



NOVA

NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

SARA AZEDO VALENTE
Licenciada em Bioquímica

**DES hidrofóbicos à base de mentol e ácidos orgânicos
naturais para utilização em tintas náuticas *antifouling***

MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

Universidade NOVA de Lisboa
novembro, 2021

DES hidrofóbicos à base de mentol e ácidos orgânicos naturais para utilização em tintas náuticas *antifouling*

Copyright © Sara Azedo Valente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória lorem ipsum

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi uma viagem repleta de desafios, dissabores e alegrias, alguns percalços pelo caminho, no entanto todos estes aspetos forem importantes contribuidores para a minha aprendizagem e que me levaram a encontrar o melhor rumo em cada momento desta incrível e enriquecedora caminhada.

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Rita Duarte, por toda a paciência, empenho, disponibilidade e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho. Senti um grande apoio e à-vontade, o que foi fundamental para trilhar este caminho.

Desejo igualmente agradecer à minha coorientadora, Professora Doutora Susana Gaudêncio, por todo o auxílio prestado, bem como, pela partilha de ideias que contribuíram para enriquecer as diversas etapas subjacentes ao trabalho realizado.

Ao professor Doutor Mário Diniz pela sua disponibilidade em realizar parte do meu trabalho experimental no seu laboratório. Agradeço a sua visão crítica e partilha de conhecimentos. O seu apoio foi fundamental para concluir esta etapa com sucesso.

Quero também endereçar os meus agradecimentos à professora Doutora Rita Sobral e Inês Grilo pelo seu auxílio na realização dos ensaios antimicrobianos e antibiofilme e por disponibilizarem o seu laboratório e tempo para a realização dos mesmos.

O meu obrigado à Juliana pela ajuda e generosidade demonstrada no desenvolvimento do meu trabalho laboratorial, e pela forma amiga como que sempre me tratou.

Agradeço a toda a equipa que compõe o grupo DESolve, grupo de investigação da Universidade Nova de Lisboa onde realizei a minha tese, especialmente à Inês Dinis, Filipa Santos e ao Filipe Oliveira, que me acompanharam de perto ao longo deste trabalho e sempre demonstraram disponibilidade e bom grado em me auxiliar.

A este Laboratório de investigação (Grupo DESolve), o qual me forneceu as ferramentas para que todo este trabalho laboratorial fosse possível, agradeço esta oportunidade que me permitiu crescer, tanto a nível pessoal como a nível académico. É fascinante perceber que tive oportunidade de trabalhar neste grupo que desempenha um papel significativo no desenvolvimento de processos mais verdes e sustentáveis e que contribui para a construção de um mundo muito mais feliz e saudável.

Desejo exprimir os meus agradecimentos à empresa Hempel Portugal S.A. pelo apoio com as tintas sem biocida e com biocida utilizadas como controlo.

Este trabalho é financiado por fundos nacionais da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, IP, no âmbito do projeto UIDP/04378/2020 da Unidade de Investigação em Biociências Moleculares Aplicadas - UCIBIO e do projeto LA/P/0140/2020 do Laboratório Associado *Institute for Health and Bioeconomy* - i4HB. FCT/MCTES através dos projetos PTDC/QUIQUI/119116/2010 e PTDC / BIA-MIC / 31645/2017. Este trabalho recebeu também financiamento do *European Union's Horizon 2020 - European Research Council (ERC)* - ao abrigo do acordo de concessão n.º ERC-2016-CoG 725034. Este trabalho também foi apoiado pelo Laboratório Associado de Química Verde (LAQV) que é financiado por fundos nacionais da FCT/MCTES ((UIDB / 50006/2020).

Aos meus colegas de mestrado, os quais foram um grande apoio neste trajeto, pela partilha de conhecimentos e palavras de conforto.

Quero também agradecer à minha mãe, o meu grande pilar, pelo apoio incondicional ao longo deste percurso e pelas suas palavras de conforto e amor.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

*"The task is not so much to see what no one has yet seen;
but to think what nobody has yet thought, about that which everybody sees."
(Arthur Schopenhauer)*

RESUMO

A bioincrustação marinha tem afetado negativamente a indústria náutica e o meio ambiente tem sofrido com esta ação. Até ao momento, não existem soluções sustentáveis, económicas e ambientalmente benignas para lidar com este fenómeno. Os avanços alcançados em solventes verdes promovem o surgimento de solventes eutéticos (DES), que possuem excelentes aplicações em diversos campos e podem ser revolucionários neste sector da indústria náutica. Neste estudo, o principal objetivo foi investigar o potencial de DES hidrofóbicos à base de mentol e ácidos orgânicos naturais para utilização em tintas náuticas *antifouling*. A nossa estratégia resultou na caracterização físico-química de diferentes formulações, o que permitiu identificar a razão molar mais adequada e as interações intermoleculares por trás das formações bem-sucedidas dos DES. A miscibilidade destes DES na tinta náutica foi avaliada e bem-sucedida. O desempenho biológico dos sistemas foi estudado em termos da sua atividade antimicrobiana contra um painel de microrganismos. O sistema Men:OL (1:1) demonstrou ser mais promissor, tendo sido o escolhido nos testes subsequentes. Os seus benefícios em termos de custo-produção também contribuíram para esta escolha. O perfil citotológico deste DES foi avaliado para células HaCat e demonstrou não promover citotoxicidade relevante. Além disso, foi estudada a aplicação do sistema incorporado nas tintas referidas em estruturas náuticas, recorrendo a espécies marinhas para avaliação do seu efeito *antifouling*. O DES foi promissor no combate ao *macrofouling* marinho e potencializou as propriedades das tintas náuticas convencionais, fornecendo indicações sobre a sua utilidade como forte candidato para aplicação em tintas náuticas *antifouling*. Os ensaios bioquímicos realizados nas espécies marinhas demonstraram que o DES não induz *stress* oxidativo nas espécies testadas.

Palavras chave: Bioincrustação marinha, solventes eutéticos, DES hidrofóbicos, mentol, ácidos orgânicos naturais, tintas náuticas *antifouling*.

ABSTRACT

Marine biofouling has negatively affected the nautical industry and the environment has suffered from this action. So far, there are no sustainable, economical and environmentally benign solutions to deal with this phenomenon. The advances achieved in green solvents promote the emergence of eutectic solvents (DES), which have excellent applications in various fields and can be revolutionary in this sector of the nautical industry. In this study, the main objective was to investigate the potential of hydrophobic DES based on menthol and natural organic acids for use in nautical antifouling paints. Our strategy resulted in the physicochemical characterization of different formulations, which allowed us to identify the most suitable molar ratio and the intermolecular interactions behind the successful formations of DES. The miscibility of these DES in nautical paint was evaluated and successful. The biological performance of the systems was studied in terms of their antimicrobial activity against a panel of microorganisms. The Men:OL (1:1) system proved to be more promising, having been chosen in subsequent tests. Its cost-production benefits also contributed to this choice. The cytotoxicological profile of this DES was evaluated for HaCat cells and demonstrated not to promote relevant cytotoxicity. In addition, the application of the system incorporated in the paints mentioned in nautical structures was studied, using marine species to assess their antifouling effect. DES was promising in combating marine macrofouling and enhanced the properties of conventional nautical paints, providing indications about its usefulness as a strong candidate for application in nautical antifouling paints. Biochemical tests carried out on marine species demonstrated that DES does not induce oxidative stress in the species tested.

Keywords: marine biofouling, eutectic solvents, hydrophobic DES, menthol, natural organic acids, nautical antifouling paints.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	IX
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
ÍNDICE	XVII
ÍNDICE DE TABELAS	XXV
LISTA DE ABREVIATURAS	XXVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. BIOFOULING MARINHO	1
1.1.1. Microrganismos incrustantes e os seus mecanismos de adesão	2
1.1.2. Problemática do biofouling na indústria náutica	3
1.1.3. Solução para o fenómeno biofouling	4
1.1.3.1. Tintas antifouling	4
1.1.3.1.1. Primeiros compostos antifouling e as suas problemáticas	5
1.1.3.1.2. Compostos antifouling alternativos e as suas problemáticas	5
1.1.3.1.2.1. Cobre	5
1.1.3.2. Alternativa sustentável - Produtos naturais marinhos antifouling	5
1.1.3.2.1. Metabolitos com propriedades antifouling descritos na literatura	6
1.1.3.2.1.1. Ácidos orgânicos naturais	6
1.1.3.2.1.2. Terpenos.....	6
1.2. BIOTECNOLOGIA	7
1.2.1. Biotecnologia azul.....	7
1.2.1.1. Actinomicetas de origem marinha	7
1.2.1.1.1. Metabolitos produzidos pelas actinomicetas – Napiradiomicinas.....	7
1.3. TECNOLOGIA VERDE.....	8
1.3.1. Solventes verdes	9
1.3.1.1. Solventes ou sistemas eutécticos (DES)	9
1.3.1.2. Solventes ou sistemas eutécticos naturais (NADES)	11
1.3.1.3. DES hidrofóbicos (HDES)	12
1.3.1.3.1. Compostos utilizados na formação de HDES descritos na literatura	12
1.3.1.3.1.1. Terpenos.....	13
1.3.1.3.1.2. Ácidos gordos	14
1.3.1.3.2. Aplicação dos HDES.....	14

1.4.	TOXICIDADE.....	14
1.4.1.	Citotoxicidade	15
1.4.2.	Ecotoxicidade	15
1.4.2.1.	Modelos biológicos	15
1.4.2.1.1.	Mexilhão <i>Mytilus edulis</i>	16
1.4.2.1.2.	Lapa <i>Patella vulgata</i>	16
1.4.2.2.	Biomarcadores do stress oxidativo	16
1.4.2.2.1.	Enzimas do stress oxidativo	17
1.4.2.2.1.1.	Glutathiona-S-transferase (GST).....	17
1.4.2.2.1.2.	Superóxido dismutase (SOD).....	17
1.4.2.2.1.3.	Catalase (CAT).....	18
1.4.2.2.1.4.	Glutathiona peroxidase (GPx)	18
1.4.2.2.2.	Capacidade antioxidante total (TAC).....	18
1.4.2.2.3.	Peroxidação lipídica	18
1.5.	OBJETIVOS	19
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1.	PREPARAÇÃO DOS DES	21
2.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS DES	22
2.2.1.	Microscopia ótica polarizada (POM).....	22
2.2.2.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	22
2.2.3.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR).....	23
2.3.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	23
2.4.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME	23
2.5.	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO SISTEMA EUTÉCTICO	24
2.5.1.	Avaliação da atividade citotxicológica	24
2.5.2.	Avaliação da atividade ecotoxicológica (dose média letal - LD ₅₀).....	25
2.6.	SIMULAÇÃO DA APLICAÇÃO DA TINTA NÁUTICA COM O SISTEMA MEN:OL (1:1) EM POSSÍVEIS ESTRUTURAS DO AMBIENTE MARINHO	25
2.7.	ENSAIOS BIOQUÍMICOS	28
2.7.1.	Tratamento das amostras.....	28
2.7.2.	Ensaio de Bradford	29
2.7.3.	Glutathiona-S-transferase (GST).....	29
2.7.4.	Superóxido dismutase (SOD).....	29
2.7.5.	Catalase (CAT) 540nm.....	30
2.7.6.	Catalase (CAT) 240 nm.....	31
2.7.7.	Glutathiona peroxidase (GPx)	31
2.7.8.	Capacidade antioxidante total (TAC).....	32
2.7.9.	Peroxidação lipídica.....	32
2.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3.	RESULTADOS E DISCUSÃO	35
3.1.	DESIGN DOS DES	35
3.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS DES	36
3.2.1.	Microscopia ótica polarizada (POM).....	36
3.2.2.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	37
3.2.2.1.	RMN unidimensional	37
3.2.2.2.	RMN bidimensional (NOESY)	42
3.2.3.	Espectroscopia FTIR-ATR.....	45
3.3.	MISCIBILIDADE DOS SISTEMAS EUTÉCTICOS DESENVOLVIDOS NA TINTA NÁUTICA.....	49

3.3.1.	Compatibilidade entre o extrato marinho rico em napiradiomicinas e os DES	50
3.3.2.	Incorporação dos DES na tinta náutica e consequente dissolução	50
3.4.	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME	51
3.5.	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO DES	53
3.5.1.	Avaliação da atividade citotóxica (Citotoxicidade)	53
3.5.2.	Avaliação da atividade ecotoxicológica (Ecotoxicidade)	56
3.6.	SIMULAÇÃO DA APLICAÇÃO DA TINTA NÁUTICA COM O SISTEMA MEN:OL (1:1) EM POSSÍVEIS ESTRUTURAS DO AMBIENTE MARINHO	57
3.6.1.	Primeiro ensaio	57
3.6.2.	Segundo ensaio	61
3.7.	ENSAIOS BIOQUÍMICOS EM ORGANISMOS MARINHOS	65
3.7.1.	Determinação de biomarcadores	65
3.7.2.	Ensaio de Bradford	65
3.7.3.	Glutathione-S-transferase (GST)	66
3.7.3.1.	Grupo 1	66
3.7.3.2.	Grupo 2	66
3.7.3.3.	Grupo 3	67
3.7.4.	Superóxido dismutase (SOD)	68
3.7.4.1.	Grupo 1	68
3.7.4.2.	Grupo 2	69
3.7.4.3.	Grupo 3	69
3.7.5.	Catalase	71
3.7.5.1.	Grupo 1	71
3.7.5.2.	Grupo 2	71
3.7.5.3.	Grupo 3	72
3.7.6.	Glutathione peroxidase (GPx)	73
3.7.6.1.	Grupo 1	73
3.7.6.2.	Grupo 2	74
3.7.6.3.	Grupo 3	74
3.7.7.	Capacidade antioxidante total (TAC)	75
3.7.7.1.	Grupo 1	75
3.7.7.2.	Grupo 2	76
3.7.7.3.	Grupo 3	77
3.7.8.	Peroxidação lipídica	78
3.7.8.1.	Grupo 1	78
3.7.8.2.	Grupo 2	78
3.7.8.3.	Grupo 3	79
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	81
	BIBLIOGRAFIA	83
A.	ANEXOS	1

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. BIOFOULING MARINHO. COLONIZAÇÃO DE ORGANISMOS NOS CASCOS DOS NAVIOS ³	1
FIGURA 1.2. ETAPAS DO PROCESSO DE <i>BIOFOULING</i> . COLONIZAÇÃO TEMPORAL DE ORGANISMOS INCRUSTANTES NUMA SUPERFÍCIE DE SUBSTRATO ³	3
FIGURA 1.3. CONSEQUÊNCIAS DO <i>BIOFOULING</i> NA INDÚSTRIA NÁUTICA. COLONIZAÇÃO DO CASCO DO NAVIO POR MICRORGANISMOS INCRUSTANTES, LEVANDO AO AUMENTO DO CONSUMO DE COMBUSTÍVEL ⁸	4
FIGURA 1.4. ESTRUTURAS QUÍMICAS DO ÁCIDO 2-HIDROXIMIRÍSTICO (HMA) (1) E DO ÁCIDO CIS-9-OLEICO (COA) (2). ÁCIDOS ORGÂNICOS NATURAIS COM PROPRIEDADES <i>ANTIFOULING</i> DESCRITOS NA LITERATURA ISOLADOS DE MICRORGANISMOS MARINHOS ²	6
FIGURA 1.5. EXEMPLO DE TERPENO COM ATIVIDADE <i>ANTIFOULING</i> . ESTRUTURA QUÍMICA DO LOBOCOMPACTOL ²	6
FIGURA 1.6. METABOLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR ACTINOMICETAS MARINHAS. ESTRUTURAS DE ISOPRENÓIDES HÍBRIDOS, SENDO AS PARTES A VERMELHO REPRESENTATIVAS DAS PORÇÕES ISOPRENÓIDES DOS RESPECTIVOS COMPOSTOS ²²	8
FIGURA 1.7. DIAGRAMA DE FASES TEÓRICO DE UMA MISTURA EUTÉCTICA BINÁRIA. FORMAÇÃO DO PONTO EUTÉCTICO NUM DIAGRAMA DE FASES DE DOIS COMPONENTES (HBA E HBD), SENDO QUE P.F. CORRESPONDE A PONTO DE FUSÃO ³³	9
FIGURA 1.8. ACEITADORES (HBA) E DADORES (HBD) DE PONTES DE HIDROGÉNIO. ESTRUTURAS QUÍMICAS DE HBA E HBD FREQUENTEMENTE UTILIZADAS NA PREPARAÇÃO DE DES ³⁴	10
FIGURA 1.9. SOLVENTES EUTÉCTICOS NATURAIS. ESTRUTURA QUÍMICA DE DIFERENTES COMPOSTOS COM CAPACIDADE DE FORMAR NADES ²⁶	11
FIGURA 1.10. ESTUDOS RELATIVOS A SOLVENTES EUTÉCTICOS HIDROFÓBICOS (HDES). NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS, AO LONGO DE 2015 E INÍCIO DE FEVEREIRO DE 2021, SOBRE HDES, CONFORME RELATADO NA PÁGINA <i>WEB OF KNOWLEDGE</i> (7 MARÇO DE 2021) ⁴⁰.....	12
FIGURA 2.1. PREPARAÇÃO DOS DES. ILUSTRAÇÃO DOS PASSOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DOS SISTEMAS EUTÉCTICOS, SENDO ESTE EXEMPLO ALUSIVO AO SISTEMA MEN:OL.....	22
FIGURA 2.2. ENSAIO RELATIVO À SIMULAÇÃO DA APLICAÇÃO DA TINTA NÁUTICA COM O SISTEMA MEN:OL (1:1) EM POSSÍVEIS ESTRUTURAS DO AMBIENTE MARINHO (PRIMEIRA PARTE). DISTRIBUIÇÃO E RESPECTIVA IDENTIFICAÇÃO DOS TANQUES (10L DE ÁGUA SALINA SINTÉTICA) COM AS PLACAS CORRESPONDENTES E OS ORGANISMOS MARINHOS EM ESTUDO.....	26
FIGURA 2.3. ENSAIO RELATIVO À SIMULAÇÃO DA APLICAÇÃO DA TINTA NÁUTICA COM O SISTEMA MEN:OL (1:1) EM POSSÍVEIS ESTRUTURAS DO AMBIENTE MARINHO (SEGUNDA PARTE). DISTRIBUIÇÃO E RESPECTIVA IDENTIFICAÇÃO DOS TANQUES (10L DE ÁGUA SALINA SINTÉTICA) COM AS PLACAS CORRESPONDENTES E OS ORGANISMOS MARINHOS EM ESTUDO.....	27
FIGURA 2.4. DETERMINAÇÃO DA DOSE MÉDIA LETAL (LD ₅₀) E POSTERIORES ENSAIOS BIOQUÍMICOS. PROCESSO QUE ENLOBA OS VÁRIOS PASSOS REALIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DA LD ₅₀ NOS MEXILHÕES <i>MYTILUS EDULIS</i> . (A) EXPOSIÇÃO DOS MEXILHÕES AO DES E RESPECTIVA AMOSTRAGEM; (B) TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ENSAIOS BIOQUÍMICOS POSTERIORES.....	28
FIGURA 3.1. SISTEMAS MEN:OL PREPARADOS. ESTUDO DE VÁRIAS RAZÕES MOLARES DO DES: (A) TEMPERATURA AMBIENTE, (B) TEMPERATURA DE, APROXIMADAMENTE, -4°C/-6 °C.....	36

FIGURA 3.2. MICROSCOPIA ÓTICA POLARIZADA. MICROGRAFIAS POM DOS TRÊS SISTEMAS DES ESTUDADOS, OBTIDAS A TEMPERATURA AMBIENTE. (A) MEN:OL (1:1); (B) MEN:HB (2:1) E (C) MEN:HB (3:1).	37
FIGURA 3.3. RMN UNIDIMENSIONAL. ESPECTROS DE ¹ H RMN EM DMSO DEUTERADO DOS COMPOSTOS PUROS - (A) MENTOL, (B) ÁCIDO OLEICO - E SISTEMA EUTÉCTICO POR ELES FORMADO - (C) MEN:OL (1:1).	39
FIGURA 3.4. RMN UNIDIMENSIONAL. ESPECTROS DE ¹ H RMN EM DMSO DEUTERADO DOS COMPOSTOS PUROS - (A) MENTOL, (B) ÁCIDO 3-HIDROXIBUTÍRICO - E DOS SISTEMAS EUTÉCTICOS POR ELES FORMADOS - (C) MEN:HB (2:1), (D) MEN:HB (3:1).	41
FIGURA 3.5. ESPETRO BIDIMENSIONAL. ESPETRO NOESY 2D EM DMSO DEUTERADO DOS VÁRIOS SISTEMAS DES: (A) MEN:OL (1:1), (B) MEN:HB (2:1) E (C) MEN:HB (3:1). OS GRUPOS FUNCIONAIS DOS PROTÕES IDENTIFICADOS ESTÃO ASSINALADOS.	44
FIGURA 3.6. ESPETROSCOPIA FTIR-ATR. (A) ESPETRO DE FTIR-ATR DOS COMPOSTOS ISOLADOS (MEN E HB) E DAS MISTURAS EUTÉCTICAS MEN:HB (NAS PROPORÇÕES 2:1 E 3:1), (B) ESPETRO DE FTIR-ATR DOS COMPOSTOS ISOLADOS (MEN E OL) E DA MISTURA EUTÉCTICA MEN:OL (NA PROPORÇÃO 1:1). NA IMAGEM ENCONTRAM-SE ASSINALADAS AS BANDAS CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS FUNCIONAIS.	46
FIGURA 3.7. ESPETROSCOPIA DE FTIR-ATR. ESPETROS DE FTIR-ATR DO EXTRATO MARINHO E DOS SISTEMAS EUTÉCTICOS COM E SEM INCORPORAÇÃO DO MESMO. (A) SISTEMA MEN:HB (2:1), (B) SISTEMA MEN:HB (3:1) E (C) SISTEMA MEN:OL (1:1).....	49
FIGURA 3.8. INCORPORAÇÃO DO EXTRATO MARINHO NOS DES. DISSOLUÇÃO DO EXTRATO MARINHO (RICO EM NAPIRADIOMICINAS) NOS DES PARA VERIFICAR A EXISTÊNCIA DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS MESMOS.....	50
FIGURA 3.9. ESTUDO DO COMPORTAMENTO DOS DES NA TINTA NÁUTICA. IMAGENS DE MICROSCÓPIO ÓTICO RELATIVAS À INCORPORAÇÃO DOS DES NA TINTA NÁUTICA SEM BIOCIDA.	50
FIGURA 3.10. CITOTOXICIDADE. IMAGEM AO MICROSCÓPIO ÓTICO DA LINHA CELULAR HACAT.	54
FIGURA 3.11. ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR (%) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (MM) DO SISTEMA EUTÉCTICO MEN:OL (1:1). OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS EM RELAÇÃO AO CONTROLO COMO A MÉDIA ± DESVIO PADRÃO DE TRÊS ENSAIOS INDEPENDENTES REALIZADOS EM TRIPLICADO.	55
FIGURA 3.12. APLICAÇÃO DO SISTEMA MEN:OL (1:1) EM TINTA NÁUTICA. ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE <i>FOULING</i> EXERCIDO PELOS ORGANISMOS MARINHOS - DIA 3 (16/07/2021). NA IMAGEM ESTÃO APRESENTADAS AS DUAS PLACAS EM TESTE CORRESPONDENTES AOS RESPECTIVOS TANQUES.....	57
FIGURA 3.13 APLICAÇÃO DO SISTEMA MEN:OL (1:1) EM TINTA NÁUTICA. ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE <i>FOULING</i> EXERCIDO PELOS ANIMAIS - DIA 6 (19/07/2021). NA IMAGEM ESTÃO APRESENTADAS AS DUAS PLACAS EM TESTE CORRESPONDENTES AOS RESPECTIVOS TANQUES.	58
FIGURA 3.14. APLICAÇÃO DO SISTEMA MEN:OL (1:1) EM TINTA NÁUTICA. ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE <i>FOULING</i> EXERCIDO PELOS ANIMAIS - DIA 7 (20/07/2021). NA IMAGEM ESTÃO APRESENTADAS AS DUAS PLACAS EM TESTE CORRESPONDENTES AOS RESPECTIVOS TANQUES.	59
FIGURA 3.15. APLICAÇÃO DO SISTEMA MEN:OL (1:1) EM TINTA NÁUTICA. ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE <i>FOULING</i> EXERCIDO PELOS ANIMAIS - DIA 8 (21/07/2021). NA IMAGEM ESTÃO APRESENTADAS AS DUAS PLACAS EM TESTE CORRESPONDENTES AOS RESPECTIVOS TANQUES.	59
FIGURA 3.16. APLICAÇÃO DO SISTEMA MEN:OL (1:1) EM TINTA NÁUTICA. ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE <i>FOULING</i> EXERCIDO PELOS ANIMAIS - DIA 9 (22/07/2021). NA IMAGEM ESTÃO APRESENTADAS AS DUAS PLACAS EM TESTE CORRESPONDENTES AOS RESPECTIVOS TANQUES.	60
FIGURA 3.17. APLICAÇÃO DO SISTEMA MEN:OL (1:1) EM TINTA NÁUTICA. ESTUDO DE NOVAS CONCENTRAÇÕES DO DES E ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE <i>FOULING</i> EXERCIDO PELOS ANIMAIS - DIA 2 (14/09/2021). NA IMAGEM ESTÃO APRESENTADAS AS DUAS PLACAS EM TESTE CORRESPONDENTES AOS RESPECTIVOS TANQUES.....	62

FIGURA 3.18. APLICAÇÃO DO SISTEMA MEN:OL (1:1) EM TINTA NÁUTICA. ESTUDO DE NOVAS CONCENTRAÇÕES DO DES E ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE <i>FOULING</i> EXERCIDO PELOS ANIMAIS - DIA 7 (21/09/2021). NA IMAGEM ESTÃO APRESENTADAS AS DUAS PLACAS EM TESTE CORRESPONDENTES AOS RESPECTIVOS TANQUES.....	62
FIGURA 3.19. APLICAÇÃO DO SISTEMA MEN:OL (1:1) EM TINTA NÁUTICA. ESTUDO DE NOVAS CONCENTRAÇÕES DO DES E ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE <i>FOULING</i> EXERCIDO PELOS ANIMAIS - DIA 10 (25/09/2021). NA IMAGEM ESTÃO APRESENTADAS AS DUAS PLACAS EM TESTE CORRESPONDENTES AOS RESPECTIVOS TANQUES.....	63
FIGURA 3.20. ATIVIDADE GST (MÉDIA ± DP NMOL/MIN/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA) DO GRUPO 1, NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> , EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SISTEMA MEN:OL (1:1).....	66
FIGURA 3.21. ATIVIDADE GST (MÉDIA ± DP NMOL/MIN/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> , RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 2.....	66
FIGURA 3.22. ATIVIDADE GST (MÉDIA ± DP NMOL/MIN/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 3, NOS MEXILHÕES <i>M.EDULIS</i> (BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS) E LAPAS <i>P. VULGATA</i>	67
FIGURA 3.23. PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO SOD (MÉDIA ± DP) DO GRUPO 1, NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SISTEMA MEN:OL (1:1).....	68
FIGURA 3.24. PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO SOD (MÉDIA ± DP), NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> , RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 2.....	69
FIGURA 3.25. PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO SOD (MÉDIA ± DP), RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 3, NOS MEXILHÕES <i>M.EDULIS</i> (BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS) E LAPAS <i>P. VULGATA</i>	70
FIGURA 3.26. ATIVIDADE DA CATALASE (MÉDIA ± DP NMOL/MIN/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA) DO GRUPO 1, NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> , EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SISTEMA MEN:OL (1:1).....	71
FIGURA 3.27. ATIVIDADE DA CATALASE (MÉDIA ± DP NMOL/MIN/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> , RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 2. AS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS OBTIDAS FORAM REPRESENTADAS POR *.....	72
FIGURA 3.28. ATIVIDADE DA CATALASE (MÉDIA ± DP NMOL/MIN/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 3, NOS MEXILHÕES <i>M.EDULIS</i> (BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS) E LAPAS <i>P. VULGATA</i>	72
FIGURA 3.29. ATIVIDADE GPX (MÉDIA ± DP NMOL/MIN/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA) DO GRUPO 1, NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> , EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SISTEMA MEN:OL (1:1).....	73
FIGURA 3.30. ATIVIDADE GPX (MÉDIA ± DP NMOL/MIN/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> , RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 2. AS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS OBTIDAS FORAM REPRESENTADAS POR *.....	74
FIGURA 3.31. ATIVIDADE GPX (MÉDIA ± DP NMOL/MIN/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 3, NOS MEXILHÕES <i>M.EDULIS</i> (BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS) E LAPAS <i>P. VULGATA</i>	75
FIGURA 3.32. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (MÉDIA ± DP NMOL/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA) DO GRUPO 1, NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SISTEMA MEN:OL (1:1).	76
FIGURA 3.33. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (MÉDIA ± DP NMOL/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> , RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 2. AS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS OBTIDAS FORAM REPRESENTADAS POR *.....	76

FIGURA 3.34. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (MÉDIA \pm DP NMOL/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 3, NOS MEXILHÕES <i>M.EDULIS</i> (BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS) E LAPAS <i>P. VULGATA</i>	77
FIGURA 3.35. CONCENTRAÇÃO MDA (MÉDIA \pm DP PMOL/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA) DO GRUPO 1, NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SISTEMA MEN:OL (1:1).	78
FIGURA 3.36. CONCENTRAÇÃO MDA (MÉDIA \pm DP PMOL/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), NAS BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS DE <i>M.EDULIS</i> , RELATIVA AOS ENSAIOS DO SEGUNDO GRUPO.	79
FIGURA 3.37. CONCENTRAÇÃO MDA (MÉDIA \pm DP PMOL/MG PROTEÍNA CITOSÓLICA), RELATIVA AO ENSAIO DO GRUPO 3, NOS MEXILHÕES <i>M.EDULIS</i> (BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS) E LAPAS <i>P. VULGATA</i>	80

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1. HDES DESCRITOS NA LITERATURA. EXEMPLOS DE COMPOSTOS NEUTROS/NATURAIS E ÁCIDOS GORDOS QUE FUNCIONAM COMO HBA E HBD EM DES HIDROFÓBICOS E RESPECTIVAS RAZÕES MOLARES ESTUDADAS. A NEGRITO E SUBLINHADO ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS OS DES DESENVOLVIDOS NO PRESENTE TRABALHO ³⁴	13
TABELA 2.1. COMPOSTOS INICIAIS DOS SISTEMAS EUTÉCTICOS ESTUDADOS. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS CONSTITUINTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DOS DES.	21
TABELA 2.2. SISTEMAS EUTÉCTICOS ESTUDADOS. IDENTIFICAÇÃO DOS SISTEMAS EUTÉCTICOS PREPARADOS E RESPECTIVAS RAZÕES MOLARES/OBSERVAÇÕES.	22
TABELA 3.1. DETERMINAÇÃO DAS RAZÕES MOLARES DOS DES ESTUDADOS. NÚMERO DE ACEITADORES (HBA) E DADORES (HBD) DE PONTES DE HIDROGÉNIO DOS RESPECTIVOS COMPONENTES INICIAIS DOS DES.	35
TABELA 3.2, VALORES DE MIC PARA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ESTIRPE COL DOS SISTEMAS EUTÉCTICOS E DOS SEUS COMPONENTES INDIVIDUAIS, BEM COMO, DOS SISTEMAS EUTÉCTICOS COM INCORPORAÇÃO DO EXTRATO MARINHO. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS POR FORMULAÇÃO PARA A ESTIRPE MICROBIANA TESTADA.	51
TABELA 3.3. VALORES MIC E ANTIBIOFILME DOS COMPOSTOS INDIVIDUAIS E DES. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS PARA CADA ESTIRPE MICROBIANA TESTADA. NO - NÃO TEM ATIVIDADE ANTIBIOFILME.	52
TABELA 3.4. VALORES DE EC ₅₀ PARA OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE RELATIVOS A DIFERENTES RAZÕES MOLARES DO SISTEMA MEN:OL. OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS EM RELAÇÃO AO CONTROLO COMO A MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (DP).	55
TABELA 3.5. REGISTO DO NÚMERO DE MEXILHÕES E LAPAS NO DECORRER DO PRIMEIRO ENSAIO RELATIVO À INCORPORAÇÃO DO DES NAS TINTAS NÁUTICAS E SIMULAÇÃO DA SUA APLICAÇÃO EM ESTRUTURAS MARINHAS. A DIMINUIÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS DEVEU-SE A FALECIMENTO. M – MEXILHÕES; L – LAPAS. EM CADA TANQUE ESTAVAM PRESENTES 12 MEXILHÕES E 4 LAPAS.	60
TABELA 3.6. REGISTO DO NÚMERO DE MEXILHÕES E LAPAS NO DECORRER DO SEGUNDO ENSAIO RELATIVO À INCORPORAÇÃO DE NOVAS CONCENTRAÇÕES DO DES NAS TINTAS NÁUTICAS E SIMULAÇÃO DA SUA APLICAÇÃO EM ESTRUTURAS MARINHAS. A DIMINUIÇÃO DO NÚMERO DE ORGANISMOS FOI DEVIDA A FALECIMENTO. M – MEXILHÕES; L – LAPAS. EM CADA TANQUE ESTAVAM PRESENTES 9-10 MEXILHÕES E 6-8 LAPAS.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)	<i>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>
BSA	Albumina de soro bovino	<i>Bovine albumine serum</i>
CAT	Catalase	<i>Catalase</i>
cDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno	<i>1-Chloro-2,4-dinitrobenzene</i>
COA	Ácido cis-9-oleico	<i>Cis-9-oleic acid</i>
DES	Solventes eutécticos	<i>Eutetic Solvents</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido	<i>Dimethylsulfoxide</i>
DP	Desvio-padrão	<i>Standard deviation</i>
EC₅₀	Concentração efetiva média	<i>Half maximum effective concentration</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FBS	Soro bovino fetal	<i>Fetal bovine serum</i>
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada	<i>Fourier transform infrared spectroscopy – attenuated total reflectance</i>
GPx	Glutaciona peroxidase	<i>Glutathione peroxidase</i>
GSH	Glutaciona reduzida	<i>Glutathione reduced</i>
GSSG	Glutaciona dissulfeto	<i>Glutathione Disulfide</i>
GST	Glutaciona-S-transferase	<i>Glutathione S-transferase</i>
HaCAT	Linha celular de queratinócitos humanos	<i>Epidermal keratinocyte line</i>
HB	Ácido 3-hidroxi-butírico	<i>3-hydroxybutiric acid</i>
HBA	Aceitador de pontes de hidrogénio	<i>Hydrogen bond acceptor</i>
HBD	Dador de pontes de hidrogénio	<i>Hydrogen bond donor</i>
HDES	Solventes eutécticos hidrofóbicos	<i>Hydrophobic eutectic solvents</i>
His	Isoprenóides híbridos	<i>Hybrid isoprenoids</i>
HMA	Ácido 2-hidroximiriístico	<i>2-hydroxymyristic acid</i>
ISO	Organização Internacional para a padronização	<i>International Organization for Standardization</i>
LD₅₀	Dose média letal	<i>Half maximum lethal dose</i>
LIs	Líquidos iónicos	<i>Ionic liquids</i>
MDA	Malondialdeído	<i>Malondialdehyde</i>
Men	Mentol	<i>Menthol</i>
MIC	Concentração inibitória mínima	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio	<i>(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
NADES	Solventes eutécticos naturais	<i>Natural deep eutectic solvente</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NBT	Nitrozazul de tetrazólio	<i>Nitroblue</i>
NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>

PBS	Tampão fosfato	<i>Phosphate buffer saline</i>
POM	Microscopia de luz polarizada	<i>Polarized optic microscopy</i>
Purpald	4-Amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol	<i>4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole</i>
OL	Ácido oleico	<i>Oleic acid</i>
QAS	Sais de amônio quaternário	<i>Quaternary amonium salt</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear	<i>Nuclear magnetic ressonance</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento	<i>Scanning electron microscopy</i>
SOD	Superóxido dismutase	<i>Superoxide dismutase</i>
TAC	Capacidade antioxidante total	<i>Total antioxidante capacity</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico	<i>Thiobarbituric acid</i>
TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico	<i>Thiobarbituric acid reactive substance</i>
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico	<i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i>
TBT	Tributilestanho	<i>Tributyltin</i>
TSB	Caldo triptona de soja	<i>Tryptone soy broth</i>
XOD	Xantina oxidase	<i>Xantine oxidase</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biofouling marinho

No ambiente marinho, os substratos (naturais e artificiais) são alvo de um indesejado processo, o qual se desencadeia rapidamente e é denominado *biofouling* ou bioincrustação ¹. A bioincrustação marinha é definida como sendo a colonização indesejada na superfície de estruturas submersas por organismos vivos, os quais se vão acumulando por adesão, crescimento e reprodução (Figura 1.1.) ^{2,3}.

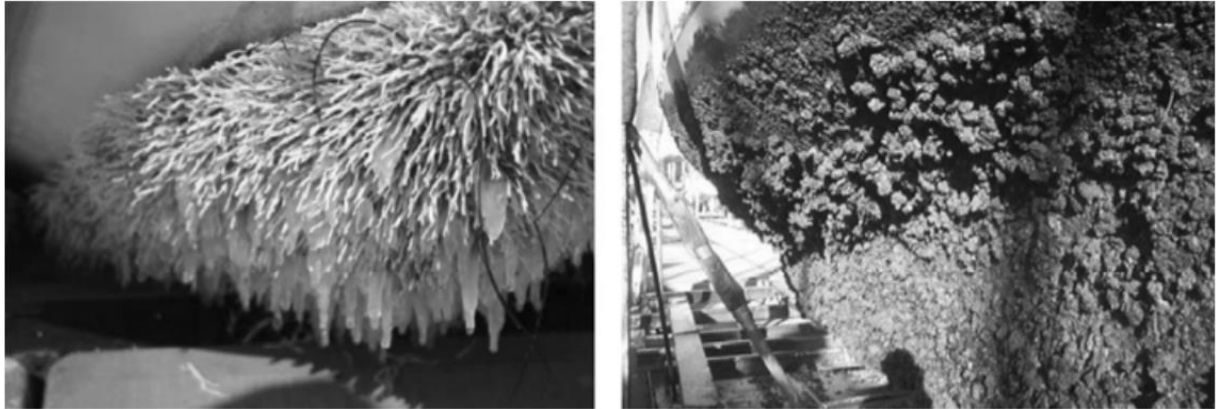


Figura 1.1. Biofouling marinho. Colonização de organismos nos cascos dos navios ³.

Este fenómeno de *biofouling* é um dos problemas mais relevantes que a tecnologia marinha enfrenta atualmente, sendo um processo dinâmico que se inicia imediatamente após o fenómeno de submersão e leva horas ou meses para o seu desenvolvimento ⁴.

1.1.1. Microrganismos incrustantes e os seus mecanismos de adesão

A bioincrustação é formada pela adesão e interação de organismos incrustantes que consistem em microrganismos ou *microfoulers* (ou seja, bactérias e diatomáceas) e macrorganismos ou *macrofoulers* (ou seja, cracas, mexilhões, vermes poliquetas, briozoários e algas marinhas) ⁵.

A formação de *biofouling* é composta por quatro fases distintas:

- i. Formação de um filme, na superfície exposta à água, constituído por materiais orgânicos (como proteínas, polissacáridos e proteoglicanos);
- ii. Fixação de *microfoulers*;
- iii. Formação do biofilme;
- iv. Fixação de *macrofoulers* ⁵.

O processo de *biofouling* pode ser simplificado conforme ilustrado na Figura 1.2. Primeiramente, através de uma reação física simples, uma camada de filme composta por materiais orgânicos (proteínas, polissacáridos e proteoglicanos) é formada na superfície do substrato. Esta etapa é curta (1 minuto) e fornece uma superfície mais aderente, sendo conseqüentemente mais propícia para o crescimento dos microrganismos ³.

O biofilme consiste em substâncias poliméricas extracelulares secretadas por bactérias e diatomáceas, o que conduz à adesão irreversível de bactérias e a uma fixação mais vigorosa de diatomáceas. Além disso, a formação do biofilme estimula a fixação de invertebrados e algas em superfícies marinhas submersas. Portanto, inibir a formação do biofilme bacteriano é de extrema importância para prevenir a formação de *biofouling* ⁵.

Após a formação e o desenvolvimento do biofilme, as larvas ou esporos de *macrofoulers* irão aderir à superfície. Deste modo, após cerca de duas ou três semanas, estes evoluirão para uma comunidade biológica complexa ³.

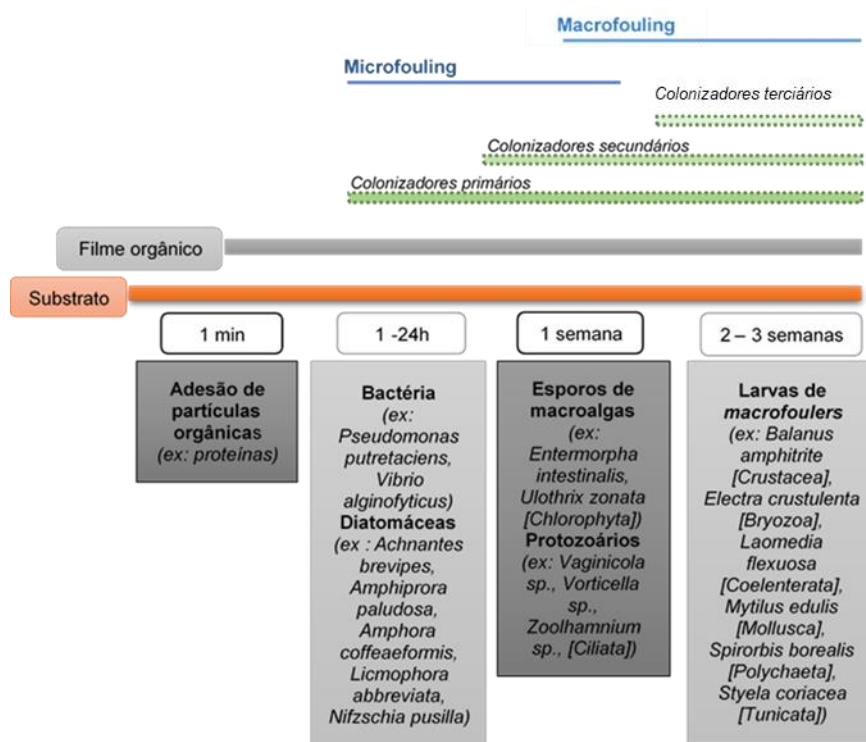


Figura 1.2. Etapas do processo de biofouling. Colonização temporal de organismos incrustantes numa superfície de substrato ³.

1.1.2. Problemática do biofouling na indústria náutica

Os organismos marinhos responsáveis pela colonização indesejada conduzem a impactos negativos em diversos tipos de equipamentos e dispositivos utilizados em navios e estruturas *offshore*, nomeadamente, amplificação da rugosidade da superfície, consumo de combustível, bem como, biocorrosão ⁶.

A formação de uma camada de biofilme tão pequena como 10 µm, no casco dos navios, pode levar a uma diminuição de 1% na eficiência do combustível. Uma vez que o *macrofouling* provoca o aumento da espessura desta camada até vários centímetros, é possível verificar uma redução significativa da eficiência do combustível (Figura 1.3) ⁷.

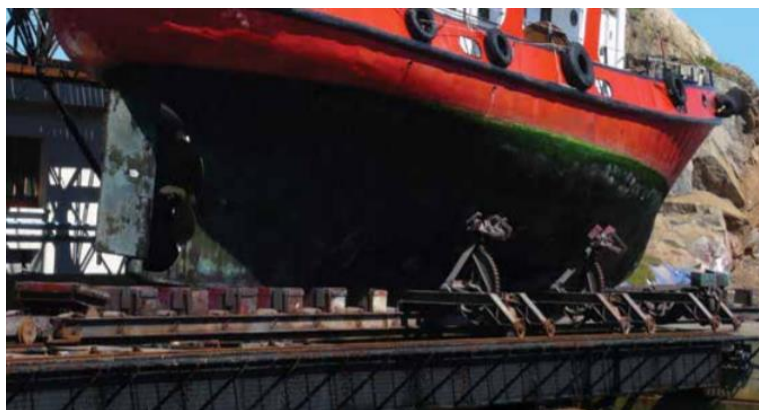


Figura 1.3. Consequências do *biofouling* na indústria náutica. Colonização do casco do navio por microrganismos incrustantes, levando ao aumento do consumo de combustível ⁸.

Deste modo, o aumento da resistência ao arrasto do navio provocado pelo aumento do peso induzido pela acumulação de organismos marinhos no seu casco pode provocar um consumo adicional de combustível até 40% maior, capacidade de manobra reduzida e aumento significativo da emissão de CO₂ e SO₂ e do custo de transporte ^{4,6}.

Por outro lado, a manutenção do casco dos navios torna-se mais cara e demorada, uma vez que as operações de limpeza necessitam ser mais frequentes e longas. Estes processos de limpeza geram, por sua vez, um grande número de substâncias tóxicas que são lançadas no oceano ³.

Uma série de problemas ambientais, como a disseminação de espécies invasoras, também são consequência destes organismos incrustantes, o que leva a desequilíbrios ambientais ².

1.1.3. Solução para o fenómeno *biofouling*

Os navios sofrem, ainda atualmente, com o efeito do crescimento de algas, cracas, entre outros, nos seus cascos devido à ausência de um sistema *antifouling* sustentável universal. O termo *antifouling* refere-se a todos os sistemas que evitam que um organismo se fixe, ou seja, colonize uma superfície ⁹.

Assim, para combater estas adversidades, grandes esforços têm sido feitos para prevenir e/ou reduzir o processo de *biofouling* marinho ⁶.

1.1.3.1. Tintas *antifouling*

O revestimento com tintas *antifouling* contendo compostos *antifouling* é reconhecida como a estratégia mais regularmente utilizada para combater a bioincrustação marinha ². Estima-se que os métodos *antifouling* economizam cerca de 60 bilhões de euros por ano em combustível para a indústria náutica e conduzem a uma redução das emissões de CO₂ e SO₂ de 384 milhões e 3,6 milhões de toneladas por ano, respetivamente ¹⁰.

1.1.3.1.1. Primeiros compostos *antifouling* e as suas problemáticas

Apesar desses benefícios inerentes aos métodos *antifouling*, alguns compostos *antifouling* despertaram muitos problemas ambientais devido à sua toxicidade para organismos não-alvo e, conseqüentemente, levaram à crescente regulamentação do seu uso ². Uma variedade de materiais tóxicos, incluindo chumbo, mercúrio, arsénio, foram utilizados para controlar organismos incrustantes, sendo que na década de 1960 foram introduzidos os organoestânicos, como o tributilestanho (TBT). Estes compostos demonstraram, até então, ser os agentes *antifouling* mais eficazes. No entanto, estavam entre os biocidas mais tóxicos, uma vez que atuavam em organismos alvo e não-alvo e não eram prontamente degradados no ambiente natural. Estes efeitos nefastos levaram a Organização Marítima Internacional a proibir a aplicação destes produtos organoestânicos em navios, desde Setembro de 2008 ¹¹.

1.1.3.1.2. Compostos *antifouling* alternativos e as suas problemáticas

Revestimentos *antifouling* alternativos ao tributilestanho (TBT) que utilizam co-biocidas são Irgarol 1051, piritionato de zinco, Sea Nine 211, cobre, entre outros. No entanto, devido a uma crescente averiguação dos seus impactos no ambiente, existe um interesse e preocupação acrescidos relativamente aos impactos económicos do *biofouling* nos navios e uma procura urgente por novos compostos *antifouling* que não sejam deletérios para o meio ambiente ¹².

1.1.3.1.2.1. Cobre

O cobre é um biocida que tem sido utilizado há mais de 200 anos como um eficiente agente *antifouling*. Uma das vantagens da utilização de tintas baseadas em cobre é o facto de ser um elemento que ocorre naturalmente no ambiente entre 0,03 e 0,23 µg/L (água salgada) e 0,2 e 30 µg/L (água doce). Por outro lado, em pequenas quantidades, o cobre é um micronutriente essencial para os seres vivos. Contudo, nos últimos dez anos surgiram preocupações quanto aos efeitos deste elemento no ambiente marinho. Altos níveis deste metal foram detetados em áreas de intensa operação náutica. Isto se deve, em parte, ao aumento do número de embarcações que adotaram tintas *antifouling*, tendo o cobre como biocida principal, geralmente sob a forma de óxido cuproso (Cu₂O) ou tiocianato de cobre (CuCHNS), em substituição às tintas compostas por TBT ^{13,14}.

1.1.3.2. Alternativa sustentável - Produtos naturais marinhos *antifouling*

Produtos naturais marinhos são uma fonte potencial para a descoberta de compostos *antifouling*, sendo uma excelente alternativa sustentável. Os oceanos possuem uma grande variedade de espécies com capacidades *antifouling*, as quais utilizam diferentes mecanismos para prevenir o *fouling*, como por exemplo, o uso de defesas químicas e físicas ou relações simbióticas entre hospedeiros (por exemplo, algas) e epibiontes (por exemplo, bactérias) ¹⁰.

Com isto, o interesse científico tem recaído na inibição do *biofouling* de forma natural, o que conduziu a uma nova tecnologia *antifouling* focada em produtos naturais marinhos ¹⁰.

1.1.3.2.1. Metabolitos com propriedades *antifouling* descritos na literatura

Na literatura, encontram-se diversos metabolitos *antifouling* isolados de microrganismos marinhos, nomeadamente ácidos orgânicos naturais e terpenos, os quais foram o foco do presente trabalho ².

1.1.3.2.1.1. Ácidos orgânicos naturais

Dois ácidos gordos, ácido 2-hidroxi-11-mirístico (HMA) (1) e ácido cis-9-oleico (COA) (2) (Figure 1.4), foram isolados de um extrato de clorofórmio da bactéria marinha *Shewanella oneidensis* SCH0402. Ambos os compostos inibiram completamente o desenvolvimento dos esporos *Ulva pertusa*. Além disso, esta classe de metabolitos demonstrou ter grande valor na aplicação comercial, uma vez que não se verificou nenhuma ligação de organismos *micro* e *macrofouling* na superfície de painéis tratados com 10% (w/w) de HMA e COA, os quais tinham estado submersos na água do mar durante 1,5 anos ¹⁵.



Figura 1.4. Estruturas químicas do ácido 2-hidroxi-11-mirístico (HMA) (1) e do ácido cis-9-oleico (COA) (2). Ácidos orgânicos naturais com propriedades *antifouling* descritos na literatura isolados de microrganismos marinhos ².

1.1.3.2.1.2. Terpenos

Um diterpeno *antifouling* ativo, lobocompactol (Figura 1.5), foi isolado de uma estirpe de actinomicetas marinhas PK209. Este composto demonstrou atividade *antifouling* significativa contra a macroalga *Ulva pertusa* e a diatomácea *Navicula annexa*. Por outro lado, o lobocompactol também demonstrou um forte poder *antifouling* contra a macroalga *Ulva pertusa* e a diatomácea *Navicula anexa*. Deste modo, é considerado um candidato promissor com atividade *antifouling* e não tóxico ¹⁶.

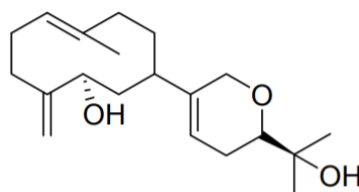


Figura 1.5. Exemplo de terpeno com atividade *antifouling*. Estrutura química do lobocompactol ².

1.2. Biotecnologia

A biotecnologia corresponde à aplicação de conhecimentos e técnicas biológicas no desenvolvimento de produtos e outros benefícios para o ser humano. Desde 1970 que surgiram inúmeras novas tecnologias, tendo sido a biotecnologia a que despertou maior interesse. Desde então, a mesma tem demonstrado capacidade de influenciar todos os importantes setores económicos, incluindo a saúde, agricultura, proteção ambiental e produção de produtos químicos ¹⁷.

1.2.1. Biotecnologia azul

A biotecnologia azul ou marinha é um dos ramos da biotecnologia e refere-se à aplicação industrial, médica ou ambiental de recursos biológicos provenientes do ambiente marinho. Uma vez que o meio ambiente marinho é o habitat com maior diversidade biológica e química do planeta, a biotecnologia marinha tem, nos últimos anos, fornecido um número crescente de importantes produtos terapêuticos, aplicações industriais e ambientais e ferramentas analíticas ¹⁸.

Como visto, o ambiente marinho é a fonte de metabolitos secundários estruturalmente únicos produzidos por diferentes organismos, sendo que vários destes compostos exibem excelentes atividades farmacológicas e *antifouling*. Deste modo, apresentam-se como candidatos aliantes para o desenvolvimento de novos medicamentos e tintas *antifouling* ¹⁹.

1.2.1.1. Actinomicetas de origem marinha

As actinomicetas são consideradas uma fonte extremamente relevante de novos metabolitos biologicamente ativos e têm sido estudadas para este efeito ²⁰. Estes microrganismos são bactérias Gram-positivas pertencentes à Ordem Actinomycetales e são os procariontes mais benéficos a nível económico e biotecnológico, incluindo géneros representativos como *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, entre outros ^{21,22}.

As actinomicetas são alvo de um forte interesse uma vez que produzem, aproximadamente, 45% de todos os metabolitos secundários bioativos microbianos. A espécie *Streptomyces* é responsável pela produção de 7600 desses compostos, o que representa 80% de metabolitos secundários bioativos ²³. Este género *Streptomyces* apresenta um enorme potencial biossintético, não existindo um potencial competidor entre outros grupos microbianos ²¹.

Estes microrganismos são ainda responsáveis por mais de 70% dos antibióticos naturais descobertos ²⁴.

1.2.1.1.1. Metabolitos produzidos pelas actinomicetas – Napiradiomicinas

Outro facto é que as actinomicetas são também conhecidas por produzirem metabolitos secundários da classe terpenóide, que incluem, entre outros, os isoprenóides híbridos (IHs). Apesar de artigos sobre metabolitos secundários de isoprenóides híbridos de actinomicetas serem relativamente raros, os compostos descobertos são significativos em termos de novidade estrutural e atividade

biológica. A Figura 1.6 representa exemplos de importantes metabolitos secundários de IHS que foram isolados de actinomicetas ²². As napiradiomicinas (**3**) são os compostos de interesse neste estudo.

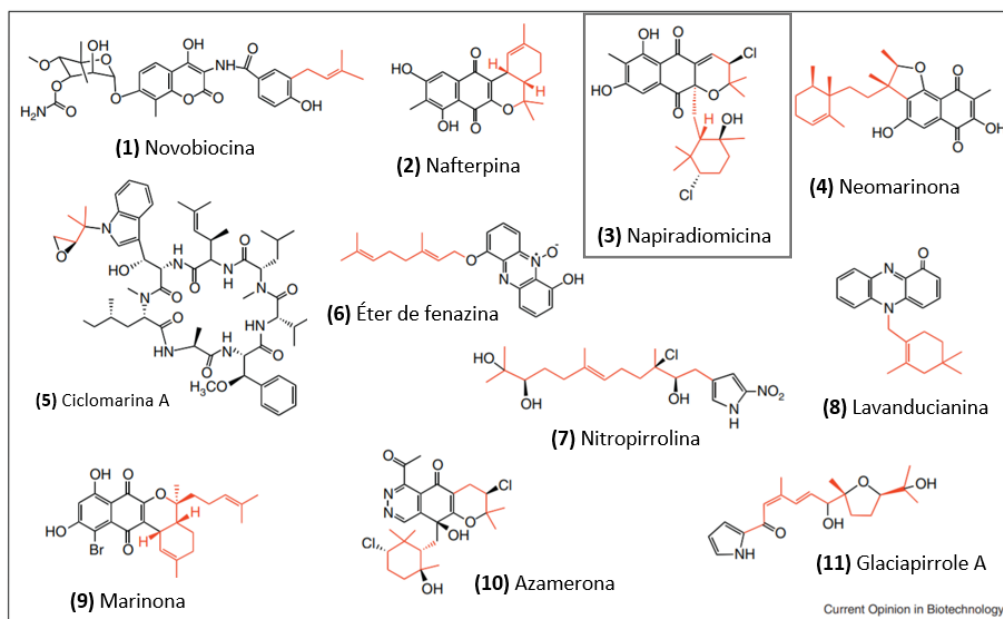


Figura 1.6. Metabolitos secundários produzidos por actinomicetas marinhas. Estruturas de isoprenóides híbridos, sendo as partes a vermelho representativas das porções isoprenóides dos respectivos compostos ²².

Napiradiomicinas são uma classe de isoprenóides híbridos e/ou meroterpenóides, as quais apresentam atividades antibacterianas significativas ^{22,25}.

Este trabalho concentrou-se na bioprospeção de actinomicetas como produtores de inibidores de *biofouling*, nomeadamente napiradiomicinas. As napiradiomicinas relatadas neste trabalho foram isoladas de actinomicetas marinhas, obtidas de sedimentos oceânicos coletados ao largo do Arquipélago da Madeira. Neste estudo, descreveu-se a capacidade das napiradiomicinas, isoladas de *S. aculeolatus*, de inibir espécies de *micro* e *macrofouling*, focando o uso de derivados de napiradiomicinas para o desenvolvimento de potenciais produtos *antifouling* sustentáveis, nomeadamente para tintas e revestimentos marinhos *antifouling*.

O desenvolvimento de solventes baratos e biodegradáveis preparados a partir de recursos naturais seria interessante para promover a dissolução destas substâncias.

1.3. Tecnologia verde

A tecnologia verde atua no desenvolvimento de novos solventes para substituir os solventes orgânicos convencionais que apresentam toxicidade inerente e alta volatilidade, levando à evaporação de compostos orgânicos voláteis para a atmosfera ²⁶. Este aspeto é uma característica fundamental da química verde, pois torna possível contornar as condições adversas atuais existentes em vários processos químicos, como é o caso de processos de separação e extração ²⁷. Neste contexto, os solventes eutéticos têm recebido grande atenção para substituir os atuais solventes orgânicos agressivos ²⁸.

1.3.1. Solventes verdes

1.3.1.1. Solventes ou sistemas eutéticos (DES)

Introduzido por Abbott e colaboradores em 2004, os solventes eutéticos, também designados sistemas eutéticos, foram alvo de um interesse crescente devido às suas propriedades exclusivas e atrativas, tendo surgido como potenciais alternativas aos solventes orgânicos comuns e aos seus análogos líquidos iónicos (LIs) ^{27,29}. Os DES e Lis partilham algumas características promissoras, no entanto os DES cumprem totalmente as métricas da química verde ^{30,31}.

DES são normalmente definidos como uma mistura de dois ou mais compostos, um aceitador de pontes de hidrogénio (HBA) e um dador de pontes de hidrogénio (HBD), que numa razão molar específica apresentam uma redução significativa no ponto de fusão do sistema em comparação com os seus compostos individuais ³². Esta redução no ponto de fusão pode ser atribuída ao estabelecimento de interações de ligações de hidrogénio entre os compostos. Por outro lado, as interações eletrostáticas e as forças de *Van der Waals* também podem desempenhar um papel importante ²⁷. A Figura 1.7 mostra o diagrama de fases teórico para misturas binárias de HBD e HBA ³³.

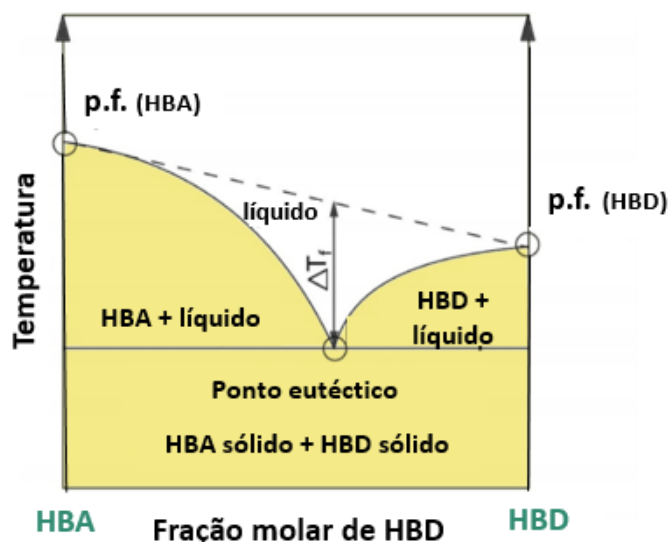


Figura 1.7. Diagrama de fases teórico de uma mistura eutética binária. Formação do ponto eutético num diagrama de fases de dois componentes (HBA e HBD), sendo que p.f. corresponde a ponto de fusão ³³.

Por sua vez, a Figura 1.8 resume as combinações típicas de HBD e HBA utilizadas na síntese de DES, comumente relatadas na literatura ³⁴.

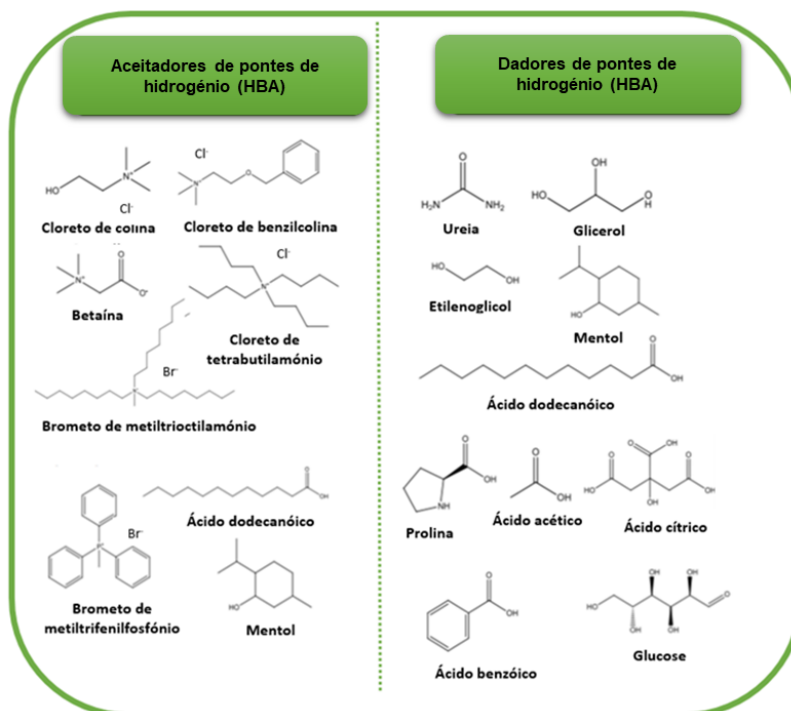


Figura 1.8. Aceitadores (HBA) e dadores (HBD) de pontes de hidrogénio. Estruturas químicas de HBA e HBD frequentemente utilizadas na preparação de DES ³⁴.

O potencial dos DES vai muito além de serem um mero solvente para processos de engenharia química. Estes solventes eutéticos já apresentam inúmeras aplicações nos campos farmacêutico e biomédico, sendo extremamente interessantes, pois a eutecticidade demonstra a capacidade de ajustar a solubilidade e permeação de vários compostos ³².

Uma das características mais notáveis dos DES é o grande número de combinações possíveis, contabilizando possivelmente 10^6 combinações diferentes, o que os transforma em solventes altamente flexíveis e versáteis para diversas aplicações ²⁹. Outra particularidade interessante é que as propriedades biológicas e físico-químicas dos DES também podem ser ajustadas pela natureza dos produtos químicos utilizados para formar um DES, juntamente com uma seleção adequada da razão molar, conteúdo de água e temperatura ²⁷.

Para além destas características, os DES apresentam outras propriedades atrativas, como os seus reduzidos custos de preparação, síntese direta e verde, não necessidade de purificação pós-síntese e descarte ambiental. Não inflamabilidade, ampla faixa de polaridade, baixa volatilidade, natureza dipolar, estabilidade química e térmica, compatibilidade com água, biodegradabilidade e perfis de toxicidade desprezíveis são outros atributos que enaltecem os DES ²⁹.

Todas estas características tornam os DES uma valiosa opção para diversos campos, como em síntese orgânica, processos de separação, biocatálise, nanomateriais, eletroquímica, fabricação de polímeros, captura de CO₂, alimentos, cosméticos, farmacêuticos e aplicações biomédicas ²⁹.

Atualmente, a procura por solventes verdes para uso em processos químicos tem vindo a concentrar-se em compostos de base biológica. Neste contexto, os solventes eutéticos à base de compostos naturais têm despoletado um interesse crescente ³⁵.

1.3.1.2. Solventes ou sistemas eutécticos naturais (NADES)

Em 2011, Verpoorte e colaboradores cunharam o termo “Solventes Eutécticos Naturais”, conhecidos como NADES. Estes solventes/ sistemas são compostos por moléculas de ocorrência natural (açúcares, álcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos e derivados de colina) e representam totalmente os princípios da química verde ³⁶.

A Figura 1.9 apresenta exemplos de diferentes moléculas que podem ser combinadas para produzir solventes eutécticos naturais ²⁶. NADES de diferentes misturas foram preparados no presente trabalho.

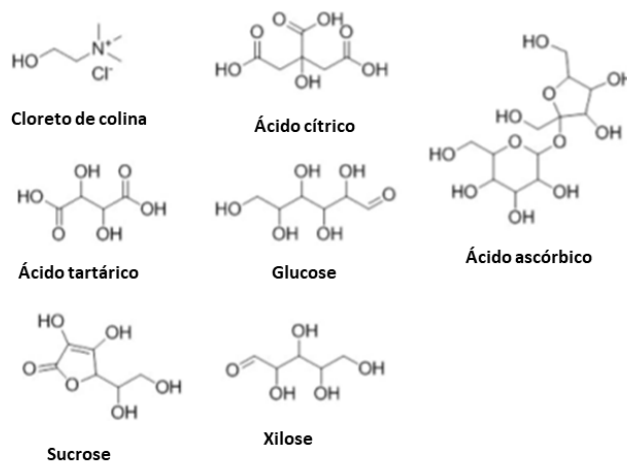


Figura 1.9. Solventes eutécticos naturais. Estrutura química de diferentes compostos com capacidade de formar NADES ²⁶.

Solventes eutécticos naturais contêm componentes que são abundantes na nossa alimentação diária, sendo assim baratos, sustentáveis e seguros. Curiosamente, alguns NADES mostram uma capacidade de solubilização muito alta de compostos não polares e polares, e alguns metabolitos são significativamente mais solúveis em NADES do que em água. Além disso, eles provaram ser capazes de dissolver até macromoléculas ³⁷.

É de salientar que a pesquisa de DES ou NADES focou-se inicialmente em solventes/ sistemas hidrofílicos, uma vez que a maioria dos solventes/ sistemas eutécticos presentes na literatura eram constituídos por materiais tipicamente de natureza hidrofílica de recursos renováveis (açúcares, álcoois, ácidos e alguns sais orgânicos) ³⁴. No entanto, a água tem uma forte capacidade de formar pontes de hidrogénio, o que pode destruir as mesmas entre os componentes que formam o DES, em vários graus. Isto torna os DES hidrofílicos instáveis em soluções aquosas e faz com que não possam ser utilizados em sistemas aquosos, limitando muito as suas aplicações práticas em química analítica. Consequentemente, os analitos de interesse só podem ser extraídos de amostras sólidas e líquidas não aquosas devido à separação de fases dos DES. Deste modo, e uma vez que este facto limita a aplicação destes DES em vários campos, muitos cientistas têm demonstrado grande interesse no desenvolvimento de DES hidrofóbicos ³⁸.

Neste trabalho, dadas as características dos sistemas reportados na literatura, temos como objetivo trabalhar com NADES mais hidrofóbicos e, assim, contribuir para o desenvolvimento e compreensão do comportamento dos mesmos.

1.3.1.3. DES hidrofóbicos (HDES)

Em 2015, o conceito de DES hidrofóbico (HDES) foi introduzido por van Osch e seus colaboradores ao combinarem diversos sais de amônio quaternário (QAS) com ácido decanóico. O solvente imiscível em água foi aplicado para extrair compostos orgânicos voláteis insolúveis em água, tendo relatado alto rendimento e eficiência de extração. A partir de então, aumentou o interesse pela investigação de como os HDES são sintetizados e a sua aplicação em diversas áreas, tal como se pode verificar na Figura 1.10³⁹.

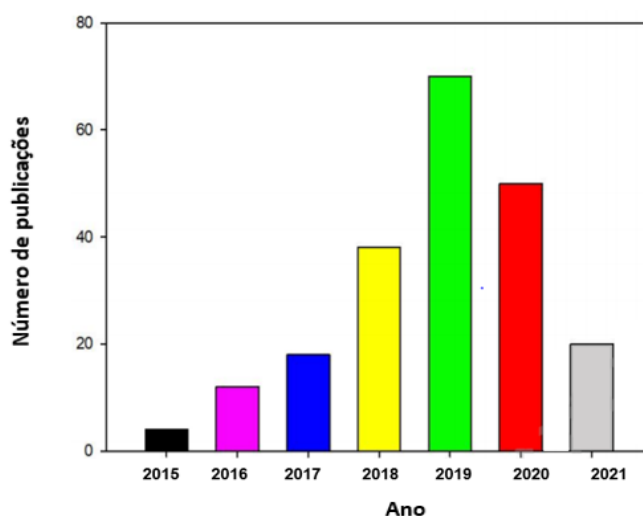


Figura 1.10. Estudos relativos a solventes eutécticos hidrofóbicos (HDES). Número de artigos publicados, ao longo de 2015 e início de fevereiro de 2021, sobre HDES, conforme relatado na página *Web of Knowledge* (7 março de 2021)⁴⁰.

1.3.1.3.1. Compostos utilizados na formação de HDES descritos na literatura

Como o próprio nome indica, os HDES são sintetizados utilizando componentes pouco solúveis em água. Artigos dedicados a DES hidrofóbicos demonstram que estes podem ser obtidos pela combinação de cloreto de colina com compostos fenólicos, mentol com ácidos carboxílicos, sendo também possível obter DES exclusivamente a partir de ácidos carboxílicos⁴¹.

A Tabela 1.1 representa exemplos de diversos sistemas eutécticos hidrofóbicos relatados na literatura, constituídos por componentes neutros/naturais e ácidos gordos, bem como os HDES estudados no presente trabalho (destacados a negrito)³⁴.

Tabela 1.1. HDES descritos na literatura. Exemplos de compostos neutros/naturais e ácidos gordos que funcionam como HBA e HBD em DES hidrofóbicos e respetivas razões molares estudadas. A negrito e sublinhado encontram-se representados os DES desenvolvidos no presente trabalho ³⁴

DES Hidrofóbicos			
	HBA	HBD	Razões molares estudadas (HBA:HBD)
Compostos neutros ou naturais	DL-Mentol	Ácido octanóico	2:1, 1:1, 1:2
		Ácido decanóico	2:1, 1:1, 1:2
		Ácido laurico	2:1, 1:1, 1:2
		Ácido oleico	2:1, 1:1
		Ácido ibuprofeno	2:1
		Ácido 3-hidroxi-butírico	3:1, 2:1
	L(-)-Mentol	Ácido octanóico	Todas as gamas
		Ácido decanóico	
		Ácido laurico	
		Ácido mirístico	
Ácido palmítico			
Timol	Ácido esteárico	Todas as gamas	
	Ácido octanóico		
	Ácido decanóico		
	Ácido laurico		
	Ácido mirístico		
	Ácido palmítico		
	Ácido esteárico		
Lidocaína	2:1		
Cânfora	7:3, 3:2, 1:1		
Ácidos gordos	Ácido Láurico	Ácido octanóico Ácido nonanóico Ácido decanóico	Todas as gamas

1.3.1.3.1.1. Terpenos

Recentemente, os terpenos demonstraram ser promissores na formação de solventes eutécticos ⁴². Dentro destes, o mentol e o timol são monoterpenóides empregues em vários processos industriais e produtos comerciais ⁴³.

O mentol foi um dos compostos escolhidos para a síntese de HDES neste trabalho.

1.3.1.3.1.1.1. Mentol

O mentol apresenta-se como um bom candidato para preparar solventes sustentáveis, baratos e hidrofóbicos. Este composto pode ser extraído das espécies *Mentha*, sendo abundante e de baixo custo (aproximadamente 60 euros/kg). Na literatura, misturas eutécticas contendo mentol têm sido relatadas em diversos campos ⁴⁴.

O primeiro DES hidrofóbico baseado em recursos naturais renováveis foi proposto pelo grupo de Marrucho, tendo combinado DL-mentol com vários ácidos carboxílicos naturais renováveis. O grupo de Coutinho também contribuiu com novos solventes eutécticos hidrofóbicos naturais à base de terpenóides, L(-)-mentol e timol, combinados com diversos ácidos carboxílicos ³⁴.

Na área farmacêutica, este monoterpeneo tem sido utilizado na formação de misturas eutécticas com outros terpenos ou compostos terapêuticos ⁴⁵.

1.3.1.3.1.2. Ácidos gordos

Os ácidos gordos são normalmente extraídos de gorduras vegetais e animais e as suas potenciais propriedades antimicrobianas foram amplamente relatadas, incluindo o seu importante papel na pele humana no que diz respeito à autodesinfecção ²⁹.

O ácido oleico (ácido gordo insaturado) foi um dos compostos utilizados no presente trabalho para a síntese de HDES.

1.3.1.3.2. Aplicação dos HDES

HDES foram aplicados com sucesso na purificação da água, preparação de novos materiais (como por exemplo, géis magnéticos, nanopartículas baseadas em nanotubos de carbono e grafeno) para a remoção de micropoluentes orgânicos, assim como, na remoção de metais da água, captura de CO₂ e extração de compostos bioativos ³³.

Estas aplicações demonstram o potencial dos DES hidrofóbicos na indústria, indicando a sua enorme capacidade como solventes inovadores e sustentáveis.⁴⁶ No entanto, algumas melhorias são ainda necessárias, sendo uma opção o uso de componentes mais naturais, como os terpenos ⁴².

1.4. Toxicidade

Resumidamente, a toxicidade de uma substância química refere-se à sua capacidade de provocar dano num determinado órgão, alterar os processos bioquímicos ou alterar um sistema enzimático ⁴⁷.

Apesar da ampla gama de aplicações dos DES, as alegações sobre a sua baixa nocividade, não toxicidade ou alta biodegradabilidade destes sistemas eutécticos não são inequívocas ⁴⁸. Até agora, a suposição de que os DES são benignos é baseada em dados de toxicidade para os componentes individuais que constituem estes sistemas, que são derivados de biomateriais. No entanto, essa teoria não leva em consideração a possibilidade do efeito sinérgico da combinação dos seus compostos nos DES, o que poderia ter impacto significativo nas propriedades biológicas de tais misturas. Alguns estudos demonstraram que nem todos os DES são altamente biodegradáveis ou não tóxicos e a falta de dados pode ser um problema sério durante as avaliações ambientais. Deste modo, a estimativa do poder verde dos sistemas eutécticos deve ser avaliada de forma proativa antes da sua utilização em larga escala ⁴⁸.

Por este motivo, o presente trabalho focou-se também na toxicidade dos DES estudados, de modo a compreender como estes sistemas se comportam no meio ambiente e o seu consequente impacto na saúde humana.

1.4.1. Citotoxicidade

A citotoxicidade resume-se na capacidade intrínseca de um material em promover alterações metabólicas nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular ⁴⁹.

Sabe-se que os DES apresentam diversas propriedades aliciantes para diferentes aplicações. Nos últimos anos, a tendência tem sido a utilização de matérias-primas de origem natural que podem atuar como solventes em organismos vivos, como lípidos ou água. Isto implica tolerância celular e baixo perfil citotóxico. Desde as primeiras investigações, numerosos estudos (tanto *in vitro* quanto *in vivo*) foram realizados para testar a citotoxicidade dos DES, principalmente em linhas celulares imortalizadas, mas também em outros organismos mais complexos, como ratos ou organismos marinhos ⁵⁰.

A concentração efetiva média (EC_{50}) é uma medida normalmente utilizada na avaliação da atividade citotxicológica. EC_{50} representa a concentração de um composto em que 50% da população exibe uma resposta, após determinada duração de exposição. Quanto mais baixa for EC_{50} , mais tóxico é o composto ⁵¹.

1.4.2. Ecotoxicidade

A ecotoxicologia é considerada uma subdisciplina da Toxicologia ambiental, sendo uma área multidisciplinar que integra Ecotoxicologia e Toxicologia e que estuda os efeitos tóxicos das substâncias nas populações, comunidades e ecossistemas. Esses estudos incluem as vias de entrada e transporte dos agentes em causa e a sua interação com o ambiente ⁵².

A dose média letal (LD_{50}) é uma medida indicativa da taxa de toxicidade de uma substância e muito comumente utilizada na avaliação da atividade ecotoxicológica. LD_{50} refere-se à quantidade de um material, dada de uma só vez e num determinado período de tempo, a qual provoca a morte de 50% de um grupo de animais de teste. Quanto mais baixa for LD_{50} , mais tóxico é o composto ⁵¹.

O estudo de como os DES podem afetar o meio ambiente é também muito relevante, uma vez que o uso generalizado dos sistemas eutéticos e a sua introdução no mercado podem ser uma importante fonte de poluição com consequente impacto nos ecossistemas e, em última instância, em humanos. Assim, o efeito dos DES em meios naturais, juntamente com as cadeias tróficas, devem ser estudados. Os estudos de biodegradabilidade para determinar quanto tempo os DES podem permanecer no meio ambiente também demonstram ser importantes ⁵⁰.

1.4.2.1. Modelos biológicos

Os organismos aquáticos são amplamente utilizados como espécies de teste, uma vez que são mais sensíveis à exposição e à toxicidade comparativamente aos organismos terrestres, incluindo mamíferos. Além de serem fáceis de capturar e apresentarem boa capacidade de filtração, podem fornecer sistemas modelo para avaliação de danos oxidativos relacionados à exposição crónica ou a concentrações subletais, mutagenicidade, entre outros efeitos adversos provocados por substâncias

tóxicas ⁵³. No presente trabalho, enfocamos os biomodelos aquáticos, nomeadamente, mexilhões *Mytilus edulis* e lapas *Patella vulgata*.

1.4.2.1.1. Mexilhão *Mytilus edulis*

Moluscos bivalves, particularmente mexilhões, são rotineiramente utilizados como organismos "sentinelas" em programas de monitorização ambiental no mundo inteiro, uma vez que se encontram amplamente distribuídos. Por outro lado, são sedentários, relativamente tolerantes a uma ampla gama de condições ambientais e possuem um grande poder de filtração, o que faz com que bioconcentrem muitos produtos químicos nos seus tecidos ⁵⁴. O mexilhão *Mytilus edulis* é um dos modelos biológicos mais utilizados para avaliar o efeito de diferentes substâncias ao nível do crescimento, fisiologia e reprodução ⁵⁵.

As brânquias e as glândulas digestivas são os dois principais tecidos dos bivalves envolvidos na desintoxicação dos xenobióticos. As brânquias devido ao seu papel como principal barreira contra a entrada de xenobióticos no organismo e, provavelmente, também como uma primeira linha de destoxificação e eliminação de agentes nocivos ⁵⁶. Por sua vez, o tubo digestivo, tal como as brânquias, é dos locais onde ocorre maior número de mitocôndrias, as quais são as principais responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) ⁵⁷. Por este motivo, foram os órgãos utilizados na realização dos ensaios bioquímicos no presente trabalho.

1.4.2.1.2. Lapa *Patella vulgata*

Os gastrópodes marinhos são capazes de aderir a substratos para manter a sua posição contra forças ambientais (ondas, vento, gravidade) e as lapas são, provavelmente, o grupo de maior sucesso em termos de poder adesivo. A espécie *Patella vulgata* é dotada de uma concha protetora que lhe permite aderir aos rochedos em zonas de forte hidrodinamismo. Este aspeto levou estes organismos a serem também utilizados como modelo biológico no presente trabalho ⁵⁸.

1.4.2.2. Biomarcadores do stress oxidativo

O stress oxidativo é um assunto importante para a toxicologia terrestre e aquática, sendo que os seus biomarcadores moleculares apresentam uma ampla aplicação em mecanismos de toxicidade ambiental em organismos aquáticos expostos a diferentes poluentes químicos ⁵⁹.

As espécies reativas de oxigénio (ROS), como o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radical hidroxilo ($\cdot OH$) são continuamente produzidas em sistemas biológicos como subprodutos tóxicos do metabolismo oxidativo normal, mas podem ser aumentadas por interações com poluentes através de vários mecanismos ⁵⁹.

Em organismos aeróbios, a neutralização, desintoxicação e remoção de ROS são efetuadas por sistemas de defesa antioxidante intracelular, que apresentam a função de interceptar e inativar radicais reativos ⁵³. A defesa antioxidante inclui enzimas antioxidantes específicas - superóxido

dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.1.1.6), glutationa-s-transferase (GST; EC 2.5.1.18) -, assim como, defesas celulares não enzimáticas – nomeadamente, glutationa reduzida (GSH), vitaminas A e E, ascorbato e urato ⁶⁰. O intervalo entre a geração e a neutralização de ROS por mecanismos antioxidantes dentro de um organismo é denominado *stress* oxidativo.

As atividades das enzimas antioxidantes são encontradas amplamente distribuídas nos tecidos dos organismos aquáticos ⁵⁹. Ensaio de enzimas antioxidantes podem indicar o estado antioxidante dos organismos, funcionando como um biomarcador potencial para o *stress* oxidativo mediado por contaminantes ⁵³.

Os sistemas de defesa antioxidante celular podem ser aumentados ou inibidos sob *stress* químico, dependendo da intensidade, duração do *stress* aplicado e da suscetibilidade dos organismos expostos ⁶¹. A exposição a poluentes orgânicos e/ou metais pode induzir aumentos significativos nas enzimas antioxidantes em resposta ao *stress* oxidativo, mas estes são transitórios e variáveis para diferentes espécies aquáticas. Uma indução da defesa antioxidante pode ser considerada uma adaptação dos organismos para prevenir a toxicidade, enquanto uma diminuição sugere um estado precário caracterizado por uma maior suscetibilidade ao *stress* ambiental, resultando em efeitos adversos ⁶¹. A complexidade da poluição em ecossistemas aquáticos fornece uma resposta não específica a um tipo de contaminante, mas os antioxidantes constituem biomarcadores úteis que refletem não apenas uma exposição aos poluentes, mas também a sua toxicidade. Portanto, uma abordagem de múltiplos marcadores pode ser mais relevante do que um único parâmetro antioxidante para a avaliação do estado antioxidante total.

1.4.2.2.1. Enzimas do *stress* oxidativo

1.4.2.2.1.1. Glutaciona-S-transferase (GST)

A glutaciona S-transferases (GST) (EC 2.5.1.18) catalisa a conjugação da glutaciona reduzida (GSH) a numerosos compostos eletrofílicos tóxicos, sendo uma via importante na eliminação de compostos potencialmente citotóxicos ou mutagénicos do corpo. A GST também se pode ligar covalentemente a uma ampla variedade de xenobióticos, conferindo proteção contra o *stress* oxidativo através da sua atividade peroxidase ⁶².

1.4.2.2.1.2. Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) é a enzima antioxidante que catalisa a dismutação do anião superóxido altamente reativo ($O_2^{\bullet-}$) para O_2 e para as espécies menos reativas H_2O_2 , que podem ser posteriormente destruídas através de reações pela ação da catalase ou da GPX (Equação 1) ⁶³.



Equação 1. Reação catalisada pela SOD. Decomposição do radical $O_2^{\bullet-}$ e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio (O_2).

1.4.2.2.1.3. Catalase (CAT)

A catalase (EC 1.11.1.6) pertence à categoria de enzimas conhecidas como oxidorredutases e está envolvida na decomposição do peróxido de hidrogénio (H₂O₂), uma espécie reativa de oxigénio resultante principalmente da quebra do radical anião superóxido (O₂^{·-}), sendo uma das ROS mais prejudiciais. O seu papel é catalisar a conversão de duas moléculas de H₂O₂ em oxigénio molecular e em duas moléculas de água (Equação 2) ⁶⁴.



Equação 2. Reação catalisada pela CAT. Decomposição do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigénio (O₂).

1.4.2.2.1.4. Glutathiona peroxidase (GPx)

A glutathiona peroxidase (GPx) é uma importante enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em água (H₂O) e os peróxidos lipídicos nos seus álcoois correspondentes. Esta enzima desempenha um papel mais crucial na inibição do processo de peroxidação lipídica e, portanto, protege as células do *stress* oxidativo ⁶⁵.

1.4.2.2.2. Capacidade antioxidante total (TAC)

A capacidade antioxidante total é um ensaio realizado para avaliar a resposta antioxidante global de uma amostra biológica ⁶⁶. Os ensaios TAC analisam não apenas a atividade antioxidante enzimática, como também compostos antioxidantes não enzimáticos. ⁶⁷ Assim, mesmo que não fossem detetadas variações nos antioxidantes enzimáticos, um aumento na produção de ROS pelo DES ainda poderia ser avaliado, medindo-se a capacidade antioxidante total.

1.4.2.2.3. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica diz respeito a danos biológicos provocados por radicais livres que são formados durante o *stress* oxidativo, sendo um dos parâmetros mais representativos do dano à membrana biológica. Fosfolípidos presentes na membrana de organismos aeróbicos são altamente vulneráveis à oxidação porque estão continuamente expostos a ROS (por exemplo, [·]OH). O dano à membrana foi estudado medindo o conteúdo de MDA como um indicador da peroxidação lipídica.⁶⁸

1.5. Objetivos

O presente trabalho procura explorar as características inovadoras dos DES hidrofóbicos, desenvolvendo HDES com base em terpenos (mentol) e ácidos orgânicos naturais (ácido oleico e ácido 3-hidroxi-butírico). Com isto, pretende-se estudar a possibilidade de potenciar a compatibilidade das napiradiomicinas com uma tinta náutica, explorando para tal a atividade antimicrobiana dos HDES (e destes sistemas com incorporação das napiradiomicinas), com posterior utilização em tintas *antifouling*. Deste modo, desenvolve-se solventes baratos e biodegradáveis à base de misturas eutécticas que podem ser preparadas a partir de recursos naturais, minimizando simultaneamente um problema que tem afetado em grande escala a indústria náutica (*biofouling*), tendo sempre como foco o bem-estar ambiental e da saúde humana; e, assim, contribuir para um mundo mais verde e saudável.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação dos DES

Primeiramente, foi efetuada a revisão da literatura, na qual se analisaram moléculas com atividade *antifouling*. As moléculas escolhidas foram ácidos orgânicos naturais (nomeadamente ácido oleico e ácido 3-hidroxibutírico) e terpenos (especificamente o mentol). Posteriormente, foi realizada a análise de sistemas eutéticos descritos na literatura, onde já existem vários exemplos reportados, sendo que dois dos nossos sistemas (os quais incluem o mentol e o ácido 3-hidroxibutírico) são sistemas novos, não reportados ainda na literatura.

Os DES foram preparados misturando DL-mentol (W266507, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) com ácido oleico (W281506, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e mentol com ácido 3-hidroxibutírico (166898, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), em diferentes razões molares. A Tabela 2.1. apresenta os compostos químicos usados neste estudo, juntamente com a sua pureza e respetivas características (estrutura química, fórmula molecular e peso molecular), conforme declarado pelos fornecedores. Todos os compostos foram utilizados como recebidos sem purificação adicional.

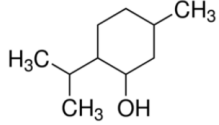
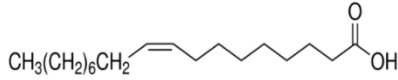
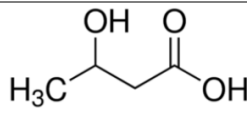
Nome	Número CAS	Pureza/ Descrição do produto	Fórmula química	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)
DL-mentol	89-78-1	≥ 95%		C ₁₀ H ₂₀ O	156,27
Ácido oleico	112-80-1	Natural		C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,46
Ácido 3-hidroxibutírico	300-85-6	95%		C ₄ H ₈ O ₃	104,10

Tabela 2.1. Compostos iniciais dos sistemas eutéticos estudados. Propriedades físico-químicas dos constituintes utilizados na preparação dos DES.

*dados retirados do site *Sigma-Aldrich*.

Os sistemas foram misturados sob agitação constante, a 30 °C. Após 30 minutos, foi obtida uma solução translúcida e os DES foram deixados a arrefecer à temperatura ambiente. Os sistemas eutéticos preparados são apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.2. Sistemas eutéticos estudados. Identificação dos sistemas eutéticos preparados e respectivas razões molares/observações.

Nome	Abreviação	Razão molar	Aspetto a temperatura ambiente
Mentol:ácido oleico	Men:OL	1:1	Líquido translúcido
Mentol:ácido 3-hidroxibutírico	Men:HB	2:1	Líquido translúcido
Mentol:ácido 3-hidroxibutírico	Men:HB	3:1	Líquido translúcido

A Figura 2.1 ilustra a preparação do sistema eutético Men:OL (1:1).



Figura 2.1. Preparação dos DES. Ilustração dos passos envolvidos na formação dos sistemas eutéticos, sendo este exemplo alusivo ao sistema Men:OL.

2.2. Caracterização dos DES

2.2.1. Microscopia ótica polarizada (POM)

A caracterização ótica dos três sistemas DES foi realizada a temperatura ambiente utilizando um modo de transmissão de um microscópio ótico polarizado BX-51 (Olympus, Tóquio, Japão) conectado a uma fonte de luz fria Olympus KL2500 LCD. Uma gota de cada sistema DES foi colocada na respectiva lâmina de vidro de microscópio para observação. As imagens foram obtidas através da câmara equipada (Olympus SC50) e software Olympus Stream Basic 1.9 (Olympus, Tóquio, Japão).

2.2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os ensaios de RMN foram realizados no aparelho Bruker Advance II de 400 MHz. O software Mestrenova 12.0 (Mestrelab Research, Santiago, Espanha) foi utilizado para processamento dos

espectros. Os DES e as respetivas matérias-primas foram dissolvidos em dimetilsulfóxido-d6 (DMSO-d6, 99,9 átomo% D, LOT. STBH4385, Sigma Aldrich), numa concentração de 30 mg/mL.

Todos os ensaios foram realizados quando os sistemas estavam em equilíbrio e nenhuma mudança adicional foi observada nas suas propriedades.

2.2.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

A análise espectroscópica foi realizada no modo de infravermelho com transformada de Fourier utilizando um espectrómetro Thermo Scientific (Class 1 Laser Product Nicolet 6100, San Jose, CA), a operar no modo de reflexão atenuada (ATR). A aquisição dos espectros foi realizada no *software* PerkinElmer Spectrum IR Version 10.6.2. Um espectro de controlo foi registado antes da aquisição e usado como referência. Os espectros finais foram registados a temperatura ambiente e são a média de 32 *scans* individuais obtidos na gama entre 4000 e 400 cm^{-1} . Os espetros de IV dependentes do tempo foram adquiridos transferindo uma quantidade adequada de cada amostra para o cristal ATR e medindo sequencialmente em intervalos de tempo regulares.

2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada pelo Laboratório *MolMicro of Bacterial Pathogens*, UCIBIO@i4HB, da Universidade Nova de Lisboa, liderado pela Prof. Rita G. Sobral.

Foi avaliada para os 3 sistemas DES desenvolvidos e para os mesmos sistemas com o extrato marinho (contendo napiradiomicinas) dissolvido, bem como, para os compostos individuais (mentol, ácido oleico e ácido 3-hidroxi-butírico), através da realização de determinação de concentração mínima inibitória (MIC) contra um painel de microrganismos, nomeadamente *Staphylococcus aureus* estirpe COL, *Staphylococcus aureus* estirpe NCTC8325-4 e *Escherichia coli* estirpe K12 e utilizando o meio Mueller Hinton (DIFCO Laboratories, Detroit, USA).

A determinação da concentração mínima inibitória foi realizada e testada em triplicado, em placas de 96 poços. As diversas amostras foram pesadas e diluídas para uma concentração final de 10 mg/mL em DMSO, tendo sido adicionadas a uma cultura diluída ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.04\text{--}0.06$) a uma concentração final de 2.5% (v/v). Todas as amostras foram diluídas em série, resultando em concentrações finais dos compostos testados que variaram de 2000 a 1,95 $\mu\text{g/mL}$.

Após 18h de incubação a 37 °C, as concentrações inibitórias mínimas (MICs) foram determinadas visualmente e por análise espectrofotométrica. As diversas amostras foram testadas novamente em triplicado para confirmação dos resultados.

2.4. Avaliação da atividade antibiofilme

A atividade antibiofilme foi realizada pelo Laboratório *MolMicro of Bacterial Pathogens*, UCIBIO@i4HB, da Universidade Nova de Lisboa, liderado pela Prof. Rita G. Sobral.

O ensaio foi realizado para o sistema Men:OL com e sem o extrato marinho como, para os compostos individuais (mentol, ácido oleico e extrato marinho). A atividade antibiofilme foi testada em triplicado, em placas de 96 poços. Deste modo, células da estirpe de *S. aureus* NCTC8325-4 foram incubadas a 37 °C, sem agitação (condições estáticas), durante 18 horas, com as amostras a concentrações que variaram de 2 a 0,0156 mg/mL, em TSB + 1% glucose. Após medir a OD_{600 nm}, o meio de cultura com as células planctónicas foi descartado. Após três lavagens com água destilada, as células aderentes foram fixadas, durante 1 hora, a 60 °C e, posteriormente, coradas com cristal violeta 0,06% (p/v) por 10 minutos. O excesso de corante foi removido por lavagem com água destilada e o violeta de cristal foi eluído com ácido acético (30%). A inibição do biofilme foi determinada a partir de medições de OD_{600 nm} de células coradas com cristal violeta. As diversas amostras foram testadas novamente em triplicado para confirmação dos resultados.

2.5. Avaliação da toxicidade do sistema eutético

2.5.1. Avaliação da atividade citotóxica

A avaliação citotóxica foi realizada no Laboratório DESolve, da Universidade Nova de Lisboa, liderado pela Prof. Ana Rita Duarte.

O efeito citotóxico, neste trabalho utilizado como indicador de segurança preliminar, foi avaliado utilizando uma linha de células imortalizada de queratinócitos humanos (HaCat) confluentes e diferenciadas. Estas células representam 80% das células epidérmicas. A linha de células HaCaT (German Cancer Research Center (DKFZ), Alemanha) foi cultivada de acordo com as instruções do fabricante em meio *Eagle modificado* por *Dulbecco* (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS, Corning, EUA) e 1% de uma solução de penicilina-estreptomicina a 1% (PS, Corning, NY, EUA). A cultura de células foi mantida em atmosfera humidificada, a 37 °C e com 5% de CO₂.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com as diretrizes ISO/EN 10993. As células HaCat foram cultivadas em placas de 96 poços, a uma densidade de $4,5 \times 10^4$ células/poço e deixadas crescer por 72 horas. As células foram incubadas com meio de cultura (controlo) e diferentes concentrações de DES diluídas no meio de cultura. Após 24h de exposição aos DES, as células foram lavadas duas vezes com PBS e a viabilidade celular foi avaliada, utilizando um ensaio de viabilidade celular CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, Wi, EUA), contendo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio).

Resumidamente, 100 µL do reagente de viabilidade foram adicionados a cada poço numa diluição de 1:10 e incubados durante 3h. A absorvância foi medida em 490 nm usando um leitor de microplaca (VICTOR Nivo™, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) e a viabilidade celular foi expressa em termos de percentagem de células vivas em relação ao controlo. Três experiências independentes foram realizadas em triplicado. A concentração efetiva média (EC₅₀) foi obtida utilizando linhas de tendência mais bem ajustadas.

2.5.2. Avaliação da atividade ecotoxicológica (dose média letal - LD₅₀)

A avaliação ecotoxicológica foi realizada no Laboratório BioTox, UCIBIO@i4HB, da Universidade Nova de Lisboa, liderado pelo Prof. Mário Diniz.

Os mexilhões *Mytilus edulis* (N=6; 3,45 ± 0,51 cm (comprimento)) foram capturados manualmente de uma região considerada pristina do Guincho (Cascais, Lisboa, Portugal). Os animais foram aclimatados em laboratório, durante pelo menos 96 horas, num tanque (capacidade volumétrica de 200 litros) com arejamento contínuo (> 6 mg/L de oxigénio dissolvido).

Antes da realização dos bioensaios, os mexilhões foram limpos para remover impurezas, areia e algas a eles aderidas. Durante o período de aclimação, permaneceram na mesma água do mar em que foram trazidos e nenhuma alimentação externa foi dada.

Posteriormente, foram realizados dois ensaios distintos. No primeiro ensaio, os mexilhões foram distribuídos aleatoriamente em tanques (volume de água de 10 litros), em sistema de circuito fechado com água salina sintética e arejamento contínuo, mantendo novamente a taxa de oxigénio acima de 6 mg/L. A água salina sintética foi preparada pela dissolução de uma preparação comercial de sais de mistura (Vibrant Sea, Seachem, EUA) em água desionizada, a uma concentração de 31 g/L ± 3 (pH ajustado para 7,9 ± 0,1 e temperatura de 20 ± 1°C).

Os animais foram expostos a sete concentrações diferentes (0 mg/L; 20 mg/L; 37,5 mg/L; 75 mg/L; 150 mg/L; 300 mg/L e 500 mg/L) do sistema eutético Men:OL (1:1). A experiência foi realizada em duplicado durante 96 horas, e os mexilhões foram alimentados, a cada 48 horas, com cerca de 2 mg de alga clorela (Superalimento Shine, Portugal), previamente dissolvida em água salina sintética.

No segundo ensaio (ensaio preliminar), os mexilhões foram expostos a duas condições diferentes: etanol (controlo) e 500 mg/L Men:OL (1:1) dissolvido em etanol. As condições experimentais a que os mexilhões foram expostos foram as mesmas que no ensaio anterior. Neste caso, o etanol (VR11202, Valente & Ribeiro, Santarém, Portugal) foi utilizado para averiguar se haveria melhor dissolução do DES no ambiente aquático.

2.6. Simulação da aplicação da tinta náutica com o sistema Men:OL (1:1) em possíveis estruturas do ambiente marinho

Este ensaio foi dividido em duas partes e envolveu a pintura de placas de vidro, recorrendo a tinta náutica sem biocida com incorporação de diferentes concentrações do sistema eutético Men:OL (1:1). Como controlo foram utilizadas placas de vidro revestidas por tinta com biocida (controlo 1) e placas de vidro revestidas por tinta sem biocida (controlo 2).

A tinta náutica sem biocida (produzida pela empresa Hempel (Palmela, Portugal) e gentilmente fornecida ao laboratório *Blue Biotechnology & Biomedicine*, UCIBIO@i4HB, da Universidade Nova de Lisboa, liderado pela Dra Susana Gaudêncio) foi utilizada como controlo, bem como, para dissolver as diferentes concentrações do DES, devido à ausência de compostos nesta tinta que, por si só, já possuam poder *antifouling*. E, deste modo, entender se o sistema eutético demonstra capacidade de potenciar esta mesma tinta, sem necessidade de recorrer a compostos biocidas *antifouling*. Por sua

vez, a tinta com biocida (cobre) foi utilizada como controlo com o objetivo de comparar os efeitos na biota marinha entre esta tinta do mercado e as tintas com o nosso DES.

De acordo com os resultados dos ensaios antimicrobianos (Tabela 3.3) para o sistema Men:OL (1:1), verificou-se que a concentração de 2 mg/mL é suficiente para inibir o crescimento antimicrobiano. Neste sentido, dissolveram-se 20 mg de DES em 10 mL de tinta náutica, de modo a obter a concentração de 2 mg/mL. No entanto, em termos de aplicação real do produto, a tinta num navio, por exemplo, vai sofrer uma forte força de fricção como consequência do atrito entre a superfície do navio e a água do mar. Portanto, foi necessário testar uma concentração bastante mais elevada e, conforme os resultados obtidos, testar posteriormente uma gama de concentrações entre estes dois valores com o propósito de chegar a uma concentração mais adequada, ou seja, onde se verificasse um efeito *antifouling* eficiente para o processo. Posto isto, a outra concentração a testar foi de 50 mg/mL, tendo-se dissolvido 500 mg de DES em 10 mL de tinta náutica, de modo a obter a concentração anterior. De salientar, que esta concentração foi escolhida de um modo aleatório, como ponto de partida para, posteriormente, encontrar a concentração mais adequada a incorporar na tinta náutica.

Assim sendo, a primeira parte do ensaio recorreu a quatro tanques (10L de água salina sintética) conforme mostrado na Figura 2.2. As concentrações do DES testadas foram 2 mg/mL e 50 mg/mL.



Figura 2.2. Ensaio relativo à simulação da aplicação da tinta náutica com o sistema Men:OL (1:1) em possíveis estruturas do ambiente marinho (primeira parte). Distribuição e respetiva identificação dos tanques (10L de água salina sintética) com as placas correspondentes e os organismos marinhos em estudo.

Resumidamente, na primeira parte do ensaio, as respetivas placas foram distribuídas, em duplicado, pelos 4 tanques com um volume de 10L de água salina sintética e foram repartidos aleatoriamente organismos marinhos, de modo a estudar o efeito *fouling* marinho, nomeadamente, mexilhão *Mytilus edulis* (N=12; $3,84 \pm 0,58$ cm (comprimento)) pela sua forte capacidade filtrante e lapas *Patella vulgata* (N=4; $54,33 \pm 4,5$ mm (comprimento)) pelo seu forte poder de adesão às superfícies.

Posteriormente, na segunda parte do ensaio, foram selecionadas também aleatoriamente concentrações intermédias a estas, nomeadamente, 5 mg/mL, 15 mg/mL e 25 mg/mL do sistema

eutético Men:OL (1:1). Estas concentrações foram também dissolvidas na tinta náutica sem biocida com o propósito de ir ao encontro de uma concentração do DES mais precisa, a qual fosse suficiente para inibir a *fouling*. Com o intuito de haver mais um dado de comparação ao potencial do sistema eutético estudado no presente trabalho, foi introduzida uma nova variável: placas de vidro revestidas com tinta sem biocida e incorporação de um composto denominado ivermectina (34624-00, Fragon Iberica, S.A.U., Barcelona, Espanha). Para tal, foi dissolvida na tinta sem biocida uma quantidade de 130 mg de ivermectina. Este composto foi introduzido ao ensaio devido a ser comumente utilizado para tratar vermes parasitas, sendo conhecido como o único agente *antifouling* comercializado obtido a partir de actinomicetas, tal como as napiradiomicinas presentes no extrato marinho. Em diversos estudos demonstrou ainda ser um substituto promissor para tintas *antifouling* à base de cobre ⁴. É de salientar que, a ivermectina, à semelhança do nosso sistema eutético, é praticamente insolúvel em água. A Figura 2.3 distribuição e a identificação dos respetivos tanques, relativos à segunda parte do ensaio.



Figura 2.3. Ensaio relativo à simulação da aplicação da tinta náutica com o sistema Men:OL (1:1) em possíveis estruturas do ambiente marinho (segunda parte). Distribuição e respetiva identificação dos tanques (10L de água salina sintética) com as placas correspondentes e os organismos marinhos em estudo.

Deste modo, as respetivas placas foram distribuídas, em duplicado, pelos 6 tanques com um volume de 10L de água salina sintética, em duplicado. Foram adicionados igualmente de modo aleatório mexilhões *Mytilus edulis* (N=9-10; $3,86 \pm 0,61$ cm (comprimento)) e lapas *Patella vulgata* (N=6-8; $51,67 \pm 2,87$ mm (comprimento)).

Os tanques encontravam-se em sistema de circuito fechado e arejamento contínuo, mantendo a taxa de oxigénio acima de 6 mg/L. Os mexilhões e lapas foram alimentados, a cada 48 horas, com cerca de 2 mg de alga clorela (Superalimento Shine, Portugal), previamente dissolvida em água salina sintética. Os tanques foram monitorizados quanto ao pH e temperatura, tendo sido registada também a mortalidade cumulativa. No final do período experimental, os organismos marinhos foram

amostrados, pesados e congelados imediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior processamento e análises bioquímicas.

2.7. Ensaios bioquímicos

2.7.1. Tratamento das amostras

Imediatamente antes do início do ensaio de exposição (T0), mexilhões *Mytilus edulis* (N=5) e lapas *Patella vulgata* (N=3); foram amostrados e alguns biomarcadores de *stress* oxidativo analisados. A salinidade e o pH (33 ± 1 e $7,78 \pm 0,18$, respetivamente) foram medidos diariamente e as condições experimentais renovadas a cada 48h. A cada período de amostragem, cinco mexilhões expostos a cada concentração do DES foram sacrificados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. As brânquias e as glândulas digestivas de cada animal foram removidas, pesadas e coletadas separadamente em microtubos (1,5 mL). Os órgãos foram homogeneizados com o auxílio de um *Tissue Homogenizer* (Tissue Master 125, Omni, Kennesaw, GA, USA) em 2 mL de tampão fosfato (PBS; “Common Buffers, Media, and Stock Solutions,” 2000), armazenado no frio, a pH $7,4 \pm 0,2$.

As amostras homogeneizadas foram centrifugadas durante 10 minutos, a $15000\times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (VWR, modelo CT 15RE da Hitachi Koki Co., Ltd., Tóquio, Japão). Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até análises posteriores. Todos os resultados dos ensaios bioquímicos foram normalizados para a massa total de proteína citosólica determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

A Figura 2.4 representa um esquema do processo realizado desde o ponto 2.5.2 (determinação de LD_{50}) relativo aos mexilhões *Mytilus edulis*, onde estes organismos foram expostos ao DES, amostrados, pesados e congelados (a), sendo posteriormente sujeitos a tratamento para os ensaios bioquímicos (b).

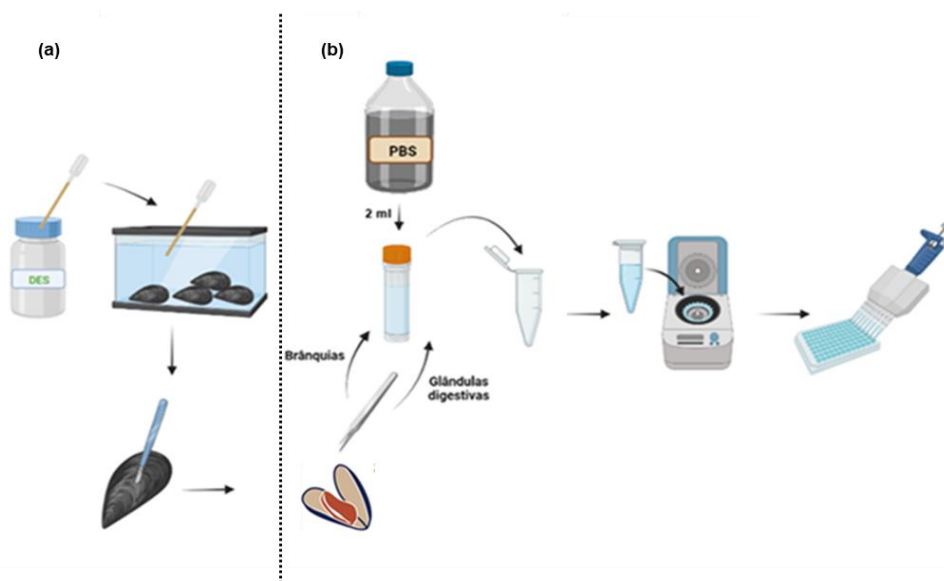


Figura 2.4. Representação do processo que engloba os vários passos realizados para a determinação da LD_{50} nos mexilhões *Mytilus edulis* e posteriores ensaios bioquímicos. (a) exposição dos mexilhões ao DES e respetiva amostragem; (b) tratamento das amostras para ensaios bioquímicos posteriores.

2.7.2. Ensaio de Bradford

A concentração de proteína total das amostras foi determinada seguindo o método de Bradford⁷⁰. Os padrões foram preparados a partir de uma solução stock (4 mg/mL) de BSA (Bovine Serum Albumin; Nzytech, Portugal) para construir uma curva de calibração. Os padrões foram preparados por diluição seriada da solução stock com PBS, numa gama que variou entre 0 e 4 mg/mL. Posteriormente, 20 µL do padrão BSA ou amostra e 180 µL do reagente de Bradford foram adicionados a uma microplaca de 96 poços (Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemanha). Tanto os padrões quanto as amostras foram analisados em duplicado. A absorvância foi lida a 595 nm, usando um leitor de microplacas (Synergy HTX, BioTek, EUA). Uma curva de calibração (0 a 4 mg/mL BSA) foi construída para estimar a concentração de proteína das amostras por regressão linear. A concentração de proteína das amostras (mg/mL) foi utilizada para normalizar os resultados obtidos nos seguintes ensaios toxicológicos.

2.7.3. Glutathione-S-transferase (GST)

A atividade da glutathione-S-transferase (EC 2.5.1.18) foi determinada de acordo com o método descrito por Habig et al.⁷¹, adaptado para microplacas. Todos os produtos químicos foram adquiridos à Sigma-Aldrich (EUA).

Este método é baseado no aumento da absorção a 340 nm, que segue a formação de um conjugado entre a glutathione (GSH) e o 1-cloro2,4-dinitrobenzeno (cDNB). Para realizar este ensaio, uma mistura de substrato foi preparada misturando glutathione reduzida (GSH) 200mM, cDNB 100mM e tampão fosfato (PBS). Em seguida, 180 µL desta solução foram adicionados a 20 µL de GST de amostra em cada poço de uma microplaca de 96 poços (Greiner Bio-one, Áustria). A atividade enzimática foi determinada registando-se a absorvância a 340 nm a cada minuto, durante 6 minutos, utilizando-se para tal um leitor de microplacas (Synergy HTX, BioTek, EUA). O aumento da absorvância por minuto foi estimada e a taxa de reação foi calculada usando um coeficiente de extinção cDNB de 0,0053 µM⁻¹. Os resultados foram expressos em relação à concentração de proteína citosólica da amostra (nmol/min/mg proteína citosólica). A Equação 3 representa a fórmula para calcular a atividade da GST.

$$\text{Atividade da GST (nmol/min/mL)} = \frac{(\Delta A_{340}) / \text{min} \times V_{\text{total}}(\text{mL}) \times \text{diluição}}{\epsilon_{\text{cDNB } 340 \text{ nm}} \times V_{\text{amostra}}(\text{mL})} \quad \text{(Equação 3)}$$

Equação 3. Cálculo da atividade da glutathione-S-transferase (GST).

2.7.4. Superóxido dismutase (SOD)

A determinação do superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) seguiu o método de redução do tetrazólio nitroazul (NBT), adaptado de Sun et al. (1988)⁷². Neste método, radicais superóxido (O₂^{•-}) são gerados

pela reação da xantina com a xantina-oxidase (XOD) e o NBT é reduzido a formazano, que pode ser avaliado espectrofotometricamente a 560 nm. A SOD compete com o NBT pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$, inibindo a sua redução. O nível de inibição é usado como uma medida da atividade da SOD. A SOD de eritrócitos bovinos (Sigma Aldrich, Alemanha) foi utilizada como padrão e controlo positivo. O ensaio foi realizado com recurso a uma microplaca de 96 poços (Greiner Bio-one, Áustria), adicionando a cada poço 200 μ L de tampão fosfato 50 mM (pH 8,0), 10 μ L de xantina 3mM (Sigma-Aldrich, Alemanha), 10 μ L de NBT 0,075 mM (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 10 μ L de EDTA 3mM (Riedel-Haen, Alemanha), 10 μ L de xantina 3 mM (Sigma-Aldrich, Alemanha), 10 μ L de NBT 0,75 mM (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 10 μ L de padrão ou amostra SOD. A reação foi iniciada com a adição de 10 μ L de XOD (Sigma-Aldrich, Alemanha) e a absorvância a 536 nm foi registada a cada dois minutos, num total de 26 minutos, utilizando um leitor de placas (Synergy HTX, BioTek, Winooski, VT, US). Os controlos negativos incluíram todos os componentes exceto SOD ou a amostra, produzindo um pico máximo na absorvância a 536 nm, o que permitiu determinar a percentagem de inibição por minuto provocada pela atividade da SOD (Equação 4). Os resultados são expressos como % de inibição.

$$\% \text{ inibição SOD} = \frac{(\Delta A_{550}) / \min_{\text{controlo negativo}} - (\Delta A_{550}) / \min_{\text{amostra}}}{(\Delta A_{550}) / \min_{\text{controlo negativo}}} \quad \text{(Equação 4)}$$

Equação 4. Cálculo da % de inibição da superóxido dismutase (SOD).

2.7.5. Catalase (CAT) 540nm

A atividade da catalase (EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com um método espectrofotométrico adaptado de Johansson & Håkan Borg (1988) ⁷³. Resumidamente, foram adicionados 20 μ L de amostra, 100 μ L de tampão (fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0) e 30 μ L de metanol (Scharlau, Espanha) a cada poço da microplaca. Para iniciar a reação, foram adicionados 20 μ L de peróxido de hidrogénio 0,035 M (30%; Sigma Aldrich, Alemanha) a cada poço da microplaca; e agitados por 20 minutos utilizando um agitador. Posteriormente, 30 μ L de hidróxido de potássio 10M (Chem-Lab, Bélgica) e 30 μ L de purpald (34,2M em HCl 0,5M; Aldrich, Alemanha) foram adicionados e colocados em incubação durante 10 minutos antes de prosseguir. Em seguida, foram adicionados aos poços da microplaca 10 μ L de periodato de potássio 65,2 mM (Chem-Lab, Bélgica). Após cinco minutos de incubação, a absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplaca (Synergy HTX, BioTek, Winooski, VT, US). A concentração de formaldeído nas amostras foi determinada com base numa curva de calibração variando de 0 a 75 μ M (Sigma-Aldrich, Alemanha). A atividade da catalase foi calculada com base em equivalentes de formaldeído (Equação 5). Os resultados são expressos em relação à massa proteica total da amostra (nmol/min/mg proteína citosólica).

$$\text{Atividade da CAT (nmol/min/mL)} = \frac{(\Delta A_{540}) / \min \times V_{\text{total}}(\text{mL}) \times \text{diluição}}{\epsilon_{H_2O_2 \ 540 \text{ nm}} \times V_{\text{amostra}}(\text{mL})} \quad \text{(Equação 5)}$$

Equação 5. Cálculo da atividade da catalase (CAT) 540 nm.

2.7.6. Catalase (CAT) 240 nm

A atividade da catalase (EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Beers & Sizer (1952) ⁷⁴ e adaptado para microplacas de 96 poços (UV-Star, Greiner-bio-one, Alemanha). No ensaio, foi medida a taxa de redução da absorvância a 240 nm devido ao consumo de H₂O₂ pela catalase. Resumidamente, uma solução de substrato de peróxido de hidrogénio [0,036% m/m] foi preparada em tampão de fosfato de potássio 50 mM (KH₂PO₄; pH 7,0 a 25 °C) (Sigma-Aldrich). Posteriormente, 7 µL de amostra seguidos de 193 µL da solução de substrato foram adicionados a cada poço da microplaca. A absorvância foi lida a 240 nm num leitor de microplaca (Synergy HTX, BioTek, USA) a cada 13 segundos durante cerca de 3 minutos. A atividade da CAT foi determinada conforme demonstrado na Equação 6, medindo-se a absorvância por minuto ((ΔA₂₄₀)/min) e utilizando-se o coeficiente de extensão molar de H₂O₂ de 0,04 µM⁻¹. A atividade da catalase foi expressa, após normalização como nmol/min/mg proteína citosólica de proteína citosólica.

$$\text{Atividade da CAT (nmol/min/mL)} = \frac{(\Delta A_{240}) / \text{min} \times V_{\text{total}}(\text{mL}) \times \text{diluição}}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 240 nm}} \times V_{\text{amostra}}(\text{mL})} \quad \text{(Equação 6)}$$

Equação 6. Cálculo da atividade da catalase (CAT) 240 nm.

2.7.7. Glutathiona peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.9) seguiu o método de Lawrence & Burk, (1976) ⁷⁵ adaptado para uma microplaca de 96 poços. Resumidamente, 20 µL de cada amostra foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços (Greiner Bio-one, Áustria). Em seguida, 120 µL do tampão de ensaio (tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4, Sigma-Aldrich, Alemanha), EDTA 5 mM (Riedel-Haen, Alemanha)) e 50 µL de mistura de co-substrato foram adicionados aos poços da microplaca. A mistura de co-substrato é composta de azida de sódio 4 mM (Sigma Aldrich, Alemanha), fosfato do dinucleótideo adenina nicotinamida 1 mM (NADPH, Sigma Aldrich, Alemanha), 4 U/mL de glutathiona redutase (GSSG-redutase, Sigma, Alemanha) e glutathiona reduzida 4 mM (GSH, Sigma-Aldrich, Alemanha). A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de hidroperóxido de cumeno 15 mM (Sigma-Aldrich, Alemanha) e a absorvância foi lida a 340 nm a cada minuto, num total de 6 minutos, utilizando um leitor de microplaca (Synergy HTX, BioTek, Winooski, VT, US). A diminuição da absorvância por minuto (ΔA₃₄₀) foi determinada e a taxa de reação foi calculada utilizando o coeficiente de extinção β-NADPH (3,73 mM⁻¹). Os resultados foram expressos em relação ao teor de proteína citosólica das amostras, em nmol/min/mg proteína citosólica. A Equação 7 representa a fórmula para calcular a atividade da GPx.

$$\text{Atividade da GPx (nmol/min/mL)} = \frac{(\Delta A_{340}) / \text{min} \times V_{\text{total}}(\text{mL}) \times \text{diluição}}{\epsilon_{\beta\text{-NADPH 340 nm}} \times V_{\text{amostra}}(\text{mL})} \quad \text{(Equação 7)}$$

Equação 7. Cálculo da atividade da glutathiona peroxidase (GPx).

2.7.8. Capacidade antioxidante total (TAC)

A capacidade antioxidante total (TAC) das amostras foi determinada seguindo o método de Kambayashi et al., 2009 ⁷⁶. É baseado na absorvância de ABTS [2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] [67], um cromóforo azul esverdeado que diminui a sua intensidade na presença de antioxidantes. A capacidade dos antioxidantes de prevenir a oxidação do ABTS é comparada com a do Trolox, um análogo.

Resumidamente, 10 µL da amostra foram adicionados a uma microplaca de 96 poços (Greiner Bio-one, Áustria) em triplicado. Posteriormente, 10µL de mioglobina 90 µM preparada em tampão fosfato também foram adicionados, seguidos por 150 µL de ABTS 600 µM preparado em água ultrafiltrada. Finalmente, um volume de 40µL de peróxido de hidrogénio diluído para uma concentração final de 250 µM foi adicionado para iniciar a reação. A microplaca foi levemente agitada e lida ao fim de 5 minutos, utilizando um leitor de microplaca (Synergy HTX, BioTek, Winooski, VT, USA) a 410 nm. Os resultados foram interpolados para uma curva padrão Trolox construída com uma faixa de concentrações de 0 a 0,33 mM. A concentração de antioxidantes de cada amostra foi calculada e expressa em relação à concentração de proteína citosólica da amostra (nmol/mg proteína citosólica).

2.7.9. Peroxidação lipídica

O ensaio da peroxidação lipídica foi adaptado do protocolo da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico - *Thiobarbituric Acid Reactive Species* (TBARS) ⁷⁷. O método TBARS é baseado na reação do malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que produz um composto que é absorvido a 530 nm.

Para realizar este ensaio, microtubos (1,5mL) foram usados para preparar cada padrão ou amostra. Resumidamente, 5 µL de cada amostra foram adicionados a microtubos seguido por 45 µL de tampão de fosfato de sódio monobásico 50 mM. Em seguida, 12,5 µL de SDS 8,1% (Sigma-Aldrich, Alemanha), 93,5 µL de ácido tricloroacético (Panreac, Espanha) (20%) e 93,5 µL de ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich, Alemanha) (1%) foram adicionados a cada microtubo. Os microtubos foram vortexados e, posteriormente, as tampas foram perfuradas com auxílio de uma agulha. A seguir, as amostras e os padrões foram incubados em água em ebulição (10 minutos, a 100 °C). Imediatamente após este tempo, foram colocados em gelo por alguns minutos para arrefecimento. Posteriormente, 62,5 µL de água ultrapura de grau MiliQ foram adicionados a cada microtubo. Os microtubos foram novamente vortexados. Triplicados de 150 µL de cada microtubo foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços (Greiner Bio-one, Áustria) e a absorvância foi lida a 530 nm utilizando um leitor de microplaca (Synergy HTX, BioTek, Winooski, VT, US). Para quantificar os peróxidos lipídicos, foi construída uma curva de calibração com solução de MDA em água ultrapura MiliQ dentro de um intervalo de 0 a 0,1 µM. Os resultados foram expressos em relação à quantidade total de proteína da amostra (pmol/mg proteína citosólica).

2.8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do *Graph PadPrism 8* (*Graph Pad Software Inc.*, San Diego, CA, USA) versão 8.0. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. As comparações estatísticas foram analisadas por *one-way* ANOVA (no caso de testes paramétricos) ou pelo teste *Kruskal-Wallis* (no caso de testes não-paramétricos), seguidos do teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*, dependendo do cumprimento dos pressupostos estatísticos (n amostral normalidade e da homogeneidade das variâncias). Foi considerado um nível de significância $p < 0,05$.

3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Design dos DES

O *design* dos DES ainda é um processo por tentativa e erro devido, sobretudo, à falta de conhecimento sobre as interações estabelecidas entre os compostos que compõem os DES ³² e, portanto, é necessário realizar a simulação das razões molares. Como referido anteriormente, os DES são compostos por um dador de pontes de hidrogénio (HBD) e um aceitador de pontes de hidrogénio (HBA). No entanto, apesar de nem sempre ser conhecido qual dos compostos do DES corresponde ao HBD e ao HBA, é possível conhecer quantos hidrogénios é que cada composto pode aceitar e quantos pode doar.

A Tabela 3.1 fornece os HBD e HBA de cada um dos compostos utilizados na síntese dos DES.

Tabela 3.1. Determinação das razões molares dos DES estudados. Número de aceitadores (HBA) e dadores (HBD) de pontes de hidrogénio dos respetivos componentes iniciais dos DES.

Composto	HBD	HBA
Mentol	1	1
Ácido oleico	1	2
Ácido 3-hidroxibutírico	2	3

*dados retirados do *site Pubchem*.

Utilizando o exemplo do sistema Men:OL, se for considerado que o mentol funciona como dador de hidrogénio e o ácido oleico como aceitador, os mesmos podem formar um DES na proporção 2:1. Isto porque o ácido oleico pode aceitar dois protões e, por outro lado, o mentol encontra-se disponível para doar um protão. Portanto, neste caso, são necessárias 2 moléculas de mentol para uma molécula de ácido oleico.

Por sua vez, se o mentol funcionar como aceitador e o ácido oleico como dador, o DES formado deverá estar na proporção de 1:1, uma vez que o ácido oleico pode doar um protão e o mentol pode aceitar um protão. Neste estudo, o mentol foi considerado como aceitador nos DES produzidos. A razão molar dos restantes DES foi calculada pelo mesmo sistema.

Ainda relativamente ao sistema Men:OL, foram testadas várias razões molares. Tal como é possível observar através da Figura 3.1, todas as amostras aparentaram ser líquidas e translúcidas à

temperatura ambiente. No entanto, quando colocadas no frio (aproximadamente - 4/- 6 °C), um grande número de amostras apresentou precipitados, tendo estas sido excluídas. Portanto, os sistemas que poderiam ser escolhidos eram os sistemas que apresentavam as razões molares 1:1, 2:1 e 3:1, onde nenhum cristal foi detetado e um líquido completamente translúcido foi obtido com sucesso. A fase líquida é uma forte indicação da existência de interações intermoleculares entre os compostos que formam os DES ^{78,79}. Neste estudo, optou-se pelo sistema Men:OL (1:1).

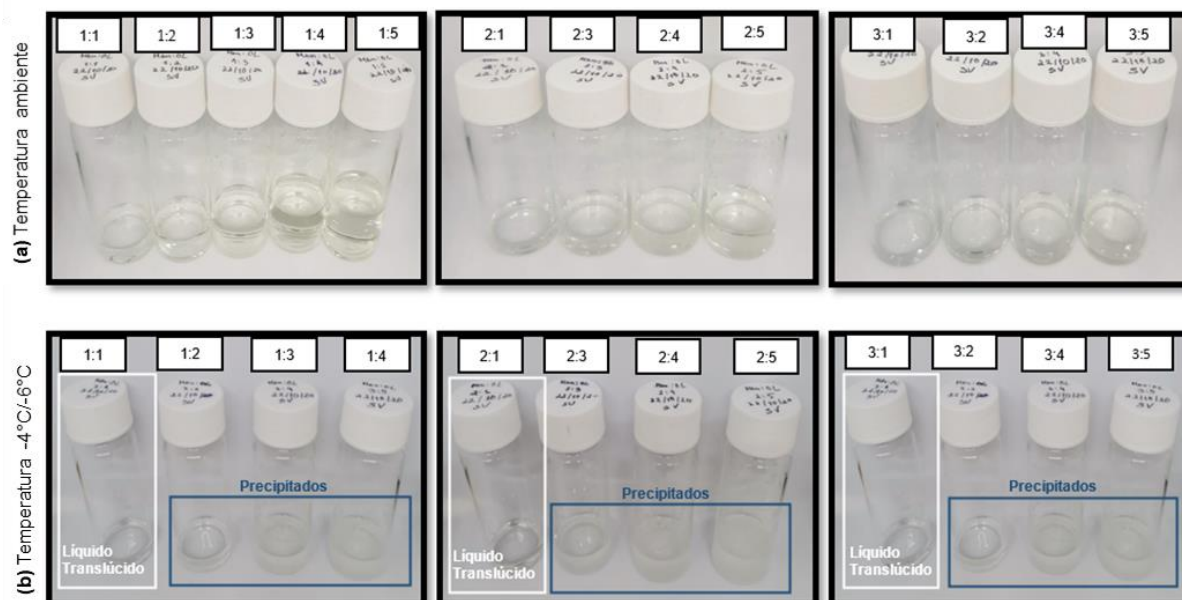


Figura 3.1. Sistemas Men:OL preparados. Estudo de várias razões molares do DES: **(a)** temperatura ambiente, **(b)** temperatura de, aproximadamente, -4°C/-6 °C.

No seguimento destas observações, e para melhor compreensão dos sistemas eutéticos escolhidos, nomeadamente - Men:OL (1:1), Men:HB (2:1) e Men:HB (3:1) -, os mesmos foram caracterizados posteriormente ao nível das suas propriedades físico-químicas. Esta caracterização envolveu técnicas como POM, RMN e FTIR-ATR.

3.2. Caracterização dos DES

3.2.1. Microscopia ótica polarizada (POM)

A microscopia ótica polarizada foi estudada para observar os sistemas sob luz polarizada, tal como o próprio nome indica, e detetar a existência de diferentes fases nas misturas eutéticas. Esta técnica é uma ferramenta comumente utilizada para avaliar a existência de estruturas semelhantes a cristais na mistura eutética, mesmo se os cristais forem misturados com uma fase líquida ⁷⁹ Quando apenas uma mistura líquida está presente, a imagem fica uniformemente preta. As imagens obtidas são apresentadas na Figura 3.2.

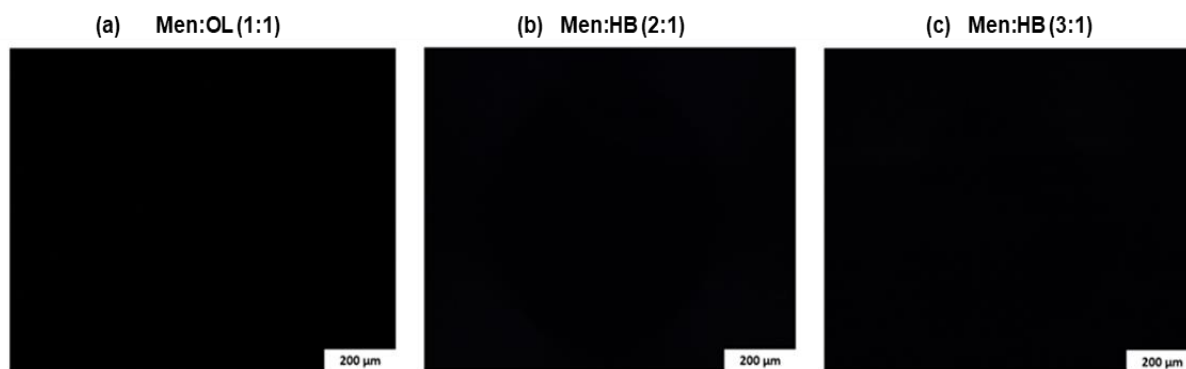


Figura 3.2. Microscopia ótica polarizada. Micrografias POM dos três sistemas DES estudados, obtidas a temperatura ambiente. **(a)** Men:OL (1:1); **(b)** Men:HB (2:1) e **(c)** Men:HB (3:1).

As micrografias POM, a temperatura ambiente, corroboraram a observação visual, pois nos vários sistemas DES nenhuma formação semelhante a cristal foi distinguida. Deste modo, estes sistemas apresentam uma micrografia com um fundo totalmente preto, que é um indicativo de uma fase líquida homogênea, a temperatura ambiente (característico dos sistemas eutéticos).

3.2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Como verificado anteriormente, os resultados obtidos por POM sugerem o estabelecimento de interações intermoleculares entre os compostos da mistura, formando uma estrutura supramolecular DES, a saber, através de ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals*. Para caracterizar ainda mais as formulações obtidas e explorar possíveis interações intermoleculares tipicamente encontradas nos DES, a espectroscopia de RMN foi realizada para os vários sistemas eutéticos em estudo e seus compostos individuais. Com esta técnica também foi pretendido confirmar as razões dos DES produzidos ²⁹.

3.2.2.1. RMN unidimensional

Na Figura 3.3 estão apresentados os espectros de ¹H RMN relativos ao sistema Men:OL (1:1) e aos respectivos compostos isolados, bem como, os integrais de diferentes sinais.

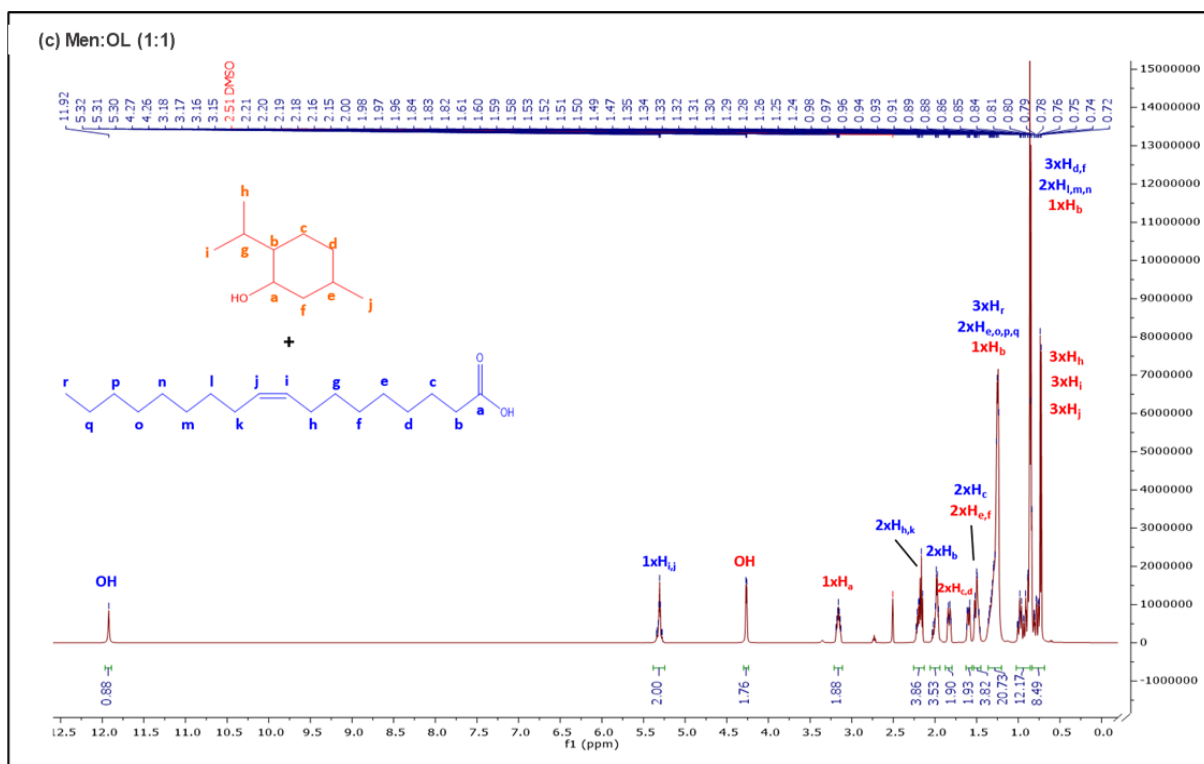
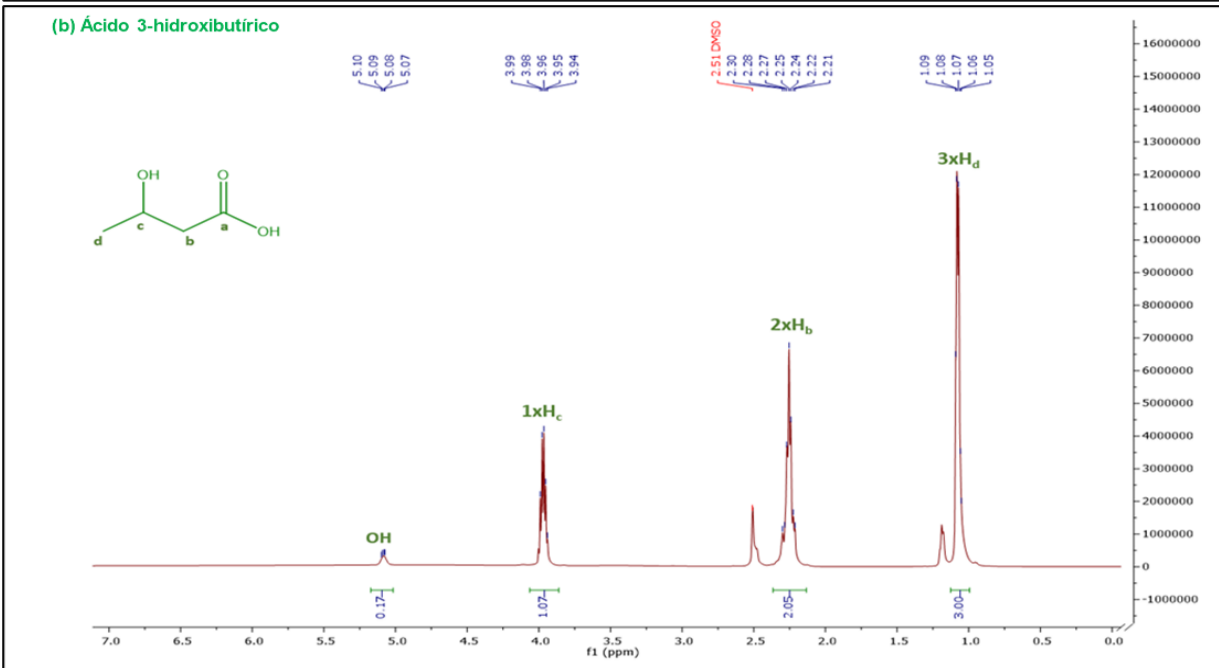
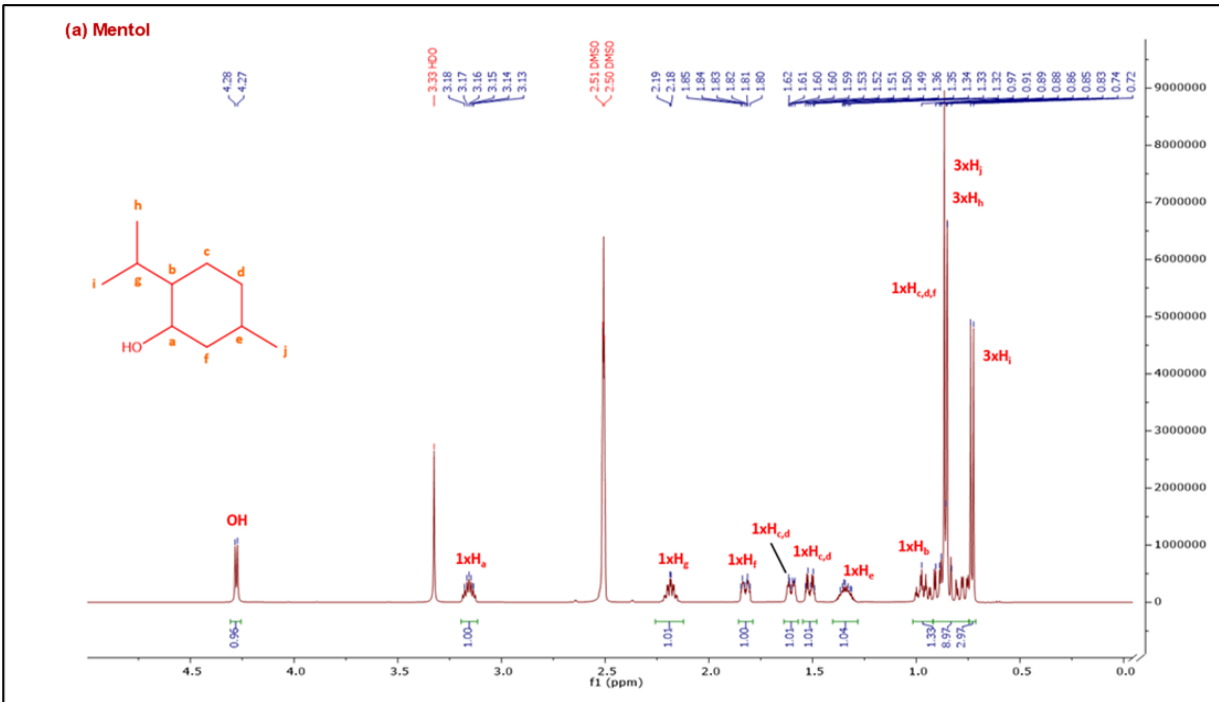


Figura 3.3. RMN unidimensional. Espectros de ^1H RMN em DMSO deuterado dos compostos puros - (a) Mentol, (b) ácido oleico - e sistema eutético por eles formado - (c) Men:OL (1:1).

Por sua vez, na Figura 3.4 são apresentados os espectros de ^1H RMN relativos aos sistemas Men:HB (2:1) e Men:HB (3:1) e aos respectivos compostos isolados, assim como, a integração dos diferentes sinais



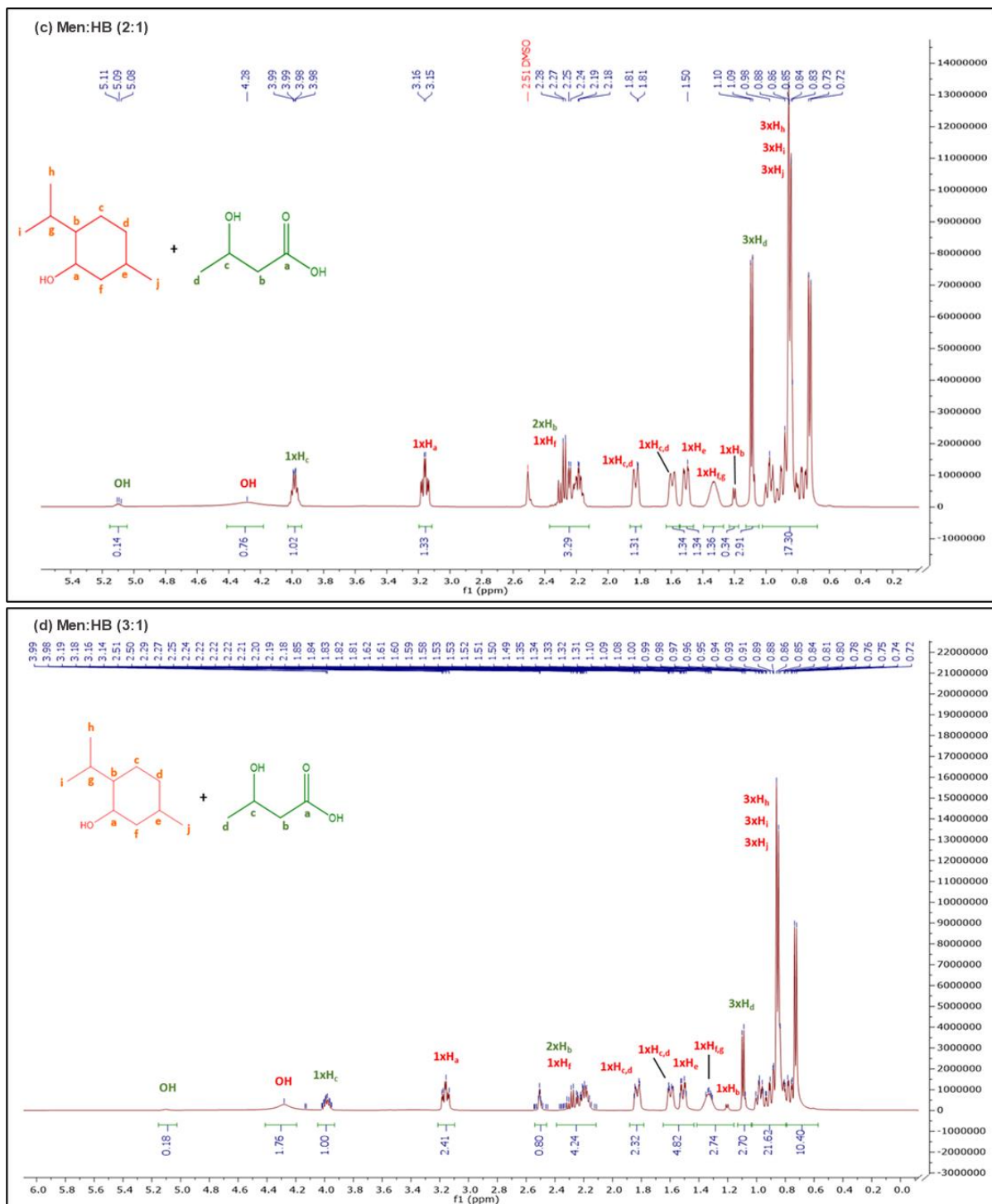


Figura 3.4. RMN unidimensional. Espectros de ^1H RMN em DMSO deuterado dos compostos puros - (a) Mentol, (b) ácido 3-hidroxi-butírico - e dos sistemas eutéticos por eles formados - (c) Men:HB (2:1), (d) Men:HB (3:1).

Uma das diferenças verificadas entre o espectro do mentol e os espectros dos sistemas Men:HB, em ambas as razões molares, deve-se aos sinais químicos atribuídos ao grupo hidroxilo do mentol. O espectro do mentol (Figuras 3.3 e 3.4 - **(a)**) apresenta um duplete bem definido ($\delta = 4,27 - 4,28$ ppm), no entanto quando misturado com o ácido 3-hidroxibutírico torna-se um singlete largo (Figura 3.4 - **(c)** e **(d)**). Deste modo, o estabelecimento de ligações de hidrogénio é comprovada pelo alargamento do desvio químico correspondente ao grupo hidroxilo do mentol no sistema, comparativamente ao que se verifica no espectro do composto mentol isolado (Figura 3.4 - **(a)**).

Como estes sistemas são viscosos, na parte inferior dos picos nos espectros de RMN, a largura da linha é ligeiramente ampla devido às interações inter e intradipolares. Os dados gerais indicam que as ligações de hidrogénio são estabelecidas entre os grupos hidroxilo do mentol e o grupo carboxilo do ácido 3-hidroxibutírico, neste caso ⁸⁰.

Este efeito de alargamento do pico pode estar relacionado com a alta viscosidade do ácido 3-hidroxibutírico. De acordo com a lei de *Stokes-Einstein-Debye*, as misturas de alta viscosidade levam a uma difusão molecular rotacional mais lenta e a tempos de relaxamento T2 mais longos. Este facto traduz-se em picos de RMN mais amplos, conforme relatado anteriormente para misturas viscosas de DES ⁸¹.

Além disso, outra evidência do estabelecimento de ligações de hidrogénio entre moléculas é o sinal do próton (H_a) ligado ao mesmo carbono do grupo hidroxilo do mentol. No espectro 1H RMN do composto isolado mentol (Figuras 3.3 e 3.4 - **(a)**), este sinal apresenta ressonância - H - num desvio químico de 3,13 - 3,18 ppm, sendo, como esperado, um multiplete. No entanto, nos espectros 1H RMN dos sistemas eutéticos estudados (Men:OL (1:1), Men:HB (2:1) e Men:HB (3:1)), apesar de não se verificar um deslocamento detetável, os sinais não se apresentam como um multiplete tão bem definido. Este facto sugere que o H_a do mentol é afetado por interações de ligações de hidrogénio entre as moléculas parentais. Esta diferença é ainda mais visível no espectro Men:OL (1:1) (Figura 3.3 - **(c)**).

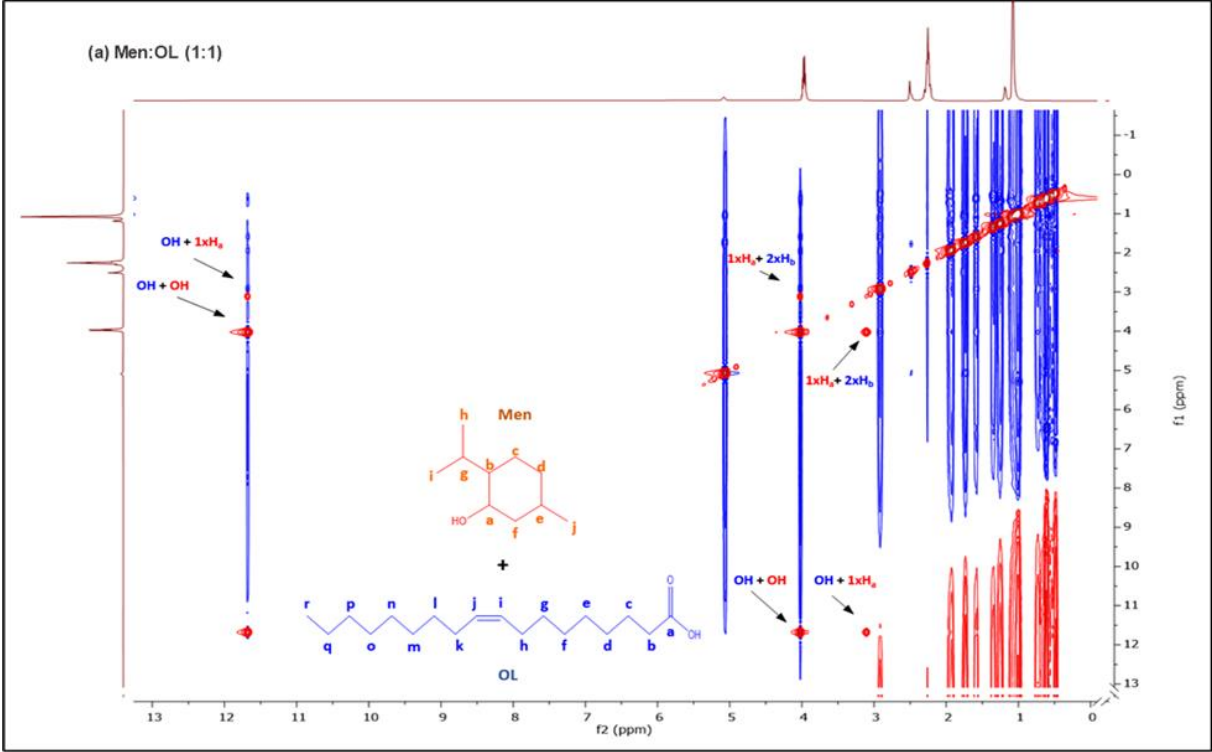
Por outro lado, a precisão das razões molares dos DES também pode ser verificada. No que diz respeito aos sistemas Men:HB, os valores dos integrais dos picos do mentol são triplicados no sistema Men:HB (3:1) e duplicados no sistema Men:HB (2:1), quando comparados com o espectro 1H RMN do mentol. Este facto também é um indicativo do possível estabelecimento de interação de ligação de hidrogénio entre os componentes que formam os DES.

Com isto, é possível averiguar que os dados de RMN suportam a POM, uma vez que foi observada uma rede de ligações de hidrogénio para as razões molares avaliadas.

3.2.2.2. RMN bidimensional (NOESY)

Outra estratégia para determinar as interações físico-químicas envolve a deteção de efeitos NOE (efeito nuclear de *Overhauser*) via relaxamento dipolo-dipolo $^1H, ^1H$ ⁸². Um NOE entre moléculas pequenas pode ser observado entre núcleos de hidrogénio que estão separados por 2–5 Å. Normalmente, os espectros NOESY são aplicados para medir a interação dipolo-dipolo 1H intermolecular. Aqui, os sinais dos prótons em interação são os sinais estudados ⁸³. Neste sentido, a

espectroscopia de efeito nuclear *Overhauser* ^1H - ^1H (NOESY) também foi realizada. Os resultados encontram-se apresentados na Figura 3.5.



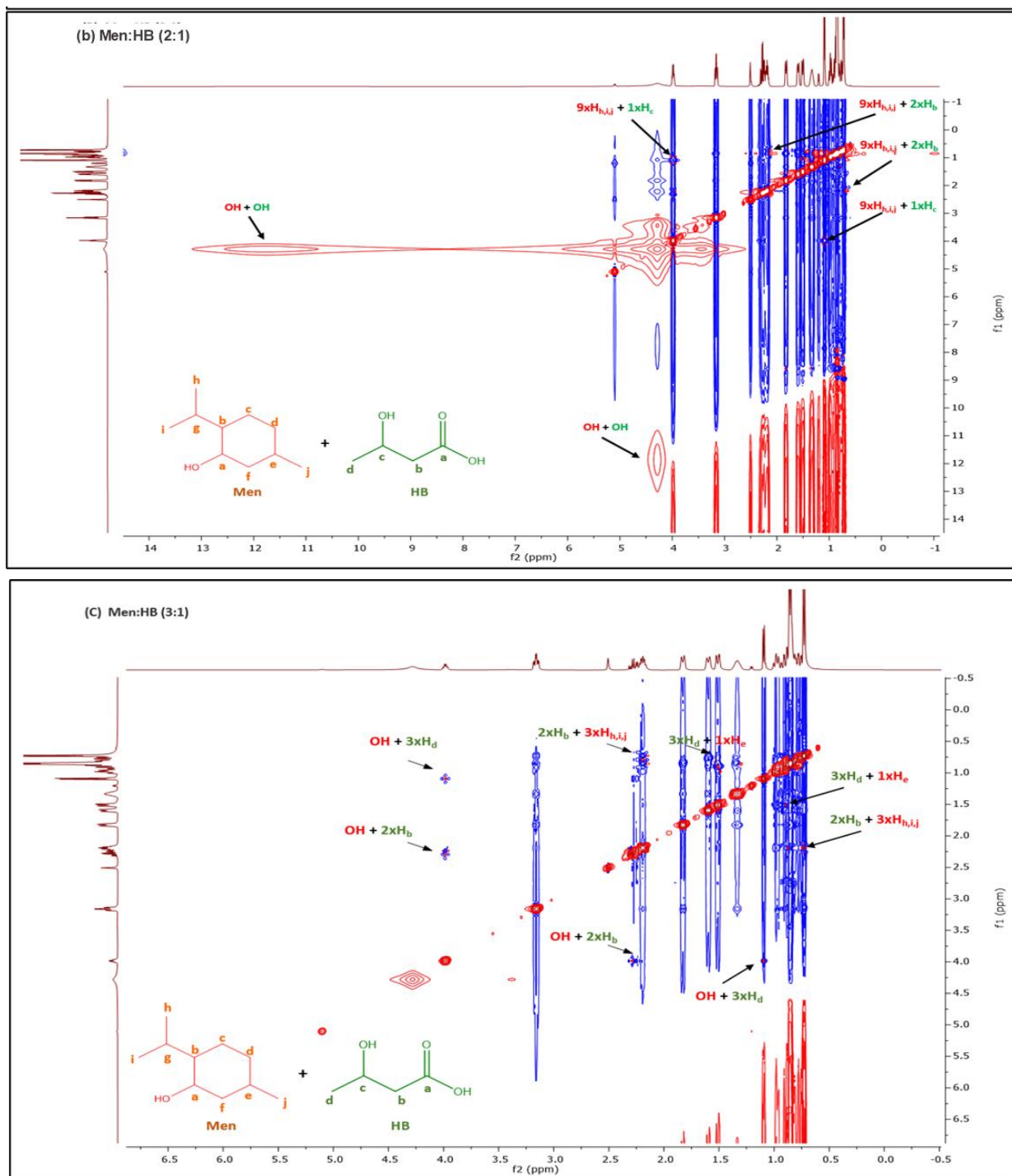


Figura 3.5. Espectro bidimensional. Espectro NOESY 2D em DMSO deuterado dos vários sistemas DES: (a) Men:OL (1:1), (b) Men:HB (2:1) e (c) Men:HB (3:1). Os grupos funcionais dos prótons identificados estão assinalados.

Através da observação dos espectros relativos aos sistemas Men:HB (2:1) e Men:HB (3:1), é possível verificar interações entre os grupos –OH do mentol com prótons do ácido 3-hidroxi-butírico (Figura 3.5 – (c)). Verifica-se também interação entre os grupos –OH dos dois compostos (Figura 3.5 – (b)). Esses dados podem ser compatíveis com a formação de uma rede supramolecular, que é característica dos DES, tal como verificado nos espectros ^1H RMN apresentados anteriormente. Para

tratar adequadamente a rede de interações entre os componentes que permitiram formar as misturas, estudos moleculares dinâmicos teriam que ser realizados.

Por outro lado, também se verifica interações entre os prótons do ácido 3-hidroxi-butírico e os prótons do mentol (Figura 3.5 – **(b)** e **(c)**). Isto pode ser explicado pelo arranjo espacial das moléculas quando se encontram na formulação DES. Com este arranjo, determinados prótons ficam tão próximos que acaba por se verificar interação entre os mesmos.

Relativamente ao sistema Men:OL (1:1), as observações foram semelhantes (Figura 3.5 - **(a)**). Também se verificou interação entre os grupos hidroxilo de ambos os compostos (mentol e ácido oleico), bem como, entre o grupo –OH do ácido oleico e o H_a do mentol (ligado ao mesmo carbono ao qual o grupo –OH do mentol se encontra ligado). Esta interação tinha sido observada nos espectros ¹H RMN anteriormente analisados (Figuras 3.3 e 3.4- **(a)**). Por fim, também foram verificadas interações entre os prótons de ambas as moléculas - facto justificado pela proximidade que adquiriram no rearranjo das moléculas no sistema DES.

3.2.3. Espectroscopia FTIR-ATR

As estruturas químicas dos DES estudados foram confirmadas por FTIR-ATR. O principal fator na formação dos DES é a formação de ligações de hidrogénio entre os componentes e, deste modo, a existência de ligações de hidrogénio pode ser avaliada pelas mudanças nas bandas representativas das ligações envolvidas nos espectros de FTIR.⁸¹

A Figura 3.6 representa os espectros de FTIR-ATR dos vários sistemas eutéticos (DES), bem como, dos seus compostos individuais. Nos espectros encontram-se também identificadas as respetivas bandas características dos grupos funcionais.

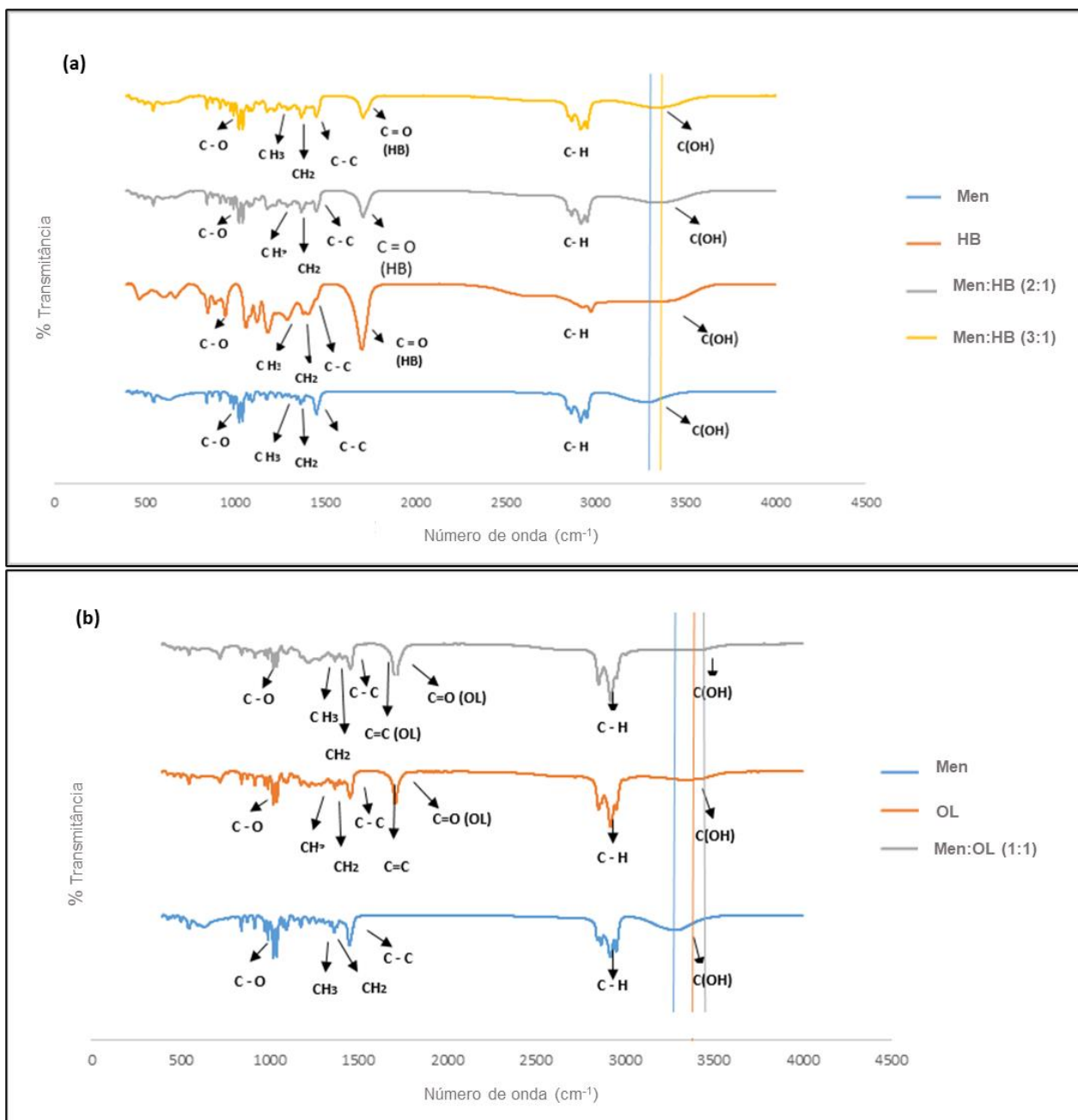


Figura 3.6. Espectroscopia FTIR-ATR. (a) Espetro de FTIR-ATR dos compostos isolados (Men e HB) e das misturas eutécticas Men:HB (nas proporções 2:1 e 3:1), (b) Espetro de FTIR-ATR dos compostos isolados (Men e OL) e da mistura eutéctica Men:OL (na proporção 1:1). Na imagem encontram-se assinaladas as bandas características dos grupos funcionais.

Quanto às propriedades físico-químicas dos DES, a análise de FTIR confirmou a presença dos seus constituintes pelo aparecimento de bandas características dos seus grupos funcionais. Deste modo, foi possível atribuir os respetivos grupos funcionais dos compostos que formam os DES.

Relativamente aos sistemas Men:HB (Figura 3.6 - (a)), a cerca de 3400 cm⁻¹ verificou-se a presença dos grupos –OH do mentol e do ácido 3-hidroxiбутírico. Entre os 2800 e 3000 cm⁻¹ confirmou-se a presença das ligações simples C-H que compõem o mentol e o ácido 3-hidroxiбутírico. A ligação dupla C=O do ácido carboxílico do HB encontra-se a, aproximadamente, 1700 cm⁻¹ e as ligações entre

carbonos (C-C) de ambos os compostos foram confirmadas a cerca de 1500 cm^{-1} . Sensivelmente a 1350 cm^{-1} são confirmados os grupos metilo e, a cerca de 1450 cm^{-1} , os grupos CH_2 de ambos os compostos que formam os DES. Finalmente, a aproximadamente, 1000 cm^{-1} são observadas as ligações C-O dos mesmos ^{81,84}.

Quanto ao sistema Men:OL (Figura 3.6 - **(b)**), a 3400 cm^{-1} verificou-se uma ligeira banda, onde seria o grupo -OH do mentol. A aproximadamente 2900 cm^{-1} confirmou-se a existência do grupo -OH do ácido carboxílico do ácido oleico. Os restantes números de onda analisados no sistema Men:HB também se verificaram neste sistema eutético, ou seja, as ligações simples C-H a 3200 cm^{-1} e, a aproximadamente, 1700 cm^{-1} a ligação dupla C=O do ácido carboxílico do ácido oleico. Além disso, a cerca de 1650 cm^{-1} , verificou-se a existência da dupla ligação C=C do ácido oleico. Relativamente a ambos os compostos individuais que formam o DES (mentol e ácido oleico), verificaram-se as suas ligações entre carbonos (C-C) a cerca de 1500 cm^{-1} e os grupos metilo a 1350 cm^{-1} . Por fim, os grupos CH_2 , aproximadamente, a 1450 cm^{-1} e as ligações C-O a cerca de 1000 cm^{-1} ^{81,84}.

Por outro lado, a espectroscopia de FTIR também foi utilizada para confirmar a formação de um novo composto, através da formação de ligações de hidrogénio, entre o mentol e os dadores de pontes de hidrogénio (ácido oleico e ácido 3-hidroxibutírico) ⁴⁴.

Nos sistemas Men:HB (2:1) e Men:HB (3:1), a banda larga a 3400 cm^{-1} relacionada com a vibração de alongamento do grupo O-H do mentol foi deslocada para, aproximadamente, 3450 cm^{-1} no DES (Figura 3.6 – **(a)**). A mudança da banda do grupo O-H no espectro FTIR pode estar relacionada à formação do sistema eutético. O mesmo se verificou para o sistema Men:OL (1:1), onde a banda correspondente ao grupo O-H do mentol também foi deslocada para cerca de 3450 cm^{-1} no DES (Figura 3.6 - **(b)**), embora a banda no sistema eutético seja menos visível do que no sistema anterior ⁸⁵. Foram colocadas linhas guia nos espetros para auxiliar a visualização deste deslocamento.

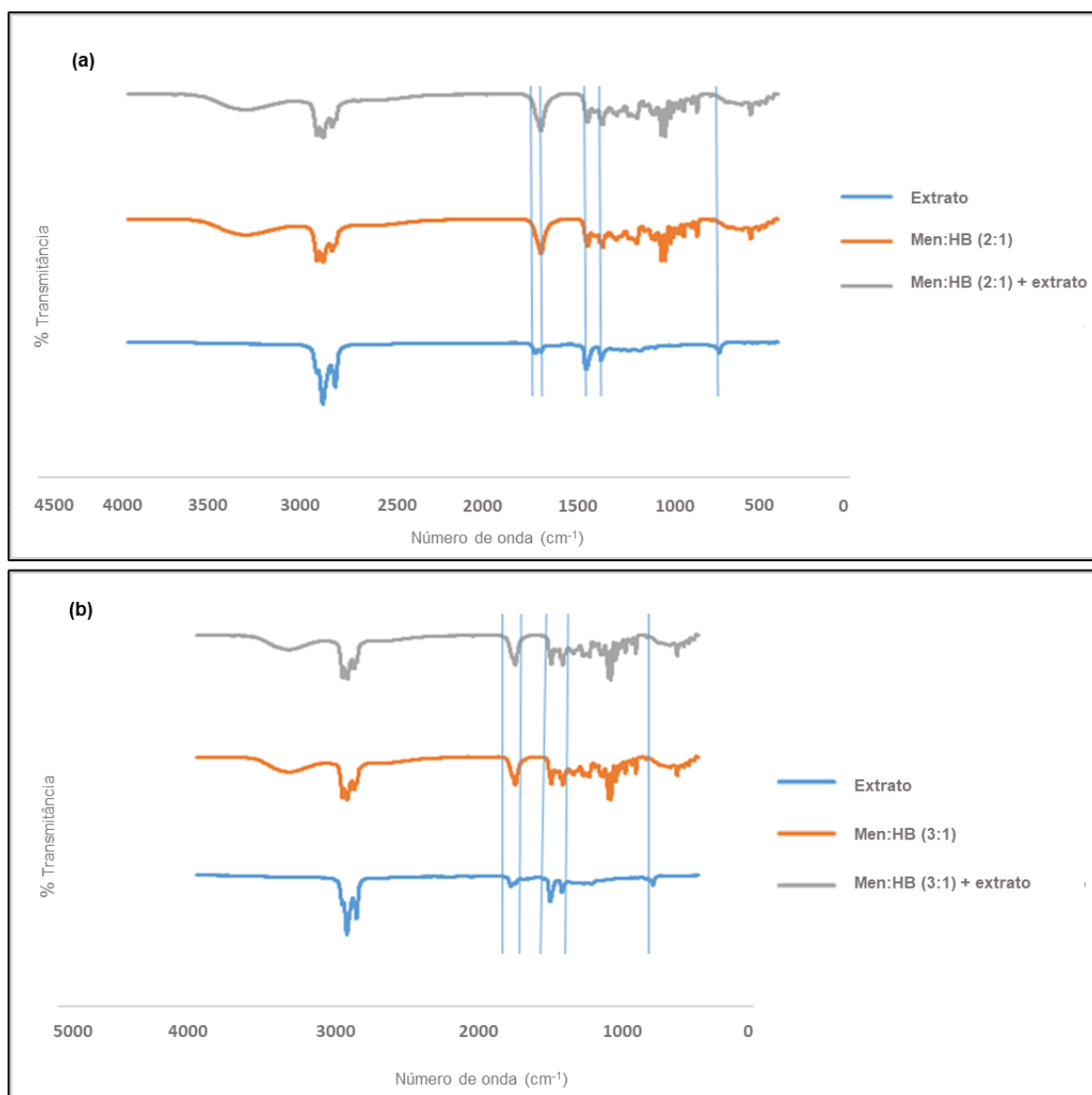
Esta mudança no estado vibracional pode estar relacionada com a transferência de uma porção da nuvem de eletrões do átomo de oxigénio para ligações de hidrogénio e, como resultado, uma diminuição na constante de força. Assim, esta mudança confirmou a existência de ligações de hidrogénio no DES ⁸⁶.

Conforme mencionado acima, as moléculas selecionadas podem estabelecer ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo e os átomos de oxigénio presentes em cada estrutura. Observando os espetros de FTIR-ATR dos DES, é possível concluir que todas as misturas apresentaram perfis de absorção semelhantes aos dos componentes individuais, com exceção das bandas de vibração de alongamento O-H. Na verdade, estas bandas foram deslocadas para frequências mais baixas (números de onda mais altos) quando comparados com aqueles dos componentes isolados da mistura, o que pode indicar que a ligação de hidrogénio ocorreu através dos grupos hidroxilo ⁸⁷.

Uma vez que a ligação de hidrogénio modifica a constante de força de ambos os grupos dador e aceitador, as frequências das vibrações de alongamento/flexão são conseqüentemente alteradas ⁸⁸. Deste modo, a espectroscopia de FTIR das misturas eutéticas mostra a interação da ligação de hidrogénio intermolecular entre os dadores de pontes de hidrogénio e o mentol, principalmente na região do grupo carboxilo com esta deslocação das bandas no espectro. Portanto, esta é uma forte

indicação da formação de uma nova ligação de hidrogénio, provando, assim, que um novo composto foi formado.

Por outro lado, a espectroscopia FTIR foi realizada também com o intuito de verificar a compatibilidade entre o extrato marinho e os DES, entendendo que compostos do extrato se tinham dissolvido nos sistemas através deste princípio da interação entre as moléculas. No entanto, algumas limitações foram verificadas nesta técnica. A Figura 3.7 representa os espectros de FTIR dos sistemas eutéticos estudados com e sem incorporação do extrato marinho, bem como, o espectro deste último.



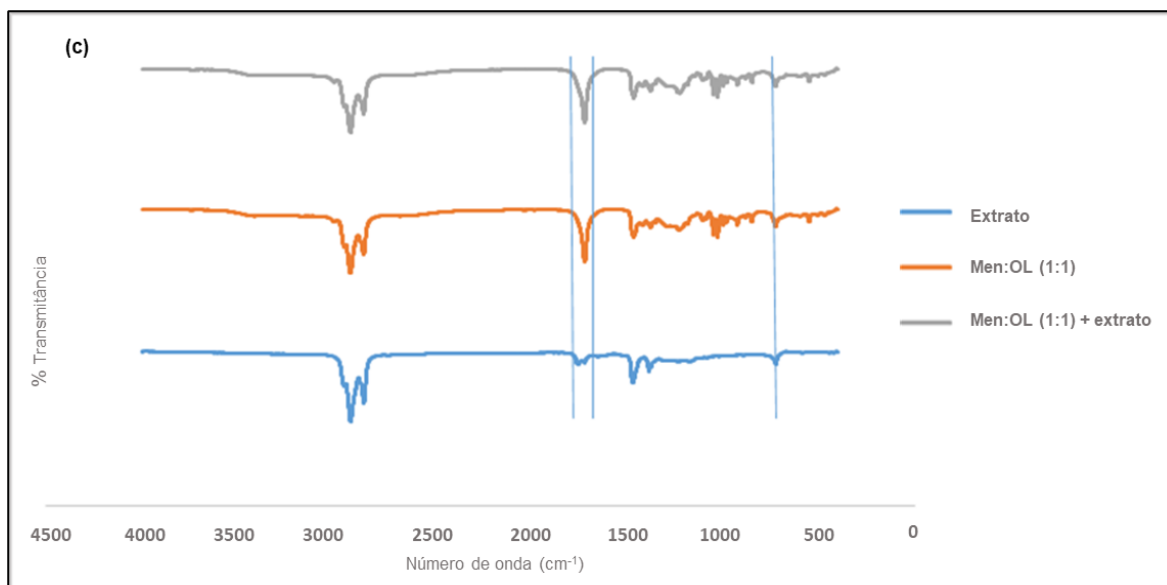


Figura 3.7. Espectroscopia de FTIR-ATR. Espectros de FTIR-ATR do extrato marinho e dos sistemas eutéticos com e sem incorporação do mesmo. (a) Sistema Men:HB (2:1), (b) Sistema Men:HB (3:1) e (c) Sistema Men:OL (1:1).

Através da análise dos espectros, verifica-se que as bandas dos espectros referentes aos DES se sobrepõem às bandas dos espectros do extrato, não sendo possível inferir conclusões. Por outro lado, relativamente aos sistemas com mentol e ácido 3-hidroxiбутírico, é possível verificar que uma banda característica do extrato marinho, a cerca de 720 cm^{-1} , não é visível no espectro correspondente ao DES com o extrato marinho dissolvido (Figura 3.7 - (a) e (b)). Como esta banda característica do extrato marinho a cerca de 720 cm^{-1} se verifica no sistema Men:OL (1:1) (Figura 3.7 - (c)), a ausência da mesma nos sistemas Men:HB pode dever-se ao facto dos constituintes do extrato marinho serem degradados pela ação acídica do ácido 3-hidroxiбутírico.

3.3. Miscibilidade dos sistemas eutéticos desenvolvidos na tinta náutica

Uma vez já estudados, preparados e caracterizados adequadamente os sistemas eutéticos hidrofóbicos, foi necessário verificar dois aspetos fundamentais para que as atividades experimentais pudessem avançar:

- 1) Compatibilidade entre o extrato marinho (rico em napiradiomicinas) e os DES preparados;
- 2) Compatibilidade dos DES na tinta náutica.

Estes dois parâmetros são essenciais. Primeiramente, uma vez que se pretende potenciar a ação dos DES através da incorporação das napiradiomicinas, que têm atividade *antimicro* e *antimacrofouling*⁴, é crucial haver compatibilidade entre os mesmos. Por outro lado, é necessário avaliar a compatibilidade destes sistemas eutéticos com a tinta náutica, de modo a ser possível a posterior aplicação em estruturas e plataformas náuticas.

3.3.1. Compatibilidade entre o extrato marinho rico em napiradiomicinas e os DES

Assim sendo, para compreender a compatibilidade do extrato marinho nos sistemas eutéticos estudados, o mesmo contendo as napiradiomicinas foi dissolvido nos DES. Com isto, verificou-se que houve realmente compatibilidade entre o extrato e os DES, tendo-se obtido uma solução homogénea. Ou seja, não se verificou separação de fases, sendo possível dissolver o extrato nos DES. A Figura 3.8 ilustra o processo de incorporação do extrato marinho nos DES.

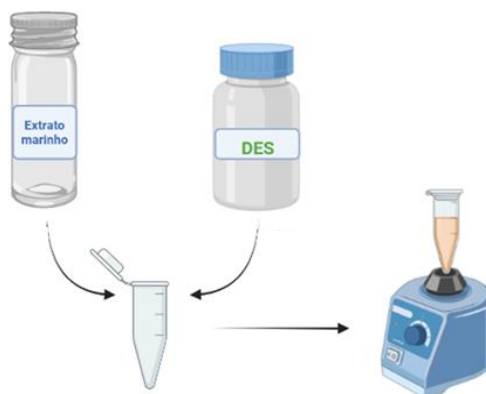


Figura 3.8. Incorporação do extrato marinho nos DES. Dissolução do extrato marinho (rico em napiradiomicinas) nos DES para verificar a existência de compatibilidade entre os mesmos.

3.3.2. Incorporação dos DES na tinta náutica e consequente dissolução

Outro aspeto muito importante neste trabalho foi analisar a incorporação dos vários DES na tinta náutica (Hempel (Palmela, Portugal)), tendo-se recorrido ao microscópio ótico para a análise (Figura 3.9). A tinta era isenta de biocidas de modo a ser possível testar o potencial dos DES e das napiradiomicinas.

Para o efeito, foi dissolvida uma quantidade em excesso dos DES, ou seja, uma quantidade maior do que a que seria necessária e que foi utilizada nos ensaios posteriores, de modo a verificar se haveria uma separação de fases. Com este ensaio foi verificada a compatibilidade entre os sistemas eutéticos e a tinta, não tendo sido observada ao microscópio ótico nenhuma semelhança a uma emulsão. Portanto, as duas fases são, de facto, homogéneas e estão bem distribuídas.

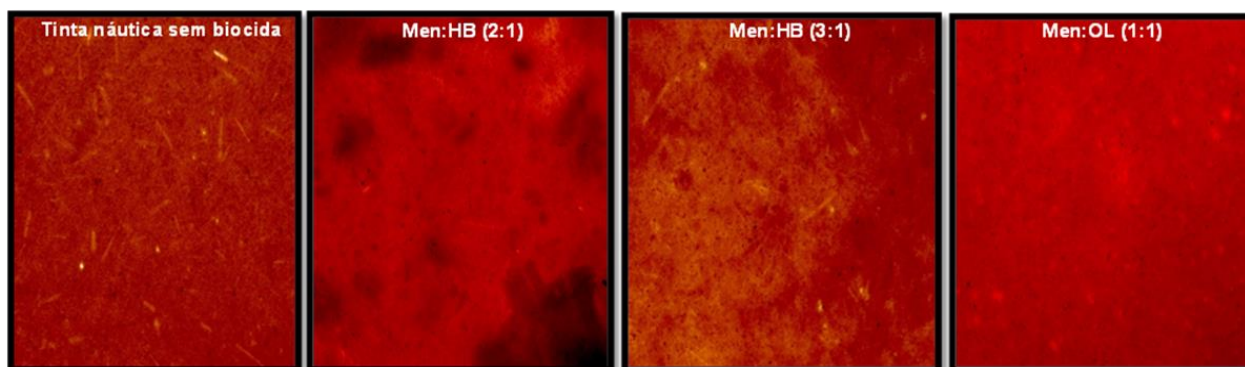


Figura 3.9. Estudo do comportamento dos DES na tinta náutica. Imagens de microscópio ótico relativas à incorporação dos DES na tinta náutica sem biocida.

3.4. Avaliação das atividades antimicrobiana e antibiofilme

A capacidade antimicrobiana dos DES foi, primeiramente, avaliada contra microrganismos clinicamente relevantes, nomeadamente *Staphylococcus aureus* estirpe COL. Não foram escolhidas as estirpes marinhas utilizadas em estudos anteriores ⁴, por estas serem de difícil manuseamento e nem sempre apresentarem crescimento. A atividade antimicrobiana foi avaliada para os três sistemas DES desenvolvidos – Men:OL (1:1), Men:HB (2:1) e Men:HB (3:1) -, compostos individuais (Men, OL e HB), bem como, para os diversos DES com o extrato marinho incorporado. As concentrações testadas foram 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,2 µg/mL; 5 µg/mL; 15,63 µg/mL; 7,81 µg/mL; 3,91 µg/mL; 1,95 µg/mL. Os valores determinados de MIC, referentes à concentração mais baixa em que não existe crescimento bacteriano, são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2, Valores de MIC para *Staphylococcus aureus* estirpe COL dos sistemas eutéticos e dos seus componentes individuais, bem como, dos sistemas eutéticos com incorporação do extrato marinho. Os resultados são apresentados por formulação para a estirpe microbiana testada.

DES/Composto	MIC (µg/mL)
	<u>Estirpe bacteriana</u> <u><i>S. aureus</i> COL</u>
Mentol (Men)	250
Ácido oleico (OL)	> 250
Ácido 3-hidroxiбутírico (HB)	> 250
Men:OL (1:1)	> 250
Men:HB (2:1)	> 250
Men:HB (3:1)	> 250
Men:OL (1:1) + extrato	> 250
Men:HB (2:1) + extrato	> 250
Men:HB (3:1) + extrato	> 250

Através da análise da tabela anterior pode verificar-se que os resultados foram praticamente iguais para os compostos individuais e os vários DES, e que nenhum dos compostos apresentou atividade antimicrobiana.

O sistema Men:OL (1:1) foi submetido à determinação de MIC e avaliação da atividade antibiofilme para concentrações superiores a 250 µg/mL. O valor da MIC é um dado importante para a realização de ensaios posteriores, nomeadamente, compreender a concentração adequada para incorporação do DES em tintas náuticas. Este novo ensaio foi realizado contra um painel mais abrangente de microrganismos, nomeadamente *Staphylococcus aureus* estirpe COL, *Staphylococcus aureus* estirpe NCTC8325-4 e *Escherichia coli* K12.

Os valores determinados de MIC e antibiofilme deste novo ensaio estão representados na Tabela 3.3. Os resultados são apresentados para o sistema Men:OL (1:1), para os compostos individuais (mentol, ácido oleico e extrato marinho) e, ainda, para o DES com incorporação do extrato marinho para cada estirpe microbiana testada.

Tabela 3.3. Valores MIC e antibiofilme dos compostos individuais e DES. Os resultados são apresentados para cada estirpe microbiana testada. NO - não tem atividade antibiofilme.

DES/Composto	MIC (µg/mL)			Antibiofilme
	Estirpe bacteriana			Estirpe bacteriana
	<i>S. aureus</i> NCTC	<i>S. aureus</i> COL	<i>E. Coli</i> K12	<i>S. aureus</i> NCTC
Mentol	2000	2000	2000	NO
Ácido oleico	2000	500	≥ 2000	NO
Extrato marinho	3,9	31,25	≥ 250	3,9
Mentol:ácido oleico (1:1)	2000	2000	≥ 2000	NO
Mentol:ácido oleico (1:1) + extrato marinho	31	2000	2000	15

O mentol, o ácido oleico e o DES não apresentaram atividade antimicrobiana e também não exibiram atividade antibiofilme contra as estirpes estudadas. As atividades antimicrobiana e antibiofilme exibidas pelo extrato marinho continuaram a verificar-se, embora menos potentes, quando este é adicionado ao DES. Com base neste resultado podemos dizer que o extrato marinho possui atividade *antimicrofouling* e que para conferir tal propriedade ao DES será necessário adicionar o extrato, pois este por si só não apresenta atividade *antimicrofouling*.

Apesar de muito reduzida, a atividade antimicrobiana dos DES foi, no geral, mais pronunciada para estirpes de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*), onde a falta de uma membrana externa, que serve como uma camada adicional de proteção contra a agressão, pode resultar numa maior exposição da membrana citoplasmática a compostos hidrofóbicos (mentol e o ácido oleico), permitindo que estes compostos exerçam os seus efeitos dentro da célula. Por outro lado, bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, apresentam uma estrutura de membrana mais complexa, com diversos estudos na literatura que afirmam que a presença de lipopolissacáridos na parede celular externa impede que compostos hidrofóbicos atinjam a célula e, assim, evita que exerçam os seus efeitos citotóxicos ⁸⁹.

Em relação ao mentol e à sua formulação DES correspondente, os efeitos antimicrobianos verificados não são pronunciados. O mentol apresentou os mesmos valores de MIC para as três estirpes testadas, sendo esperado que para *E. coli* K12 o efeito inibitório fosse menor, uma vez que as bactérias Gram-negativas tendem, em geral, a ser mais resistentes à ação de compostos hidrofóbicos (como é o caso do mentol). Por sua vez, este aspeto foi verificado quanto ao ácido oleico e à formulação DES, que apresentaram valores ligeiramente superiores para *E. coli*, comparativamente a *S. aureus*. A maior diferença foi obtida para o ácido oleico, nomeadamente, entre *S. aureus* COL e *E. coli* K12 ⁷³. Estas diferenças observadas entre os compostos mentol e ácido oleico podem residir nas respetivas estruturas químicas. O ácido oleico é um ácido gordo insaturado com uma cadeia de 18 carbonos,

enquanto o mentol é um terpeno que possui um anel ciclohexano. Estas diferentes estruturas podem resultar em diferentes efeitos antibacterianos ⁷³.

Na verdade, vários autores relataram que, em geral, os ácidos gordos de cadeia média e longa tendem a apresentar um maior efeito antibacteriano contra bactérias gram-positivas. O principal consenso é que os ácidos gordos insaturados com comprimento de cadeia de carbono de 10 e 12 exibem maior potencial antimicrobiano, o que provavelmente significa que esses ácidos gordos apresentam o equilíbrio hidrofóbico ideal para a permeação de parede/membrana microbiana. Os resultados menos positivos observados para o mentol são provavelmente devido ao seu anel de ciclohexano, que aumenta muito a sua hidrofobicidade ^{72,74,75}. Deste modo, reduz a sua solubilidade e, portanto, a sua biodisponibilidade.

É de salientar que a determinação da atividade antibacteriana de ácidos gordos, em culturas em suspensão, não é simples devido à turbidez das soluções lipídicas e, também, à sua falta geral de solubilidade em água, como relatado em outros estudos. Para resolver este problema, DMSO foi adicionado ao meio numa percentagem que não mostrou qualquer efeito na determinação de MICs. Deve ser notado que as diluições realizadas não enfraquecem e/ou interrompem a rede de interações intermoleculares, conforme relatado em outros estudos para outras formulações de DES em determinadas gamas de concentração ²³.

Apesar de os resultados mostrarem que o DES testado apresenta menor atividade antimicrobiana comparativamente à atividade antimicrobiana dos seus componentes individuais, se avaliarmos a concentração de cada componente na mistura do DES iremos certamente verificar uma diferença considerável quanto à concentração presente nas amostras dos compostos puros individuais. Uma menor concentração de cada componente individual utilizado, mentol e ácido oleico, estão presentes na mistura DES em comparação com a quantidade dos compostos puros isolados ⁷⁶. Isto pode justificar a razão pela qual o DES apresentou menor poder antibacteriano comparativamente aos seus compostos individuais.

Apesar de na literatura não se encontrarem reportados os DES estudados no presente trabalho, existem estudos antimicrobianos que incluem alguns dos compostos que constituem os nossos sistemas eutéticos ou compostos que pertencem à mesma classe de moléculas. Estudos envolvendo o mentol e outro monoterpeneo (timol) revelaram que os efeitos antimicrobianos verificados para o mentol e a sua formulação DES não foram tão pronunciados quanto os do timol. Os efeitos observados nas bactérias Gram-positivas foram menos pronunciados, e também nenhum efeito inibitório foi verificado para as espécies Gram-negativas. Este facto residiu principalmente nas diferenças da estrutura química dos anéis cíclicos do composto, o que tornou o mentol menos resistente à degradação ⁷³. Na literatura, é conhecido que o mentol exhibe propriedades antimicrobianas ⁷⁶.

3.5. Avaliação toxicológica do DES

3.5.1. Avaliação da atividade citotóxica (Citotoxicidade)

Neste ensaio citotóxico foi considerado o sistema Men:OL por dois motivos:

- (1) A espectroscopia FTIR-ATR sugeriu que a ação ácida de HB parece degradar o extrato marinho.
- (2) O custo do ácido oleico é muito mais reduzido comparativamente ao do ácido 3-hidroxiбутírico, o que terá impacto na aplicação final, sendo, portanto, mais aliciante para o consumidor.

Posto isto, as razões molares testadas do sistema foram de 1:1 M, 2:1 M e 3:1 M, uma vez que foram algumas das razões molares do sistema Men:OL que se apresentaram líquidas a temperatura ambiente, na preparação dos sistemas eutéticos no início do presente trabalho (Figura 3.1).

Uma vez que o presente estudo visa a aplicação de DES em tintas náuticas, a avaliação do efeito citotóxico numa linha celular de queratinócitos humanos (HaCat), que correspondem a células epidérmicas, parece ser interessante do ponto de vista deste trabalho. As linhagens de células da pele constituem modelos *in vitro* adequados para estudar os efeitos tóxicos deste sistema eutético, pois o DES, incorporado na tinta náutica, irá exercer contacto, tanto em humanos como em organismos marinhos, através da via dérmica e, também, da via oral. A Figura 3.10 representa uma imagem ao microscópio ótico da linha celular HaCaT obtida no presente trabalho.

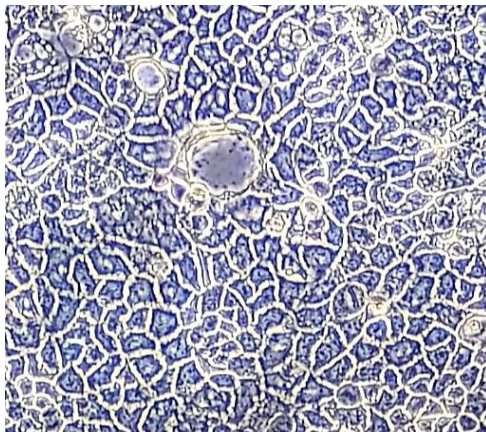


Figura 3.10. Citotoxicidade. Imagem ao microscópio ótico da linha celular HaCat.

Por sua vez, a viabilidade celular em função da concentração do sistema Men:OL (1:1) encontra-se representada na Figura 3.11.

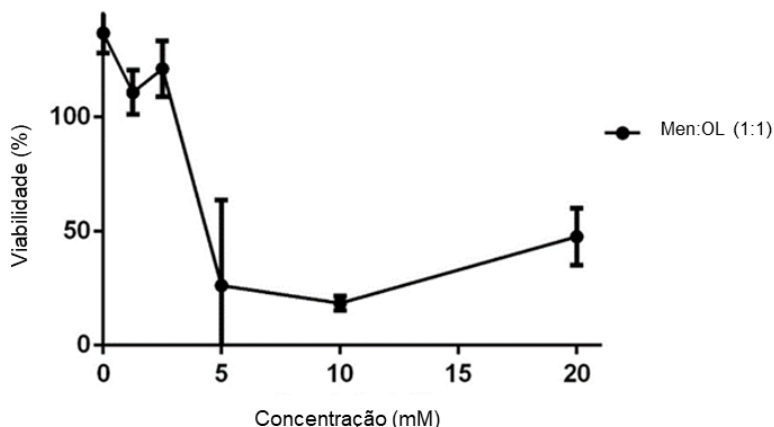


Figura 3.11. Estudo da viabilidade celular (%) em função da concentração (mM) do sistema eutético Men:OL (1:1). Os resultados foram expressos em relação ao controlo como a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado.

Através da análise do gráfico, verifica-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração do sistema até 10 mM. Os valores de EC_{50} obtidos a partir do gráfico apresentado estão representados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Valores de EC_{50} para os ensaios de citotoxicidade relativos a diferentes razões molares do sistema Men:OL. Os resultados foram expressos em relação ao controlo como a média \pm desvio padrão (DP).

Sistema eutético	Valores de EC_{50} (mM)
Men:OL (1:1)	$3,8 \pm 1,8$
Men:OL (2:1)	$3,2 \pm 1,8$
Men:OL (3:1)	$3,8 \pm 2,3$

Na literatura encontram-se descritos alguns estudos citotóxicos que envolvem mentol e ácidos gordos para a linha celular HaCat. Segundo Joana M. Silva et al. ²⁹, que estudaram o papel terapêutico de DES com base em mentol e ácidos gordos saturados, foi verificado que o sistema mentol:ácido láurico (4:1) apresentou citotoxicidade com valor de EC_{50} de $5,6 \pm 0,3$ mM de mentol equivalente. Além disso, esse sistema apresentou citotoxicidade semelhante à do mentol puro.

Comparando o valor anteriormente apresentado ($5,6 \pm 0,3$ mM) com os dos nossos sistemas (Tabela 3.4.), podemos verificar que os nossos DES apresentaram valores na mesma gama de concentrações. Por outro lado, uma vez que o efeito demonstrado pelos DES foi muito semelhante ao apresentado pelo próprio mentol em estudos anteriores, podemos deduzir que a bioatividade apresentada pelos nossos sistemas pode ser ditada pela presença de mentol.

No entanto, os efeitos sinérgicos/aditivos podem levar, em alguns casos, a sistemas mais ou menos tóxicos em comparação com os seus constituintes ⁹⁰. Assim, no caso do presente estudo, foi demonstrado que estes efeitos sinérgicos conduziram a DES não tóxicos, uma vez que apresentaram valores de citotoxicidade muito semelhantes a outros relatados na literatura e referidos aqui anteriormente.

3.5.2. Avaliação da atividade ecotoxicológica (Ecotoxicidade)

Os ensaios de ecotoxicidade pretenderam avaliar se o nosso sistema eutético se apresentava como um sistema ambientalmente seguro e com a capacidade de impedir a deposição de organismos marinhos nos cascos das embarcações, não afetando, contudo, os organismos não-alvo (organismos não incrustantes). Este ensaio ecotoxicológico teve por base a análise da toxicidade aguda, mais precisamente o cálculo da dose média letal (LD_{50}) e, posteriormente, a realização de ensaios bioquímicos, de modo a analisar o efeito do sistema Men:OL (1:1) ao nível dos tecidos dos organismos marinhos em estudo. A escolha deste sistema recaiu sobre os motivos referidos anteriormente.

Uma vez que, de acordo com os resultados dos primeiros ensaios antimicrobianos (Tabela 3.2), a maioria dos compostos individuais e sistemas eutéticos apresentaram resultados de MIC *S.aureus* estirpe COL superiores a 250 µg/mL, foram consideradas as seguintes concentrações: 500 mg/L; 1000 mg/L e 1500 mg/L. Neste primeiro ensaio, não foi possível determinar o LD_{50} , uma vez que os mexilhões não sobreviveram, não havendo dados suficientes para prosseguir com o cálculo da dose letal. Considerou-se uma justificativa para a morte total dos mexilhões, o facto de neste ensaio se encontrarem distribuídos cerca de 6 organismos em aquários de poliestireno de apenas 1,5 litros de água salina. Este volume não demonstrou ser adequado para organismos com uma grande capacidade de filtração. Seria mais adequado um volume maior de água salina, retratando mais eficientemente o que aconteceria no ambiente marinho real.

Assim sendo, outra gama de concentrações do sistema foi testada para um volume de 10 litros de água salina em cada tanque, nomeadamente, 0 mg/L; 10 mg/L; 20 mg/L; 37,5 mg/L; 75 mg/L; 150 mg/L; 250 mg/L e 500 mg/L. Com este acerto de volume foi verificado que a taxa de sobrevivência foi de 100%, não sendo possível calcular o LD_{50} . No decorrer do ensaio foi notado que uma grande parte do sistema eutético permanecia insolúvel à superfície. Isto pode indicar que os mexilhões não tiveram contacto suficiente com o sistema, uma vez que o mesmo não se dissolveu adequadamente na água salina. Contudo, os ensaios bioquímicos foram realizados para compreender, apesar de não haver mortes, se parte do DES era internalizado pelos mexilhões causando efeitos adversos.

De modo a contornar este aspeto, foi realizado um ensaio preliminar com etanol. O etanol, sendo um composto hidrofóbico, apresenta poder para dissolver o sistema Men:OL (1:1), também este hidrofóbico. Esta tentativa foi testada para compreender se o sistema se dissolveria eficientemente na água salina e, assim, entender se seria melhor assimilado pelos mexilhões. Ensaios bioquímicos foram também realizados posteriormente para comparação com os ensaios anteriores. Por outro lado, sendo que na última gama de concentrações referidas, 500 mg/L de DES foi a concentração testada mais elevada e onde não se verificou mortes, esta mesma concentração foi dissolvida em etanol e testada nos mexilhões (num volume de 10 litros de água salina). Foi observada uma taxa de sobrevivência de 100%. É de salientar que a quantidade de etanol nos 10L finais dos tanques corresponde a 0,03%, sendo muito reduzida e, por isso, é improvável que o etanol tenha algum efeito nos animais.

Deste modo, e apesar das várias tentativas, não foi possível calcular o LD_{50} , um dado importante para avaliar a ecotoxicidade do sistema eutético. No entanto, foi estudado o efeito a nível subcelular do sistema eutético nos tecidos dos mexilhões, através dos ensaios bioquímicos (capítulo 3.7).

3.6. Simulação da aplicação da tinta náutica com o sistema Men:OL (1:1) em possíveis estruturas do ambiente marinho

3.6.1. Primeiro ensaio

O estudo foi monitorizado ao longo do tempo relativamente ao comportamento dos mexilhões *Mytilus edulis* e de lapas *Patela vulgata*, ou seja, sua capacidade de adesão à superfície com as respetivas tintas e concentrações de DES ou se estas provocavam o afastamento dos animais. O estudo teve início apenas com os mexilhões, contudo as lapas foram adicionadas ao terceiro dia do ensaio, uma vez que, como referido anteriormente, são organismos com forte poder de adesão às superfícies, potenciando a compreensão da capacidade *antifouling* dos DES. O estudo prosseguiu até serem obtidos resultados conclusivos do efeito das tintas nos diversos organismos. As Figuras 3.12 – 3.16 apresentam os resultados obtidos a partir do terceiro dia, tendo o estudo tido uma duração de 9 dias.



Figura 3.12. Aplicação do sistema Men:OL (1:1) em tinta náutica. Análise da evolução do processo de *fouling* exercido pelos organismos marinhos - dia 3 (16/07/2021). Na imagem estão apresentadas as duas placas em teste correspondentes aos respetivos tanques.

As placas de tinta com biocida (Figura 3.12 - **(a)**) apresentaram apenas um mexilhão muito fracamente aderente a uma das placas, tendo o mesmo acabado por perder essa capacidade de adesão após a placa ser retirada do tanque. Por sua vez, no caso das placas com tinta sem biocida (Figura 3.12 - **(b)**), verificou-se uma adesão de ambas as espécies de organismos testados. Relativamente à tinta sem biocida contendo a concentração mais alta do DES (Figura 3.12 – **(c)**), as lapas estavam aderentes às placas e os mexilhões demonstraram estar aderentes apenas às lapas pelos bissos (e não às placas com a tinta). É de notar que os mexilhões apresentam esta característica

de produzir uma espécie de filamentos (bissos) com o propósito de conseguirem aderir às superfícies sólidas. Por fim, quanto às placas com a concentração mais baixa do DES (Figura 3.12 – **(d)**), foi verificado o mesmo comportamento, havendo menos mexilhões que aderiram às lapas.



Figura 3.13 Aplicação do sistema Men:OL (1:1) em tinta náutica. Análise da evolução do processo de *fouling* exercido pelos animais - dia 6 (19/07/2021). Na imagem estão apresentadas as duas placas em teste correspondentes aos respectivos tanques.

Relativamente ao controle 1 (Figura 3.13 – **(a)**), apenas uma lapa estava aderente à placa. No entanto, essa adesão era tão fraca que os organismos deslizaram da placa onde haviam sido colocados. No que diz respeito ao controle 2 (Figura 3.13 – **(b)**), ambos os organismos continuavam a apresentar uma adesão forte às placas. Por sua vez, na tinta sem biocida com incorporação de 50 mg/mL de DES (Figura 3.13 – **(c)**), apenas as lapas tinham aderido às placas, contudo de uma forma tão fraca que acabaram por deslizar. Finalmente, no caso da tinta sem biocida com incorporação de 2 mg/mL de DES (Figura 3.13– **(d)**), as lapas estavam aderidas às placas com um dos mexilhões a elas ligado.

É de salientar que, neste dia, se registou a morte de dois mexilhões no tanque que continha as placas revestidas com a tinta com biocida, restando assim 10 mexilhões (83,33%) no respetivo tanque (Tabela 3.5).

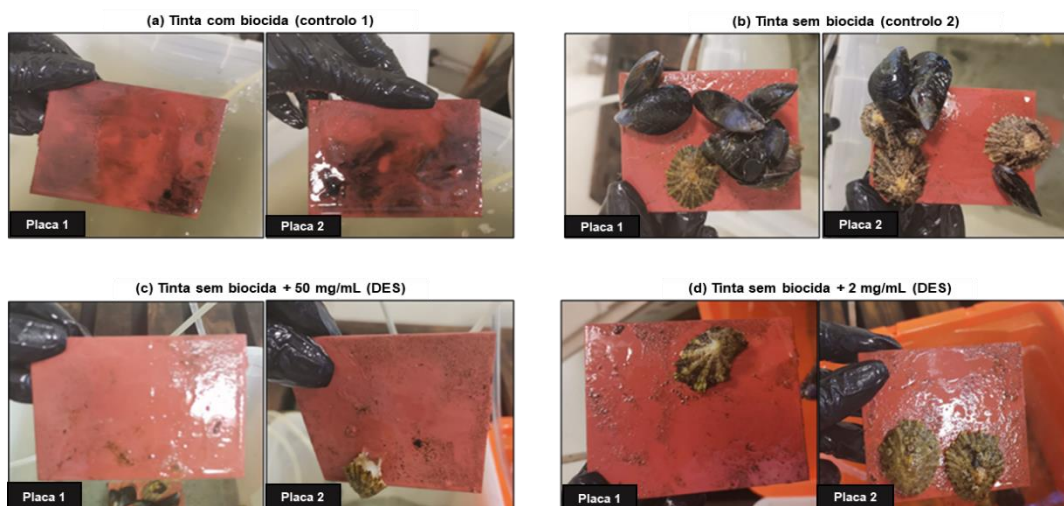


Figura 3.14. Aplicação do sistema Men:OL (1:1) em tinta náutica. Análise da evolução do processo de *fouling* exercido pelos animais – dia 7 (20/07/2021). Na imagem estão apresentadas as duas placas em teste correspondentes aos respectivos tanques.

As placas com a tinta com biocida (Figura 3.14 – **(a)**) não apresentaram aderência de nenhum dos organismos em estudo. Por sua vez, nas placas com apenas a tinta sem biocida (Figura 3.14 – **(b)**), os mexilhões e as lapas continuaram aderidos às mesmas. No que diz respeito às tintas com 50 mg/mL DES (Figura 3.14 – **(c)**) – os mexilhões não aderiram, tendo apenas uma lapa muito fracamente ligada a uma das superfícies. Por outro lado, na concentração mais baixa - 2 mg/mL DES (Figura 3.14 – **(d)**) – verificou-se a adesão de três lapas, ligação essa mais forte do que no caso anterior, sendo que os mexilhões não aderiram.

É de salientar que, neste dia, também foi observada mortalidade de organismos no tanque que continha as placas revestidas com a tinta com biocida: quatro lapas (100%) e 7 mexilhões (70%). Neste momento, o tanque ficou apenas com 3 mexilhões (Tabela 3.5).

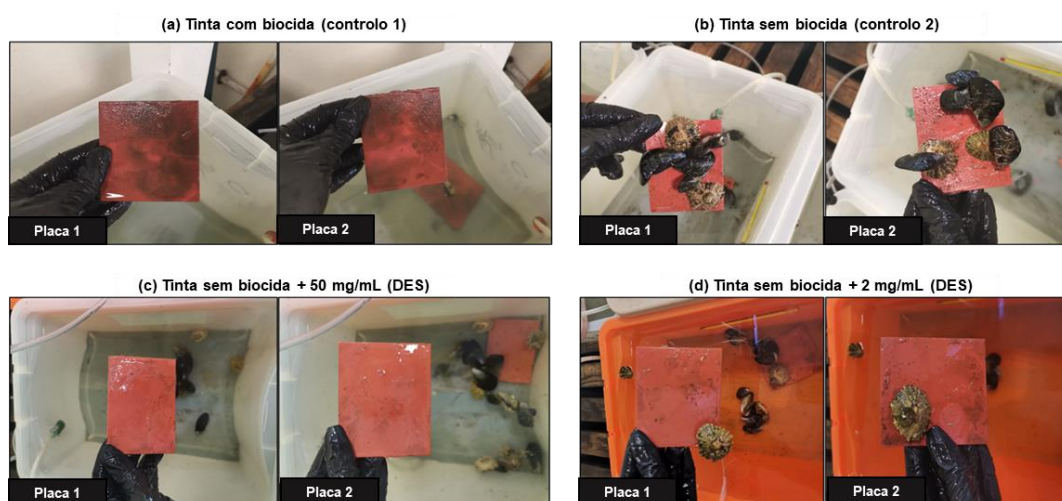


Figura 3.15. Aplicação do sistema Men:OL (1:1) em tinta náutica. Análise da evolução do processo de *fouling* exercido pelos animais - dia 8 (21/07/2021). Na imagem estão apresentadas as duas placas em teste correspondentes aos respectivos tanques.

Neste dia, os resultados foram bastante similares ao do dia anterior. No entanto, as placas contendo a tinta sem biocida com 50 mg/mL (DES) (Figura 3.15 – (c)) não apresentaram nenhum organismo ligado e, por sua vez, a tinta com a concentração mais baixa de DES (Figura 3.15 – (d)) apresentou apenas uma lapa ligada a cada uma das placas. No entanto, essa ligação demonstrou ser mais fraca do que a do dia anterior.

Neste dia, registou-se a morte de 2 mexilhões no tanque da tinta com biocida, restando nesse mesmo tanque apenas 1 mexilhão (66,67%) em estudo (Tabela 3.5).

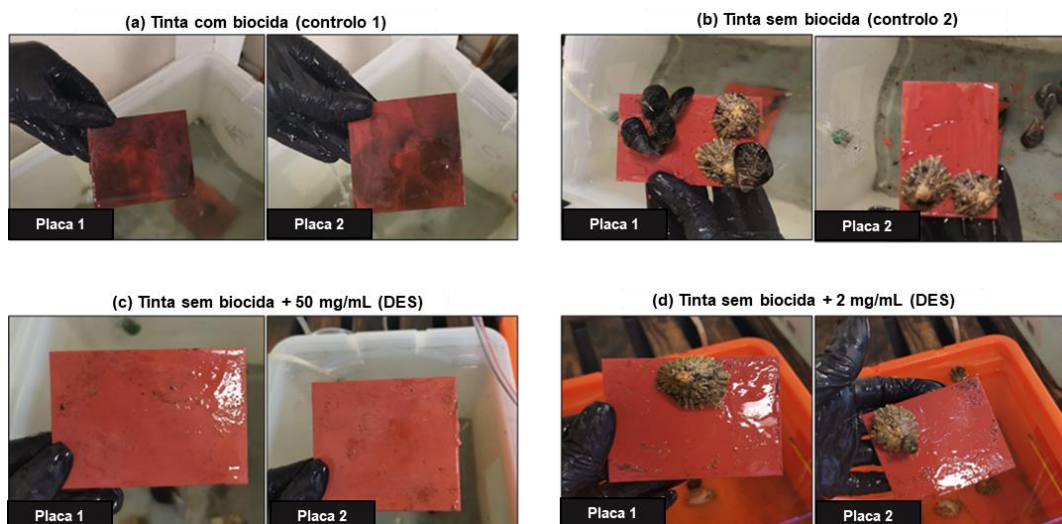


Figura 3.16. Aplicação do sistema Men:OL (1:1) em tinta náutica. Análise da evolução do processo de *fouling* exercido pelos animais - Dia 9 (22/07/2021). Na imagem estão apresentadas as duas placas em teste correspondentes aos respectivos tanques.

Os resultados apresentados na Figura 3.16 foram praticamente idênticos aos do dia anterior. O ensaio deu-se por terminado neste dia, uma vez que no controle 1 (tinta com biocida), o último organismo em estudo (mexilhão) neste tanque acabou por morrer.

A Tabela 3.5 representa a mortalidade cumulativa no decorrer do primeiro ensaio.

Tabela 3.5. Registo do número de mexilhões e lapas no decorrer do primeiro ensaio relativo à incorporação do DES nas tintas náuticas e simulação da sua aplicação em estruturas marinhas. A diminuição do número de animais deveu-se a falecimento. M – Mexilhões; L – Lapas. Em cada tanque estavam presentes 12 mexilhões e 4 lapas.

Tanque	Número de animais													
	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9	
	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L
Tinta com biocida	12	4	12	4	12	4	10	4	3	0	1	0	0	0
Tinta sem biocida	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4
Tinta sem biocida + 2 mg/mL (DES)	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4
Tinta sem biocida + 50 mg/mL (DES)	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4

É possível verificar que apenas no controlo 1 (tinta com biocida) se verificou a morte dos animais. Isto é indicativo de que as tintas com biocida existentes no mercado apresentam uma ameaça para as espécies marinhas, provocando a sua morte.

De acordo com as Figuras 3.12-3.16, a tinta com biocida apresenta um bom poder *antifouling* quando comparada com a tinta sem biocida, verificando-se uma quase inexistente adesão dos organismos às placas. No entanto, tal como já referido, a tinta com biocida afeta negativamente o ecossistema marinho (facto verificado pelo número de mortes crescente no decorrer do estudo).

A presença do sistema eutético na tinta sem biocida demonstrou potenciar a sua ação, sendo possível verificar excelentes resultados na concentração mais elevada (50 mg/mL), onde se verifica uma forte atividade *antifouling*, não permitindo que os organismos adiram à superfície das placas. Outro aspeto muito importante foi o facto de não se ter verificado número de mortes dos animais ao longo da experiência.

Na concentração mais baixa (2 mg/mL), este efeito *antifouling* também foi observado, no entanto, num grau mais reduzido. Além disso, os animais expostos à tinta com esta concentração do DES também sobreviveram. Este facto demonstra que o DES potencia a atividade *antibiofouling* das tintas sem biofilme, não provocando a morte dos organismos em estudo, contrariamente à tinta com biocida. Assim sendo, o sistema eutético apresenta-se como uma solução sustentável e ambientalmente benigna contra o problema do *fouling* marinho, demonstrando ser eficaz, seguro do ponto de vista ambiental e com a capacidade de impedir a deposição de organismos marinhos nos cascos das embarcações, sem, no entanto, afetar organismos não-alvo.

Outro aspeto verificado foi que a presença do DES aparentou melhorar a qualidade da tinta sem biocida. No decorrer do estudo, foi verificada uma deterioração da tinta sem biocida, sendo que na Figura 3.16 – **(b)** (dia 9 do estudo) é nitidamente visível a presença de tinta no fundo do tanque, proveniente das placas. Por sua vez, na tinta sem biocida contendo o DES, em ambas as concentrações, tal facto não se verificou. Com isto, é expectável que o DES potencia também a qualidade da tinta sem biocida.

3.6.2. Segundo ensaio

A duração deste segundo ensaio seguiu o critério do ensaio anterior, tendo terminado aquando da morte dos organismos em teste num dos controlos. Neste sentido, o ensaio teve a duração de 10 dias.

As Figuras 3.17-3.19 ilustram imagens de três dos dias em que o ensaio decorreu (dia 2, dia 7 e dia 10).

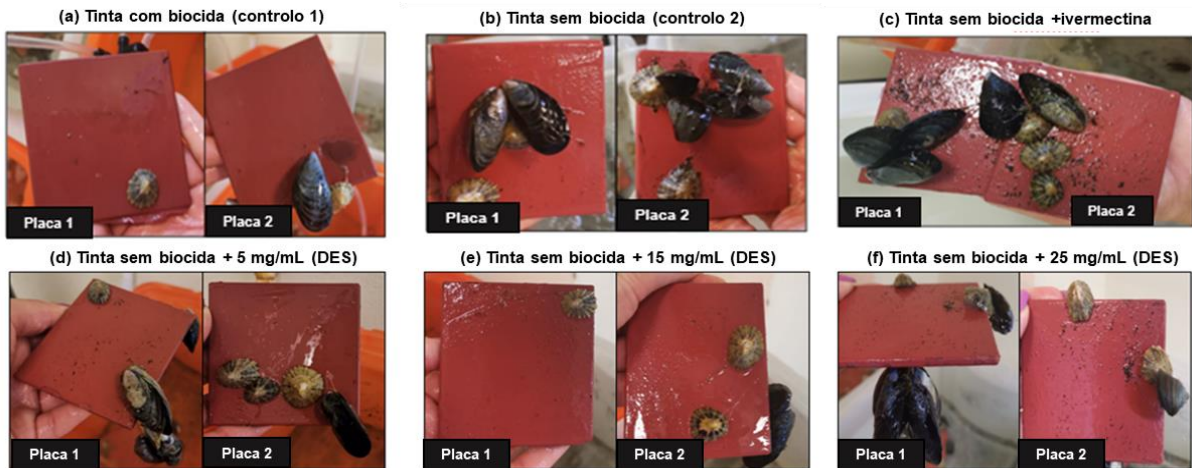


Figura 3.17. Aplicação do sistema Men:OL (1:1) em tinta náutica. Estudo de novas concentrações do DES e análise da evolução do processo de *fouling* exercido pelos animais - dia 2 (14/09/2021). Na imagem estão apresentadas as duas placas em teste correspondentes aos respetivos tanques.

Os tanques relativos à tinta sem biocida (Figura 3.17 – (b)) e à tinta sem biocida com incorporação de ivermectina (Figura 3.17 – (c)) foram os que apresentaram maior nível de *fouling*. As placas de tinta com incorporação das diferentes concentrações do sistema Men:OL (1:1) demonstraram um menor grau de adesão por parte dos organismos. Além disso, à medida que a concentração do sistema aumentou pôde notar-se uma menor adesão dos organismos, sendo que na concentração mais elevada do DES os mexilhões e as lapas estavam mais fracamente ligados às placas com a respetiva tinta.

Neste dia, registou-se a morte de 2 lapas no tanque da tinta com biocida, restando nesse mesmo tanque 4 lapas (66,67%) em estudo (Tabela 3.6).

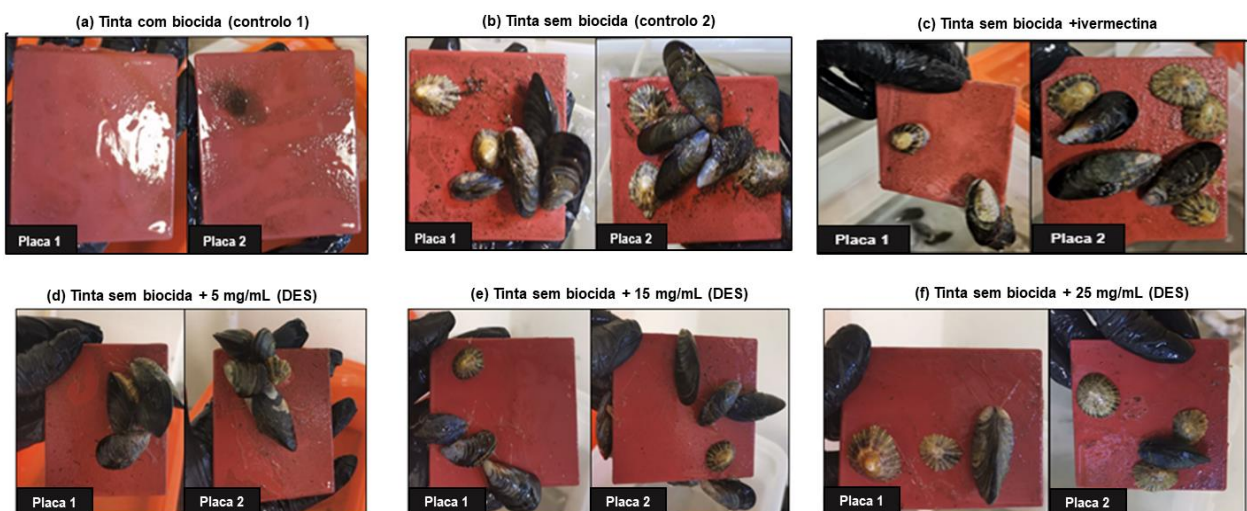


Figura 3.18. Aplicação do sistema Men:OL (1:1) em tinta náutica. Estudo de novas concentrações do DES e análise da evolução do processo de *fouling* exercido pelos animais - dia 7 (21/09/2021). Na imagem estão apresentadas as duas placas em teste correspondentes aos respetivos tanques.

A Figura 3.18 diz respeito ao sétimo dia de ensaio. As placas de tinta com biocida (Figura 3.18 – (a)) foram as únicas que não apresentaram nenhum organismo ligado. A tinta sem biocida (Figura 3.18 - (b)) e a tinta sem biocida com incorporação de ivermectina (Figura 3.18 - (c)), foram os casos que apresentaram maior grau de adesão por parte das lapas e dos mexilhões, sendo que o segundo em menor grau devido à presença da ivermectina que acrescenta poder *antifouling* à tinta sem biocida.

Comparativamente a estes últimos, é possível verificar que os tanques com as placas de tinta que contêm o DES apresentaram uma menor adesão por parte dos organismos. Na menor concentração do DES (5 mg DES/mL de tinta sem biocida) (Figura 3.18 – (d)), verificou-se um maior nível de adesão por parte dos mexilhões. À medida que a concentração aumentou, esta adesão por parte dos mexilhões tornou-se mais enfraquecida, sendo que na concentração mais alta apenas um mexilhão se encontrava ligado a cada uma das placas, estando preso pelo bisso. Por outro lado, também foi verificado que as lapas se encontravam mais fracamente aderidas às placas de tinta nesta concentração. É de salientar que nas placas revestidas com a tinta com biocida se verificou uma mancha escura, provavelmente devida ao efeito tóxico do cobre. No estudo anterior este aspeto também foi verificado.

Neste dia, foi registada a morte de 2 lapas no tanque da tinta com biocida, restando nesse mesmo tanque 2 lapas (50%) em estudo (Tabela 3.6). É de salientar que, neste dia, todas as lapas em estudo tinham acabado por morrer em dias anteriores do ensaio.

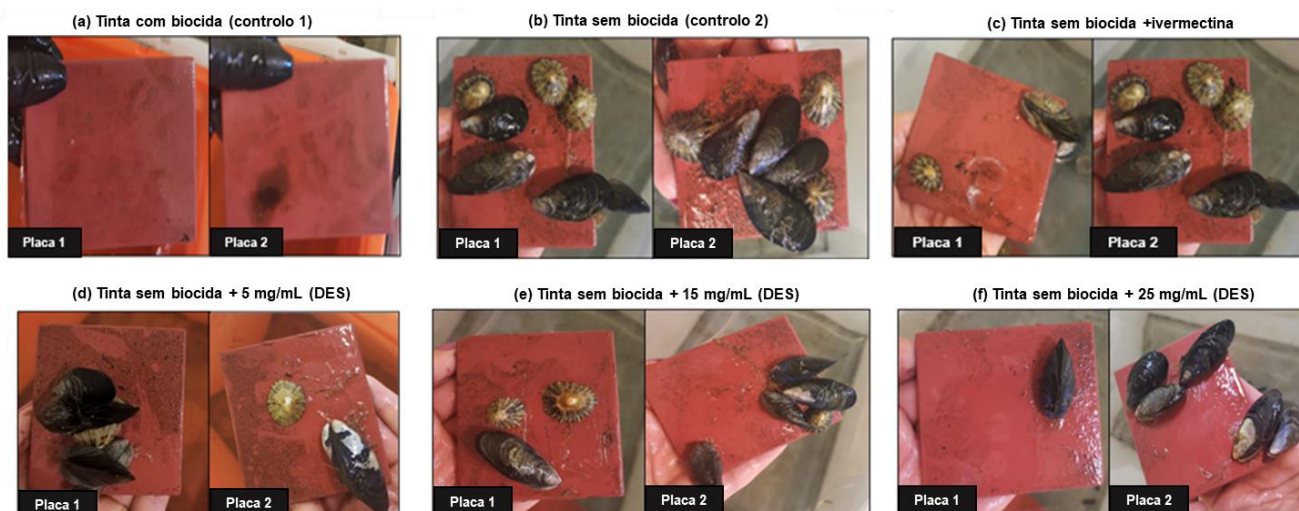


Figura 3.19. Aplicação do sistema Men:OL (1:1) em tinta náutica. Estudo de novas concentrações do DES e análise da evolução do processo de *fouling* exercido pelos animais - dia 10 (25/09/2021). Na imagem estão apresentadas as duas placas em teste correspondentes aos respetivos tanques.

A Figura 3.19 diz respeito ao décimo (e último) dia de ensaio. Tal como nos dias anteriores registados, a tinta sem biocida (Figura 3.19 - (b)) e a tinta sem biocida com incorporação de ivermectina (Figura 3.19 - (c)), continuaram a apresentar maior grau de adesão por parte dos organismos. No entanto, a adesão por parte dos organismos às placas demonstrou ser ainda mais fraca no caso da tinta sem biocida com incorporação de ivermectina. Este composto demonstrou algum poder *antifouling*, no entanto, é possível notar que este efeito *antifouling* foi muito superior nas tintas em que o sistema eutético estava incorporado. Além disso, também se verificou que o aumento da

concentração de DES continuou a coincidir com uma maior capacidade *antifouling*. É de salientar que no tanque com a maior concentração do DES (Figura 3.19 - (f)), as lapas não aderiram às placas com a tinta. Isto demonstra o poder *antifouling* do sistema eutético. Neste dia, registou-se a morte do único mexilhão em estudo, no tanque da tinta com biocida (Tabela 3.6). Deste modo, o ensaio terminou ao décimo dia do ensaio.

Neste segundo ensaio é possível verificar que, a estas concentrações, o sistema eutético Men:OL (1:1) continuou a desempenhar o seu poder *antifouling*, sendo que a concentração 25 mg /mL (DES) demonstrou maior capacidade em minimizar a adesão por parte dos microrganismos.

A morte cumulativa dos organismos ao longo do mesmo também foi estudada. A Tabela 3.6 resume o número de mexilhões e lapas em estudo no decorrer do segundo ensaio. A diminuição do número de organismos observada foi devido à mortalidade.

Tabela 3.6. Registo do número de mexilhões e lapas no decorrer do segundo ensaio relativo à incorporação de novas concentrações do DES nas tintas náuticas e simulação da sua aplicação em estruturas marinhas. A diminuição do número de organismos foi devida a falecimento. M – Mexilhões; L – Lapas. Em cada tanque estavam presentes 9-10 mexilhões e 6-8 lapas.

Tanque	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L
Tinta sem biocida	9	7	9	7	9	7	9	6	9	6	9	5	9	5	9	5	9	5	9	5
Tinta com biocida	9	6	9	4	9	4	9	4	9	0	4	0	2	0	2	0	1	0	0	0
Tinta sem biocida + ivermectina	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6
Tinta sem biocida + DES (5 mg/ml)	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6
Tinta sem biocida + DES (15 mg/ml)	9	6	9	6	9	6	9	6	9	5	8	5	8	5	8	5	8	5	8	5
Tinta sem biocida + DES (25 mg/ml)	10	8	10	8	10	8	10	8	10	8	10	8	10	8	10	8	10	8	10	8

Tal como no primeiro ensaio, verificou-se um elevado número de animais mortos no tanque correspondente à tinta com biocida. Na tinta sem biocida + 15 mg/mL (DES) foram verificadas as mortes de um mexilhão e uma lapa, no entanto, estas mortes foram devidas, muito provavelmente, à idade dos animais, uma vez que na concentração mais elevada do DES não foi verificada nenhuma morte.

Relativamente à ivermectina, diversos estudos demonstraram que este composto seria um substituto promissor para o material *antifouling* marinho ⁶. No entanto, no presente estudo, o sistema eutético demonstrou maior capacidade *antifouling* comparativamente à ivermectina mesmo na sua concentração mais baixa. A quantidade dissolvida de ivermectina na tinta foi de 130 mg, ou seja, na tinta estava presente uma concentração de 13 mg/mL (uma vez que a massa de ivermectina referida foi dissolvida em 10 mL de tinta). Esta concentração foi superior à concentração mais baixa do DES testada e muito semelhante à segunda concentração de DES testada (15 mg/mL). Os resultados face a esta nova variável vieram enfatizar o potencial do nosso sistema eutético neste ramo da indústria náutica.

Infelizmente, uma vez que a quantidade do extrato marinho contendo as napiradiomicinas de que dispúnhamos era relativamente reduzida e que o mesmo não se encontrava purificado, não nos foi possível a realização destes ensaios com este aditivo. Por forma a complementar este estudo, seria

interessante a obtenção de uma maior quantidade de extrato purificado, mais concentrado nos agentes *antifouling* napiradiomicinas.

Este campo dos sistemas eutéticos no mundo das tintas náuticas é uma área sem referências na literatura, pelo que não nos é possível realizar uma comparação com outras conclusões advindas de outros estudos.

3.7. Ensaios bioquímicos em organismos marinhos

Durante o período de exposição, os parâmetros da qualidade da água permaneceram estáveis, nomeadamente, pH e temperatura ($7,78 \pm 0,18$ e $22,4 \pm 0,7$ °C, respetivamente). No processo de dissecação dos animais não foi observada perda de integridade e/ou escurecimento das brânquias e/ou glândulas nem das lapas. As medidas do peso das brânquias ($189,96 \pm 73,69$ mg) e das glândulas digestivas ($112,17 \pm 46,91$) não sugeriram alterações após a exposição ao DES. Em vez disso, as variações foram atribuídas à aleatoriedade natural dos indivíduos. Nas lapas também não foram verificadas alterações nas medidas do peso ($399,23 \pm 80,17$) após a exposição ao sistema eutético.

3.7.1. Determinação de biomarcadores

Os resultados dos biomarcadores repartem-se em 3 grupos:

- **Grupo 1** - Concentrações de DES dissolvidas diretamente na água: 0 mg/L (controlo); 20 mg/L; 38,5 mg/L; 75 mg/L; 150 mg/L; 300 mg/L e 500 mg/L de DES.
- **Grupo 2** – Concentrações do DES dissolvidas em etanol (ensaio preliminar): controlo (etanol) e 500 mg/L DES dissolvido em etanol.
- **Grupo 3** – Concentrações do DES incorporadas na tinta náutica sem biocida: 2 mg/mL; 5 mg/mL; 15 mg/mL; 25 mg/mL e 50 mg/mL. Os controlos utilizados foram: tinta náutica com e sem biocida.

Os biomarcadores de *stress* oxidativo utilizados para avaliar as consequências toxicológicas do sistema Men:OL (1:1) foram CAT, SOD, GPx, GST, TAC e peroxidação lipídica. Deste modo, pretendeu-se entender se o sistema eutético poderá afetar, ou até mesmo inibir, vias enzimáticas e metabólicas através do *stress* oxidativo desencadeado pela produção de ROS, ao estar em contacto com os organismos. As diferenças significativas registadas ao nível dos ensaios bioquímicos são apresentadas em Anexos (Tabelas A1-A5).

3.7.2. Ensaio de Bradford

Tal como esperado, no caso dos mexilhões, foi detetada, de um modo geral, maior quantidade de proteína nas glândulas digestivas do que nas brânquias. Relativamente às lapas, os valores foram superiores aos órgãos anteriores, no entanto, neste caso, foi analisado o organismo total, sendo que nos mexilhões foram utilizados órgãos individualizados (brânquias e glândulas digestivas). No entanto, a determinação da proteína total nos órgãos analisados teve como objetivo a normalização dos biomarcadores em função da massa de proteína.

3.7.3. Glutathione-S-transferase (GST)

3.7.3.1. Grupo 1

Os resultados da atividade da GST, expressos em nmol/min/mg de proteína citosólica, relativos ao grupo 1 são apresentados na Figura 3.20.

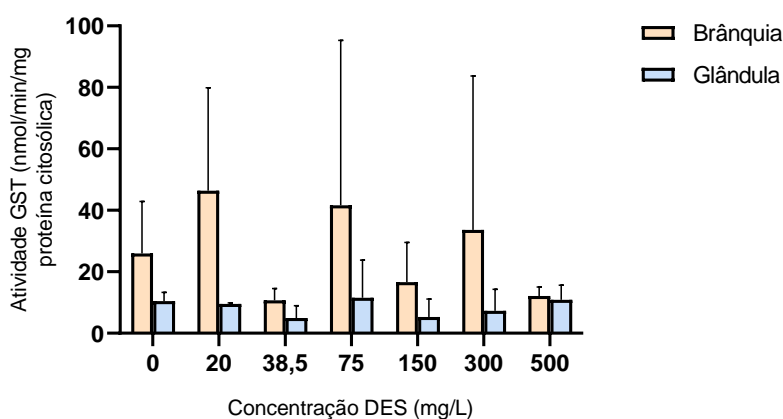


Figura 3.20. Atividade GST (média \pm DP nmol/min/mg proteína citosólica) do grupo 1, nas brânquias e glândulas digestivas de *M.edulis*, expostas a diferentes concentrações do sistema Men:OL (1:1).

Em ambos os órgãos dos mexilhões, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o controlo (0 mg/L (DES)) e as várias concentrações do DES. Assim, foi possível inferir que nenhuma das condições às quais estes organismos foram expostos foi suficiente para causar alterações na atividade da GST.

3.7.3.2. Grupo 2

A atividade da GST relativa ao grupo 2 que envolveu o uso de etanol (ensaio preliminar) encontra-se representada na Figura 3.21.

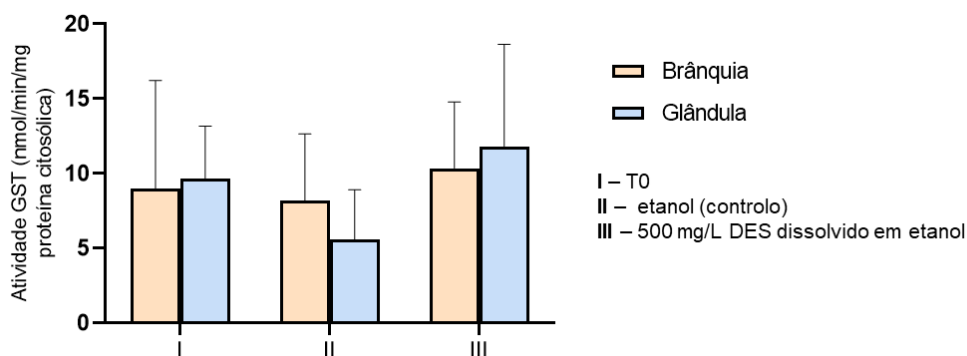


Figura 3.21. Atividade GST (média \pm DP nmol/min/mg proteína citosólica), nas brânquias e glândulas digestivas de *M.edulis*, relativa ao ensaio do grupo 2.

Neste ensaio preliminar não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o T0 e o controlo (etanol). Isto significa que os mexilhões não sofreram alterações entre a chegada ao laboratório para aclimação (T0) e os controlos (com etanol) dos ensaios de exposição. Também não foram registadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o controlo e o DES (500 mg/L) dissolvido em etanol. Deste modo, os resultados sugerem que a adição do sistema eutético ao meio não promoveu o *stress* oxidativo nos mexilhões. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos no grupo anterior (grupo 1). Assim, apesar de se ter verificado que não houve uma dissolução completa do DES no solvente etanol, o sistema eutético foi absorvido mais eficientemente pelos mexilhões e a concentração mais elevada do mesmo (500 mg/L) não induziu alterações ao nível deste mecanismo de *stress* oxidativo, tal como verificado no ensaio do grupo 1.

3.7.3.3. Grupo 3

A atividade da GST relativamente ao ensaio do grupo 3 (tinta náutica com incorporação de várias concentrações do DES), expressa em nmol/min/mg proteína citosólica, encontra-se apresentada na Figura 3.22.

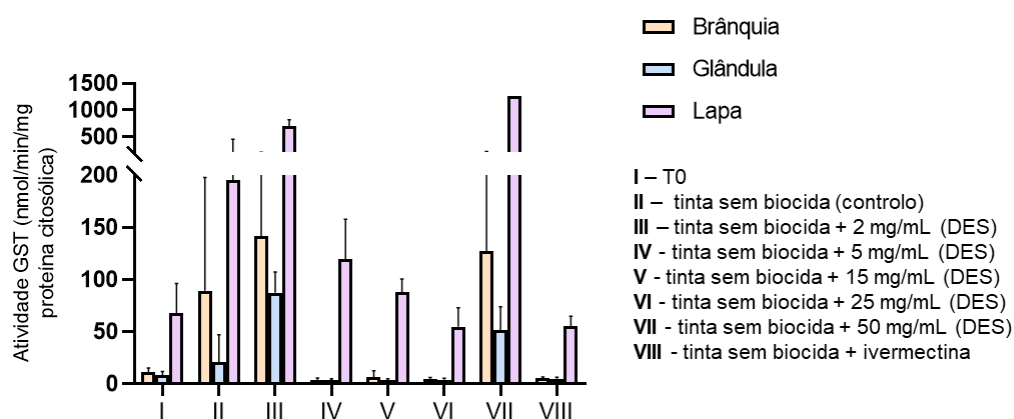


Figura 3.22. Atividade GST (média \pm DP nmol/min/mg proteína citosólica), relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M. edulis* (brânquias e glândulas digestivas) e lapas *P. vulgata*.

Os mexilhões revelaram não ter sofrido alterações na atividade da GST entre os animais à chegada ao laboratório para aclimação (T0) e os animais controlo dos ensaios de exposição com as placas com tinta sem biocida, ou seja, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre T0 e os controlos do ensaio de exposição. Relativamente às brânquias, as amostras expostas às diversas concentrações do DES também não evidenciaram alterações significativas quando comparadas com o controlo tinta sem biocida. Assim sendo, o sistema eutético parece não induzir um aumento significativo na atividade da GST, nas brânquias, o que indicaria *stress* oxidativo.

Quanto às glândulas digestivas, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo (tinta sem biocida) e a concentração mais baixa e mais elevada do DES (2 mg/mL e 50 mg/mL, respetivamente) (Tabela A1, em anexos). Neste caso, o aumento da atividade desta enzima parece evidenciar *stress* oxidativo sobre este órgão. Contudo, este efeito sobre a concentração mais baixa,

sem que ocorram alterações significativas nas concentrações intermédias de exposição, permanece por esclarecer.

Nas lapas não foram registadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o T0 e o controlo tinta sem biocida, bem como, entre o controlo e as várias concentrações do DES. Assim, pode inferir-se que o sistema eutético não induziu alterações significativas na atividade da GST, não evidenciando a existência de *stress* oxidativo nas lapas, após o período de exposição.

O composto ivermectina não revelou diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controlo tinta sem biocida. No entanto, algumas diferenças significativas ($p < 0,05$) foram reveladas com o sistema Men:OL (1:1) no caso dos mexilhões, nomeadamente, na concentração mais reduzida e na mais elevada do DES (2 mg/mL e 50 mg/mL, respetivamente) (Tabela A1, em anexos). Isto pode indicar que, em termos de toxicidade, a exposição ao DES é diferente da exposição à ivermectina. No entanto, mais ensaios seriam necessários para compreender se estas alterações foram devidas a fatores externos não testados (como sexo e idade/crescimento do animal). Este aspeto poderia ser resolvido aumentando o número de organismos por ensaio ou repartir os mesmos relativamente ao sexo.

3.7.4. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima que causou uma inibição de 50%.

3.7.4.1. Grupo 1

Os resultados da SOD, expressos em % inibição, relativos ao grupo 1 são apresentados na Figura 3.23.

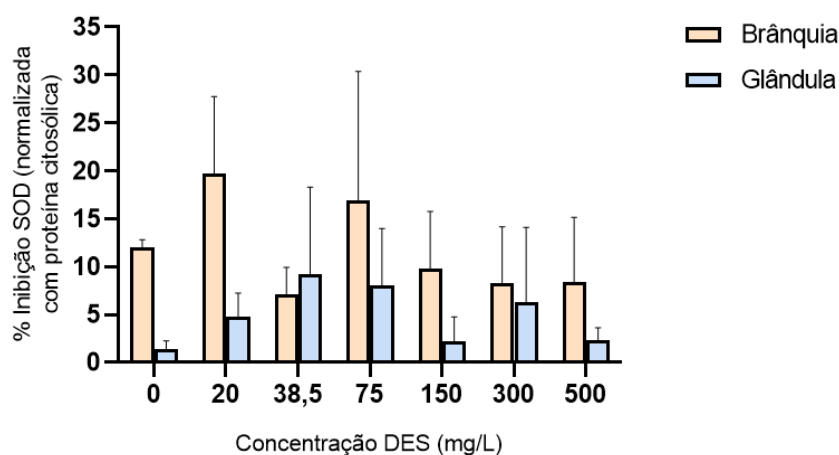


Figura 3.23. Percentagem de inibição SOD (média \pm DP) do grupo 1, nas brânquias e glândulas digestivas de *M. edulis* expostas a diferentes concentrações do sistema Men:OL (1:1).

Não foram detetadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os mexilhões expostos às diversas concentrações do sistema eutético e o controlo (0 mg/L (DES)). Deste modo, é possível inferir

que o sistema eutético não provocou a indução desta enzima antioxidante nos mexilhões, sugerindo não haver *stress* oxidativo por exposição ao DES.

3.7.4.2. Grupo 2

No caso do ensaio preliminar que envolveu o uso de etanol (grupo 2), os níveis de SOD obtidos para as respetivas amostras encontram-se representadas na Figura 3.24.

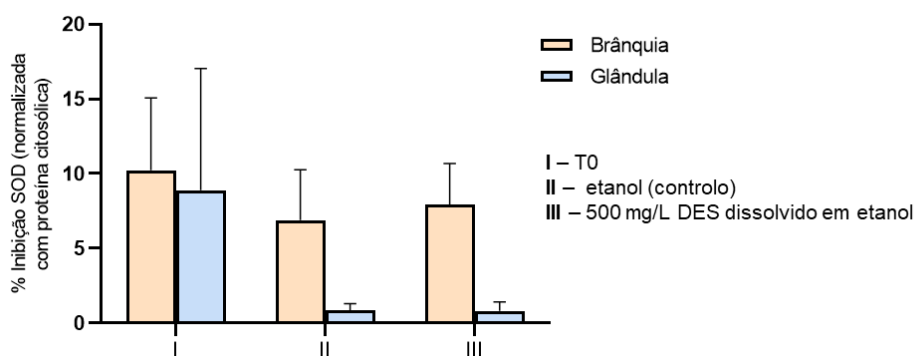


Figura 3.24. Percentagem de inibição SOD (média \pm DP), nas brânquias e glândulas digestivas de *M. edulis*, relativa ao ensaio do grupo 2.

Em ambos os órgãos dos mexilhões (brânquias e glândulas digestivas) não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) na SOD (% de inibição) entre o T0 e o controlo (etanol), ou seja, o etanol parece não ter causado alterações neste mecanismo de combate ao *stress* oxidativo. Uma vez que também não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o controlo (etanol) e as amostras expostas a 500 mg/L DES dissolvido em etanol, o sistema eutético não provocou alterações na atividade desta enzima de combate ao *stress* oxidativo. Assim sendo, estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos no ensaio anterior (grupo 1), sendo que o DES na concentração mais elevada (500 mg/L) não demonstrou induzir *stress* oxidativo nos mexilhões, relativamente à SOD.

3.7.4.3. Grupo 3

Os resultados de SOD relativos ao grupo 3 (tintas náuticas) estão apresentados na Figura 3.25.

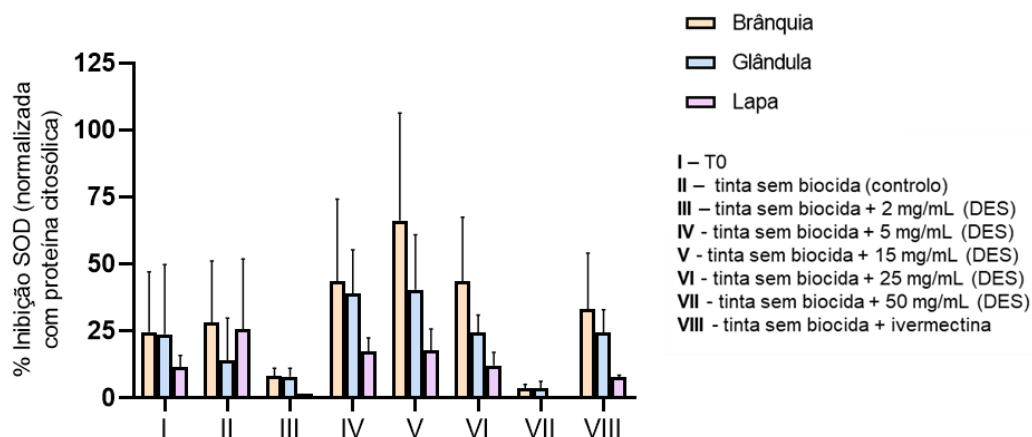


Figura 3.25. Percentagem de inibição SOD (média \pm DP), relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M. edulis* (brânquias e glândulas digestivas) e lapas *P. vulgata*.

Segundo a análise estatística, em ambos os organismos marinhos, as amostras relativas ao T0 e ao controlo tinta sem biocida não registaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Assim sendo, os mexilhões e as lapas não demonstraram sofrer alterações na atividade da SOD (% de inibição), entre a chegada ao laboratório para aclimação (T0) e os ensaios de exposição com a tinta sem biocida.

Relativamente às brânquias dos mexilhões, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o controlo e as várias concentrações do sistema eutético. Por sua vez, nas glândulas digestivas foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo (tinta sem biocida) e 15 mg/mL (DES) (Tabela A2, em anexos). Desta forma, o sistema eutético demonstrou provocar, de certo modo, algumas alterações ao nível desta enzima antioxidante, sugerindo alguma toxicidade para este órgão. Contudo, uma vez que entre o controlo e as concentrações mais elevada do DES (25 e 50 mg/mL) não foram observadas diferenças significativas, seria necessário a realização de mais ensaios para entender se este *stress* oxidativo poderia ter origem em fatores externos, como, por exemplo, sexo e idade dos mexilhões.

Nas lapas, o sistema eutético não induziu alterações nos mecanismos de *stress* oxidativo, uma vez que não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as diferentes concentrações de DES e o controlo tinta sem biocida.

O composto ivermectina não revelou, nos dois organismos testados, diferenças significativas ($p > 0,05$) relativamente ao controlo tinta sem biocida e às diversas concentrações do DES testadas. Deste modo, o sistema Men:OL (1:1) revelou efeitos semelhantes à ivermectina, no sentido de não se ter observado alterações nesta enzima de *stress* oxidativo. A ivermectina tem vindo a ser utilizada em tintas para inibição de *macrofouling*, além de ser também aplicada para uso humano. Deste modo, o facto de os efeitos do DES terem demonstrado ser semelhantes aos efeitos da ivermectina, no sentido de não provocarem alterações nos níveis de SOD, é um aspeto muito favorável para a aplicação futura do nosso sistema eutético em tintas *antifouling*, demonstrando que o nosso DES parece não apresentar toxicidade, tal como sucede para ivermectina.

3.7.5. Catalase

3.7.5.1. Grupo 1

A atividade da catalase relativa ao grupo 1 encontra-se representada na Figura 3.26.

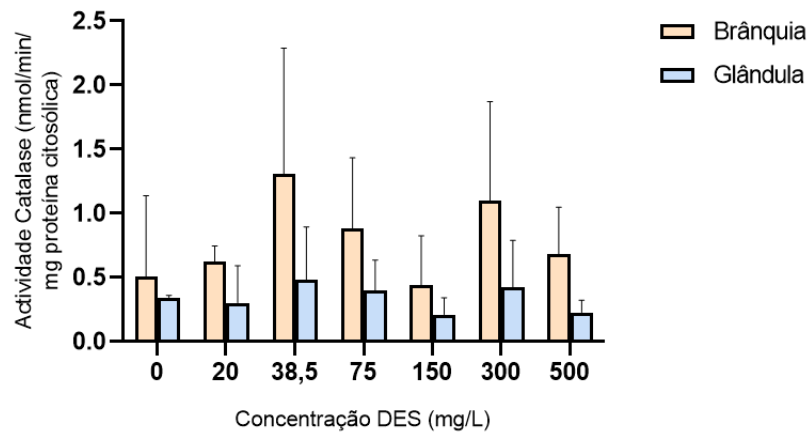


Figura 3.26. Atividade da catalase (média \pm DP nmol/min/mg proteína citosólica) do grupo 1, nas brânquias e glândulas digestivas de *M.edulis*, expostas a diferentes concentrações do sistema Men:OL (1:1).

A análise estatística não revelou, em ambos os órgãos dos mexilhões, diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as amostras dos animais expostos às diversas concentrações do DES e o controle (0 mg/L (DES)). Assim, apesar de se verificar alguma variabilidade na atividade da catalase com o aumento da concentração do DES, os mexilhões não apresentaram, portanto, alterações nesta enzima antioxidante após exposição ao DES.

3.7.5.2. Grupo 2

A atividade da catalase relativa ao grupo 2 (ensaio preliminar com etanol) encontra-se apresentada na Figura 3.27.

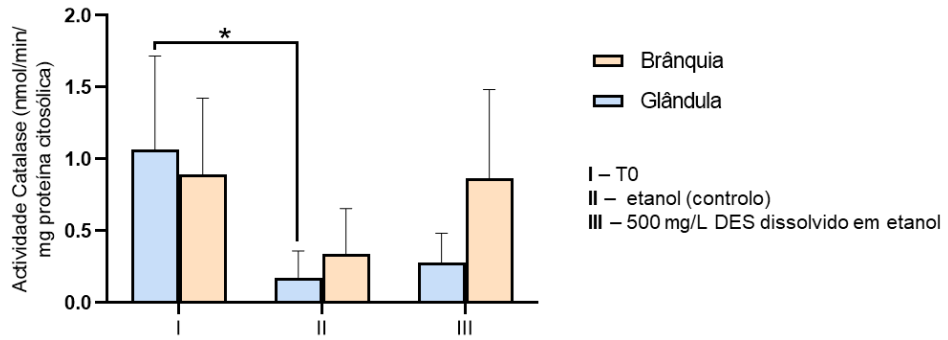


Figura 3.27. Atividade da catalase (média \pm DP nmol/min/mg proteína citosólica), nas brânquias e glândulas digestivas de *M. edulis*, relativa ao ensaio do grupo 2. As diferenças significativas obtidas foram representadas por *.

Relativamente às brânquias não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Por sua vez, ao nível das glândulas digestivas, foram detetadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o T0 e o controlo (etanol) (Tabela A3, em anexos). Isto denota que os animais T0, com níveis mais elevados de catalase, sofreram algum *stress* adicional aquando da chegada ao laboratório e que diminuiu após o período de aclimação e o início dos ensaios de exposição.

Por sua vez, não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o controlo e os animais expostos a 500 mg/L DES dissolvido em etanol, o que sugere que o sistema eutéctico não provocou alterações nos níveis desta enzima antioxidante, indicando que a exposição ao DES não causou *stress* oxidativo, apesar de se ter verificado que não houve uma dissolução completa do DES neste solvente (etanol). Estes resultados estão de acordo com os obtidos no grupo 1.

3.7.5.3. Grupo 3

Quanto ao ensaio do grupo 3 (tintas náuticas), a atividade da catalase, expressa em nmol/min/mg proteína citosólica, encontra-se representada na Figura 3.28.

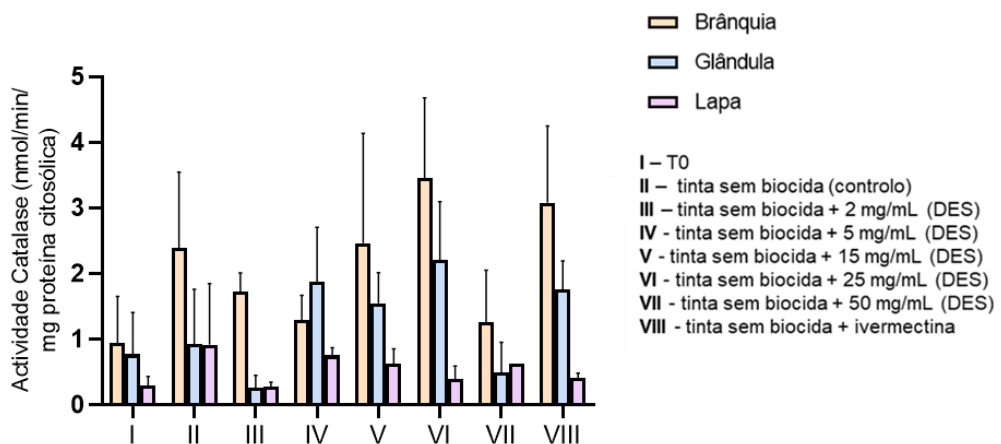


Figura 3.28. Atividade da catalase (média \pm DP nmol/min/mg proteína citosólica), relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M. edulis* (brânquias e glândulas digestivas) e lapas *P. vulgata*.

Nos vários organismos, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o T0 e o controlo (tinta sem biocida). Deste modo, deduz-se que os animais não sofreram alterações na atividade desta enzima, entre a chegada ao laboratório (T0) em comparação com os controlos (tinta sem biocida) dos ensaios de exposição.

No que diz respeito aos mexilhões, tanto nas brânquias como nas glândulas digestivas, as várias amostras dos animais expostos às diversas concentrações do DES não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controlo. Neste sentido, o sistema eutético indicou não promover alterações ao nível da atividade da catalase, não causando o *stress* oxidativo. Quanto às lapas também não se registaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Relativamente ao composto ivermectina não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) comparativamente ao controlo e às diversas concentrações do nosso sistema eutético Men:OL (1:1). Deste modo, não existe toxicidade significativa, tanto ao nível do DES como da ivermectina. Portanto, o DES revelou efeitos semelhantes à ivermectina, no sentido de não se ter observado alterações nesta enzima de *stress* oxidativo

3.7.6. Glutathiona peroxidase (GPx)

3.7.6.1. Grupo 1

Os resultados da atividade da GPx, expressos em nmol/min/mg proteína citosólica, relativos ao grupo 1, são apresentados na Figura 3.29.

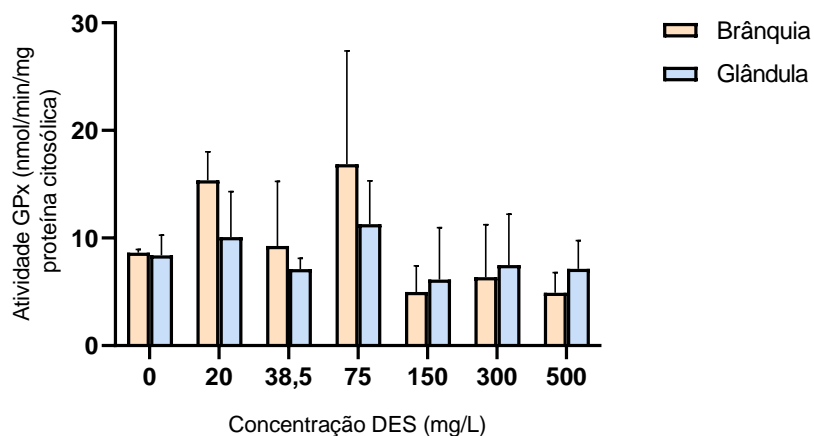


Figura 3.29. Atividade GPx (média \pm DP nmol/min/mg proteína citosólica) do grupo 1, nas brânquias e glândulas digestivas de *M.edulis*, expostas a diferentes concentrações do sistema Men:OL (1:1).

A análise estatística revelou que não foram detetadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre ambos os órgãos dos mexilhões expostos às diversas concentrações do sistema eutético e os respetivos controlos (0 mg/L (DES)). Deste modo, o sistema eutético demonstrou não causar alterações nesta enzima de *stress* oxidativo, em comparação com os controlos.

3.7.6.2. Grupo 2

Relativamente ao grupo 2 (ensaio preliminar com etanol), a atividade da GPx (expressa em nmol/min/mg proteína citosólica) encontra-se representada na Figura 3.30.

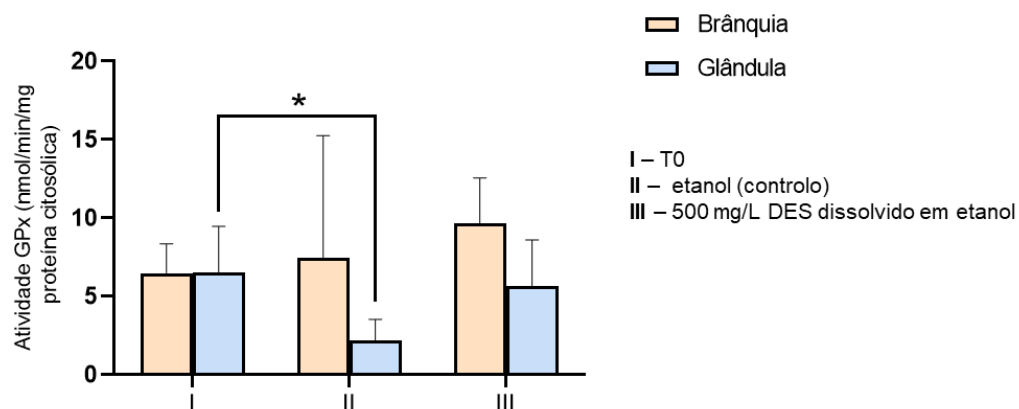


Figura 3.30. Atividade GPx (média \pm DP nmol/min/mg proteína citosólica), nas brânquias e glândulas digestivas de *M.edulis*, relativa ao ensaio do grupo 2. As diferenças significativas obtidas foram representadas por *.

Foram registadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o T0 e o controlo (etanol) nas glândulas digestivas (Tabela A4, em anexos). Desta forma, a exposição ao etanol parece ter tido um efeito na atividade desta enzima antioxidante de *stress* oxidativo. Por sua vez, não foram registadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o controlo e as amostras dos animais expostos a 500 mg/L de DES dissolvido em etanol. Assim sendo, e apesar do sistema eutético não se ter dissolvido totalmente no solvente etanol, o DES não provocou alterações ao nível da atividade desta enzima. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos nos ensaios do grupo 1, onde a concentração mais elevada do sistema eutético (500 mg/L) não induziu *stress* oxidativo nestes organismos.

3.7.6.3. Grupo 3

A atividade da GPx para o grupo 3 (tintas náuticas com incorporação do DES) é apresentada na Figura 3.31.

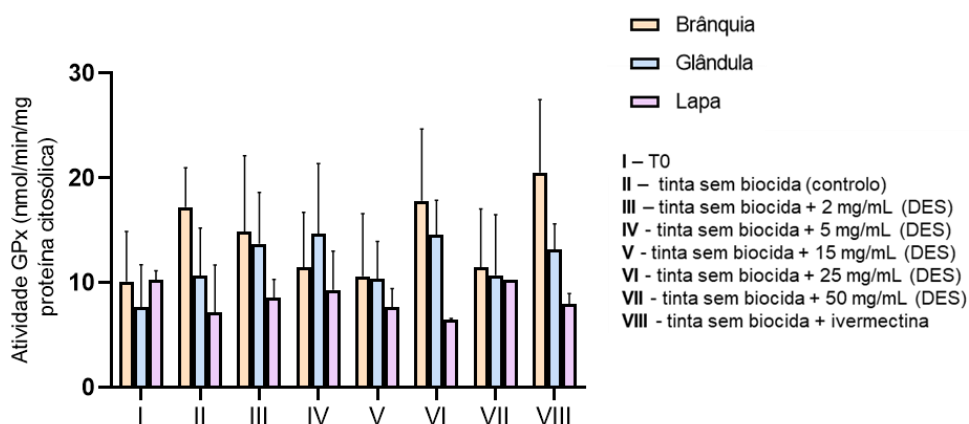


Figura 3.31. Atividade GPx (média \pm DP nmol/min/mg proteína citosólica), relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M.edulis* (brânquias e glândulas digestivas) e lapas *P. vulgata*.

Para os dois organismos em estudo não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre T0 e o controle (tinta sem biocida), não se registando, por isso, alterações ao nível desta enzima de *stress* oxidativo quando expostos à tinta sem biocida. O mesmo se observou entre o controle e as várias concentrações do DES, não se registando diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controle. Deste modo, os resultados sugerem que a exposição ao sistema eutético não induz a ação deste mecanismo de combate ao *stress* oxidativo, tanto nos mexilhões como nas lapas.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o composto ivermectina e as diversas concentrações do DES, nos dois organismos testados. Deste modo, o nosso sistema eutético e a ivermectina (já utilizada em tintas náuticas) não parecem apresentar toxicidade relevante.

3.7.7. Capacidade antioxidante total (TAC)

3.7.7.1. Grupo 1

A TAC relativa ao ensaio do grupo 1, medida em brânquias e glândulas digestivas, é apresentada na Figura 3.32.

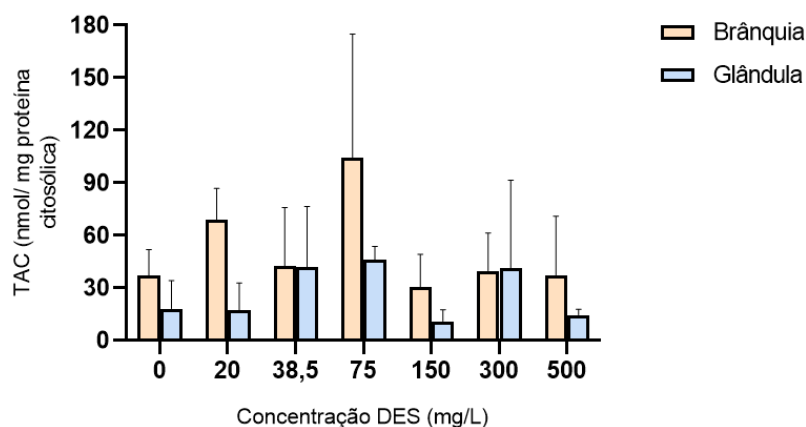


Figura 3.32. Capacidade antioxidante total (média \pm DP nmol/mg proteína citosólica) do grupo 1, nas brânquias e glândulas digestivas de *M.edulis* expostas a diferentes concentrações do sistema Men:OL (1:1).

Ambos os órgãos dos mexilhões não revelaram alterações significativas ($p > 0,05$) entre o controlo (0 mg/L (DES)) e as várias concentrações do sistema eutético. Assim, a produção de antioxidantes não foi induzida após a exposição a nenhuma das concentrações do DES testadas, o que sugere que o sistema eutético não causa *stress* oxidativo suficiente que leve os tecidos a aumentar a produção de antioxidantes para combater o *stress* oxidativo nos mexilhões.

3.7.7.2. Grupo 2

No caso do ensaio relativo ao grupo 2 (ensaio preliminar com etanol), os níveis da TAC, expressos em nmol/mg proteína citosólica, encontram-se representados na Figura 3.33.

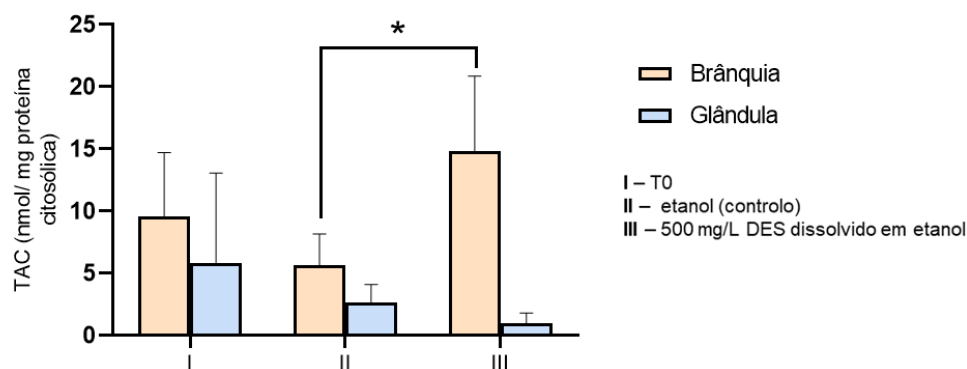


Figura 3.33. Capacidade antioxidante total (média \pm DP nmol/mg proteína citosólica), nas brânquias e glândulas digestivas de *M.edulis*, relativa ao ensaio do grupo 2. As diferenças significativas obtidas foram representadas por *.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o T0 e o controlo (etanol). Portanto, a presença de etanol não causou alterações ao nível da capacidade antioxidante total em comparação com os animais T0. Por outro lado, ao nível das brânquias, registaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as amostras dos animais expostos a 500 mg/L DES dissolvido em etanol. Este aspeto não se verificou para as glândulas digestivas dos animais expostos a esta

concentração do DES dissolvido em etanol, onde não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Assim sendo, o sistema eutético indicou promover alterações ao nível da capacidade antioxidante total para os tecidos das brânquias. Estes resultados não estão de acordo com os resultados anteriores do grupo 1, onde 500 mg/L DES não promoveu *stress* oxidativo nos tecidos das brânquias e glândulas digestivas. Isto pode ser indicativo de que o sistema eutético, ao estar dissolvido em etanol, tem a sua solubilidade aumentada no meio, sendo, portanto, melhor absorvido pelos mexilhões e promovendo, de certo modo, alterações ao nível da capacidade antioxidante total para os tecidos das brânquias.

3.7.7.3. Grupo 3

Relativamente ao ensaio do grupo 3 (tintas náuticas com incorporação de várias concentrações do DES), os resultados obtidos para a TAC, expressos em nmol/mg de proteína citosólica, estão representados na Figura 3.34.

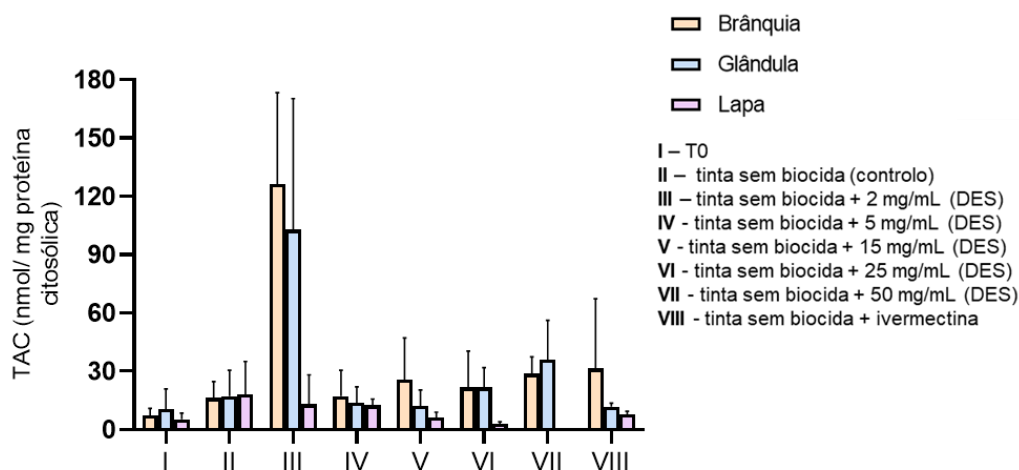


Figura 3.34. Capacidade antioxidante total (média \pm DP nmol/mg proteína citosólica), relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M. edulis* (brânquias e glândulas digestivas) e lapas *P. vulgata*.

Não foram registadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o T0 e o controlo (tinta sem biocida), em ambos os órgãos dos mexilhões. Relativamente às brânquias, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as amostras dos animais expostos à tinta sem biocida + 2 mg/mL (DES) (Tabela A3, em anexos). Isto sugere alguma capacidade do DES causar um aumento da capacidade antioxidante total. Este efeito observado apenas na concentração de exposição mais baixa permanece por esclarecer. No entanto, estas alterações podem ter sido induzidas por fatores externos, sendo necessário realizar mais ensaios para uma melhor compreensão e esclarecimento dos resultados.

Nas glândulas digestivas dos mexilhões não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as várias concentrações do DES. Assim, o sistema eutético não levou a um aumento da capacidade antioxidante total neste órgão, o que parece indicar não existir um efeito da exposição ao DES sobre este mecanismo de combate ao *stress* oxidativo.

Nas lapas não foram registadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as várias concentrações do DES. Portanto, o sistema eutético não causou alterações na capacidade antioxidante, sugerindo que o DES não causa *stress* oxidativo nos organismos marinhos testados.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o composto ivermectina e o controlo tinta sem biocida. A ivermectina registou diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente aos animais expostos à concentração mais baixa do DES (ao nível das brânquias) (Tabela A3, em anexos). Deste modo, e uma vez que estas diferenças significativas não foram observadas para as restantes concentrações mais elevadas do DES, seriam necessários mais ensaios para compreender se estas alterações são devidas a fatores externos, como já referido anteriormente.

3.7.8. Peroxidação lipídica

3.7.8.1. Grupo 1

Os resultados da peroxidação lipídica, expressos em pmol/mg proteína citosólica, relativos ao ensaio do grupo 1 estão representados na Figura 3.35.

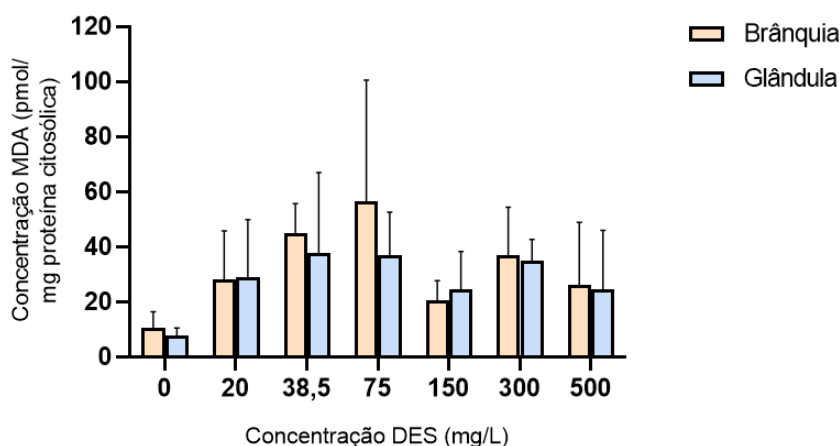


Figura 3.35. Concentração MDA (média \pm DP pmol/mg proteína citosólica) do grupo 1, nas brânquias e glândulas digestivas de *M. edulis* expostas a diferentes concentrações do sistema Men:OL (1:1).

A exposição às várias concentrações do DES provocaram uma tendência para um aumento no conteúdo de MDA comparativamente ao controlo (0 mg/L (DES)). No entanto, segundo os resultados da análise estatística, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o controlo e as várias concentrações do sistema eutético, em ambos os órgãos dos mexilhões. Portanto, os resultados parecem sugerir que o sistema eutético não provoca alterações relevantes ao nível da peroxidação lipídica, indicador de *stress* oxidativo, nos mexilhões expostos.

3.7.8.2. Grupo 2

A concentração de MDA (pmol/mg proteína citosólica) para as amostras do grupo 2 (ensaio preliminar com etanol), encontram-se representadas na Figura 3.36.

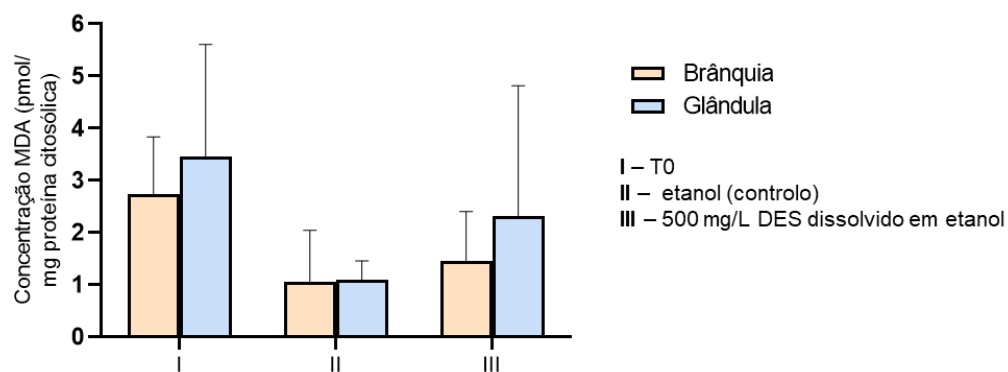


Figura 3.36. Concentração MDA (média \pm DP pmol/mg proteína citosólica), nas brânquias e glândulas digestivas de *M.edulis*, relativa aos ensaios do segundo grupo.

Segundo a análise estatística, realizada em ambos os órgãos dos mexilhões, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o T0 e o controlo (etanol). Também não foram registadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as amostras expostas a 500 mg/L DES dissolvido em etanol. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos no ensaio do grupo 1, em que a exposição à maior concentração do DES (500 mg/L) não parece ter induzido *stress* oxidativo nos mexilhões. Portanto, o DES em etanol encontra-se melhor dissolvido no meio, sendo absorvido mais eficientemente pelos mexilhões e, tal como no grupo 1, continua sem provocar um aumento da peroxidação lipídica (concentração de MDA), indicador de *stress* oxidativo nos animais expostos.

3.7.8.3. Grupo 3

Os resultados do ensaio relativo ao grupo 3 (tintas náuticas), expressos em pmol/mg proteína citosólica, são apresentados na Figura 3.37.

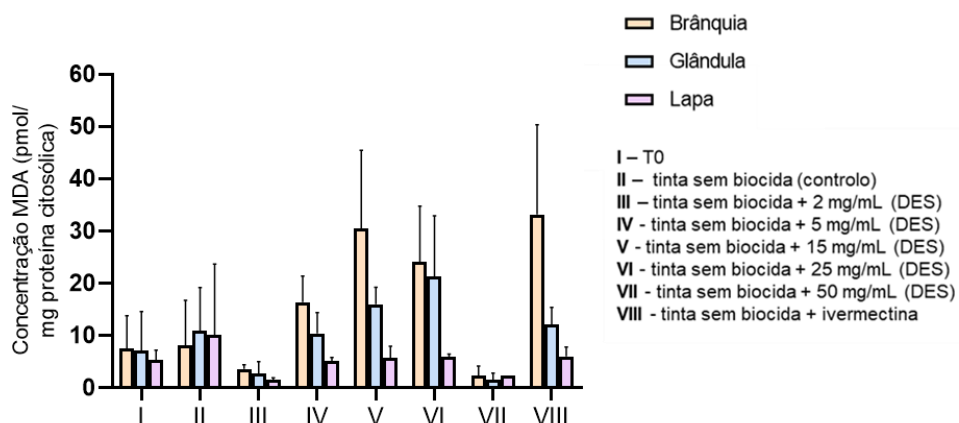


Figura 3.37. Concentração MDA (média \pm DP pmol/mg proteína citosólica), relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M.edulis* (brânquias e glândulas digestivas) e lapas *P. vulgata*.

Nos mexilhões, em ambos os órgãos analisados, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o T0 e o controle tinta sem biocida. Relativamente às brânquias, também não se registaram diferenças significativas entre o controle e as diversas concentrações do DES testadas. Portanto, o sistema eutético não promoveu alterações ao nível da peroxidação lipídica, em comparação com os respectivos controles. No que diz respeito às glândulas digestivas, foram registadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle tinta sem biocida e as amostras expostas à tinta sem biocida + 25 mg/ml DES (Tabela A4, em anexos), sugerindo a existência de algum *stress* oxidativo provocada pela exposição ao DES. Também seria interessante a realização de mais ensaios para compreender se estas alterações podem ter sido devidas a fatores externos, entendendo se, até esta concentração, o DES não provoca alterações significativas nos níveis de MDA.

Quanto às lapas não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) e, portanto, o sistema eutético parece não promover níveis aumentados de ROS neste organismo e que, por sua vez, iriam causar *stress* oxidativo.

A ivermectina não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) relativamente ao controle. No entanto, foram detetadas diferenças significativas ($p < 0,05$) com a menor e a maior concentração do DES (2 mg/mL e 50 mg/mL, respetivamente) (Tabela A4, em anexos), sugerindo um efeito da exposição à ivermectina sobre os níveis de MDA, indicando algum *stress* oxidativo.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente estudo, o potencial de DES hidrofóbicos à base de mentol e ácidos orgânicos naturais foi estudado, partindo de dados abrangentes sobre as propriedades químicas e físicas destes solventes até à sua potencial aplicação na indústria náutica.

As misturas obtidas deram origem a uma amostra líquida (DES) quando os compostos individuais foram combinados em razões molares adequadas. Os dados obtidos mostraram que as propriedades dos materiais de partida não sofrem nenhum efeito negativo devido à sua inclusão na estrutura supramolecular do DES, retendo as suas propriedades *antifouling*. As características notáveis destes sistemas residem principalmente nas interações intermoleculares entre os componentes, que permitem adequar as suas propriedades em função da razão molar dos dois componentes presentes nos sistemas estudados. Estes aspetos foram confirmados através da caracterização dos DES, recorrendo a técnicas microscópicas e espectroscópicas. O ácido 3-hidroxi-butírico foi, pela primeira vez, combinado com sucesso com o mentol.

O extrato marinho contendo as napiradiomicinas foi misturado com os DES e verificou-se que no caso dos sistemas Men:HB houve uma degradação dos compostos bioativos, dada a acidez do meio. Isto já não se verificou no caso do sistema Men:OL (1:1). Este aspeto ditou a escolha deste último sistema em ensaios posteriores. Os sistemas preparados foram incorporados na tinta náutica e verificou-se uma boa distribuição entre os dois componentes, não havendo separação de fases. Futuramente, e dado que não houve tempo durante a realização desta tese para estes ensaios, seria interessante que se pudessem realizar os ensaios subsequentes, nomeadamente os ensaios de ecotoxicidade e *antifouling* também com a combinação Men:OL + napiradiomicinas.

A caracterização foi essencial para escolher o sistema mais adequado para a aplicação pretendida neste estudo. Neste sentido, a caracterização dos DES foi seguida pela avaliação do seu desempenho biológico em termos das suas propriedades antimicrobianas e de toxicidade para células HaCaT. O sistema Men:OL (1:1) revelou ainda ser seguro, não demonstrando citotoxicidade significativa. Adicionalmente, o custo do ácido oleico é bastante mais reduzido comparativamente ao do ácido 3-hidroxi-butírico, tendo esta razão também contribuído para o avanço do trabalho apenas com o sistema Men:OL.

Este sistema demonstrou excelentes resultados como constituinte de tintas náuticas ao revelar um forte poder *antifouling* nas diversas concentrações testadas e a não indução de morte das espécies marinhas em estudo, ao contrário do que foi verificado na tinta contendo biocida (cobre), existente no mercado. Por outro lado, demonstrou também melhores resultados comparativamente à ivermectina, sendo este um composto biocida promissor e utilizado em tintas para inibição de *macrofouling*. O sistema eutético demonstrou ainda melhorar a qualidade da tinta sem biocida, impedindo a desintegração da mesma das placas de vidro em que foi aplicada, facto que não se verificou nessa mesma tinta sem a incorporação do DES. Este sistema eutético demonstrou ser seguro para as espécies marinhas submetidas aos efeitos do DES, uma vez que na maioria dos mecanismos de *stress* oxidativo, não induziu alterações, não afetando, portanto, os tecidos dos órgãos dos organismos estudados como modelos biológicos. No âmbito desta tese, está ainda em curso a avaliação da atividade de *microfouling*, através da análise por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) das superfícies imersas durante várias semanas, com os vários revestimentos. No entanto, à data de entrega da dissertação, ainda não eram conhecidos estes resultados. Contudo, os DES demonstraram ser candidatos promissores com forte evidência experimental.

Por outro lado, para testar a capacidade do DES num contexto mais real e, assim, chegar a uma concentração mais exata do mesmo, bem como, avaliar o tempo de bioatividade do sistema, seria interessante realizar um teste *antifouling in situ*, aplicando a tinta com incorporação das várias concentrações do DES numa estrutura marinha ou barco. Assim, outras variáveis poderiam ser testadas, como por exemplo, a fricção que ocorre entre a superfície com a tinta e a água do mar, o que interfere na ligação dos organismos à superfície com a tinta. Além disso, as condições no ambiente marinho são diferentes: temperatura, salinidade, pH, diversidade de microrganismos. A formação do biofilme na superfície com a tinta, tendo em conta estas condições referidas, provavelmente teria outro resultado num ambiente marinho real. Este biofilme levaria à adesão de *macrofoulers*, o que nos daria uma noção mais rigorosa do potencial *antifouling* do sistema eutético, bem como, da concentração mais efetiva para este efeito.

Com isto, acreditamos que a aplicação deste DES nas tintas náuticas é uma alternativa sustentável às tintas comerciais que possuem na sua composição componentes tóxicos e não seguros para o meio ambiente, preservando as espécies marinhas que não interferem no fenómeno de *biofouling*. Deste modo, esperamos contribuir para o desenvolvimento de um composto inovador e com boa *performance* do ponto de vista ambiental. Esperamos também que este trabalho venha a possibilitar a abertura de uma nova vertente dos sistemas eutéticos no mundo da investigação.

Pre vemos ainda que os sistemas utilizados no presente trabalho possam ser considerados em outras áreas e estudos, contribuindo assim para a evolução da ciência.

BIBLIOGRAFIA

1. Dobretsov, S. *et al.* Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* **27**, 893–905 (2011).
2. Wang, K. L., Wu, Z. H., Wang, Y., Wang, C. Y. & Xu, Y. Mini-review: Antifouling natural products from marine microorganisms and their synthetic analogs. *Mar. Drugs* **15**, 1–21 (2017).
3. Cao, S., Wang, J. D., Chen, H. S. & Chen, D. R. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Sci. Bull.* **56**, 598–612 (2011).
4. Pereira, F. *et al.* Antifouling napyradiomycins from marine-derived actinomycetes streptomyces aculeolatus. *Mar. Drugs* **18**, 1–19 (2020).
5. Waturangi, D. E., Hariyanto, J. P., Lois, W., Hutagalung, R. A. & Kwan Hwang, J. Inhibition of marine biofouling by aquatic Actinobacteria and Coral-Associated marine bacteria. *Malays. J. Microbiol.* **13**, 92–99 (2017).
6. Liu, C., Yan, B., Duan, J. & Hou, B. Biofilm inhibition effect of an ivermectin/silyl acrylate copolymer coating and the colonization dynamics. *Sci. Total Environ.* **736**, 139599 (2020).
7. Armstrong, E., Boyd, K. G. & Burgess, J. G. Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotechnology Annual Review.* **6**, 221–241 (2000).
8. Bressy, C. & Lejars, M. Marine fouling : An overview marine fouling. *J. Ocean Technol.* **9**, 19–28 (2014).
9. Magin, C. M., Cooper, S. P. & Brennan, A. B. Non-toxic antifouling strategies. *Mater. Today* **13**, 36–44 (2010).
10. Salta, M., Wharton, J. A., Dennington, S. P., Stoodley, P. & Stokes, K. R. Anti-biofilm performance of three natural products against initial bacterial attachment. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 21757–21780 (2013).
11. Qian, P. Y., Xu, Y. & Fusetani, N. Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling* **26**, 223–234 (2009).
12. Schultz, M. P., Bendick, J. A., Holm, E. R. & Hertel, W. M. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* **27**, 87–98 (2011).
13. Martins, T.L. & Vargas, V.M.F. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.* **8**, 1–11 (2013).
14. Burgess, J. G. *et al.* The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling* **19**, 197–205 (2003).
15. Bhattarai, H. D. *et al.* Isolation of antifouling compounds from the marine bacterium, *Shewanella oneidensis* SCH0402. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 243–249 (2007).
16. Cho, J. Y. & Kim, M. S. Induction of antifouling diterpene production by *Streptomyces cinnabarinus* PK209 in Co-culture with marine-derived *Alteromonas* sp. KNS-16. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1849–1854 (2012).
17. Gavrilescu, M. & Chisti, Y. Biotechnology - A sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* **23**, 471–499 (2005).
18. Burgess, J. G. New and emerging analytical techniques for marine biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 29–33 (2012).
19. Pereira, R. C. & Costa-Lotufo, L. V. Bioprospecting for bioactives from seaweeds: Potential, obstacles and alternatives. *Brazilian J. Pharmacogn.* **22**, 894–905 (2012).
20. Motohashi, K. *et al.* Studies on terpenoids produced by actinomycetes: 5-Dimethylallylindole-3-carboxylic acid and A80915G-8"-acid produced by marine-derived *Streptomyces* sp. MS239. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **61**, 75–80 (2008).
21. Solanki, R., Khanna, M. & Lal, R. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* **48**, 410–431 (2008).
22. Gallagher, K. A., Fenical, W. & Jensen, P. R. Hybrid isoprenoid secondary metabolite production

- in terrestrial and marine actinomycetes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 794–800 (2010).
23. Kurtböke, D. I. Biodiscovery from rare actinomycetes: An eco-taxonomical perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1843–1852 (2012).
 24. Kwon, H. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. & Fenical, W. Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus 'Marinispora'. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1622–1632 (2006).
 25. Cheng, Y. Bin, Jensen, P. R. & Fenical, W. Cytotoxic and antimicrobial napyradiomycins from two marine-derived streptomyces strains. *European J. Org. Chem.* 3751–3757 (2013). doi:10.1002/ejoc.201300349
 26. Paiva, A. *et al.* Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063–1071 (2014).
 27. Silva, J. M., Silva, E., Reis, R. L. & Duarte, A. R. C. A closer look in the antimicrobial properties of deep eutectic solvents based on fatty acids. *Sustain. Chem. Pharm.* **14**, 100192 (2019).
 28. Dai, Y., Spronsen, J. Van & Witkamp, G. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* **766**, 61–68 (2013).
 29. Silva, J. M. *et al.* Therapeutic Role of Deep Eutectic Solvents Based on Menthol and Saturated Fatty Acids on Wound Healing. *ACS Appl. Bio Mater.* **2**, 4346–4355 (2019).
 30. Smith, E. L., Abbott, A. P. & Ryder, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060–11082 (2014).
 31. Gilmore, M. *et al.* Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Incorporating Trioctylphosphine Oxide: Advanced Liquid Extractants. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **6**, 17323–17332 (2018).
 32. Silva, E. *et al.* Optimal design of the des based on perillyl alcohol and ibuprofen. *Pharmaceutics* **12**, 1–17 (2020).
 33. Makoś, P., Słupek, E. & Gębicki, J. Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review. *Microchem. J.* **152**, 104384 (2020).
 34. Florindo, C., Branco, L. C. & Marrucho, I. M. Quest for Green-Solvent Design: From Hydrophilic to Hydrophobic (Deep) Eutectic Solvents. *ChemSusChem* **12**, 1549–1559 (2019).
 35. Silva, L. P. *et al.* Design and Characterization of Sugar-Based Deep Eutectic Solvents Using Conductor-like Screening Model for Real Solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **6**, 10724–10734 (2018).
 36. Gomez, F. J. V., Espino, M., Fernández, M. A. & Silva, M. F. A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect* **3**, 6122–6125 (2018).
 37. Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. & Choi, Y. H. Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in carthamus tinctorius L. *Anal. Chem.* **85**, 6272–6278 (2013).
 38. Tang, W., An, Y. & Row, K. H. Emerging applications of (micro) extraction phase from hydrophilic to hydrophobic deep eutectic solvents: opportunities and trends. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **136**, 116187 (2021).
 39. Dwamena, A. K. Recent advances in hydrophobic deep eutectic solvents for extraction. *Separations* **6**, (2019).
 40. Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M. & Wong, W. F. Hydrophobic deep eutectic solvents: Current progress and future directions. *J. Ind. Eng. Chem.* **97**, 142–162 (2021).
 41. Makoś, P., Przyjazny, A. & Boczkaj, G. Hydrophobic deep eutectic solvents as “green” extraction media for polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* **1570**, 28–37 (2018).
 42. Van Osch, D. J. G. P. *et al.* A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 2933–2942 (2019).
 43. Martins, M. A. R. *et al.* Tunable Hydrophobic Eutectic Solvents Based on Terpenes and Monocarboxylic Acids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **6**, 8836–8846 (2018).
 44. Ribeiro, B. D., Florindo, C., Iff, L. C., Coelho, M. A. Z. & Marrucho, I. M. Menthol-based eutectic mixtures: Hydrophobic low viscosity solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **3**, 2469–2477 (2015).
 45. Lee, J., Jung, D. & Park, K. Hydrophobic deep eutectic solvents for the extraction of organic and inorganic analytes from aqueous environments. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **118**, 853–868 (2019).
 46. Van Osch, D. J. G. P., Dietz, C. H. J. T., Warrag, S. E. E. & Kroon, M. C. The Curious Case of Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: A Story on the Discovery, Design, and Applications. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **8**, 10591–10612 (2020).
 47. Chapman, P. M., Ho, K. T., Munns, W. R., Solomon, K. & Weinstein, M. P. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 271–278 (2002).
 48. Bystrzanowska, M. & Tobiszewski, M. Assessment and design of greener deep eutectic solvents

- A multicriteria decision analysis. *J. Mol. Liq.* **321**, 114878 (2021).
49. Korzeniewski, C. & Callewaert, D. M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **64**, 313–320 (1983).
 50. Lomba, L. *et al.* Deep eutectic solvents: Are they safe? *Appl. Sci.* **11**, (2021).
 51. Amara, I., Miled, W., Slama, R. Ben & Ladhari, N. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **57**, 115–130 (2018).
 52. Macko, P., Palosaari, T. & Whelan, M. Extrapolating from acute to chronic toxicity in vitro. *Toxicol. Vitro.* **76**, 105206 (2021).
 53. Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. & Scoullou, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **64**, 178–189 (2006).
 54. Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F. & Rocher, B. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: Major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* **70**, 83–93 (2004).
 55. Aloísio Torres, M. *et al.* Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 923–932 (2002).
 56. Nunes, B., Gaio, A. R., Carvalho, F. & Guilhermino, L. Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **71**, 341–354 (2008).
 57. Li, Z. H. *et al.* Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 319–327 (2011).
 58. Grenon, J. F. & Walker, G. The tenacity of the limpet, *Patella vulgata* L.: An experimental approach. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **54**, 277–308 (1981).
 59. Livingstone, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 656–666 (2001).
 60. De Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M. & Vermeulen, N. P. E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 202–226 (1999).
 61. Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A. & Vasseur, P. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 106–121 (2000).
 62. Hayes, J. D. & Strange, R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* **61**, 154–166 (2000).
 63. Matés, J. M. & Sánchez-Jiménez, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosci.* **4**, 339–345 (2000).
 64. Sigman, D. S. et Boyer, P. D. *The enzymes. Mechanisms of Catalysis.* **3**, 245–27 (1990).
 65. Igbinosa, E. O., Beshiru, A., Akporehe, L. U., Oviasogie, F. E. & Igbinosa, O. O. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in raw meat samples intended for human consumption in Benin City, Nigeria: Implications for public health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **13**, (2016).
 66. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, (2017).
 67. Revel, M. *et al.* Tissue-specific biomarker responses in the blue mussel *Mytilus* spp. exposed to a mixture of microplastics at environmentally relevant concentrations. *Front. Environ. Sci.* **7**, 1–14 (2019).
 68. Cheeseman, K. H. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol. Aspects Med.* **14**, 191–197 (1993).
 69. Hayyan, M. *et al.* Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**, 455–459 (2013).
 70. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Crop J.* **5**, 407–415 (1976).
 71. Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139 (1974).
 72. Sun, Y., Oberley, L. W. & Li, Y. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin. Chem.* **34**, 497–500 (1988).
 73. Johansson, L. H. & Håkan Borg, L. A. A spectrophotometric method for determination of catalase

- activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* **174**, 331–336 (1988).
74. BEERS, R. F. & SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**, 133–140 (1952).
 75. Lawrence, R. A. & Burk, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 952–958 (1976).
 76. Kambayashi, Y. *et al.* Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **44**, 46–51 (2009).
 77. Uchiyama, M. & Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**, 271–278 (1978).
 78. Aroso, I. M. *et al.* Design of controlled release systems for THEDES - Therapeutic deep eutectic solvents, using supercritical fluid technology. *Int. J. Pharm.* **492**, 73–79 (2015).
 79. Aroso, I. M. *et al.* Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **98**, 57–66 (2016).
 80. Mann, S. K., Pham, T. N., McQueen, L. L., Lewandowski, J. R. & Brown, S. P. Revealing Intermolecular Hydrogen Bonding Structure and Dynamics in a Deep Eutectic Pharmaceutical by Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy. *Mol. Pharm.* **17**, 622–631 (2020).
 81. Roda, A. *et al.* Unravelling the nature of citric acid:l-arginine:water mixtures: The bifunctional role of water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23**, 1706–1717 (2021).
 82. Meneses, L., Santos, F., Gameiro, A. R., Paiva, A. & Duarte, A. R. C. Preparation of binary and ternary deep eutectic systems. *J. Vis. Exp.* **2019**, 1–5 (2019).
 83. Liu, Y. *et al.* Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J. Nat. Prod.* **81**, 679–690 (2018).
 84. Álvarez, M. S., Longo, M. A., Deive, F. J. & Rodríguez, A. Synthesis and characterization of a lipase-friendly DES based on cholinium dihydrogen phosphate. *J. Mol. Liq.* **340**, (2021).
 85. Nedaei, M., Zarei, A. R. & Ghorbanian, S. A. Development of a new emulsification microextraction method based on solidification of settled organic drop: Application of a novel ultra-hydrophobic tailor-made deep eutectic solvent. *New J. Chem.* **42**, 12520–12529 (2018).
 86. Lamei, N., Ezoddin, M. & Abdi, K. Air assisted emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration of methadone in water and biological samples. *Talanta* **165**, 176–181 (2017).
 87. Rodrigues, L. A. *et al.* Terpene-Based Natural Deep Eutectic Systems as Efficient Solvents to Recover Astaxanthin from Brown Crab Shell Residues. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **8**, 2246–2259 (2020).
 88. Knop, S., Jansen, T. L. C., Lindner, J. & Vöhringer, P. On the nature of OH-stretching vibrations in hydrogen-bonded chains: Pump frequency dependent vibrational lifetime. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 4641–4650 (2011).
 89. Bart, H. J. Extraction of Natural Products from Plants - An Introduction. *Ind. Scale Nat. Prod. Extr.* 1–25 (2011). doi:10.1002/9783527635122.ch1
 90. Rodrigues, L. A. *et al.* Unveiling the potential of betaine/polyol-based deep eutectic systems for the recovery of bioactive protein derivative-rich extracts from sardine processing residues. *Sep. Purif. Technol.* **276**, (2021).

A. ANEXOS

A1. Ensaio bioquímico em organismos marinhos. Diferenças significativas registadas na atividade da GST relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M. edulis* (brânquias (B) e glândulas digestivas (G)) e lapas *P. vulgata* (L). **II** – tinta sem biocida (controlo); **III** – tinta sem biocida + 2 mg/mL (DES); **IV** - tinta sem biocida + 5 mg/mL (DES); **V** - tinta sem biocida + 15 mg/mL (DES); **VI** - tinta sem biocida + 25 mg/mL (DES); **VII** - tinta sem biocida + 50 mg/mL (DES); **VIII** - tinta sem biocida + ivermectina.

	III			IV			V			VI			VII			VIII			
	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	
II	---			---			---			---			---			---			B
		p=0,00 01			---			---			---			p=0,01 19			---		G
			---			---			---			---			---			---	L
III				p=0,03 10			p=0,02 57			---			---			p=0,03 45			B
					p=0,00 01			p=0,00 01			p=0,00 01			p=0,00 97			p=0,00 01		G
						---						---			---				L
IV							---			---			---						B
								---			---			p=0,00 01					G
									---			---			---				L
V										---			---						B
											---			p=0,00 01					G
												---			---				L
VI												---						B	

															p=0,00 01					G
																---				L
VII																	---			B
																		p=0,00 02		G
																			---	L

A2. Ensaio bioquímico em organismos marinhos. Diferenças significativas registadas na atividade da SOD relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M. edulis* (brânquias (B) e glândulas digestivas (G)) e lapas *P. vulgata* (L). **II** – tinta sem biocida (controlo); **III** – tinta sem biocida + 2 mg/mL (DES); **IV** - tinta sem biocida + 5 mg/mL (DES); **V** - tinta sem biocida + 15 mg/mL (DES); **VI** - tinta sem biocida + 25 mg/mL (DES); **VII** - tinta sem biocida + 50 mg/mL (DES); **VIII** - tinta sem biocida + ivermectina.

	III			IV			V			VI			VII			VIII			
	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	
II	---			---			---			---			---						B
		---			---			p=0,04 71			---			---					G
			---			---						---							L
III				---			p=0,03 77			---			---			---			B
					p=0,04 96			p=0,03 48			---			---			---		G
						---						---							L
IV							---			---			p=0,04 64			---			B
								---						p=0,01 48			---		G
												---							L
V										---			p=0,00 20			---			B
														p=0,01 00			---		G
																			L
VI													p=0,05 00			---			B
																	---		G
																			L

VII																	---			B	
																			---		G
																				---	L

A3. Ensaio bioquímico em organismos marinhos. Diferenças significativas registadas na capacidade antioxidante total (TAC) relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M. edulis* (brânquias **(B)** e glândulas digestivas **(G)**) e lapas *P. vulgata* **(L)**. **II** – tinta sem biocida (controlo); **III** – tinta sem biocida + 2 mg/mL (DES); **IV** - tinta sem biocida + 5 mg/mL (DES); **V** - tinta sem biocida + 15 mg/mL (DES); **VI** - tinta sem biocida + 25 mg/mL (DES); **VII** - tinta sem biocida + 50 mg/mL (DES); **VIII** - tinta sem biocida + ivermectina.

	III			IV			V			VI			VII			VIII			
	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	
II	p=0,00 01			---			---			---			---			---			B
		---			---			---		---				---			---		G
			---			---			---			---			---			---	L
III				p=0,00 01			p=0,00 01			p=0,00 01			p=0,00 01			p=0,00 01			B
					---			---			---			---			---		G
						---			---			---			---			---	L
IV							---			---			---			---			B
								---			---			---			---		G
									---			---			---			---	L
V									---				---			---			B
										---				---			---		G
											---				---			---	L
VI													---			---			B
														---			---		G
															---			---	L

VII																	---			B	
																			---		G
																				---	L

A4. Ensaio bioquímico em organismos marinhos. Diferenças significativas registadas na atividade da lipoperoxidação lipídica relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M. edulis* (brânquias (B) e glândulas digestivas (G)) e lapas *P. vulgata* (L). **II** - tinta sem biocida (controlo); **III** - tinta sem biocida + 2 mg/mL (DES); **IV** - tinta sem biocida + 5 mg/mL (DES); **V** - tinta sem biocida + 15 mg/mL (DES); **VI** - tinta sem biocida + 25 mg/mL (DES); **VII** - tinta sem biocida + 50 mg/mL (DES); **VIII** - tinta sem biocida + ivermectina.

	III			IV			V			VI			VII			VIII			
	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	
II	---			---			---			---			---						B
		---			---			---			p=0,04 24			---					G
			---			---			---						---				L
III				---			p=0,04 47			---			---			---			B
					---			p=0,01 70			p=0,00 02			---			---		G
						---			---						---			---	L
IV							---			---			---			---			B
								---			---			---			---		G
									---						---			---	L
V										---			p=0,00 71			---			B
											---			p=0,00 67			---		G
												---						---	L
VI													p=0,04 24			---			B
														p=0,00 01			---		G
																		---	L

VII																	p=0,00 40			B
																		---		G
																			---	L

A5. Ensaio bioquímico em organismos marinhos. Diferenças significativas registadas na atividade da catalase relativa ao ensaio do grupo 3, nos mexilhões *M. edulis* (brânquias (B) e glândulas digestivas (G)) e lapas *P. vulgata* (L). **II** – tinta sem biocida (controlo); **III** – tinta sem biocida + 2 mg/mL (DES); **IV** - tinta sem biocida + 5 mg/mL (DES); **V** - tinta sem biocida + 15 mg/mL (DES); **VI** - tinta sem biocida + 25 mg/mL (DES); **VII** - tinta sem biocida + 50 mg/mL (DES); **VIII** - tinta sem biocida + ivermectina.

	III			IV			V			VI			VII			VIII			
	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	B	G	L	
II	---			---			---			---			---						B
		---			---			---			---			---					G
			---			---			---			---			---				L
III				---			---			---			---			---			B
					p=0,03 50			---			p=0,00 52			---		---			G
						---			---			---			---			---	L
IV							---			p=0,03 04			---			---			B
								---			---			p=0,03 71			---		G
									---			---			---			---	L
V									---				---			---			B
											---			---			---		G
												---			---			---	L
VI													---			---			B
														p=0,00 40			---		G



2021

SARA AZEDO VAENTE

DES hidrofóbicos à base de mentol e ácidos orgânicos
naturais para utilização em tintas náuticas *antifouling*