasa et al. (2006)	
		2005	-	150	Harino et al. (2007)	
		2006-2007	-	1,20	Harino et al. (2009)	
	2007	ND	7,20	Eguchi et al. (2010)		
	Tailândia	2004	-	0,09	Harino et al. (2006)	
	Porto Rico	2004	ND	-	Carbery et al. (2006)	
	EUA	2004	ND	-	Carbery et al. (2006)	
	Coréia	2010-2011	-	281	Kim et al. (2014)	
		2014	24	117	Lam et al. (2017)	
	Alemanha	2013	ND	-	Daehne et al. (2017)	
Panamá	2016	ND	81,6	Batista-Andrade et al. (2016, 2018)		
	2014	-	130	Soroldoni et al. (2017)		
	2015	-	75	Abreu et al. (2020)		
Brasil	NI	-	41,14	Soares et al. (2021)		
	DCF	Espanha	1996-1999	600	-	Martinez et al (2001)
			2000	-	11	Martinez e Barceló (2001)
2010			ND	-	Giráldez et al. (2013)	
Reino Unido		1998	ND	-	Thomas (1998)	
		1999	-	688	Voulvoulis et al. (2000)	
Grécia		1999-2000	-	195	Albanis et al. (2002)	
		1999-2000	284	-	Sakkas et al. (2002)	
		2003	36 (DMSA)	-	Hamwijk et al. (2005)	
Japão		2005	-	14	Harino et al. (2007)	
Austrália		2006	ND	-	Reitsema (2008)	
Porto Rico		2004	ND	-	Carbery et al. (2006)	
Coréia	2006-2009	-	29,8	Lee at al. (2011)		
	2010-2011	-	ND	Kim et al. (2014)		
EUA	2004	ND	-	Carbery et al. (2006)		
Itália	2010	ND	-	Ansanelli et al. (2017)		
Alemanha	2013	105 (DMSA)	-	Daehne et al. (2017)		
Panamá	2016	ND	ND	Batista-Andrade et al. (2016)		
	2015	-	16	Abreu et al. (2020)		
	2018	240 (DMSA)	ND (DMSA)	Viana et al. (2019)		
Brasil	NI	-	ND	Soares et al. (2021)		

ND = não detectado (menor que o limite de detecção); NI = não informado.

* As unidades utilizadas na tabela foram as usuais de cada tipo de análise, água em ppt e sedimento em ppb.

Avaliação de toxicidade

Testes de toxicidade são ferramentas importantes para avaliar a qualidade das águas, a carga poluidora de efluentes e substâncias com potencial tóxico, além de estabelecer uma relação causal entre o efeito biológico e a substância ou material testado, uma vez que somente as análises físico-químicas e químicas tradicionais não são suficientes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes (Costa et al., 2008; Taylor e Scroggins, 2013).

Os efeitos tóxicos medidos em testes de toxicidade podem incluir qualquer resposta (*endpoint*) exibida por um organismo teste ou população, resultante de um estímulo químico, como letalidade, crescimento, reprodução, entre outros. A quantificação da toxicidade é mais comumente avaliada a partir da resposta de um organismo às mudanças na concentração dos agentes tóxicos (dose-resposta). Estas relações de causa e efeito fornecem a base para a avaliação de riscos apresentados pelos contaminantes (Walker et al., 2012; Fox, 2016).

Muitos testes de toxicidade expressam seus resultados através de estimativas de concentrações que causarão uma resposta tóxica no organismo (ou população), como a concentração mediana que pode causar uma determinada porcentagem de letalidade, efeito ou inibição, como CE₁₀ ou CE₅₀ (respectivamente, concentrações que causam 10% e 50% de efeito nos organismos expostos)

Em função do maior número de amostras ambientais contendo herbicidas, fungicidas e outros produtos químicos, os testes de ecotoxicidade com microalgas são particularmente úteis nos programas de avaliação da qualidade ambiental, tendo em vista a importância ecológica desse grupo, além de certas características das microalgas que as qualificam como excelentes bioindicadores e/ou organismos teste para ensaios de toxicidade, como por exemplo o fato de seu tamanho microscópico possibilitar a obtenção de respostas em nível de população e comunidade; são onipresentes em todos os corpos d'água; podem ser cultivados em condições controladas; possuem curto tempo de geração, respondendo rapidamente às mudanças ambientais. Além disso, os testes com microalgas são geralmente sensíveis, rápidos e de baixo custo (Klaine et al., 2002; Nie et al., 2009; Cid et al., 2012; Anderson e Phillips, 2016). Estes bioensaios podem ajudar a fornecer

informações sobre os efeitos desses poluentes no ambiente para, a partir delas, estabelecer medidas para a prevenção ou mitigação da poluição aquática (Cid et al., 2011)

Fitotoxicidade

Com a detecção mais frequente dos biocidas de terceira geração no ambiente, a toxicidade desses compostos em microalgas passou a ser mais investigada, com a maior parte dos estudos concentrando-se nos herbicidas diuron e irgarol (Martins et al., 2018), que por serem inibidores de fotossíntese, apresentam alta toxicidade para as microalgas (Thomas e Brooks, 2010; Dafforn et al., 2011). Entretanto, outros compostos anti-incrustantes como DCOIT e diclofluanida também podem causar efeitos tóxicos em vários grupos de organismos, incluindo microalgas. O Quadro 2 reúne os efeitos descritos destes dois biocidas em diferentes espécies de microalgas.

A maioria dos ensaios padronizados com microalgas (95% ou mais), focam na inibição do crescimento como efeito tóxico a ser observado. O crescimento da população de microalgas pode ser monitorado diretamente pela contagem de células sob um microscópio em câmaras especiais, ou contadores eletrônicos de partículas, ou ainda utilizando citometria de fluxo. Também podem ser utilizadas estimativas indiretas como a densidade ótica (absorbância) da cultura, o peso seco ou o teor de clorofila *a* (por fluorimetria ou espectrofotometria) (Neuwoehner et al., 2008; Cid et al, 2012).

A clorofila é um dos principais pigmentos fotossintéticos e base da fotossíntese das algas, sendo a clorofila *a* a mais abundante e importante na maioria das algas (Gan, 2019). Além do seu uso para estimar indiretamente crescimento ou biomassa algal, devido a sua influência direta na fotossíntese, análises de clorofila *a* são bastante utilizadas para determinar se houve interferência na atividade fotossintética de microalgas, quando expostas aos poluentes. Os principais métodos para se quantificar o teor de clorofila *a* são a espectrofotometria, fluorimetria e cromatografia (dos Santos et al., 2003).

Quadro 2. Valores de CE₅₀ de microalgas expostas ao DCOIT e diclofluanida (DCF).

	Grupo	Espécie	CE ₅₀	Efeito	Referência	
DCOIT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i> sp.	0,90 (72 h)	Inibição do crescimento	Devilla et al. (2005)	
	Bacillariophyta	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0,32 (72 h)		Onduka et al. (2013)	
		<i>Halamphora coffeaeformis</i>	3 (48 h)		Jacobson e Willingham (2000)	
		<i>Nitzschia pungens</i>	267,4 (96 h)		Jung et al. (2016)	
		<i>Skeletonema costatum</i>	13,9 (96 h);		Mochida e Fuji (2009);	
			0,22 (72 h)		Onduka et al. (2013)	
	Chlorophyta	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3,9 (72 h)		Onduka et al. (2013)	
		<i>Raphidocelis subcapitata</i>	32 (120 h)		Mochida e Fuji (2009)	
		<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	107 (24 h)		Arrhenius et al. (2006);	
			175 (24 h)		Neuwoehner et al. (2008)	
			423,35 (24 h)			Inibição do PSII
			177,8 (24 h)			Inibição da divisão celular
			1354,7 (24 h)		Crescimento total do volume celular	
			<i>Selenastrum capricornutum</i>		3 (30 h) 3 (72 h);	Fernandez-Alba et al. (2002);
	160 (72 h)				Okamura e al. (2003)	
	1,6 (72 h)				Onduka et al. (2013)	
	Haptophyta	<i>Emiliania huxleyi</i>	0,35 (72 h)		Devilla et al. (2005)	
	DCF ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bacillariophyta	<i>Nitzschia pungens</i>		377 (96 h)	Inibição do Crescimento
<i>Skeletonema costatum</i>			<97700 (DMSA 72 h)	ECHA (2016)		
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>			193 (72 h)	Carteau et al. (2014)		
Chlorophyta		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	25,32 (24 h) 31,99 (48 h) 37,65 (72 h)	Almeida et al. (2017)		
		<i>Desmodesmus subspicatus</i>	15000 (72 h)	ECHA (2016)		
		<i>Selenastrum capricornutum</i>	64 (30 h) 133 (72 h)	Fernandez-Alba et al. (2002)		

Apesar da facilidade e baixo custo de alguns métodos aplicados, o uso somente da inibição do crescimento como *endpoint*, pode nos trazer algumas lacunas, como por

exemplo, a dificuldade em determinar se um certo estressor causa morte celular (efeito algicida) ou apenas inibição da divisão celular (efeito algistático) (Bechèt et al., 2015).

A viabilidade celular é um parâmetro que permite a quantificação de células viáveis com rapidez e precisão. A determinação deste indicativo, juntamente com a avaliação do estado fisiológico em culturas de microalgas são necessárias em vários campos de pesquisas. A viabilidade de células pode ser estimada usando uma variedade de métodos, sendo que, dentre os mais comuns, estão uso de substâncias que coram as células ou determinadas estruturas celulares. Procedimentos de coloração já foram usados por mais de 100 anos para diferenciar células vivas de células mortas, podendo ser com ou sem fluorescência, vitais (coram somente células vivas) ou inviáveis (coram células não viáveis), sendo que apesar de mecanismos de ação diferentes, a maioria depende da funcionalidade da membrana celular (Markelova et al., 2000; Capasso et al., 2003; Garvey et al. 2007, Gallo-Villaneueva et al., 2011; Zetsche e Meysman, 2012; Bechèt et al., 2015).

O vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina), é um corante vital não fluorescente, solúvel em água, fracamente catiônico, que passa através da membrana plasmática intacta e se concentra nos lisossomas de células viáveis, enquanto em células vegetais, pode se acumular no citoplasma e vacúolos (Triglia et al., 1991; Zetsche e Meysman, 2012). Segundo Zetsche e Meysman (2012), o vermelho neutro é o corante vital menos tóxico e é amplamente utilizado, sendo aplicado com sucesso em copépodes e outros representantes do zooplâncton, além de microalgas. Para da Luz et al., (2016), o uso do vermelho neutro foi útil para analisar rapidamente a viabilidade das microalgas *Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum* após exposição ao herbicida glifosato, podendo ser considerado uma ferramenta eficaz para medições de toxicidade nessas algas.

Espécies diferentes de microalgas podem responder de forma distinta aos compostos tóxicos e, portanto, uma abordagem comparativa com várias espécies taxonomicamente diferentes se faz necessária. A escolha de uma espécie geralmente depende de sua disponibilidade, facilidade de manutenção/cultivo e aplicação (Klaine et al., 2002; Lourenço, 2006). Algumas espécies de microalgas marinhas frequentemente utilizadas nos ensaios, inclusive recomendadas em normas técnicas brasileiras como a ABNT NBR 16181 (2013), são: as diatomáceas *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Minutocellus polymorfus* e *Chaetoceros*

calcitrans; as clorófitas *Dunaliella tertiolecta* e *Tetraselmis chuii*; e a primnesiófita *Isochrysis galgana*.

Microalgas utilizadas

Dunaliella salina e *Chlorella minutissima* são microalgas verdes unicelulares pertencente à família Chlorophyceae. A espécie *D. salina* é cosmopolita, tem células biflageladas, tamanho variando de 16 – 24 μm e não contém parede celular rígida. Esta microalga é conhecida por acumular carotenóides sob diversas condições de estresse, tendo grande importância biotecnológica, com aplicações na área de saúde e nutrição (Murthy et al., 2005; Ben-Amotz et al., 2009).



Figura 2. Células de *Dunaliella salina*. Fonte: Feng et al., 2013.

A espécie *C. minutissima*, também cosmopolita, não possui flagelos, é esférica, tem diâmetro variando entre 5-10 μm e possui uma rígida parede celular. As microalgas do gênero *Chlorella* são muito utilizadas na biotecnologia, servindo para consumo humano, no tratamento de resíduos e recuperação de água, além de ser considerada uma das matérias-primas promissoras para biocombustíveis e biofertilizantes (Huss et al., 1999; Yu et al., 2016).

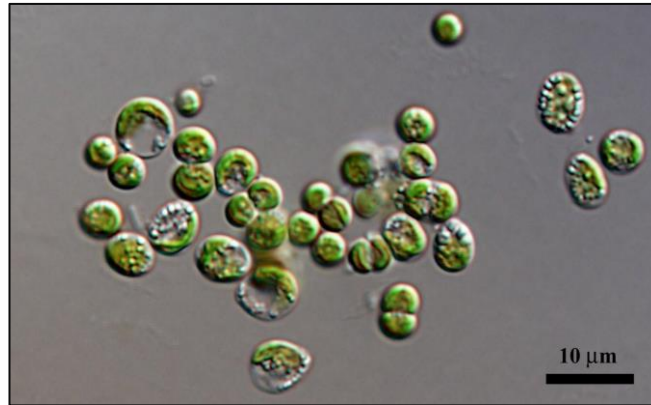


Figura 3. Células de *Chlorella minutissima*. Fonte: CCALA, 2021.

A microalga *Chaetoceros muelleri* é uma diatomácea marinha cosmopolita pertencente à família Chaetocerotaceae. Possui uma morfologia simples comparada às espécies do mesmo gênero, com valvas fracamente silicificadas, tamanho pequeno (4 – 20 μm) e quatro largas setas nas extremidades. É uma das espécies mais recomendadas em todo o mundo para a alimentação larval de crustáceos e moluscos e além disso, também é considerada uma das microalgas mais adequadas para a produção de biomassa e lipídios em grande escala (Reinke, 1984; Goksan et al. 2003; Wang et al., 2014).



Figura 4. Células de *Chaetoceros muelleri*. Fonte: Derner, 2006.

As diatomáceas do gênero *Thalassiosira* são importantes componentes do fitoplâncton e dominam as florações em águas eutróficas. *Thalassiosira pseudonana* é uma pequena diatomácea cêntrica com 3–5 μm de diâmetro e ampla distribuição geográfica. É uma espécie estuarina capaz de crescer tanto em água doce como marinha. Foi a primeira diatomácea a ter seu genoma totalmente sequenciado, o que estabeleceu esta espécie como

principal modelo para estudos experimentais e genômicos de diatomáceas (Armbrust et al., 2004; Alverson et al., 2011; Baek et al., 2011).

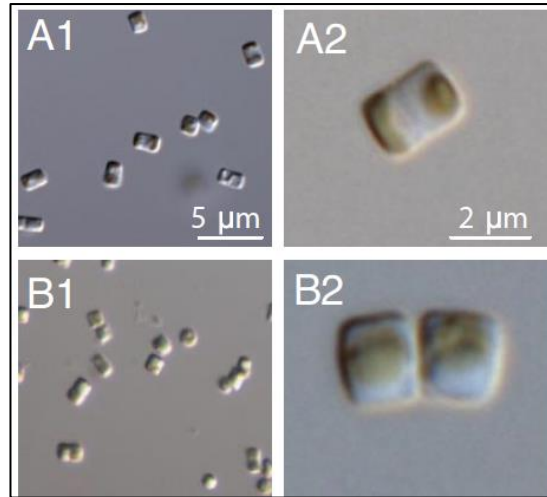


Figura 5. Células de *Thalassiosira pseudonana*. Fonte: Mock et al., 2008.

OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar os efeitos da exposição crônica de curta duração (72h) aos biocidas de sistemas anti-incrustantes DCOIT e diclofluanida para as microalgas marinhas *Chaetoceros muelleri*, *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Thalassiosira pseudonana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os efeitos da exposição aos biocidas DCOIT e diclofluanida sobre o crescimento microalgal, teor de clorofila *a* e viabilidade celular das espécies de microalgas marinhas;
- Indicar as concentrações de efeito (CE₁₀, CE₅₀) dos biocidas DCOIT e diclofluanida sobre a densidade celular e teor de clorofila *a* para as espécies de microalgas marinhas;
- Avaliar a utilização das espécies expostas como organismos-teste para ensaios de toxicidade crônica com biocidas;
- Comparar os efeitos dos biocidas entre as diferentes espécies de microalgas e diferentes *endpoints*.

REFERÊNCIAS

ABNT. NBR 16181., 2013. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com microalgas marinhas. Rio de Janeiro. 27 p.

Abreu, F.E.L., Lima da Silva, J.N., Castro, Í.B., Fillmann, G., 2020. Are antifouling residues a matter of concern in the largest South American port? *Journal of Hazardous Materials*. 398. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122937>

Albanis, T.A., Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., 2002. Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. *Chemosphere* 48, 475–485. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00134-0)

Almeida, A.C.G, Petersen, K., Langford, K., Thomas, K.V., Tollefsen, K.E., 2017. Mixture toxicity of five biocides with dissimilar modes of action on the growth and photosystem II efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80:16-18, 971-986. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1352176>

Alverson, A.J., Beszteri, B., Julius, M.L., Theriot, E.C., 2011. The model marine diatom *Thalassiosira pseudonana* likely descended from a freshwater ancestor in the genus *Cyclotella*. *BMC Evolutionary Biology* 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-125>

Alzieu, C.L., Sanjuan, J., Deltreil, J.P., Borel, M., 1986. Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies. *Mar. Pollut. Bull.* 17, 494–498.

Amara, I., Miled, W., Slama, R. B., Ladhari, N., 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 57, 115–130. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.001>

Anderson, B., Phillips, B., 2016. Saltwater toxicity tests. In: Blasco, J., Chapman, P.M., Campana, O., Hampel, M., 2016. *Marine Ecotoxicology: Current Knowledge and Future Issues*. Academic Press, London. pp. 167-197.

Ansanelli, G., Manzo, S., Parrella, L., Massanisso, P., Chiavarini, S., di Landa, G., Ubaldi, C., Cannarsa, S., Cremisini, C., 2017. Antifouling biocides (Irgarol, Diuron and

dichlofluanid) along the Italian Tyrrhenian coast: Temporal, seasonal and spatial threats. *Regional Studies in Marine Science* 16, 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2017.09.011>

Armbrust, V.E., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E. et al. 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* (New York, N.Y.). 306. 79–86. <https://doi.org/10.1126/science.1101156>.

Arrhenius, Å., Backhaus, T., Grönvall, F., Junghans, M., Scholze, M., Blanck, H., 2006. Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: Mixture toxicity studies with TBT, Irgarol, and Sea-Nine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 335–345. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-1057-9>

Baek, S.H., Jung, S.W., Shin, K., 2011. Effects of temperature and salinity on growth of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) isolated from ballast water. *Journal of Freshwater Ecology* 26, 547–552. <https://doi.org/10.1080/02705060.2011.582696>

Batista-Andrade, J.A., Caldas, S.S., Batista, R.M., Castro, I.B., Fillmann, G., Primel, E.G., 2018. From TBT to booster biocides: Levels and impacts of antifouling along coastal areas of Panama. *Environmental Pollution* 234, 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.063>

Batista-Andrade, J.A., Caldas, S.S., de Oliveira Arias, J.L., Castro, I.B., Fillmann, G., Primel, E.G., 2016. Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones. *Marine Pollution Bulletin* 112, 415–419. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.045>

Béchet, Q., Feurgard, I., Guieysse, B., Lopes, F., 2015. The colorimetric assay of viability for algae (CAVA): a fast and accurate technique. *Journal of Applied Phycology* 27, 2289–2297. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0508-y>

Bellas, J., 2007. Toxicity of the booster biocide Sea-Nine to the early developmental stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquatic Toxicology* 83, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.011>

Ben-Amotz, A., Polle, J.E.W., Rao, D.V.S., 2009. The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology-Science Publishers. 575 p.

Callow, M.E., Willingham, G.L., 1996. Degradation of antifouling biocides. *Biofouling* 10, 239–249. <https://doi.org/10.1080/08927019609386283>

Callow, J.A., Callow, M.E., 2011. Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms1251>

Cao, S., Wang, J.D., Chen, H.S., Chen, D.R., 2011. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin*, Vol 56, 598-612. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4158-4>

Capasso, J.M., Cossío, B.R., Berl, T., Rivard, C.J., Jiménez, C., 2003. A colorimetric assay for determination of cell viability in algal cultures. *Biomolecular Engineering* 20, 133–138. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00037-6)

Carbery, K., Owen, R., Frickers, T., Otero, E., Readman, J., 2006. Contamination of Caribbean coastal waters by the antifouling herbicide Irgarol 1051. *Marine Pollution Bulletin* 52, 635–644. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.10.013>

Carteau, D., Vallée-Réhel, K., Linossier, I., Quiniou, F., Davy, R., Compère, C., Delbury, M., Fay, F., 2014. Development of environmentally friendly antifouling paints using biodegradable polymer and lower toxic substances. *Progress in Organic Coatings* 77, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2013.11.012>

Castro, Í.B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático, *Quim. Nova* 34, No 6, 1021-1031. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600020>

CCALA. 2021. Células de *Chlorella minutíssima*. <https://ccala.butbn.cas.cz/en>. Disponível em: <<https://ccala.butbn.cas.cz/en/chlorella-minutissima-fott-novakova>> Acesso em: 14/09/2021.

Chen, L., Xu, Y., Wang, W.X., Qian, P.Y., 2015. Degradation kinetics of a potent antifouling agent, butenolide, under various environmental conditions. *Chemosphere* 119, 1075–1083. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.056>

Chen, L., Lam, J.C.W., 2017. SeaNine 211 as antifouling biocide: A coastal pollutant of emerging concern. *Journal of Environmental Sciences (China)* 61, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.03.040>

Cid, A.; Prado, R.; Rioboo, C.; Suárez-Bregua, P.; Herrero, C., 2012. Use of Microalgae as Biological Indicators of Pollution: Looking for New Relevant Cytotoxicity Endpoints. In: Johansen, M.N. *Microalgae: biotechnology, microbiology and energy*. Nova Science Publishers, New York. pp. 311-324.

Costa, C.R.; Olivi, P.; Botta, C.M.R.; Espindola, E.L.G., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7), 1820-1830. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>

Daehne, D., Fürle, C., Thomsen, A., Watermann, B., Feibicke, M., 2017. Antifouling biocides in German marinas: Exposure assessment and calculation of national consumption and emission. *Integrated Environmental Assessment and Management* 13, 892–905. <https://doi.org/10.1002/ieam.1896>

Dafforn, K.A., Lewis, J.A., Johnston, E.L., 2011. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin* 62, 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.012>

Da Luz, D.S., da Silva, D.G., Souza, M.M., Giroldo, D., Martins, C.D.M.G., 2016. Efficiency of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Phycological Research* 64, 56–60. <https://doi.org/10.1111/pre.12114>

De Mora, S. J., Pelletier, E., 1997. Environmental Tributyltin Research: Past, Present, Future. *Environmental Technology*, 18(12), 1169–1177. <https://doi.org/10.1080/09593331808616637>

Derner, R.B., 2006. Efeitos de fontes de carbono no crescimento e composição química das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Tese (Doutorado) – Pós- Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. 158 p.

Devilla, R.A., Brown, M.T., Donkin, M., Tarran, G.A., Aiken, J., Readman, J.W., 2005. Impact of antifouling booster biocides on single microalgal species and on a natural marine phytoplankton community. *Marine Ecology Progress Series* 286, 1–12. <https://doi.org/10.3354/meps286001>

Dos Santos, A.C.A., Calijuri, M.C., Moraes, E.M., Adorno, M.A.T., Falco, P.B., Carvalho, D.P., Deberdt, G.L.B., Benassi, S.F., 2003. Comparison of three methods for chlorophyll determination: spectrophotometry and fluorimetry in samples containing pigment mixtures and spectrophotometry in samples with separate pigments through high performance liquid chromatography. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 15 (3), 7-18.

ECHA, 2016. Regulation (EU) No 528/2012 Concerning the Making Available on the Market and Use of Biocidal Products. Assessment Report for Dichlofluanid. United Kingdom. 68 p.

Eguchi, S., Harino, H., Yamamoto, Y., 2010. Assessment of antifouling biocides contaminations in Maizuru Bay, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 684–693. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9394-8>

Feng, S., Feng, W., Zhao, L., Gu, H., Li, Q., Shi, K., Guo, S., Zhang, N. 2013. Preparation of transgenic *Dunaliella salina* for immunization against white spot syndrome virus in crayfish. *Archives of Virology*, 159(3), 519–525. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1856-7>

Fernandez, M.A., Pinheiro, F.M., 2007. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. *International Journal of Environment and Health* 1, 427–448. <https://doi.org/10.1504/IJENVH.2007.017875>

Fernández-Alba, A.R., Hernando, M.D., Piedra, L., Chisti, Y., 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays, *Analytica Chimica Acta* 456, 303-312. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00037-5)

Ferreira, C.E.L., Gonçalves, J.E.A., Coutinho, R., 2004. Cascos de navios e plataformas como vetores na introdução de espécies exóticas. In: SILVA, J.S.V. & SOUZA, R.C.C.L. (orgs.) *Água de lastro e bioinvasão*. Interciência, Rio de Janeiro, p. 144-155.

Fox, D.R., 2016. Contemporary Methods for Statistical Design and Analysis. In: Blasco, J., Chapman, P.M., Campana, O., Hampel, M., 2016. *Marine Ecotoxicology: Current Knowledge and Future Issues*. Academic Press, London. Pp. 35-70.

Gallo-Villanueva, R.C., Jesús-Pérez, N.M., Martínez-López, J.I., Pacheco, A., Lapizco-Encinas, B.H., 2011. Assessment of microalgae viability employing insulator-based dielectrophoresis. *Microfluidics and Nanofluidics* 10, 1305–1315. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0764-3>

Gan, T., Zhao, N., Yin, G., Chen, M., Wang, X., Liu, J., Liu, W., 2019. Optimal chlorophyll fluorescence parameter selection for rapid and sensitive detection of lead toxicity to marine microalgae *Nitzschia closterium* based on chlorophyll fluorescence technology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 111551. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111551>

Garvey, M., Moriceau, B., Passow, U., 2007. Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions. *Marine Ecology Progress Series* 352, 17–26. <https://doi.org/10.3354/meps07134>

Giráldez, I., Chaguaceda, E., Bujalance, M., Morales, E., 2013. Determination of five booster biocides in seawater by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1271, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.017>

Godoi, A.F.L., Favoreto, R., Santiago-Silva, M., 2003. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos, *Quim. Nova* 26, No. 5, 708-716. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000500015>

Göksan, T., Bar Durmaz, Y., Bevket Gökpınar, S., 2003. Effects of light path lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898). *Aquaculture* 217, 431–436. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00854-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00854-7)

Hamwijk, C., Schouten, A., Foekema, E.M., Ravensberg, J.C., Collombon, M.T., Schmidt, K., Kugler, M., 2005. Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas. *Chemosphere* 60, 1316–1324. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.072>

Harino, H., Kitano, M., Mori, Y., Mochida, K., Kakuno, A., Arima, S. 2005a. Degradation of antifouling booster biocides in water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(1), 33-38. <http://doi.org/10.1017/S0025315405010799h>

Harino, H., Mori, Y., Yamaguchi, Y., Shibata, K., Senda, T., 2005b. Monitoring of antifouling booster biocides in water and sediment from the port of Osaka, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 303–310. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0084-2>

Harino, H., Ohji, M., Wattayakorn, G., Arai, T., Rungsupa, S., Miyazaki, N., 2006. Occurrence of antifouling biocides in sediment and green mussels from Thailand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 400–407. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0246-x>

Harino, H., Yamamoto, Y., Eguchi, S., Kawai, S., Kurokawa, Y., Arai, T., Ohji, M., Okamura, H., Miyazaki, N., 2007. Concentrations of antifouling biocides in sediment and mussel samples collected from Otsuchi Bay, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 179–188. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0087-2>

Harino, H., Iwasaki, N., Arai, T., Ohji, M., Miyazaki, N., 2009. Occurrence of antifouling biocides and fluorinated alkyl compounds in sediment core from deep sea: Suruga Bay, Tosa Bay, and Nankai Trough, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57, 661–669. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9374-z>

Hellio, C., Yebra, D.M., 2009. Introduction, in: *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*. Elsevier Ltd, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1533/9781845696313.1>

Huss, V.A.R., Frank, C., Hartmann, E.C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B.M., Wenzeler, P., Kessler, E., 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta), *J. Phycol* 35. 587-598. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3530587.x>

IMO, 2001. International convention on the control of harmful antifouling systems on ships. International Maritime Organisation, London.

Jacobson, A.H., Willingham, G.L., 2000. Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants, *The Science of the Total Environment* 258, 103-110. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00511-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00511-8)

Jung, S.M., Bae, J.S., Kang, S.G., Son, J.S., Jeon, J.H., Lee, H.J., Jeon, J.Y., Sidharthan, M., Ryu, S.H., Shin, H.W., 2017. Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia* larvae. *Marine Pollution Bulletin* 124, 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.047>

Kim, N.S., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Ha, S.Y., Han, G.M., Shin, K.H., 2014. Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater from coastal areas of South Korea. *Marine Pollution Bulletin* 78, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.043>

Klaine, S.J., Lewis, M.A., Knuteson, S.L., 2002. Phytotoxicity. In: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J. *Handbook of Ecotoxicology*, second edition. Lewis Publishers, Florida. pp. 191-218.

Lam, N.H., Jeong, H., Kang, S., Kim, D.J., Ju, M.J., Horiguchi, T., Cho, H.S., 2017. Organotins and new antifouling biocides in water and sediments from three Korean Special Management Sea Areas following ten years of tributyltin regulation: Contamination profiles and risk assessment. *Marine Pollution Bulletin* 121, 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.026>

Larsen, D.K., Wagner, I., Gustavson, K., Forbes, V.E., Lund, T., 2003. Long-term effect of Sea-Nine on natural coastal phytoplankton communities assessed by pollution induced

community tolerance. *Aquat. Toxicol.* 62, 35–44. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(02\)00065-6](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00065-6)

Lee, S., Chung, J., Won, H., Lee, D., Lee, Y.W., 2011. Analysis of antifouling agents after regulation of tributyltin compounds in Korea. *Journal of Hazardous Materials* 185, 1318–1325. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.048>

Lewis, J.A., 2018. Battling biofouling with and without biocides. *Chemistry in Australia*. June 2018, 26-29.

Lewis, J.A., 1998. Marine biofouling and its prevention on underwater surfaces. *Materials Forum* 22, 41-61.

Lourenço, S. O., 2006. *Cultivo de Microalgas Marinhas - princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa. 602 p.

Markelova, A., Vladimirova, M., Kuptsova, E., 2000. A Comparison of Cytochemical Methods for the Rapid Evaluation of Microalgal Viability. *Russian Journal of Plant Physiology* 47, 815-819. <https://doi.org/10.1023/A:1026619514661>.

Martínez, K., Barceló, D., 2001. Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC-APCI-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 370(7), 940–945. <https://doi.org/10.1007/s002160100904>

Martínez, K., Ferrer, I., Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Marcé, R.M., Borrull, F., Barceló, D., 2001. Occurrence of Antifouling Biocides in the Spanish Mediterranean Marine Environment. *Environmental Technology*, 22(5), 543–552. <https://doi.org/10.1080/09593332208618258>

Martins, T., Vargas, V.M.F., 2013. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 8. 1-11. <https://doi.org/10.5132/eec.2013.01.001>.

Martins, S.E., Fillmann, G., Lillicrap, A., Thomas, K. v., 2018. Review: Ecotoxicity of organic and organo-metallic antifouling co-biocides and implications for environmental

hazard and risk assessments in aquatic ecosystems. Biofouling.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1404036>

Mochida, K., Fujii, K., 2009. Toxicity in plankton and fish, in: Ecotoxicology of Antifouling Biocides. Springer Japan, pp. 365–382. https://doi.org/10.1007/978-4-431-85709-9_21

Mock, T., Samanta, M.P., Iverson, V., Berthiaume, C., Robison, M., Holtermann, K., Durkin, C., Bondurant, S.S., Richmond, K., Rodesch, M., Kallas, T., Huttlin, E.L., Cerrina, F., Sussman, M.R., Armbrust, E.V. 2008. Whole-genome expression profiling of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* identifies genes involved in silicon bioprocesses. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(5):1579-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707946105>

Murthy, K.N.C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M.M., Sowmya, P.R., Ravishankar, G.A., 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* - A green microalga. Life Sciences 76, 1381–1390. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.015>

Neuwoehner, J., Junghans, M., Koller, M., Escher, B.I., 2008. QSAR analysis and specific endpoints for classifying the physiological modes of action of biocides in synchronous green algae. Aquatic Toxicology 90, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.010>

Nie, X., Gu, J., Lu, J., Pan, W., Yang, Y., 2009. Effects of norfloxacin and butylated hydroxyanisole on the freshwater microalga *Scenedesmus obliquus*. Ecotoxicology 18. 677-684. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0334-1>

Ocean Decade, 2019. Summary Report-South Atlantic Regional Workshop. Disponível em: <https://oceandecade.org/resource/95/-SummaryReport---South-Atlantic-Regional-Workshop-25-27November-2019-in-support-of-the-UN-Decade-ofOcean-Science-for-Sustainable-Development-20212030>.

Okamura, H., Nishida, T., Ono, Y., Shim, W.J., 2003. Phytotoxic effects of antifouling compounds on nontarget plant species. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 881–886. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-8803-3>

Onduka, T., Ojima, D., Ito, M., Ito, K., Mochida, K., Fujii, K., 2013. Toxicity of the antifouling biocide Sea-Nine 211 to marine algae, crustacea, and a polychaete. *Fisheries Science* 79, 999–1006. <https://doi.org/10.1007/s12562-013-0678-6>

Readman, J. W., Kwong, L. L. W., Grondin, D., Bartocci, J., Villeneuve, J. P., & Mee, L. D., 1993. Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints. *Environmental Science & Technology*, 27(9), 1940–1942. <https://doi.org/10.1021/es00046a027>

Readman, J.W., 2006. Development, Occurrence and Regulation of Antifouling Paint Biocides: Historical Review and Future Trends. In: Konstantinou, I. *Antifouling Paint Biocides (The Handbook of Environmental Chemistry)*. Springer, Berlin. pp. 1-15.

Reinke, D.C., 1984. Ultrastructure of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae): auxospore, resting spore and vegetative cell morphology. *Journal of Phycology* 20, 153-155. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1984.00153.x>

Reitsema, T., 2008. Antifouling biocides in Perth coastal waters: a snapshot at select areas of vessel activity, Water Science Technical Series Report No.1, Department of Water, Western Australia. Regulation.

Roberts, J.A., 2009. Innovation and Regulation on the Open Seas: The Development of Sea-Nine Marine Anti-Fouling Paint - Studies in Materials Innovation. Chemical Heritage Foundation. 15 p.

Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2001. Photodegradation study of the antifouling booster biocide dichlofluanid in aqueous media by gas chromatographic techniques, *Journal of Chromatography A*. 930, 135–144. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01193-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01193-1)

Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2002. Survey for the Occurrence of Antifouling Paint Booster Biocides in the Aquatic Environment of Greece. *Environ. Sci, & Pollut. Res.* 9, 327. <https://doi.org/10.1007/BF02987576>

Schouten, A., Mol, H., Hamwijk, C., Ravensberg, J.C, Schmidt, K., Kugler, M. 2005. Critical Aspects in the Determination of the Antifouling Compound Dichlofluanid and its

Metabolite DMSA (N,N-dimethyl-N'-phenylsulfamide) in Seawater and Marine Sediments. *Chroma* 62, 511–517. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0648-y>

Silva, V., Silva, C., Soares, P., Garrido, E.M., Borges, F., Garrido, J., 2020. Isothiazolinone biocides: Chemistry, biological, and toxicity profiles. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25040991>

Soares, K.L., Sunyer-Caldú, A., Barbosa, S.C., Primel, E.G., Fillmann, G., Diaz Cruz, M.S., 2021. Rapid and cost-effective multiresidue analysis of pharmaceuticals, personal care products, and antifouling booster biocides in marine sediments using matrix solid phase dispersion. *Chemosphere* 267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129085>

Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, Í.B., Duarte, F.A., Pinho, G.L.L., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *Journal of Hazardous Materials* 330, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.001>

Steen, R.J.C.A., Ariese, F., Hattum, B. van, Jacobsen, J., Jacobson, A., 2004. Monitoring and evaluation of the environmental dissipation of the marine antifoulant 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) in a Danish Harbor. *Chemosphere* 57, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.043>

Taylor, L.N., Scroggins, R.P., 2013. Biological Test Methods in Ecotoxicology. In: Féraud, J.F., Blaise, C. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Netherlands. pp. 197-204.

Thomas, K.V., 1998. Determination of selected antifouling booster biocides by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 825, Issue 1, 29-35. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00717-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00717-1)

Thomas, K.V., Mchugh, M., Hilton, M., Waldock, M., 2003. Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles of biocides associated with paint particles into marinas may increase their persistence in the environment. *Environmental Pollution* 123, 153–161. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00343-3](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00343-3)

Thomas, K.V., 2009. The Use of Broad-spectrum Biocides in Marine Antifouling Paints. In: Hellio, C., Yebra, D.M. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*. Elsevier Ltd, pp. 522–553.

Thomas, K.V., Brooks, S., 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling* 26, 73-88. <https://doi.org/10.1080/08927010903216564>

Triglia, D., Braa, S.S., Yonan, C., Naughton, G.K. 1991. In vitro toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. *In Vitro Cell Dev Biol - Animal* 27, 239. <https://doi.org/10.1007/BF02630923>

Tsunemasa, N., Hashimoto, K., Yamaoka, Y., Ueno, H., Okamura, H., 2006. Contamination of an alternative antifoulant in coastal waters of Hiroshima Bay. *Journal of Environmental Chemistry*. 16. 201-211. <https://doi.org/10.5985/jec.16.201>

UNESCO, 2021. Ocean decade website: Our story. Disponível em: <https://oceandecade.org/about?tab=our-story>. Acesso em: 11 de maio de 2021.

Viana, J.L.M., dos Santos, S.R.V., dos Santos Franco, T.C.R., Almeida, M.A.P., 2019. Occurrence and partitioning of antifouling booster biocides in sediments and porewaters from Brazilian Northeast. *Environmental Pollution* 255. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112988>

Voulvoulis, N., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2000. Occurrence of Four Biocides Utilized in Antifouling Paints, as Alternatives to Organotin Compounds, in Waters and Sediments of a Commercial Estuary in the UK. *Marine Pollution Bulletin* 40, 938-946. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00034-5)

Walker, C.H., Sibly, R.M., Hopkin, S.P., Peakall, D.B., 2012. *Principles of ecotoxicology*. Taylor & Francis Group, CRC Press. 352 p.

Wang, X.W., Liang, J.R., Luo, C.S., Chen, C.P., Gao, Y.H., 2014. Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology* 161, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.012>

Weiss, J.S., 2014. Marine Pollution: What everybody needs to know? Oxford University Press, New York. 273 p.

Xie, Q., Pan, J., Ma, C., Zhang, G., 2019. Dynamic surface antifouling: Mechanism and systems. *Soft Matter*. <https://doi.org/10.1039/c8sm01853g>

Yu, M., Yang, S., Lin, X., 2016. De-novo assembly and characterization of *Chlorella minutissima* UTEX2341 transcriptome by paired-end sequencing and the identification of genes related to the biosynthesis of lipids for biodiesel. *Marine Genomics* 25, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.11.005>

Zetsche, E.-M, Meysman, F. J. R. 2012. Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *Journal of Plankton Research*, 34(6), 493–509. <http://doi.org/10.1093/plankt/fbs018>

Zhang, A. Q., Zhou, G.J., Lam, M.H.W., & Leung, K.M.Y., 2019. Toxicities of Irgarol 1051 derivatives, M2 and M3, to two marine diatom species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109455. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109455>

Zhou, X., Cao, S., Li, X., Xi, C., Ding, X., Xu, F., Hu, J., Chen, Z. 2016. Rapid Determination of Dichlofluanid Residues in Vegetables Using Dispersive-SPE Sample Preparation Combined with Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 54(5), 858–863. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw006>

ARTIGO CIENTÍFICO

(A ser traduzido para a língua inglesa e segundo normas da revista Marine Pollution
Bulletin - Elsevier)

Efeitos dos biocidas DCOIT e diclofluanida para as microalgas *Chaetoceros muelleri*,
Thalassiosira pseudonana, *Chlorella minutissima* e *Dunaliella salina*

Debora Carolina Costa Privado; Marianna Basso Jorge; Ricardo Luvizotto Santos

Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, Universidade Federal do Maranhão –
UFMA, Maranhão, Brasil.

RESUMO

O uso de sistemas anti-incrustantes à base de biocidas é a estratégia mais eficaz e econômica para combater a bioincrustação, entretanto, o acúmulo desses xenobióticos no ambiente pode causar riscos para organismos não-alvo. Este estudo avaliou e comparou efeitos dos biocidas DCOIT e diclofluanida em 4 espécies de microalgas marinhas através de ensaios de 72 h de exposição. Ambos os biocidas provocaram inibição do crescimento e redução do teor de clorofila *a* em todas as microalgas, entretanto, o DCOIT se mostrou bem mais tóxico, com valores de CE_{50} variando de 1,2 a $12 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto as CE_{50} do diclofluanida variaram de 32,1 a $115,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Foram observados CE_{10} e CE_{50} de DCOIT abaixo de valores já detectados no ambiente. Os resultados observados reforçam a importância de haver um monitoramento mais regular da presença desses compostos no ambiente, e também a avaliação do uso do DCOIT em sistemas anti-incrustantes, considerando os potenciais riscos ao fitoplâncton marinho.

Palavras-chaves: Bioincrustação; ensaios crônicos, fitotoxicidade;

1- Introdução

A bioincrustação marinha consiste no acúmulo de organismos vivos, por adesão, crescimento e reprodução, em superfícies naturais ou artificiais submersas ou semi-submersas na água (Cao et al., 2011), sendo que esse processo natural pode trazer prejuízos para a indústria marítima. Ao longo do tempo, o uso de tintas (sistemas) anti-incrustantes à base de compostos biocidas se tornou a estratégia mais econômica, eficaz e utilizada pela indústria marítima para evitar esse fenômeno (Xie et al., 2019).

Sabe-se que atualmente, o transporte marítimo é fundamental para o comércio e movimentação da economia global e está em constante crescimento. Segundo a Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento, no início de 2020, a frota mundial de navios comerciais registrados era de 98.140 com mais de 11 bilhões de toneladas de cargas movimentadas somente no ano de 2019 (UNCTAD, 2020). Entretanto, como consequência da expansão portuária, há o aumento do uso de sistemas anti-incrustantes, tornando os biocidas empregados nesses sistemas cada vez mais presentes em áreas portuárias, elevando suas concentrações no ambiente devido ao processo de lixiviação (Turner, 2010).

Com a descoberta da alta toxicidade do TBT no final da década de 80 e o banimento do seu uso como anti-incrustante em 2003, uma “terceira geração” de sistemas anti-incrustantes tem sido aplicada (Hellio e Yebra, 2009; Castro et al, 2011). Esta nova geração inclui compostos com diferentes classes de ingredientes ativos, objetivando alta eficiência e menor impacto ao ambiente (Fernandez e Pinheiro, 2007; Castro et al., 2011; Martins e Vargas, 2013). Embora os níveis de concentração de alguns biocidas anti-incrustantes no meio ambiente não sejam, em sua maioria, elevados o suficiente para causar efeitos tóxicos agudos em algumas espécies, a caracterização do destino e dos efeitos desses biocidas no ambiente marinho tem sido alvo das pesquisas (Helio e Yebra, 2009) e diversos estudos têm analisado a toxicidade de alguns destes compostos em diferentes grupos de organismos, incluindo bactérias, peixes, tunicados, ouriço-do-mar, mexilhões e microalgas (Bellas et al., 2005; Zhou et al., 2006; Cima et al., 2008; Chen et al., 2014; Moon et al., 2019; Rola et al., 2020).

O DCOIT (4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one, CAS 64359-81-5) é um biocida de amplo espectro e faz parte do sistema anti-incrustante SeaNine 211. Esse isotiazol possui Kow de 2,85, baixa solubilidade em água (0,0065 mg/L), tendência a

acumular no sedimento (tornando-se imóvel e não disponível), com meia-vida geralmente inferior a 24h na água do mar e inferior a 1h no sedimento (Thomas e Brooks, 2010; Castro et al., 2011; Chen e Lam, 2017). Os principais produtos de degradação são o ácido N-octil oxâmico, 4,5-dicloro-tiazol e o ácido N-octil carbâmico (Thomas, 2009). Estudos relatam que esse biocida pode causar imunossupressão, estresse oxidativo e apoptose de hemócitos em ascídia (*Botryllus schlosseri*); estresse oxidativo em espécie de coral (*Sarcophyton cf. glaucum*) e nos tecidos do fígado de peixe-arroz (*Oryzias melastigma*); inibição da síntese de ATP em mitocôndrias isoladas de tecidos do fígado de ratos, inibição do fotossistema II em algas; neurotoxicidade, desregulação endócrina e comprometimento reprodutivo em peixes (Chen e Lam, 2017).

A diclofluanida (N-dichlorofluoromethylthio-N,N-dimethyl-N-phenylsulphamide, CAS 1085-98-9) é um fungicida do grupo dos organoclorados, muito utilizado na agricultura e também em sistemas anti-incrustantes. Apresenta baixa solubilidade em água (0,006 mg/L) e um Kow de 3,7. A taxa de degradação da diclofluanida é elevada, sendo que os principais produtos de degradação são N,N-dimetil-NV-fenil-sulfamida (DMSA), n-diclorofluorometiltio-anilina e anilina, sendo o DMSA (o menos tóxico) o principal subproduto (Sakkas et al., 2001; Thomas et al., 2003; Hamwijk et al., 2005). O diclofluanida apresenta menor toxicidade em comparação com outros ingredientes de sistemas anti-incrustantes (Guardiola et al., 2012; Amara et al., 2018), embora alguns estudos tenham identificado efeitos como: redução de embriogênese, aumento de malformações embrionárias e larvais e diminuição no crescimento larval de ouriços-do-mar e mexilhões (*Mytilus edulis*); inibição de atividades enzimáticas, imunossupressão e apoptose de hematócitos em ascídia (*Botryllus schlosseri*), inibição da fotossíntese em algas e efluxo de Ca^{2+} das mitocôndrias em plantas (Hertel e Marmé, 1983; Johansson et al., 2012; Amara et al., 2018; Cima e Varello, 2020).

As microalgas são organismos que desempenham um papel importante nos ecossistemas, pois contribuem significativamente para a produtividade primária, ciclagem de nutrientes e decomposição nos ecossistemas aquáticos (Petsas e Vagi, 2017). Avaliar efeitos de substâncias tóxicas nas microalgas é importante pois quaisquer mudanças na densidade e na composição taxonômica desses organismos podem afetar profundamente a qualidade química e a dinâmica do ecossistema (McCormicks e Cairns, 1997).

Um dos métodos mais utilizados para verificar se algum composto é tóxico para as microalgas é a avaliação do crescimento desses organismos quando expostos a determinados xenobióticos. Entretanto, o uso de outros *endpoints* em conjunto com a avaliação do crescimento são importantes para a verificação de outros tipos de efeitos, como por exemplo, se a substância causa redução da viabilidade celular, inibição de enzimas, inibição ou redução de pigmentos importantes que podem interferir na fotossíntese, como clorofila *a*, ou até mesmo a inibição do fotossistema 2 (PSII) (Klaine et al, 2002; Neuwoehner et al., 2008; Cid et al, 2012; Bechét et al., 2015).

Determinar efeitos dos biocidas de 3^a geração em diferentes espécies, sobretudo produtores primários, é fundamental para a tomada de decisão acerca dos ingredientes mais seguros a serem empregados nos sistemas anti-incrustantes. Portanto, neste estudo, tivemos como o objetivo avaliar e comparar efeitos da exposição crônica (72h) aos biocidas DCOIT e diclofluanida sobre o crescimento, teor de clorofila *a* e viabilidade celular de quatro espécies de microalgas marinhas: *Chaetoceros muelleri*, *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Thalassiosira pseudonana*.

2- Materiais e métodos

2.1- Cultivos das Microalgas

As cepas das microalgas *C. minutissima* (BMAK 26A), e *T. pseudonana* (BMAK 127) foram doadas pelo Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo – IOUSP ao o Banco de Microalgas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande - FURG. A cepa da microalga *D. salina* (BMAK 16) foi doada também pelo BMAK – IOUSP ao Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade federal do Maranhão – UFMA. A cepa da microalga *C. muelleri* foi doada pelo Banco de Cultivo de Microalgas do Laboratório de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos/IO-FURG da Universidade Federal do Rio Grande.

As microalgas foram mantidas em cultivos monoespecíficos, utilizando o meio Guillard F/2 descrito da norma brasileira ABNT NBR 16181 (2013) preparado em água marinha artificial (sal marinho Coralife, EUA) salinidade 35, pH entre 7,5 e 8,5, com adição de silicato nos cultivos de *C. muelleri*. As culturas foram mantidas sob as mesmas condições dos ensaios, em frascos erlenmayer, temperatura entre 20-24 °C, luminosidade

constante de aproximadamente 7.000 Lux utilizando-se lâmpadas de LED brancas frias (6.500 K), com repicagem periódica. Todo o material e soluções utilizadas para os cultivos foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min.

2.2- Ensaios de toxicidade

Os ensaios de toxicidade seguiram a norma ABNT NBR 16181 (ABNT, 2013). Previamente, foram feitos ensaios com as mesmas condições dos ensaios definitivos a fim de determinar o melhor intervalo de concentrações dos biocidas para cada uma das microalgas. Inicialmente, os biocidas DCOIT e diclofluanida (Sigma-Aldich, EUA) foram diluídos em 100% de dimetil-sulfóxido (DMSO) (ISOFAR, Brasil) e em seguida essa solução estoque foi diluída em meio Guillard F2, de modo que o solvente (DMSO) ficasse na concentração de 0,01% em cada frasco.

As microalgas foram expostas a 5 concentrações de cada um dos biocidas durante 72 h, com base nos resultados dos ensaios preliminares, além de um controle somente com meio de cultivo e um controle solvente com meio de cultivo e 0,01% de DMSO (para testar se houve influência do solvente). Os intervalos das concentrações usadas de DCOIT e diclofluanida para cada uma das microalgas estão na Tabela 1. As microalgas foram inoculadas em frascos *erlenmayer* (densidade inicial entre 10^3 e 10^4 células mL⁻¹) com 50 mL de solução, concentrações em triplicata, luminosidade constante com intensidade luminosa de aproximadamente 8.000 lux (lâmpadas de LED branca), temperatura entre 20 e 24°C, salinidade de 35 g kg⁻¹, pH inicial entre 8,0 e 8,5 e agitação 4x ao dia e mudança aleatória da posição dos frascos 2x ao dia.

Tabela 1. Intervalos de concentração dos biocidas DCOIT e diclofluanida.

Espécie	DCOIT (µg L ⁻¹)					Diclofluanida (µg L ⁻¹)				
<i>Chaetoceros muelleri</i>	2	3	4	5	6	15	30	60	120	240
<i>Chlorella minutissima</i>	2,5	5	10	20	40	40	80	160	320	640
<i>Dunaliella salina</i>	10	15	20	25	30	50	75	112,5	168,2	253,1
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	2,5	5	10	20	30	20	40	80	160	320

2.3 - Densidade Celular

Para determinação da densidade celular, amostras foram retiradas no início e fim do ensaio, fixadas com lugol e em seguida foi feita a contagem das células em um hemocitômetro com o auxílio de um microscópio ótico (Olympus, CX40RF200) com aumento de 400x. Após a contagem, a inibição do crescimento para cada uma das concentrações foi calculada através da seguinte fórmula:

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

Onde:

IC = Inibição de crescimento

T = Densidade celular da concentração teste

C = Densidade celular do controle

2.4 - Clorofila *a*

Para a quantificação de clorofila *a*, alíquotas (5 mL) de cada um dos frascos foram retiradas ao final de cada ensaio e levadas à centrifugação (4000 RPM por 10 min) (Centribio 80-2B) e após o descarte do sobrenadante, fez-se a adição de metanol (3 mL) (ISO FAR, Brasil) para a extração da clorofila *a*. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Spectronic 200) nos comprimentos de onda de 663 nm e 750 nm, e a concentração foi calculada de acordo com Mackiney (1941). A redução do teor de clorofila *a* foi calculada usando a mesma fórmula da inibição da densidade.

2.5- Viabilidade celular

Ao final dos ensaios (72 h), amostras de 1 mL foram retiradas de cada réplica e foram adicionados 100 µL de solução do corante vital vermelho neutro (400 µg L⁻¹). Após o intervalo de 2h, essas amostras foram fixadas com formol 4% e a viabilidade foi observada através da contagem de células em hemocitômetro com auxílio de microscópio ótico (400x), de acordo com da Luz et al. (2016). O total de 200 células foram contadas para cada réplica (quando possível), sendo consideradas viáveis as células que apresentavam coloração vermelha, indicando a incorporação do corante. Nas concentrações onde houve grande inibição celular, foi considerado o número total de células observado em 15 quadrantes do hemocitômetro. O resultado da viabilidade foi expresso em porcentagem de células viáveis.

2.6 - Análises de dados

O *software* usado para as análises dos dados e gráficos foi o SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc.). Os dados de densidade, clorofila *a* e viabilidade celular foram expressos em média e desvio padrão. Os dados foram testados quando a normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene). As médias de dados paramétricos foram comparadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

A curva dose-resposta foi definida através do ajuste da curva sigmoidal usando a equação de Weibull, 4 parâmetros (Christensen et al., 2007) em uma regressão não linear com concentrações testadas e porcentagem de inibição. A CE_{10} e CE_{50} para a densidade celular quanto clorofila *a* foram calculadas com base nas porcentagens de inibição através de dois métodos, a partir do método dos probitos (Finney, 1952) e através das curvas dose-resposta obtidas (Sebaugh, 2011). Quando não houve a possibilidade da obtenção da CE_{10} e CE_{50} através dos probitos, apenas a curva dose-resposta foi utilizada.

3- Resultados

3.1 - Efeitos dos biocidas no crescimento das microalgas

O solvente DMSO não causou efeito significativo ($p > 0,05$) em nenhum dos *endpoints* avaliados nas microalgas deste estudo. Dessa forma, foram utilizadas as médias dos valores observados nos grupos controle e controle solvente.

Os biocidas causaram a inibição do crescimento em todas as microalgas expostas. Em ordem de sensibilidade e com base nos valores de CE_{50} do DCOIT e diclofluanida, temos: *C. muelleri* > *C. minutissima* > *T. pseudonana* > *D. salina* (Tabela 2 e Figura 1). Os valores de CE_{50} (baseados na inibição do crescimento) para o DCOIT ficaram entre $3,4 \mu\text{g L}^{-1}$ (*C. muelleri*) e $12,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (*D. salina*), indicando maior toxicidade do DCOIT para as microalgas que o diclofluanida, cujos valores de CE_{50} ficaram entre $34,6 \mu\text{g L}^{-1}$ (*C. muelleri*) e $101,9 \mu\text{g L}^{-1}$ (*D. salina*). Com base na comparação entre as CE_{50} das microalgas estudadas, pode-se considerar que, em média, o DCOIT é cerca de 10 vezes mais tóxico que a diclofluanida.

Com relação aos valores médios de CE_{10} do DCOIT, estes variaram de 2,2 a $9,7 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo os maiores efeitos observados para as microalgas *C. muelleri* e *C. minutissima*

(2,2 e 2,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), e o menor para a microalga *T. pseudonana* (9,7 $\mu\text{g L}^{-1}$).

C. muelleri foi a alga mais sensível ao diclofluanida com base nos valores de CE_{50} . Entretanto, ao analisar os valores de CE_{10} da microalga *C. minutissima* (5,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) bem como a respectiva curva dose-resposta, observa-se que esta microalga demonstrou maior sensibilidade ao biocida nas concentrações menores quando comparada às demais microalgas.

Considerando as microalgas estudadas e com base nos valores de CE_{10} e CE_{50} , *C. muelleri* foi a espécie mais sensível aos biocidas enquanto *D. salina* e *T. pseudonana* foram as mais resistentes. Vale ressaltar que *C. minutissima* não demonstrou inibição total do crescimento algal (100%) durante os ensaios para ambos os biocidas, além de exibir uma inibição mais gradual que as demais microalgas, sugerindo a presença de células mais resistentes no período de 72 h dos ensaios.

Tabela 2. Valores de CE_{10} e CE_{50} , dos biocidas DCOIT e diclofluanida sobre o crescimento das microalgas através dos probitos e da curva dose-resposta.

Espécie	DCOIT						Diclofluanida					
	CE_{10}			CE_{50}			CE_{10}			CE_{50}		
	Curva	Probitos	Média	Curva	Probitos	Média	Curva	Probitos	Média	Curva	Probitos	Média
<i>Chaetoceros muelleri</i>	2,4	2,0	2,2	3,4	3,4	3,4	15,9	16,0	15,9	34,5	34,8	34,6
<i>Chlorella minutissima</i>	3,0	1,7	2,3	5,2	9,5	7,4	5,0	5,4	5,2	79,7	71,7	75,7
<i>Dunaliella salina</i>	9,9	9,0	9,4	11,2	12,7	12,0	99,2	56,4	77,8	113,6	90,2	101,9
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	9,7	-	9,7	11,5	-	11,5	86,2	-	86,2	98,8	-	98,8

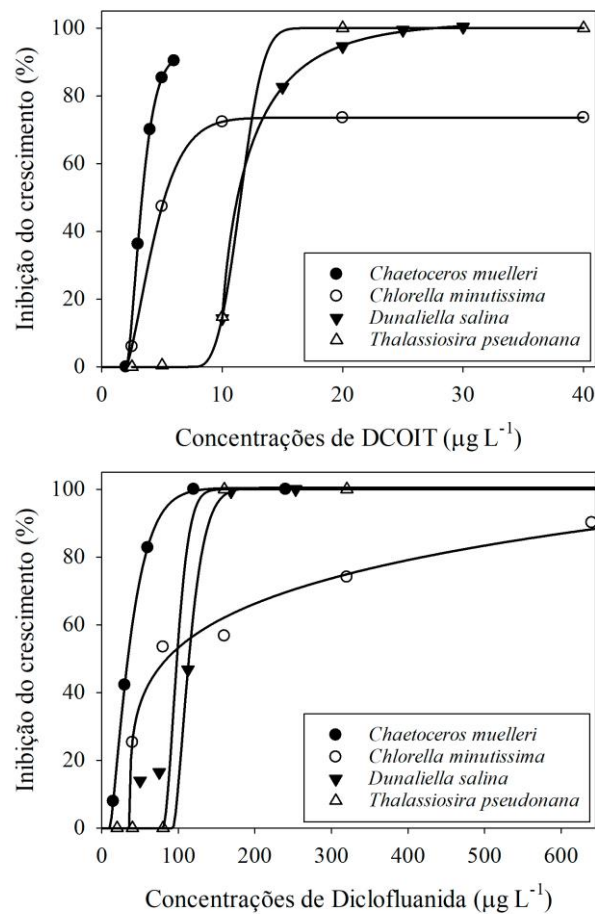


Figura 1. Curvas dose-resposta de inibição de crescimento das microalgas após exposição aos biocidas DCOIT e diclofluanida.

3.2 - Efeito dos biocidas no teor de clorofila *a* das microalgas

Os biocidas causaram a inibição da clorofila *a* em todas as microalgas expostas. Em ordem de sensibilidade das espécies estudadas, e com base nos valores de CE₅₀ do DCOIT, temos: *C. muelleri* > *C. minutissima* > *T. pseudonana* > *D. salina*, sendo que em relação ao diclofluanida, temos em ordem de sensibilidade: *C. muelleri* > *T. pseudonana* > *C. minutissima* > *D. salina* (Tabela 3 e Figura 2).

Os valores de CE₅₀ para o DCOIT ficaram entre 1,2 µg L⁻¹ (*C. muelleri*) e 11,8 µg L⁻¹ (*D. salina*), indicando maior toxicidade que a diclofluanida, cujos valores de CE₅₀ ficaram entre 32,1 µg L⁻¹ (*C. muelleri*) e 115,1 µg L⁻¹ (*D. salina*).

As CE₁₀ do teor de clorofila *a* apresentaram um padrão semelhante às do crescimento, com *C. muelleri* e *C. minutissima* exibindo maior sensibilidade tanto ao

DCOIT (0,1 e 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), quanto ao diclofluanida (11,7 e 7,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), sendo que valores exibidos para as duas microalgas foram mais distantes da CE_{50} quando comparadas às demais microalgas, principalmente *C. minutissima* com o composto diclofluanida. Os biocidas exibiram valores mais altos, próximos da CE_{50} , para as microalgas *T. pseudonana* e *D. salina* (7,4 e 8,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DCOIT e 89 e 92 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diclofluanida, respectivamente), indicando efeito mais homogêneo nas células expostas a partir do limiar de toxicidade, quando comparado às outras duas espécies.

De acordo com as curvas do teor de clorofila *a*, observou-se inibição próxima à 100% para a maioria das microalgas expostas aos dois biocidas. Assim como observado com a inibição do crescimento, todas as microalgas foram mais sensíveis ao biocida DCOIT, apresentando valores de inibição de clorofila *a* superiores a 90% em concentrações acima de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que a microalga *C. muelleri* exibiu inibição acima de 70% logo na primeira concentração testada desse composto. Quanto ao composto diclofluanida, as algas apresentaram o mesmo padrão das curvas de inibição de crescimento, alcançando valores acima de 90% de inibição em concentrações abaixo de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, exceto *C. minutissima* que chegou a mais de 90% somente quando exposta à concentração de 640 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida.

Tabela 3. Valores de CE_{10} e CE_{50} dos biocidas DCOIT e diclofluanida sobre o teor de clorofila *a* das microalgas.

Espécie	DCOIT						Diclofluanida					
	CE_{10}			CE_{50}			CE_{10}			CE_{50}		
	Curva	Probita	Média	Curva	Probita	Média	Curva	Probita	Média	Curva	Probita	Média
<i>C. muelleri</i>	0,1	-	0,1	1,0	1,4	1,2	10,5	12,8	11,7	34,0	30,1	32,1
<i>C. minutissima</i>	1,2	1,7	1,5	5,5	5,0	5,2	5,5	10,0	7,7	114,8	100,5	107,7
<i>D. salina</i>	9,2	7,7	8,5	11,4	12,2	11,8	93,7	90,2	92,0	112,7	117,6	115,1
<i>T.pseudonana</i>	9,0	5,8	7,4	12,0	9,4	10,7	89,0	-	89,0	103,7	-	103,7

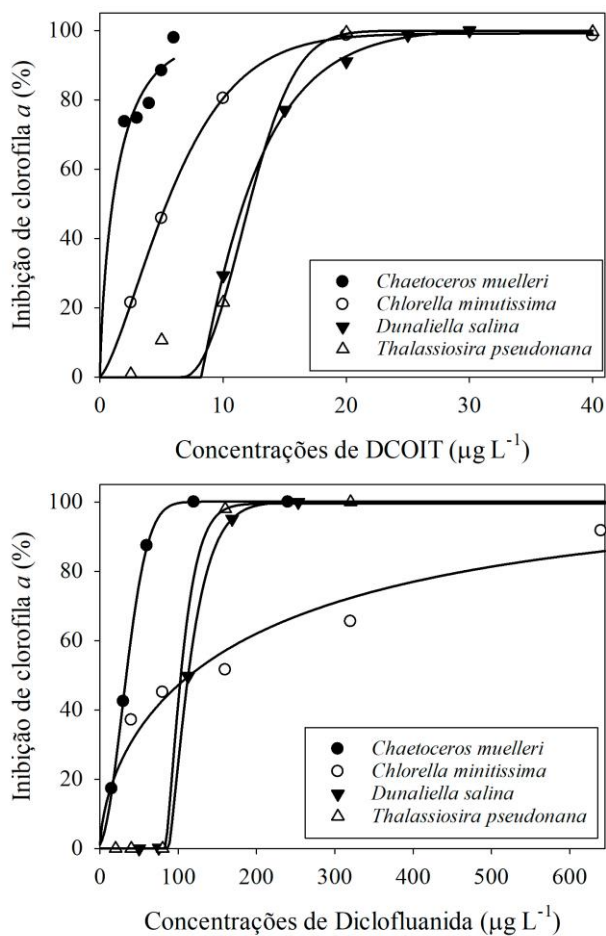


Figura 2. Curvas dose-resposta de inibição do teor de clorofila *a* das microalgas após exposição aos biocidas DCOIT e diclofluánida.

3.3 - Viabilidade Celular

Após exposição ao biocida DCOIT, observou-se que não houve diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) na porcentagem de viabilidade celular entre os controles e as demais concentrações para todas as microalgas (Figura 3), ainda que houvesse inibição do crescimento e poucas células para serem visualizadas. Não foi possível determinar a porcentagem de viabilidade celular usando o vermelho neutro para a microalga *T. pseudonana* nas duas maiores concentrações devido a ausência de células.

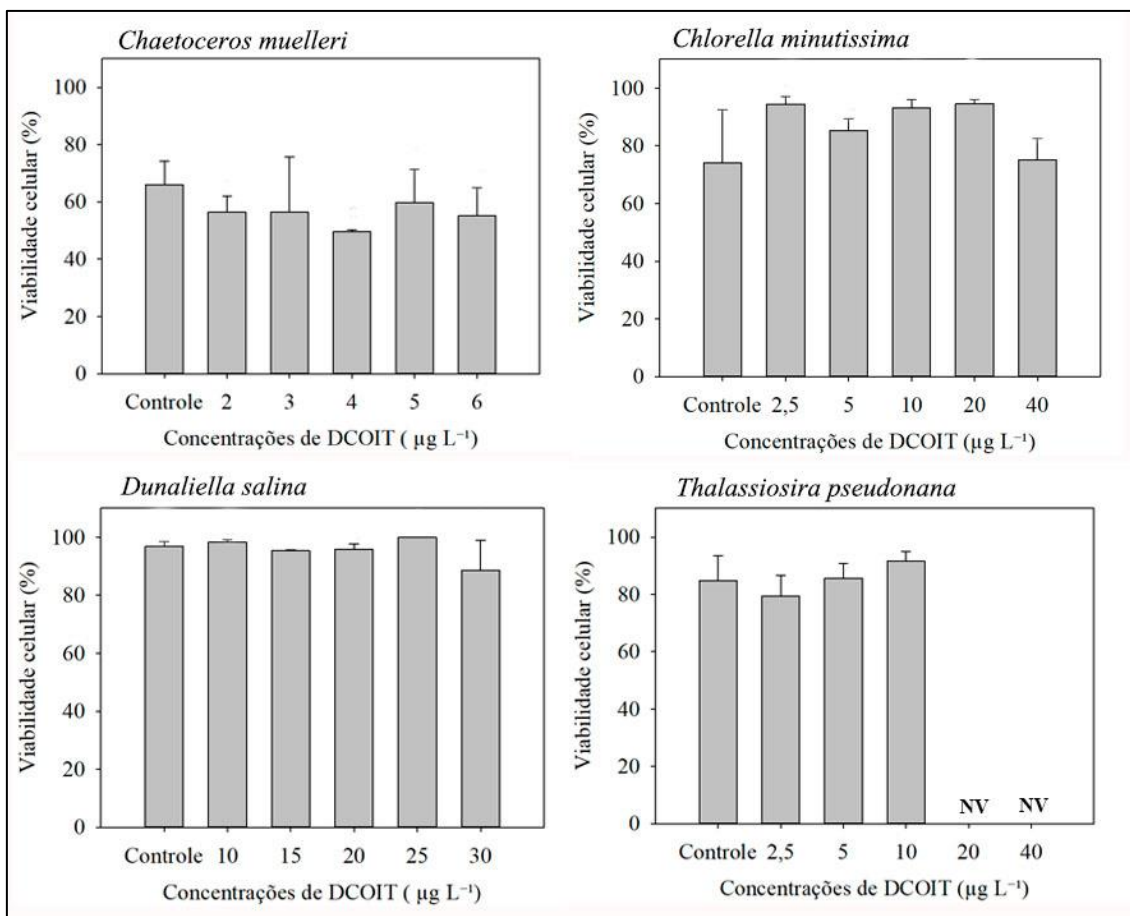


Figura 3. Viabilidade celular das microalgas após exposição ao biocida DCOIT. Dados expressos em médias e desvio padrão. NV = células não visualizadas.

Com relação ao biocida diclofluanida, não houve diferença significativa da viabilidade da maioria das espécies em relação aos controles (ANOVA, $p > 0,05$) (Figura 4), com exceção da microalga *T. pseudonana*, que apresentou células com ausência de coloração (não viáveis) na concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$. Houve ausência de células de *T. pseudonana* na concentração de $320 \mu\text{g L}^{-1}$ e de *C. muelleri* nas concentrações 120 e $240 \mu\text{g L}^{-1}$.

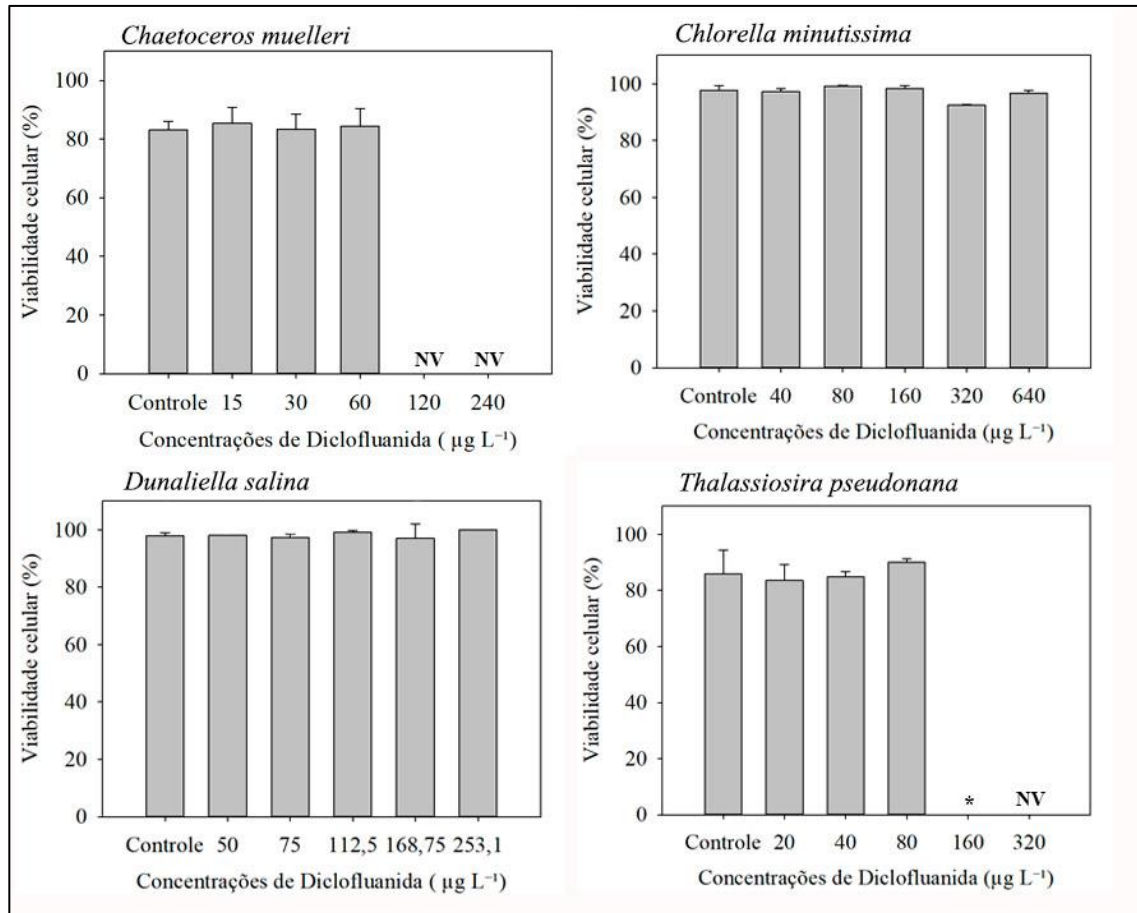


Figura 4. Viabilidade celular das microalgas após exposição ao biocida Diclofluanida. Dados expressos em médias e desvio padrão. * indica valor significativamente diferente do controle (ANOVA, $p < 0,05$). NV = não visualizadas.

4- Discussão

Os biocidas de terceira geração, como o DCOIT e a diclofluanida, vêm sendo amplamente detectados em análises ambientais de portos e marinas pelo mundo, e mesmo sendo menos prejudiciais que as gerações anteriores por conta de sua rápida degradação, causam danos a diferentes organismos, incluindo microalgas. As concentrações máximas já detectadas de DCOIT e diclofluanida em amostras ambientais de água foram $3,7 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, sendo ambas na Espanha (Martínez et al., 2001).

Entre os biocidas aplicados atualmente, o grupo dos herbicidas (inibidores de fotossíntese), como diuron e irgarol, é o mais tóxico para os ecossistemas aquáticos, seguidos pelos microbiocidas e biocidas de amplo espectro, que afetam produtores e consumidores primários mesmo nas mais baixas concentrações de exposição testadas. Os

fungicidas são os menos tóxicos, mas ainda assim, causam certa preocupação (Martins et al., 2018).

Com base nos ensaios de exposição realizados nesse estudo, observamos que ambos os biocidas causaram efeitos em diferentes níveis nas quatro espécies de microalgas expostas, com DCOIT sendo mais tóxico que diclofluanida para todas as 4 espécies de microalgas testadas, sendo a espécie *C. muelleri* a mais sensível. Jung et al. (2016) ao expor a diatomácea *Nitzschia pungens* a 9 biocidas anti-incrustantes para detectar efeitos sobre o crescimento celular, também verificaram que o DCOIT foi mais tóxico do que a diclofluanida.

Os valores de CE₁₀ e CE₅₀ do DCOIT para a microalga *C. muelleri* (0,1 – 1,2 µg L⁻¹) e CE₁₀ para *C. minutissima* (1,5 µg L⁻¹) foram menores que valores já encontrados em análises ambientais da água, como 0,28 µg L⁻¹ na Dinamarca (Steen et al., 2004) e 3,7 µg L⁻¹ na Espanha (Martinez et al., 2001). A inibição do crescimento de microalgas após a exposição crônica de curta duração (72h) ao DCOIT também foi observada em outros estudos (Tabela 4.), com CE₅₀ variando de 0,22 a 160 µg L⁻¹. Outro ponto que foi observado comparando os dados obtidos nesse e nos demais estudos, é que a sensibilidade das microalgas ao DCOIT não tem relação com o grupo taxonômico que elas estão inseridas.

Tabela 4. CE₅₀ do biocida DCOIT em microalgas marinhas após 72h de exposição

	Grupo	Espécie	CE ₅₀ (72 h)	Referência
DCOIT (µg L ⁻¹)	Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i> sp.	0,90	Devilla et al. (2005)
	Bacillariophyta	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0,32	Onduka et al. (2013)
		<i>Skeletonema costatum</i>	0,22	Onduka et al. (2013)
		<i>Chaetoceros muelleri</i>	3,4	Este estudo
		<i>Thalassiosira pseudonana</i>	11,5	Este estudo
	Chlorophyta	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3,9	Onduka et al. (2013)
		<i>Selenastrum capricornutum</i>	3,0 160	Fernandez-Alba et al. (2002); Okamura e al. (2003)
		<i>Tetraselmis tetrathele</i>	1,6	Onduka et al. (2013)
		<i>Chlorella minutissima</i>	7,4	Este estudo
		<i>Dunaliella salina</i>	12	Este estudo
	Haptophyta	<i>Emiliania huxleyi</i>	0,35	Devilla et al. (2005)

Ainda não está muito claro como especificamente o DCOIT penetra em diferentes organismos para induzir uma variedade de efeitos tóxicos (Chen e Lam, 2017), havendo ainda escassez de dados sobre o mecanismo de ação do DCOIT, sobretudo em microalgas. Uma das informações conhecidas é que este biocida causa a inibição do transporte de elétrons no PSII (fotossistema II) em organismos fotossintetizantes (Guardiola et al., 2012; Petsas e Vagi, 2017). Devilla et al. (2005) observaram que após exposição de uma comunidade fitoplanctônica natural ao DCOIT, houve redução da clorofila, produtividade primária e redução da produtividade do PSII. Em contrapartida, Neuwoehner et al. (2008) ao analisar vários *endpoints* para microalga dulcícola *Scenedesmus vacuolatus*, notaram que as células cresceram, mas tiveram dificuldades em se dividir, indicando que este composto teve seu efeito mais pronunciado na divisão celular das algas e interpretando que este fator é causa primária para a toxicidade das algas, e que o PSII é afetado apenas indiretamente e em concentrações muito mais altas.

De modo geral, o mecanismo de ação de biocidas do tipo izotiazonas (incluindo o DCOIT) em microrganismos é complexo e envolve desde inibição de crescimento até perda de viabilidade, sendo que a inibição do crescimento é resultado da rápida perturbação do metabolismo da célula pela inibição de várias enzimas, incluindo as desidrogenases, afetando rapidamente atividades como respiração e síntese de ATP. Enquanto a inibição das atividades celulares é mais rápida (minutos), a morte celular pode durar mais tempo (horas), sendo que quanto maior for a concentração do biocida, menor será o tempo de contato necessário para a morte celular (Williams, 2007).

Segundo o relatório da Agência Europeia de Produtos Químicos, o biocida diclofluanida tem um amplo espectro de atividade que inclui algas, diatomáceas e outros organismos incrustantes (ECHA, 2016). Apesar dos efeitos verificados nas microalgas nesse estudo, o menor valor de CE_{10} observado ($5,5 \mu\text{g L}^{-1}$), foi quase 10 vezes superior ao maior valor já detectado em amostras ambientais de água ($0,6 \mu\text{g L}^{-1}$). No entanto, apesar da rápida degradação e baixas concentrações no ambiente, a entrada constante deste fungicida nos sedimentos costeiros e na coluna d'água pode expor momentaneamente alguns organismos ao estresse químico, resultando em efeito negativo de longo prazo nas comunidades costeiras (Cima e Varello, 2020).

A inibição do crescimento de microalgas após a exposição ao diclofluanida no período de 72h também foi observada em outros estudos, conforme indicado na Tabela 5.

Todavia, estas publicações acerca do efeito do diclofluanida ainda são escassas e pouco se sabe sobre como funciona particularmente seu mecanismo de ação em microalgas embora alguns autores indiquem que esse composto tem como modo de ação a inibição do PSII (Dafforn et al., 2011; Guardiola et al., 2012).

Tabela 5. CE₅₀ do biocida DCOIT em microalgas marinhas após 72h de exposição

	Grupo	Espécie	CE ₅₀ (72 h)	Referência
Diclofluanida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bacillariophyta	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	193	Carteau et al. (2014)
		<i>Chaetoceros muelleri</i>	34,6	Este estudo
		<i>Thalassiosira pseudonana</i>	98,8	Este estudo
	Chlorophyta	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	37,6	Almeida et al. (2017)
		<i>Desmodesmus subspicatus</i>	15000	ECHA (2016)
		<i>Selenastrum capricornutum</i>	133	Fernandez-Alba et al. (2002)
		<i>Chlorella minutissima</i>	75,7	Este estudo
	<i>Dunaliella salina</i>	101,9	Este estudo	

Almeida et al. (2017) ao exporem a microalga clorófito *Chlamydomonas reinhardtii* ao diclofluanida encontraram valor de EC₅₀ (72 h) de 37,67 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, apesar da inibição no crescimento, não foi notada alteração da eficiência do PSII. Estes autores notaram a diminuição da toxicidade do composto com o aumento de tempo de exposição, atribuindo este fato a processos como fotólise, degradação química e biológica durante o tratamento, o que pode explicar a maior tolerância das algas a este biocida. Por outro lado, Johansson et al. (2012), ao avaliarem o efeito desse biocida nos mecanismos de concentração de carbono da macroalga *Saccharina latissima*, visto que as macroalgas dependem desses mecanismos para manter uma alta atividade fotossintética em condições de baixa disponibilidade de dióxido de carbono (CO₂), notaram através de ensaio de incorporação de ¹⁴C e síntese de O₂, que o composto pareceu inibir a fotossíntese.

A atividade biocida de compostos N-haloalquiltio como a diclofluanida é baseada na capacidade que a ligação N-S tem de se abrir e reagir com entidades nucleofílicas dentro da célula, como grupos SH de enzimas (ECHA, 2016). Hertel e Marmé (1983) ao avaliarem o mecanismo de ação da diclofluanida em plantas, sugeriram que a inibição do acúmulo de

Ca^{2+} na mitocôndria pode ser o efeito primário desse composto, sendo que, a inibição da regulação do Ca^{2+} livre citoplasmático pode levar à inibição da mitose e a outras disfunções fisiológicas.

Comparando os *endpoints* utilizados neste estudo, tanto a avaliação do crescimento quanto o teor de clorofila *a* foram eficazes para avaliar efeitos dos biocidas nas quatro espécies de microalgas expostas. Entretanto, observamos na exposição ao biocida DCOIT que a redução do conteúdo de clorofila *a* apresentou menores valores de CE do que a inibição do crescimento para todas as microalgas, principalmente *C. muelleri* e *C. minutissima*. Portanto, a clorofila pode servir como um parâmetro mais sensível do que a inibição do crescimento para o DCOIT. O oposto foi observado com o composto diclofluanida (exceto em *C. muelleri*), onde a inibição do crescimento se mostrou um parâmetro mais sensível que a clorofila *a*.

O crescimento de algas é um *endpoint* que reflete a reprodução e o desenvolvimento da população. No entanto, a inibição do crescimento pode integrar vários mecanismos de ação, não fornecendo informações detalhadas sobre os mecanismos de toxicidade dos compostos (Almeida et al., 2017). Já a clorofila *a* pode ser um indicador eficaz tanto do estado de crescimento das microalgas quanto da eficiência da fotossíntese (Huang et al., 2016), pois qualquer alteração no teor dessa molécula, pode afetar diretamente o processo de fotossíntese.

A maior sensibilidade do teor de clorofila *a* perante o DCOIT pode estar relacionado com o fato de esse biocida ser um inibidor do PSII (Dafforn et al., 2011; Guardiola et al., 2012; Chen e Qian, 2017; Petsas e Vagi, 2017). Entretanto, apesar do conteúdo de pigmentos ser frequentemente usado como um biomarcador clássico de exposição a pesticidas, outros *endpoints* como parâmetros de fluorescência Chl- α e taxa fotossintética são mais indicados, eficazes e precisos para avaliar se a substância de fato inibiu a fotossíntese (Fai et al, 2007; Petsas e Vagi, 2017).

A avaliação da viabilidade celular nesse estudo nos permitiu observar que apesar da alta inibição do crescimento, a maior parte das microalgas remanescentes permaneceram viáveis após exposição tanto ao DCOIT, quanto à diclofluanida. Entretanto, devido ao número reduzido de células nas maiores concentrações, não foi possível afirmar com segurança se estes biocidas de fato não influenciam na viabilidade celular ou se apenas células mais resistentes permaneceram. Observou-se também a ausência de células nas

maiores concentrações de diclofluanida para *C. muelleri* e *T. pseudonana* e DCOIT para *T. pseudonana*, podendo este ser um indicativo de que esses biocidas podem causar letalidade a essas microalgas nestas concentrações. Recomendam-se mais testes para confirmar a hipótese de que os biocidas não interferem na viabilidade celular das microalgas em concentrações não letais, incluindo a utilização de outros tipos de marcadores químicos.

O uso de diferentes espécies de algas representando os principais grupos taxonômicos do fitoplâncton, principalmente os gêneros abundantes e cosmopolitas, pode ser provavelmente a melhor solução para cobrir uma ampla faixa de sensibilidade desses organismos (Rojidrtova-Pardrova e Marsalek, 1999). Todas as espécies utilizadas nesse estudo se mostraram eficazes para a avaliação da toxicidade de biocidas em ensaios crônicos de curta duração. Dentre as espécies expostas ao DCOIT e diclofluanida, a que se mostrou mais sensível foi a diatomácea *C. muelleri* e a mais resistente foi a *Dunaliella salina*.

Onduka et al. (2013), ao expor 4 espécies de microalgas marinhas ao DCOIT, também observou maior sensibilidade e maior resistência por microalgas dos mesmos gêneros desse estudo (*Chaetoceros calcitrans* e *Dunaliella tertiolecta*), com valores de $EC_{50}(72h)$ para *C. calcitrans* ($0,32 \mu g L^{-1}$) ainda mais baixos do que o observado por *C. muelleri* nesse presente estudo. O gênero *Chaetoceros* é um dos maiores gêneros de diatomáceas do fitoplâncton marinho (aproximadamente 400 espécies), e suas muitas espécies estão amplamente distribuídas, com algumas sendo cosmopolitas (Li et al., 2017). Estima-se que esse gênero represente 14,5% da biomassa de diatomáceas marinhas de todo planeta, sendo um dos mais importantes para a produtividade primária (Shirai et al., 2008; Leblanc et al., 2012), portanto, o contato com substâncias que inibem o crescimento de espécies desse gênero, pode impactar negativamente os ecossistemas em que elas estão inseridas.

Apesar de não ser a espécie mais resistente segundo as CE_{50} , a espécie *C. minutissima* exibiu um padrão de resposta diferente das demais microalgas. As curvas dose-resposta com inibições mais graduais e os fatores de aumento da concentração de efeito mais altos, sugerem que esta espécie possui maior resistência ao aumento de concentração desses compostos em comparação com as demais microalgas. Uma característica importante dessa espécie, é que ela possui uma parede celular com uma camada externa trilaminar composta por uma substância análoga a esporopolenina

(*algaenan*) (Dempsey et al., 1980; Alhattab et al., 2018). Essa substância é um heteropolímero de poliéster altamente resistente a ácidos e bases devido a um efeito de proteção estérica da estrutura molecular, que pode dificultar a penetração de várias substâncias nas células (Zych et al., 2009; Alhattab et al., 2018). Esta característica pode justificar a maior tolerância dessas microalgas ao aumento de concentração dos biocidas, em comparação com as outras espécies.

O uso de diferentes espécies e *endpoints* nesse estudo foi importante para se obter melhor avaliação dos níveis de efeitos que esses biocidas podem causar e das diferentes faixas de sensibilidade das microalgas quando expostas a eles. Com base nos resultados observados nesse e em outros estudos, onde o DCOIT se mostrou altamente tóxico para microalgas, é importante que se reavalie o uso desse biocida, além de se persistir na busca por alternativas menos nocivas para se combater a bioincrustação. Contaminantes que causam efeitos em microalgas, são considerados ecologicamente relevantes e um gatilho para a preocupação ambiental, pois as mudanças podem interferir nas trajetórias normais das populações (Almeida et al., 2017) podendo trazer um desequilíbrio no meio em que estão inseridos.

5- Conclusão

A partir dos ensaios de exposição realizados nesse estudo, pudemos concluir que ambos os biocidas são tóxicos para diferentes espécies de microalgas, sendo que o DCOIT é potencialmente mais tóxico que a diclofluanida, causando efeitos inclusive em concentrações já registradas em amostras ambientais. Tanto a inibição de crescimento, quanto a redução de clorofila *a*, mostraram-se eficazes para avaliar a toxicidade desses compostos em microalgas, entretanto, recomendam-se mais testes para avaliar a viabilidade celular de forma mais acertiva. Os resultados encontrados nesse estudo reforçam que, apesar da nova geração de biocidas ser considerada menos tóxica que os empregados anteriormente, seu amplo uso em todo mundo pode trazer consequências negativas para o meio ambiente, principalmente em organismos não-alvo e de extrema importância ecológica como o fitoplâncton.

6- Agradecimentos

Agradecemos ao Grupo de Pesquisa em Ecotoxicologia Aquática (EcoBiotox) da FURG pela assistência e dados referentes aos ensaios das microalgas *Chlorella minutissima* e *Thalassiosira pseudonana*, à Fundação de Amparo à pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA pelo suporte financeiro (bolsa de mestrado) através do edital BM QUOTA UFMA 2019 (BM-02315/19) e à Financiadora de Inovação e Pesquisa – FINEP pelo financiamento do projeto (CT-Hidro 1111/13 – AIBRASIL2) no qual esse trabalho está inserido.

7- Referências

ABNT. NBR 16181., 2013. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com microalgas marinhas. Rio de Janeiro. 27 p.

Almeida, A.C.G, Petersen, K., Langford, K., Thomas, K.V., Tollefsen, K.E., 2017. Mixture toxicity of five biocides with dissimilar modes of action on the growth and photosystem II efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80:16-18, 971-986. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1352176>

Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A., & Brooks, M. S.L., 2018. Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1560-9>

Amara, I., Miled, W., Slama, R. B., Ladhari, N., 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 57, 115–130. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.001>

Béchet, Q., Feurgard, I., Guieysse, B., Lopes, F., 2015. The colorimetric assay of viability for algae (CAVA): a fast and accurate technique. *Journal of Applied Phycology* 27, 2289–2297. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0508-y>

Bellas, J., Granmo, Å., Beiras, R., 2005. Embryotoxicity of the antifouling biocide zinc pyrithione to sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and mussel (*Mytilus edulis*). *Marine Pollution Bulletin* 50, 1382–1385. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.06.010>

Cao, S., Wang, J.D., Chen, H.S., Chen, D.R., 2011. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin*, Vol 56, 598-612. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4158-4>

Carteau, D., Vallée-Réhel, K., Linossier, I., Quiniou, F., Davy, R., Compère, C., Delbury, M., Fay, F., 2014. Development of environmentally friendly antifouling paints using biodegradable polymer and lower toxic substances. *Progress in Organic Coatings* 77, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2013.11.012>

Castro, Í.B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático, *Quim. Nova* 34, No 6, 1021-1031. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600020>

Chen, L., Lam, J.C.W., 2017. SeaNine 211 as antifouling biocide: A coastal pollutant of emerging concern. *Journal of Environmental Sciences (China)* 61, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.03.040>

Chen, L., Qian, P.-Y., 2017. Review on Molecular Mechanisms of Antifouling Compounds: An Update since 2012. *Marine Drugs*, 15(9), 264. <http://doi.org/10.3390/md15090264>

Chen, L., Ye, R., Xu, Y., Gao, Z., Au, D.W.T., Qian, P.Y., 2014. Comparative safety of the antifouling compound butenolide and 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) to the marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquatic Toxicology* 149, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.023>

Christensen, E.R., Kusk, K.O., Nyholm, N., 2007. Dose-Response Regressions for Algal Growth and Similar Continuous Endpoints: Calculation of Effective Concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 28, No. 4, 826–835. <https://doi.org/10.1897/08-068.1>

Cid, A.; Prado, R.; Rioboo, C.; Suárez-Bregua, P.; Herrero, C., 2012. Use of Microalgae as Biological Indicators of Pollution: Looking for New Relevant Cytotoxicity Endpoints. In: Johansen, M.N. *Microalgae: biotechnology, microbiology and energy*. Nova Science Publishers, New York. pp. 311-324.

Cima, F., Bragadin, M., Ballarin, L., 2008. Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes. I. Sea-Nine 211 and chlorothalonil. *Aquatic Toxicology* 86, 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.010>

Cima, F., Varello, R., 2020. Immunotoxicity in ascidians: Antifouling compounds alternative to organotins-V. The case of dichlofluanid. *Journal of Marine Science and Engineering* 8. <https://doi.org/10.3390/JMSE8060396>

Da Luz, D.S., da Silva, D.G., Souza, M.M., Giroldo, D., Martins, C.D.M.G., 2016. Efficiency of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Phycological Research* 64, 56–60. <https://doi.org/10.1111/pre.12114>

Dafforn, K.A., Lewis, J.A., Johnston, E.L., 2011. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin* 62, 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.012>

Dempsey, G.P., Lawrence, D., Cassie, V., 1980. The ultrastructure of *Chlorella minutissima* Fott et Nováková (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia*, 19(1), 13–19. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-19-1-13.1>

Devilla, R.A., Brown, M.T., Donkin, M., Tarran, G.A., Aiken, J., Readman, J.W., 2005. Impact of antifouling booster biocides on single microalgal species and on a natural marine phytoplankton community. *Marine Ecology Progress Series* 286, 1–12. <https://doi.org/10.3354/meps286001>

ECHA, 2016. Regulation (EU) No 528/2012 Concerning the Making Available on the Market and Use of Biocidal Products. Assessment Report for Dichlofluanid. United Kingdom. 68 p.

Fai, P.B., Grant, A., Reid, B., 2007. Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment, *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1520-1531. <https://doi.org/10.1897/06-394R1.1>

Fernández-Alba, A.R., Hernando, M.D., Piedra, L., Chisti, Y., 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays, *Analytica Chimica Acta* 456, 303-312. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00037-5)

Fernandez, M.A., Pinheiro, F.M., 2007. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. *International Journal of Environment and Health* 1, 427–448. <https://doi.org/10.1504/IJENVH.2007.017875>

Finney, D.J., 1952. In: *Probit Analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge University Press, Cambridge, 318 pp.

Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 1541-1560. <https://doi.org/10.3390/ijms13021541>

Hamwijk, C., Schouten, A., Foekema, E.M., Ravensberg, J.C., Collombon, M.T., Schmidt, K., Kugler, M., 2005. Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas. *Chemosphere* 60, 1316–1324. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.072>

Hellio, C., Yebra, D.M., 2009. Introduction, in: *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*. Elsevier Ltd, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1533/9781845696313.1>

Hertel, C., Marmé, D., 1983. Herbicides and fungicides inhibit Ca^{2+} uptake by plant mitochondria: A possible mechanism of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 19, 282-290. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(83\)90056-1](https://doi.org/10.1016/0048-3575(83)90056-1)

Huang, J., Cheng, J., Yi, J., 2016. Impact of silver nanoparticles on marine diatom *Skeletonema costatum*. *Journal of Applied Toxicology*, 36(10), 1343–1354. <https://doi.org/10.1002/jat.3325>

Johansson, P., Eriksson, K.M., Axelsson, L., Blanck, H., 2012. Effects of seven antifouling compounds on photosynthesis and inorganic carbon use in sugar kelp *Saccharina latissima* (Linnaeus). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 63, 365–377. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9778-z>

Jung, S.M., Bae, J.S., Kang, S.G., Son, J.S., Jeon, J.H., Lee, H.J., Jeon, J.Y., Sidharthan, M., Ryu, S.H., Shin, H.W., 2017. Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia* larvae. *Marine Pollution Bulletin* 124, 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.047>

Klaine, S.J., Lewis, M.A., Knuteson, S.L., 2002. Phytotoxicity. In: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J. *Handbook of Ecotoxicology*, second edition. Lewis Publishers, Florida. pp. 191-218.

Leblanc, K., Arístegui, J., Armand, L., Assmy, P., Beker, B., Bode, A., Breton, E., Cornet, V., Gibson, J., Gosselin, M.P., Kopczynska, E., Marshall, H., Peloquin, J., Piontkovski, S., Poulton, A.J., Quéguiner, B., Schiebel, R., Shipe, R., Stefels, J., van Leeuwe, M.A., Varela, M., Widdicombe, C., Yallop, M., 2012. A global diatom database- A bundance, biovolume and biomass in the world ocean. *Earth Syst. Sci. Data.* 4. 149-165. <https://doi.org/10.5194/essd-4-149-2012>.

Li, Y., Boonprakob, A., Gaonkar, C.C., Kooistra, W.H.C.F., Lange, C.B., Hernández-Becerril, D., Chen, Z., Moestrup, Ø., Lundholm, N., 2017. Diversity in the Globally Distributed Diatom Genus *Chaetoceros* (Bacillariophyceae): Three New Species from Warm-Temperate Waters. *PLOS ONE*, 12(1), e0168887. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0168887>

Mackinney, B.G., 1941. Absorption of light by Chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry* 140, 315-322. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)51320-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)51320-x)

Martínez, K., Ferrer, I., Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Marcé, R.M., Borrull, F., Barceló, D., 2001. Occurrence of Antifouling Biocides in the Spanish Mediterranean Marine Environment. *Environmental Technology*, 22(5), 543–552. <https://doi.org/10.1080/09593332208618258>

Martins, T., Vargas, V.M.F., 2013. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 8. 1-11. <https://doi.org/10.5132/eec.2013.01.001>.

Martins, S.E., Fillmann, G., Lillicrap, A., Thomas, K.V., 2018. Review: Ecotoxicity of organic and organo-metallic antifouling co-biocides and implications for environmental hazard and risk assessments in aquatic ecosystems. *Biofouling*. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1404036>

McCormick, P. V., Cairns, J., 1994. Algae as indicators of environmental change. *Journal of Applied Phycology*, 6(5-6), 509–526. <https://doi.org/10.1007/bf02182405>

Moon, Y.S., Kim, M., Hong, C.P., Kang, J.H., Jung, J.H., 2019. Overlapping and unique toxic effects of three alternative antifouling biocides (Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211) on non-target marine fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 180, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.070>

Neuwoehner, J., Junghans, M., Koller, M., Escher, B.I., 2008. QSAR analysis and specific endpoints for classifying the physiological modes of action of biocides in synchronous green algae. *Aquatic Toxicology* 90, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.010>

Okamura, H., Nishida, T., Ono, Y., Shim, W.J., 2003. Phytotoxic effects of antifouling compounds on nontarget plant species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 881–886. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-8803-3>

Onduka, T., Ojima, D., Ito, M., Ito, K., Mochida, K., Fujii, K., 2013. Toxicity of the antifouling biocide Sea-Nine 211 to marine algae, crustacea, and a polychaete. *Fisheries Science* 79, 999–1006. <https://doi.org/10.1007/s12562-013-0678-6>

Petsas, A.S., Vagi, M.C., 2017. 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. pp. 37-77.

Rojíčková-Padrtova, R., Marsalek, B., 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere* 38, 3329-3338. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00566-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00566-9)

Rola, R.C., Guerreiro, A.S., Gabe, H., Geihs, M.A., da Rosa, C.E., Sandrini, J.Z., 2020. Antifouling biocide dichlofluanid modulates the antioxidant defense system of the brown

mussel *Perna perna*. Marine Pollution Bulletin 157.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111321>

Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2001. Photodegradation study of the antifouling booster biocide dichlofluanid in aqueous media by gas chromatographic techniques, *Journal of Chromatography A*. 930, 135–144. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01193-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01193-1)

Sebaugh, J.L., 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics* 10, 128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>

Shirai, Y., Tomaru, Y., Takao, Y., Suzuki, H., Nagumo, T., Nagasaki, K., 2008. Isolation and Characterization of a Single-Stranded RNA Virus Infecting the Marine Planktonic Diatom *Chaetoceros tenuissimus* Meunier. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4022–4027. <https://doi.org/10.1128/aem.00509-08>

Steen, R.J.C.A., Ariese, F., Hattum, B. van, Jacobsen, J., Jacobson, A., 2004. Monitoring and evaluation of the environmental dissipation of the marine antifoulant 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) in a Danish Harbor. *Chemosphere* 57, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.043>

Thomas, K.V., Mchugh, M., Hilton, M., Waldock, M., 2003. Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles of biocides associated with paint particles into marinas may increase their persistence in the environment. *Environmental Pollution* 123, 153–161. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00343-3](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00343-3)

Thomas, K.V., 2009. The Use of Broad-spectrum Biocides in Marine Antifouling Paints. In: Hellio, C., Yebra, D.M. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*. Elsevier Ltd, pp. 522–553.

Thomas, K.V., Brooks, S., 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling* 26, 73-88. <https://doi.org/10.1080/08927010903216564>

Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Marine Pollution Bulletin*, 60(2), 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.12.004>

UNCTAD - United Nations Conference on Trade and Development, 2020. Trade and Development Report 2020 - From global pandemic to prosperity for all: avoiding another lost decade. New York: United Nations. 159 p.

Williams, T.M., 2007. The mechanism of action of isothiazolone biocides. In: Proceedings of the NACE-International Corrosion Conference Series; Nace International: San Diego, CA, USA. pp. 060901–0609017.

Xie, Q., Pan, J., Ma, C., Zhang, G., 2019. Dynamic surface antifouling: Mechanism and systems. *Soft Matter*. <https://doi.org/10.1039/c8sm01853g>

Zhou, X., Okamura, H., Nagata, S., 2006. Remarkable synergistic effects in antifouling chemicals against *Vibrio fischeri* in a bioluminescent assay. *Journal of Health Science*, 52. 243-251. <https://doi.org/10.1248/jhs.52.243>.

Zych, M., Burczyk, J., Kotowska, M., Kapuścik, A., Banaś, A., Stolarczyk, A., Termińska-Pabis, K., Dudek, S., Klasik, S., 2009. Differences in staining of the unicellular algae Chlorococcales as a function of algaenan content. *Acta Agronomica Hungarica*, 57(3), 377–381. <https://doi.org/10.1556/aagr.57.2009.3.12>