

**Caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de
nanomateriais engenheirados com propriedade anti-incrustante
sobre microrganismos isolados de ambiente marinho**

VITHÓRIA CAROLYNA TRINDADE DOS SANTOS

SÃO VICENTE - SP
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL
PAULISTA

Caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanomateriais engenheirados com propriedade anti-incrustante sobre microrganismos isolados de ambiente marinho

VITHÓRIA CAROLYNA TRINDADE DOS SANTOS

ORIENTADORA: CRISTIANE ANGÉLICA OTTONI

CO-ORIENTADOR: DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA

CO-ORIENTADOR: ROBERTO CARLOS DOMINGOS MARTINS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

SÃO VICENTE - SP

2021

S237c Santos, Vithória Carolyna Trindade dos
Caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de
nanomateriais engenheirados com propriedade anti-incrustante
sobre microrganismos isolados de ambiente marinho / Vithória
Carolyna Trindade dos Santos. -- São Vicente, 2021
73 p.: il., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni
Coorientador: Denis Moledo de Souza Abessa
Coorientador: Roberto Carlos Domingos Martins

1. Nano-anti-incrustante. 2. DCOIT. 3. Bacillus subtilis.
4. Aspergillus niger. 5. Chlorella minutissima. I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
UNESP – Instituto de Biociências / Campus do Litoral Paulista
Dados fornecidos pelo autor

A Deus e à minha família, pelo amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por me permitir nunca desistir dos meus sonhos.

A Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni, pela orientação, amizade e a dedicação com que conduziu a minha formação.

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Denis Abessa e Dr. Roberto Martins por me ensinar, auxiliar e acreditar em meu potencial.

Aos Profs. Drs. do Instituto de Biociências que conduziram direta ou indiretamente na minha formação.

A Flávia Saldanha por todo o ensinamento, auxílio e confiança.

A Roberta Merquizo por todo o ensinamento, apoio e risadas.

A todas colegas do laboratório Micobio-Nanotec, em especial a Cláudia Aquaroli, pelos momentos felizes e tristes compartilhados e por todo o auxílio.

À CAPES pelo incentivo financeiro para a execução desse trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros (PPG- BAC) pela oportunidade da formação acadêmica

Ao Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista (IB-CLP) da Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMAR) e Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), pelo espaço e equipamentos cedidos.

A Ana Paula, pelo amor, educação e confiança.

Ao Márcio dos Santos, por todo incentivo, amor e confiança.

Aos meus irmãos, Lucas, Livia e Maria Valentina pelo amor, carinho e momentos de felicidade.

A Sonia Maria pela inspiração pelo conhecimento, amor e sempre acreditar nos

meus sonhos.

A toda a família Trindade e dos Santos pelo amor e apoio, em especial Waldeli Trindade e Josefa dos Santos pelo amor e carinho.

Ao Tiago Zaminelli, por todo o apoio e amizade.

Ao Guilherme Rodrigues companheiro da minha vida e companheiro de laboratório. Por acreditar nos meus sonhos mais que eu mesma. Pelo amor, paciência, companheirismo e dedicação.

A família Borges, pelo carinho, amor e por me considerar parte da família.

A Mili, Maia e Spike, por todo amor e carinho durante todos esses anos.

A Prof. Dra. Cristiane Ottoni e ao Guilherme Rodrigues um agradecimento especial, pelo carinho, paciência e por não medirem esforços para realizar meu sonho.

“Work gives you meaning and purpose and life is empty without it.” (Stephen Hawking)

RESUMO

A bioincrustação marinha (BI) é um processo natural de extrema importância para a biodiversidade, onde ocorre o crescimento sucessivo de organismos em uma superfície submersa. No entanto, quando ocorre em estruturas construídas pelo homem, causam diversos problemas socioeconômicos e ambientais. A principal solução para a BI consiste na aplicação de tintas que contêm biocidas anti-incrustantes (BANIN) que impedem a adesão e crescimento destes organismos a uma superfície. Devido às leis ambientais cada vez mais restritivas, as empresas da área têm se dedicado no desenvolvimento de formulações que sejam menos nocivas ao meio ambiente. O objetivo do trabalho foi caracterizar nanomateriais (NM) com propriedades anti-incrustantes e determinar a sua toxicidade em microrganismos isolados da zona costeira brasileira. Os NM constituídos pelo biocida orgânico 4,5-dicloro-2-noctil-4-isotiazolin3-ona (DCOIT), encapsulado em nanocontentores mesoporosos de sílica (SiNC) e revestidos pela prata (Ag), foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia de energia dispersiva (*Energy Dispersive Spectroscopy* - EDS ou EDX), Espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS), Potencial Zeta (P ζ) e Índice de polidispersão (*Polydispersion Index* - PDI). A toxicidade dos NM foi determinada a partir da Concentração mínima inibitória (CIM) e Concentração Mínima Biocida (CBM) em bactérias (*Bacillus subtilis*, *Vibrio aestuarianus*, *V. parahaemolyticus*), fungos (*Penicillium citrinum* IB-CLP11, *P. sclerotigenum* IB-CLP17, *Aspergillus niger* IB-CLP20 e *P. polonicum* IB-CLP22) e microalga (*Chlorella minutissima* BMAK26a). Os NM apresentaram estabilidade e monodispersão de tamanhos como verificado pelas análises de DLS, PDI e P ζ . As micrografias obtidas por MET revelaram a forma esférica com diâmetros de 112, 136, 139 e 133 nm para SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag, respectivamente e a análise de EDS confirmou a presença dos elementos presentes nas amostras. O ensaio antimicrobiano em bactérias e fungos mostrou que SiNC apresentou ação antimicrobiana apenas para *B. subtilis* (CIM = 10 mg·L⁻¹). DCOIT foi tóxico para todas as espécies de bactérias e fungos (CIM = 1 mg·L⁻¹; CBM ≤ 10 mg·L⁻¹) e Ag sendo o que apresentou maior toxicidade (CBM ≤ 1 mg·L⁻¹). SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag apresentaram ação antimicrobiana para todas as espécies de bactérias e fungos (CIM = 1 mg·L⁻¹ e CBM ≤ 10 mg·L⁻¹). O ensaio de densidade celular em *C. minutissima* apresentou menor toxicidade para SiNC (EC₅₀ = 2,24 mg·L⁻¹), SiNC-DCOIT (EC₅₀ = 0,625 mg·L⁻¹), SiNC-Ag (EC₅₀ = 0,584 mg·L⁻¹), quando comparados aos valores estimados para DCOIT (EC₅₀ = 0,040 mg·L⁻¹), Ag (EC₅₀ = 0,021 mg·L⁻¹). A análise da clorofila total apresentou um aumento de 133%, 122% e 120% (SiNC, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT, respectivamente) na concentração de 0,001 mg·L⁻¹ em comparação com o controle. SiNC na concentração de 0,01 e 0,1 mg·L⁻¹ apresentou umaumento de 130% para as duas concentrações. Enquanto que SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag na concentração de 1 mg·L⁻¹ apresentou uma diminuição de 28,9%, 81,3%, 85,5% e 92,4% no teor de clorofila total. DCOIT e Ag apresentaram uma maior influência no teor de clorofila, reduzindo em 17,3% e 23,2% em comparação com o controle, respectivamente a 0,01 mg·L⁻¹. O encapsulamento do biocida comprovou ser uma abordagem inovadora e promissora para o desenvolvimento de tintas anti-incrustantes.

Palavras-chave: Nano-anti-incrustante; DCOIT; *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Chlorella minutissima*.

ABSTRACT

Marine biofouling (BI) is a natural process of extreme importance for biodiversity, where successive growth of organisms occurs on a submerged surface. However, when it occurs on man-made structures, it causes several socioeconomic and environmental problems. The main solution for BI is the application of paints containing anti-fouling biocides (BANIN) that prevent these organisms from adhering and growing on a surface. Due to increasingly restrictive environmental laws, companies in the area have been dedicated to the development of formulations that are less harmful to the environment. The objective of this work was to characterize nanomaterials (NM) with anti-fouling properties and to determine their toxicity on microorganisms isolated from the Brazilian coastal zone. The NM consisting of the organic biocide 4,5-dichloro-2-noctyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT), encapsulated in mesoporous silica nanocontainers (SiNC) and coated by silver (Ag), were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS or EDX), Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potential (P ζ) and Polydispersion Index (PDI). The toxicity of NMs was determined from the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Biocidal Concentration (MBC) on bacteria (*Bacillus subtilis*, *Vibrio aestuarianus*, *V. parahaemolyticus*), fungi (*Penicillium citrinum* IB-CLP11, *P. sclerotigenum* IB-CLP17, *Aspergillus niger* IB-CLP20 and *P. polonicum* IB-CLP22) and microalgae (*Chlorella minutissima* BMAK26a). The NMs showed stability and size monodispersity as verified by DLS, PDI and P ζ analyses. Micrographs obtained by TEM revealed spherical shape with diameters of 112, 136, 139 and 133 nm for SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag and SiNC-DCOIT-Ag, respectively and EDS analysis confirmed the presence of the elements present in the samples. The antimicrobial assay on bacteria and fungi showed that SiNC showed antimicrobial action only for *B. subtilis* (MIC = 10 mg·L⁻¹). DCOIT was toxic to all species of bacteria and fungi (MIC = 1 mg·L⁻¹; MBC \leq 10 mg·L⁻¹) and Ag showing the highest toxicity (MBC \leq 1 mg·L⁻¹). SiNC-DCOIT, SiNC-Ag and SiNC-DCOIT-Ag showed antimicrobial action for all species of bacteria and fungi (MIC = 1 mg·L⁻¹ and MBC \leq 10 mg·L⁻¹). Cell density assay on *C. minutissima* showed lower toxicity for SiNC (EC₅₀ = 2.24 mg·L⁻¹), SiNC-DCOIT (EC₅₀ = 0.625 mg·L⁻¹), SiNC-Ag (EC₅₀ = 0.584 mg·L⁻¹), when compared to the estimated values for DCOIT (EC₅₀ = 0.040 mg·L⁻¹), Ag (EC₅₀ = 0.021 mg·L⁻¹). Total chlorophyll analysis showed an increase of 133%, 122% and 120% (SiNC, SiNC-Ag and SiNC-DCOIT, respectively) at the concentration of 0.001 mg·L⁻¹ compared to the control. SiNC at the concentration of 0.01 and 0.1 mg·L⁻¹ showed an increase of 130% for both concentrations. While SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag and SiNC-DCOIT-Ag at the concentration of 1 mg·L⁻¹ showed a decrease of 28.9%, 81.3%, 85.5% and 92.4% in total chlorophyll content. DCOIT and Ag showed a greater influence on chlorophyll content, reducing by 17.3% and 23.2% compared to the control, respectively at 0.01 mg·L⁻¹. Encapsulation of the biocide has proven to be an innovative and promising approach for the development of anti-fouling paints.

Keywords: Nano-antifouling; DCOIT; *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Chlorella minutissima*.

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Bioincrustação.....	18
2.1.1	Biofilme.....	20
2.2	Nanomateriais.....	21
2.3	Anti-incrustantes.....	25
2.4	Legislação.....	29
2.4.1	Biocidas anti-incrustantes.....	29
2.4.2	Nanomateriais.....	31
2.5	Microrganismos testes.....	32
2.5.1	Bactérias.....	32
2.5.2	Fungos Filamentosos.....	33
2.5.3	Microalga.....	34
3	OBJETIVO.....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
3.2.1	Caracterizar os nanomateriais por diferentes técnicas morfológicas – Microscopia eletrônica de transmissão e Espectroscopia de Raios X por dispersão e energia (<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> - EDS ou EDX);.....	36
3.2.2	Caracterizar os nanomateriais por diferentes técnicas estruturais – Espalhamento de Luz Dinâmico (<i>Dynamic Light Scattering</i> - DLS), Potencial Zeta (Pζ), Índice de polidispersão (<i>Polydispersion Index</i> - PDI) e Difração de Raios X (DRX);.....	36
3.2.3	Testes miniaturizados de toxicidade em bactérias marinhas Gram-positiva e Gram-negativas isoladas na zona costeira brasileira;.....	36
3.2.4	Testes miniaturizados de toxicidade em fungos marinhos isolados na zona costeira brasileira;.....	36
3.2.5	Teste miniaturizado de toxicidade em microalga isolada na zona costeira brasileira.	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Síntese dos nanomateriais.....	37
4.2	Caracterização dos nanomateriais.....	37
4.2.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	37
4.2.2	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia.....	38
4.2.3	Difração de Raios X.....	38
4.2.4	Análise de tamanho de partícula, distribuição e índice de polidispersão.....	38
4.3	Ensaio de toxicidade.....	38
4.3.1	Determinação de Concentração inibitória mínima e Concentração bacterida mínima	38

4.3.2	Determinação de Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima	39
4.3.3	Determinação da densidade celular de microalga.....	40
4.4	Análise estatística	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1	Caracterização dos nanomateriais	43
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão	43
5.1.2	Espectroscopia de energia dispersiva.....	43
5.1.3	Difração de Raios X.....	44
5.1.4	Tamanho de partícula, distribuição e índice de polidispersão	45
5.2	Ensaio de Toxicidade	49
5.2.1	Determinação de Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima	49
5.2.2	Determinação de Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima	51
5.2.3	Determinação da densidade celular da <i>Chlorella minutissima</i>	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8	ANEXO.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de crescimento de diferentes organismos marinhos bioincrustantes.	18
Figura 2. Modelo esquemático das etapas da formação de biofilme microbiano presente na bioincrustação.	20
Figura 3. Linha do tempo com acontecimentos relevantes da história das tintas anti-incrustantes.	25
Figura 4. Área do Estuário de Santos com a determinação dos pontos de coleta das amostras das espécies de bactérias <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio aestuarianus</i> isoladas.	32
Figura 5. Área da Baía do Araçá - São Sebastião com a determinação do ponto de coleta da amostra das espécies de fungos filamentosos <i>Penicillium citrinum</i> IB-CLP11, <i>Penicillium sclerotigenum</i> IB-CLP17, <i>Aspergillus niger</i> IB-CLP20 e <i>Penicillium polonicum</i> IB-CLP22 isolados.	34
Figura 6. Área de Cananéia - Litoral Paulista com a determinação do ponto de coleta da amostra da espécie de microalga marinha <i>Chlorella minutissima</i> isolada.	35
Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão dos nanomateriais: (a) SiNC; (b) SiNC-DCOIT; (c) SiNC-Ag; (d) SiNC-DCOIT-Ag.	43
Figura 8. Difrátogramas de raios X de SiNC, SiNC-Ag, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag.	45
Figura 9. A imagem representa o diâmetro hidrodinâmico formado, analisado pela técnica DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico).	46
Figura 10. A imagem representa a dupla camada formada e os diferentes potenciais de superfícies que podem ser analisados para identificar a estabilidade dos nanomateriais pela técnica Pζ (Potencial Zeta).	48
Figura 11. Curva de crescimento da microalga <i>Chlorella minutissima</i>	53
Figura 12. Retas de calibração da absorbância da cultura de <i>Chlorella minutissima</i> em função da concentração de células.	54
Figura 13. Efeito dos MNMEs no crescimento da alga <i>Chlorella minutissima</i> . O valor é a sobrevivência da alga sob tratamento variado em relação ao controle.	55
Figura 14. Clorofila total da microalga <i>Chlorella minutissima</i> exposta aos MNMEs SiNC, DCOIT, Ag, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag, SiNC-DCOIT-Ag, respectivamente após as 96 horas.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxicidade expressa em Concentração inibitória mínima (CIM), concentração biocida mínima (CBM), concentração de efeito mais baixa observada (LOEC) e concentração efetiva mediana (EC ₅₀) para espécies que constituem o biofilme expostas a nanomateriais.....	24
Tabela 2. Toxicidade expressa em concentração efetiva mediana (EC ₅₀) para espécies presentes no fitoplâncton que constituem o biofilme expostas a biocidas utilizados na TANIN.	26
Tabela 3. Toxicidade expressa em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração efetiva mediana (EC ₅₀) para espécies que constituem o biofilme expostas ao biocida DCOIT.....	27
Tabela 4. Toxicidade expressa em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração efetiva mediana (EC ₅₀) para espécies que constituem o biofilme expostas ao biocida Ag.	28
Tabela 5. Análise semi-quantitativa e micrografia das amostras de (a) SiNC; (b) SiNC-DCOIT; (c) SiNC-Ag; (d) SiNC-DCOIT-Ag, com ampliação de 250x.....	44
Tabela 6. Caracterização das amostras de SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag (∅ =129, 152, 134 and 125 nm para SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag, respectivamente).....	47
Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração biocida mínima (CBM) das amostras de NCs SiNC, DCOIT, Ag, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Vibrio aestuarianus</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . “nd”: não determinado.	50
Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de NCs SiNC, DCOIT, Ag, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag contra <i>Penicillium citrinum</i> IB-CLP11, <i>Penicillium clerotigenum</i> IB-CLP17, <i>Aspergillus niger</i> IB-CLP20 e <i>Penicillium polonicum</i> IB-CLP22. “nd”: não determinado.....	52
Tabela 9. Material suplementar com os dados de SiNC, DCOIT e Ag e sua toxicidade para todas as espécies testadas. Concentração inibitória mínima (CIM), concentração biocida mínima (CBM), concentração de efeito não observado (NOEC), concentração de efeito mais baixa observada (LOEC), concentração efetiva mediana (EC ₅₀) para espécies expostas a SiNC, DCOIT e Ag. “nd”: não determinado. CBM representa a concentração bactericida / fungicida mínima.	71

Tabela 10. Material suplementar com os dados de SiNC, DCOIT e Ag e sua toxicidade para todas as espécies testadas. Concentração inibitória mínima (CIM), concentração biocida mínima (CBM), concentração de efeito não observado (NOEC), concentração de efeito mais baixa observada (LOEC), concentração efetiva mediana (EC₅₀) para espécies expostas a SiNC, DCOIT e Ag. “nd”: não determinado. CBM representa a concentração bactericida / fungicida mínima.71

LISTA DE SIGLAS

ABDI - Agência brasileira de desenvolvimento industrial

ACVM - *Act Agricultural Compounds and Veterinary Medicines Act 1997*

AFS - Anti-Fouling System

Ag - Prata

AgNO₃ - Nitrato de Prata

AgNP - Nanopartícula de Prata

AGVET - *Agricultural and Veterinary Chemicals Code Act 1994*

AN - Ágar nutriente

ANTIN - Anti-incrustantes

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APVMA - *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority*

BANIN - Biocidas Anti-Incrustantes

BD - Batata Dextrose

BDA - Batata Dextrose Ágar

BHI - *Brain Heart Infusion*

BI - Bioincrustação

BMAK - Banco de Microrganismos Aidar & Kutner

BPD - Biocidal Products Directive

CBM - Concentração Biocida Mínima ou Concentração Bactericida Mínima

CFM - Concentração Fúngica Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CO₂ - Dióxido de Carbono

CTAB - Cetil Brometo De Trimetilamônio

CuPT - Piritona de Cobre

DCOIT - 4,5-dicloro-2-noctil-4-isotiazolin3-ona

DLS - Espalhamento de Luz dinâmico

DRX - Difração de Raios X

EC₅₀ - Concentração Efetiva Mediana

EDS ou EDX - Espectroscopia de energia dispersiva

EPS - Substâncias Poliméricas Extracelulares

ERMA - *Environmental Risk Management Authority New Zealand*

EUA - Estados Unidos da América

FDA - *Food and Drug Administration*

IB-CLP - Instituto de Biociências- Câmpus Litoral Paulista

IBN - Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia

IO - Instituto Oceanográfico

IPT - Instituto de Pesquisa Tecnológica

JPMA - *Japan Paint Manufacturers' Association*

LC₅₀ - Concentração letal mediana

LOEC - Concentração de Efeito Mais baixa Observada

MEPC - Comitê de Proteção do Meio Ambiente Marinho

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MH - *Muller Hinton Broth*

MICROMAR - Laboratório de Microbiologia Marinha

MNMEs - Micro-Nanomateriais Estruturados

NM - Nanomateriais

NOEC - Concentração de efeito não observado

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento

OMI - Organização Marítima Internacional

PCPA - Pest Control Products Act

PDI - Índice de Polidispersão

PMRA - Pest Management Regulatory Agency

Pζ - Potencial Zeta

SiNC - Nanocontentores Mesoporosos de Sílica

SiO₂ - Dióxido de Silício

SiO₂NPs - nanopartículas de dióxido de silício

Smallmatek - *Small Materials and Technologies, Lda*

TANIN - Tintas Anti-Incrustantes

TBT – Tributilestanho

TCMTB - Benzotiazol-2-iltio tiocianato de metila

TEOS - Tetraetilortossilicato

TiO₂NP - Nanopartícula de Dióxido de Titânio

TPT - Trifenilestanho

TSA - Ágar triptona de soja

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

US-EPA - *United States Environmental Protection Agency*

Uv-Vis – Ultravioleta Visível

ZnPT - Piritona de Zinco

1 INTRODUÇÃO

O ambiente marinho (AM) tem sofrido de forma severa, especialmente na última década, em decorrência da contínua exposição a compostos antropogênicos. Neste contexto, ações relacionadas ao monitoramento ambiental, intrinsecamente associada à preservação da biodiversidade, são iminentes (Machado et al., 2020). Dentre os diversos organismos que compõem o AM, os microrganismos desempenham um papel fundamental associado à sua função ecológica (Sen et al., 2021; Hermoso et al., 2021). Também, são reconhecidamente considerados como um dos principais agentes no processo de bioincrustação (Luo et al., 2017).

A bioincrustação (BI) é definida como a colonização em qualquer superfície sólida, viva ou morta, natural ou artificial, por microrganismos e, sequencialmente, por macrorganismos (Hayek et al., 2021). Este processo se inicia com a adsorção de diversos nutrientes e matéria orgânica presente no ambiente a uma superfície. O biofilme formado viabiliza o crescimento de organismos maiores, que se aderem de forma sucessiva à superfície (Chen et al., 2021). Muito embora a BI seja importante para o desenvolvimento da cadeia trófica, contribuindo para a biodiversidade e produtividade biológica local (Hayek et al., 2021; Farkas et al., 2021), quando esse processo ocorre em estruturas construídas pelo homem, os organismos incrustantes não só colocam em perigo o desenvolvimento da economia marinha, mas também, dificultam a exploração humana do oceano (Gu et al., 2020).

Séculos atrás, metais pesados, como cobre, chumbo, arsênico e mercúrio eram utilizados como anti-incrustantes (ANTIN) em cascos de navios. Com o passar do tempo, esses ANTIN foram proibidos devido aos riscos que apresentam ao meio ambiente, com exceção do cobre, que ainda é permitido. Desde a década de 1950, um potente biocida de amplo espectro, tributilestanho (TBT), foi incorporado a várias formulações de revestimento para cascos de navios (Szeto et al., 2020). Contudo, na década de 1970, na França, foram investigados os efeitos tóxicos do TBT liberado dos revestimentos de ANTIN. A extrema toxicidade do TBT foi observada em muitos organismos aquáticos, para além daqueles que estão diretamente associados ao fenômeno da BI. Devido à esta detecção nociva ao ambiente supracitado, muitos países restringiram a sua utilização. Com base nas recomendações da Convenção Internacional a respeito do Controle de Sistemas Anti-incrustantes Nocivos para Navios realizada no ano de 2001, o uso de TBT foi proibido a partir de setembro do ano de 2008. Em decorrência deste fato, os

fabricantes de revestimentos ANTIN restringiram de suas formulações o estanho (Han et al., 2021). Como alternativa ao TBT, o biocida, diclorometilisotiazolinona (DCOIT, Sea-Nine 211), aprovado em 1994 pelos Estados Unidos e em 2014 pela União Europeia, ganhou espaço, uma vez que, apresenta uma rápida degradação e menores danos ao meio ambiente (Jesus et al., 2021). Toxicologicamente, o DCOIT demonstra elevada atividade antimicrobiana, sobretudo com relação a bactérias e fungos (Castro et al., 2011). Este biocida também foi referenciado como um agente que causa distúrbios em enzimas de neurotransmissão, citotoxicidade, estresse oxidativo dentre outros aspectos negativos. Jesus et al. (2021) e Su et al. (2018) reforçam a necessidade de maiores estudos relacionados à toxicidade e impactos ambientais do DCOIT, previamente a sua comercialização.

Neste contexto, diante da necessidade crescente de se desenvolver estratégias inovadoras para prevenir a deterioração das estruturas marinhas e, que ao mesmo tempo, não sejam agressivas ao meio ambiente, os revestimentos à base de nanomateriais têm sido descritos como uma possível alternativa. Estratégias que utilizam o encapsulamento e imobilização de compostos ativos ANTIN em nanocontentores "inteligentes" estão em expansão. Os nanocontentores "inteligentes" são materiais nanoestruturados que liberam os compostos ativos de forma controlada, evitam o contato entre as espécies ativas e a matriz de revestimento e fornecem uma barreira de proteção do composto ativo para o meio ambiente (Avelelas et al., 2017; Miller et al., 2020). Estudos sobre uma nova formulação de DCOIT incorporado em nanocontentores de sílica com revestimento de prata foram realizados por Jesus et al. (2021), Santos et al. (2020) e Figueiredo et al. (2020) sinalizando a eficiência desses materiais como ANTIN, uma vez que, a sua exposição a organismos como, crustáceos e microcrustáceos, apresentaram uma menor toxicidade em comparação aos biocidas equivalentes, DCOIT e Ag, respectivamente.

Diante do exposto, no presente estudo, foi realizada a caracterização e avaliada a ação antimicrobiana de uma nova geração do agente anti-incrustante DCOIT, encapsulado em nanocontentores de sílica (SiNC) e revestidos com prata (Ag).

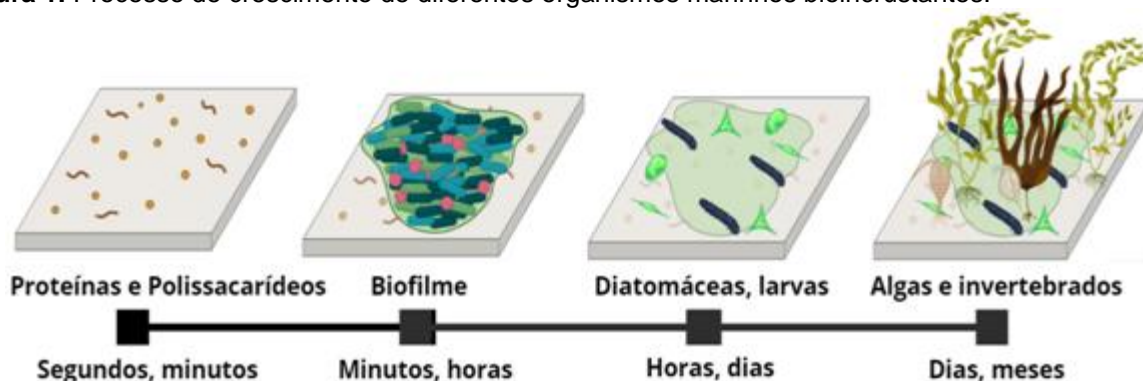
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioincrustação

O oceano abrange cerca de 70% da superfície terrestre sendo o principal meio aquaviário do transporte de cargas mundial. Deste modo, é inegável e imprescindível destacar a sua importância do ponto de vista econômico de diversos setores industriais. A indústria de transporte marítimo é fortemente afetada pela BI, uma vez que, está associada à redução do desempenho dos navios. Existem mais de 4000 espécies presentes nos oceanos que podem contaminar a superfície submersa dos cascos, colocando em risco a biodiversidade (Farkas et al., 2021).

A BI é um fenômeno no qual diferentes organismos colonizam de maneira acelerada estruturas naturais e sintéticas submersas em um ambiente aquático. Existem dois grupos principais, composto por diversos organismos incrustantes. Com base em seu tamanho, esses grupos são classificados em microrganismos e macrorganismos. Os organismos incrustantes passam por quatro estágios principais de progressão: adsorção, consolidação, microincrustação e macroincrustação (Fig. 1) (Abioye et al., 2019).

Figura 1. Processo de crescimento de diferentes organismos marinhos bioincrustantes.



Fonte: Adaptado de Li e Ning (2019).

A primeira etapa da BI ocorre com a formação de uma película na superfície submersa em decorrência da aglomeração de moléculas orgânicas, como polissacarídeos, proteínas, proteoglicanos e moléculas inorgânicas. Após a aglomeração das moléculas orgânicas e inorgânicas, inicia-se a segunda etapa que consiste na formação de um biofilme microbiano que contém principalmente bactérias, cianobactérias, dinoflagelados, fungos e protozoários. O biofilme é uma camada

microbiana que coloniza substratos naturais ou artificiais. Estas camadas microbianas apresentam diversos níveis de complexidade estrutural e funcional. Tais camadas são controladas por processos físicos, químicos e biológicos, incluindo interações com topografia, ambientais, ciclagem de nutrientes e matéria orgânica e fotossíntese, que afetam diretamente o funcionamento do ecossistema (Caruso et al., 2020). A terceira etapa é caracterizada pela adesão de organismos maiores como diatomáceas, cracas, larvas e esporos de macroalgas. A quarta e última etapa consiste na colonização e desenvolvimento de espécies marinhas maiores de invertebrados como poliquetas, cracas, mexilhões e algas (Agostini et al., 2020).

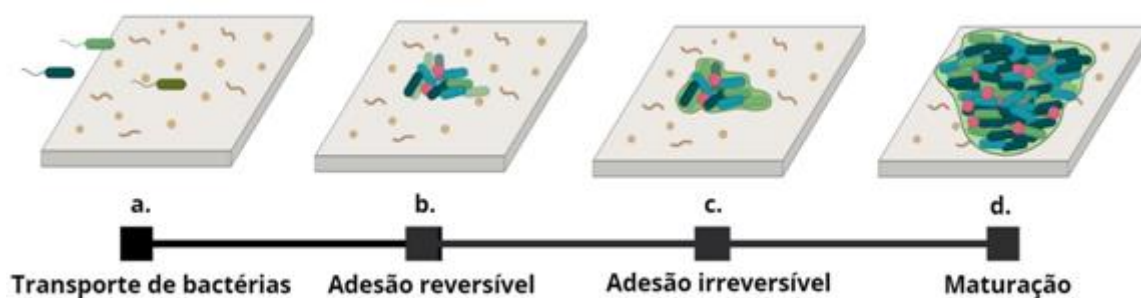
Ainda que a BI seja um processo natural, quando associada a estruturas produzidas pelo homem, pode causar severos impactos econômicos, principalmente associados à indústria naval (Pradhan et al., 2018). De acordo com Abioye et al. (2019), em decorrência de fatores associados a este fenômeno, existe uma perda econômica anual de 200 bilhões de euros. A BI pode desencadear entupimento de tubulações, aumentando o peso da embarcação e, conseqüentemente, afetar a superfície dos cascos, deixando-os irregulares, rugosos e corroídos, elevando o atrito e, por consequência, a redução de sua velocidade. Além disso, o aumento do gasto do combustível amplia as emissões de CO₂, influenciando diretamente no efeito estufa (Abioye et al., 2019). Em adição, as camadas de biofilme podem também abrigar e facilitar o crescimento de microrganismos patogênicos afetando a saúde pública (Joyce et al., 2019).

Segundo Ygit et al. (2019), a BI gera diversos impactos econômicos devido ao crescimento sucessivo das espécies que se aderem aos cascos das embarcações e, também, na água de lastro também gera impactos ambientais, contribuindo para a introdução de espécies invasoras, que podem competir e/ou extinguirem espécies nativas, alterando a cadeia alimentar e reduzindo a biodiversidade do ecossistema. A consequência desse impacto, também pode envolver a redução das populações de espécies de interesse comercial gerando um impacto social para as comunidades que dependem financeiramente desses organismos. Assim, esforços para prevenir a BI são altamente benéficos para economia e meio ambiente.

2.1.1 Biofilme

A formação do biofilme é composta por quatro etapas, inicialmente ocorre o transporte de bactérias para a superfície (Fig. 2a), devido a fatores associados à gravidade, dinâmica de fluidos e mobilidade celular (Flemming et al., 2020). Sequencialmente, ocorre a adesão reversível. Nesta etapa (Fig. 2b), diferentes fatores físico-químicos como rugosidade, hidrofobicidade/hidrofilicidade, porosidade e topologia dos poros da superfície são responsáveis pela aderência das células bacterianas a uma superfície. Assim como, a presença de flagelos, pelos, fímbrias e glicocálice afetam significativamente o grau de adesão, uma vez que, estes apêndices auxiliam as células a permanecerem fixas mesmo quando atuam forças repulsivas (Mahamuni-Badiger et al., 2020). A terceira etapa (Fig. 2c) consiste na adesão irreversível, onde as bactérias interagem com o filme primário e, em minutos, ocorre a fixação permanente das células por conta de compostos adesivos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS) presentes no meio. Na última etapa, o crescimento dessas células supracitadas chega ao ponto de maturação. A maturação ocorre devido a presença de nutrientes no biofilme e proporciona o assentamento e o crescimento de invertebrados e algas (Fig. 2d) (Antunes et al., 2018; Amara et al., 2018).

Figura 2. Modelo esquemático das etapas da formação de biofilme microbiano presente na bioincrustação.



Fonte: Adaptado de Amara et al. (2018)

2.2 Nanomateriais

O desenvolvimento da nanotecnologia levou a um enorme investimento na produção de nanomateriais (NM). Os nanomateriais são materiais que exibem pelo menos uma única entidade morfológica, como dimensão arquitetônica, tamanho granular, dimensão de partículas e assim por diante, em nanoescala ou abaixo de 100 nm (Idumah et al., 2020). Quando o tamanho de um material é reduzido para a faixa nanométrica, as propriedades químicas, físicas e biológicas do material mudam e se tornam totalmente diferentes das propriedades de seus átomos individuais, moléculas ou materiais em larga escala. Isso ocorre, pois há uma modificação na superfície do material, a superfície modificada é uma ferramenta poderosa que aprimora as propriedades do material ao transmitir os grupos funcionais desejados em sua superfície sem comprometer as propriedades em massa (Mathew et al., 2019; Jawed et al., 2020).

No início do ano 2000, a primeira geração de NM foi amplamente utilizada na forma de nanoestruturas passivas (função estacionária). As nanoestruturas passivas incluem revestimentos nanoestruturados, dispersão de nanopartículas, superfícies nanopadronizadas, engenharia de ultraprecisão, materiais bulk (metais nanoestruturados, polímeros e cerâmicas). Estes materiais nanoestruturados têm estruturas estacionárias ou quase-estacionárias e funções associadas ao comportamento mecânico ou reatividade química. A segunda geração destes materiais foi iniciada no ano de 2005, sendo classificadas como nanoestruturas ativas. As nanoestruturas ativas possuem funções que evoluem, isto é, mudam o seu estado durante sua operação (Lai et al., 2018).

A introdução de novas tecnologias atreladas à nanotecnologia promoveu a partir do ano de 2010, o desenvolvimento da terceira geração de NM. Esta geração se destaca pelo desenvolvimento de sistemas de nanosistemas, uso em várias sínteses e técnicas de montagem, tais como: biomontagem, redes em nanoescala, em multiescala e em arquiteturas hierárquicas, robótica em superfícies, nanosistemas modulares, processos quimiomecânicos de montagem molecular, sistemas em nanoescala baseados em quântica. A quarta geração iniciada no ano de 2015 foi impulsionada por envolver nanosistemas moleculares heterogêneos, onde cada molécula no nanosistema tem uma estrutura específica e um papel diferente. Moléculas poderiam ser usadas como dispositivos e fundamentalmente novas funções poderiam emergir destas estruturas e arquiteturas engenheiradas. Tal situação se aproximaria do modo de funcionamento dos

sistemas biológicos, mas na comparação com eles: são à base de água, processam a informação de forma relativamente lenta, e têm múltiplas escalas hierárquicas. Atualmente nesta geração, os NM são produzidos para a interação direta com sistemas biológicos (Lai et al., 2018).

Os NM podem ser produzidos a partir do método *bottom-up* ou *top-down*. O método *bottom-up* consiste em construir estruturas átomo a átomo ou molécula por molécula. No método *top-down*, a produção do NM é iniciada por processos de trituração e moagem, ou seja, macroscópica e segue uma sequência de processos até atingir a escala desejada. As sínteses dos NM podem ter origem em fontes naturais e antropogênicas, incluindo metabolismos microbianos, fontes hidrotermais e poeira vulcânica. Os micro-nanomateriais estruturados (MNMEs) de fontes antropogênicas são projetados com características aprimoradas, que incluem propriedades ópticas, térmicas e elétricas, condutividade, solubilidade e reatividade. Portanto, em comparação com as formas naturais, esses materiais têm interações distintas com constituintes bióticos e abióticos do ambiente. Essas propriedades exclusivas dos MNMEs resultam em aplicações amplamente difundidas em produtos comerciais e trazem benefícios para vários setores industriais, como alimentos, cosméticos, pesticidas e produtos farmacêuticos (El-saied et al., 2020).

Novos NM ANTIN foram desenvolvidos recentemente usando nanocontentores mesoporosos de sílica (SiNC) para encapsular o biocida DCOIT, sendo posteriormente revestidos de um agente antimicrobiano, normalmente a Ag. Os SiNC possuem um núcleo vazio e uma concha com mesoporosidade gradual que confere capacidade de carga significativa e permite a liberação prolongada e estimulada do biocida, como pH, proporcionando uma carga ambiental segura do biocida, juntamente com o direcionamento específico. Estes nanocontentores também possuem boa biocompatibilidade, elevada capacidade de carregamento, versatilidade em se fixar a ligantes alvo, ampliando assim, o reconhecimento celular específico. Em acréscimo, a sua porosidade pode ser ajustável e bem definida, tornando estes MNMEs adequados para entrega de drogas (Vazquez et al., 2017). Quando utilizado como aditivo de revestimento, a vida útil do biocida é ampliada e o teor percentual do ingrediente ativo principal no revestimento também é bastante reduzido. A empresa Small Materials and Technologies, Lda (Smallmatek), situada em Aveiro, Portugal, tem desenvolvido e produzido nos últimos anos nanomateriais de engenharia funcionalizados, incluindo os utilizados no presente estudo. De acordo com Santos et al. (2020) e Eivazzadeh-Keihan

et al. (2020) a inserção destes compostos em revestimentos de proteção para aplicações marítimas é promissora.

É imprescindível destacar, que para aplicações marítimas este tipo de compostos incorporados aos revestimentos sejam estáveis e apresentem ação antimicrobiana, impedindo assim, a formação do biofilme. A aplicação de revestimentos anti-incrustantes eficientes pode gerar uma economia de milhões de dólares no custo das operações de manutenção, ou mesmo prevenir danos aos ecossistemas. Os revestimentos anti-incrustantes frequentemente incluem biocidas para prevenir o crescimento de microrganismos indesejados, como bactérias, cianobactérias, fungos, protozoários e microalgas, e macroincrustantes, como briozoários, macroalgas, vermes tubulares e mexilhões (Jesus et al., 2021).

O mercado de NM pode chegar a US \$100 bilhões em 2025 (Allan et al., 2021). A produção de NM é uma área de inovação de produtos que está se desenvolvendo mais rapidamente do que as estruturas regulatórias. Os MNMEs podem sofrer alterações durante sua fabricação, uso e subsequente, entrada e passagem pelo ambiente. Estas alterações podem afetar suas formas químicas e físicas, reatividade, mobilidade potencial, detectabilidade e toxicidade (Kralova e Jampilek, 2021). Devido ao incremento da utilização desses MNMEs, os mesmos são considerados nos dias atuais contaminantes emergentes. Gutner-Hoch et al. (2019) reforça que é imprescindível a uma alargada avaliação da toxicidade de micro e nanomateriais previamente a sua inserção no mercado e, conseqüentemente, exposição ao meio ambiente.

A interação de compostos antropogênicos com a biodiversidade marinha (bactérias, fungos, microalgas) é considerada a primeira etapa da incorporação de poluentes na cadeia trófica. As formas como os MNMEs atuam na biodiversidade marinha ainda são pouco conhecidas e variam de acordo com a espécie de estudo e as características dos NM (Allan et al., 2021). Os efeitos dos MNMEs são estudados utilizando diversos organismos (Tab. 1), sendo que, para ecossistemas de água doce e marinho, as algas são os representantes mais comuns, devido ao seu valor ecológico que constitui a base das cadeias tróficas (Arze et al., 2020).

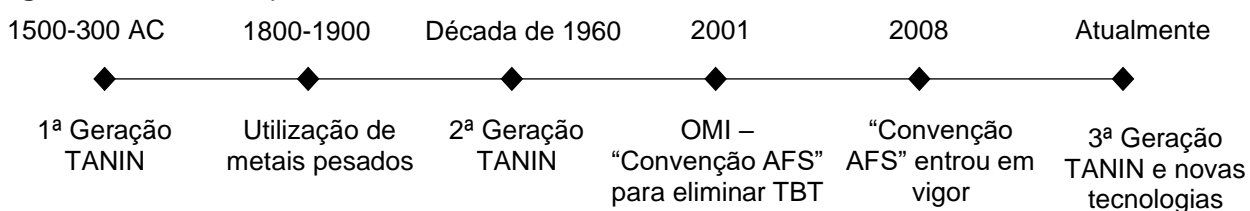
Tabela 1. Toxicidade expressa em Concentração inibitória mínima (CIM), concentração biocida mínima (CBM), concentração de efeito mais baixa observada (LOEC) e concentração efetiva mediana (EC₅₀) para espécies que constituem o biofilme expostas a nanomateriais.

Organismos	Espécies	Nanomateriais	Tamanho (nm)	Toxicidade (mg·L ⁻¹)	Referências
Bactérias	<i>Bacillus subtilis</i>	AgNP	24,2	CIM 15,6 CBM 31,2	Erjaee et al. (2017)
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AgNP	30-60	CIM 6,8 CBM 27,3	Rajesh et al. (2020)
	<i>Escherichia coli</i>	AgNP	15-20	CIM 25	Ahmad et al. (2017)
		SiNC	100-150	EC ₅₀ 17,1	
	<i>Vibrio fisheri</i>	SiNC-DCOIT	100-150	EC ₅₀ 2,51	Figueiredo et al. (2019)
		SiNC-Ag	100-150	EC ₅₀ 1,14	
		SiNC-DCOIT-Ag	100-150	EC ₅₀ 0,646	
Fungos	<i>Penicillium expansum</i>	AgNP	15-220	EC ₅₀ 2	Neethu et al. (2018)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	AgNP	20,56	CIM 1	Xue et al. (2016)
	<i>Aspergillus flavus</i>	AgNP	20,56	CIM 2	Xue et al. (2016)
	<i>Aspergillus sp.</i>	AgNP	15,5	CIM 1-2	Singh et al. (2014)
Microalgas	<i>Dunaliella salina</i>	AgNP	12,65	EC ₅₀ 0,480	Johari et al. (2018)
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	AgNP	≠ tamanhos	LOEC 0,16	Burchardt et al. (2012)
		SiNC	100-150	EC ₅₀ 2,03	
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	SiNC-DCOIT	100-150	EC ₅₀ 0,036	Figueiredo et al. (2019)
		SiNC-Ag	100-150	EC ₅₀ 2,87	
		SiNC-DCOIT-Ag	100-150	EC ₅₀ 0,012	
Perifiton	Perifiton misto	AgNP	35	EC ₅₀ 3,73	Gil-Allué et al. (2015)

2.3 Anti-incrustantes

Os anti-incrustantes (ANTIN) são biocidas incorporados na composição das tintas anti-incrustantes (TANIN), cuja principal função é impedir o crescimento de microrganismos que aderem às superfícies submersas. De acordo com a cronologia referente a utilização de TANIN (Fig.3), folhas de chumbo e cobre são descritas como os primeiros materiais ANTIN utilizados em embarcações. Com o aparecimento de novas tecnologias e legislações mais restritivas, os biocidas utilizados foram substituídos (Konstantinou et al., 2004; Amara et al., 2018).

Figura 3. Linha do tempo com acontecimentos relevantes da história das tintas anti-incrustantes.



(Adaptado de Amara et al., 2018).

A primeira geração de TANIN apresentava em sua composição óxidos de zinco (ZnO) e cobre (CuO). A durabilidade destas tintas foi estimada em tempo inferior a um ano. Muito embora apresentassem ação ANTIN para a maioria dos organismos, foi reportada a resistência de algumas espécies de algas. Em meados da década de 1960, uma segunda geração de TANIN com formulações contendo biocidas organoestânico, principalmente o tributilestanho (TBT) e o trifenilestanho (TPT), foram vastamente exploradas devido a eficiente ação ANTIN e elevada durabilidade. Contudo, a utilização desses compostos, também apresentou elevada toxicidade para espécies não alvo. Diante desta problemática, a Organização Marítima Internacional (OMI) propôs no ano de 2001 banimento mundial dos biocidas organoestânicos (Abreu, 2016).

Devido às limitações impostas pela OMI, o interesse industrial para o desenvolvimento de tintas utilizando biocidas de terceira geração foi ampliado. Os biocidas que fazem parte da formulação das TANIN de terceira geração pertencem ao grupo de compostos orgânicos e organometálicos. Os principais compostos são o Irgarol 1051, Diuron, DCOIT, Benzotiazol-2-iltio tiocianato de metila (TCMTB). Os biocidas DCOIT, Piritona de cobre (CuPT) e Piritona de zinco (ZnPT) são frequentemente incorporados às TANIN (Tab. 2). Estes biocidas apresentam um tempo de degradação

mais rápido que os biocidas convencionais e se comportam de forma eficiente quando encapsulados em nanomateriais (Avelelas et al., 2017).

Tabela 2. Toxicidade expressa em concentração efetiva mediana (EC₅₀) para espécies presentes no fitoplâncton que constituem o biofilme expostas a biocidas utilizados na TANIN.

Anti-incrustante	Espécies	Exposição	Toxicidade (mg L ⁻¹)	Referências
Irgarol 1051	<i>Vibrio fisheri</i>	EC ₅₀ (15min)	50,8	Férrandez-Alba et al. (2002)
	<i>Chroococcus minor</i>	EC ₅₀ (96h)	0,008	Zhang et al. (2008)
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	EC ₅₀ (24h)	0,001	Gatidou e Thomaidis (2007)
	Várias espécies	EC ₅₀ (72h)	0,441	Nystrom et al. (2002)
Diuron	<i>Synechococcus sp.</i>	EC ₅₀ (96h)	0,110	Bao et al. (2011)
	<i>Raphidocelis subcapita</i>	EC ₅₀ (72h)	0,001	Mezcua et al. (2002)
	<i>Pyrocystis lúnula</i>	EC ₅₀ (24h)	19	Bao et al. (2011)
	<i>Pyrocystis lúnula</i>	EC ₅₀ (24h)	19	Stauver et al. (2008)
ZnPT	<i>Synechococcus sp.</i>	EC ₅₀ (96h)	0,022	Bao et al. (2011)
	<i>Tetraselmis chuii</i>	EC ₅₀ (96h)	0,280	Avelelas et al. (2017)
	<i>Pyrocystis lúnula</i>	EC ₅₀ (24h)	0,0004	Bao et al. (2011)
CuPT	<i>Synechococcus sp.</i>	EC ₅₀ (96h)	0,022	Bao et al. (2011)
	<i>Tetraselmis chuii</i>	EC ₅₀ (96h)	0,300	Avelelas et al. (2017)
	<i>Pyrocystis lúnula</i>	EC ₅₀ (24h)	0,023	Bao et al. (2011)
TBT	<i>Vibrio fisheri</i>	EC ₅₀ (15min)	0,011	Férrandez-Alba et al. (2002)
	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	EC ₅₀ (24h)	0,01475	Arrhenius et al. (2006)
	<i>Skeletonema marinoi</i>	EC ₅₀ (96h)	0,00355	Xie et al. (2011)
	<i>Asterionella japônica</i>	EC ₅₀ (96h)	0,00315	

O DCOIT é amplamente utilizado em aplicações marinhas como alternativa ao TBT (Amara et al., 2018). Quando comparado ao TBT, apresenta melhor comportamento ambiental. Este biocida é facilmente biodegradado, possuindo um tempo de meia-vida no ambiente marinho compreendido entre 1 a 3 dias. Na última década, muitos estudos destacam que o DCOIT (Tab. 3) apresenta efeitos tóxicos nos organismos marinhos (Aidarova et al., 2018). Su et al. (2018), reforçam a necessidade de estudos complementares associados à toxicidade e, conseqüentemente, potenciais impactos ambientais.

Tabela 3. Toxicidade expressa em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração efetiva mediana (EC₅₀) para espécies que constituem o biofilme expostas ao biocida DCOIT.

Organismos	Espécies	Exposição	Toxicidade (mg L ⁻¹)	Referências
Bactérias	<i>Bacillus subtilis</i>	CIM (24 h)	21,2	Erjaee et al. (2017)
	<i>E. coli</i>	CIM (24 h)	15,6	
	<i>Vibrio fischeri</i>	EC ₅₀ (30 min)	0,600	Georgantzopoulou et al. (2012)
	<i>Vibrio fischeri</i>	EC ₅₀ (15 min)	0,464	Rosen et al. (2008)
Fungos	<i>Aspergillus flavus</i>	CIM (120 h)	70	Ismaiel e Tharwat (2014)
	<i>Penicillium vulpinum</i>	CIM (120 h)	60	
	<i>Penicillium cirinum</i>	CIM	0,8	Chen et al. (2018)
	<i>Aspergillus niger</i>	CIM	0,4	
Fitoplâncton	<i>Isochrysis galbana</i>	EC ₅₀ (48 h)	0,081	Wilson e Freeburg (1980)
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EC ₅₀ (72 h)	0,070	Figueiredo et al. (2017)
	<i>Dunaliella salina</i>	EC ₅₀ (72 h)	0,218	Johari et al. (2018)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC ₅₀ (48 h)	0,0011	Angel et al. (2013)
	<i>Ceratocory shorrida</i>	EC ₅₀ (24 h)	0,008	
	<i>Pyrocystis pseudonociluca</i>	EC ₅₀ (24 h)	0,038	Rosen et al. (2008)
	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	EC ₅₀ (24 h)	0,006	
	<i>Gymnodinium splendens</i>	EC ₅₀ (48 h)	0,021	Wilson e Freeburg (1980)

Gutner-Hoch et al. (2019) destacam que a liberação controlada de biocidas mediada por MNMEs é promissora. Segundo os autores, os MNMEs utilizados para o encapsulamento ou imobilização não apresentam toxicidade, sendo uma alternativa inovadora na redução de possíveis impactos ambientais. Além disso, apresentam benefícios em termos de estabilidade e durabilidade dos revestimentos ANTIN. Os MNMEs incluem principalmente, hidróxidos de camada dupla, SiNC e microcápsulas de poliuréia.

Os MNMEs podem ser revestidos por diversos materiais, incluindo a Ag. O uso multifacetado da Ag com várias aplicações comerciais é antigo. A prata atualmente é

comumente utilizada em escala nanométrica, sendo incorporada a dispositivos médicos, impregnada em implantes poliméricos, equipamentos esportivos, dentre outras aplicações (Mohanta et al., 2020; Erjaee et al., 2017). A sua principal função está associada a ação antimicrobiana e, por consequência, elevada ação inibitória na formação de biofilmes (Tab.4). Neste sentido e diante da necessidade crescente de mercado naval, a Ag é amplamente explorada nas formulações de TANIN (Abreu, 2016).

Tabela 4. Toxicidade expressa em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração efetiva mediana (EC₅₀) para espécies que constituem o biofilme expostas ao biocida Ag.

Organismos	Espécies	Exposição	Toxicidade (mg L ⁻¹)	Referências
Bactérias	<i>Vibrio fischeri</i>	EC ₅₀ (15 min)	0,012	Fernández-Alba et al. (2002)
		EC ₅₀ (30 min)	0,299	Figueiredo et al. (2019)
	<i>Pseudomonas atlântica</i>	CIM	0,1	Jacobson e Willingham (2000)
	<i>Pseudomonas náutica</i>	CIM	0,1	
Fitoplâncton	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EC ₅₀ (72 h)	0,004	Figueiredo et al. (2017)
	<i>Selenastrum capricornotum</i>	EC ₅₀ (72 h)	0,003	Fernández-Alba et al. (2002)
	<i>Emiliana huxleyi</i>	EC ₅₀ (72 h)	0,0004	Devilla et al. (2005)
Perifíton	Perifíton misto	EC ₅₀ (72 h)	0,026	Arrhenius et al. (2006)

2.4 Legislação

2.4.1 Biocidas anti-incrustantes

A legislação para biocidas anti-incrustantes (BANIN) foi elaborada com o objetivo de controlar a comercialização e utilização destes produtos de forma indiscriminada, permitindo assim, uma maior proteção do meio ambiente (Thomas e Brooks, 2010).

Estudos realizados na baía da França no ano de 1982, constataram efeitos tóxicos de compostos orgânicos de estanho, como o TBT, em ecossistemas marinhos (Alzieu, 1991). Baseado nos resultados, no ano de 1988, a Organização Marítima Internacional (OMI) em parceria com o Comitê de Proteção do Meio Ambiente Marinho (MEPC), avaliou o efeito dos biocidas de compostos orgânicos de estanho utilizados nas formulações das TANIN. Posteriormente, em 1999 a OMI adotou a Resolução A.895(21), restringindo o uso desses compostos principalmente em embarcações de pequeno porte (Price e Readman, 2013).

Em 2001, a OMI estabeleceu uma convenção internacional que entrou em vigor em setembro de 2008, proibindo o uso desses compostos em TANIN. No Brasil, a Marinha do Brasil suspendeu o uso de tintas antivegetativas à base de TBT em seus navios em 2003 e, em 2007, aplicou uma regulamentação, a NORMAM 23, para restringir o uso de compostos organoestânicos em todos os sistemas antivegetativos de todas as embarcações brasileiras registradas de pequenas embarcações de lazer a navios (Toste et al., 2011).

Contudo, somente no ano de 2010, o TBT foi definitivamente banido, conforme o Decreto Legislativo Nº 797. Mesmo antes da aprovação do decreto, em 2008, alguns países da União Europeia e o Japão adotaram regulamentações propondo um sistema de pintura ANTIN livre de TBT (Abreu, 2016). Em 2002 o Brasil assinou a Convenção *Anti-Fouling System* (AFS) estando ainda sujeita à ratificação pelo Congresso Nacional. Em 2007 no Brasil a regulamentação NORMAM-23/DPC realizada pela Marinha do Brasil e Diretoria de Portos e Costas foi adotada no país onde estabelece procedimentos sobre o controle do uso de sistemas ANTIN danosos ao meio ambiente marinho ou à saúde humana. A Convenção AFS foi aprovada em 2010 e em apenas 2014 entrou em decreto com o DEC Nº 8.345 foi introduzido no Brasil onde aborda trata sobre a convenção OMI para sistemas anti-incrustantes (OMI, 2014; Pereira e Ankjaergaard, 2009; Abreu, 2016).

Alguns países possuem o seu próprio sistema de aplicação específica a produtos ANTIN, onde alguns incorporam um esquema de registro, enquanto outros usam apenas

um esquema de notificação. Na Europa a legislação de ANTIN pode ser aplicada pela Diretiva de Produtos Biocidas (BPD), onde os estados membros da União Européia podem incorporar as regulamentações. Nos Estados Unidos da América (EUA), as TANIN são controladas pela Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas, sendo a aprovação desses compostos concedida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA). Da mesma forma que nos EUA, no Canadá os biocidas são classificados como pesticidas antimicrobianos, são regulamentadas pela Lei de Produtos de Controle de Pragas (PCPA), que é administrado pela Health Canada's Pest Management Agência Reguladora (PMRA) e, também, precisam ser aprovadas antes de vendas e aplicadas (Pereira e Ankjaergaard, 2009; Abreu, 2016).

Na oceania, a Austrália considera as TANIN como produtos químicos agrícolas, a fabricação, o fornecimento e a venda de tintas anti-incrustantes são regulamentados por meio de a Lei do Código de Químicos Agrícolas e Veterinários de 1994 (o código Agvet) que é administrado pela Australian Pesticides e Autoridade de Medicamentos Veterinários (APVMA). Na Nova Zelândia as TANIN foram registradas e aprovadas pela Lei de Substâncias Perigosas e Novos Organismos 1996 (Lei HSNO). A Autoridade de Gestão de Risco Ambiental da Nova Zelândia (ERMA) avalia e aprova substâncias perigosas sob a Lei HSNO e coloca controles ou condições sobre a substância para gerenciar seu risco para o meio ambiente (ACVM Act) (Pereira e Ankjaergaard, 2009).

Na Ásia, o Japão desenvolveu a Associação dos Fabricantes de Tintas (JPMA) que introduziu um sistema autorregulatório de gerenciamento para fornecer informações de conformidade relacionadas à Convenção OMI e informações relacionadas aos armadores, operadores de navios, governo autoridades responsáveis e outros órgãos relacionados, examinando tintas fabricadas e distribuídas por membros regulares da JPMA, membros apoiantes ou empresas não associadas. Em Hong Kong, China as TANIN são consideradas pesticidas e são controladas pelo Regulamento de Pesticidas Cap. 133, que é administrado pelo Departamento de Agricultura, Pesca e Conservação que propõe que o produto anti-incrustante importado, fornecido e vendido para uso em Hong Kong deve obter um registro específico. As legislações que tratam especificamente do marketing e do uso de TANIN é o ponto principal para os órgãos reguladores que trabalham com esta classe de produtos. Há a necessidade de que as regulamentações acompanhem as revoluções tecnológicas desses produtos (Pereira e Ankjaergaard, 2009).

2.4.2 Nanomateriais

A produção de MNMEs tem evoluído exponencialmente, entretanto, as agências reguladoras mundiais ainda esbarram em diversos aspectos associados às definições dos materiais que compõem esta classe, proteção à saúde pública e ao meio ambiente.

No Brasil, no ano de 2011, a Agência brasileira de desenvolvimento industrial (ABDI) desenvolveu o estudo intitulado “Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação”, cujo objetivo foi disponibilizar informações consolidadas a pesquisadores, empresários e entidades que lidam com o assunto, no que diz respeito aos riscos da nanotecnologia e suas implicações sobre as questões regulatórias (ABDI, 2011). O Projeto de Lei nº 6741, que entrou em vigor no ano de 2013, dispôs sobre a política nacional associada ao uso da nanotecnologia no país.

Em 2014, o Comitê Interno de Nanotecnologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), instituiu a Portaria Nº 1.358, com a finalidade de coordenar as ações institucionais na área da nanotecnologia julgadas prioritárias. Em geral, essa norma obriga o registro a informar sobre a natureza nanotecnológica dos produtos e processos sujeitos à vigilância sanitária, monitorar e regulamentar todo o uso de nanomateriais e todos os processos e partes que o envolvem (ANVISA, 2014).

No ano de 2019, foi aprovado o Projeto de Lei nº 880 que dispôs estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação nanotecnológica. No mesmo ano, a Portaria nº 3.459 foi introduzida para instituir a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN), como política nacional para o desenvolvimento da nanotecnologia, com intuito de criar, integrar e fortalecer ações governamentais na área, com foco na promoção da inovação na indústria brasileira e no desenvolvimento econômico e social.

Os sistemas regulamentários de aplicação e utilização de NM são específicos para cada país. A *Food and Drug Administration* (FDA) é a agência responsável pela promoção da saúde pública que controla e supervisiona a aplicação de NMs nos EUA. Na União Europeia a *European Chemicals Agency* (ECHA) é a agência responsável pela regulamentação de NM e que visa gerir os aspectos técnicos, científicos e regulamentativos de todos os produtos químicos (ABDI, 2011).

2.5 Microrganismos testes

2.5.1 Bactérias

O gênero *Bacillus* é constituído por bactérias Gram-positivas em forma de bastonetes. As bactérias deste gênero podem formar biofilme e, também, produzir metabólitos de importância industrial. *Bacillus subtilis* é uma das principais representantes desse gênero. Esta bactéria é muito utilizada como modelo de estudo, uma vez que não é patogênica e, também, é de fácil cultivo (Lee et al., 2021; Guo et al., 2021).

As bactérias do gênero *Vibrio* são Gram-negativas em forma de bastonetes curvos com flagelo. As espécies mais comuns são as *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio aestuarianus*. Estas espécies são conhecidas por estarem associadas a doenças infecciosas e gastroenterite. A *V. parahaemolyticus* e *V. aestuarianus*, estão presentes em água doce e salgada, são aeróbias facultativas, oxidativas positivas e não produzem esporos. São também conhecidas por serem patogênicas oportunistas (Xu et al., 2018; Nguyen et al., 2021).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Vibrio* foram isoladas de amostras de sedimentos coletados em diferentes pontos do Estuário de Santos (Fig. 4). As amostras foram processadas pelo Laboratório de Microbiologia Marinha (MICROMAR), do Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista (IB-CLP), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

Figura 4. Área do Estuário de Santos com a determinação dos pontos de coleta das amostras das espécies de bactérias *Bacillus subtilis*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio aestuarianus* isoladas.



(Fonte: Autor)

2.5.2 Fungos Filamentosos

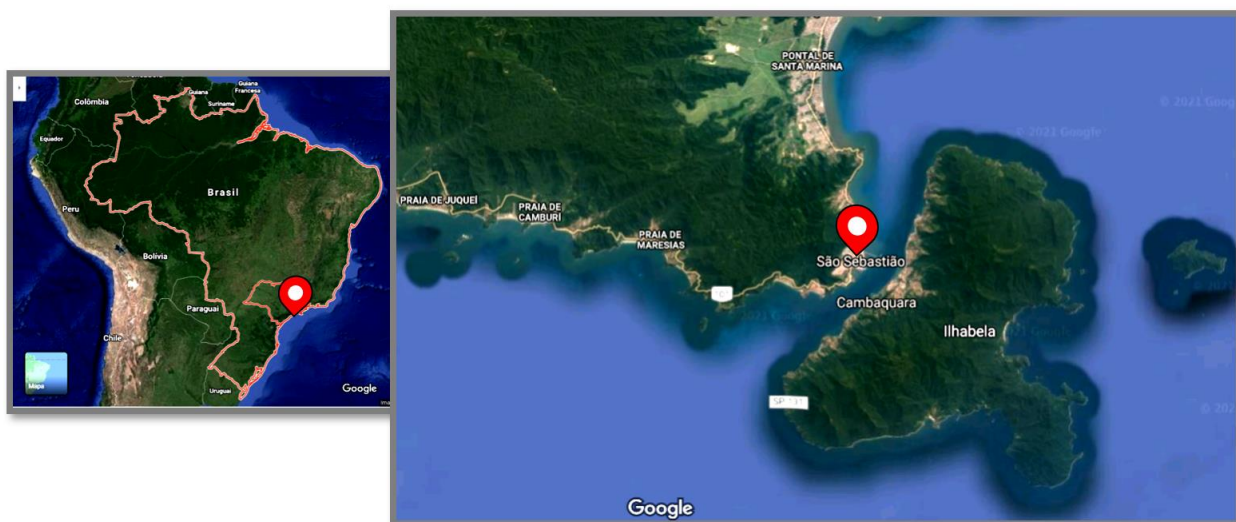
Estima-se que o Reino Fungi contenha sete filos principais e 1,5 milhão de espécies. Ascomycota é o maior grupo e inclui alguns gêneros importantes como *Penicillium* e *Aspergillus*. Diversas espécies desse gênero são utilizadas para a fermentação de uma grande variedade de produtos fúngicos, como penicilina, álcool e ácido cítrico. Os polissacarídeos compreendem outro grupo de compostos derivados de fungos naturais que têm valor médico considerável. Espécies como *Penicillium citrinum*, *Penicillium sclerotigenum* e *Penicillium polonicum* podem ser fitopatogênicas causando diversos danos na área agrícola (Carvalho et al., 2021).

O gênero *Aspergillus* é muito utilizado para a produção de diversos processos industriais como na área de alimentos e produção comercial de ácidos, pertencem ao filo Ascomycota e podem estar presentes tanto em ambiente terrestre, quanto aquático. Algumas espécies desse gênero podem ser fitopatogênicas e patogênicas (Ohte et al., 2020). *Aspergillus niger* é um dos microrganismos mais aplicado na biotecnologia, um patógeno oportunista que vem sendo utilizado a décadas para produção de enzimas de interesse industrial e produção de ácidos (Ma et al., 2021).

Com o aumento da busca de novos metabólitos e moléculas biologicamente ativas, os fungos marinhos cada vez mais têm sido estudados. Amin et al. (2020) e Yurchenko et al. (2021) destacam que as linhagens fúngicas isoladas do ambiente marinho são promissoras para aplicações industriais, uma vez que, são capazes de sobreviver em um ambiente extremo com elevada salinidade e produzir moléculas complexas com propriedades biotecnológicas.

As linhagens de fungos filamentosos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* de origem marinha provenientes da Coleção de Cultura do Instituto de Biociências-Câmpus do Litoral Paulista (IB-CLP), foram isoladas da Baía do Araçá, São Sebastião/ SP (Fig. 5), de acordo com os padrões da American Public Health Association.

Figura 5. Área da Baía do Araçá - São Sebastião com a determinação do ponto de coleta da amostra das espécies de fungos filamentosos *Penicillium citrinum* IB-CLP11, *Penicillium sclerotigenum* IB-CLP17, *Aspergillus niger* IB-CLP20 e *Penicillium polonicum* IB-CLP22 isolados.



(Fonte: Autor)

2.5.3 Microalga

As microalgas do gênero *Chlorella* são unicelulares, esféricas e sem flagelo. Pertencem ao filo Chlorophyta e são encontradas na água doce e salgada. A reprodução ocorre de forma assexuada e as melhores condições de cultivo são em elevada concentração de nutrientes e luminosidade. São muito utilizadas industrialmente devido ao rápido crescimento e fácil cultivo (Cao et al., 2021).

A microalga *Chlorella minutissima* é encontrada em ambiente ducícola ou marinho. Pertencente à classe das Chlorophyceae, *C. minutissima* contém pigmentos verdes fotossintetizantes clorofila a e b em seus cloroplastos (Sharan & Nara, 2020). Chandra & Ghosh (2019) e Khan et al. (2018), destacam a importância dessa espécie, devido à ampla utilização para produção de biodiesel, tratamento de efluentes e produção de metabólitos de interesse biotecnológico. Em adição, esta espécie é referenciada como organismos presente na BI (Fanesi et al., 2021).

A linhagem da microalga *C. minutissima* BMAK26a de origem marinha proveniente do Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, foi isolada do ambiente marinho na cidade de Cananéia (Fig. 6).

Figura 6. Área de Cananéia - Litoral Paulista com a determinação do ponto de coleta da amostra da espécie de microalga marinha *Chlorella minutissima* isolada.



(Fonte: Autor.)

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi caracterizar os nanomateriais (MNMEs) com propriedades anti-incrustantes e determinar a sua toxicidade em microrganismos isolados da zona costeira brasileira.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Caracterizar os nanomateriais por diferentes técnicas morfológicas – Microscopia eletrônica de transmissão e Espectroscopia de Raios X por dispersão e energia (*Energy Dispersive Spectroscopy* - EDS ou EDX);
- 3.2.2 Caracterizar os nanomateriais por diferentes técnicas estruturais – Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS), Potencial Zeta (P ζ), Índice de polidispersão (*Polydispersion Index* - PDI) e Difração de Raios X (DRX);
- 3.2.3 Testes miniaturizados de toxicidade em bactérias marinhas Gram-positiva e Gram-negativas isoladas na zona costeira brasileira;
- 3.2.4 Testes miniaturizados de toxicidade em fungos marinhos isolados na zona costeira brasileira;
- 3.2.5 Teste miniaturizado de toxicidade em microalga isolada na zona costeira brasileira.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese dos nanomateriais

Os MNMEs com ação anti-incrustante foram projetados e sintetizados pela empresa portuguesa Smallmatek, Lda. Para o processo de síntese SiNC foi preparado por uma microemulsão de óleo em água contendo o surfactante cetil brometo de trimetilamônio (CTAB), seguido por uma hidrólise e uma condensação de tetraetilortossilicato (TEOS) na interface da microemulsão. Após obter o produto precipitado, o mesmo foi filtrado e lavado com água deionizada. O encapsulamento do biocida DCOIT em SiNC foi realizado a partir de uma solução de óleo em água. Os materiais foram homogeneizados em uma solução de amônia com posterior adição do DCOIT previamente diluído em uma solução aquosa contendo xileno e CTAB. Na última etapa TEOS foi adicionado. A adesão de Ag à superfície de SiNC e SiNC-DCOIT pela exposição dos materiais à uma solução de nitrato de prata (AgNO_3), seguida pela reação espontânea da redução de Ag na superfície de SiO_2 . Na última etapa, os compostos passaram por uma secagem de 140°C (Maia et al., 2015; Figueiredo et al., 2019).

4.2 Caracterização dos nanomateriais

A caracterização dos MNMEs foi realizada em nível estrutural e morfológico (Fig. 7). Para as análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta ($P\zeta$) e índice de polidispersão (PDI), foram preparadas dispersões coloidais ($0,001$, $1,0$ e $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dos materiais em água Milli-Q a 35 de salinidade.

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As caracterizações morfológicas e medida de diâmetro dos MNMEs foram realizadas utilizando o microscópio de transmissão eletrônica LEO 906E, Zeiss, Alemanha, operado a 200 kV . Para a preparação das amostras, as dispersões coloidais dos MNMEs foram depositadas por gotejamento em grades de cobre recobertas com carbono (Ilett et al., 2020; Prasad et al., 2020).

4.2.2 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia

As razões atômicas foram obtidas por análise de energia dispersiva de raios-X (*Energy Dispersive Spectroscopy* - EDX ou EDS), usando um microscópio eletrônico de varredura Philips XL30, com um feixe de elétrons de 20 keV e equipado com um microanalisador EDAX DX-4.

4.2.3 Difração de Raios X

A identificação das fases cristalinas presentes nas amostras ocorreu utilizando um difratômetro Rigaku, modelo Miniflex II com fonte de radiação Cu K α (0.15406 nm), sendo utilizada para a análise uma pequena quantidade da MNMEs previamente depositada em um suporte de vidro contendo graxa de silicone.

4.2.4 Análise de tamanho de partícula, distribuição e índice de polidispersão

O tamanho da partícula foi analisado por espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS), enquanto que, a carga foi determinada pelo potencial zeta (P ζ). Também foi determinado índice de polidispersão (*Polydispersion Index* - PDI). Todas as análises foram realizadas utilizando o equipamento Dynamic Light Scattering (Zetasizer Nano, ZS90).

4.3 Ensaio de toxicidade

4.3.1 Determinação de Concentração inibitória mínima e Concentração bacterida mínima

As bactérias marinhas Gram-positiva *Bacillus subtilis* e Gram-negativa *Vibrio aestuarianus* e *Vibrio parahaemolyticus* foram previamente crescidas “overnight” em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI). A concentração celular foi ajustada a $1,0 \times 10^5$ UFC de acordo com o protocolo de Silva et al. (2007). Para o teste de determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foi utilizada a metodologia adaptada proposta por Mann e Markham (1998).

Os ensaios foram realizados de forma miniaturizada, utilizando placas de 96 poços. Inicialmente todos os poços foram preenchidos com 170 μ L de inóculo, com

salinidade ajustada a 35. A salinidade foi ajustada a partir da proporção de 35 g de sal marinho para 1 litro de meio de cultura (Marui et al., 2021). Nas colunas 1 e 2, controle positivo, foram inseridos 190 µL do meio de cultura Muller Hinton (MH), isento de ágar, com salinidade ajustada a 35. Para cada nanomaterial (SiNC, DCOIT, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag, SiNC-DCOIT-Ag) foi inserido um volume de 20 µL de dispersão coloidal nas colunas de 3 a 11, em concentrações compreendidas entre 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg·L⁻¹. Ao controle negativo, coluna 12, foi inserido um volume de 20 µL de solução de AgNO₃, concentração 10 mg·L⁻¹.

Um volume de 10 µL de solução de resazurina a 0,01% foi adicionado a todos os poços após 24 h de incubação. A resazurina é um corante que serve como um indicador redox. Tem uma cor azul e uma baixa fluorescência intrínseca. Depois de entrar na célula, em resposta à atividade metabólica das células vivas, a resazurina é reduzida a resorufina, que tem uma cor rosa e é fluorescente. Dessa forma o corante é utilizado para identificação da viabilidade celular (Needs et al., 2021). O tempo de incubação total foi de 48 horas a 37°C. Findado este período, foi determinada a concentração mínima inibitória (CIM). Um segundo teste foi realizado de acordo com o protocolo adaptado descrito por Abbaszadeh et al. (2014) e Li et al. (2016) sendo denominado a concentração mínima biocida (CBM). Tanto CIM como CBM foram realizados em triplicata.

Um segundo teste foi realizado de acordo com o protocolo adaptado descrito por Abbaszadeh et al. (2014) e Li et al. (2016) sendo denominado a CBM. Foram retirados 10 µL de cada poço com ausência de crescimento visível e transferidos para placas que continham meio ágar triptona de soja (TSA) por um período de 24 h. Após o período de incubação, foram considerados como bactericidas os compostos que inibiram 100% do crescimento do microrganismo. Tanto CIM como CBM foram realizados em triplicata.

4.3.2 Determinação de Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima

Para o teste de determinação das concentrações mínimas inibitórias (CIM) foi utilizada a metodologia adaptada proposta por Mann e Markham (1998). Suspensões de esporos de fungos marinhos *Penicillium citrinum* IB-CLP11, *Penicillium sclerotigenum* IB-CLP17, *Aspergillus niger* IB-CLP20 e *Penicillium polonicum* IB-CLP22 foram preparadas com base na ABNT-NBR 14941 (2011). Os fungos foram crescidos em meio de cultura

Batata Dextrose Ágar (BDA) a 30°C por um período de sete dias. Após este período, foi adicionada sobre a placa 10 mL de solução salina com Tween 80. As suspensões de esporos foram transferidas para um frasco Falcon e homogeneizadas em uma plataforma agitadora a 30°C por e 150 rpm por cinco minutos. Na sequência, as suspensões foram filtradas em algodão de vidro. As concentrações foram ajustadas com o auxílio de uma Câmara de Neubauer a $1,0 \times 10^5$ esporos·mL⁻¹ em meio Batata Dextrose (BD).

Os ensaios foram realizados de forma miniaturizada, utilizando placas de 96 poços. Inicialmente todos os poços foram preenchidos com 170 µL de inóculo, com salinidade ajustada a 35. Nas colunas 1 e 2, controle positivo, foram inseridos 190 µL do meio de cultura BD, isento de ágar, com salinidade ajustada a 35. Para cada nanomaterial (SiNC, DCOIT, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag, SiNC-DCOIT-Ag) foi inserido um volume de 20 µL de dispersão coloidal nas colunas de 3 a 11, em concentrações compreendidas entre 0,001-10 mg·L⁻¹. Ao controle negativo, coluna 12, foi inserido um volume de 20 µL de solução de AgNO₃, concentração 10 mg·L⁻¹. Um volume de 10 µL de solução de Resazurina a 0,01% foi adicionado a todos os poços após 24 h de incubação. O tempo de incubação total foi de 72 horas a 30°C, findado este período, foi determinada a CIM.

Um segundo teste foi realizado de acordo com o protocolo adaptado descrito por Abbaszadeh et al. (2014) e Li et al. (2016) sendo denominado a CFM. Foram retirados 10 µL de cada poço com ausência de crescimento visível e transferidos para placas que continham meio BDA por um período de 7 dias. Após o período de incubação, foram considerados como fungicidas os compostos que inibiram 100% do crescimento do microrganismo. Tanto CIM como CFM foram realizados em triplicata.

4.3.3 Determinação da densidade celular de microalga

A microalga *Chlorella minutissima* foi cedida pelo Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. A cultura foi mantida no Laboratório de Micologia e Aplicações Biotecnológicas e Nanotecnológicas, em meio de cultura líquido Guillard, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e iluminação (fluxo de fótons de aproximadamente $70 \mu\text{mol de fóton m}^{-2}\text{s}^{-1}$), com fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro). Diariamente, ocorreu contagem celular com o auxílio de uma Câmara de Neubauer para a construção da curva de crescimento e determinação da fase exponencial.

O protocolo experimental para determinação de toxicidade em microalgas seguiu a norma ABNT NBR 12648 (2013). Este método consiste na exposição dos organismos-teste aos diferentes tratamentos, durante um período de 96 h. A toxicidade foi determinada pela inibição do crescimento da biomassa algácea nos recipientes-teste, comparado ao controle negativo, sob as mesmas condições de ensaio.

4.3.3.1 Curva de crescimento

A construção da curva de crescimento foi realizada com a retirada diária de uma alíquota de 20 µL do cultivo. Com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, as células foram contadas. O ponto anterior à entrada na fase estacionária foi determinado como o ponto de coleta do inóculo utilizado para os ensaios de toxicidade.

4.3.3.2 Curva padrão de calibração

Uma curva padrão de calibração foi construída utilizando um cultivo de *C. minutissima* crescida até o pico da fase exponencial. Com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, foram preparadas soluções padrão de *C. minutissima* nas concentrações de 2500, 5000, 10000, 20000, 40000, 80000 e 160000 cel·mL⁻¹. Para cada solução padrão, um volume de 200 µL foi inserido individualmente em 8 poços de uma microplaca de 96 poços. Na sequência, com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis, com comprimento de onda ajustado a 680 nm, foram efetuadas as leituras. Como controle negativo foi utilizado um branco com 200 µL de meio de cultura (Dubois et al., 1956).

4.3.3.3 Densidade celular

Os testes de inibição de densidade celular foram realizados em microplacas de 96 poços, contendo o inóculo ajustado à densidade celular de 1,0x10⁴ cel·mL⁻¹ em meio de cultura Guillard.

A biomassa algácea foi determinada após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição por meio da densidade óptica das microalgas em um espectrofotômetro UV-Vis, com leitura da absorbância luminosa a 680 nm. A incubação total ocorreu em um período de 96 horas, mantendo a temperatura 23±1°C. O teste foi realizado em quadruplicata.

Ao final, a biomassa inicial de cada réplica das soluções-teste e controle (sem amostra tratada) foi subtraída da obtida após o período de exposição, calculando-se assim a biomassa produzida durante o ensaio. Para definir a concentração celular pela absorbância, foi utilizada a curva padrão de calibração previamente preparada, descrita no item 4.3.3.2.

4.3.3.4 Determinação da Clorofila Total

Para estimar o conteúdo de clorofila total, foi necessário realizar a extração e solubilização de pigmentos em acetona e depois preparar as soluções para serem levadas ao espectrofotômetro. A clorofila foi extraída no escuro a 4°C após 96 h de uma amostra de microalgas concentrada em uma solução aquosa de acetona a 80% e determinada por medição do comprimento de onda do extrato usando um espectrofotômetro, o ensaio foi feito utilizando a solução de acetona 80% como o branco. O sobrenadante foi aspirado e as absorbâncias foram analisadas em 665 e 645 nm. As medidas de absorbância resultantes foram traduzidas para um teor de clorofila de acordo com a seguinte equação (Lichtenthaler, 1987):

$$\text{Clorofila total} = 17,3 \times \text{Abs}_{645} + 7,81 \times \text{Abs}_{649}$$

4.4 Análise estatística

A inibição do crescimento (%) de cada espécie foi determinada de acordo com o método da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento (OCDE). Os valores de concentração efetiva (EC_{50}) após 96 h foi calculado com o software GraphPad Prism v6.0 usando a equação de regressão não linear que melhor se ajusta aos dados, considerando o R^2 valor, a soma absoluta dos quadrados e os intervalos de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

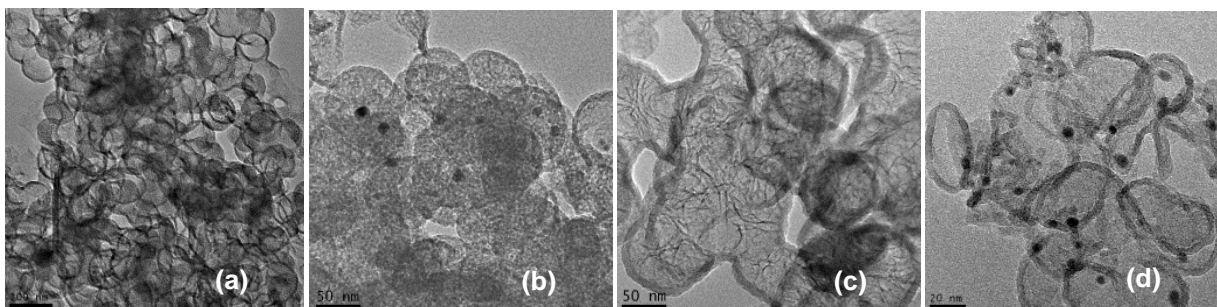
5.1 Caracterização dos nanomateriais

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

O microscópio eletrônico de transmissão emite um feixe de elétrons sob alta tensão, a partir de uma coluna de elétrons. Os elétrons são focalizados a partir de lentes eletromagnéticas em direção à amostra, desencadeando uma interação. Essa interação permite que os elétrons que constituem o feixe produzam diferentes tipos de radiação, que são analisadas pelo detector e traduzidas como imagem para um computador acoplado.

De acordo com a Figura 7 (a-d) obtidas por MET, os MNMEs possuem forma esférica e regular, apresentando o tamanho médio de 112, 136, 139 e 133 nm para SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag, respectivamente. Foi possível observar aglomerados de Ag provenientes do metal AgNO_3 nas imagens obtidas.

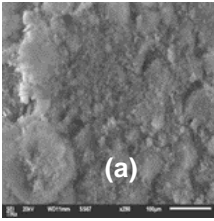
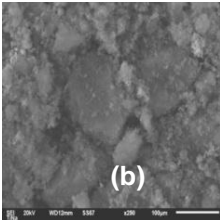
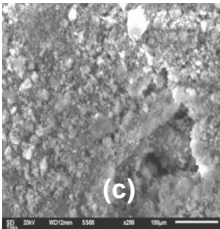
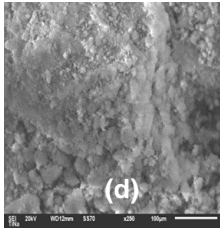
Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão dos nanomateriais: (a) SiNC; (b) SiNC-DCOIT; (c) SiNC-Ag; (d) SiNC-DCOIT-Ag.



5.1.2 Espectroscopia de energia dispersiva

Os resultados indicados pela técnica de EDS são importantes, permite o mapeamento composicional e semi quantitativo de nanomateriais (Angwin et al., 2019). Como apresentado na Tabela 5, as amostras apresentaram a composição atômica prevista.

Tabela 5. Análise semi-quantitativa e micrografia das amostras de (a) SiNC; (b) SiNC-DCOIT; (c) SiNC-Ag; (d) SiNC-DCOIT-Ag, com ampliação de 250x.

Amostra	Elemento	(mol%)	Micrografia
SiNC	C	34,39	
	O	43,28	
	Si	22,33	
	Total	100,00	
SiNC-Ag	O	61,93	
	Si	37,22	
	Ag	0,85	
	Total	100,00	
SiNC-DCOIT	O	59,14	
	Si	37,16	
	Cl	2,86	
	Zn	0,30	
	Mo	0,54	
	Total	100,00	
SiNC-DCOIT-Ag	O	57,22	
	Si	36,24	
	S	1,79	
	Cl	2,88	
	Zn	0,73	
	Ag	1,14	
	Total	100,00	

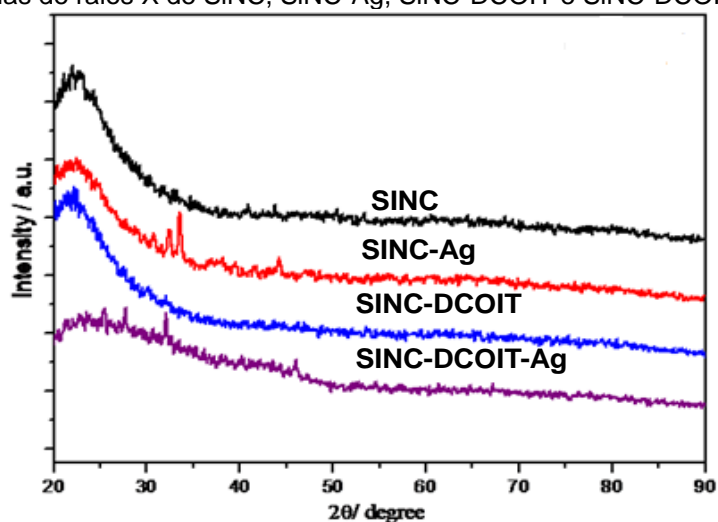
5.1.3 Difração de Raios X

A análise de difração de raios X (DRX) fornece informações detalhadas sobre a estrutura atômica e molecular das amostras, como também, posições, composições químicas, tensões na sua rede cristalina e fases cristalinas. Para a análise da amostra um feixe de raios X incide sobre o material e um detector identifica o feixe de raios que emergem da amostra. Ao interagir com a estrutura atômica do material, o feixe é difratado pelos átomos e a informação é processada e repassada para um computador acoplado. O resultado do DRX é importante para compreender tanto as posições, como as intensidades dos efeitos de difração, é uma propriedade física fundamental dos

materiais, servindo para rápida identificação e entendimento completo de sua estrutura (Chirayil et al., 2017).

De acordo com a Figura 8 o pico de difração em $2\theta = 25^\circ$ é proveniente da sílica, sendo observada em todos os difratogramas de raios X. Nas composições de SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag é possível observar os padrões característicos da Ag. De acordo com o DRX existem dois picos distintos correspondendo às reflexões (111) e (220) que confirmam a estrutura cúbica de face centrada da Ag.

Figura 8. Difratogramas de raios X de SiNC, SiNC-Ag, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag.

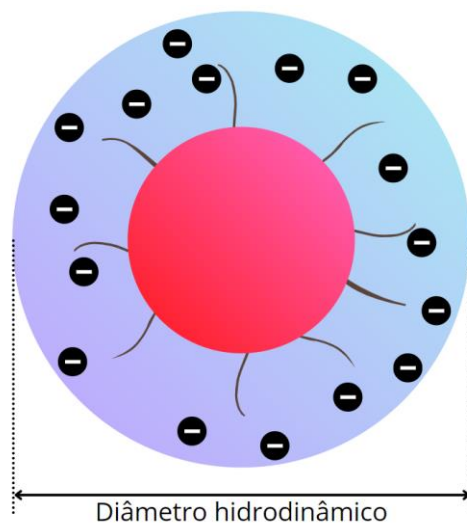


5.1.4 Tamanho de partícula, distribuição e índice de polidispersão

A técnica DLS, é utilizada para obter a medida do diâmetro hidrodinâmico das partículas nanométricas em suspensão. A técnica se baseia em dois conceitos que se relacionam com as partículas presentes no meio: o movimento browniano e o espalhamento de luz. As partículas e moléculas em suspensão estão em constante movimento, este movimento constante e aleatório é chamado de movimento browniano, é induzido por um constante bombardeamento de moléculas do solvente, que estão se movendo, devido à sua energia térmica. O espalhamento de luz acontece quando um laser emite uma iluminação em direção a partícula ou molécula, estas espalham a radiação em todas as direções e a partir disso, a flutuação da intensidade de luz fornece informações sobre o coeficiente de difusão da partícula e do seu diâmetro hidrodinâmico para um detector. O diâmetro hidrodinâmico pode variar de 1 a 2000 nm, fornece

informações como intensidade, tamanho e área de contato superficial de uma partícula em uma suspensão (Fig. 9) (Chirayil et al., 2017).

Figura 9. A imagem representa o diâmetro hidrodinâmico formado, analisado pela técnica DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico).



Fonte: Adaptado de Guivar (2015).

A medição no instrumento de DLS, se inicia com um laser monocromático com um comprimento de onda de 633 nm, a luz emitida converge para um centro focal na amostra por meio de uma lente de focalização. A luz é espalhada pelas partículas em todos os ângulos e direções. O DLS detecta este espalhamento para um ângulo fino. As flutuações de intensidade de luz espalhadas são convertidas em pulsos elétricos, os quais são alimentados a um correlacionador digital. O correlacionador gera uma função de autocorrelação, a partir da qual se relaciona com o coeficiente de difusão das partículas, e estes, por sua vez, com o tamanho das partículas (Chirayil et al., 2017).

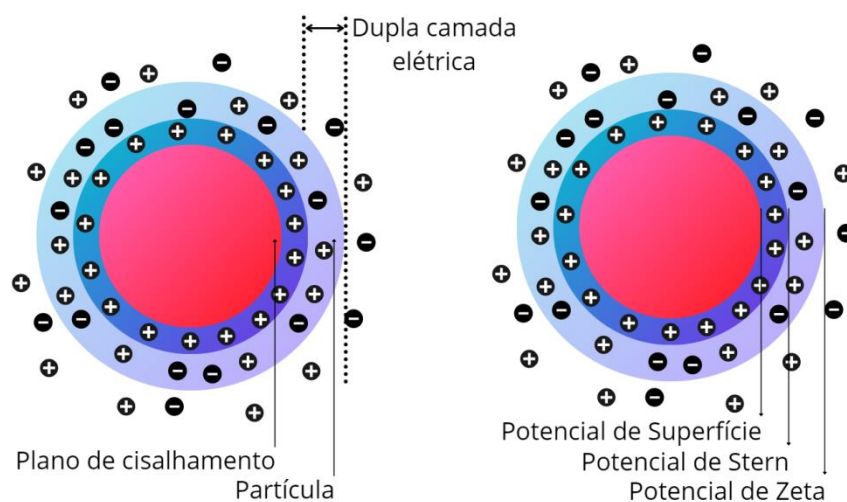
O diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS (Tab. 6) indica que o tamanho dos nanomateriais analisados variaram entre 205,72 a 252,50 nm. A diferença de tamanho obtida por DLS em comparação aos determinados por MET decorre do fato de que os nanomateriais estão em meio líquido e em contínuos deslocamentos aleatórios denominados de movimento Browniano. Em acréscimo, os diâmetros de SINC e SINC-DCOIT são similares, enquanto que, com a adesão de Ag, ocorreu um incremento no diâmetro, variando entre 220 a 230 nm, respectivamente. Segundo Letzel et al. (2018), os valores obtidos são influenciados pelo revestimento metálico incorporado.

Tabela 6. Caracterização das amostras de SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag ($\phi = 129, 152, 134$ and 125 nm para SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag, respectivamente)

Amostra	Concentração (mg·L ⁻¹)	DLS (nm)	(P ζ)	PDI
SiNC	0,001	203,37	30,90	0,45
	0,1	210,33	27,23	0,50
	10	226,21	29,34	0,55
SiNC-DCOIT	0,001	202,67	12,15	0,58
	0,1	206,12	11,26	0,44
	10	231,11	13,93	0,52
SiNC-Ag	0,001	220,30	-29,09	0,51
	0,1	232,80	-30,95	0,56
	10	246,45	-28,99	0,50
SiNC-DOIT-Ag	0,001	225,72	-25,22	0,49
	0,1	239,33	-23,13	0,51
	10	251,50	-25,34	0,54

O P ζ é uma técnica utilizada para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. A maioria dos MNMEs em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície, isso acontece devido a dissociação, ionização de grupos funcionais na superfície da partícula e pela adsorção diferencial de íons da solução na superfície. Essa carga afeta a distribuição de íons na vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície formando-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. A dupla camada elétrica formada se divide na região interna, que inclui íons ligados à superfície e a região externa, onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Essas regiões em conjunto com a superfície da partícula, geram diferentes potenciais a serem analisados como o potencial de superfície, potencial stern e potencial zeta (Fig. 10). A partir desses potenciais é possível analisar a estabilidade das partículas no meio encontrado e entender seu estado de agregação, precipitação e coagulação (Clogston e Patri, 2010; Ahmadi et al., 2011).

Figura 10. A imagem representa a dupla camada formada e os diferentes potenciais de superfícies que podem ser analisados para identificar a estabilidade dos nanomateriais pela técnica P ζ (Potencial Zeta).



Fonte: Adaptado de Guivar (2015).

Esse potencial pode ser determinado a partir da correlação da carga efetiva das partículas com a repulsão eletrostática e estabilidade da suspensão. Para a medição do potencial é realizada a laser doppler electrophoresis, um campo elétrico é aplicado na amostra, e as partículas com carga irão migrar para o eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional a magnitude da sua carga, essa velocidade da carga está relacionada ao P ζ . A amostra é colocada em cubetas com a presença de 2 eletrodos, um positivo e um negativo, é aplicado uma carga elétrica e as partículas migram para o eletrodo de carga oposta. Um feixe de laser passa através da amostra na célula capilar durante a eletroforese e o espalhamento de luz do movimento da partícula tem a frequência mudada, a mudança da frequência é relacionada a velocidade que as partículas migram. A partir disso, quanto maior o P ζ , mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação. A partir disso, a alta estabilidade é identificada quando o valor de P ζ é menor do que -30mV ou maior do que +30mV (Clogston e Patri, 2010; Ahmadi et al., 2011).

O PDI é utilizado para descrever informações sobre a homogeneidade da distribuição dos MNMEs, dessa forma quanto maior o valor indicado, maior a distribuição e dispersão de tamanhos dos materiais, ou seja, maior a variedade de tamanhos diferentes ou polidispersão dos MNMEs. A partir disso, a faixa de 0 a 0,05 de PDI indica uma população monodispersa, a faixa de 0,05 a 0,08 população quase monodispersa, 0,08 a

0,3, população com baixa polidispersividade, 0,3 a 0,6, população com média polidispersividade e acima de 0,7, população muito polidispersa. Devido à mutabilidade presentes em processos de fabricação, raramente se consegue a monodispersão dos produtos, mas ainda sim, é ideal que o PDI tenha valor mais próximo ao 0, população monodispersa, respectivamente (Chirayil et al., 2017).

O índice de polidispersividade (PDI) obtido foi entre 0,44 e 0,58 indicando polidispersividade média. O valor do potencial Zeta (Pζ) de superfície de SINC e SINC-DCOIT, enquanto que, SINC-Ag e SINC-DCOIT-Ag apresentaram superfícies negativas em meio aquoso. Considerando o elevado valor em módulo do Pζ e polidispersividade média, a tendência destes MNMEs se agregarem é baixa.

Algumas dessas características vistas durante a caracterização, também foram observadas por Saman et al. (2020) que caracterizou SINC e observou seus aglomerados em formato “*cauliflower*”. De acordo com o estudo, esse fenômeno ocorre pela capacidade de adsorção desses nanomateriais. Esses agrupamentos formam partículas volumosas que influenciam diretamente a polidispersão e estabilidade.

A caracterização físico-química dos MNMEs é imprescindível, uma vez que, permite relacionar seus efeitos no meio e, conseqüentemente, nos mais diversos organismos. Portanto, para estudos de toxicidade esse processo é de extrema importância para compreender e aplicar esses ensaios (Khan et al., 2019).

5.2 Ensaio de Toxicidade

5.2.1 Determinação de Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima

A tabela 7 apresenta a atividade antibacteriana dos MNMEs e seus precursores contra bactérias isoladas da zona costeira brasileira. Dentre as bactérias selecionadas para o estudo, apenas *Bacillus subtilis* apresentou inibição em seu crescimento, efeito bacteriostático. quando exposta a SiNC na concentração de 10 mg·L⁻¹. Por sua vez, o biocida DCOIT na forma livre, em concentração de 1 mg·L⁻¹, apresentou ação bacteriostática. Após 24 horas, o DCOIT perdeu a capacidade de inibir o crescimento de todas as espécies. DCOIT na concentração de 10 mg·L⁻¹, foi bactericida para todas as espécies. De acordo com os resultados obtidos, o DCOIT encapsulado não apresentou o mesmo comportamento detectado no ensaio com DCOIT na forma livre. Michailidis et al. (2020) destaca que o DCOIT interage covalentemente com a superfície de SiNC,

permitindo que essa interação forneça propriedades ANTIN para as formulações de revestimento, prolongando seu desempenho ANTIN.

Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração biocida mínima (CBM) das amostras de NCs SiNC, DCOIT, Ag, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag contra *Bacillus subtilis*, *Vibrio aestuarianus* e *Vibrio parahaemolyticus*. “nd”: não determinado.

NC-Anti-IN (mg·L ⁻¹)	<i>B. subtilis</i>		<i>V.aestuarianus</i>		<i>V.parahaemolyticus</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CBM	CBM
SiNC	10	nd	nd	nd	nd	nd
DCOIT	1	≥10	1	≥10	1	≥10
Ag	nd	≥1	nd	≥1	nd	≥1
SiNC-DCOIT	1	≥10	1	≥10	1	≥10
SiNC-Ag	1	≥10	1	≥10	1	≥10
SiNC-DCOIT-Ag	1	≥10	1	≥10	1	≥10

A prata é reconhecida pela ação antimicrobiana e apresentou ação bactericida para todas as espécies a partir da concentração de 1 mg·L⁻¹. Isso pode ser justificado, pois este material na forma ionizada é altamente reativo e se liga às proteínas do tecido promovendo mudanças estruturais na parede celular bacteriana e na membrana nuclear levando à distorção celular e morte. Ag também se liga ao DNA e RNA bacteriano por meio de desnaturação e inibição da replicação bacteriana (Pugazhendhi et al. 2018). O uso de Ag em escala nanométrica é hoje considerado uma das estratégias mais promissoras no combate à formação de biofilme.

As dispersões coloidais dos nanocontentores SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag apresentaram efeito bacteriostático na concentração de 1 mg·L⁻¹. Foi observado, efeito bactericida nas espécies *B. subtilis*, *V. estuarinos* e *V. parahaemolyticus* na concentração de 10 mg·L⁻¹. Resultados similares também foram observados por Maia et al. (2015). Maia et al. (2015) expuseram a bactéria *E. coli* ao biocida DCOIT na forma livre e encapsulada, SiNC -COIT. De acordo com os resultados obtidos, após 45 minutos de exposição, o DCOIT na forma livre apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 16 ppm, enquanto que, para SiNC-DCOIT a Concentração Biocida Mínima (CBM) foi igual a 80 ppm.

A baixa toxicidade de SiNC também foi observada por Erdinçmer e Sponza (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana de SiO₂NP sobre o gênero *Vibrio sp.* De acordo

com o estudo, a bactéria *Vibrio fischeri* apresentou resistência ao material, $EC_{50} = 31,457 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os autores observaram que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes em comparação à bactéria Gram-positiva. Resultados similares foram obtidos com Yusof et al. (2020) utilizando a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a Gram-negativa *E. coli*. Segundo Sirelkhatim et al. (2015) a parede celular das bactérias Gram-positivas possui uma membrana citoplasmática com multicamadas de polímero de peptidoglicano e uma parede celular mais espessa, enquanto que, as bactérias Gram-negativas são compostas por duas membranas celulares, uma membrana externa e uma membrana plasmática com uma fina camada de peptidoglicano. Durante os experimentos não foi detectada alteração de pH.

5.2.2 Determinação de Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima

Em todas as concentrações selecionadas para o estudo (Tabela 8), o nanocontendor SiNC não comprometeu a viabilidade das espécies fúngicas. O efeito antibacteriano de SiNC observado sem comprometer células eucariotas também foi observado por Fellahi et al. (2013) que avaliaram a atividade antibacteriana de substratos de nanofios de Si com incorporação de Ag e Cu. De acordo com os resultados, as nanoestruturas apresentaram forte toxicidade contra *E. coli*. Contudo, foi também observado que nanofios de sílica com Ag incorporada são biocompatíveis a células eucariotas. Su et al. (2010) observaram também uma elevada atividade antibacteriana de nanofios a base de Si com biocompatibilidade a células eucariotas. Esses estudos sinalizam a possibilidade do desenvolvimento composto a base de sílica, especialmente em escala nanométrica com Ag incorporada com um bom potencial para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos aplicados a diversas áreas (Malarkodi et al., 2014).

O DCOIT, em concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, apresentou ação fungistática. Após 24 horas de exposição, as espécies *Penicillium citrinum*, IB-CLP11, *Aspergillus niger* IB-CLP20 e *Penicillium polonicum* IB-CLP22 apresentaram crescimento. Enquanto que, o biocida na concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foi fungicida para todas as espécies. A utilização do corante rezasurina permitiu que fosse observado a perda das propriedades do DCOIT durante o experimento. Comparando com o DCOIT encapsulado, foi observado que o

mesmo não perdeu sua atividade, sendo liberado gradativamente e retendo sua efetividade por um maior período de tempo.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de NCs SiNC, DCOIT, Ag, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag contra *Penicillium citrinum* IB-CLP11, *Penicillium clerotigenum* IB-CLP17, *Aspergillus niger* IB-CLP20 e *Penicillium polonicum* IB-CLP22. “nd”: não determinado.

NC-Anti-IN (mg·L ⁻¹)	<i>Penicillium citrinum</i>		<i>Penicillium clerotigenum</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium polonicum</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
SiNC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DCOIT	1	≥10	1	≥10	1	≥10	1	≥10
Ag	nd	≥1	nd	≥1	nd	≥1	nd	≥1
SiNC-DCOIT	1	≥10	1	≥10	1	≥10	1	≥10
SiNC-Ag	1	≥10	1	≥10	1	≥10	1	≥10
SiNC-DCOIT-Ag	1	≥10	1	≥10	1	≥10	1	≥10

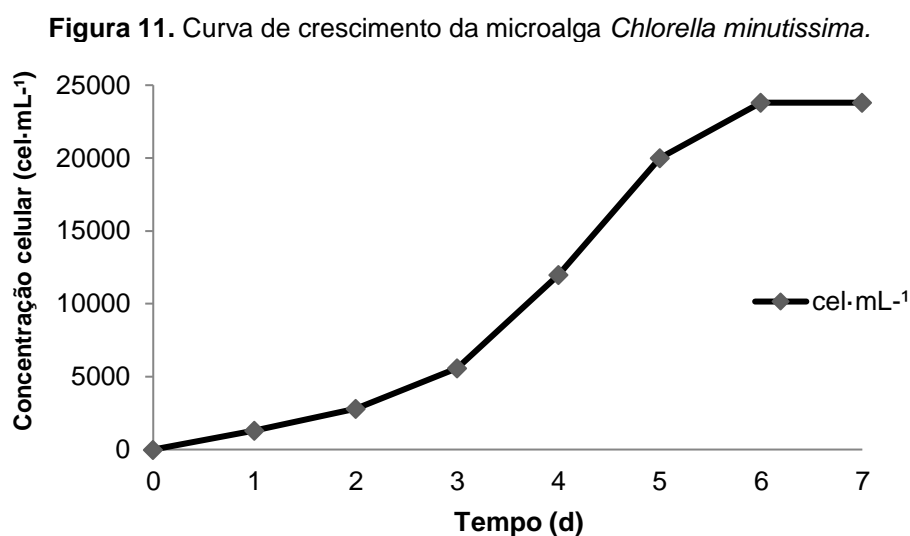
A prata em concentração de 1 mg·L⁻¹, apresentou ação fungicida para todas as espécies. É sabido que compostos à base de Ag mostram elevada atividade antimicrobiana. As AgNPs podem induzir pontuações e lacunas na membrana fúngica e, eventualmente, fragmentar a célula. Além disso, os íons Ag interagem com grupos dissulfeto ou sulfidril de enzimas que levam à interrupção dos processos metabólicos, fazendo com que o DNA perca sua capacidade de replicação e o ciclo celular é interrompido na fase G2/M, resultando em danos ao DNA. Eventualmente, as células são afetadas por estresse oxidativo e finalmente apoptose (Kessler et al., 2018). SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag na concentração de 1 mg·L⁻¹, apresentou ação fungistática e foram fungicidas na concentração 10 mg·L⁻¹ para todas as espécies. Não ocorreu alteração de pH durante o experimento.

Os resultados confirmaram que as nanocápsulas carregadas foram eficazes, uma vez que, a toxicidade dos materiais encapsulados (SiNC-DCOIT, SiNC-Ag, SiNC-DCOIT-Ag) foi menor comparada a de seus equivalentes (DCOIT, Ag). SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag, apresentaram comportamento e toxicidade promissora frente às espécies alvo da bioincrustação.

5.2.3 Determinação da densidade celular da *Chlorella minutissima*

5.2.3.1 Curva de crescimento

A construção da curva de crescimento e determinação da fase exponencial ocorreu por meio de contagem celular diária por um período de 7 dias. O final da fase exponencial foi determinado após 5 dias de cultivo (Fig. 11).

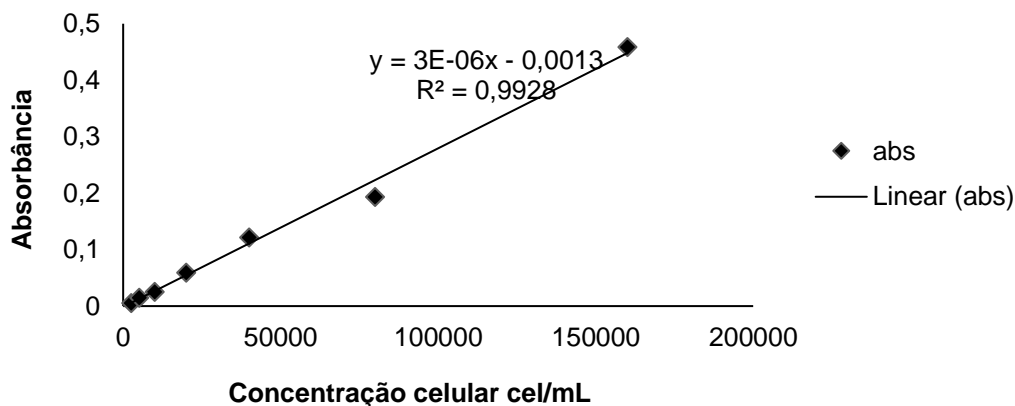


5.2.3.2 Curva de calibração

Para definir a variação da concentração celular da microalga nos ensaios de exposição aos compostos selecionados no presente estudo, foi construída previamente, uma curva padrão de calibração (Fig. 12).

A densidade óptica (DO) obtida nos padrões, para cada concentração celular, variaram entre 0,008-0,449. A quantificação celular foi obtida pela equação $y = 3e - 06x - 0,0013$, com a regressão linear ($R^2 = 0,992$). A equação permitiu a conversão dos valores da absorbância em concentração celular. Segundo o protocolo descrito por Dubois et al. (1956) para um bom ajuste, a análise de regressão linear deve ser obter o R^2 próximo a 0,99.

Figura 12. Reta de calibração da absorbância da cultura de *Chlorella minutissima* em função da concentração de células.

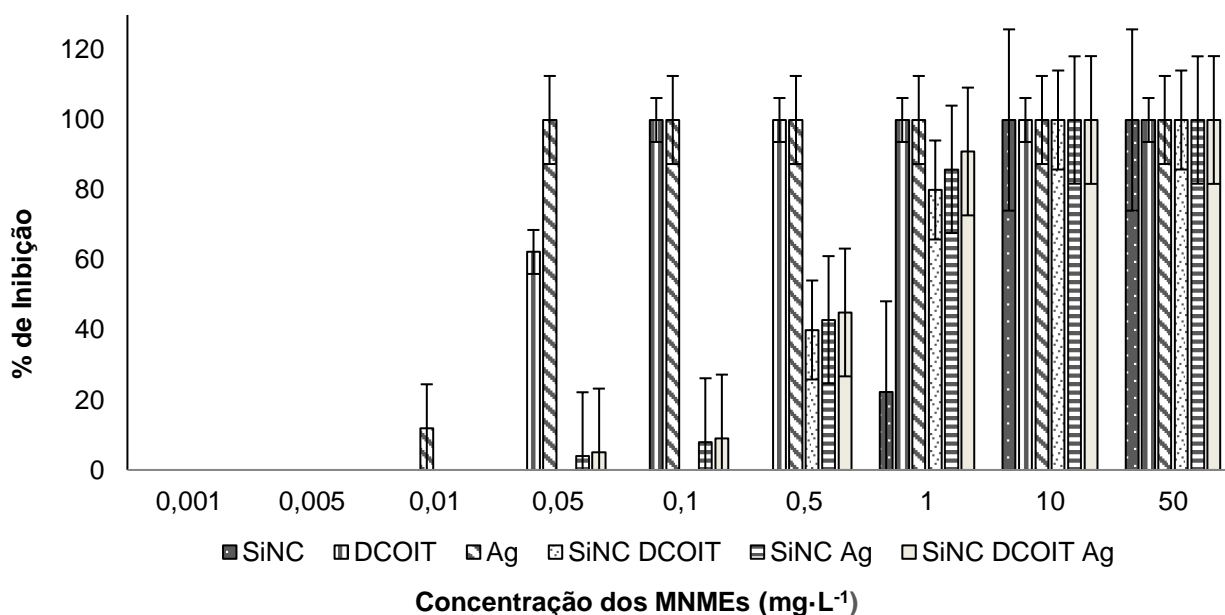


5.2.3.3 Densidade celular

As microalgas, como produtoras primárias no ecossistema aquático, desempenham um papel importante em todo o ambiente marinho. Estes organismos são sensíveis às mudanças no ambiente, devido a esta característica, são frequentemente utilizadas como organismos modelo para estudos de toxicidade. A toxicidade dos NMs está atrelada às suas características (tamanho, estado de oxidação, estrutura cristalina), assim como, concentração, meio de cultura e espécies (Fang et al., 2022; Vargas-Estrada et al., 2020; Phan, 2019).

A biomassa algácea foi determinada após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição por meio da DO das microalgas em um espectrofotômetro UV-Vis, com leitura da absorbância luminosa a 680 nm (Fig. 13). De acordo com os resultados apresentados na SiNC ($EC_{50}=2,24 \text{ mg L}^{-1}$) foi o composto que apresentou menor toxicidade em comparação a Ag ($EC_{50}=0,021 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e DCOIT ($EC_{50}=0,625 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag apresentaram toxicidade para a espécie ($EC_{50}=0,625 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $EC_{50}=0,584 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $EC_{50}=0,544 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente), porém, sendo menos tóxicos que o equivalente em larga escala. Dentre eles, SiNC-DCOIT foi o menos tóxico, apresentando efeito apenas na concentração de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto que, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag em $0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. As concentrações de $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,005 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de todos os MNMEs não apresentaram toxicidade. Todos os MNMEs nas concentrações de 10 e $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ apresentaram letalidade para a espécie. Não houve alteração do pH durante o experimento.

Figura 13. Efeito dos MNMEs no crescimento da alga *Chlorella minutissima*. O valor é a sobrevivência da alga sob tratamento variado em relação ao controle.



Resultados similares foram apresentados por Figueiredo et al. (2019) que expôs *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis gaditana* a SiNC, DCOIT, Ag, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag, na faixa de concentração de 0,001 a 100 mg·L⁻¹ por 72 horas. Os MNMEs DCOIT e SiNC-DCOIT, apresentaram toxicidade de EC₅₀ = 0,032 mg·L⁻¹ e EC₅₀ = 37,4 mg·L⁻¹, para a espécie *Isochrysis galbana*, enquanto que, para *Nannochloropsis gaditana* a toxicidade foi de EC₅₀ = 0,035 mg·L⁻¹ e EC₅₀ 0,590 mg·L⁻¹, respectivamente. Segundo os autores, SiNC-DCOIT-Ag foi menos tóxico que os biocidas na forma livre, sendo um candidato promissor para diminuir o impacto ambiental dos biocidas de última geração utilizados atualmente, sem comprometer sua eficácia anti-incrustante. Segundo Campos et al. (2021) o encapsulamento do DCOIT em nanocontentores têm sido amplamente explorados como uma alternativa ecológica promissora. Este procedimento controla a liberação do biocida ao longo do tempo, reduzindo o impacto ambiental e solucionando problemas de compatibilidade com o revestimento.

Nanomateriais que possuem em sua composição sílica, já foram reportados como tóxicos ao gênero *Chlorella* sp. Ji et al. (2011) efetuaram estudos de toxicidade expondo diversas nanopartículas, nanopartículas de dióxido de silício (SiO₂NPs) de diferentes tamanhos (760 ± 20 nm; 770 ± 30; 1040 ± 30 nm e 1330 ± 90 nm) a microalga *Chlorella* sp. Os autores concluíram que as duas SiO₂NPs de menores tamanhos (760 ± 20 nm e 770 ± 30 nm) reduziram em 20% a taxa de crescimento da espécie. Resultados

semelhantes foram descritos por Erdinçmer e Sponza (2020) ao avaliarem a toxicidade de diversas nanopartículas, incluindo as SiO₂NPs, na faixa de concentração compreendida entre 0,01 a 5,0 mg·L⁻¹. Dentre os nanomateriais testados, a microalga foi mais sensível as SiO₂NPs (EC₅₀=1.4 mg·L⁻¹).

Tayemeh et al. (2020) e Hazeem et al. (2019) também compararam a toxicidade de AgNO₃ e AgNP para o gênero *Chlorella*. Os resultados indicaram que AgNO₃ foi 10 vezes mais tóxico em comparação a exposição das AgNPs para a microalga *C. vulgaris*. AgNO₃ exibiu 100% de efeito inibitório em 0,01 mg·L⁻¹, enquanto que, as AgNPs apresentaram 100% de efeito inibitório na concentração de 0,1 mg·L⁻¹. Hazeem et al. (2020) também apresentaram resultados onde ocorreu uma maior toxicidade do AgNO₃ comparado com AgNPs para *C. vulgaris* isolada do ambiente marinho. Segundo Johari et al. (2018) uma suspensão de AgNPs rica em íons em ambientes de água salobra e salgada tendem a aglomerar o que pode desencadear mudanças em sua área de superfície, carga e tamanho em comparação com as partículas sintetizadas (Johari et al., 2018).

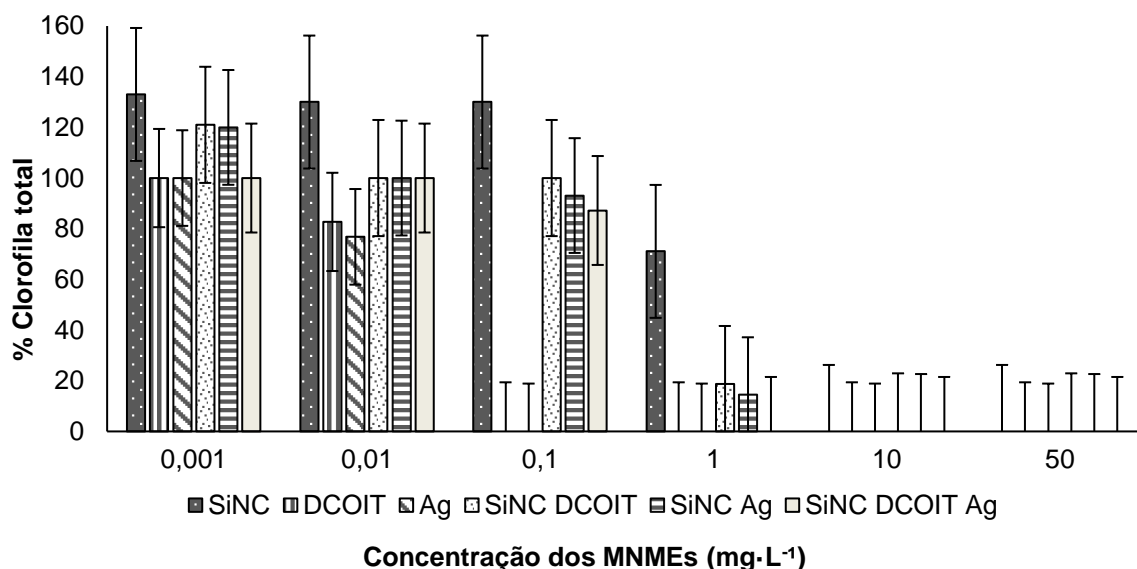
Os efeitos tóxicos dos nanomateriais (SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag) e seus componentes isolados (DCOIT, Ag e SiNC) para várias espécies-alvo e não-alvo de zonas temperadas foram recentemente descritos por Figueiredo et al. (2020; 2019). No entanto, são escassas as informações a respeito dos efeitos destes biocidas nanoestruturados ANTIN encapsulados em espécies aquáticas tropicais, reforçando assim, a necessidade de mais estudos utilizando diferentes organismos desta zona. Recentemente, Jesus et al. (2021) realizou o primeiro estudo focado nos efeitos dos MNMEs supracitados expostos ao microcrustáceo *Mysidopsis juniae*. De forma resumida, os autores determinaram a toxicidade dos compostos em testes agudos: DCOIT> SiNC-Ag> SiNC-DCOIT> SiNC-DCOIT-Ag> SiNC> Ag e em testes crônicos: SiNC-Ag> SiNC-DCOIT-Ag> DCOIT> Ag> SiNC, embora não tenha sido possível determinar a toxicidade crônica de SiNC-DCOIT.

5.2.3.4 Clorofila total

A microalga *C. vulgaris* foi exposta aos nanocontentores e seus equivalentes nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 50 mg·L⁻¹ por um período de 96 horas. Findado este período, as amostras foram analisadas. De acordo com a figura 15, a menor concentração (0,001 mg·L⁻¹) apresentou um maior teor de clorofila que o branco. Dentre os nanomateriais analisados, SiNC foi o que apresentou uma maior concentração de

clorofila nas concentrações em que não apresentou efeito no crescimento celular. O DCOIT e a Ag foram os compostos mais tóxicos e, também, os que mais influenciaram na clorofila total. Todos os compostos nas concentrações 10 e 50 mg·L⁻¹ não apresentaram clorofila total (Fig. 14).

Figura 14. Clorofila total da microalga *Chlorella minutissima* exposta aos MNMEs SiNC, DCOIT, Ag, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag, SiNC-DCOIT-Ag, respectivamente após as 96 horas.



SiNC, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT nas menores concentrações de estudo, apresentaram um aumento no teor de clorofila total. A concentração de 0,001 mg·L⁻¹ aumentou 133%, 122% e 120% para SiNC, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT, respectivamente, em comparação com o controle. Efeitos similares também foram apresentados por SiNC na concentração de 0,01 e 0,1 mg·L⁻¹ (aumento de 130% para as duas concentrações). Enquanto que SiNC, SiNC-DCOIT, SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag na concentração de 1 mg·L⁻¹ apresentaram uma diminuição de 28,9%, 81,3%, 85,5% e 92,4% no teor de clorofila total. DCOIT e Ag apresentaram uma maior influência no teor de clorofila, reduzindo em 17,3% e 23,2%, respectivamente quando em comparação com o controle a 0,01 mg·L⁻¹. Phan (2019) relata que as células algáceas em condições de estresse tendem a ajustar o metabolismo celular e armazenar moléculas grandes, como proteínas e lipídios. As algas podem tolerar efeitos tóxicos normalmente em doses mais baixas. Neste estudo, o conteúdo de clorofila total da *C. minutissima* aumentou significativamente com uma dose baixa dos compostos, mas diminuiu à medida que uma dose mais elevada foi introduzida.

A toxicidade de compostos com Ag presente na composição também foi observada por Romero et al. (2020), ao expor a alga *Chlorella vulgaris* a AgNPs por um

período de 96 horas, relataram que a concentração por célula de clorofila *a* aumentou de 62% para 397%. Em acréscimo, a clorofila *b* apresentou um aumento na concentração por célula de 42% para 316%. Tais resultados, comparados com o grupo controle, na presença de AgNP nas menores concentrações (90 a 720 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Enquanto que, na maior concentração (1440 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ocorreu a diminuição em 16% da razão clorofila *a* / clorofila *b* (Chla/Chlb). Os NMs reconhecidamente descritos pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células animais e vegetais, causando estresse oxidativo e danos celulares. O aumento ou a diminuição da clorofila indica um distúrbio metabólico (Tripathi e Poluri, 2021).

O aumento ou a diminuição da clorofila total observado pode ser a mudança na proporção da razão Chla/Chlb. Essa razão pode ser considerada como um indicador metabólico. Indica a expressão da sensibilidade a fatores externos do sistema enzimático do complexo coletor de luz II (LHCII) dos cloroplastos. Uma mudança na proporção sugere um desequilíbrio estequiométrico entre os complexos do centro de reação de ambos os fotossistemas e o complexo coletor de luz do fotossistema II. Isso pode ser resultado de uma resposta fisiológica adaptativa de defesa do organismo, já que o primeiro passo na degradação da clorofila *b* é a conversão em clorofila *a*. A diminuição da clorofila pode estar relacionada ao dano no pigmento das células expostas ou redução dos complexos pigmento-proteína, que pode ser resultado da aceleração da atividade da clorofilase ou da estimulação da produção de ROS por conta da presença dos xenobióticos no meio. (Romero et al., 2020). Esses resultados também foram observados por Mariano et al. (2020) que expôs *C. vulgaris* e *Dunaliella tertiolecta* a AgNPs em diferentes concentrações. Foi observado que o conteúdo de clorofila diminuiu em 34% e 51% para *C. vulgaris* e 44% e 75% para *D. tertiolecta* quando expostas ao nanomaterial nas concentrações de 1 e 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Diante do conjunto de resultados obtidos sumarizados nas tabelas 9 e 10 (Anexo), é possível considerar que o encapsulamento de biocidas é uma solução ecologicamente correta e promissora para o desenvolvimento de novos materiais a serem utilizados como ANTIN.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possibilitou avaliar a potencial incorporação de nanomateriais engenheirados com capacidade anti-incrustante a tintas para revestimento de embarcações e que simultaneamente apresentassem uma abordagem amiga do ambiente. Os resultados são inéditos para microrganismos aquáticos de ambiente tropical.

As caracterizações dos nanomateriais engenheirados utilizados neste estudo foram fundamentais para a compreensão de suas propriedades e estruturas físico-químicas e, conseqüentemente, a melhor compreensão de sua interação com o meio biológico.

O ensaio de toxicidade comprovou a capacidade antimicrobiana dos materiais para os microrganismos alvo da bioincrustação. Ainda que os materiais encapsulados tenham apresentado atividade antimicrobiana, devido a liberação controlada dessa formulação foi possível observar também uma menor toxicidade comparada com seus equivalentes em larga escala.

O encapsulamento permitiu a preservação da molécula do biocida DCOIT. Na forma livre o DCOIT apresentou sinais de degradação após 24 horas, enquanto encapsulado (SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag) não apresentou sinais de degradação. Tais resultados são promissores para a formulação dos nanomateriais engenheirados em tintas anti-incrustantes, uma vez que, o encapsulamento aumentou a durabilidade do composto tornando seu desenvolvimento em escala industrial economicamente viável.

Este estudo também fornece uma revisão de dados de toxicidade de biocidas anti-incrustantes e nanomateriais utilizados atualmente. Esses dados são úteis como base para futuros trabalhos acadêmicos, como também, projetos regulatórios e industriais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbaszadeh S.; Sharifzadeh A.; Shokri H.; Khosravi A.R.; Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal of Medical Mycology**, v.24, p.51-56, 2014.

ABDI, Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação. Brasília: ABDI, 2011. 50 p. (Estudo setorial de inovação).

Abioye, O.P.; Loto, C.A.; Fayomi, O.S.I. Evaluation of anti-biofouling progresses in marine application. **Journal of Bio - and Tribo - Corrosion**, v.5, p.22, 2019.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 16181. Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com microalgas marinhas. Rio de Janeiro, p.4. 2013.

ABNT NBR 12648 / 2011: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae).

Abreu, F.E.L. **Biocidas anti-icrustantes de terceira geração em sedimentos superficiais da costa brasileira**. 2016. Dissertação (Mestrado Oceanografia Física, Química e Geológica) – Curso de Oceanografia Física, Química e Geológica, Universidade Federal do Rio Grande.

Agostini, V.O.; Macedo, J.M.; Muxagata, E.; Silva, M.V.; Pinho, G.L.L. Non-toxic antifouling potential of Caatinga plant extracts: effective inhibition of marine initial biofouling. **Hydrobiologia**, v.847, p.45-60, 2020.

Ahmad, A.; Wei, Y.; Syed, F.; Tahir, K.; Rehman, A.U.; Khan, A.; Ullah, S.; Yuan, Q. The effects of bacteria-nanoparticles interface on the antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles. **Microbial Pathogenesis**, v.102, p.133-142, 2017.

Ahmadi, M.; Habibi, A.; Pourafshry, P.; Ayatollahi, S.H. Zeta potential investigation and mathematical modeling of nanoparticles deposited on the rock surface to reduce fine migration. **SPE Middle East Oil and Gas Show and Conference**, 2011.

Aidarova, S.B.; Sharipova, A.A.; Issayeva, A.B.; Mutaliyeva A.Z.; Tleuova, A.B.; Grigoriev, D.O.; Kudasova, D.; Dzhakasheva, M.; Miller, R. Synthesis of submicrocontainers with “Green” biocide and study of their antimicrobial activity. **Colloids and Interfaces**, v.2, p.67, 2018.

Allan, J.; Belz, S.; Hoeveler, A.; Hugas, M.; Okuda, H.; Patri, A.; Rauscher, H.; Silva, P.; Slikker, W.; Sokull-Kluettgen, B.; Tong, W.; Anklam, E. Regulatory landscape of nanotechnology and nanoplastics from a global perspective. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.122, p.104885, 2021.

Alzieu, C. Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. **Marine Environmental Research**, v.32(1-4), p.7-17, 1991.

Amara, I.; Miled, W.; Slama, R.B.; Ladhari, N. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.57, p.115-130, 2018.

Amin, F.; AlNadhari, S.; Homaidan, A.A. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.28(1), p.224-231, 2020.

Angel, B.M.; Batley, G.E.; Jarolimek, C.V.; Rogers, N.J. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. **Chemosphere**, v.93, p.359-365, 2013.

Angwin, C.; Ghali, N.; Baker, D.; Brady, A.F.; Pope, F.M.; Vandersteen, A.; Wagner, B.; Ferguson, D.J.P.; Dijk, F.S. Electron microscopy in the diagnosis of Ehlers-Danlos syndromes: correlation with clinical and genetic investigations. **Medical Dermatology**, v.18(3), p.698-707, 2019.

Antunes, J.; Leão, P.; Vasconcelos, V. Marine biofilms: diversity of communities and of chemical cues. **Environmental Microbiology Reports**, v.11, p.287-305, 2018.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. PORTARIA Nº 1.358, DE 20 DE AGOSTO DE 2014. Disponível em: < https://www.poderesaude.com.br/novosite/images/publicacoes_21.08.2014-lli.pdf > Acessado em: 31 de maio 2021.

Arrhenius, Å.; Backhaus, T.; Grönvall, F.; Junghans, M.; Scholze, M.; Blanck, Hans. 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**, v.50, p.335–345, 2006.

Arze, A.R.; Manier, N.; Chatel, A.; Mouneyrac, C. Characterization of the nano–bio interaction between metallic oxide nanomaterials and freshwater microalgae using flow cytometry. **Nanotoxicology**, v.14(8), p.1-14, 2020.

Avelelas, F.; Martins, R.; Oliveira, T.; Maia, F.; Malheiro, E.; Soares, A.M.V.M.; Loureiro, S.; Tedim, J. Efficacy and Ecotoxicity of Novel Anti-Fouling Nanomaterials in Target and Non-Target Marine Species. **Marine Biotechnology**, v.19, p.164-174, 2017.

Bao, V.W.W.; Leung, K.M.Y.; Qiu, J.W.; Lam, M.H.W. Acute toxicities of Five common lyused antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.1147-1151, 2011.

Burchardt, AD.; Carvalho, RN; Valente, A.; Nativo, P.; Gilliland, D.; Garcia, CP.; Passarella, R.; Pedroni, V.; Rossi, F.; Lettieri, T. Effects of silver nanoparticles in diatom *Thalassiosira pseudonana* and cyanobacterium *Synechococcus* sp. **Environmental science and technology**, v.46, p.11336-11344, 2012.

Campos, B.G.; Figueiredo, J.; Perina, F.; Abessa, D.M.S.; Loureiro, S.; Martins, R. Occurrence, effects and environmental risk of antifouling biocides (EU PT21): Are marine ecosystems threatened ?. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.32(1), p.1064-3389, 2021.

Cao, S.; Zhang, D.; Teng, F.; Liao, R.; Cai, Z.; Tao, Y.; Hu, H. Inhibitory effects of ultralow-dose sodium hypochlorite on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*: Differences in sensitivity and physiology. **Science of The Total Environment**, v.774, p.145638, 2021.

Caruso, G. Microbial Colonization in Marine Environments: Overview of Current Knowledge and Emerging Research Topics. **Journal of Marine Science and Engineering**, v.8(2), p.78, 2020.

Carvalho, A.C.; Junior, C.Y.O.; Rodrigues, L.D.C.; Medeiros, L.S.; Veiga, T.A.M. *Penicillium* genus as a source for anti-leukemia compounds: an overview from 1984 to 2020. **Leukemia and Lymphoma**, v.15, p.1042-8194, 2021.

Castro, I.B.; Westphal, E.; Fillmann, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v.34(6), p.1021-1031, 2011.

Chandra, R.; Amit; Ghosh, U.K. Effects of various abiotic factors on biomass growth and lipid yield of *Chlorella minutissima* for sustainable biodiesel production. **Environmental Science and Pollution Research**, v.26, p.3848-3861, 2019.

Chen, L.; Wang, Y.; Chen, Z.; Cai, Z.; The fouling layer development on MD membrane for water treatments: An especial focus on the biofouling progress. **Chemosphere**, v.264(2), p.128458, 2021.

Chen, M.; Mudhar, R. Antimicrobial activity of organic wood preservatives against bio-deterioration fungi: minimum inhibitory concentration (MIC) via spiral gradient endpoint (SGE) test. **American Wood Protection Association Annual Meeting Proceeding**, v.114, p.230-237, 2018.

Chirayil, C.J.; Abraham, J.; Mishra, R.K.; George, S.C.; Thomas, S. Instrumental Techniques for the Characterization of Nanoparticles. **Therm. Rheol. Meas. Tech. Nanomater. Charact.**, p.1–36, 2017:

Clogston, J.D.; Patri, A.K. Zeta potential measurement. **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**, v.697, p.63-70, 2010.

Devilla, R.; Brown, M.; Donkin, M.; Tarran, G.; Aiken, J.; Readman, J. Impact of antifouling booster biocides on single microalgal species and on a natural marine phytoplankton community. **Marine Ecology Progress Series**, v.286, p.1–12, 2005.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K. Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-356, 1956.

Eivazzadeh-Keihan, R.; Chenab, K.K.; Taheri-Ledari, R.; Mosafer, J.; Hashemi, S.M.; Mokhtarzadeh, A.; Maleki, A.; Hamblin, M.R. Recent advances in the application of mesoporous silica-based nanomaterials for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v.107, p.110267, 2020.

El-saied, H.A.; Ibrahim, A.M. Effective Fabrication and Characterization of Eco-friendly Nano Chitosan Capped Zinc Oxide Nanoparticles for Effective Marine Fouling Inhibition. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.8, p.103949, 2020.

Erdirinçmer, N.; Sponza, D.T. Evaluation of the effects of nano-metal oxide (Nano-SiO₂, Nano-HfO₂, Nano-CeO₂, Nano-Ta₂O₅) on Microtox, Algae and *Daphnia magna*. **Asian Basic and Applied Research Journal**, v.2(2), p.37-42, 2020.

Erjaee, H.; Rajaian, H.; Nazifi, S. Synthesis and characterization of novel silver nanoparticles using *Chamaemelum nobile* extract for antibacterial application. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v.8, p.2043-6262, 2017.

Fanesi, A.; Lavayssière, M.; Breton, C.; Bernard, O.; Briandet, R.; Lopes, F. Shear stress affects the architecture and cohesion of *Chlorella vulgaris* biofilms. **Scientific Reports**, v.11, p.4002, 2021.

Fang, R.; Gong, J.; Cao, W.; Chen, Z.; Huang, D.; Ye, J.; Cai. The combined toxicity and mechanism of multi-walled carbon nanotubes and nano copper oxide toward freshwater algae: *Tetradismus obliquus*. **Journal of Environmental Sciences**, v.112, p.376-387, 2022.

Farkas, A.; Degiuli, N.; Martić, I. The impact of biofouling on the propeller performance. **Ocean Engineering**, v.219, p.108376, 2021.

Fellahi, O.; Sarma, R.K.; Das, M.R.; Saikia, R.; Marcon, L.; Yannick, C.; Hadjersi, T.; Maamache, M.; Boukherroub, R. The antimicrobial effect of silicon nanowires decorated with silver and copper nanoparticles. **Nanotechnology**, v.24, p.49, 2013.

Fernández-Alba, A.R.; Hernando, M.D.; Piedra, L.; Chisti, Y. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. **Analytica Chimica Acta**, v.456(2), p.303-312, 2002.

Figueiredo, J.; Loureiro, S.; Martins, R. Hazard of novel anti-fouling nanomaterials and biocides DCOIT and silver to marine organisms. **Environmental Science: Nano**, v.7, p.1670-1680, 2020.

Figueiredo, J.; Oliveira, T.; Ferreira, V.; Sushkova, A.; Silva, S.; Carneiro, D.; Martins, R. Toxicity of innovative anti-fouling nano-based solutions in marine species. **Environmental Science**, v.6, p.1418-1429, 2019.

Figueiredo, J.M. **Toxicity of novel anti-fouling nanomaterials in marine organisms**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Curso Ecologia Aplicada, Universidade de Aveiro.

Flemming, H.C. Biofouling and me: My Stockholm syndrome with biofilms. **Water Research**, v.173, p.115576, 2020.

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

Georgantzopoulou, A.; Balachandran, Y.; Rosenkranz, P.; Dusinska, M.; Lankoff, A.; Wojewodzka, M.; Kruszewski, M.; Cuignard, C.; Audinot, J.; Girija, S.; Hoffman, L.; Gutleb, A. Ag nanoparticles: size- and surface-dependent effects on model aquatic

organisms and up take evaluation with Nano SIMS. **Nanotoxicology**, v.7(7), p.1168–1178, 2002.

Gil-Allué, C.; Schirmer, K.; Tlili, A.; Gessner, M.O.; Behra, R. Silver nanoparticle effects on stream periphyton during short-term exposures. **Environmental science and technology**, v.49, p.1165-1172, 2015.

Gu, Y.; Yu, L.; Mou, J.; Wu, D.; Xu, M.; Zhou, P.; Ren, Y. Research Strategies to Develop Environmentally Friendly Marine Antifouling Coatings. **Marine drugs**, v.18(7), p.371, 2020.

Guivar, R.J. **Functionalization of iron oxide magnetic nanomaterials with applications in biosensors and bone tissue regeneration**. 2015. Tesis para optar el Grado de Magister em Física com menção em Física del Estado Sólido, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Guo, X.; Chai, C.; An, Y.; Peng, C.; Shi, N.; Wang, W.; Lu, F.; Dai, Y.; Liu, F. Rational design of signal peptides for improved MtC1LPMO production in *Bacillus amyloliquefaciens*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.175, p.262-269, 2021.

Gutner-Hoch, E.; Martins, R.; Maia, F.; Oliveira, T.; Shpigel, M.; Weis, M.; Tedim, J.; Benayahu, Y. Toxicity of engineered micro-and nanomaterials with antifouling properties to the brine shrimp *Artemia salina* and embryonic stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Environmental Pollution**, v.251, p.530-537, 2019.

Han, X.; Wu, J.; Zhang, X.; Shi, J.; Wei, J.; Yang, Y.; Wu, B.; Feng, Y. Special issue on advanced corrosion-resistance materials and emerging applications. The progress on antifouling organic coating: From biocide to biomimetic surface. **Journal of Marine Science and Technology**, v.61, p.46-62, 2021.

Hayek, M.; Salgues, M.; Souche, J.C.; Cunge, E.; Giraudel, C.; Paireau, O. Influence of the Intrinsic Characteristics of Cementitious Materials on Biofouling in the Marine Environment. **Sustainability**, v.13(5), p.2625, 2021.

Hazeem, L.J.; Kuku, G.; Dewailly, E.; Slomianny, C.; Barras, A.; Hamdi, A.; Boukherroub, R.; Culha, M.; Bououdina. Toxicity effect of silver nanoparticles on photosynthetic pigment content, growth, ROS production and ultrastructural changes of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Nanomaterials**, v.9, p.914, 2019.

Hermoso, M.I.; Martin, V.Y.; Gelcich, S.; Stotz, W.; Thiel, M. Exploring diversity and engagement of divers in citizen science: Insights for marine management and conservation. **Marine Policy**, v.124, p.104316, 2021.

Idumah, C.I.; Obele, C.M.; Emmanuel, E.O.; Hassan, A. Recently Emerging Nanotechnological Advancements in Polymer Nanocomposite Coatings for Anti-corrosion, Anti-fouling and Self-healing. **Surfaces and Interfaces**, v.21, p.100734, 2020.

Ilet, M.; S'ari, M.; Freeman, H.; Aslam, Z.; Koniuch, N.; Afzali, M.; Cattle, J.; Hooley, R.; Roncal-Herrero, T.; Collins, S.M.; Hondow, N.; Brown, A.; Brydson, R. Analysis of complex, beam-sensitive materials by transmission electron microscopy and associated

techniques. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v.378, p.2186, 2020.

Ismail, A.A.; Tharwat, N.A. Antifungal activity of silver ion on ultrastructure and production of aflatoxin B1 and patulin by two mycotoxigenic strains, *Aspergillus flavus* OC1 and *Penicillium vulpinum* CM. **Journal de Mycologie Médicale**, v.24, p, 193-204, 2014.

Jacobson A.H.; Willingham G.L. Sea-nine antifoulant: na environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. **Science of the Total Environment**, v.258, p.103-11021, 2000.

Jawed, A.; Saxena, V.; Pandey, L.M.; Engineered nanomaterials and their surface functionalization for the removal of heavy metals: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v.33, p.101009, 2020.

Jesus, E.P.S.; Figueirêdo, L.P.; Maia, F.; Martins, R.; Nilin, J. Acute and chronic effects of innovative antifouling nanostructured biocides on a tropical marine microcrustacean. **Marine Pollution Bulletin**, v.164, p.111970, 2021.

Ji, J.; Long, Z.; Lin, D. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.* **Chem. Eng. J.**, v.170, p.525-530, 2011.

Johari, S.A.; Sarkheil, M.; Tayemed, M.B.; Veisi, S. Influence of salinity on the toxicity of silver nanoparticles (AgNP) and silver nitrate (AgNO₃) in halophilic microalgae, *Dunaliella salina*. **Chemosphere**, v.209, p.156-162, 2018.

Joyce, P.W.S.; Cuthbert, R.N.; Kregting, L.; Crane, K.; Vong, G.Y.W.; Cunningham, E.M.; Coughlan, N.E. Stay clean: direct steam exposure to manage biofouling risks. **Marine Pollution Bulletin**, v.142, p.465-469, 2019.

Kessler, N.J.; Waterland, R.A.; Prentice, A.M.; Silver, M.J. Establishment of environmentally sensitive DNA methylation states in the very Early human embryo. **Science Advances**, v.4(7), p.2624, 2018

Khan, S.A.; Malla, F.A.; Rashmi; Malav, L.C.; Gupta, N.; Kumar, A. Potencial of wastewater treating *Chlorella minutissima* for methane enrichment and CO₂ sequestration of biogas and producing lipids. **Energy**, v.150, p.153-163, 2018.

Konstatinou, I.; Albanis, T.A. World wide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**, v.30, p.235-248, 2004.

Kralova, K.; Jampilek, J. Responses of medicinal and Aromatic Plants to Engineered Nanoparticles. **Applied Sciences**, v.11(4), p.1813, 2021.

Lai, R.W.S; Yeung, K.W.Y.; Yung, M.M.N.; Djuriscic, A.B.; Giesy, J.P.; Leung, K.M.Y. Regulation of engineered nanomaterials: current challenges, insights and future directions. **Environmental Science and Pollution Research**, v.25, p.3060-3077, 2018.

Lee, B.C.; Tsai, J.C.; Lin, C.Y.; Hung, C.W.; Sheu, J.C.; Tsai, H.J. Using *Bacillus subtilis* as a Host Cell to Express an Antimicrobial Peptide from the Marine Chordate *Ciona intestinalis*. **Marine drugs**, v.19(2), p.111, 2021.

Letzel, A.; Gokce, B.; Menzel, A.; Plech, A.; Barcikowski, S. Primary particle diameter differentiation and biomodality identification by five analytical methods using gold nanoparticle size distributions synthesized by pulsed laser ablation in liquids. **Applied Surface Science**, v.435, p.743-751, 2018.

Li Y.; Kong W.; Li M.; Liu H.; Zhao X.; Yang S.; Yang M. Litsea cubeba essential oil as the potential natural fumigant: Inhibition of *Aspergillus flavus* and AFB1 production in licorice. **Industrial Crops Products**, v.80, p.186-193, 2016.

Li, Y.; Ning, C. Latest research progress of marine microbiological corrosion and biofouling, and new approaches of marine anti-corrosion and anti-fouling. **Bioactive Materials**, v.4, p.189-195, 2019.

Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes **Methods in enzymology**, v.48, p.350-382, 1987.

Luo, J.; Lv, P.; Zhang, J.; Fane, A.G.; Mcdougald, D.; Rice, S.A. Succession of biofilm communities responsible for biofouling of membrane bioreactors (MBRs). **PLoS ONE**, v.12(7), p.0179855, 2017.

Ma, Y.; Ling, T.; Su, X.; Jiang, B.; Nian, B.; Chen, L.; Liu, M.; Zhang, Z.; Wang, D.; Mu, Y.; Jiao, W.; Liu, Q.; Pan, Y.; Zhao, M. Integrated proteomics and metabolomics analysis of tea leaves fermented by *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii* and *Aspergillus fumigatus*. **Food Chemistry**, v.334, p.127560, 2021.

Machado, I.; Moura, T.; Figueiredo, I.; Chaves, C.; Costa, J.L.; Cabral, H.N. Effects of scale on the assessment of fish biodiversity in the marine strategy framework directive context. **Ecological Indicators**, v.117, p.106546, 2020.

Mahamuni-Badiger, P.P.; Patil, P.M.; Badiger, M.V.; Patel, P.R.; Thorat- Gadgil, B.S.; Pandit, A.; Raghvendra A.B. Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v.108, p.110319, 2020.

Maia, F.; Silva, A.P.; Fernandes, S.; Cunha, A.; Almeida, A.; Tedim, J.; Zheludkevich, M.L.; Ferreira, M.G.S. Incorporation of biocides in nanocapsules for protective coatings used in maritime applications. **Chemical Engineering Journal**, v.270, p.150–157, 2015.

Malarkodi, C.; Rajeshhkumar, S.; Paulkumar, K.; Vanaja, M.; Gnanajobitha, G.; Annadurai, G. Biosynthesis and antimicrobial activity of semiconductor nanoparticles Against oral pathogens. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v.2014, 2014.

Mann C.M.; Markham J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

Mariano, S.; Panzarini, E.; Inverno, M.D.; Voulvoulis, N.; Dini, L. Toxicity, bioaccumulation and biotransformation of glucose-capped silver nanoparticles in green microalgae *Chlorella vulgaris*. **Nanomaterials**, v.10(7), p.1377, 2020.

Marui, J.; Phouphasouk, S.; Giavang, Y.; Yiale, Y.; Boulom, S. Relationship between Salinity and Histamine Accumulation in *Padaek*, a Salt-Fermented Freshwater Fish Paste from Laos. **Journal of Food Protection**, v.84(3), p.429-436, 2021.

Mathew, J.; Soney, C.; George, J.J. Potencial applications of nanotechnology in transportation: A review. **Journal of King Saud University - Science**, v.31(4), p.586-594, 2019.

Mezcua, J.; Rueda, J. Earthquake study of September 23, 2001 in Pego (*Alicante*). Obtaining a Lg-M relationship for the Iberian Peninsula. **Revista de la Sociedad Geológica de España**, v.15, p.159-173, 2002.

Michailidis, M.; Hoch, E.G.; Wengier, R.; Onderwaters, R.; D'as, R.A.; Benayahu, Y.; Semenov, A.; Vinokurov, V.; Shchukin, D.G. Highly effective functionalized coatings with antibacterial and antifouling properties. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v.8(24), p.8928-8937, 2020.

Miller, R.J.; Adeyemi, S.A.; Page, H.M.; Kui, L.; Lenihan, H.S.; Keller, A.A. Nano and traditional copper and zinc antifouling coatings: metal release and impact on marine sessile invertebrate communities. **Journal of Nanoparticle Research**, v.22, p.129, 2020.

Mohanta, Y.K.; Biswas, K.; Jena, S.J.; Hashem, A.; Allah, E.F.A.; Mohanta, T.K. Anti-biofilm and antibacterial activities of silver nanoparticles synthesized by the reducing activity of phytoconstituents presente in the indian medicinal plants. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p.1143, 2020.

Needs, S.H.; Osborn, H.M.I.; Edward, A.D.; Couting bacteria in microfluidic devices: Smartphone compatible 'dip-and-test' viable cell quantitation using resazurin amplified detection in microliter capillary arrays. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106199, p.0167-7012, 2021.

Neethu, S.; Midhun, S.J.; Radhakrishnan, E.K.; Jyothis, M. Green synthesized silver nanoparticles by marine endophytic fungus *Penicillium plonicumand* its antibacterial efficacy against bio film forming, multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Pathogenesis**, v.116, p.263-272, 2018.

Nguyen, T.V.; Alfaro, A.; Arroyo, B.B.; Leon, J.A.R.; Sonnenholzner, S. Metabolic responses of penaeid shrimp to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v.533, p.736174, 2021.

Nystrom B.; Slooten, K.B.V.; Bérard A.; Grandjean, D.; Druart, J.C.; Leboulanger, C. Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Genva. **Water Research**, v.36, p.2020-2028, 2002.

Ohte, S.; Shiokawa, T.; Koyama, N.; Katagiri, T.; Imada, C.; Tomoda, H. A new diketopiperazine-like inhibitor of bone morphogenetic protein-induced osteoplastic differentiation produced by marine-derived *Aspergillus sp.* BFM-0085. **The Journal of Antibiotics**, v.73, p.554-558, 2020.

Okay, O.; Donkin, P.; Peters, L.; Livingstone, D. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel (*Mytilus edulis*). **Environmental Pollution**, v.110, p. 103–113, 2000.

OMI, Organização marítima internacional International Convention on the Control of Harmful Anti-Fouling Systems on Ships. AFS/CONF/26. 2001.

OMI, Organização marítima internacional International Convention on the Control of Harmful Anti-Fouling Systems on Ships. AFS/CONF/26. 2014.

Pereira, M.; Ankjaergaard, C. Legislation affecting antifouling products. In Woodhead Publishing Series in Metals and Surface Engineering, **Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies**, p.240-259, 2009.

Phan, T.L. Effect of silver nanoparticles on tropical freshwater and marine microalgae. **Journal of Chemistry**, v.2019, 2019.

Pradhan, S.; Kumar, S.; Mohanty S.; Nayak, S.K. Environmentally benign fouling-resistant marine coatings: A Review. **Polymer-Plastics Technology and Materials**, v.58(5), p.498-518, 2018.

Prasad, S.; Potdar, V.; Cherian, S.; Abraham, P.; Basu, A. Transmission electron microscopy imaging of SARS-CoV-2. **Indian Journal of Medical Research**, v.151(2-3), p.241-243, 2020.

Price, A.R.G.; Readman, J.W. Booster biocide antifoulants: Is history repeating itself ? **Late lessons from early warnings: science, precaution, innovation**, v.1, p.265-278, 2013.

Pugazhendhi, A.; Prabakar, D.; Jacob, J.M.; Karuppusamy, I.; Saratale, R.G. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gelidium amansii* and its antimicrobial property Against various pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v.144, p.41-45, 2018.

Rajesh, M.K.; Muralikrishna, K.S.; Nair, S.S.; Krishna, B.; Subrahmanya, T.M.; Sonu, K.P.; Subaharan, K.; Sweeta, H.; Keshava Prasad, T.S.; Neeli, Chandran.; Karunasagar, I.; Hebbar, H.B.; Karun, A. Facile coconut inflorescence sap mediated synthesis of silver nanoparticles and its diverse antimicrobial and cytotoxic properties. **Materials Science and Engineering: C**, v.111, p.110834, 2020.

Romero, J.M.; Cordon, G.B.; Lagorio, M.G. Re-absorption and scatterinf of chlorophyll fluorescence in canopies: A revised approach. **Remote Sensing of Environment**, v.246, p.111860, 2020.

Rosen, G.; Osorio-Robayo, A.; Rivera-Duarte, I.; andLapota, D. Comparison of Bioluminescent Dinoflagellate (QwikLite) and Bacterial (Microtox) Rapid Bioassays for the Detection of Metal and Ammonia Toxicity. **Archivesof Environmental Contamination and Toxicology**, v.54(4), p.606–611, 2008.

Saman, N.; Kamal, N.A.A.; Lye, J.W.P.; Mat, H. Synthesis and characterization of CTAB silica nanocapsules and its adsorption behavior towards PD(II) íons in aqueous solution. **Advanced Powder Technology**, v.31(8), p.3205-3214, 2020.

Santos, J.V.N.; Martins, R.; Fontes, M.K.; Campos, B.G.; Silva, M.B.M.P.; Maia, F.; Aessa, D.M.S.; Perina, F.C. Can Encapsulation of the Biocide DCOIT Affect the Anti-

Fouling Efficacy and Toxicity on Tropical Bivalves ? **Applied Sciences**, v.10(23), p.8579, 2020.

Sen, K.; Bai, M.; Sen, B.; Wang, G. Disentangling the structure and function of mycoplankton communities in the context of marine environmental heterogeneity. **Science of the total environment**, v.766, p.142635, 2021.

Sharan, A.; Nara, S. Exposure of synthesized CO₃O₄ nanoparticles to *Chlorella minutissima*: An ecotoxic evaluation in freshwater microalgae. **Aquatic Toxicology**, v.224, p.105498, 2020.

Silva, N.; Junqueira V.C.A; Silveira, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. **Varela**, v.3, p. 430, 2007.

Singh, D.; Rathod, V.; Ninganagouda, S.; Herimath, J.; Kulkarni, P.; Optimization and Characterization of Silver Nanoparticle by Endophytic Fungi *Penicillium* sp. Isolated from *Curcuma longa* (Turmeric) and Application Studies against MDR *E. coli* and *S. aureus*. **Journal Pharm. Res.**, v.7, p.448–453, 2014.

Sirelkhatim, A.; Mahmud, S.; Seeni, A.; Kaus, N.H.M.; Ann, L.C.; Bakhori, S.K.M.; Hassan, H. Mohamad, D. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro. Lett.**, v.7, p.219-242, 2015.

Stauber, J.L.; Binet, M.T.; Bao, V.W.W.; Boge, J. Zhang, A.Q.; Leung, K.M.Y. Adams, M.S. Comparison of the Qwiklittm algal bioluminescence test with marine algal growth rate inhibition bioassays. **Environmental Toxicology**, v.23, p.5, 2008.

Su, Y.; Li, H.; Xu, C.; Wang, X.; Xie, J.; Qin, J. G.; Li, E. Endoplasmic reticulum stress mediates 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) – induced toxicity and liver lipid metabolism changes in *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Pollution**, v. 242, p.1981-1987, 2018.

Su, Y.T.; Lan, G.Y.; Chen, W.Y.; Chang, H.T. Detection of copper ions through recovery of the fluorescence of DNA-templated copper/silver nanoclusters in the presence of mercaptopropionic acid. **Ana. Chem.**, v.82(20), p.8566-8572, 2010.

Szeto, W.; Leung, M.K.; Leung, D.Y. Recent developments of titanium materials for aquatic antifouling application. **Journal of Marine Science and Technology**, v.26, p.301-321, 2020.

Taymeh, B.M.; Esmailbeigi, M.; Shirdel, I.; Joo, H.S.; Johari, S.A.; Banan, A.; Nourani, H.; Mashhadi, H.; Jami, M.J.; Tabarook, M. Perturbation of fatty acid composition, pigments, and growth indices of *Chlorella vulgaris* in response to silver ions and nanoparticles: a new holistic understanding of hidden ecotoxicological aspect of pollutants. **Chemosphere**, v.238, p.124576, 2020.

Thomas, K.V.; Brooks, S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. **Biofouling**, v.26(1), p.73-88, 2010.

Torres, M.; Barros, M.; Sara, C.; Pinto, E.; Rajamani, S.; Sayre, R.; Colepicolo, P. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, p.1–15, 2007.

Tripathi, S.; Poluri, K.M. Heavy metal detoxification mechanisms by microalgae: Insights from transcriptomics analysis. **Environmental Pollution**, v.285, p.117443, 2021.

US-EPA, 2002. EPA-821-R-02-013: Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, p.335.

Vargas-Estrada, L.; Torres-Arellano, S.; Longoria, A.; Arias, D.M.; Okoye, P.U.; Sebastian, P.J. Role of nanoparticles on microalgal cultivation: A review. **Fuel**, v.280, p.118598, 2020.

Vazquez, N.I.; Gonzalez, Z.; Ferrari, B.; Castro, Y. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles by sol-gel as nanocontainer for future drug delivery applications. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v.56(3), p.139-145, 2017.

Wang, Y.; Zhu, X.; Lao, Y.; Lv, X.; Tao, Y.; Huang, B.; Wang, J.; Zhou, J.; Cai, Z. TiO₂ nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornutum*. **Science Total Environmental**, v.565, p.818–826, 2016.

Wilson, W.; Freeburg, L. Toxicity of Metals to Marine Phytoplankton Cultures. **Environmental Research Laboratory**, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, 1980.

Xie, Y.H.; Su, R.G.; Zhang, L.X.; Wang, C.Y.; Wang, X.L. Toxic effects of chloride tributyltin on the predominant phytoplankton species of China coastal sea. **Huan Jing Ke Xue**, v.32, p.2909-2915, 2011.

Xu, X.; Huang, L.; Su, Y.; Yan, Q. The complete genome sequence of *Vibrio aestuarianus* W-40 reveals virulence factor genes. **Microbiology Open**, v.7(3), p.568, 2018.

Xue, B.; He, D.; Gao, S.; Wang, D.; Yokoyama, K., Wang, L. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal of Nanomedicine**, v.11, p.1899-1906, 2016.

Ygit, S.S.; Demirel, K.; Atlar, M. An investigation on the effect of bio-encrustation on the hydrodynamic characteristics of the ship using CFD. **Ocean Engineering**, v.175, p.122-137, 2019.

Yurchenko, A.N.; Girich, E.V.; Yurchenko, E.A. Metabolites of Marine Sediment-Derived Fungi: Actual Trends of Biological Activity Studies. **Marine drugs**, v.19(2), p.88, 2021.

Yusof N.A.A.; Zain N.M.; Pauzi, N. Synthesis of ZnO nanoparticles with chitosan as stabilizing agent and their antibacterial. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.124, p.1132-1136, 2019

Zhang, A.Q.; Leung, K.M.Y.; Kwok, K.W.H.; Bao, V.W.W.; Lam, M.H.W. Toxicities of antifouling biocide Irgarol 1051 and its major degraded product to marine primary producers. **Marine Pollution Bulletin**, v.57, p.575-586, 2008.

8 ANEXO

Tabela 9. Material suplementar com os dados de SiNC, DCOIT e Ag e sua toxicidade para todas as espécies testadas. Concentração inibitória mínima (CIM), concentração biocida mínima (CBM), concentração de efeito não observado (NOEC), concentração de efeito mais baixa observada (LOEC), concentração efetiva mediana (EC₅₀) para espécies expostas a SiNC, DCOIT e Ag. “nd”: não determinado. CBM representa a concentração bactericida / fungicida mínima.

Espécies	SiNC (mg·L ⁻¹)					DCOIT (mg·L ⁻¹)					Ag (mg·L ⁻¹)				
	CIM	CBM	NOEC	LOEC	EC ₅₀	CIM	CBM	NOEC	LOEC	EC ₅₀	CIM	CBM	NOEC	LOEC	EC ₅₀
<i>B. subtilis</i>	10	nd	≤1	10	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	nd	≥1	≤0,1	1	nd
<i>V. aestuarinus</i>	nd	nd	≤10	nd	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	nd	≥1	≤0,1	1	nd
<i>V. parahaemolyticus</i>	nd	nd	≤10	nd	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	nd	≥1	≤0,1	1	nd
<i>P. citrinum</i>	nd	nd	≤10	nd	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	nd	≥1	≤0,1	1	nd
<i>P. clerotigenum</i>	nd	nd	≤10	nd	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	nd	≥1	≤0,1	1	nd
<i>P. citrinum</i>	nd	nd	≤10	nd	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	nd	≥1	≤0,1	1	nd
<i>A. niger</i>	nd	nd	≤10	nd	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	nd	≥1	≤0,1	1	nd
<i>C.minutissima</i>	nd	nd	≤0,5	1	2,24	nd	nd	≤0,01	0,05	0,04	nd	nd	≤0,005	0,01	0,021

Tabela 10. Material suplementar com os dados de SiNC, DCOIT e Ag e sua toxicidade para todas as espécies testadas. Concentração inibitória mínima (CIM), concentração biocida mínima (CBM), concentração de efeito não observado (NOEC), concentração de efeito mais baixa observada (LOEC), concentração efetiva mediana (EC₅₀) para espécies expostas a SiNC, DCOIT e Ag. “nd”: não determinado. CBM representa a concentração bactericida / fungicida mínima.

Espécies	SiNC-DCOIT (mg·L ⁻¹)					SiNC-Ag (mg·L ⁻¹)					SiNC-DCOIT-Ag (mg·L ⁻¹)				
	CIM	CBM	NOEC	LOEC	EC ₅₀	CIM	CBM	NOEC	LOEC	EC ₅₀	CIM	CBM	NOEC	LOEC	EC ₅₀
<i>B. subtilis</i>	nd	≥10	≤1	10	nd	nd	≥10	≤1	10	nd	nd	≥10	≤1	10	nd
<i>V. aestuarinus</i>	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd
<i>P. citrinum</i>	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd
<i>P. clerotigenum</i>	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd
<i>P. citrinum</i>	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd
<i>A. niger</i>	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd	1	≥10	≤0,1	1	nd
<i>C. minutissima</i>	nd	nd	≤0,1	0,5	0,625	nd	nd	≤0,01	0,05	0,582	nd	nd	≤0,01	0,05	0,544