

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**

**INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE GEOLOGIA E GEOFÍSICA/LAGEMAR**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM DINÂMICA DOS OCEANOS E DA TERRA**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA E ANTI-INCRUSTANTE DE UM  
GLICEROFOSFOLIPÍDIO SINTÉTICO ANÁLAGO AO ENCONTRADO EM  
ESPONJAS MARINHAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE GEOLOGIA E GEOFÍSICA/LAGEMAR**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM DINÂMICA DOS OCEANOS E DA TERRA**

**Avaliação ecotoxicológica e anti-incrustante de um glicerofosfolípido sintético  
análogo ao encontrado em esponjas marinhas**

**RAFAELA DOS SANTOS COSTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Dinâmica dos Oceanos e da Terra, como parte dos requisitos para a obtenção do grau em Mestre. Área de Concentração: Ecologia Marinha.

**Orientador: Dr. Ricardo Coutinho**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Daniela Batista**

**NITERÓI**

**2016**

C834

Costa, Rafaela dos Santos

Avaliação ecotoxicológica e anti-incrustante de um glicerosfolípido sintético análogo ao encontrado em esponjas marinhas / Rafaela dos Santos Costa. – Niterói : [s.n.], 2016.  
90 f.

Dissertação (Mestrado em Dinâmica dos Oceanos e da Terra) –  
Universidade Federal Fluminense, 2016.

1.Biotecnologia marinha. 2.Biocida. 3.Tintas antiincrustantes.  
4.Toxicidade. I.Título.

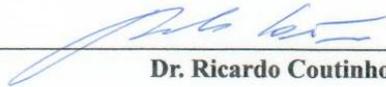
CDD 660.6

**Avaliação ecotoxicológica e anti-incrustante de um glicerosfolípido sintético  
análogo ao encontrado em esponjas marinhas**

**RAFAELA DOS SANTOS COSTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Dinâmica dos Oceanos e da Terra, como parte dos requisitos para a obtenção do grau em Mestre. Área de Concentração: Ecologia Marinha.

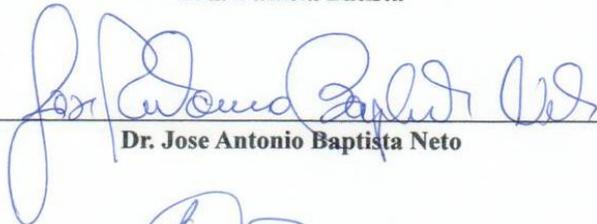
**BANCA EXAMINADORA**



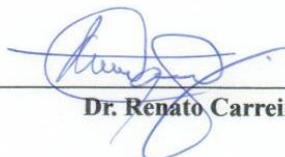
**Dr. Ricardo Coutinho**



**Dra. Daniela Batista**



**Dr. Jose Antonio Baptista Neto**



**Dr. Renato Carreira**



**Dra. Luciana Altvater (Suplente)**

**NITERÓI**

**2016**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, por sempre me amparar nos momentos mais difíceis da minha vida e me dar forças para continuar a minha caminhada. Também agradeço a Deus, pela criação dos organismos marinhos e que, graças a Ele, foi possível realizar esse estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos membros da Banca.

Ao Programa de Pós-Graduação Dinâmica dos Oceanos e da Terra.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Coutinho, por me aceitar ser sua aluna de pós-graduação, por todo o apoio, orientação, oportunidades, ensinamentos e pela motivação.

À minha co-orientadora Dra. Daniela Batista por toda a paciência, apoio, ajuda, supervisão em diferentes fases desse trabalho e pelas correções criteriosas.

A todos da equipe da Divisão de Biotecnologia Marinha, que participaram direta ou indiretamente desse trabalho.

Agradeço, especialmente, as minhas amigas, Carolina Terra, Ellen Oliveira e Ana Polycarpa pelo auxílio nos diferentes experimentos realizados.

A Juliana Ferrari que sempre esteve disponível em me ajudar nas coletas de craca, auxiliar nos experimentos e me deu várias dicas de desenho amostral.

Aos meus amigos Márcio Abreu e Fábio, por auxiliarem em diferentes coletas.

A Luciana Britto e Luciana Altvater, pelas várias dicas que foram dadas.

Aos meus queridos amigos, Glauce Galeazzi, Thamiyres Pessôa, Jurema Quintanilha e José Eduardo, por todo o incentivo nessa jornada.

Ao meu amigo Julio Cesar Quintanilha, pelo auxílio em química.

A Laís Lima, Priscila Araújo e Alexandre Kassuga por compartilharem seus conhecimentos em estatística.

A gringa Gabriela Perna, pelo auxílio com inglês.

À Dra. Elizabeth, pela assistência durante os experimentos com ouriço.

Ao Comandante William Romão, por todo o auxílio e ensinamento na parte química desse trabalho.

A Dagles, por me auxiliar com a preparação das soluções químicas.

Ao Dr. Sergey Dobretsov, por compartilhar seus conhecimentos sobre alguns experimentos realizados, pelo auxílio em estatística e pela amizade.

Aos meus amigos do grupo de acústica submarina, José Tadeu Braum, Nonato, Felipe e Bruna Braum, pela amizade e apoio ao longo desses anos.

Aos meus pais Odilon Costa e Cláudia Meirelles e meus irmãos Gabriela Costa e Rafael Costa, aos quais amo muito, pelo carinho, paciência, por sempre me incentivar a estudar e nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu noivo Christian Viana, pelo companheirismo, paciência e amor. Também quero agradecer pelo abrigo no Rio durante as disciplinas.

Às minhas madrinhas, Anna Fernanda e Thamires Ferreira, pela amizade e apoio durante esse processo. A Thamires, também gostaria de agradecer pelo abrigo em sua casa durante as disciplinas.

Ao professor Marcos Fernandez, por compartilhar seus conhecimentos em ecotoxicologia.

Às minhas amigas “meninas venenosas”, Gabrielle Quadra e Helena Souza, pela amizade e troca de informações sobre ecotoxicologia.

*“Não se entregue e não deixe a maré te levar...”*

*Nx Zero*

## RESUMO GERAL

Com a proposta de inserção no mercado de tintas anti-incrustantes, um novo composto, denominado “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” sintetizado a partir da lecitina de soja foi recentemente patenteado devido a sua eficiência em inibir a incrustação quando testado em campo e laboratório. No entanto, não foram realizados experimentos ecotoxicológicos para avaliar possíveis efeitos negativos do biocida em invertebrados marinho. Logo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade e atividade anti-incrustante do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” em larvas de diferentes invertebrados marinhos com a finalidade de fornecer subsídios para o seu uso como biocida auxiliar. Esta dissertação está organizada em três capítulos. O primeiro teve como objetivo avaliar a toxicidade (mortalidade) e a ação anti-incrustante do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” em larvas do briozoário *Bugula neritina* e em dois estágios larvais da craca *Amphibalanus amphitrite*. As concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto testado foram tóxicas para as larvas de *B.neritina* e *A.amphitrite*. As demais concentrações do composto (10; 5; 0.5; 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) não apresentaram toxicidade para *B.neritina* e para o estágio náuplio II e cipris de *A.amphitrite*. Foi observada uma inibição no assentamento larvar de *B.neritina* nas concentrações 10 e 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , porém, esse efeito não foi registrado para as cipris em nenhuma das concentrações testadas. O composto apresentou eficácia na inibição do assentamento larvar e pode ser uma alternativa potencial para ser usado como biocida acessório em tintas anti-incrustantes. A segunda parte avaliou o efeito desse composto no desenvolvimento embriolarval de uma espécie não alvo de ouriço do mar, *Lytechinus variegatus*. Foi observada má formação das larvas e retardo no desenvolvimento larvar de *L.variegatus* nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto testado, assim como no controle positivo (solventes). Porém, não foram observados efeitos tóxicos nas demais concentrações (10; 5; 0.5; 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os resultados obtidos nesse capítulo mostram que essa substância testada é menos tóxica para o desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus* quando comparado ao cobre, substância muito utilizada como biocida principal em tintas anti-incrustantes. A terceira parte avaliou o potencial do composto como ferramenta natural de controle químico para do coral não nativo *Tubastraea coccinea*. Foi observada toxicidade para as larvas desse coral invasor nas concentrações mais elevadas (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Esse composto sintético pode ser uma alternativa como ferramenta de controle dessa espécie, já que as tintas anti-incrustantes apresentam eficácia limitada, no controle de *T.coccinea* em estruturas artificiais. Os dados obtidos no presente estudo poderão subsidiar a utilização dessa substância como um biocida acessório em tintas anti-incrustantes.

**Palavras-chave:** Composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”; Toxicidade; *Amphibalanus amphitrite*; *Lytechinus variegatus*; *Tubastraea coccinea*, *Bugula neritina*; Anti-incrustante.

## ABSTRACT

With the insertion proposal for in anti fouling paint market, a new compound, denominated "1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine" synthesized from soybean lecithin was recently patented due to their efficiency to inhibit fouling when tested in laboratory and field. However, were not performed ecotoxicological experiments to evaluate possible negative effects of biocide in marine invertebrates. Thus, the present study aims to assess the toxicity and antifouling activity of the compound "1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine" larvae of different marine invertebrates in order to provide subsidies to your use as a booster biocide. This dissertation is organized into three parts. The first aimed to evaluate the toxicity (mortality) and the action of the antifouling compound "1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine" on bryozoan larvae *Bugula neritina* and two larval stages of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*. At 100 and 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  the compound was found to be toxic to *B.neritina* and *A.amphitrite* larvae. The other concentrations (10; 5; 0.5; 0:05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) showed no toxic effect on *B.neritina* and the nauplii stage II and cypris of *A.amphitrite*. At 10 and 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  there was inhibition of larval settlement of *B.neritina*, however, this effect was not observed for the cypris in any of the tested concentrations. The compound showed efficacy in inhibiting larval proving to be a potential booster biocide alternative for use in antifouling paints. Part two assessed the effect of this compound on the embriolarval development of a non target species, the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Malformations and delayed development was observed in *L.variegatus* larvae at 100 and 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  as well to the positive (solvents). However, toxic effects were not observed in the other concentrations (10; 5; 0.5; 0:05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The results obtained in this chapter show that the test substance is less toxic to the developing *L.variegatus* embriolarval in comparison to copper, a compound which is often the main biocide in antifouling paints. Part three assessed the potential of the natural compound as chemical control tool to control the larvae of the non-native coral *Tubastraea coccinea*. Toxic effects on the coral larvae were observed at the highest concentrations (100 and 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). This synthetic compound may be used as an alternative control tool, as many antifouling paints have limited effectiveness in the control of *T.coccinea* on artificial structures. The result obtained in this study may be used to justify the use of the substance as a booster biocide in antifouling paints.

**Keywords:** Compound "1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine"; Toxicity; *Amphibalanus amphitrite*; *Lytechinus variegatus*; *Tubastraea coccinea*, *Bugula neritina*; Antifouling.

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
Impactos ecológicos e econômicos causados pela bioincrustação marinha.....	16
Ensaio tóxicos para novas substâncias.....	18
Compostos naturais como alternativas “ecologicamente corretas para tintas anti-incrustantes.....	19
A origem do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfolina” usado no presente estudo.....	20
I.I OBJETIVO GERAL.....	23
I.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
I.III HIPÓTESES.....	23
II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO 1.....	32
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1.1 INTRODUÇÃO.....	35
1.2 MATERIAL E MÉTODO.....	37
1.2.1 Tratamentos.....	37
1.2.2 Bioensaio com <i>Bugula neritina</i> Linnaeus, 1758.....	38
1.2.2.1 Organismo-teste.....	38
1.2.2.2 Coleta e aclimação.....	38
1.2.2.3 Teste de toxicidade e anti-incrustante.....	39
1.2.3 Bioensaio com cirripédio <i>Amphibalanus amphitrite</i> Darwin, 1854.....	39
1.2.3.1 Organismo-teste.....	39
1.2.3.2 Coleta e aclimação.....	40
1.2.3.3 Obtenção das larvas e manutenção do cultivo.....	40
1.2.3.4 Teste de toxicidade e assentamento.....	41
1.3 TRATAMENTO DOS DADOS.....	41
1.4 RESULTADOS.....	42
1.4.1 Bioensaio com <i>B.neretina</i> .....	42

1.4.2 Bioensaio com <i>A. amphitrite</i> .....	44
1.5 DISCUSSÃO.....	50
1.6 REFERÊNCIAS.....	53
CAPÍTULO 2.....	61
ABSTRACT.....	62
2.1 INTRODUCTION.....	63
2.2 MATERIALS AND METHODOS.....	64
2.2.1 Target specie.....	64
2.2.2 Sea urchin collection.....	64
2.2.3 Tested chemicals.....	65
2.2.4 Toxicity experiment.....	65
2.3 STATISTICAL ANALYSES.....	66
2.4 RESULTS.....	67
2.5 DISCUSSION.....	68
2.7 REFERENCES.....	70
CAPÍTULO 3.....	75
RESUMO.....	76
ABSTRACT.....	77
3.1 INTRODUÇÃO.....	78
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
3.2.1 Tratamentos.....	79
3.2.2 Procedimento de coleta.....	80
3.2.3 Teste de toxicidade.....	80
3.3 TRATAMENTO DE DADOS.....	81
3.4 RESULTADOS.....	81
3.5 DISCUSSÃO.....	83
3.6 REFERÊNCIAS.....	85
III. CONCLUSÕES GERAIS.....	90
IV. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	91

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura I.</b> Estrutura molecular do composto patenteado.....	21
<b>Figura 1.1 -</b> <i>Bugula neritina</i> .....	38
<b>Figura 1.2 -</b> <i>Amphibalanus amphitrite</i> .....	40
<b>Figura 1.3</b> Média e desvio padrão da mortalidade larvar (%) de <i>Bugula neritina</i> em diferentes tratamentos. Controle positivo: solventes (clorofórmio, metanol e água LC-MS); Controle negativo: sulfato de cobre; Controle nulo: água do mar; Composto: 1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina. O asterisco (*) indicam tratamentos com diferenças significas em relação ao controle de água do mar ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).....	43
<b>Figura 1.4</b> Média e desvio padrão do assentamento (%) larvar de <i>Bugula neritina</i> em diferentes tratamentos. Controle positivo: solventes (clorofórmio, metanol e água LC-MS); Controle negativo: sulfato de cobre; Controle nulo: água do mar; Composto: 1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina. O asterisco (*) indicam tratamentos com diferenças significas em relação ao controle de água do mar ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).....	44
<b>Figura 1.5</b> Média e desvio padrão da mortalidade (%) larvar de náuplio <i>A.amphitrite</i> em diferentes tratamentos. Controle positivo: solventes; Controle negativo: sulfato de cobre; Controle nulo: água do mar; Composto: 1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina. O asterisco (*) indicam tratamentos com diferenças significas em relação ao controle de água do mar ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).....	45
<b>Figura 1.6 -</b> Média e intervalo de confiança da mortalidade (%) larvar de cipris de <i>A.amphitrite</i> ao longo de três dias de exposição. As cipris foram submetidas ao composto testado (“1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”) e aos solventes (controle positivo), sulfato de cobre (controle negativo), água do mar (controle nulo) em seis diferentes concentrações.....	47
<b>Figura 1.7-</b> Média e intervalo de confiança do assentamento larvar (%) de cipris de <i>A.amphitrite</i> em diferentes tratamentos ao longo de três dias de exposição. As cipris foram submetidas ao composto testado (“1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”)	

e aos solventes (controle positivo), sulfato de cobre (controle negativo), água do mar (controle nulo) em seis diferentes concentrações.....49

**Figura 2.1-** Abnormal development larvae *Lytechinus variegatus* (%) subject to six concentrations of the new antifouling compound 1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine. The asterisk (\*) indicates that the results were significantly different compared to seawater control ( $p < 0.05$ , Tukey test). The data are the means of five replicates.....68

**Figura 3.1-** *Tubastraea coccinea*.....80

**Figura 3.2-** Média e desvio padrão da mortalidade larvar (%) de *T.coccinea* submetidas ao sulfato de cobre (controle negativo), composto (“1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”), solventes (controle positivo) e água do mar (controle nulo) em cinco diferentes concentrações. O asterisco (\*) indicam tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle de água do mar ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).....82

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela I-</b> Características físicas e químicas do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” sintetizado a partir de lecitina de soja comercial.....	22
---	----

## **LISTA DE ABREVIACOES**

**µg** - Micrograma

**ABNT** - Associação Brasileira de Normas Técnicas

**Cu** - Cobre

**CuPt** - Cobre piritiona

**CuSO<sub>4</sub>** - Sulfato de cobre

**CL<sub>50</sub>** - Concentração letal para 50% dos organismos testados.

**CE<sub>50</sub>** - Concentração efetiva para 50% dos organismos testados.

**KCl** - Cloreto de potássio

**TBT** - tributilestanho

**ZnPt** - Zinco piritiona

## **I. INTRODUÇÃO GERAL**

Essa dissertação é o resultado de um trabalho que foca a utilização de um composto sintético análogo ao encontrado em esponjas marinhas. O presente trabalho está dividido em três capítulos, que tem como finalidade a inclusão do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” para seu uso como biocida auxiliar. Para alcançar esse objetivo testes de toxicidade e anti-incrustante foram realizados com diferentes organismos marinhos.

Em seguida algumas considerações sobre a temática proposta, objetivos, hipóteses e os capítulos correspondentes. Por fim, apresento as principais conclusões deste estudo e as perspectivas futuras.

### **Impactos ecológicos e econômicos causados pela bioincrustação marinha**

A bioincrustação marinha é resultante do estabelecimento de micro e macro organismos marinhos em substratos naturais (tais como rochas, madeira, outros organismos, etc.) ou artificiais (cais, plataformas, cascos de navios, boias, cabos, etc) (Martins & Vargas, 2013) expostos à água do mar (Cao *et al.*, 2011). No início do processo de bioincrustação os microrganismos secretam uma substância extracelular polimérica (EPS) que envolve e ancora os mesmos ao substrato, dando início ao processo de formação do biofilme, que por meio da alteração da composição química do local, atrai e estimula o crescimento e estabelecimento de outros macroorganismos (Chambers *et al.*, 2007). A adesão de organismos em substratos como os cascos de embarcações podem gerar diferentes danos para o ambiente, tais como, introdução de espécies exóticas (Santos & Lamonica, 2008).

Algumas espécies exóticas oriundas da bioincrustação se estabelecem normalmente fora de sua distribuição geográfica (Carlton, 2001). Essas espécies em geral possuem vantagens competitivas em relação a espécies nativas, como por exemplo, a ausência de predadores e maior habilidade de sobreviver e reproduzir em ambientes degradados, como regiões portuárias (Gollasch, 2002). Atualmente, na costa do Brasil, existem variados relatos sobre a introdução de espécies marinhas bentônicas, na maioria dos casos, mostrando um forte indício de introdução via bioincrustação ou por água de lastro (MMA, 2009).

Adicionalmente, a bioincrustação em cascos dos navios causa problemas econômicos relacionados à indústria naval, já que pode produzir rugosidade que aumenta o fluxo turbulento, o ruído acústico e o arraste da embarcação (Daros, 2014), que pode aumentar o consumo de combustível em até 40% (Chapman *et al.*, 2014). Há ainda o aumento na frequência da docagem para a remoção dos organismos incrustados e novas pinturas do navio (Schultz *et al.*, 2011).

O assentamento indesejável de invertebrados marinhos bentônicos em cascos de navio é um problema antigo e muitas substâncias já foram testadas como tinta anti-incrustante. Os “biocidas” são substâncias químicas com base orgânica e inorgânica que tem como finalidade inibir a aderência de micro e macro-organismos marinhos em substratos artificiais (Guardiola *et al.*, 2012). Historicamente, misturas com óleo de baleia e chumbos foram os primeiros a serem utilizados como biocidas em cascos de embarcações feitas de madeiras (Dafforn *et al.*, 2011). Porém, com a evolução das embarcações com revestimentos metálicos, novos biocidas foram testados no mercado (Castro *et al.*, 2011). As tintas anti-incrustantes a base de óxido de cobre e zinco foram usadas no século XX dentro da regulamentação mundial e foram denominadas como de “primeira geração”. Entretanto, estudos posteriores comprovaram que essas tintas eram pouco eficientes e com baixa durabilidade (Yebra *et al.*, 2004). Assim, em 1961 foram desenvolvidas as primeiras tintas com base em organoestânicos. Essas tintas ficaram denominadas como de “segunda geração”, tendo como base o tribulíestanho (TBT) e trifenílestanho (TPT). Esses organoestânicos foram aplicados na indústria de tintas já que o tribulíestanho apresentava uma alta eficiência e durabilidade, além de apresentar bons resultados quando comparado ao cobre (Godoi *et al.*, 2003). Porém, esse composto começou a apresentar inúmeros problemas devido à sua elevada toxicidade. O TBT é persistente no ambiente e também apresenta uma alta toxicidade para organismos que não são incrustantes, descritos como organismos não-alvo (Hoch, 2001; Lima *et al.*, 2006). O “imposex” em gastrópodes é o efeito tóxico mais conhecido causado pelo TBT (Lima Verde *et al.*, 2007). O efeito é caracterizado pelo surgimento de estruturas sexuais masculinas em fêmeas, que é irreversível e provoca a esterilização dos animais, podendo até exterminar populações de espécies mais sensíveis (Fernandez *et al.*, 2005). Por apresentar efeitos tóxicos nos organismos, o uso do TBT foi banido pela Organização Marítima Internacional- IMO em 2003 e o prazo limite para os países encerrarem a sua utilização foi até 2008 (Hellio, 2010). No Brasil, a Marinha suspendeu o uso das tintas à base de TBT nos navios em 2003 (Toste *et al.*, 2011), sendo criadas,

posteriormente, as Normas da Autoridade Marítima para o controle de Sistemas Antiincrustantes em Embarcações (NORMAM-23, 2007).

Atualmente, 20 diferentes compostos estão homologados pelo IMO para o uso como biocidas aditivos em tintas que empregam o cobre como principal substância em sua composição (Takahashi, 2009). Estes biocidas aditivos são compostos orgânicos não-metálicos, organometálicos e substâncias inorgânicas que, em alguns casos, podem ser usados de forma simultânea (Castro *et al.*, 2011). Estes novos biocidas foram classificados como de “3º geração”. Os biocidas aditivos mais usados são Irgarol, Diuron, Sea-Nine 211, Clorotalonil, Diclofluanida, Zinco piritiona e Cobre piritiona (Thomas *et al.*, 2001; Konstantinou & Albanis, 2004). A contaminação desses biocidas também é frequentemente detectada nas áreas com forte atividade naval, porém, os seus efeitos no ambiente são pouco conhecidos (Wang *et al.*, 2011). Desta forma, esses compostos ainda são potencialmente danosos ao meio ambiente.

### **Ensaio toxicológicos para novas substâncias**

Os efeitos causados pelas substâncias químicas no ambiente têm sido avaliados através de ensaios ecotoxicológicos (Akaishi, 2003). A partir de ensaios ecotoxicológicos é possível estabelecer os limites máximos da concentração da substância que seja não danosa ao meio ambiente auxiliando, assim, na tomada de decisões políticas (Zagatto & Bertolotti, 2008). Os testes de toxicidade são realizados sob condições experimentais específicas e controlados, que permitem expor os organismos-testes a diferentes concentrações para avaliação dos efeitos (Costa *et al.*, 2008). A mortalidade, imobilidade e alterações fisiológicas durante o desenvolvimento dos organismos são exemplos de efeitos negativos causados por substâncias tóxicas (Bao *et al.*, 2011; Fernández-Alba *et al.*, 2012).

Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos de acordo com o tempo de exposição ao composto. Os testes de toxicidade aguda avaliam os efeitos de substâncias em um curto período de tempo que pode variar de 0 até 96 horas (Rand & Petrocelli, 1985). Geralmente os efeitos observados para esses experimentos é letalidade ou imobilidade. Os resultados desses testes são expressos em valores de CL<sub>50</sub>, indicando qual a concentração causa efeito deletério para 50% dos organismos testados (Costa *et al.*, 2008). Já os testes de toxicidade crônica avaliam os efeitos de um agente

químico causando alterações fisiológicas ou comportamentais (Zagatto & Bertolotti, 2008). A toxicidade crônica está relacionada com o efeito de uma substância através de períodos prolongados sob exposição de doses subletais que causam alterações nos organismos testados (Schvartsman, 1991). Essas alterações podem aparecer em parte ou durante todo o ciclo de vida da espécie. Geralmente os testes de toxicidade crônica utilizam os estágios mais sensíveis dos organismos- teste como embriões e larvas (Borrely, 2001). Nesses ensaios os valores são indicados em CE<sub>50</sub> que gera efeitos a 50% dos organismos testados em um determinado período de tempo (CETESB, 1990). De acordo com o Regulamento da Comissão Europeia, os novos biocidas precisam prever os seus impactos sobre a biodiversidade através de ensaios toxicológicos antes de serem comercializados no mercado de tintas (UE, 2012).

### **Compostos naturais como alternativas “ecologicamente corretas” para tintas anti-incrustantes**

Como alternativa para essa problemática da toxicidade dos biocidas utilizados atualmente, compostos naturais estão sendo testados para a incorporação em tintas anti-incrustantes (Castro *et al.*, 2011). Acredita-se que por serem naturais não teriam um efeito danoso as espécies não alvos e ao meio ambiente de uma forma geral. Porém, é extremamente necessária a realização de ensaios toxicológicos mesmo com compostos de origem natural, para obter uma melhor avaliação do potencial de periculosidade destas substâncias (Perina, 2009), visto que os testes auxiliam na prevenção de possíveis consequências ecológicas antes da liberação de uma substância química no ambiente (Wu *et al.*, 1997). Muitos organismos sésseis desenvolvem-se livres da incrustação por outros organismos devido à produção de metabólitos secundários, e por este motivo esses organismos têm sido testados como potencial anti-incrustante (Fusetani, 2011). Contudo, dois aspectos ainda restringem o possível uso de compostos naturais em tintas anti-incrustantes: a dificuldade da obtenção das substâncias em grande quantidade e a ausência de testes ecotoxicológicos com organismos alvo e não-alvo (Clare, 1996; Qian, 2015). Por exemplo, Da Gama *et al.*, (2002; 2003) mostrou que o elatol, um composto de origem natural oriundo da macroalga *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V. Lamouroux, 1813 apresentou significativa ação anti-incrustante no ambiente natural e em laboratório. Porém, a sua aplicação em larga escala ainda é inviável devido à quantidade

de biomassa elevada que seria necessária para obter esse composto em escala comercial. Uma das alternativas para contornar esse problema é a síntese de compostos análogos aos encontrados nos organismos.

### **A origem do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” usado no presente estudo**

O Fator de Ativação de plaquetas ou *Platelet Activating Factor* é um glicerofosfolípídio (PAF ou Lyso-PAF) mediador bioativo, participando de funções celulares, assim como patologia celular (Bazan, 1994). O PAF que identifica primeiramente a defesa molecular envolvendo processos patológicos, como reações inflamatórias (Vadas et al., 2008).

As esponjas marinhas se destacam dentre os invertebrados marinhos com potencial aplicação em tintas antiincrustantes, tendo em vista o seu alto potencial de defesa química (Tsoukatou *et al.*, 2007). As esponjas são desprovidas de defesas físicas e, com isso, geralmente produzem centenas de compostos químicos que são amplamente explorados como fontes de compostos bioativos (Perdicaris *et al.*, 2013). Alguns estudos mostram que extratos orgânicos de esponjas marinhas contêm uma alta proporção de lipídios que podem contribuir para bioatividade desses organismos (Dembitsky *et al.*, 2003).

O PAF e Lyso-PAF estão presentes em animais e vegetais marinhos e terrestres (Singh *et al.*, 2013; Nishikawa *et al.*, 2015). Tem sido proposto o uso de PAF extraídos de esponjas marinhas como alternativa para biocida (Butler *et al.* 1996). O uso dessa substância como biocida tem como princípio o possível desencadeamento de uma reação antagônica ou inflamatória nas células dos organismos incrustantes quando estão em contato com tal composto (Prescott *et al.*, 1990). Assim, o que se espera é que o composto difundido no biofilme possa agir ocasionando o rompimento ou mau funcionamento da membrana celular.

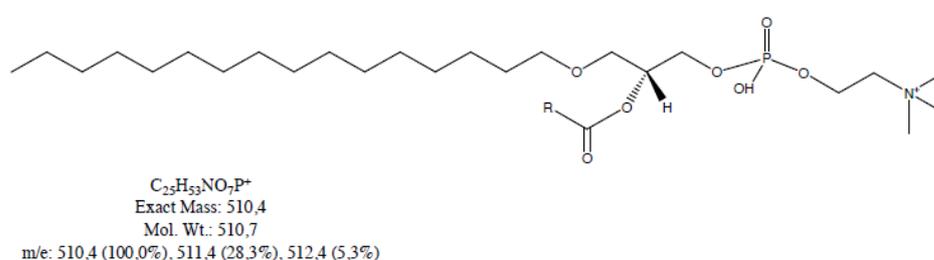
Butler *et al.* (1996) foram os primeiros a verificar a eficiência de Lyso-PAF extraídos da esponja marinha *Crella incrustans* como eficientes inibidores do assentamento larvar do briozoário *Bugula neritina*. Dentro desse contexto, Batista *et al.* (2015a) extraíram PAF das esponjas marinhas - *Aplysina fulva*, *Amphimedon viridis*, *Arenosclera brasiliensis*, *Darwinella sp.* e *Geodia corticostylifera* - para aplicação

dessa substância como um biocida natural com a finalidade de produzir um composto análogo sintético. Porém, conclui-se que a extração dos compostos é inviável devido à demanda de biomassa necessária para a produção do biocida natural, já que 1kg de esponjas rende apenas 2 mg de substância que poderia ser aplicada como um biocida (Batista, 2012). Como alternativa, foram conduzidas extrações dessa mesma substância (PAF), porém tendo como matéria-prima lecitina de soja comercial (Batista, 2012) uma matéria-prima abundante e de baixo custo. Além disso, a lecitina de soja é um complexo de mistura que envolve diferentes tipos de fosfolipídios (Patil *et al.*, 2010)

Experimentos realizados em laboratório demonstraram que o novo composto sintetizado a base de lecitina apresenta uma redução significativa no crescimento da bactéria *Pseudoalteromonas elkovii* (80% na concentração de 100µg/L), assim como de microalgas *Skeletonema costatum* (até 63%; 300µg/L) quando comparada à ação do sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), biocida usualmente empregado em tintas anti-incrustantes comerciais (Batista, 2012).

Também foram conduzidos experimentos em campo na Baía de Guanabara utilizando placas de carbono contendo um biocida utilizado no mercado e 5% desse composto sintetizado a partir de lecitina. Através desses testes foi possível observar que ocorreu redução da bioincrustação marinha de macroorganismos nas placas que continham a tinta contendo esse composto (Batista *et al.* 2015b).

Em 2014, o composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” sintético e análogo à lecitina de soja, foi então patenteado (US 8657943-B2, 2014) devido seu potencial uso em tintas comerciais anti-incrustantes (Figura I, Tabela I). Porém, não foram realizados testes ecotoxicológicos com esse composto.



**Figura I-** “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”

**Tabela I.** Características físicas e químicas do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” sintetizado a partir de lecitina de soja comercial (US 8657943-B2, 2014).

Fórmula molecular	C <sub>25</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>7</sub> P
Classe	Mistura éter-glicero-fosfolípidios
Peso molecular	Valor médio 510
Solubilidade em água	Média
Solubilidade em solvente orgânico	Médio para alto

Tendo em vista as questões abordadas, o presente estudo visou detectar os possíveis efeitos tóxicos do composto sintetizado “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” em diferentes invertebrados marinhos. Os resultados obtidos estão apresentados em três capítulos, que se encontram no formato de artigos científicos. O primeiro capítulo foi intitulado “Análise da toxicidade aguda e eficiência anti-incrustante de um composto sintetizado a partir de glicerofosfolípidios em larvas de organismos incrustantes”, tendo como objetivo avaliar a letalidade e eficiência anti-incrustante do composto testado, em larvas de invertebrados bentônicos, o briozoário *Bugula neritina* Linnaeus, 1759 (Bryozoa) e o cirripédio *Amphibalanus amphitrite* Darwin, 1854 (Arthropoda). O segundo capítulo intitulado “Toxicity of an antifouling compound synthesized from soya bean lecithin to sea urchin *Lytechinus variegatus* larvae” teve como objetivo avaliar o potencial tóxico do composto no desenvolvimento embriolarval do ouriço do mar *Lytechinus variegatus* Lamarck, 1816 (*Echinodermata*), um organismo não-alvo encontrado ao longo da costa brasileira. O último capítulo intitulado “Avaliação do composto 1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina como possível ferramenta de controle químico do coral sol *Tubastraea coccinea*”, teve como objetivo verificar se esse composto natural pode auxiliar como ferramenta de controle químico para as larvas do coral não nativo *Tubastraea coccinea* Lesson 1829.

## **I.I OBJETIVO GERAL**

Avaliar a toxicidade e atividade anti-incrustante do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” em larvas de diferentes invertebrados marinhos com a finalidade de fornecer subsídios para o seu uso como biocida auxiliar.

## **I.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Verificar o efeito letal do composto em larvas de cirripédio *Amphibalanus amphitrite* e do briozoário *Bugula neritina*;
- ✓ Averiguar a eficiência do composto como inibidor do assentamento larvar do cirripédio *A. amphitrite* e do briozoário *B. neritina*;
- ✓ Determinar o efeito do composto no desenvolvimento embriolarval do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*;
- ✓ Avaliar o efeito letal do composto em larvas do coral invasor *Tubastraea coccinea*.

## **I.III HIPÓTESES:**

H<sub>0</sub>: O composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” não inibe de forma eficiente o assentamento larvar de *B.neritina* e *A.amphitrite*.

H<sub>1</sub>: O composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” inibe eficientemente o assentamento larvar de *B.neritina* e *A.amphitrite*;

H<sub>0</sub>: O composto não causa efeito tóxico em larvas aos invertebrados marinhos *B.neritina* e náuplios de *A.amphitrite*;

H<sub>1</sub>: O composto causa efeitos deletérios para as larvas dos invertebrados *B.neritina* e *A.amphitrite*

H<sub>0</sub>: O desenvolvimento embriolarval do ouriço *Lytechinus variegatus* não sofre alterações quando em contato com o composto testado.

H<sub>1</sub>: O ouriço *L.variegatus* sofre alterações no seu desenvolvimento embriolarval quando em contato com o composto testado;

H<sub>0</sub>: A substância “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” não exerce efeito tóxico nas larvas de *Tubastraea coccinea*;

H<sub>1</sub>: A substância “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” exerce efeito tóxico nas larvas do coral sol *Tubastraea coccinea*.

## II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akaishi, F.M. (2003) Aplicação de Biomarcadores de Contaminação Ambiental em Estudos de Laboratório e Monitoramento em Campo. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 111p.

Batista, W. R. (2012). *Utilização de glicerofosfolípidios sintéticos análogos do PAF como agentes antiincrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 214p.

Batista, W.R., Lopes, S.R.P., Silva, D.B.C., Neves, M.H.C.B., Coutinho, R., Lopes, C.C., Lopes, R.S.C.(2015a). Evaluating antimicrobial activity of bioactive glycerophospholipids presents in brazilian marine sponges extracts. In: The battle against microbial pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, 144-150.

Batista, W.R., Neves, M.H.C.B., Coutinho, R., Lopes, C.C., Lopes, R.S.C. (2015b). Glicerofosfolípidios sintéticos para uso como aditivo biocida em tintas antiincrustante. *Química Nova*, XY: 1-7.

Bazan, N.G. (1994). Platelet-activating factor is a synapse messenger and an intracellular modulator of gene expression. *Journal Lipids Mediatos Cell Signal* ,10:83–86.

Borrely, I.S.(2001). *Redução da toxicidade aguda de efluentes industriais e domésticos tratados por irradiação com feixe de elétrons, avaliada com as espécies Vibrio fischeri, Daphnia similis e Poecilia reticulata*. Tese de Doutorado.Universidade de São Paulo, São Paulo,120p.

Butler, A.J., Altena, I.A.V., Dunnes, S.J. (1996). Antifouling activity of Lyso-platelet-activating factor extracted from australian sponge *Crella incrustans*. *Journal of Chemical Ecology*, 22:1-16.

Cao, S., Wang, J., Chen, H., Chen, D. (2011). Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin* 56: 598-612.

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

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (1990). Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: CETESB,17p.

Chambers, L.D., Chambers, L., Stokes, K.R., Walsh, F.C., Wood, R.J.K. (2007). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*, 202:412-413.

Clare, A.S. (1996). Marine natural product antifoulants: status and potential. *Biofouling*, 9: 211–229.

Carlton, J.T. (2001). Introduced species in U.S. Coastal Waters: Environmental Impacts and Management Priorities. Arlington, Virginia: Pew Oceans Commission.

Chapman, J., Hellio, C., Sullivan, T., Brown, R., Russell, S., Kitteringham, E., Le Nor, L., Regan, F. (2014). Bioinspired synthetic macroalgae: Examples from nature for antifouling applications. *International Biodeterioration Biodegradation*, 86:6-13.

Comunidade Europeia. (2012). Regulamento (UE) nº528/2012 do parlamento europeu e do conselho de 22 de maio de 2012, relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas.

Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R., Espindola, E. L. G. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31:1820–1830.

Daros, B.N. (2014). *Indução de imposex em Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767) (*Gastropoda: Muricidae*) exposto à água contaminada com tributilestanho (TBT). Monografia. Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, 86p.

Dafforn, K.A., Lewis, J.A., Johnston, E. L. (2011). Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 62:453-465.

Da Gama, B.A.P., Pereira,R.C., Carvalho, A.G.V., Coutinho,R.,Yoneshigue.,Valentin,Y. (2002) The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. *Biofouling*, 18:13-20.

Da Gama, B.A.P., Pereira,R.C., Soares,A.R., Teixeira,V.L., Yoneshigue,Valenti,Y. V.(2003). Is the mussel test a good indicator of antifouling activity? A comparison between laboratory and field assays. *Biofouling*, 19:161-169.

Dembitsky, V. M., Rezanka, T., Srebnik, M. (2003). Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae class Demospongiae. *Chemistry Physics Lipids*, 123:117–155.

Djerassi, C., Lam, W. K. (1991). Phospholipid studies of marine organisms. Sponge phospholipids. *Accounts of Chemical Research*, 24:69–75.

Fernandez, M.A., Wagener, A.L.R., Lima Verde, A.M., Scofield, A.L., Pinheiro, F.M., Rodrigues, E. (2005). Imposéx and surface sediment specialion: A combined approach to avaluete organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Environmental Research*, 59:435-452.

Fusetani, N. (2011). Antifouling marine natural products. *Natural Product Reports*, 28:400–410.

Godoi, A.F.L., Favoreto, R., Santigao-Silva, M. (2003). Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. *Química Nova*, 26:708-716.

Gollasch, S. (2002). The importance of ship hull fouling as a vector of species introductions into the North Sea. *Biofouling*, 18: 105–121.

Guardiola, F. A., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M. A. (2012). Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 1541–1560.

Hellio, C. (2010). The potential of marine biotechnology for the development of new antifouling solutions. *Le Journal Des Sciences Halieutique et Aquatique*, 2:35-41.

Hoch, M. (2001). Organotin compounds in the environment: an overview. *Applied Geochemistry*, 16:19–43.

Konstantinou, I.K., Albanis, T.A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: A review. *Environment International*, 30:235-248.

Lima, A.F.A., Castro, I.B., Rocha-Barreira, C.A. (2006). Inposex induction in *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) submitted to an organotin-contaminated diet. *Brazilian Journal of Oceanography*, 24:85-90.

Lima Verde, A.M., Wagner, A.L.R. Fernandez, M.A., Coutinho, R. (2007). *Stramonita haemastoma* as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. *Marine Environmental Research*, 64: 384-398.

Martins, T.L., Vargas, V.M.F. (2013). Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8:1-11.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. (2009). Informe sobre as espécies exóticas invasoras marinhas no Brasil / Ministério do Meio Ambiente: Lopes, R. M./IO-USP-Brasília: MMA/SBF, 440 p.

NORMAM-23/DPC. (2007). Normas da Autoridade Marítima para controle de Sistemas Antiincrustantes em Embarcações.

Nishikawa, Y., Furukawa, A., Shiga, I., Muroi, Y., Ishiii, T., Hongo, Y., Takahashi, S., Sugawara, T., Koshino, H., Ohnishi, M. (2015). Cytoprotective Effects of Lysophospholipids from Sea Cucumber *Holothuria atra*. *Plos One*.

Patil, V. V., Galge, R. V., Thorat, B. N. (2010). Extraction and purification of phosphatidylcholine from soyabean lecithin. *Separation and Purification Technology*, 75: 138–144.

Perina, F. C. (2009). *Avaliação da toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 120p.

Perdicaris, S., Vlachogianni, T., Valavanidis, A. (2013). Bioactive Natural Substances from Marine Sponges: New Developments and Prospects for Future Pharmaceuticals. *Natural Products Chemistry & Research*, 1:1-8.

Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. (1990). Platelet-activating factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 17381 – 17384.

Qian, P.Y., Zhongrui L., Xua,Y., Lia, Y., Fusetani,N.(2015). Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009–2014. *Biofouling*, 31:101-122.

Santos, J.G.A., Lamonica, M.N.(2008). Água de lastro e bioinvasão: introdução de espécies exóticas associada ao processo de mundialização. *Vértices*, 10:141-151.

Singh, P., Singh, I. N., Mondal, S. C., Singh, L., Garg, V. K. (2013). Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin. *Fitoterapia*, 84: 180–201.

Schvartsman,S.(1991). Intoxicações agudas. Sarvier, São Paulo, 335p.

Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R., Hertel, W.M. (2011). Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* 27: 87–98.

Rand, G.M. & S.R. Petrocelli. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Taylor & Francis, New York, 666 pp.

Takahashi, K. (2009). Release Rate of Biocides from Antifouling Paints. In: Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W. *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*.

Toste, R., Fernandez, M. A., Pessoa, I. A., Parahyba, M. A., Dore, M. P.(2011). Organotin pollution at Arraial do Cabo, Rio de Janeiro State, Brazil: increasing levels after the TBT ban. *Brazilian Journal of Oceanography*, 59:111-117.

Thomas, K. V., Fileman, T. W., Readman, J. W., Waldock, M. J. (2001). Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 677–688.

Tsoukatou, M., Maréchal, J.P., Hellio, C., Novaković, I., Tufegdžic, S., Sladić, D., Gašić, M.J., Clare, A.S., Vagias, C., Roussis, V.( 2007). Evaluation of the activity of the sponge metabolites avarol and avarone and their synthetic derivatives against fouling micro- and macroorganisms. *Molecules*, 12: 1022-1034.

United State Patent and Trademark Office (USPTO) (2014).1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine compounds, preparation process, antifouling composition, process for its preparation, method to prevent fouling, method to turn a surface into an antifouling surface, and, covered surface. Patented number US 8657943-B2.

Vadas, P., Gold, M., Perelman, B., Liss, G. M., Lack, G., Blyth, T., Simons,F.E.R., Simons, K. J., Cass, D.,Yeung, J.(2008).Platelet-Activating Factor, PAF Acetylhydrolase, and Severe Anaphylaxis. *New England Journal Medicine*, 358: 28–35.

Wang, H., Li, Y., Huang, H., Xu, X., Wang, Y. (2011). Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides using the *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin embryo test. *Environmental Toxicology Chemistry*, 30: 692–703.

Wu, R.S.S., Lam, P.K.S., Zhou, B.S. (1997). A phototaxis inhibition assay using barnacle larvae. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12:.231-236.

Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50:75-104.

Zagatto, P.A., Bertolotti, E. (2011). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. São Carlos: Rima, 478 p.

## Capítulo 1

Análise da toxicidade aguda e anti-incrustante de um composto sintetizado a partir de glicerofosfolipídios em larvas de organismos incrustantes

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade (mortalidade) e a ação anti-incrustante do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” em larvas de *Bugula neritina* e em dois estágios larvais de *Amphibalanus amphitrite* através de bioensaios conduzidos em laboratório. A porcentagem de larvas assentadas e mortas foi quantificada em seis diferentes concentrações do composto ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $0.05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e comparado com o controle positivo (solventes), controle negativo (sulfato de cobre) e controle nulo (água do mar). As maiores concentrações do composto ( $100$  e  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram tóxicas para as larvas de *B.neritina*, ( $100$  e  $90\%$ , respectivamente) náuplio ( $97\%$  e  $46\%$ , respectivamente) e cipris ( $58\%$  e  $33\%$ , respectivamente) de *Amphibalanus amphitrite*. Por outro lado, foi observado  $100\%$  de inibição do assentamento larvar de *B.neritina* nas concentrações  $10$  e  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  desse composto. Nos experimentos com náuplios não foram observados efeitos tóxicos do composto abaixo da concentração  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para as cipris o composto testado não apresentou inibição do assentamento larvar, causando apenas mortalidade e permitindo o assentamento larvar. A concentração letal para  $50\%$  das larvas foi de  $41,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *B.neritina*, enquanto que para os náuplios e para as cipris de *A.amphitrite* o  $\text{LC}_{50}$  foi de  $54,5$  e  $69,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Os solventes utilizados (clorofórmio, metanol e água LC-MS) apresentaram toxicidade para as larvas de *B.neritina* ( $80\%$  e  $50\%$ , respectivamente) e náuplios ( $80\%$  de mortalidade), em contrapartida não foram observados efeitos deletérios nas cipris. O sulfato de cobre (controle negativo) apresentou uma elevada toxicidade para todas as larvas testadas (variando de  $21\%$  à  $100\%$  de mortalidade). Ambas as larvas de *B.neritina* e *A.amphitrite* apresentaram elevada taxa de mortalidade na maior concentração testada do composto ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), próximas ao controle negativo (sulfato de cobre). Quando comparado aos demais biocidas acessórios utilizados no mercado de tintas, a substância testada apresenta uma baixa toxicidade. Porém, mais experimentos devem ser realizados para determinar a faixa de concentração ideal que iniba o assentamento larvar e não cause toxicidade para as mesmas com a finalidade de incluir esse composto em tintas anti-incrustantes.

**Palavras- chave:** Composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”; Toxicidade; Anti-incrustante; Larvas.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the toxicity (mortality) and action of the antifouling compound, "1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine" on *Bugula neritina* larvae and two larval stages of *Amphibalanus amphitrite* by bioassays conducted in the laboratory. The percentage of settled and dead larvae was measured at six different concentrations of the compound ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $0.05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and compared with a positive control (solvent), negative control (copper sulphate) and null control (sea water) at the same concentrations as the test compound. The highest concentrations of the compound ( $100$  and  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) were toxic to *B.neritina* larvae ( $100$  and  $90\%$ , respectively), as well as the nauplii ( $97\%$  and  $46\%$ , respectively) and cypris ( $58\%$  and  $33\%$ , respectively) of *A.amphitrite*. Furthermore,  $100\%$  inhibition of *B.neritina* larval settlement in concentrations of  $10$  and  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  was observed. In experiments of this compound with nauplii were observed toxic effects of compound concentrations from  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . For cypris the compound tested showed no inhibition of larval settlement, causing mortality and only allowing the larval settlement. The lethal concentration to  $50\%$  of the *B.neritina* larvae was  $41.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , while for the nauplii and for cypris of *A.amphitrite* the  $\text{LC}_{50}$  was  $54.5$  and  $69.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectively. The solvents used (chloroform, methanol and water LC-MS) were toxic to *B.neritina* larvae ( $80\%$  and  $50\%$ , respectively) and nauplii ( $80\%$  mortality), however deleterious effects were observed in cypris. Copper sulphate (negative control) showed a high toxicity for all larvae tested (range of  $21\%$  to  $100\%$  mortality). Both *B.neritina* and *A.amphitrite* larvae had a high mortality rate at the highest concentration of the compound ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), next to the negative control (copper sulphate). When compared to other biocides used in the paint industry, the test substance has a low toxicity. However, further experiments must be performed to determine the ideal concentration range that inhibits settling and does not cause larval toxicity in order to include this compound in antifouling paints.

**Keywords:** "1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine" compound; Toxicity; Antifouling activity; Larvae.

## 1.1 INTRODUÇÃO

O processo de estabelecimento, crescimento e reprodução de bactérias e invertebrados sésseis sobre superfícies artificiais submersas é conhecido como bioincrustação (Cao *et al.*, 2010; Holm, 2012). A bioincrustação ocasiona problemas econômicos no mercado naval, pois está relacionada com o aumento do consumo de combustível e corrosão (Chapman *et al.*, 2014). Além disso, a bioincrustação gera impactos negativos nos ecossistemas devido à introdução de espécies exóticas (Gollasch, 2002; Piola *et al.*, 2009). Com o intuito de impedir esse processo substâncias químicas denominadas biocidas têm sido utilizadas como princípio ativo em tintas anti-incrustantes (Castro *et al.*, 2011). Um bom exemplo de composto utilizado como biocida é o tributilestanho, amplamente utilizado durante anos devido à sua eficiência no controle da bioincrustação (Iwao, 2003). Porém, devido a sua toxicidade em espécies não-alvo, seu uso foi banido em 2008 (Yebera *et al.*, 2004; Fusetani, 2008). Depois do banimento desse composto, cerca de 20 compostos estão sendo comercializados atualmente como biocidas acessórios (Takahashi, 2009), mas estudos alguns evidenciaram toxicidade desses biocidas para organismos não-alvo (Dafforn *et al.*, 2011).

Considerando os impactos causados pelos biocidas comerciais atuais usados em tintas anti-incrustantes (Guardiola *et al.*, 2012), muitos compostos naturais estão sendo testados como uma alternativa “ambientalmente correta” (Qian *et al.*, 2010). Esses compostos são isolados de microorganismos, algas, esponjas, corais entre outros (Blosser & Gray, 2000; Tsoukatou *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2014; Dobretsov *et al.*, 2015). Porém, poucos desses compostos são comercialmente aplicáveis por conta da biomassa necessária de matéria prima para a extração de novas substâncias (Thoms & Schupp, 2005). A implementação de análogos e sintéticos dessas substâncias é considerada uma boa alternativa para este problema (Qian *et al.*, 2015).

Recentemente, um estudo propôs o uso de glicerofosfolipídios análogos ao Fator de Ativação de Plaquetas ou *Platelet Activating Factor* (PAF) sintetizados a partir da lecitina de soja como potencial biocida acessório, denominado “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfolina” (Batista *et al.*, 2015). Esse biocida acessório apresentou eficiência em testes realizados em campo e em laboratório (Batista *et al.*, 2015; Batista, 2012). Porém, faz-se necessário a realização de bioensaios toxicológicos para sua aplicação em tintas de acordo com o regulamento proposto pela União Européia (EU,

2010). Esses bioensaios geralmente utilizam invertebrados para avaliar a toxicidade de diferentes substâncias (Mochida & Fujii, 2009).

Os invertebrados marinhos *Bugula neritina* (Linnaeus, 1758) (Bryozoa: Bugulidae) e *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) (Arthropoda: Balanidae) são frequentemente usados como organismos modelos para bioensaios de novos compostos anti-incrustantes devido às suas amplas distribuições geográficas e dominância nas comunidades macrobentônicas tropical e subtropical (Fusetani, 2004). Tanto *B.neritina* como *A.amphitrite* são espécies excelentes para a realização de bioensaios por serem facilmente coletadas no campo, além do seu cultivo em laboratório ser amplamente conhecido (Dahms *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2009). Em geral, os bioensaios realizados com esses organismos avaliam a toxicidade aguda tendo como resposta a mortalidade e/ou a inibição do assentamento larvar (Faimali *et al.*, 2006).

As larvas de *B.neritina* são grandes, facilmente notadas, ricas em nutrientes (Wendt, 2000), são liberadas durante o dia (Lindquist & Hay 1996), possuem uma natação lenta e passam pouco tempo no plâncton (Keough & Chernoff, 1987). Seu assentamento pode ser observado em um período entre uma e duas horas e após 48 horas completam sua metamorfose (Dahms *et al.*, 2004). Já as larvas de *A.amphitrite* passam por um desenvolvimento mais complexo até completar a metamorfose. Possuem seis estágios planctotróficos que iniciam no estágio náuplio e encerram no estágio cypriis (Maréchal *et al.*, 2012).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfolina” no assentamento e mortalidade larvar dos invertebrados *B.neritina* e *A.amphitrite*.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Tratamentos

A água do mar utilizada para a diluição de soluções de teste e controles foi coletada com uso de galão plástico de 10 litros, numa área localizada na Ilha do Farol, em Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil (23°00'04.77"S; 42°00'24.42"O). Em laboratório, a água do mar foi imediatamente filtrada, utilizando filtro de acetato de celulose (0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore).

O sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) (Reagen) foi usado como controle negativo, já que este composto (Cu) tem sido usado como alternativa ao TBT e é reconhecidamente tóxico aos invertebrados (Manzo *et al.*, 2008). O controle positivo consistiu numa solução preparada na proporção de 1:1:1 de clorofórmio (Tedia), metanol (Merck) e água pura (Millipore). A utilização desses solventes foi determinada com base no método de Folch (1957) que descreve clorofórmio, metanol e água sendo uma mistura binária mais eficaz na extração de lipídios presentes em matrizes animais e vegetais. Além disso, foi utilizado um controle nulo onde continha apenas água do mar filtrada para observar o desenvolvimento natural dos organismos testados.

Seis concentrações diferentes do composto foram preparadas (0,05; 0,5; 5; 10; 50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a partir de uma amostra mãe. Para tal, 100 mg do composto foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionado a proporção de 1:1:1 de clorofórmio, metanol e água pura (LC-MS) (2ml de cada solvente) e avolumado até 1 litro com água do mar, sendo considerada a solução “mãe”. Essa solução “mãe” foi utilizada para a preparação das seis concentrações (0,05; 0,5; 5; 10; 50; 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A utilização de um controle negativo e positivo é comum em testes de toxicidade (Magalhães & Filho, 2008). Para o controle negativo foi pesado 100 mg de sulfato de cobre e avolumado com água do mar até 1000 mL, sendo a amostra mãe usada para preparar as demais concentrações. Similarmente, para o controle positivo foi utilizado à mesma proporção de solventes usados nos tratamentos com a substância em diferentes concentrações.

## 1.2.2 Bioensaio com *Bugula neritina* Linnaeus, 1758

### 1.2.2.1 Organismos-teste

O briozoário *Bugula neritina* (Filo Bryozoa) (Fig 1.1) apresentam uma distribuição cosmopolita (Cetto *et al.*, 2011). São normalmente encontrados em portos e baías poluídos, principalmente associados a qualquer substrato consolidado artificial. Seu uso em testes de toxicidade é relevante porque representa uma espécie incrustante típica, além da facilidade de liberação de suas larvas em laboratório (Bryan *et al.*, 1998) que variam de acordo com a sua fertilidade (Keough, 1989). O período estimado de assentamento larvar dessa espécie varia 1 à 2 horas (Dahms *et al.*, (2004).



**Figura 1.1** - *Bugula neritina*. Foto: Costa, R.S.

### 1.2.2.2 Coleta e aclimação

Os briozoários foram coletados no Canal de Itajuru, Cabo Frio, Rio de Janeiro (22°52'29.46"S; 42°01'04.77"O). As colônias férteis foram coletadas em cascos das embarcações com uso de espátulas. Após a coleta, a fauna e detritos agregados foram removidos. Os organismos foram levados para o Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), onde foram transferidos e mantidos em um aquário (10 litros) com aeração constante, sob temperatura de 25 °C em um ambiente totalmente escuro para auxiliar no processo da indução de liberação larvar.

### 1.2.2.3 Teste de toxicidade e anti-incrustante

Após 24 horas, os organismos foram transportados para um béquer de quatro litros para facilitar a coleta das larvas. O béquer com *Bugula neritina* foi exposto à luz solar por cerca de 30 minutos para indução de liberação de larvas (Keough, 1984). As larvas nadaram para a superfície do recipiente e foram coletadas com o auxílio de pipeta Pasteur. As larvas foram colocadas em placas de 24 poços (Ciencor), contendo 2 ml das seis diferentes concentrações ( $0.05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do composto e dos controles (negativo, positivo e nulo). Quatro réplicas foram usadas para cada tratamento. A quantidade de larvas por réplica variou de cinco a dez, de acordo com a eficiência da liberação em cada experimento. Cada placa foi observada no microscópio estereoscópico (Zeiss, modelo KL 1500 LCD) após 24 horas (Martíns & Uriz, 1993). A quantidade de larvas nadando, mortas e assentadas foram quantificadas em cada poço.

### 1.2.3 Bioensaio com cirripédio *Amphibalanus amphitrite* Darwin, 1854

#### 1.2.3.1 Organismos-teste

As Balamorpha (cracas) são crustáceos, frequentemente encontradas, incrustadas em substratos consolidados naturais e artificiais. A espécie *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) é uma boa representante de crustáceos marinhos (Figura 1.2), por ser cosmopolita e apresentar uma ampla distribuição geográfica (Piazza *et al.*, 2011). Ocorrem principalmente na região de entre marés (Desai *et al.*, 2006). Diversos estudos usam larvas desse cirripédios em estágio náuplio II em teste de toxicidade (Lam *et al.*, 2000; Piazza *et al.*, 2011; 2012) e estágio cypis para avaliar o assentamento larvar (Maréchal & Hellio, 2009).



**Figura 1.2** - *Amphibalanus amphitrite*. Foto: M.Faimali

#### 1.2.3.2 Coleta e aclimação

Os indivíduos adultos de *A. amphitrite* foram coletados em região de entre marés em Monte Alto na Lagoa de Araruama - RJ (22°94'23.43'' S; 42°11'50.16'' O) e na Praia dos Anjos - Arraial do Cabo, RJ (22°58'16.33''S; 42°01'10.60''O). Após a coleta, os espécimes foram levados para o laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) onde foram mantidos em aquários (10 litros) em sistema de cultivo. Para os testes com estágio náuplio II foram utilizadas as cracas coletadas na Praia dos Anjos, e nos experimentos realizados com cipris foram utilizadas as cracas coletadas na Lagoa de Araruama.

#### 1.2.3.3 Obtenção das larvas e manutenção do cultivo

Os cirripédios (fase adulta) foram submetidos à imersão em água do mar filtrada após um período de duas horas de permanência num béquer sem água. Os cirripédios liberaram larvas em seu primeiro estágio, denominado náuplio I, assim que entraram em contato com a água do mar devido ao estresse gerado pela dessecação. Foi utilizada uma câmara escura e um foco de luz para observação das larvas liberadas que, em cerca de 30 minutos, passam para o estágio larvar náuplio II. Este estágio foi utilizado nos experimentos tendo em vista a sua reconhecida sensibilidade (Faimali *et al.*, 2009).

Para obtenção de larvas no estágio cipris, os cirripédios (fase adulta) foram mantidos em aquários com uma alimentação diária de *Artemia* sp. sob a temperatura de 22°C. O procedimento para a cultura do estágio larvar náuplio seguiu o protocolo de Hellio *et al.* (2004). Após aproximadamente quatro dias, as larvas passam de náuplio

para o estágio cypriis. As cypriis foram coletadas com uma rede de plâncton de 200µm e colocadas em placas de petri com água do mar filtrada. As larvas foram mantidas sob refrigeração (6°C) até o início dos experimentos (quatro dias).

#### 1.2.3.4 Teste de toxicidade e assentamento

##### Bioensaio com Náuplio II

Os náuplios foram coletados com a ajuda de pipeta Pasteur e posteriormente inseridos em placas de 24 poços (Ciencor), contendo 2ml das seis concentrações do composto testado (0.05 µg.mL<sup>-1</sup>; 0.5 µg.mL<sup>-1</sup>; 5 µg.mL<sup>-1</sup>; 10 µg.mL<sup>-1</sup>; 50 µg.mL<sup>-1</sup>; 100 µg.mL<sup>-1</sup>) e dos diferentes controles (sulfato de cobre e solventes). Um controle contendo 2ml de água do mar também foi incluído na placa 24 poços. Cerca de 5 a 10 náuplios foram colocados em cada poço, sendo quatro réplicas para cada tratamento. Quatro réplicas foram usadas para cada tratamento. A quantidade de larvas mortas foi observada através de um microscópio estereoscópico binocular (Zeiss, modelo KL 1500 LCD), no tempo inicial do experimento (T=0) e após 24h (T=24) (Rittshof *et al.*, 1992

##### Bioensaio com Cypriis

As larvas cypriis foram inseridas em placas de 24 poços (Ciencor), contendo 2ml das seis concentrações do composto (0.05 µg.mL<sup>-1</sup>; 0.5 µg.mL<sup>-1</sup>; 5 µg.mL<sup>-1</sup>; 10 µg.mL<sup>-1</sup>; 50 µg.mL<sup>-1</sup>; 100 µg.mL<sup>-1</sup>) e três controles (sulfato de cobre, solventes e água do mar). Cerca de 10-15 cypriis foi adicionada em cada poço. Foram utilizadas seis réplicas para cada concentração e para o composto e todos os controles. As placas foram embrulhadas em papel alumínio e incubadas a 28°C, de acordo com Maréchal & Hellio (2008). O total de cypriis mortas e assentadas foi observado em microscópio estereoscópico (Zeiss, modelo KL 1500 LCD) durante três dias. As cypriis que não se moveram e não responderam após o toque de uma agulha entomológica foram consideradas como mortas.

### 1.3 TRATAMENTO DOS DADOS

As premissas da normalidade e homeocedasticidade dos dados foram averiguadas através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Os dados que não atenderam essas premissas foram transformados para arcoseno. Para os

experimentos realizados com as larvas de *B.neritina* e náuplio de *A.amphitrite* a análise de variância fatorial (ANOVA) foi usada para verificar se há diferenças significativas na porcentagem de larvas assentadas e mortas entre os diferentes tratamentos. O teste Tukey foi utilizado para verificar as diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, usando nível de significância  $\alpha = 0,05$  (Zar, 1999). Já nos experimentos realizados com cipris a significância das diferenças observadas no assentamento e mortalidade dos diferentes tratamentos ao longo do tempo foi testada através de Análises de Variância para medidas repetidas (ANOVA). Nos casos em que foi detectada diferença significativa, o teste *a posteriori* de Bonferroni foi aplicado.

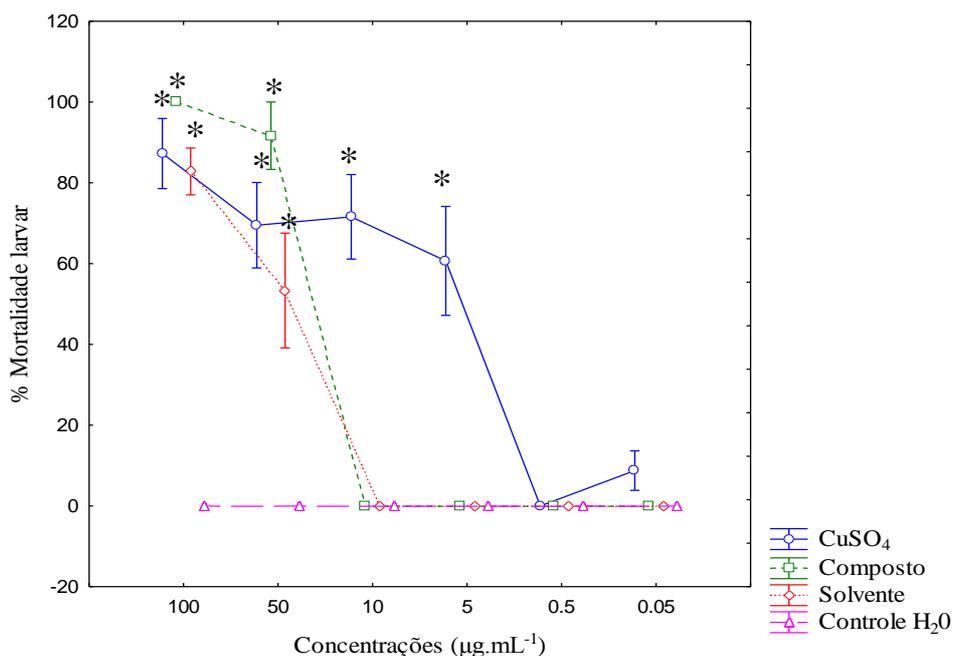
A concentração letal do composto ( $CL_{50}$ ) para 50% das larvas de todos os organismos testados foi calculado usando análise de Probitos (Finney, 1971). Todas estas análises foram realizadas no Programa Statistic 7.0 (Statsoft, 2006).

## 1.4 RESULTADOS

### 1.4.1 Bioensaio com *B.neritina*

#### *Mortalidade larvar*

As maiores taxas de mortalidade foram observadas nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (100 e 90%, respectivamente); enquanto que o efeito letal não foi observado nas demais concentrações (10 até 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Figura 1.3). A porcentagem de larvas mortas variou significativamente entre os tratamentos (ANOVA;  $F= 15,264$ ;  $p<0,05$ ), sendo significativamente maior nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  quando comparado ao controle com água do mar (Tukey;  $p<0,05$ ). Em contraste, não foi observada diferença significativa entre a porcentagem de larvas mortas observadas nestas concentrações (100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) quando comparado ao controle sulfato de cobre (Tukey;  $p>0,05$ ). O sulfato de cobre apresentou elevada toxicidade, com mortalidade variando de 90 até 50% (Figura 1.3). Uma diferença significativa (Tukey;  $p<0,05$ ) foi observada nas concentrações de 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do controle solvente e o controle água do mar. Não foi observada diferença significativa entre o controle água do mar e as concentrações entre 10 até 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do controle positivo (solvente) (Tukey;  $p>0,05$ ). O valor da concentração letal do composto para 50% das larvas de *B.neritina* foi de 41,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

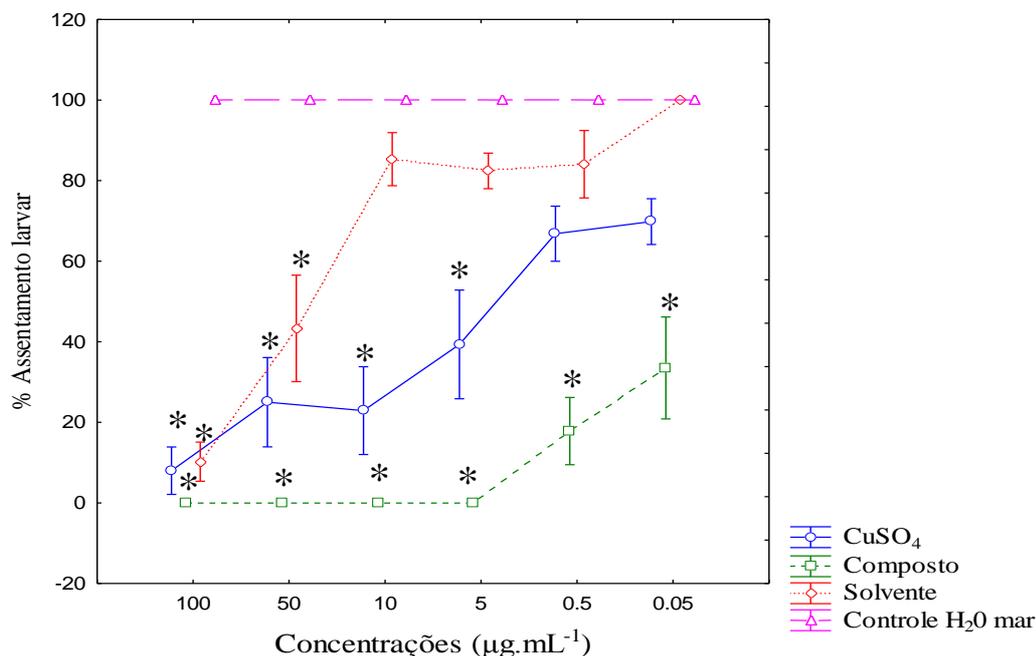


**Figura 1.3** - Média e desvio padrão da mortalidade larvar (%) de *Bugula neritina* em diferentes tratamentos. Controle positivo: solventes (clorofórmio, metanol e água LC-MS); Controle negativo: sulfato de cobre; Controle nulo: água do mar; Composto: “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”. O asterisco (\*) indicam tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle de água do mar ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

#### Assentamento larvar

As porcentagens de larvas assentadas variaram significativamente entre os diferentes tratamentos (ANOVA;  $F=15,265$   $p < 0,05$ ). Houve assentamento larvar nas concentrações 0.5 e 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (20 e 30%, respectivamente) (Fig 1.4). A porcentagem de larvas assentadas nas concentrações 0.5 e 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto testado diferiu significativamente quando comparado aos demais controles (Tukey;  $p < 0,05$ ). No controle negativo ( $\text{CuSO}_4$ ) foi observado uma taxa de assentamento nas mesmas concentrações que o composto, porém com cerca de 65% de larvas assentadas. Não foram observadas diferenças significativas nessas concentrações do cobre quando comparada ao controle de água do mar (Tukey;  $p > 0,05$ ). Com relação ao controle positivo (solventes), a taxa de assentamento variou entre 80% e 100% nas concentrações 10 até 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A porcentagem de larvas assentadas nestas mesmas concentrações do controle solvente não diferiu significativamente quando comparado ao controle nulo (água do mar) (Tukey;  $p > 0,05$ ), nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

foram observadas diferenças significativas em relação ao controle nulo (Tukey;  $p < 0,05$ ).



**Figura 1.4-** Média e desvio padrão do assentamento (%) larvar de *Bugula neritina* em diferentes tratamentos. Controle positivo: solventes (clorofórmio, metanol e água LC-MS); Controle negativo: sulfato de cobre; Controle nulo: água do mar; Composto: “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”. O asterisco (\*) indicam tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle de água do mar ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

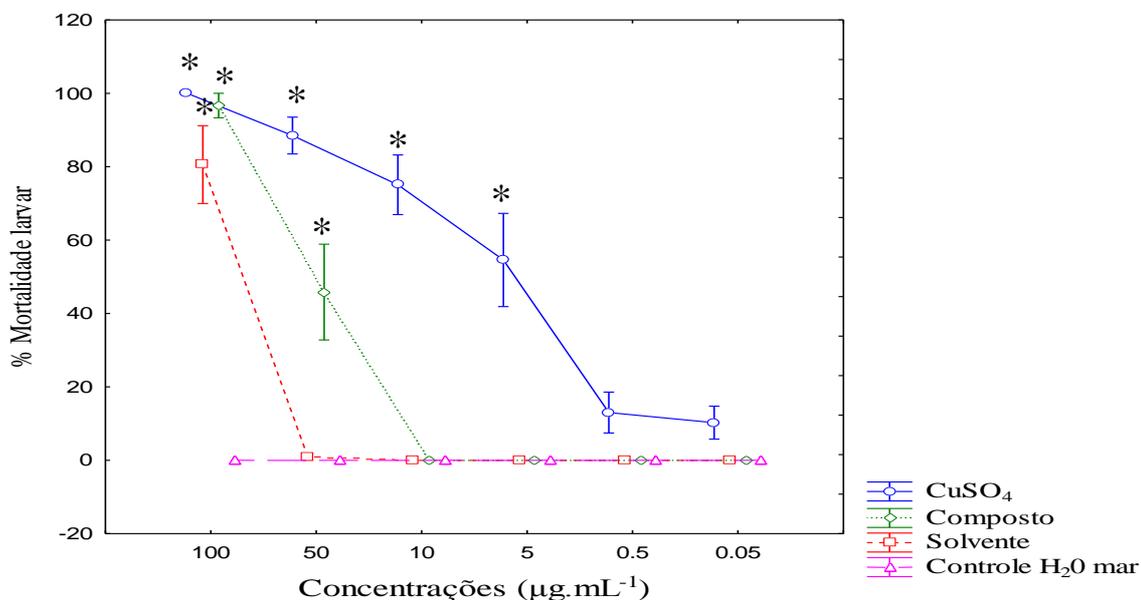
#### 1.4.2 Bioensaio com *A.amphitrite*

##### *Mortalidade larvar náuplio II*

A Fig. 1.5 mostra que a porcentagem da mortalidade larvar variou significativamente entre os diferentes tratamentos (ANOVA;  $F=15,263$ ;  $p < 0,05$ ). As maiores taxas de mortalidade de náuplios foram observadas nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (97 e 46 %, respectivamente) após 24 horas; enquanto que na demais concentrações (10; 5; 0.5; 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) não foi observado efeito letal para as larvas. Foi observada diferença significativa nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do efeito causado pelo composto em relação ao controle de água do mar (Tukey;  $p < 0,05$ ). A porcentagem de larvas mortas não variou significativamente entre o controle sulfato de cobre e, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto (Tukey;  $p > 0,05$ ). Em contraste, as porcentagens de

larvas mortas diferem significativamente entre  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto e o controle negativo (Tukey;  $p < 0,05$ ). O valor que causa letalidade para 50% das larvas testadas é  $54,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Foram observados efeitos tóxicos em  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos solventes utilizados (80% de mortalidade), enquanto que nenhuma mortalidade foi observada nas demais concentrações. A porcentagem de larvas mortas em  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do controle solvente diferiu significativamente em relação ao controle de água do mar (Tukey;  $p < 0,05$ ). A mortalidade larvar no controle negativo (sulfato de cobre) aumentou progressivamente de 50 % ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) até 100% ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A mortalidade larvar em  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  até  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do controle negativo diferiu significativamente em relação ao controle nulo de água do mar (Tukey;  $p < 0,05$ ).



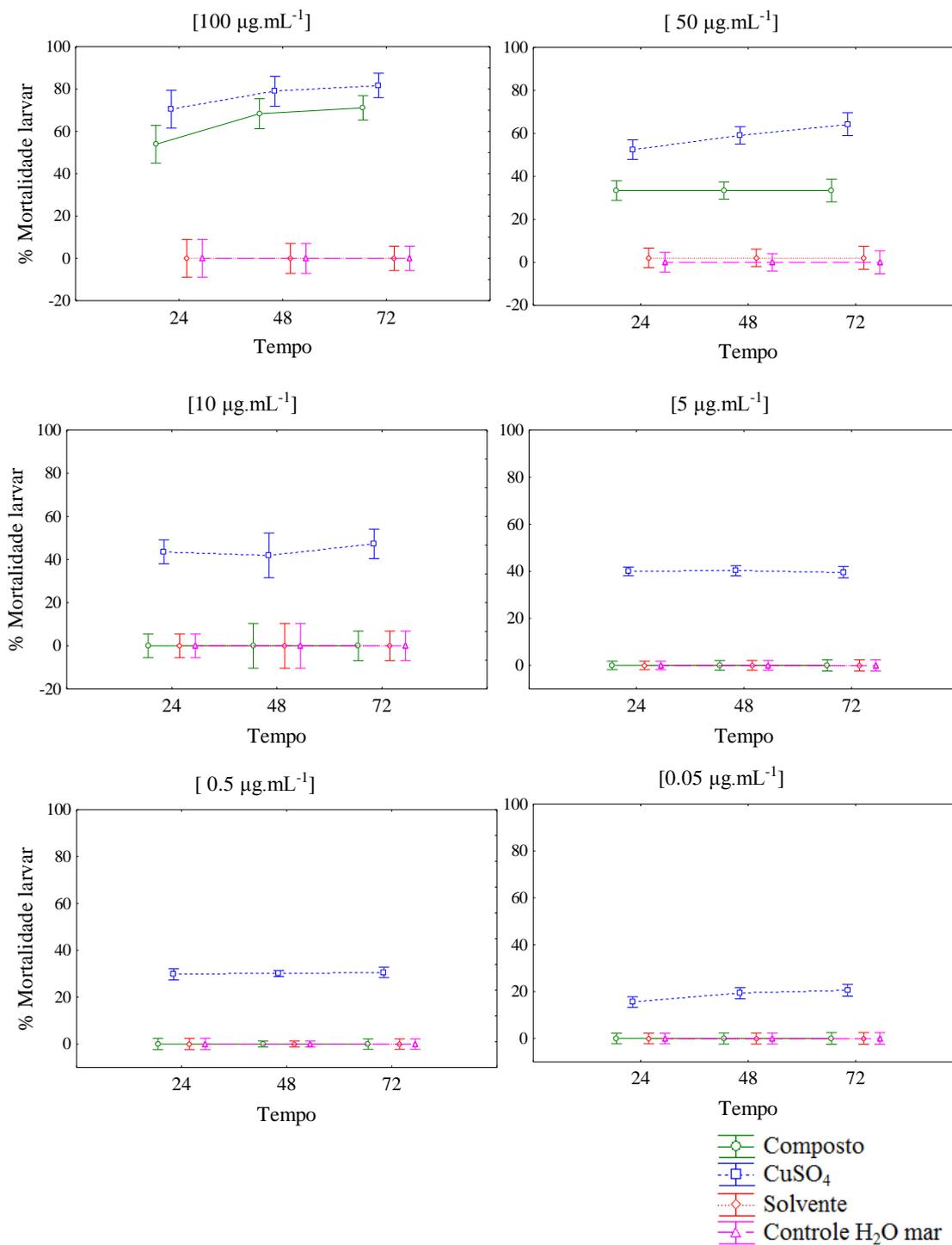
**Figura 1.5-** Média e desvio padrão da mortalidade (%) larvar de náuplio *A.amphitrite* em diferentes tratamentos. Controle positivo: solventes; Controle negativo: sulfato de cobre; Controle nulo: água do mar; Composto: “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”. O asterisco (\*) indicam tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle de água do mar ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

### *Mortalidade larvar cipris*

Os efeitos letais nas larvas cipris sujeitas aos diferentes tratamentos estão apresentados na Fig 1.6. Foi observado através da análise de variância que a porcentagem da mortalidade larvar variou entre os tratamentos (ANOVA,  $F= 3,19$ ;  $p<0.05$ ). O composto foi tóxico para as cipris nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (58% e 33%, respectivamente). Nessas concentrações (100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) as porcentagens de larvas mortas em do composto variaram significativamente em relação ao controle de água do mar (Bonferroni;  $p>0,05$ ). Na concentração 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não foram observadas diferenças significativas do composto quando comparado ao controle negativo (sulfato de cobre) (Bonferroni;  $p>0,05$ ). Nas demais concentrações (10 até 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) não apresentou diferenças significativas nas demais concentrações quando comparado ao controle nulo (água do mar) e controle positivo (solventes) ( $p<0.05$ ). O valor da concentração letal para 50% das larvas após 72 horas expostas ao composto foi de 69,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

O controle positivo (solventes) não apresentou efeitos deletérios para as larvas. Além disso, não foram verificadas diferenças significativas em relação ao controle nulo (água do mar) (Bonferroni;  $p>0,05$ ).

A porcentagem de larvas mortas aumentou progressivamente com o aumento das concentrações do controle negativo (sulfato de cobre) de 21% (0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) até 77% (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O controle negativo diferiu significativamente na concentração 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  quando comparado ao composto (Bonferroni ;  $p<0.05$ ). Quando comparado aos demais controles (nulo e positivo) apresentou diferença significativa em todas as concentrações testadas ( Bonferroni;  $p<0.05$ ).



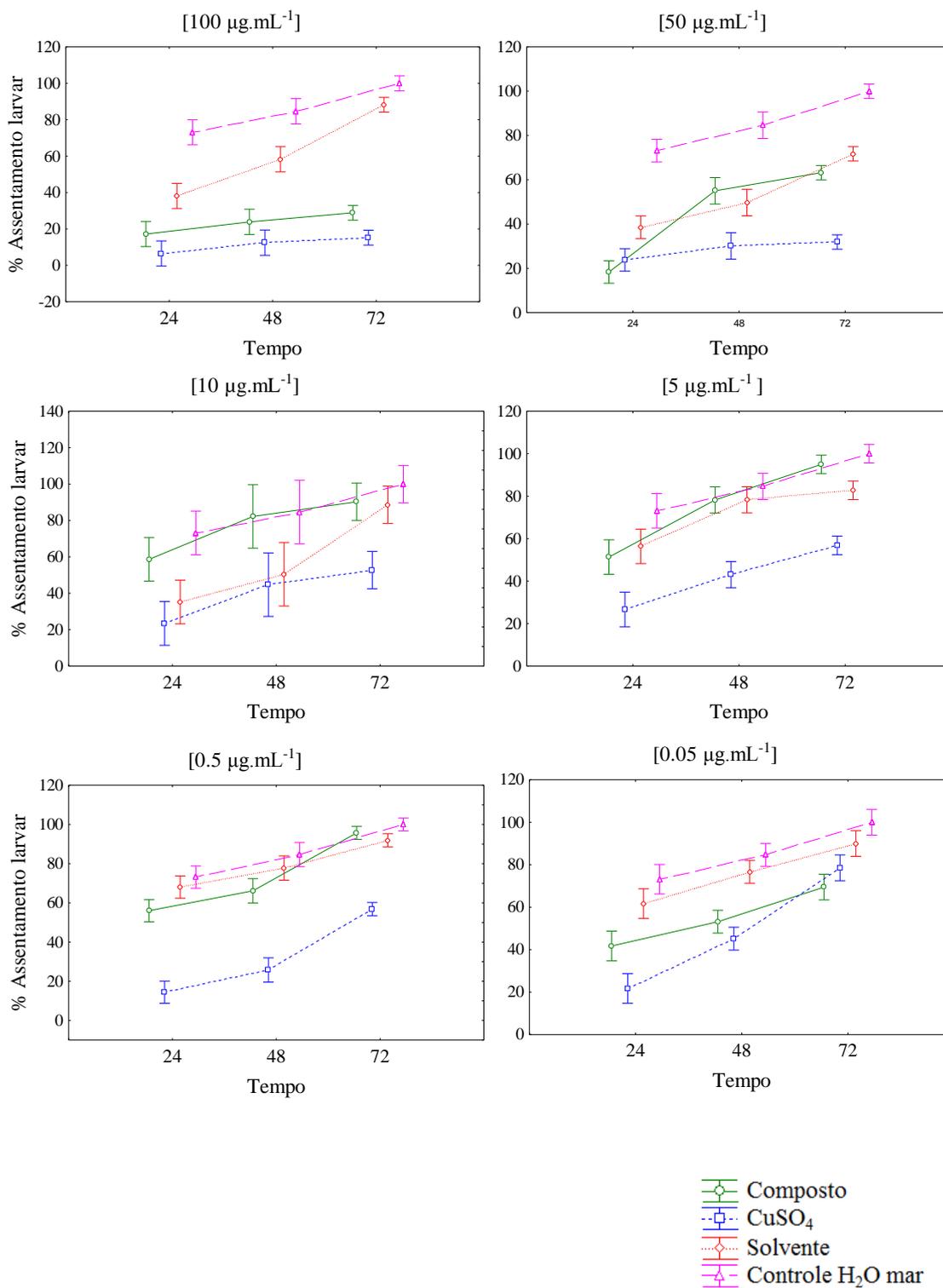
**Figura 1.6-** Média e intervalo de confiança da mortalidade (%) larvar de cipris de *A.amphitrite* ao longo de três dias de exposição. As cipris foram submetidas ao composto testado (“1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”) e aos solventes (controle positivo), sulfato de cobre (controle negativo), água do mar (controle nulo) em seis diferentes concentrações.

### *Assentamento larvar cipris*

A porcentagem de assentamento larvar das cipris nos diferentes tratamentos está representada na Fig 1.7. O assentamento larvar diferiu significativamente entre os diferentes tratamentos durante os três dias de experimento (ANOVA;  $F=7,54$ ;  $p<0,05$ ). Nesse período todas as cipris assentaram e realizaram metamorfose em todos os tratamentos (com aspectos de uma craca juvenil). Nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto foi verificada diferenças significativas quando comparado ao controle nulo (água do mar) ( $p<0,05$ ). Na concentração 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não foram verificadas diferenças significativas quando comparado ao controle negativo (sulfato de cobre) (Bonferroni;  $p>0,05$ ). O assentamento larvar não diferiu significativamente nas concentrações 10 até 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto testado quando comparado ao controle nulo (água do mar) e controle positivo (solventes) (Bonferroni;  $p>0,05$ ).

No controle positivo (solventes), as larvas assentaram em todas as diferentes concentrações testadas. Nesse controle não foram observadas diferenças significativas da taxa de assentamento em relação ao controle nulo (água do mar) (Bonferroni;  $p>0,05$ )

Em relação ao sulfato de cobre (controle negativo) o assentamento larvar diferiu do controle nulo e positivo nas concentrações 100 até 0.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Bonferroni;  $p<0,05$ ). Na concentração 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não foram verificadas diferenças significativas em relação aos demais tratamentos (Bonferroni;  $p>0,05$ ).



**Figura 1.7-** Média e intervalo de confiança do assentamento larvar (%) de cipris de *A.amphitrite* em diferentes tratamentos ao longo de três dias de exposição. As cipris foram submetidas ao composto testado (“1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”) e aos solventes (controle positivo), sulfato de cobre (controle negativo), água do mar (controle nulo) em seis diferentes concentrações.

## 1.5 DISCUSSÃO

Diferentes compostos naturais estão sendo testado para aplicação em tintas anti-incrustantes, tendo em vista a toxicidade causada pelos biocidas utilizados atualmente (Ralston & Swain, 2009). No presente estudo, os efeitos do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” em sua fase sólida foram testados em larvas de dois invertebrados dominantes na bioincrustação marinha. Os resultados obtidos nesse estudo mostram que as concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto são tóxicos para larvas de *B.neritina* e em náuplios e cipris de *A.amphitrite*. Porém, as concentrações 5 e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram eficientes em conter o assentamento larvar de *B.neritina*, mas não nas larvas cipris de *A.amphitrite*.

As concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” foram altamente tóxicas para as larvas de *B.neritina* e *A.amphitrite*. Por outro lado, as menores concentrações do composto ( $\leq 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) não foram letais para as larvas e causaram efeito de repelição apenas em *B.neritina*. Outros compostos sintéticos análogos também são conhecidos em causar baixa toxicidade para as larvas de *B.neritina* e apresentarem ação antilarvar, como os esteroides da gorgônia *Subergorgia suberosa* (Qi *et al.*, 2008) e *Streptomyces albidoflavus* (Xu *et al.*, 2010). Similarmente com os resultados obtidos no presente estudo, o composto sintético “Polymeric 3-alkylpyridium” oriundo da esponja *Reniera sarai* não apresentou eficiência na inibição do assentamento de cipris e causou baixa toxicidade em náuplios de *A.amphitrite* (Faimali *et al.*, 2003).

As respostas das larvas de *B.neritina* e cipris de *A.amphitrite* quanto à inibição do assentamento larvar sugerem que o composto pode atuar de formas diferentes. Por esse motivo é necessário à realização de experimentos ecotoxicológicos com mais de uma espécie para avaliação da eficácia como biocida (Arrhenius *et al.*, 2014).

Os efeitos anti-incrustantes de biocidas acessórios Irgarol e Sea-Nine já foram reportados para *B.neritina*. O estudo realizado por De Nys (1996) mostrou que essas substâncias agem de forma efetiva na inibição do assentamento larvar. Tal fato foi observado posteriormente com outros biocidas acessórios em diferentes larvas de invertebrados. Os efeitos negativos de Cobre piritiona e Zinco piritiona são relatados na literatura para náuplio II e cipris de *A. amphitrite* (Faimali *et al.*, 2003). Os biocidas apresentam eficiência na inibição do assentamento de cipris, mas são altamente tóxicos para o estágio náuplio II. Os biocidas acessórios comerciais também foram testados com

cipris de *A.amphitrite* como Irgarol, Diuron, apresentando concentrações efetivas ( $CE_{50}$ ) de 2.2, 21,  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente (Bao *et al.*,2011). Assim como os resultados descritos para o biocida Sea-Nine que apresenta uma dose letal para 50% das cipris de *A.amphitrite* em uma concentração de  $0.34 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Jacobson & Willingham, 2000). Esses biocidas apresentam concentrações efetivas relativamente baixas e mostram uma maior eficiência quando comparado ao composto testado. Mesmo apresentando uma eficiência para as cipris, esses biocidas utilizados atualmente nas tintas causam diferentes efeitos negativos para organismos não alvos como retardo do desenvolvimento embriolarval, embriotoxicidade e mortalidade larval (Ernst *et al.*, 1991; Kobayashi & Okamura, 2002; Bellas, 2006).

Os compostos naturais extraídos de organismos marinhos também são apontados como eficientes inibidores da bioincrustação marinha. Já foram observados que o gorgosterol isolado da gorgônia *Isis minorbrachyblasta* (Qi *et al.*, 2010) e o *Lyso-PAF* extraído das esponjas *Crella incrustans* (Buttler *et al.*, 1996) impedem o assentamento larvar de *B.neritina*. Similarmente, o metabólito E da alga *Dictyota menstrualis* inibe o assentamento das larvas desse mesmo briozoário, porém com altas taxas de mortalidade (Schimitt *et al.*, 1995). Apesar de alguns compostos naturais apresentarem eficácia em conter a bioincrustação, a obtenção da biomassa necessária para isolar esses compostos é inviável (Qian *et al.*, 2015). Sendo uma alternativa o uso de análogos sintéticos dessas substâncias.

No presente estudo foi observado que ambos os controles negativo (sulfato de cobre) e positivo (clorofórmio, metanol e água LC-MS) foram tóxicos para as larvas dos invertebrados. O controle negativo causou efeitos deletérios para as larvas de *B.neritina* e *A. amphitrite*. Os efeitos negativos do cobre no recrutamento, crescimento e incrustação de larvas de *B.neritina* já foram relatados por Piola & Johnston (2006). Similarmente, as concentrações 100 e  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do controle positivo usado no presente estudo também foram tóxicos para as larvas de *B.neritina* e náuplio II de *A. amphitrite*. Apesar da desvantagem dos solventes clorofórmio e metanol de serem tóxicos as larvas de diferentes invertebrados marinhos (Guilhermino *et al.*,2000), esses solventes são largamente utilizados na extração de lipídios (Brum *et al.*, 2009) e por essa razão foram escolhidos para a diluição do composto, já que o composto é um glicerofosfolipídio. Frente à toxicidade apresentada pelos solventes para náuplio II e larvas de *B.neritina*, provavelmente, o composto deve causar uma reduzida toxicidade para essas larvas. Por outro lado, esse mesmo controle não apresentou toxicidade para as cipris de *A.*

*amphitrite*. Provavelmente, este fato está relacionado à sensibilidade das larvas de *B.neritina* e do estágio náuplio II, porém as cipris podem apresentar resistência aos solventes. Foram observados efeitos similares em relação à baixa toxicidade em extratos com solventes orgânicos em cipris nos estudos de Loschau & Kratke (2005).

Em resumo, os resultados obtidos nesse estudo mostram que o composto é eficaz na inibição do assentamento larvar para *B.neritina* nas concentrações 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , mesmo com os efeitos dos solventes utilizados, mas não inibiu o assentamento larvar das cipris de *A.amphitrite*. A toxicidade foi observada nas maiores concentrações (100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em todas as larvas testadas. Para se obter uma melhor compreensão da toxicidade e ação anti-incrustante desse composto, novos experimentos devem ser realizados com faixas mais restritas entre 50 e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , avaliando onde inicia a toxicidade para as larvas e a eficácia da inibição do assentamento larvar . Mas propõe-se que a substância testada pode ser uma alternativa como biocida acessório, tendo em vista a sua baixa toxicidade quando comparado com os demais biocidas acessórios. Além disso, diferente de outros compostos acima citados, a matéria-prima para a realização da síntese da substância testada é a lecitina de soja, um resíduo da produção da soja comercial o que facilita uma futura aplicação desse composto em tintas anti-incrustantes.

## 1.6 REFERÊNCIAS

Arrhenius A., Backhaus T., Hilvarsson A., Wendta I., Zgrundo A., Blanck H. (2014). A novel bioassay for evaluating the efficacy of biocides to inhibit settling and early establishment of marine biofilms. *Marine Pollution Bulletin*, 87: 292–299.

Batista, W.R. (2012) Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti- incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. Brasil.

Batista, D., Carvalho, A. P., Costa, R., Coutinho, R., Dobretsov, S. (2014). Extracts of macroalgae from the Brazilian coast inhibit bacterial quorum sensing. *Botanica Marina* 57: 441–447.

Batista, W.R., Neves, M.H.C.B., Coutinho, R., Lopes, C.C, Lopes, R.S.C. (2015). Glicerofosfolipídios sintéticos para uso como aditivo biocida em tintas antiincrustante *Química Nova*, 38:917-923.

Bao, V. W. W., Leung, K. M. Y., Qiu, J. W., Lam, M. H. W. (2011). Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin*, 62:1147–1151.

Bellas, J. (2006). Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Science of The Total Environment*, 367: 573–585.

Bellas, J. (2007). Toxicity of the booster biocide Sea-Nine to the early developmental stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquatic Toxicology*, 83: 52–61.

Bryan, P.J., Kreider, J.L., Qian, P. (1998). Settlement of the serpulid polychaete *Hydroides elegans* (Haswell) on the arborescent bryozoan *Bugula neritina* (L.): evidence of a chemically mediated relationship. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 220:171–190.

Blosser, S., Gray, K. M. (2000). Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 47–55.

Brum, A. A. S., Arruda, L. F., Regitano-D'Arce, M. A. B. (2009). Método de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, 32: 849–854.

Butler, A.J., Altena, I.A.V., Dunnes, S.J. (1996). Antifouling activity of *Lyso-platelet-activating* factor extracted from Australian sponge *Crella incrustans*. *Journal of Chemical Ecology*, 22:1-16.

Cao, S., Wang, J., Chen, H., Chen, D. (2011). Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin* 56: 598-612.

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

Cetto, P.H., Nalesso, R.C., Tonini, J.F.R.(2011). Abundância do briozoário *Bugula neritina* como biofouling na Maricultura: Prejuízos Ou Um Recurso Econômico Com Potencial Farmacológico? *Boletim El Bohío*, 2:1-3.

Chapman, J., Hellio, C., Sullivan, T., Brown, R., Russell, S., Kiterringham, E., Le Nor L., Regan, F. (2014). Bioinspired synthetic macroalgae: Examples from nature for antifouling applications. *International Biodeterioration Biodegradation* 86:6-13

Chen, J., Yang, L., Foulks, J.M., Weyrich, A.S., Marathe, G.K., McIntyre, T.M.(2007) Intracellular PAF catabolism by *PAF* acetylhydrolase counteracts continual *PAF* synthesis. *The Journal of Lipid Research* ,48: 65-76.

Chesworth, J.C., Donkin, M.E., Brown, M.T. (2004). The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquatic Toxicology*, 66: 293–305.

Clare, A.S., Matsumura, K., 2000. Nature and perception of barnacle settlement pheromones. *Biofouling*: 15, 57-71.

Comunidade Europeia. (2012). Regulamento (UE) n°528/2012 do parlamento europeu e do conselho de 22 de maio de 2012, relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas.

Dafforn, K.A., Lewis, J.A., Johnston, E.L. (2011). Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 453–465.

Dahms, H.U., Dobretsov, S., Qian, P.Y. (2004). The effect of bacterial and diatom biofilms on the settlement of the bryozoan *Bugula neritina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 313: 191–209.

De Nys, R., Leya, T., Maximilien, R., Afsar, A., Nair, P. S. R., Steinberg, P. D. (1996). The need for standardised broad scale bioassay testing: A case study using the red alga *Laurencia rigida*. *Biofouling*, 10: 213–224.

Desai, DV., Anil, AC., Venka,T, K. (2006). Reproduction in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica): influence of temperature and food concentration. *Marine Biology*, 149:1431-1441.

Dobretsov, S., Al-Wahaibi, A., Lai, D., Al-Sabahi J., Claereboudt,M., Proksch, P., Soussi,B.(2015). Inhibition of bacterial fouling by soft coral natural products. *Biodeterioration and Biodegradation*, 98:53-58.

Ernst, W., Doe, K., Jonah, P., Young, J., Julien, G., Hennigar, P. (1991). The toxicity of Chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Archives Environmental Contamination Toxicology*, 21: 1–9.

Faimali,M. Esemplare adulto del balanoconosciuto anche come “dente di cane” allevato in laboratório. Disponível em: <http://www.ismar.cnr.it/eventi-e-notizie/notizie/un-test-ecotossicologico-sviluppato-da-ismar-cnr-diventa-norma-unichim>. Acesso em 20 de março de 2016.

Faimali, M., Sepcic, K., Turk, T., Geraci S. (2003) Non-toxic antifouling activity of polymeric 3-alkylpyridium salts from the Mediterranean sponge *Reniera sarai* (Pulitzer-Finali). *Biofouling* ,19:47–56.

Faimali, M., Garaventa, F., Piazza, V., Greco, G., Corrà, C., Magillo, F., Tagliafierro, G. (2006). Swimming speed alteration of larvae of *Balanus Amphitrite* as a behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. *Marine Biology*, 149: 87–96.

Feng, D.Q., Ke, C.H., LU, C.Y., Li, S.J. (2009). Herbal plants as a promising source of natural antifoulants: Evidence from barnacle settlement inhibition. *Biofouling*: 25, 181–190.

Finney, D.J.( 1971). *Probit Analysis*. Cambridge University Press, London, 333pp.

Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G.H.1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The journal Biological Chemistry* 226: 497–509.

Fusetani, N. Biofouling and antifouling. (2004). *Natural Product Reports*, 21: 94 – 104.

Guardiola, F. A., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M. A. (2012). Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 1541–1560.

Gollasch, S. (2002).The importance of ship hull fouling as a vector of species introductions into the North Sea. *Biofouling*, 18: 105–121.

Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M. (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46:357–62.

Hellio, C., Marechal, J.P., Veron, B., Bremer, G., Clare, A.S., Le Gal, Y. (2004). Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from Brittany coast (France). *Marine Biotechnology*, 6: 67–82.

Holm, E. R. (2012). Barnacles and biofouling. *Integrative and Comparative Biology*, 52: 348–355.

Iwao, O. (2003). Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry*, 17: 81–105.

Jacobson, A.H., Willingham, G.L. (2000). Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *The Science of the Total Environment*, 258: 103-110.

Kecough, M.J. (1984). Kin-recognition and the spatial distribution of larvae of the bryozoan *Bugula neritina*. *Evolution*, 38:132-133.

Kecough, M.J. (1989). Variation in Growth Rate and Reproduction of the Bryozoan *Bugula neritina*. *The biological Bulletin*, 177: 277-286.

Keough, M.J., Chernoff, H. (1987) Dispersal and population variation in the bryozoan *Bugula neritina*. *Ecology*, 68: 199–210.

Kobayashi, N., Okamura, H. (2002). Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Marine Pollution Bulletin*, 44(8), 748–751.

Lam, P.K.S., Wo, K.T., Wu, R.S.S. (2000). Effects of cadmium on the development and swimming behaviour of barnacle larvae *Balanus amphitrite* Darwin. *Environmental Toxicology*, 15:8–13.

Lindquist N., Hay, M.E. (1996). Palatability and chemical defense of marine invertebrate larvae. *Ecological Monographs*, 66, 431–450.

Loschau, M., Kratke R. (2005). Efficacy and toxicity of self-olishing biocide-free antifouling paints. *Environmental Pollution*, 138: 260-267.

Magalhães, D. D. P., Ferrão-Filho, A. D. S. (2008). Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Australis*, 12: 355–381.

Maréchal, J.-P., Hellio, C. (2009). Challenges for the Development of New Non-Toxic Antifouling Solutions. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 4623–4637.

Maréchal, J-P., Matsumara K., Conlan, S., Hellio C. (2012) Competence and discrimination during cyprid settlement in *Amphibalanus amphitrite*. *International Biodeterioration & Biodegradation* ,72:59-66.

Maréchal, J-P., Hellio, C. (2010). Antifouling activity against barnacle cypris larvae: Do target species matter (*Amphibalanus amphitrite* versus *Semibalanus balanoides*)? *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65:92-101.

Mochida, K., Fujii, K. (2009). Further effects of alternative biocides on aquatic organisms. In: *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*; Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W., Eds.; Springer: Tokyo, Japan; pp. 383–396.

Moran, P. J., Grant, T. R. (1993). Larval settlement of marine fouling organisms in polluted water from Port Kembla Harbour, Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 26: 512–514.

Okamura, H., Nishida, T., Ono, Y., Shim, W.J. (2003). Phytotoxic effects of antifouling compounds on non target plant species. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* , 71: 881–886.

Piazza, V., Ferioli, A., Giacco, E., Melchiorre, N., Valenti, A., Del Prete, F., Biandolino, F., Dentone, L., Frisenda., FAIMALI, M. (2012). A standardization of *Amphibalanus* (*Balanus*) *amphitrite* (Crustacea, Cirripedia) larval bioassay for ecotoxicological studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79:134-138.

Piazza,V., Corrà, C., Garaventa, F., Jordan, A., Dramisino, P. (2011). Toxicological response of *Amphibalanus amphitrite* larvae as an indirect evaluation of antifouling paints efficacy. *Chemistry and Ecology*, 27:87-95.

Piola, R. F., & Johnston, E. L. (2006). Differential tolerance to metals among populations of the introduced bryozoan *Bugula neritina*. *Marine Biology*, 148: 997–1010.

Qi, S.H., Zhang, S., Yang, L.H., Qian, P.Y., (2008). Antifouling and antibacterial compounds from the gorgonians *Subergorgia suberosa* and *Scripearia gracillis*. *Natural Product Research*, 22, 154–166.

Qi, S.-H., Miao, L., Gao, C.-H., XU, Y., Zhang, S., Qian, P.-Y. (2010). New steroids and a new alkaloid from the gorgonian *Isis minorbrachyblasta*: Structures, cytotoxicity, and antilarval activity. *Helvetica Chimica Acta*, 93: 511–516.

Qian P.Y, Xu, Y., Fusetani N. (2010). Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling* 26:223–234.

Qian, P-Y., Li, Z., Xu, Y., Li, Y., Fusetani, N. (2015). Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009–2014. *Biofouling* 31:101-122.

Rao D, Webb, J.S., Holmstrom, C., Case, R., Low, A., Steinberg, P. (2007). Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms. *Applied Environmental Microbiology*, 73:7844–52.

Ralston, E., Swain, G., (2009). Bioinspiration-the solution for biofouling control? *Bioinspiration Biomimetics* 4: 1-9.

Rittschof, D., Clare, a S., Gerhart, D. J., Mary, S. A., & Bonaventura, J. (1992). Barnacle *in vitro* assays for biologically active substances: Toxicity and Settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite amphitrite* darwin. *Biofouling*, 6: 115–122.

Schmitt, T.M., Hay ,M.E., Lindquist, N. (1995). Constraints on chemically mediated coevolution: multiple functions for seaweed secondary metabolites. *Ecology*, 7:107–123.

Takahashi, K. (2009). Release Rate of Biocides from Antifouling Paints. In: Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W. *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* Eds, Springer: Tokyo, Japan; pp. 383–396.

Thomas, K.V., Brooks, S. (2010). The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling* 26: 73–88.

Thoms, C., Schupp, P. (2005). Biotechnological potential of marine sponges and their associated bacteria as producers of new pharmaceuticals. *Journal of International Biotechnology Law*, 2: 217-220.

Tsoukatou, M., Maréchal, J.P., Hellio, C., Novaković, I., Tufegdžic, S., Sladić, D., Gašić, M.J., Clare, A.S., Vagias, C., Roussis V. (2007). Evaluation of the activity of the sponge metabolites avarol and avarone and their synthetic derivatives against Fouling micro- and macroorganisms. *Molecules* 12: 1022-1034.

Wendt, D.E. (2000) Energetics of larval swimming and metamorphosis in four species of *Bugula* (Bryozoa). *Biological Bulletin*, 198: 356–356.

Xu, Y., He, H., Schulz, S., Liu, X., Fusetani, N., Xiong, H., Xiao, X., Qian, P.-Y. (2010). Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. *Bioresource Technology*, 101(4), 1331–6.

Zar, J. H. (1999) *Biostatistical Analysis*, 4th edition. Prentice Hall International Incorporated, Englewood Cliffs, Upper Saddle River, NJ, USA.

## Capítulo 2

Toxicity of an antifouling compound synthesized from soybean lecithin to *Lytechinus variegatus* sea urchin larvae

## ABSTRACT

In the present study, potential toxicity of a new antifouling agent 1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine synthesized from soya bean lecithin was tested on larvae of non-target sea urchin species *Lytechinus variegatus*, as compliance with environmental safety regulations. Larvae were incubated at six different concentrations (0.05; 0.5; 5; 10; 50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of the compound. Copper sulfate (0.05; 0.5; 5; 10; 50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), solvent (1:1:1 chloroform, methanol and LC-MS water) and seawater were used as controls. After 24 hour, the developmental abnormalities of 100 randomly selected larvae were investigated. The compound at 0.05 – 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  did not affect toxicity and development of sea urchin larvae. The compound was as toxic as copper sulfate (ANOVA, Tukey;  $p>0.05$ ) at higher concentrations and its  $\text{EC}_{50-24\text{h}}$  was 56.34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Our results suggested that the new antifouling compound is less toxic to larvae of invertebrates than traditional biocides (copper) and, thus, can be used as an alternative for naval industries.

**Keywords:** Antifouling; Toxicity; Sea urchin development; Larvae.

## 2.1 INTRODUCTION

Biofouling is the process of undesirable attachment and growth of marine organisms submerged surfaces [1]. It causes huge economic losses for the naval industry (e.g increased of fuel consumption and corrosion) and has negative implications for the coastal environmental (e.g introduction of alien species) [2]. To prevent the biofouling process on artificial substrates, chemical substances, such as biocides, are applied in antifouling paints [3]. For many years, tributyltin (TBT) was the most widely used biocide in paint formulations [4]. This biocide is highly harmful to the environment, accumulates in the sediments and causes toxicity to non-target species [5]. The negative effects of TBT include the abnormal growth and reproductive failure in oysters, mortality of mussel larvae [6] and imposex of gastropods [7]. Due to its toxicity, the TBT was banned in 2008 by the International Maritime Organization (IMO) [8]. Nowadays, copper and zinc combined with organic booster biocides are most commonly used in antifouling paints [9]. The most commonly used biocides, such as Irgarol 1051, Sea-Nine 211, Chlorothalonil, Dichlofluanid, Zinc pyrithione, Copper pyrithione [10], are highly toxic and dangerous to the environment [11].

It has been proposed that naturally occurring secondary metabolites can be used as “alternative environmentally friendly” antifouling agents [12]. The main difficulty with industrial use of marine natural products is producing them in large quantities at a low cost [5]. One of the possible solutions to these problems is to synthesize natural products chemically or biologically [13]. 1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine compound” is a natural product synthesized from soybean lecithin, a cheap raw material which has large production [14]. This compound at concentrations of 100 µg/L is capable of reducing growth of bacteria in laboratory experiments [15]. Recently, commercial antifouling paints contain 5% of this synthesized compound

reduced significantly macroorganism covered on carbon plates surface immersed in high polluted Guanabara Bay, indicating their promising applicability as booster biocide [14]. Due to good antifouling efficacy of this synthetic compound, the process of its preparation and use were patented [16], but no toxicity testing was performed. To assess the environmental impact of any antifouling compound standardized toxicity tests should be performed [17], which include ecotoxicological tests to assess impacts on non-target organisms as according to the European Commission [18].

Standard toxicity testing using sea urchin embryonic development has been applied worldwide [19]. As examples, sea urchin embryos of *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) have been used to assess environmental impacts caused by microplastics [20], heavy metals [21] and biocides [22]. The main aim of the present study was to assess the toxicity the antifouling compound 1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine to non-target species, such as larvae of *L. variegatus*. In this study larval anomalies and embryos in the presence of the synthetic compound were compared with ones in the presence of copper sulfate - a common antifouling biocide.

## **2.2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.2.1 Target specie**

The sea urchin *L. variegatus* is distributed along the Atlantic Occidental coast from North Carolina (USA) to southern Brazil, occurring mainly on natural substrates from the intertidal zone to 20m depth [23]. Sea urchins have long been recognized as a strong structuring force of algae communities throughout coastal areas worldwide [24].

### **2.2.2 Sea urchin collection**

Twenty mature sea urchin individuals were collected by divers from the rocks in the Prainha beach, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Southeast Brazil (22°57'27.5"S; 42°02'27.4"W) during March - April 2015. All specimens were immediately transported

to the laboratory and maintained in aquaria ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). The macroalga *Ulva fasciata* was also collected from the same location and used for sea urchin feeding.

### 2.2.3 Tested chemicals

All chemicals, copper sulfate (Reagen, Paraná, Brazil), methanol (Merck, Rio de Janeiro, Brazil) and chloroform (TEDIA; Rio de Janeiro, Brazil), used in this study were analytical grade. Seawater was obtained from uncontaminated area ( $23^\circ00'04.77''\text{S}$ ;  $42^\circ00'24.42''\text{O}$ ). Before experiments it was filtered using a cellulose acetate filter ( $0.45 \mu\text{m}$ , Millipore). Filtered sea water was used for the dilution of chemical solutions and as the seawater control. The solvent control was prepared by mixing in (2.0 ml: 2.0 ml: 2.0 ml) chloroform, methanol and LC-MS water. The use of such solvents was determined based on studies demonstrating that chloroform and methanol are more effective for extraction of lipids [25]. Seawater and copper sulfate solution were used as positive and negative controls, respectively. Copper sulfate was prepared using 100 mg and diluting it in 1 liter of seawater, this stock solution served as basis for the preparation of concentrations ( $0.05$ ,  $0.5$ ,  $5$ ,  $10$ ,  $50$  and  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The antifouling compound 1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine was synthesized as reported previously (Batista *et al.*, 2015). Then, the compound was dissolved in 1:1:1 mixture of chloroform, methanol and LC-MS water. Six concentrations ( $0.05$ ,  $0.5$ ,  $5$ ,  $10$ ,  $50$  and  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of this compound and controls were tested in toxicity experiments (see below).

### 2.2.4 Toxicity experiment

The toxicity test followed the protocol described by “Associação Brasileira de normas técnicas” (ABNT) [26]. Briefly, the sea urchin gametes were released by injection of  $0.5 \text{ M}$  potassium chloride (KCl) into the coelomic cavity. Eggs (female gametes) were identified by the yellow-orange color, while white color corresponds to

sperm (male gametes). The fertilization process was performed by adding an aliquot of sperm (0.5 ml) into a container containing 24.5mL of filtered sea water with the eggs. Fertilization was confirmed by observation of appearance of an outer membrane fertilization using a microscope (Axio Scope A1, Carl Zeiss).

A subsample of 1 mL was removed from the eggs suspension in order to count number of eggs under a microscope using Sedgwick-Rafter chamber. In the egg count showed that 80% of the samples were in the presence of fertilization membrane. This procedure was repeated three times in order to estimate the amount of eggs suspension to be placed in each test vials. A total of 60 $\mu$ l of fertilized eggs (300 eggs / ml) were added in the vials.

During the experiment, each vial contained either tested solution of the compound or copper sulfate or solvent. There were five replicates for each concentrations in this experiment. All treatments were incubated at 25°C with 12:12h light: dark photoperiod. The bioassay was terminated after 24 h when 80% of pluteus larvae were present in the seawater control. Then, all treatments were fixed with 5% formaldehyde solutions for further analysis.

For each replicate 100 larvae were randomly observed under an optical microscope using Sedgwick-Rafter chambers. The number of healthy pluteus larvae was counted and regarded as normal development, while the occurrence of deformity in larval settlement indicated abnormal development. Delay in the larval development and larval abnormalities indicated the presence of toxicity.

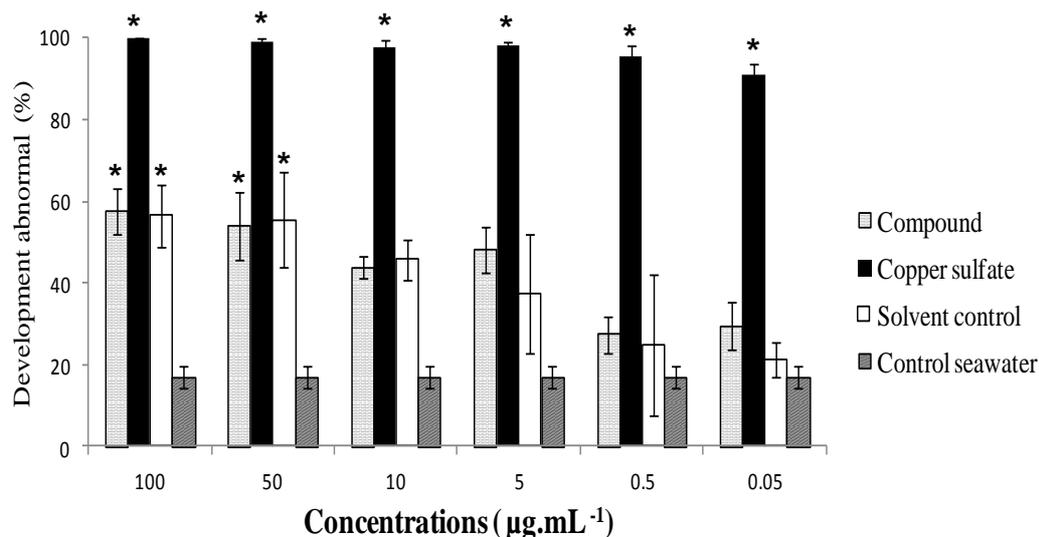
### **2.3 STATISTICAL ANALYSES**

Statistical analyses were conducted using the software Statistica 8.0 (StatSoft, USA). The effect of different treatments and concentrations on the larval toxicity was by two-way analysis of variance (ANOVA). The post-hoc Tukey test was employed to

identify significant differences among groups. The effective concentrations ( $EC_{50}$ ) were calculated using the Probit software after normalizing data to the mean control response [27].

## 2.4 RESULTS

As expected, larvae exposed to the seawater control had low number of anomalies (<20%) (Fig. 2.1). In opposite, copper sulfate solutions showed the highest toxicity among all treatments (up to 80%; Fig 2.1). Analysis of variance showed that there are significant differences among treatments. Larvae exposed to copper sulfate had the highest frequency of anomalies in comparison with others treatments (ANOVA, Tukey;  $p < 0.05$ ). The synthetic compound at concentrations between 50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was toxic to larvae and showed significant differences from the seawater control (Tukey;  $p > 0.05$ ). In contrast, the compound at concentrations from 0.05 to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  did not have toxicity significantly ( $p > 0.05$ ) different from that in seawater. Solvent control was toxic at concentrations 100 and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (up to 50%), while lower concentrations did not have significant toxicity ( $p > 0.05$ ). The  $EC_{50}$  for the development larvae for compound was 56.34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figure 2.1** Abnormal development larvae *Lytechinus variegatus* (%) subject to six concentrations of the new antifouling compound 1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine. The asterisk (\*) indicates that the results were significantly different compared to seawater control ( $p < 0.05$ , Tukey test). The data are the means of five replicates.

## 2.5 DISCUSSION

Previously it was shown that a novel antifouling compound 1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine can be employed as alternative booster biocide in antifouling paints composition [14]. This natural product was synthesized from soybean lecithin [15], material that is very abundant and has low cost [28]. It was suggested that the new antifouling agent is less toxic than traditional antifouling copper biocides.

This study demonstrated that at concentrations 0.05 – 10 µg mL<sup>-1</sup>, 1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine did not show significant toxicity to *Lytechinus variegatus* larvae. Previously, it was demonstrated that this compound has antifouling properties at concentrations 5- 10 µg mL<sup>-1</sup> (Costa RS, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, Arraial do Cabo, RJ, Brazil personal communication). This indicates that this compound will be not toxic for non-target organisms at effective antifouling concentrations. In opposite, it was demonstrated that antifouling biocide Diuron cause abnormalities on *L.variegatus* larvae at 2 µg.mL<sup>-1</sup> [22]. Commercial booster biocides Sea-Nine 211 and Chlorothalonil at concentrations 1000-fold lower than that tested in this study were toxic for the sea urchin *Paracentrotus lividus* and interfered with its larval growth [29] and affected its embryonic development [19].

Similarly, the EC<sub>50</sub> concentration of biocide Dichlofluanid to embryos of the sea urchin *Glyptocidaris crenularis* is 0.2 µg mL<sup>-1</sup>, indicating high toxicity [30]. Despite of above mentioned examples, the environmental risk of booster biocides considered to be low due their short half-life [31].

Our bioassay was performed with the synthetic analog of glycerophospholipids. This lipid compound is not fully soluble in sea water, thus the compound was dissolved in a mixture of solvents, such as methanol/chloroform/water (1/1/1 v/v) [32]. Our experiments showed that the solvent control had similar toxicity to one observed to the compound. Thus, the observed toxicity of *L. variegatus* larvae could be due to solvent but not the substance. The chloroform has been shown to be toxic to some invertebrates, such as *Oryzias latipes* [33], *Artemia salina* [34] and *Daphnia magna* [35]. In the future paint applications, new synthetic antifouling glycerophospholipids will be dissolved with solvent xilol, a high volatile organic solvent often used by paint industry, thus reducing problems of possible toxicity of solvents.

As expected, copper sulfate caused significant abnormalities in the development of *L. variegatus* larvae. Copper is a trace element fundamental for the functioning of all organisms and highly toxic at high concentrations [36]. It has been shown that among booster biocides (copper pyrithione, Irgarol 1051, dichlofluanid, tolylfluanid, and Sea nine 211), copper pyrithione was found to be the most toxic, which affected embryonic development of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* at the concentration 0.010 µg mL<sup>-1</sup> [38]. In another study, embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus* were sensitive to copper concentrations as low as 0.015 µg mL<sup>-1</sup> [37]. Our findings confirmed that copper biocide causes adverse effects in the sea urchin embryonic development.

To summarize, our study suggested that synthetic antifouling agent 1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine is not toxic at effective concentrations to larvae of non-target sea urchin species *Lytechinus variegatus* and less toxic than commonly used biocide copper. In future studies it is necessary to determine the half-life, environmental fate, possible negative environmental impacts and toxicity of this synthetic compound its commercialization.

## 2.7 REFERENCES

1. Yebra DM, Kill S, Dam-Johansen K. 2004. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat* 50:75-104.
2. Maréchal JP, Hellio, C. 2009. Challenges for the Development of New Non-Toxic Antifouling Solutions. *Int J of Mol Sci* 10: 4623–4637.
3. Costa MB, Fernandez MA, Barbiero DC, Melo FTV, Otegui MBP, Ferrari BS. 2008. First record of imposex in *Thais deloidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. *Braz J Oceanogr* 56:145-148.
4. Konstantinou IK, Albanis TA. 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: A review. *Environ Int* 30:235-248.
5. Qian PY, Xu Y, Fusetani N. 2010. Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling*, 26: 223–234.
6. Ladislao BA. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environ Int* 34:292-308.
7. Horiguchi T. 2006. Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. *Environ Sci* 13:77-87.
8. Champ MA. 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci Total Environ* 258:21–71.
9. Manzo S, Buono S, Cremisini, C. 2008. Predictability of Copper, Irgarol and Diuron combined effects on sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 54: 57–68.

10. Albanis TA, Lambropoulou DA, Sakkas VA, Konstantinou. 2002. Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. *Chemosphere* 48: 475–485.
11. Yamada H. 2007. Behaviour, occurrence, and aquatic toxicity of new antifouling biocides and preliminary assessment of risk to aquatic ecosystems. *Bull Fish Res Agen* 21:31–45.
12. Ravendran TV, Limna Mol, VP. 2009. Natural product antifoulants. *Curr Sci India* 97: 508-520.
13. Qian, P-Y, Li Z, Xu Y, Li Y, Fusetani N. 2015. Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009–2014. *Biofouling* 31:101-122.
14. Batista, WR, Neves, MHCB, Coutinho R, Lopes CC, Lopes, RSC. 2015. Glicerofosfolipídios sintéticos para uso como aditivo biocida em tintas anti-incrustante *Quim Nova* 38:917-923.
15. Batista, W.R. 2012. Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti- incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
16. United State Patent and Trademark Office (USPTO). 2014.1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine compounds, preparation process, antifouling composition, process for its preparation, method to prevent fouling, method to turn a surface into an antifouling surface, and, covered surface. Patent number US 8657943-B2.
17. Thomas KV, Brooks S. 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling* 26:73–88.
18. Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products.

19. Kobayashi N, Okamura H. 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Mar Pollut Bull* 44:748-751.
20. Nobre CR, Santana MF, Maluf A, Cortez FS, Cesar A, Pereira CD, Turra A. 2015. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar Pollut Bull* 92:99-104.
21. Powell ML, Jones WT, Gibbs VK, Hammer HS, Lawrence JM, Fox F, Lawrence AL, Watt AS. 2010. Dietary Copper Affects Survival, Growth, and Reproduction in the Sea Urchin *Lytechinus variegatus*. *J Shellfish Res*, 29:1043-1049.
22. Perina FC, Abessa DMS, Pinho GLL, Filmann .2011. Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. *Ecotoxicology*, 20: 1870–1880.
23. Watts SA, McClintock JB, Lawrence JM. 2001. The ecology of *Lytechinus variegatus*. In: John ML (Ed), *Developments in aquaculture and fisheries science edible sea urchins: biology and ecology*, Vol 32, Elsevier, Amsterdam, pp375-393.
24. Greenway M. 1995. Trophic relationships of macro fauna within a Jamaican seagrass meadow and the role of echinoid *Lytechinus variegatus* (Lamarck). *Bull Mar Sci* 56: 719–736.
25. Bligh, E.G., Dyer, W.M., 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem Physiol* 37: 911–917.
26. ABNT.2012. Ecotoxicologia aquática- Toxicidade crônica de curta duração- Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Norma ABNT-NBR:15350:2012. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, p 21.
27. Finney DJ.1971. Probit analysis. London, UK Cambridge University Press.
28. Xu Q, Nakajima M, Liu Z, Shiina T. 2011. Soybean-based surfactants and their applications, in *Soybean Applications and Technology* (ed T-B.Ng), InTech.

29. Bellas J. 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Sci Total Environ* 367:573-585.
30. Xue Xu, Xia Wang, Yan Li, Yonghua Wang, & Yuan Wang. 2011. Acute toxicity and synergism of binary mixtures of antifouling biocides with heavy metals to embryos of sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. *Human & Experimental Toxicology*, 30: 1009–1021.
31. Guardiola, FA, Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. 2012. Risks of Using Antifouling Biocides in Aquaculture. *Int J Mol Sci*. 13: 1541–1560.
32. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G.H. 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues, *J Biol Chem* 226: 497–509.
33. Toussaint MW, Rosencrance AB, Brennan LM, Beaman JR, Wolfe MJ, Hoffmann FJ, Gardner HSJ. Chronic Toxicity of Chloroform to Japanese Medaka Fish. *Environ Health Persp* 109:35-40.
34. Jessinta S, Azhari HN, Tajuddin SN, Abdurahman HN. 2013. Brine Shrimp (*Artemia salina*) Toxicity Assay of Extracts from Different Parts of Neem (*Azadirachta indica*). International Conference Of Chemical Engineering and Industrial Biotechnology, Venue: Kuantan.
35. Guilhermino L, Diamantino T, Silva MC, Soares AMVM. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicol Environ Saf* 46:357–62.
36. Burridge L, Weis J, Cabello F, Pizarro, J. 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306: 7–23.

37. Wang, H, Li Y, Huang H, Xu X, Wang, Y. 2011. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides using the *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin embryo test. *Environ Toxicol Chem* 30: 692–703.
38. Manzo S, Buono S, Cremisini, C. 2008. Predictability of Copper, Irgarol, and Diuron combined effects on sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Arch Environ Con Tox*, 54: 57–68.

### Capítulo 3

Avaliação do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” como possível ferramenta de controle químico de prevenção do coral sol *Tubastraea coccinea*

## RESUMO

No presente estudo, o composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” foi utilizado como uma possível ferramenta de controle químico para as larvas do coral exótico *Tubastraea coccinea*. As colônias foram coletadas em Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, levadas para o laboratório, nos meses de julho e agosto quando ocorre liberação de larvas dessa espécie. As larvas liberadas foram colocadas em placas de 24 poços imediatamente após sua liberação, onde foram submetidas a cinco diferentes concentrações do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” (0.5, 5, 10, 50 and 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e três controles (1:1:1 clorofórmio: metanol: água pura; sulfato de cobre e água do mar). A mortalidade larvar de *T.coccinea* foi verificada no início do experimento e após 24 horas. O composto foi tóxico para as larvas de *T.coccinea* na concentração 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (35% de mortalidade) e não diferiu significativamente do controle negativo (sulfato de cobre) (Tukey;  $p>0.05$ ). Por outro lado, a mortalidade larvar nas demais concentrações variou de 10 (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a 3% (5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A concentração do composto que causa 50% de letalidade para as larvas de *T.coccinea* foi de 142, 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os solventes utilizados no controle positivo não apresentaram efeitos deletérios para as larvas. Os resultados obtidos nesse estudo mostram que o composto sintético pode ser uma alternativa como ferramenta de controle dessa espécie, já que as tintas anti-incrustantes apresentam eficácia limitada, no controle de *T.coccinea* em estruturas artificiais.

**Palavras-chave:** Composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”; Controle; Larva; *Tubastraea coccinea*; Toxicidade.

## ABSTRACT

In the present study, the compound "1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine" was tested to ascertain if it could be used as a possible tool for the chemical control of larvae of the exotic coral, *Tubastraea coccinea*. The colonies were collected in Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, during the months of July and August, which is the spawning period for this species, and taken back to the laboratory. The larvae were placed in 24 well plates immediately after the larval release, and subjected to five different concentrations of "1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine" (0.5, 5, 10, 50 and 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and three controls (1: 1: 1 chloroform: methanol: pure water, copper sulphate and sea water). The larval mortality of *T.coccinea* was checked at the beginning of the experiment and after 24 hours. The compound was toxic to *T.coccinea* larvae at 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (35% mortality), not significantly different from the negative control (copper sulphate) (Tukey test;  $p > 0.05$ ). Furthermore, larval mortality at other concentrations ranged from 10% (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) to 3% (5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The concentration of the compound which caused 50% lethality for *T.coccinea* larvae was 142.2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Solvents used in the positive control showed no deleterious effects on the larvae. The results of this study show that this synthetic compound may be used as an alternative control tool, as many antifouling paints have limited effectiveness in the control of *T.coccinea* on artificial structures.

**Keywords:** Compound "1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine"; Control; Larvae; *Tubastraea coccinea*; Toxicity.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A bioincrustação marinha não está apenas associada às questões econômicas referentes à indústria naval, mas também é considerada um dos maiores vetores de introdução de espécies invasoras (Minchin & Gollasch, 2003). Espécies invasoras são aquelas que estão fora da sua distribuição natural e apresenta um potencial de distribuição em uma nova área (IUCN, 2000). Essas espécies invasoras são consideradas um problema ecológico, pois podem afetar a integridade da comunidade e alterar a biodiversidade (Sala *et al.*, 2000). São ainda muitas vezes competitivamente superiores e influenciam alguns mecanismos tais como, competição por espaço e alimentação (Hellio *et al.*, 2009). Esses organismos geralmente sofrem baixa taxa de predação quando comparada com espécies nativas (Moreira & Creed, 2012); além de alterar o funcionamento normal dos ecossistemas por alterar a ciclagem de nutrientes e a produtividade (Vitousek, 1990).

O coral sol *Tubastraea coccinea* (Lesson, 1829) é originário do Oceano Pacífico Sul (Cairns, 2000), porém, atualmente pode ser considerada uma espécie cosmopolita devido à sua introdução em várias partes do mundo através da incrustação em plataformas petrolíferas e cascos de embarcações (Cairns, 1994; Sammarco *et al.*, 2008). Esse coral apresenta estratégias reprodutivas que facilitam a rápida colonização e expansão para novos ambientes, tal como incubação das larvas (Richmond, 1997), altas taxas de liberação de larvas, tempo prolongado das larvas na coluna d'água, altas taxas de recrutamento (De Paula, 2007), além de produzirem compostos alelopáticos (Lages *et al.*, 2009).

No Brasil esse coral foi reportado em 1980, observado primeiramente nas plataformas da Bacia de Campos (Castro & Pires, 2001). Posteriormente, *Tubastraea coccinea* se estabeleceu em costões ao longo da costa brasileira (De Paula & Creed, 2004; Ferreira 2003; Creed 2006). Para evitar a sua expansão métodos de controle estão sendo utilizados.

As tintas anti-incrustantes são utilizadas para evitar a incrustação dos organismos, porém a eficiência das mesmas é limitada no controle de espécies exóticas (Minchin *et al.*, 2006). Recentemente, o glicerofosfolípido PAF presentes em esponjas marinhas *Aplysina fulva*, *Amphimedon viridis*, *Arenosclera brasiliensis*, *Darwinella sp.*, *Geodia corticostylifera* apresentou potencial anti-incrustante (Batista *et al.*, 2015a). Apesar desses compostos apresentarem eficácia em conter a bioincrustação, a obtenção da biomassa necessária para isolar esses compostos é inviável já que são

oriundos de organismos marinhos. Esse glicerofosfolípideo é encontrado em outros organismos e vegetais marinhos e terrestres (Singh *et al.*, 2013; Nishikawa *et al.*, 2015) e, com isso, a alternativa encontrada foi utilizar a lecitina de soja como matéria prima devido ao seu baixo custo e a abundância (Xu *et al.*, 2011). Foi feito o composto sintético e análogo aos glicerofosfolípidios encontrados em lecitina de soja e através de testes em laboratório e campo foi verificada a eficácia desse composto (“1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”) no controle da bioincrustação (Batista *et al.*, 2015b), e por este motivo esse composto foi patenteado (US 8657943-B2,2014). Logo, o presente estudo teve como objetivo testar o efeito tóxico do biocida “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” em larvas do coral sol *T.coccinea*, para possível aplicação como ferramenta de controle químico dessa espécie invasora.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Tratamentos

Para a preparação da diluição dos controles e do composto, 10 litros de água do mar foram coletados Ilha do Farol, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil (23°00'04.77"S; 42°00'24.42"O). Posteriormente, a água coletada foi filtrada em laboratório utilizando filtro de acetato de celulose (0,45  $\mu$ m, Millipore).

O controle positivo foi preparado utilizando a proporção de 1:1: 1 dos solventes orgânicos clorofórmio (Tedia) e metanol (Merck) além de água pura (Millipore). Essa foi preparada usando 2 ml de cada solvente. Os solventes foram escolhidos pela eficácia na extração de lipídios com base no método de Folch (1957). O sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) (Reagen) foi usado como controle negativo, já que esse composto tem sido utilizado como biocida principal em tintas anti-incrustantes. O controle nulo consiste em água do mar filtrada.

Cinco concentrações diferentes do composto foram preparadas a partir de uma amostra mãe 0,5; 5; 10; 50 e 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Para tal, 100 mg do composto foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionado a proporção de 1:1:1 de clorofórmio, metanol e água pura (LC-MS) (2ml de cada solvente) e avolumado até 1 litro com água do mar, sendo considerada a solução “mãe”. Essa solução “mãe” foi utilizada para a preparação das seis concentrações do composto (0,05; 0,5; 5; 10; 50; 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). Para o controle negativo foi pesado 100 mg de sulfato de cobre e avolumado com água do mar até 1000 mL, sendo a amostra mãe usada para preparar as

demais concentrações. Similarmente, para o controle positivo foi utilizado à mesma proporção de solventes usados nos tratamentos com a substância em diferentes concentrações.

### 3.2.2 Procedimento de coleta

Cerca de 30 colônias de *Tubastraea coccinea* foram coletadas na Ilha dos Porcos, Arraial do Cabo – RJ – Brasil (23°57'58."S; 41°59'23"W), durante os meses de julho e agosto de 2015 quando ocorre liberação de larvas da espécie (De Paula, 2007). As colônias foram retiradas do substrato com auxílio de espátula e marreta, armazenadas em caixas térmicas. Posteriormente, os exemplares foram imediatamente levados para o Laboratório de Recursos Marinhos (LAREMAR) do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), onde foram acondicionados em aquários para a realização dos experimentos.



**Figura 3.1** - *Tubastraea coccinea*. Foto: Terra, C.S.S.

### 3.2.3 Teste de toxicidade

As larvas liberadas pelas colônias foram colocadas em placas de 24 poços (Ciencor) contendo 2ml das concentrações do composto ( $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e de dois controles (sulfato de cobre e solventes). Um total de quatro réplicas foi utilizado por tratamento, sendo incluídas cerca de dez larvas em cada uma. A mesma quantidade de larvas e réplicas foi incluída no controle nulo (água do mar). A taxa de mortalidade e sobrevivência das larvas foi verificada em microscópio estereoscópico binocular (Zeiss, modelo KL 1500 LCD), após vinte e quatro horas. Foram realizados três bioensaios.

### 3.3 TRATAMENTO DOS DADOS

As premissas da homogeneidade das variâncias e a normalidade dos dados foram previamente verificadas através dos testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. A porcentagem de mortalidade larvar de *T.coccinea* foi transformada para arcoseno, visto que os dados não atenderam às premissas de normalidade e a homogeneidade das variâncias. Para verificar se as diferenças observadas são estatisticamente significativas entre os tratamentos foi testada através de uma análise de variância fatorial (ANOVA). O teste Tukey foi utilizado para verificar as diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, usando nível de significância  $\alpha = 0,05$  (Zar, 1999). A análise de Probitos foi usada para calcular a concentração letal para 50% ( $CL_{50}$ ) dos organismos testados (Finney, 1971). Todos esses testes foram realizados no Software Statistic 7.0 (Statsoft, 2006).

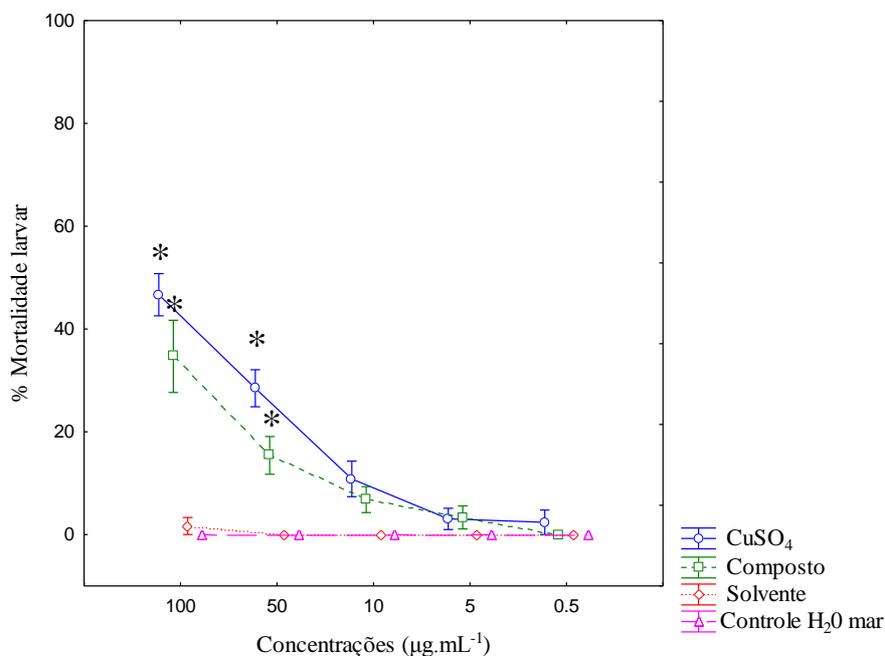
### 3.4 RESULTADOS

A figura 3.2 mostra a mortalidade causada pelos diferentes controles e do composto. Cerca de 1.110 larvas foram analisadas durante os experimentos. A mortalidade larvar variou significativamente entre os tratamentos (ANOVA;  $F=12,220$ ;  $p<0,05$ ). As maiores taxas de mortalidade foram verificadas nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto (35% e 15%, respectivamente). A mortalidade larvar nessas concentrações foram significativamente maiores quando comparada ao controle nulo (água do mar) e controle positivo (solventes) (Tukey;  $p<0,05$ ). Não foram verificadas diferenças significativas entre as demais concentrações (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e os controles (Tukey;  $p>0,05$ ). A  $CL_{50}$  para as larvas de *T.coccinea* foi de 142, 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Não foi observada diferença significativa entre a porcentagem de larvas mortas observadas nas concentrações 100; 10; 5 e 0,05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do composto quando comparado ao controle sulfato de cobre (Tukey;  $p>0,05$ ). Porém, na concentração 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi observada diferença significativa em relação as taxas de mortalidade (Tukey ;  $p<0,05$ ).

O controle negativo ( $\text{CuSO}_4$ ) foi tóxico, causando de 15% (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) até 50% (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de mortalidade nas larvas. Uma diferença significativa foi observada nas concentrações de 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  quando comparado ao controle positivo ( solventes) e controle nulo (água do mar) (Tukey;  $p<0,05$ ). Não foram observadas diferenças

significativas nas demais concentrações 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 0.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ) quando comparado aos controles (Tukey;  $p > 0,05$ ).

Não foi observada diferença significativa entre o controle positivo (solvente) e o controle nulo (água do mar) em todas as concentrações (Tukey;  $p > 0,05$ ).



**Figura 3.2-** Média e desvio padrão da mortalidade de larvas (%) de *T.coccinea* submetidas ao sulfato de cobre (controle negativo), ao composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina”, aos solventes clorofórmio e metanol (controle positivo) e água do mar (controle nulo) em cinco diferentes concentrações. O asterisco (\*) indicam tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle de água do mar ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

### 3.5 DISCUSSÃO

O coral sol *Tubastraea coccinea* tem sido considerado uma praga no mundo inteiro (Shearer, 2009), sendo um grande problema para o governo, gestores ambientais, órgãos públicos e pesquisadores que visam encontrar eficientes formas de controle dessa espécie invasora (Tachikawa, 2005). O presente estudo foi o primeiro a testar um composto natural sintético como potencial forma de controle do coral sol. O novo composto apresentou toxicidade às larvas de *Tubastraea coccinea* na maior concentração testada ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), similar ao encontrado no controle negativo (sulfato de cobre) que é atualmente considerado um eficiente biocida (ICOMIA, 2006). Porém, os efeitos negativos causados pelo cobre, que incluem infertilidade são amplamente reportados na literatura (Negri & Heyward; 2001) e a redução do assentamento larvar (Reichelt-Brushett & Harrison, 2000) de corais escleractíneos. No presente estudo não foi verificado o assentamento larvar de *T.coccinea* já que as larvas do coral podem ficar de 3 a 14 dias na coluna d'água até assentarem (Reyes-Bonilla *et al.*, 1997), mas já foi visto que no ambiente natural o assentamento pode levar mais de 100 dias (Fenner, 2001). Contudo, o composto testado apresentou menor toxicidade quando comparado ao sulfato de cobre na concentração  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e maior eficácia na inibição do assentamento larvar para outras espécies em concentrações entre 10 e  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (ver capítulo 1). Em contrapartida, o sulfato de cobre nessas mesmas concentrações não inibiu de forma eficaz o assentamento larvar de outras espécies, causando apenas mortalidade (ver capítulo 1). Esses resultados mostram que o composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” pode ser uma alternativa quando comparado ao sulfato de cobre, já que, em concentrações menores, ele apresenta maior eficácia em  $10$  e  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em inibir o assentamento.

Um trabalho realizado com extrato bruto de *Carijoa riisei* mostra que ele atua de forma tóxica para as larvas levando a mortalidade (Mizrahi, 2014). O composto que causa tal efeito, no entanto, ainda não foi identificado e isolado. Com isso, o composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” torna-se uma alternativa viável tendo em vista a facilidade de síntese para aplicação em tintas.

Os resultados reportados na literatura mostram que os biocidas acessórios comerciais (Diuron, Irgarol, Sea-Nine, Dichofluanid, Chlorothanoil, Zinco piritona) são eficientes no controle da bioincrustação, mas apresentam elevada toxicidade para diferentes espécies de corais nativos (Skeikh *et al.*, 2009; Bao *et al.*, 2011). O biocida

Irgarol inclusive foi banido nas Bermudas devido a sua toxicidade aguda em recifes de corais (Carbery *et al.*, 2006). O composto testado, também apresenta toxicidade em espécies nativas nas concentrações 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , porém, não foi observado o efeito de letalidade nas demais concentrações testadas no presente trabalho (10; 5; 0.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (ver capítulo 2).

Apesar de esforços e recursos disponíveis para estudar a introdução de espécies via bioincrustação marinha através de cascos de navios e plataformas (Ferreira *et al.*, 2006), os controles químicos utilizados não apresentam eficácia como as tintas à base de tributilestano (Martins & Vargas, 2013), já que esses organismos são de fácil colonização e expansão (De Paula, 2007). As entidades governamentais e ambientais devem procurar soluções práticas para minimizar perdas ecológicas e econômicas que podem resultar da proliferação de espécies invasoras (Olenin *et al.*, 2007).

Atualmente alguns estudos buscam formas alternativas de controle do coral *Tubastraea coccinea*, que inclui experimentos com salinidade (Altvater *et al.*, 2015) e temperatura (Mizhari, 2008). O hipoclorito de sódio também foi testado em colônias dessa espécie, sendo uma outra alternativa de controle químico (Altvater *et al.*, 2016). Mantellato *et al.* (2015) propõem um método alternativo utilizando envoltórios de folhas de plástico e rafia, onde ocorre a mortalidade das colônias por falta de oxigênio, alimento e/ou desgaste físico. Outro método utilizado é a retirada manual das colônias em praias e recifes, seguida pela posterior utilização de água doce para matar as colônias (Moreira *et al.*, 2014).

Tendo em vista os problemas causados por esse coral invasor, o presente estudo pode auxiliar no controle químico dessa espécie. Cabe ressaltar que os resultados foram obtidos através de experimentos em laboratório que nem sempre reproduzem o que ocorre no ambiente, para uma futura aplicação do composto como uma possível ferramenta de controle outros experimentos devem ser realizados, como por exemplo, testes em campo com placas contendo o composto em locais de ocorrência do coral *T.coccinea* para verificar se ocorreria a mortalidade das larvas. Além disso, experimentos devem ser conduzidos com corais nativos para avaliar o efeito do composto.

]

### 3.6 REFERÊNCIAS

Altvater, L., Bastos, N., Andrade, M., Messano, L.V.R., Apolinário, M., Coutinho, R.(2015). Response of the invasive coral *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 to long-term low-salinity exposure: a potential control strategy. XI Biofouling, Benthic Ecology and Marine Biotechnology Meeting, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro.

Altvater, L., Messano, L.V.R., Apolinário, M., Coutinho, R. (2016). Use of sodium hypochlorite as a control method for non-indigenous corals: The case of *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829. 9th International Conference on Marine Bioinvasions, Sydney, Australia.

Bao, V. W. W., Leung, K. M. Y., Qiu, J. W., Lam, M. H. W. (2011). Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin*, 62:1147–1151.

Batista, W.R., Lopes, S.R.P., Silva, D.B.C., Neves, M.H.C.B., Coutinho, R., Lopes, C.C., Lopes, R.S.C.(2015a). Evaluating antimicrobial activity of bioactive glycerophospholipids presents in brazilian marine sponges extracts. In: The battle against microbial pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, 144-150.

Batista, W.B., Neves, M.H.C.B., Coutinho, R., Lopes, C.C., Lopes, R.S.C. (2015b). Glicerofosfolípidios sintéticos para uso como aditivo biocida em tintas antiincrustante. *Química Nova*, XY: 1-7.

Cairns, S.D. (1994). Scleractinia of the temperate north Pacific. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 557:1-150.

Cairns S (2000) A revision of the shallow-water azooxanthellate scleractinia of the Western Atlantic. *Studies on the Natural History of the Caribbean Region*, 75:1–240.

Carbery, K., Owen,R., Frickers,T., Otero, E., Readman,J.(2006). Contamination of Caribbean coastal waters by the antifouling herbicide Irgarol 1051.*Marine Pollution Bulletin*, 52:35-44.

Castro, C.B., Pires D.O. (2001). Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. *Bulletin of Marine Science*, 69: 357–371.

Creed JC (2006) Two invasive alien azooxanthellate corals, *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*, dominate the native zooxanthellate *Mussismilia hispida* in Brazil. *Coral Reefs* 25:250–350.

De Paula, A.F., Creed, J.C. (2004). Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: A case of accidental introduction. *Bulletin of Marine Science* 74: 175–183

De Paula, A.F.(2007). Biologia reprodutiva, crescimento e competição dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) com espécies nativas. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 142 pp.

Fenner, D. (2001). Biogeography of three Caribbean coral (Scleractinia) and a rapid range expansion of *Tubastraea coccinea* into the Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 69: 1175- 1189.

Ferreira, C.E.L. (2003) Non-indigenous corals at marginal sites. *Coral Reefs* 22: 498.

Ferreira, C. E. L., Gonçalves, J. E. A., Coutinho, R. (2006). Ship hulls and oil platforms as potential vectors to marine species introduction. *Journal of Coastal Research*, 39: 1341–1346.

Finney, D.J.( 1971). *Probit Analysis*. Cambridge University Press, London, 333pp.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.

Hellio, C., Yebra, D., editors. (2009). Advances in marine antifouling coatings and technologies. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.

ICOMIA - International Council of Marine Industry Associations. (2006). Factsheet on copper-based antifouling.

IUCN (The World Conservation Union). (2000). Guidelines for the prevention of biodiversity loss caused by alien invasive species.

Lages, B.G., Rezende, C.M., Pinto, A.C., Creed, J.C. (2009). Experimental investigation of change in chemical compounds of the invasive coral *tubastraea* spp. due to proximity of competitors. Anais do IX Congresso de Ecologia, São Lourenço, Minas Gerais.

Mantelatto, M. C., Pires, L. M., Joana, G., Oliveira, G. De., Creed, J. C. (2015). A test of the efficacy of wrapping to manage the invasive corals *Tubastraea tagusensis* and *T. coccinea*. *Management of Biological Invasions* 6: 367–374.

Martins, T.L., Vargas, V.M.F. (2013). Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8:1-11.

Minchin, D., Gollasch, S. (2003). Fouling and ships' hulls: How changing circumstances and spawning events may result in the spread of exotic species. *Biofouling*, 19:111–122.

Minchin, D., Floerl, O., Savini, D. & Occhipinti-Ambrogi, A. (2006) Small craft and the spread of exotic species. In :The ecology of transportation: managing mobility for the environment (ed. by J.L. Davenport and J. Davenport), pp. 99–118.

Mizrahi, D. (2014). Influência de processos pré e pós-assentamento no padrão de ocorrência do coral sol *Tubastraea coccinea*, no litoral norte do Estado de São Paulo. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 159pp.

Mizrahi, D. (2008) Influência da temperatura e luminosidade na distribuição da espécie invasora *Tubastraea coccinea* na região de ressurgência de arraial do cabo– RJ. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 85pp.

Moreira, T.S.G., Creed, J.C. (2012). Invasive, non-indigenous corals in a tropical rocky shore environment: no evidence for generalist predation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 438: 7–13.

Moreira P.L, Ribeiro, F.V, Creed, J.C.(2014). Control of invasive marine invertebrates: An experimental evaluation of the use of low salinity for managing pest corals (*Tubastraea* spp). *Biofouling*, 30: 639–650

Negri, A.P., Heyward, A.J. (2001). Inhibition of coral fertilization and larval metamorphosis by tributyltin and copper. *Marine Environmental Research* 51: 17-27.

Nishikawa, Y., Furukawa, A., Shiga, I., Muroi, Y., Ishiii, T., Hongo, Y., Takahashi, S., Sugawara, T., Koshino, H., Ohnishi, M. (2015). Cytoprotective Effects of lysophospholipids from sea *Cucumber Holothuria atra*. *Plos One*,

Olenin, S., Minchin, D., Daunys, D. (2007). Assessment of biopollution in aquatic ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 55: 379-394.

Reichelt-Brushett, A. J., Harrison, P. L. (2000). The effect of copper on the settlement success of larvae from the scleractinian coral *Acropora tenuis*. *Marine Pollution Bulletin*, 41: 385–391.

Reyes-Bonilla, H., Pérez-Vivar, T.L., Ketchum, J.T.(1997) Nuevos registros del coral ahermatípico *Tubastraea coccinea* Lessen, 1829 (Scleractinia: Dendrophyllidae) en el Pacífico de México. *Revista de Investigación Científica*, 8: 31-34.

Richmond, R.H. (1997). Reproduction and recruitment in coral: critical links in the persistence of reefs. In: Birkeland E (Ed) *Life and death of corals reefs*. Chapman and Hall, New York, pp. 175-197.

Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Hueneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L, Sykes, M.T, Walker, B.H, Walker, M., Wall, D.H.(2000) Biodiversity—global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287:1770–1774.

Sammarco, P.W., Atchison, A.D., Brazeau, D.A., Boland, G.S., Hartley, S.B., Lirette, A. (2008) .Distribution, abundance, and genetics of corals throughout the N. Gulf of Mexico: the world's largest coral settlement experiment. Proc 11th Int Coral Reef Symp, Fort Lauderdale, FL, July 2008, Abstract.

Shearer, T. L. (2009). Population Analysis of an Introduced Coral Species, *Tubastraea coccinea* , in Florida, 229–236. 28th Symposium.Dauphin Island, AL: AAUS.

Sheikh, M.A., Higuchi, T., Fujimura, H., Imo, T.S., Miyagi, T., Oomori, T. (2009). Contamination and impacts of new antifouling biocide Irgarol-1051 on subtropical coral reef waters. *International Journal Environmental Science Technology*, 6: 353-358.

Singh, P., Singh, I. N., Mondal, S. C., Singh, L., Garg, V. K. (2013). Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin. *Fitoterapia*, 84: 180–201.

Tachikawa, H. (2005). Azooxanthellate scleractinia (hexacorallia, anthozoa, cnidaria) collected from Otsuki, Kochi Prefecture, Japan. *Kuroshio Biosphere*, 2:1-27.

United State Patent and Trademark Office (USPTO) (2014).1-hydroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine compounds, preparation process, antifouling composition, process for its preparation, method to prevent fouling, method to turn a surface into an antifouling surface, and, covered surface. Patented number: US 8657943-B2.

Vitousek, P.M. (1990). Biological invasions and ecosystem processes: towards an integration of population biology and ecosystem studies. *Oikos*, 57:7-13.

Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z., Shiina, T.(2011). Soybean-based surfactants and their applications, in Soybean Applications and Technology (ed T-B.Ng), InTech.

### III. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo indicaram que composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” sintético análogo ao encontrado em esponjas marinhas é tóxico para as larvas dos diferentes organismos testados nas maiores concentrações ( $\geq 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Porém, em concentrações menores o composto não causa letalidade para as larvas ( $\leq 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Isso ressalta a importância da realização de testes de toxicidade para a tomada de decisões para a liberação de uma substância química no ambiente, mesmo tendo como base molecular uma substância natural.

O composto inibiu de forma eficiente o assentamento larvar de *Bugula neritina*, porém, o mesmo efeito de inibição não foi observado para as cipris de *Amphibalanus amphitrite*.

Similar aos efeitos da toxicidade aguda causada pelo composto em *B.neritina* e *A.amphitrite*, nos experimentos realizados com o ouriço *Lytechinus variegatus* foi verificada alterações no desenvolvimento embriolarval causada pelo composto nas concentrações mais elevadas ( $\geq 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e não foram detectados efeitos crônicos nas demais concentrações.

O composto estudado foi tóxico para as larvas do coral invasor *Tubastraea coccinea* nas mesmas concentrações das larvas das diferentes espécies testadas. De uma forma geral, o composto causou menos dano as larvas quando comparado ao sulfato de cobre que é amplamente utilizado como biocida principal em tintas anti-incrustantes.

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios com “1-hydroxy-2-o-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine” em sua fase sólida, mostra que esse composto pode ser uma boa alternativa como biocida auxiliar. A utilização de matéria-prima de baixo custo, como lecitina para sua síntese, a baixa toxicidade em organismos não-alvo e a eficiência na inibição do assentamento larvar quando comparado ao cobre e outros biocidas acessórios, faz com que esse composto possa ser uma boa alternativa de biocida auxiliar nas tintas anti-incrustantes.

#### **IV. PERSPECTIVAS FUTURAS**

As atividades realizadas no presente trabalho devem ser complementadas com bioensaios utilizando faixas de concentrações mais restritas, já que no presente estudo foram feitos testes com faixas mais abrangentes. Adicionalmente, pretende-se realizar ensaios com organismos adultos, pois a sensibilidade das espécies é diferente quando comparado aos estágios larvais.

No ambiente marinho esse composto pode interagir com outras substâncias e apresentar uma toxicidade ainda mais elevada, logo é importante avaliar a toxicidade do composto “1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina” com outros biocidas para estimar efeitos sinérgicos. Outro aspecto de extrema importância é a avaliação da meia-vida desse composto para conhecer sua persistência no ambiente.