

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GEOLOGIA E GEOFÍSICA/LAGEMAR

PÓS-GRADUAÇÃO EM DINÂMICA DOS OCEANOS E DA TERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO DO CORAL
INVASOR *Tubastraea coccinea* LESSON, 1829 E DE POTENCIAIS
COMPETIDORES**

ELLEN APARECIDA DE SOUZA OLIVEIRA

NITERÓI

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GEOLOGIA E GEOFÍSICA/LAGEMAR

PÓS-GRADUAÇÃO EM DINÂMICA DOS OCEANOS E DA TERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO DO CORAL
INVASOR *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 E DE POTENCIAIS
COMPETIDORES**

ELLEN APARECIDA DE SOUZA OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Dinâmica dos Oceanos e da Terra da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Ecologia Marinha.

Orientador: Dr. Ricardo Coutinho

Co-orientadora: Dr^a. Luciana Altvater

NITERÓI

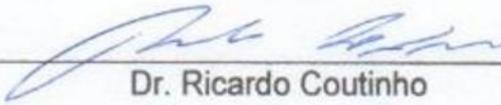
2017

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO DO CORAL
INVASOR *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 E DE POTENCIAIS
COMPETIDORES**

ELLEN APARECIDA DE SOUZA OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Dinâmica dos Oceanos e da Terra da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Ecologia Marinha.

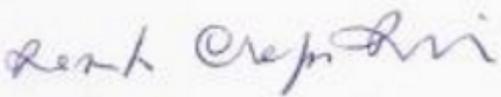
BANCA EXAMINADORA



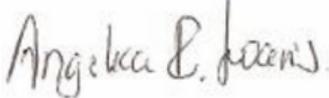
Dr. Ricardo Coutinho



Dra. Elizabeth Neves



Dr. Renato Crespo Pereira



Dra. Angelica Ribeiro Soares



Dr. José Eduardo A. Gonçalves (Suplente)

NITERÓI

2017

O48

Oliveira, Ellen Aparecida de Souza

Avaliação da atividade biológica do extrato bruto do coral invasor *Tubastraea coccínea* Lesson, 1829 e de potenciais competidores / Ellen Aparecida de Souza Oliveira. – Niterói : [s.n.], 2017.

103 f.

Dissertação (Mestrado em Dinâmica dos Oceanos e da Terra) – Universidade Federal Fluminense, 2017.

1.Bioinvasão. 2.Bioincrustação. 3.Toxicidade. I.Título.

CDD 574.92

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, pela oportunidade de trabalhar no IEAPM em um grupo tão unido, amigo e com pessoas maravilhosas, dedicadas e competentes. Também agradeço a Ele pela força, sabedoria, amor e proteção para concluir mais uma etapa da minha vida.

A minha família linda, amada e maravilhosa. Obrigada pelo o amor, carinho, apoio, incentivo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido pai científico (orientador), Dr. Ricardo Coutinho, pela oportunidade, dedicação, confiança, carinho, amizade, ensinamentos, motivação, orientação, e apoio. Obrigada por ser esta pessoa tão querida, animada, que transmite luz, positividade e serve de inspiração para todos que amam fazer pesquisa.

A minha querida amiga e co-orientadora, Dr. Luciana Altvater, pela paciência, ajuda, dedicação, amizade, disponibilidade, orientação, correções criteriosas e compreensão nos momentos de desespero.

Ao Instituto de Estudo do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) pela infraestrutura para realização e desenvolvimento deste projeto.

Aos queridos amigos Alexandre Kassuga, Nathália Bastos, Priscila Araújo, Kiani Mello, Carolina Terra, Daniela Batista, Layla, Maurício e Fábio pela ajuda nas coletas e armazenamento das colônias.

As queridas amigas Juliana Ferrari, Ana Polycarpa, Carolina Terra, Rafaela Costa, Erica Sardela pela ajuda nos experimentos de laboratório.

As queridas Juliana Ferrari e Daniela Batista pela ajuda na tradução dos resumos.

As secretárias mais lindas, fofas, queridas e eficientes da Divisão de Biotecnologia Marinha, Glauce Galeazzi e Thamyres Pessôa. Sem vocês estaríamos perdidos.

A Dra. Daniela Sudatti pelo carinho e por todo apoio na fase inicial do projeto.

A todos os componentes do laboratório de química, em especial, ao Casarim.

Aos amigos queridos Márcio Abreu, José Eduardo, Jurema Quintanilha, Laís Lima, Júlio Monteiro e Luciana Messano pelas conversas, apoio e incentivo.

Aos queridos amigos Laís Naval, Alexandre Kassuga e Julio Quintanilha pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os meninos das embarcações e viaturas por todo auxílio. Obrigada pelo apoio e paciência.

Ao querido Luciano pelo cultivo de microalgas e autoclavagem dos materiais.

A Dra. Maria Helena por ter permitido o uso do Laboratório de Biofilme para a realização dos experimentos e pela doação das bactérias marinhas.

Aos membros da banca.

A querida dona Wilma pela estadia em Niterói nos períodos de disciplina.

A tia querida Cláudia Faria e sua linda família, por todo apoio, carinho e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Dinâmica do Oceano e da Terra, em especial a secretária Larêssa.

A Petrobrás pelo apoio financeiro através do projeto GEBIO.

A FUNDEP pela concessão da bolsa.

.

"O Mar não é um obstáculo: é um caminho."

Amyr Klink

RESUMO GERAL

O coral gênero *Tubastraea*, nativo do Indo-Pacífico, chegou ao Brasil provavelmente no final da década de 1980. *Tubastraea coccinea* é um dos primeiros corais escleractíneos invasores do Atlântico sul. Estudos prévios demonstraram que esta espécie produz compostos bioativos com múltiplas propriedades, tais como, defesa contra predadores, competidores e organismos incrustantes. Estes compostos podem conferir a *T. coccinea* uma vantagem sobre as espécies nativas, facilitando seu processo de introdução, expansão e colonização em novos habitats. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos: (1) Verificar o potencial anti-incrustante e a toxicidade aguda do extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* em larvas de organismos incrustantes (*Amphibalanus amphitrite*, *B. neritina* e larvas de coespecíficos) (2) Verificar o efeito no assentamento e a toxicidade aguda do extrato bruto de potenciais competidores (*Darwinella* sp., *Palythoa caribaeorum*, *Tubastraea tagusensis* nas larvas do coral invasor *T. coccinea*; (3) avaliar o crescimento de oito bactérias marinhas expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea*. Os resultados demonstraram que o extrato bruto do coral apresentou potencial como anti-incrustante, visto que foi tóxico nas maiores concentrações (1%, 10% e 100%) para as larvas de *A. amphitrite* e *T. coccinea* e em todas as concentrações para as larvas de *B. neritina*. No entanto, não apresentou nenhum efeito sobre o assentamento de *A. amphitrite* e *B. neritina* nas menores concentrações (0,01% e 0,1%) e induziu o assentamento de larvas coespecíficas na menor concentração. Apenas a concentração de 0,1% inibiu o assentamento de larvas coespecíficas e não foi tóxica para as mesmas. O extrato bruto de potenciais competidores apresentou toxicidade, principalmente nas concentrações de 10% e 100% e inibiram o assentamento larvar em praticamente todas as concentrações testadas. Quanto às bactérias expostas ao extrato bruto do coral *T. coccinea*, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as substâncias químicas produzidas pelo coral têm grande potencial antibacteriano, já que inibiu o crescimento de quatro bactérias marinhas.

ABSTRACT

Tubastraea coccinea (Scleractinia: Dendrophyllidae) is the first invasive scleractinian coral in the Western South Atlantic. The genus *Tubastraea* arrived in Brazil in the late 1980's, attached to oil platforms at Campos Basin, state of Rio de Janeiro. *Tubastraea coccinea* produces chemical substances that act as a defense mechanism against predators, competitors and fouling organisms. These chemicals may confer to *T. coccinea* an advantage over the native species, facilitating the process of introduction, expansion and colonization in new habitats. Thus, the objective of the present study was: (1) to verify the antifouling potential and the acute toxicity of the crude extract of *T. coccinea* on larvae of fouling organisms (*Amphibalanus amphitrite* and *Bugula neritina*) and conspecific (2) to verify the effect of the crude extract of potential competitors (*Darwinella sp.*, *Palythoa caribaeorum*, *Tubastraea tagusensis*) on settlement and mortality of *T. coccinea* larvae; (3) to evaluate the growth of eight bacteria exposed to the crude extract of *T. coccinea*. The results showed that the crude extract of the coral showed potential as an antifouling, since it was toxic at the highest concentrations (1%, 10% and 100%) for *A. amphitrite* and *T. coccinea* larvae and at all concentrations for larvae of *B. neritina*. However, had no effect on the settlement of *A. amphitrite* and *B. neritina* at the lowest concentrations (0.01% and 0.1%) and induced settlement of co-specific larvae at the lowest concentration. Only the concentration of 0.1% inhibited settlement of co-specific larvae without being toxic to them. The crude extract of potential competitors presented toxicity to *T. coccinea* larvae, mainly in concentrations of 10% and 100%, and inhibited larval settlement at all concentrations tested. Thus, the secondary metabolites of these organisms may be an important tool in the control of *T. coccinea* invasive coral. Regarding the experiment with bacterias, the results demonstrated that the chemical substances produced by the coral have great antibacterial potential, since they inhibited the growth of four marine bacteria.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO GERAL | 18 |
| Bioincrustação Marinha e Bioinvasão..... | 18 |
| Ecologia química marinha | 20 |
| O coral invasor | 21 |
| OBJETIVOS..... | 26 |
| Objetivo Geral..... | 26 |
| Objetivos específicos | 26 |
| REFERÊNCIAS..... | 27 |
| Capítulo 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INCRUSTANTE E TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO BRUTO DO CORAL INVASOR Tubastraea coccinea Lesson, 1829 | 34 |
| Resumo | 34 |
| Abstract..... | 35 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 36 |
| 1.2 MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 1.2. 1 Coleta de organismos | 39 |
| 1.2.2 Peso e volume dos organismos..... | 39 |
| 1.2.3 Preparação dos extratos..... | 40 |
| 1.2.4 Experimentos de laboratório | 41 |
| 1.2.4.1 Preparação dos testes de assentamento e toxicidade | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2.4.2 <i>Amphibalanus amphitrite</i> (Darwin, 1854) | 41 |
| 1.2.4.3 <i>Bugula neritina</i> (Linnaeus, 1758) | 43 |
| 1.2.4.4 <i>Tubastraea coccinea</i> Lesson 1829 | 43 |
| 1.2.4.5 Testes de assentamento e toxicidade | 44 |
| <i>Amphibalanus amphitrite</i> | 44 |
| <i>Bugula neritina</i> | 45 |
| <i>Tubastraea coccinea</i> | 46 |
| Análise Estatística | 47 |
| 1.3 RESULTADOS | 47 |
| 1.3.1 Bioensaio com <i>Amphibalanus amphitrite</i> | 47 |
| 1.3.2 Bioensaio com <i>Bugula Neritina</i> | 49 |
| 1.3.3 Bioensaio com <i>T. coccinea</i> | 52 |
| 1.4 DISCUSSÃO | 54 |
| 1.5 REFERÊNCIAS | 58 |
| CAPÍTULO 2: efeito químico do extrato bruto de potenciais competidores nas larvas do coral invasor <i>Tubastraea coccinea</i> Lesson, 1829 | 63 |
| Resumo | 63 |
| ABSTRACT | 64 |
| 2.1 Introdução | 65 |
| 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS | 68 |
| 2.2.1 Escolha e coleta dos organismos | 68 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 2.2.2 | Peso e volume dos organismos..... | 68 |
| 2.2.3 | Preparação dos extratos..... | 69 |
| 2.2.3 | Experimentos de laboratório..... | 70 |
| 2.2.3.1 | <i>Tubastraea coccinea</i> Lesson 1829..... | 70 |
| 2.2.3.2 | Preparação dos testes de assentamento e toxicidade..... | 71 |
| | Análise Estatística..... | 72 |
| 2.3 | RESULTADOS..... | 73 |
| 2.3.1 | Bioensaio com extrato bruto de <i>Darwinella</i> sp..... | 73 |
| 2.3.2 | Bioensaio com extrato bruto de <i>Palythoa caribaeorum</i> | 75 |
| 2.3.3 | Bioensaio com extrato bruto de <i>T. tagusensis</i> | 78 |
| 2.4 | DISCUSSÃO..... | 80 |
| 2.5 | REFERÊNCIAS..... | 83 |
| CAPÍTULO 3: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO DE | | |
| | <i>Tubastraea coccinea</i> Lesson, 1829..... | 87 |
| | Resumo..... | 87 |
| | Abstract..... | 88 |
| 3.1 | INTRODUÇÃO..... | 89 |
| 3.2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 91 |
| 3.2.1 | Coleta e triagem dos organismos..... | 91 |
| 3.2.2 | Peso e volume dos organismos..... | 91 |
| 3.2.3 | Preparação dos extratos..... | 91 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.4 Bioensaio da atividade antibacteriana do extrato bruto de <i>T. coccinea</i> | 92 |
| 3.2.4.1 Organismos testados | 92 |
| 3.2.4.2 Preparação do meio de cultura e Crescimento bacteriano | 92 |
| 3.2.5 Teste de sensibilidade em discos | 93 |
| 3.3 RESULTADOS | 93 |
| 3.3.1 Teste de sensibilidade em discos | 93 |
| 3.4 DISCUSSÃO | 95 |
| 3.5 REFERÊNCIAS | 98 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 103 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Colônias do coral invasor *Tubastraea coccinea* no costão rochoso da Ilha dos porcos em Arraial do Cabo (RJ).....21
- Figura 2:** Mapa da distribuição do coral invasor *Tubastraea coccinea* na costa brasileira.....23
- Figura 3:** Mapa da Baía de Arraial do Cabo e sua localização no Brasil e no estado do Rio de Janeiro (áreas marcadas em preto). O lado direito indica o local de coleta das colônias (Ilha dos Porcos).....38
- Figura 4:** Relação entre peso dos extratos e volume de *Tubastraea coccinea*.....40
- Figura 5:** Indivíduo adulto do cirripédio *Amphibalanus amphitrite* (A); Organismos adultos de *A. amphitrite* mantidos em recipientes de plástico com aeração no laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos do IEAPM (B); Larva do cirripédio no estágio de náuplio (C).....42
- Figura 6:** Indivíduo adulto do briozoário *Bugula neritina* (A); Colônias colocadas em um béquer de cinco litros para facilitar a coleta das larvas (B).....43
- Figura 7:** Colônia do coral invasor *T. coccinea* no costão rochoso da Ilha dos Porcos em Arraial do Cabo (RJ) (A); Colônias mantidas em aquários no Laboratório de Recursos Marinhos (LAREMAR).....44
- Figura 8:** Larvas cipris de *A. amphitrite*: natantes (A); assentada e metamorfoseada (B); mortas (C).....45
- Figura 9:** Larvas do briozoário *B. neritina*: natante (A); assentada e metamorfoseada (B); mortas (C).....45
- Figura 10:** Larvas do coral invasor *T. coccinea*: natante (A); assentada e metamorfoseada (B); morta (C).....46
- Figura 11:** Média e desvio padrão da mortalidade das larvas do cirripédio *A. amphitrite* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente), em um período de 24

horas.....48

Figura 12: Média e intervalo de confiança do assentamento das larvas do cirripédio *A. amphitrite* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T.coccinea* em três concentrações (0,01%, 0,1%,1%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 10 dias.....50

Figura 13: Média e desvio padrão da mortalidade das larvas do briozoário *B. neritina* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas.....51

Figura 14: Média e intervalo de confiança do assentamento das larvas do briozoário *B. neritina* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T.coccinea* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) nas primeiras 6 horas e após 24 horas.....52

Figura 15: Média e desvio padrão da mortalidade das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas.....53

Figura 16: Média e intervalo de confiança do assentamento das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T.coccinea* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) nas primeiras 6 horas e após 24 horas.....55

Figura 17: Colônias de *T. coccinea* próximas à esponja *Darwinella sp.* (A); ao zoantídeo *P. caribaeorum* (B); e ao coral *T. tagusensis* (C). As colônias dos potenciais competidores estão sinalizadas pelas setas em vermelho.....69

Figura 18: Gráficos dos potenciais competidores demonstrando a relação entre peso dos extratos e volume das colônias. Relação entre peso dos extratos e volume da esponja *Darwinella sp.* (A); Relação entre peso dos extratos e volume do zoantídeo *P. caribaeorum* (B); Relação entre peso dos extratos e volume do coral invasor *T. tagusensis* (C).....71

Figura 19: Colônia do coral invasor *Tubastraea coccinea* no costão rochoso da Ilha dos Porcos em Arraial do Cabo (RJ).....72

Figura 20: Média e desvio padrão correspondente a mortalidade das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto da esponja *Darwinella sp.* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas.....75

Figura 21: Média e intervalo de confiança correspondente ao assentamento das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto da esponja *Darwinella sp.* em três concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 10 dias.....77

Figura 22: Média e desvio padrão correspondente a mortalidade das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do zoantídeo *P. caribaeorum* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas.....78

Figura 23: Média e intervalo de confiança correspondente ao assentamento das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do zoantídeo *P. caribaeorum.* em quatro concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 10 dias.....79

Figura 24: Média e desvio padrão correspondente a mortalidade das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. tagusensis* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas.....80

Figura 25: Média e intervalo de confiança correspondente ao assentamento das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. tagusensis.* em três concentrações (0,01%, 0,1%,1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 10 dias.....82

Figura 26: Atividade antibacteriana: crescimento de bactérias marinhas expostas extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* na concentração natural, ao controle posit com antibiótico e ao controle negativo com os solventes DCM: metanol (1:1) medição da zona de inibição em milímetros com o auxílio de uma régua de 30 cm96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Extrato bruto dos potenciais competidores do coral invasor *T. coccinea* em diferentes concentrações.....73

Tabela 2: Média e desvio padrão do crescimento de bactérias marinhas expostas a diferentes tratamentos: extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* na concentração natural, controle negativo representado pelos solventes diclorometano:metanol (1:1) e o controle positivo representado pelo antibiótico rifampicina.....98

LISTA DE ABREVIACOES

ANOVA – Análise de Variância

CCD – Cromatografia em camada delgada

DCM – Diclorometano

IEAPM – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

IMO – Organização Marítima Internacional

LAREMAR – Laboratório de Recursos Marinhos

LB – Luria-Bertani

OD – Densidade tica

TBT – Tributilestanho

TPT – Trifenilestanho

INTRODUÇÃO GERAL

Bioincrustação Marinha e Bioinvasão

A bioincrustação marinha é o fenômeno que ocorre a colonização de organismos sésseis em substratos naturais e artificiais submersos. Este fenômeno é caracterizado por dois processos: o primeiro é a formação do biofilme, que facilita a proliferação de micro-organismos e o segundo é o assentamento e crescimento de macro-organismos tais como mexilhões, macroalgas, cirripédios e briozoários (Cao *et al.* 2011).

A aplicação de tintas sobre superfícies expostas à água como cascos de navios, por exemplo, é o método de proteção mais aplicado para o controle da bioincrustação (Chambers *et al.* 2014). No entanto, muitos biocidas testados foram considerados uma ameaça para o ambiente marinho, já que são altamente tóxicos para organismos não-alvo (Castro *et al.* 2011; Guardiola *et al.* 2012). O desenvolvimento de tintas a base de produtos naturais, parece ser uma alternativa mais promissora para minimizar a bioincrustação e os impactos gerados no ambiente marinho.

Outra consequência gerada pela bioincrustação é a introdução de espécies exóticas em ambientes onde não havia registros anteriores (Souza *et al.* 2009; Dafforn *et al.* 2011). Os impactos econômicos e sociais provocados pelas espécies invasoras marinhas são a disseminação de doenças humanas, e a diminuição na produção das atividades dependentes do ambiente marinho e dos seus recursos como a pesca, aquicultura e o turismo. Esses impactos além de reduzir a taxa de emprego também interferem na qualidade e bem-estar da população da localidade afetada (Kotta *et al.* 2001; Pimentel *et al.* 2000; Bax *et al.* 2003, Cohen, 2005).

A bioinvasão marinha caracteriza-se pela entrada, estabelecimento e dispersão de uma espécie em um novo ambiente, podendo ocorrer de forma natural e de forma intencional ou acidental, ocasionado pelas atividades humanas (Carlton, 1987; Bax, 2003).

Apenas uma pequena fração das espécies exóticas se torna invasora e o seu sucesso em novos habitats dependerá de alguns fatores, tais como: características

biológicas das espécies (como tolerância fisiológica e modo de reprodução, por exemplo); as condições do meio ambiente onde foram introduzidas; o clima; o número suficiente de indivíduos introduzidos para estabelecimento de uma população; interações ecológicas com as espécies nativas e alimentação disponível. São esses os principais fatores que determinaram o nível de impacto que será provocado pela espécie invasora no novo ambiente (Lages *et al.* 2015).

Os principais mecanismos nos quais uma espécie é transportada e introduzida em novos ambientes é chamado de vetor. Existem diversos tipos de vetores que operam em diferentes escalas espaciais e temporais. No ambiente marinho, a dispersão das espécies exóticas tem como principais vetores a água de lastro (Carlton & Geller, 1993; Bax, 2003), a incrustação em estruturas submersas móveis, tais como cascos de navios e plataformas de petróleo (Gollasch, 2002; Ferreira *et al.* 2006) e atividades de aquicultura (Bax, 2003).

O sucesso na colonização das espécies em uma nova localidade pode se tornar um problema em larga escala, gerando impacto na diversidade biológica nativa (Cohen & Carlton 1998; Kotta *et al.* 2001; Bax, 2003;); redução da população de espécies nativas, através de interações como competição (já que aumenta a competição por recursos vitais como espaço, alimento, luz, por exemplo), predação e doenças (Ruiz *et al.* 2000; Cohen, 2005); destruição de estruturas marítimas (Cohen, 2005, Anil *et al.* 2002) e reestruturação da cadeia alimentar (Anil *et al.* 2002).

Nos Estados Unidos, a introdução de duas espécies de peixe foi capaz de provocar alterações no ecossistema invadido. A carpa *Ctenopharyngodon idella* foi responsável pela redução da flora nativa e a carpa *Cyprinus carpio* aumentou a turbidez da água, o que levou a extinção de algumas espécies de peixes nativos (Pimentel *et al.* 2000). No Mediterrâneo o coral invasor *Oculina patagônica*, considerado uma espécie oportunista dominante, cresce sobre estruturas calcárias de vários organismos, tais como serpulídeos, vermetídeos e cracas. Além disso, essa espécie foi responsável pela eliminação de algas e outros organismos de corpo mole (Sartoretto, *et al.* 2008).

Em contraste com os exemplos de impactos negativos mencionados, a introdução de algumas espécies invasoras também pode gerar impactos positivos para uma determinada espécie ou grupos específicos de organismos. Experimentos

de campo com o poliqueta *Marenzelleria cf. vridis* no norte do mar Báltico mostrou que esta espécie foi capaz de aumentar a produção bentônica de clorofila a (Kotta *et al.* 2001). Além disso, um estudo anterior realizado em Arraial do Cabo (RJ) mostrou indícios de que a entrada do coral invasor *Tubastraea coccinea* pode estar causando o aumento da riqueza e da biodiversidade no início do estágio sucessional em áreas em que o coral invasor é considerado abundante (Araújo, 2016).

Ecologia química marinha

A Ecologia Química Marinha é uma ciência relativamente nova, de caráter interdisciplinar, com o intuito de ampliar o conhecimento sobre mediações químicas nos diversos níveis de interação entre os organismos marinhos. Teve início no final da década de 80 após colaboração entre químicos e ecólogos permitindo o desenvolvimento interdisciplinar desta área, contribuindo para descoberta, caracterização e catalogação de novas substâncias químicas encontradas na natureza (Maschek & Baker, 2008). Além disso, está ampliando o conhecimento sobre funções ecológicas dos metabólitos secundários de organismos marinhos e sua evolução (Pereira, 2009; Lages *et al.* 2012; Becerro *et al.* 1997).

A química é fundamental para todas as formas de vida, sendo utilizada em múltiplas funções. Os organismos utilizam um conjunto de vias biosintéticas para produzir produtos químicos essenciais que permitem sua sobrevivência, fornecimento de energia, capacidade reprodutiva, aumento da sua complexidade e diversidade no processo evolutivo. Esses produtos são conhecidos como metabólitos primários ou principais e incluem, por exemplo, os lipídeos, proteínas e o DNA (Harper *et al.* 2001; Maschek & Baker, 2008; Teixeira, 2009).

Muitos organismos produzem substâncias químicas que não estão envolvidas diretamente no crescimento, desenvolvimento ou reprodução (Lages *et al.* 2015). Elas são chamadas de metabólitos secundários ou produtos naturais e representam respostas ecológicas dos organismos com o ambiente em que vivem. Os metabólitos secundários marinhos desempenham vários papéis ecológicos, entre eles estão à defesa contra predadores, competidores, organismos incrustantes e patógenos (Clare, 1996; Tsoukatou *et al.* 2007; Pereira & Gama, 2008; Lages *et al.* 2015).

Além disso, podem desempenhar papel na reprodução já que sinais químicos específicos podem promover ou impedir o estabelecimento das larvas marinhas (Hay, 1996; Maida, 1995). Em ambientes marinhos, os organismos competem por espaço, luz e nutrientes, desta forma, os mesmos têm desenvolvido mecanismos de defesa para aumentar suas chances de sobrevivência (Lages *et al.* 2015; Maschek & Baker, 2008).

Terpenos, esteróides, ácidos graxos e alcalóides são alguns dos metabólitos secundários com propriedades ecológicas (Hay & Fenical, 1996; Lages *et al.* 2015) e são encontrados em muitos organismos marinhos como algas (Pereira & Gama, 2008), esponjas (Becerro *et al.* 1997; Batista *et al.* 2014), ascídias (Tarjuelo *et al.* 2002) e octocorais (Aceret *et al.* 1995; Lages, *et al.* 2006).

Os cnidários pertencentes à ordem Alcyonacea, que inclui a maioria dos octocorais, produzem uma gama de metabólitos secundários que desempenham diversas funções ecológicas (Coll 1982; Sammarco *et al.* 1983, Sammarco *et al.* 1987; Sammarco & Coll, 1992; Lages, 2006; Altvater, 2014). Um trabalho realizado por Lages e colaboradores (2006) serve como exemplo para demonstrar as funções ecológicas desempenhadas por substâncias químicas produzidas por uma espécie de coral pertencente a este grupo. Em experimentos de campo com extrato bruto do octocoral exótico *Chromonephthea braziliensis*, em Arraial do Cabo, confirmou a eficiência de substâncias bioativas produzidas pelo coral contra predação de peixes generalistas e competição por espaço.

O coral invasor

O coral invasor *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 (Scleractinia: Dendrophyllidae) (Figura 1) é considerado um dos primeiros corais escleractíneos invasores do Atlântico Sul, que provavelmente chegou ao Brasil incrustado em plataforma de petróleo no final de 1980. Espécie originária do Pacífico é ahermatípica (não construtora de recifes) e azooxantelada, sendo, portanto, independente da luz solar para o seu desenvolvimento (Cairns, 1994; Castro & Pires, 2001; Paula & Creed, 2005). Este coral é facilmente reconhecido pela sua coloração laranja e vermelha sendo chamado de coral sol (*sun coral*) e coral tubo (*cup coral*) (Cairns, 2000; Paula & Creed, 2004; Paula, 2007). *Tubastraea coccinea* é uma

espécie hermafrodita e pode se reproduzir tanto assexuadamente como sexuadamente (fertilização interna e desenvolvimento larvar interno) (Ayre & Resing, 1986; Richmond 1997; Paula *et al.* 2014)). Um estudo realizado na Baía de Ilha Grande (RJ) por Paula e colaboradores (2014) demonstrou que a reprodução desta espécie é bastante intensa nos meses de novembro, janeiro e fevereiro.



Figura 1: Colônias do coral invasor *Tubastraea coccinea* no costão rochoso da Ilha dos Porcos em Arraial do Cabo (RJ).

Classificação taxonômica:

Filo: Cnidaria Hatschek, 1888

Classe: Anthozoa Ehrenberg, 1831

Subclasse: Zoantharia (= Hexacorallia) Hyman, 1940

Ordem: Scleractinia Bourne, 1900

Subordem: Dendrophylliina Vaughan and Wells, 1943

Família: Dendrophylliidae Gray, 1847

Gênero: *Tubastraea* Lesson, 1829

Espécie: *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829

A espécie habita diferentes profundidades (Paula & Creed, 2005; Mizrahi 2008; Mantellato, 2012; Mizrahi *et al.* 2014; Miranda *et al.* 2016), mas é encontrada em maior abundância em águas rasas (ambiente considerado estressante, em virtude das mudanças bruscas dos fatores ambientais e biológicos) de costões rochosos

protegidos e possui grande tolerância a temperatura e dessecação (Paula & Creed, 2004; Paula & Creed, 2005).

Devido sua rápida taxa de expansão e crescente abundância em localidades recém-colonizadas, *Tubastraea* é considerada uma espécie bem sucedida e também oportunista (Cairns, 2000; Paula & Creed, 2005). Este coral tem sido encontrado frequentemente em cascos de navios (Cairns, 2000) e plataformas de petróleo (Ferreira, 2003) e já é considerada invasora na costa brasileira, inclusive em áreas de proteção ambiental (Paula & Creed, 2004; Silva *et al.* 2011). Esta espécie é cosmopolita e está em expansão na costa brasileira (Figura 2) podendo ser encontrada nos estados do Rio de Janeiro (Ferreira, 2003; Creed *et al.* 2008; Silva *et al.* 2011), Bahia (Sampaio *et al.* 2012; Miranda *et al.* 2012), Santa Catarina (Capel, 2012) e São Paulo (Mantellato, 2012). Estudos realizados por Paula e Creed (2005) mostraram que esta espécie expandiu sua taxa de colonização em Ilha Grande (RJ), tornando-se bem estabelecida e sendo considerada dominante nos costões rochosos desta localidade. Já em Arraial do cabo, norte do estado do Rio de Janeiro, colônias da espécie *Tubastraea coccinea* foram registradas pela primeira vez no final da década de 1990, sendo encontradas apenas seis colônias de 3 a 5 cm (Ferreira, 2003). Hoje encontramos grandes “manchas” de coral-sol nos costões rochosos de alguns locais, como Ilha dos Porcos, Anequim e Saco dos Cadeiros (Mizrahi, 2012; Araújo, 2016).



Figura 2: Mapa da distribuição do coral invasor *Tubastraea coccinea* na costa brasileira (Ferreira, 2003; Creed *et al.* 2008; Silva *et al.* 2011; Sampaio *et al.* 2012; Miranda *et al.* 2012; Capel, 2012; Mantellato, 2012).

O que pode estar contribuindo para a introdução, facilidade de colonização e expansão desta espécie é a produção de metabólitos secundários (Silva *et al.* 2014). O coral invasor *T. coccinea* é considerado competitivamente dominante, já que substâncias químicas produzidas por este coral foram capazes de provocar necrose em colônias do coral nativo *Mussismilia hispida* (Creed, 2006, Santos, 2013) e apresentou atividade contra peixes generalistas e organismos incrustantes (Lages *et al.* 2010a). Lages (2012) mostrou em experimentos de campo que espécies do gênero *Tubastraea* produzem diversos metabólitos secundários que estão envolvidos na defesa contra outros organismos marinhos. Além disso, um composto denominado de Tubastrina é encontrado em espécies do gênero *Tubastraea* e em outros invertebrados marinhos, apresenta diversas atividades biológicas, tais como atividade antiviral, anticancer, antimicrobiana e anti-inflamatória, sendo portanto, um composto muito importante para aumentar as chances de sobrevivência desses

invertebrados no ambiente marinho (Sakai & Higa, 1987; Barenbrock & Kock, 2005; Pearce *et al.* 2008; Lorentzen *et al.* 2015).

Tendo em vista as questões abordadas, o presente trabalho verificou o efeito químico do extrato bruto da espécie invasora *Tubastraea coccinea* em larvas de invertebrados marinhos e em bactérias marinhas. Além disso, verificou o efeito químico do extrato bruto de potenciais competidores nas larvas de *T. coccinea*. O trabalho foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo, intitulado “Avaliação da toxicidade e da atividade anti-incrustante do extrato bruto do coral invasor *Tubastraea coccinea*”, que teve como objetivo avaliar a toxicidade e o assentamento das larvas de invertebrados marinhos (*Amphibalanus amphitrite*, *Bugula neritina*) e de coespecíficos quando expostas ao extrato bruto do coral invasor. O segundo capítulo, intitulado: “Avaliação do efeito químico do extrato bruto de potenciais competidores nas larvas do coral invasor *T. coccinea*”, visa avaliar a mortalidade e o assentamento das larvas de *T. coccinea* expostas aos extratos brutos de três potenciais competidores, o zoantídeo *Palythoa caribeorum*, a esponja exótica *Darwinella sp.* e o coral invasor *Tubastraea tagusensis*. “O terceiro capítulo, intitulado “Atividade antibacteriana do extrato bruto de *Tubastraea coccinea*”, tem como objetivo verificar o crescimento de bactérias marinhas patogênicas (*Vibrio comunnis*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio corallilyticus*), corrosiva (*Shewanella putrefaciens*) e incrustantes (*Vibrio estuarians*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Polibacter irgensis* e *Pseudomonas fluorescens*) expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* sobre as larvas de organismos marinhos incrustantes e no crescimento de bactérias marinhas, assim como avaliar o efeito do extrato bruto de potenciais competidores sobre as larvas de *T.coccinea*.

Objetivos específicos

- Verificar o potencial anti-incrustante e a toxicidade aguda do extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* sobre as larvas de organismos incrustantes e larvas de coespecíficos;
- Verificar o efeito no assentamento e a toxicidade aguda do extrato bruto de potenciais competidores sobre larvas do coral invasor *T. coccinea*;
- Avaliar o crescimento de bactérias marinhas expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea*.

REFERÊNCIAS

ACERET, T. L.; SAMMARCO, P. W.; COLL, J. C. Toxic effects of alcyonacean diterpenes on scleractinian corals. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 188, p. 63-78, 1995.

ALTVATER, L. Potencial invasor de *Stragulum bicolor* Van Ofwegen & Haddad, 2011(Cnidaria, Octocorallia, Alcyonacea. Tese de Doutorado (Biologia Marinha), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 125 p. 2014.

ARAÚJO, P. R. Desenvolvimento da comunidade bentônica invadida pelos corais do gênero *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) em Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação de Mestrado (Ecologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 48p. 2016.

ANIL, A. C.; VENKAT, K.; SAWANT, S. S, DILEEPKUMAR, M. DHARGALKAR, V. K.; RAMAIAH, N.; HARKANTRA, S. N.; ANSARI, Z. A. Marine bioinvasion: Concern for ecology and shipping. *Current Science*, v. 83, p. 214 – 218, 2002.

AYRE, D. J.; RESING, J. M. Sexual and asexual production of planulae in reef coral. *Marine Biology*, v. 90, p. 187-190, 1986.

BATISTA, D.; CARVALHO, A. P.; COSTA, R.; COUTINHO, R.; DOBRETSSOV, S. Extracts of macroalgae from the Brazilian coast inhibit bacterial quorum sensing. *Botanica Marina*, v. 57, p. 441–447. 2014.

BAX, N.; WILLIAMSON, A.; AGUERO M.; GONZALEZ, E.; GEEVES, W. Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity. *Marine Policy*, v. 27, p. 313–323, 2003.

BARENBRÖCK, J. S.; KOCK, M. Screening enzyme-inhibitory activity in several ascidian species from Orkney Islands using protein tyrosine kinase (PTK) bioassay-guided fractionation. *Journal of Biotechnology*, v. 117, p. 225-232, 2005.

BECERRO, M. A.; URIZ, M. J.; TURON, X. Chemically-mediated interactions in benthic organisms: the chemical ecology of *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida). *Hydrobiologia*, v. 356, p. 77-89, 1997.

CAO, S.; WAHG, J. D.; CHEN, H. S; CHEN, D. R. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin*, v. 56, n. 7, p. 598-612. 2011.

CAIRNS, S.D. Scleractinia of the temperate North Pacific. *Smithson. Contr. Zool.*,v. 557: 150 pp, 1994.

CAIRNS, S. D. Revision of the Shallow-water Azooxanthellate Scleractinia of the Western Atlantic. *Studies of the Natural history of the Caribbean Region*, v. 75, p. 1 – 231, 2000.

CAPEL, K. C. C. Scleractinia (Cnidaria: Anthozoa) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo (SC), com ênfase na estrutura espaço-temporal da formação mais meridional de corais recifais no Oceano Atlântico. Dissertação de Mestrado (Ecologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 111p. 2012.

CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático, *Quimica Nova*, v. 34, p. 1021-1031. 2011.

CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. BRAZILIAN CORAL REEFS: WHAT WE ALREADY KNOW AND WHAT IS STILL MISSING. *Bulletin of Marine Science*, v. 69, p. 357–371, 2001.

CARLTON, J. T. Patterns of transoceanic marine biological invasions in the pacific ocean. *Bulletin of marine science*, v. 41, p. 452-465, 1987.

CARLTON, J. T.; GELLER, J. B. Ecological roulette: The global transport of nonindigenous marine organisms. *Science*, v. 261, p. 78 – 82, 1993.

COHEN, A. N. Overview of 2004/05 Rapid Assessment Shore and Channel Surveys for Exotic Species in San Francisco Bay. *Overview of Rapid Assessment Surveys*, p. 1 – 7, 2005.

COHEN, A, N.; CARLTON, J. T. Accelerating Invasion Rate in a Highly Invaded Estuary. *Science*, v. 279 , p. 555 – 558, 1988.

COLL, J. C.; BARREL, S. L.; SAMMARCO, P. W.; WILLIAMS, W. T.; BAKUS, G. J. Chemical Defences in Soft Corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier

Reef: A Study of Comparative Toxicities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 8, p. 271-278, 1982.

CHAMBERS, L. D.; WHARTON, J. A.; WOODA, R. J. K.; WALSHA, F. C.; STOKESA, K. R. Techniques for the measurement of natural product incorporation into an antifouling coating. *Progress in Organic Coatings*, v. 77, p. 473-484, 2014.

CLARE, A. S. Marine natural product antifoulants: Status and potential. *Biofouling*, v. 9, p. 211-229, 1996.

CREED, J. C.; OLIVEIRA, A. E. S.; PAULA, A. F. de. Cnidaria, Scleractinia, *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 and *Tubastraea tagusensis* Wells, 1982: Distribution extension. *Check List*, v. 4, p. 297-300, 2008.

DAFFORN, K. A.; LEWIS, J. A.; JOHNSTON, E. L. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 453-465, 2011.

FERREIRA, C. E. F. Non-indigenous corals at marginal sites. *Coral Reefs*, v. 22, p. 498, 2003.

FERREIRA, C. E. F.; GONÇALVES, J. E. A.; COUTINHO, R. Ship Hulls and Oil Platforms as Potential Vectors to Marine Species Introduction. *Journal of Coastal Research*, v. 39, p. 1340 - 1345, 2006.

GOLLASCH, S. The Importance of Ship Hull Fouling as a Vector of Species Introductions into the North Sea. *Biofouling*, v. 18, p. 105-121, 2002.

GUARDIOLA, F. A.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Risks of Using Antifouling Biocides in Aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 1541-1560, 2012.

HARPER, M. K.; BUGNI, T. S.; COPP, B. R.; JAMES, R. D., LINDASAY B. S.; RICHARDSON, A. D.; SCHNABEL, P. C.; TASDEMIR, D.; VANWAGONER, R.M.; VERBITSKI, S. M.; IRELAND, C. M. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In: McClintock JB, Baker BJ, Marine chemical ecology. p. 267-300, 2001.

HAY, M. E. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 200, p. 103-134, 1996.

HAY, M. E.; FENICAL, W. Chemical Ecology and marine biodiversity: Insights and products from the sea. *Oceanography*, v. 9, p. 10-20, 1996.

KOTTA, J.; ORAV, H.; SANDBERGE-KILPI, E. Ecological consequence of the introduction of the polychaete *Marenzelleria* cf. *viridis* into a shallow-water biotope of the northern Baltic Sea. *Journal of sea research*, v. 46, p.273 – 280, 2001.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; FERREIRA, C. E. L.; PEREIRA, R. C. Chemical defense of an exotic coral as invasion strategy. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 328, p. 127– 135, 2006.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; PINTOS, A. C.; CREED, J.C. Chemical defenses against generalist fish predators and fouling organisms in two invasive ahermatypic corals in the genus *Tubastraea*. *Marine Ecology*, v. 31, p. 473 - 482, 2010 a.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. Proximity to competitors changes secondary metabolites of nonindigenous cup corals, *Tubastraea* spp. in the southwest Atlantic. *Mar Biol*, v. 159, p. 1551–1559, 2012.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; CREED, J. C. A Review of the Ecological Role of Chemical Defenses in Facilitating Biological Invasion by Marine Benthic Organisms. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 46, p. 1-26, 2015.

MAIDA, M.; SAMMARCO, P. W.; COLL, J. Effects of soft corals on scleractinian coral recruitment. I: Directional allelopathy and inhibition of settlement. *Marine Ecology Progress Series*, v. 121, 191 – 202, 1995..

LORENTZEN, M.; BAYER, A.; SYDNES, M. O.; JØRGENSEN, K. B. Total synthesis of tubastrine and 3-dehydroxy tubastrine by microwave-assisted cross-coupling reactions. *Tetrahedron*, v. 71, p. 8278-8284, 2015.

MANTELLATO, M. C. Distribuição e abundância do coral invasor *Tubastraea* spp. 2012. Dissertação de Mestrado (Ecologia e Evolução), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

MASCHEK, J. A.; BAKER, B. J. The Chemistry of Algal Secondary Metabolism. Capítulo I. In: Algal Chemical Ecology, 2008.

MIRANDA, R. J.; CRUZ, I. C. S.; BARROS, F. Effects of the alien coral *Tubastraea tagusensis* on native coral assemblages in a southwestern Atlantic coral reef. *Mar Biol.*, v. 163, p. 45, 2016.

MIZHARI, D. Influência da temperatura e luminosidade na distribuição da espécie invasora *Tubastraea coccinea* na região de ressurgência de Arraial do Cabo – RJ. Dissertação de Mestrado (Ecologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MIZHARI, D. 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 (Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, São Paulo, 2014.

PAULA, A. F. Biologia reprodutiva, crescimento e competição dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) com espécies nativas. 2007. Tese de Doutorado (Ciências Biológicas - Zoologia), Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

PAULA, A. F. de; CREED, J. C. Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: A case of accidental introduction. *Bulletin of Marine Science*, v. 74, p. 175–183, 2004.

PAULA, A. F.; CREED, J. C. Spatial distribution and abundance of nonindigenous coral genus *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) around Ilha Grande, Brazil. *Braz. J. Biol.*, v. 65, p. 661-673, 2005.

PAULA, A. F. de; PIRES, D. de O.; CREED, J. C. Reproductive strategies of two invasive Sun corals (*Tubastraea* spp.) in the southwestern Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 93, p. 481–492, 2014.

PEARCE, A. N.; CHIA, E. W.; BERRIDGE, M. V.; MAAS, E. W.; PAGE, M. J.; HARPER, J. L. WEBB, V. L.; COPP, B. R. Orthidines A–E, tubastrine, 3,4-dimethoxyphenethyl-b-guanidine, and 1,14-sperminedihomovanillamide: potential anti-inflammatory alkaloids isolated from the New Zealand ascidian *Aplidium orthium* that act as inhibitors of neutrophil respiratory burst. *Tetrahedron*, v. 64, 5745 – 5755, 2008.

PEREIRA, R. C.; GAMA, B. A. P. da. Macroalgal Chemical Defenses and Their Roles in Structuring Tropical Marine Communities. *Algal Chemical Ecology*, p. 25-55, 2008.

PIMENTEL, D.; LACH, L.; ZUNGA, R.; MORRISON, D. Environmental and Economic Costs of Nonindigenous Species in the United States. *BioScience*, v. 50, p. 53 - 65 , 2000.

RUIZ, G. M.; RAWLINGS, T. K.; DOBBS, F. C.; DRAKE, L. A.; MULLADY, T.; HUG, A.; COLWELL, R. R. Global spread of microorganisms by ships Ballast water discharged from vessels harbours a cocktail of potential pathogens. *Nature*, v. 408, p. 49 – 50, 2000.

SAKAI, R.; HIGA, T. Tubastrine, a New Guanidinostyrene from the Coral *Tubastraea áurea*. *Chemistry Letters*, p. 127-128, 1987.

SAMMARCO, P. W.; COLL, J. C.; LA BARRE, S.; WILLIS, B. Competitive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia): Allelopathic effects on selected scleractinian corals. *Coral Reefs*, v. 1, p. 173 – 178, 1983.

SAMMARCO, P. W.; LA BARRE, S.; COLL, J. C. Defensive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef. *Oecologia*, v. 74, p. 93 – 101, 1987.

SAMMARCO, P. W.; COLL, J. C. Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 88, p. 93 – 104, 1992.

SAMPAIO, C. L. S.; MIRANDA, R. J.; MAIA-NOGUEIRA, R.; ANCHIETA, J.; NUNES, C. C. New occurrences of the nonindigenous orange cup corals *Tubastraea coccinea* and *T. tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) in Southwestern Atlantic. *Check List*. v. 8, p. 528-530, 2012.

SANTOS, L. A. H. dos; RIBEIRO, F. V.; CREED, J. C. Antagonism between invasive pest corals *Tubastraea spp.* And the native reef-builder *Mussismilia hispida* in the southwest Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 449, p. 69-76, 2013.

SARTORETTO, S.; HARMELIN, JEAN-GEORGES; BACHET, F.; BEJAOU, N.; LEBRUN, O.; ZIBROWIUS, H. The alien coral *Oculina patagonica* De Angelis, 1908 (Cnidaria, Scleractinia) in Algeria and Tunisia. *Aquatic Invasions*, v. 3, p. 173-180, 2008.

SILVA, A. G.; LIMA, R. P., GOMES, A. N.; FLEURY, B. G; CREED, J. C. Expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* into the Tamoiós Ecological Station Marine Protected Area, Brazil. *Aquatic Invasions*, v. 6, p. 105 – 110, 2011.

SOUZA, R. C. C. L; CALAZANS, S. H.; SILVA, E. P. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. *Ciência e Cultura*, v. 61, p. 35-41, 2009.

TARJEULO, I.; LOPEZ – LEGENTIL, S.; CODINA, M.; TURON, X. Defence mechanisms of adults and larvae of colonial ascidians: patterns of palatability and toxicity. v. 235, p. 103–115, 2002.

TSOUKATOU, M.; MARECHAL, J. P.; HELLIO, C.; NOVAKOVIC, I.; TUFEGDZIC, S.; SLADIC, D.; GASIC, M. J.; CLARE, A. S.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Evaluation of the Activity of the Sponge Metabolites Avarol and Avarone and their Synthetic Derivatives Against Fouling Micro- and Macroorganisms. *Molecules*, v. 12, p. 1022-1034, 2007.

**Capítulo 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INCRUSTANTE E
TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO BRUTO DO CORAL INVASOR
Tubastraea coccinea Lesson, 1829**

RESUMO

O coral gênero *Tubastraea*, nativo do Indo-Pacífico, chegou ao Brasil provevalmente no final da década de 1980. *Tubastraea coccinea* é um dos primeiros corais escleractíneos invasores do Atlântico sul. Estudos prévios demonstraram que esta espécie produz compostos bioativos com múltiplas propriedades, tais como, defesa contra predadores, competidores e organismos incrustantes. Estes compostos podem conferir a *T. coccinea* uma vantagem sobre as espécies nativas, facilitando seu processo de introdução, expansão e colonização em novos ambientes. O objetivo do presente estudo foi verificar a toxicidade aguda e a potencial anti-incrustante do extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* em larvas de *Amphibalanus amphitrite*, *Bugula neritina* e coespecíficos. As colônias de *T. coccinea* foram coletas no costão da Ilha dos porcos em Arraial do Cabo (RJ), congeladas, liofilizadas e embebidas em diclorometano e metanol (1:1) para obtenção do extrato bruto. Para cada bioensaio o extrato bruto em diferentes concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100% da concentração natural) foi incorporado a béqueres de vidro com capacidade para 10 ml. O controle consistiu na incorporação dos solventes DCM:Metanol (1:1) na mesma proporção utilizada no extrato. O controle nulo foi composto por água do mar filtrada. A cada um dos béqueres foram adicionados 8 ml de água do mar filtrada. O assentamento larvar para *A. amphitrite* foi registrado diariamente durante dez dias; de hora em hora e após 24h para *B. neritina* e diariamente durante dez dias para *T. coccinea*. Os resultados mostraram que o extrato bruto do coral apresentou potencial como anti-incrustante, já que foi tóxico nas maiores concentrações (1%, 10% and 100%) para as larvas de *A. Amphitrite* e *T. coccinea* e em todas as concentrações para as larvas de *B. neritina*. No entanto, não apresentou nenhum efeito sobre o assentamento de *A. amphitrite* e *B. neritina* nas menores concentrações (0,01% e 0,1%) e induziu o assentamento de larvas coespecíficas na menor concentração. Apenas a concentração de 0,1% inibiu o assentamento de larvas coespecíficas e não foi tóxica para as mesmas.

ABSTRACT

The corals from the genus *Tubastraea*, native from the Indo-Pacific, arrived in Brazil probably in the late 1980's. *Tubastraea coccinea* is one of the first scleractinian corals to have invaded the South Atlantic. Previous studies have shown that this species produces bioactive compounds with multiple properties, such as defense against generalist fish, competitors and antifouling activity. Thus, the production of secondary metabolites may facilitate the successful introduction, colonization and expansion of this species in new environments. In this study, the acute toxicity and the antifouling activity of the crude extract of *T. coccinea* on larvae of conspecifics, the barnacle *Amphibalanus amphitrite*, and the bryozoan *Bugula neritina* were investigated. Colonies of *T. coccinea* were collected from Porcos Island, in Arraial do Cabo (Rio de Janeiro, Brazil), frozen, lyophilized and soaked in dichloromethane and methanol (1:1) to obtain the crude extract. To perform the bioassays, the crude extract in different concentrations (100%, 10%, 1%, 0.1% and 0.01% from natural concentration) was added to 10ml beakers. The control consisted in solvents DCM:Metanol (1:1) at the same volume used in the treatments with the crude extract. The null control consisted only in filtered seawater. To each beaker were added 8 ml of filtered sea water and 8-10 larvae of the test organism. Larval settlement was registered daily over ten days to *A. amphitrite*, hourly for six hours and after 24h to *B. neritina* and daily over ten days to *T. coccinea*. The results showed that the crude extract of the coral was toxic to *A. amphitrite* and *T. coccinea* larvae at the highest concentrations (1%, 10% and 100%) and to *B. neritina* at all tested concentrations. The extract had no effect on the settlement of *A. amphitrite* and *B. neritina* at the lowest concentrations (0.01% and 0.1%). The concentration of 0.1% was non-toxic to conspecific larvae, but inhibited the settlement, while the concentration of 0.01% induced the settlement.

1.1 INTRODUÇÃO

O assentamento e acúmulo de organismos marinhos em substratos tais como cascos de navios provocam vários danos à industrial naval como aumento do arrasto hidrodinâmico, diminuição na capacidade de manobra do navio, aumento no consumo de combustível, consumo extra de energia, custos altos para a manutenção e aumento da corrosão (Chambers *et al.* 2000; Cao *et al.* 2011). Além disso, a bioincrustação facilita a introdução de espécies invasoras em ambientes onde não havia registros anteriores (Souza *et al.* 2009; Dafforn *et al.* 2011).

Substâncias químicas, denominadas biocidas, são utilizadas como princípio ativo em tintas anti-incrustantes com o objetivo de minimizar ou mesmo impedir o processo de bioincrustação. No entanto, muitos biocidas utilizados anteriormente foram considerados uma ameaça para o ambiente marinho por serem altamente tóxicos para organismos não-alvo (Castro *et al.* 2011; Guardiola *et al.* 2012).

Historicamente, a primeira tentativa de evitar a bioincrustação (data de 2 mil anos atrás) foi revestir barcos de madeira com chumbo misturado a óleo de baleia, enxofre e arsênio (Castro *et al.* 2011; Daros, 2014). Em meados do século XX, com o desenvolvimento de embarcações metálicas em substituição as de madeira, novos biocidas a base de metais pesados como o cobre e zinco foram incorporados às tintas anti-incrustantes (Yebra *et al.* 2004; Fernandez & Pinheiro, 2007; Castro *et al.* 2011; Daros, 2014), denominadas tintas de primeira geração (Fernandez & Pinheiro, 2007). Esses metais incorporados às tintas, além de serem tóxicos para os organismos marinhos, eram também pouco eficientes no controle da incrustação devido à baixa durabilidade (Lewis, 1998; Dafforn *et al.* 2011; Castro *et al.* 2011).

Na década de 1960, a indústria química desenvolveu tintas mais eficientes para o controle da bioincrustação a base de compostos organoestânicos: tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT), conhecidas como tintas de segunda geração (Fernandez & Pinheiro, 2007; Hellio, 2010). No entanto, o uso do TBT foi banido pela Organização Marítima Internacional (IMO) no ano de 2008 em virtude dos efeitos deletérios provocados em muitas espécies marinhas (Hellio, 2010). A partir de 1987, novos biocidas (3^o geração) começaram a ser utilizados como uma alternativa de tintas anti-incrustantes. Dentre os compostos não metálicos

presentes nesta geração estão o Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211, Clorotalonil, Diclofluanida e Tiram. Em relação aos compostos metálicos (orgânicos e inorgânicos) estão o Zinco Piritiona, Cobre Piritiona, Ziram, Maneb, Óxido Cuproso, Tiocianato de Cobre e Naftenato de Cobre (Castro *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Ainda que sejam livres de TBT, esses compostos sozinhos ou misturados são considerados uma ameaça para o ambiente marinho (Wang *et al.*, 2011).

Uma alternativa mais promissora para minimizar os impactos gerados pela bioincrustação é o desenvolvimento de novos revestimentos anti-incrustantes tendo como princípio ativo produtos naturais marinhos (Chambers *et al.* 2014; Ribeiro, 2005).

Algas, esponjas, ascídias, octocorais e outros organismos sésseis produzem uma diversidade de metabólitos secundários que desempenham diversos papéis ecológicos (Hay & Fenical, 1996) tais como defesa contra predadores, organismos incrustantes e patógenos (Hay, 1996). Em organismos desprovidos de mecanismos de escape ou sem estruturas físicas de defesa, a produção de compostos químicos parece ser mais comum, aumentando as chances de sobrevivência destas espécies no ambiente marinho (Pawlink, 1993; Hay e Fenical, 1996; Lindquist & Hay, 1996).

O coral *Tubastraea coccinea* é considerado um dos primeiros corais escleractíneos invasores do Atlântico Sul (Paula & Creed, 2005). Esta espécie é ahermatípica (não construtora de recifes) e azooxantelada, sendo, portanto, independente da luz solar para o seu desenvolvimento (Paula & Creed, 2005). É considerada invasora na costa brasileira, inclusive em áreas de proteção ambiental (Paula & Creed, 2004; Silva *et al.* 2011) e é encontrada em diferentes profundidades, especialmente em águas rasas de costões rochosos protegidos. Esta espécie é facilmente reconhecida pela sua coloração laranja ou avermelhada (Paula & Creed, 2004).

Estudos prévios demonstraram que as substâncias químicas produzidas por *T. coccinea* foram capazes de provocar necrose em colônias do coral nativo *Mussismilia hispida* (Creed, 2006; Santos, 2013), atividade contra peixes generalistas e organismos incrustantes (Lages *et al.* 2010a). Diante disso, surgiu o interesse em realizar novos testes com os compostos produzidos por este coral. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi verificar a atividade anti-incrustante

e a toxicidade aguda do extrato bruto de *T. coccinea* sobre as larvas de invertebrados marinhos. Nos bioensaios foram utilizadas larvas do briozoário *Bugula neritina* (Linnaeus, 1758), do cirripédio *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) e do próprio coral *T. coccinea*. As duas primeiras espécies são consideradas modelos em bioensaios de assentamento e toxicidade, em virtude da facilidade de coleta e cultivo em laboratório (Rittschof *et al.* 1984; Rittschof *et al.* 1992; Dahms *et al.* 2004; Faimali *et al.* 2006; Feng *et al.* 2013). Já a última foi escolhida com o intuito de verificar o efeito das substâncias produzidas por coespecíficos adultos no assentamento e mortalidade das larvas.

As hipóteses testadas foram:

H₁: O extrato bruto do coral invasor inibe o assentamento de larvas do cirripédio *Amphibalanus amphitrite* e do briozoário *Bugula neritina* e induz o assentamento das larvas coespecíficas;

H₂: O extrato bruto do coral invasor é tóxico para as larvas do cirripédio *Amphibalanus amphitrite* e do briozoário *Bugula neritina* e não é tóxico para as larvas coespecíficas.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Coleta de organismos

Colônias de *Tubastraea coccinea* foram coletadas no costão da Ilha dos Porcos (Figura 3) em Arraial do Cabo (RJ), através de mergulho autônomo, a uma profundidade de aproximadamente 7 m. Após a coleta, os organismos foram colocados separadamente em sacos plásticos (Ziploc) com água do mar e armazenados em uma caixa térmica. Os espécimes foram levados para o Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), onde se fez a retirada dos organismos epibiontes com o auxílio de uma pinça.

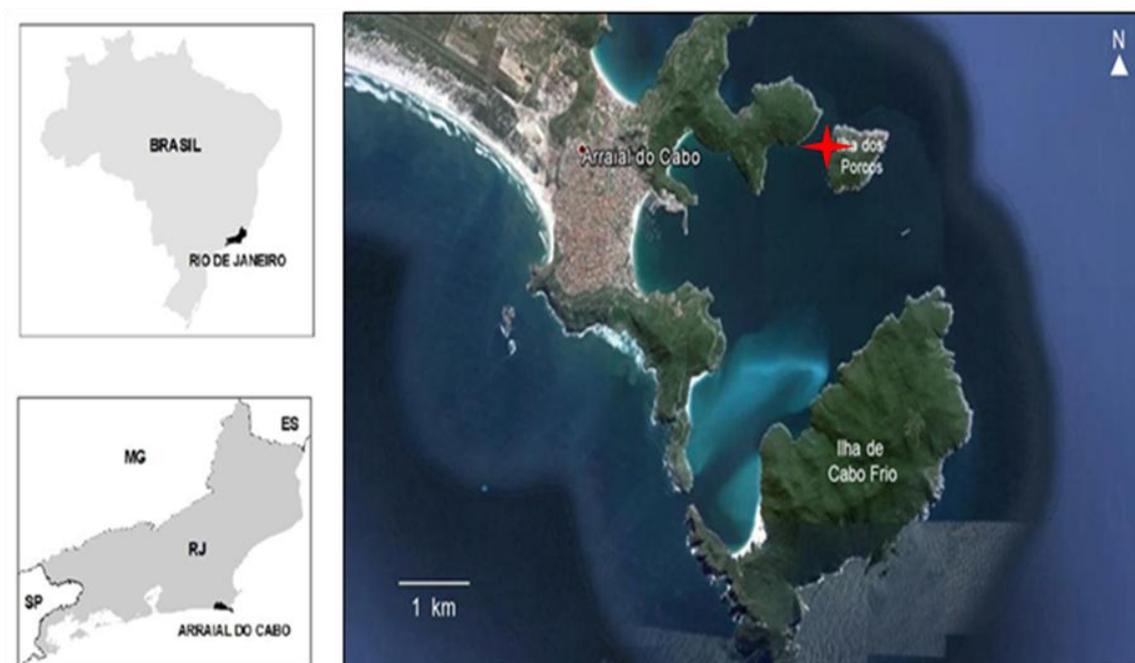


Figura 3: Mapa da Baía de Arraial do Cabo e sua localização no Brasil e no estado do Rio de Janeiro (áreas marcadas em preto). O lado direito indica o local de coleta das colônias (Ilha dos Porcos).

1.2.2 Peso e volume dos organismos

As colônias coletadas foram devidamente identificadas e separadas para determinação do peso úmido e volume. O volume foi determinado através do deslocamento de líquido em proveta graduada, após a imersão dos organismos e o

peso úmido foi obtido utilizando balança de precisão com cinco casas decimais. Posteriormente, as colônias foram congeladas até o início do processo de extração.

Após serem retiradas do freezer, as colônias foram liofilizadas para que toda água fosse removida de seus tecidos. Em seguida, obteve-se o peso seco das colônias utilizando balança de precisão com cinco casas decimais.

1.2.3 Preparação dos extratos

Para a obtenção dos extratos as colônias foram colocadas, separadamente, em recipientes de vidro e embebidas em uma mistura de diclorometano (DCM) e metanol (1:1) e foram extraídas sucessivamente em três intervalos (48h, 72h, 48h). Após cada extração o material foi filtrado e evaporado. Nas duas primeiras extrações, a evaporação foi realizada em capela e na última os extratos foram evaporados com auxílio do Turbo Vap (equipamento que auxilia na evaporação de solventes) em banho Maria, a uma temperatura de 50 °C para aumentar a eficiência do processo de evaporação dos solventes.

O material remanescente foi pesado para determinar a concentração natural do extrato bruto do coral invasor *T. coccinea*, que foi estabelecida a partir da relação entre a massa do extrato e volume das espécies envolvidas (Figura 4). Para determinar a massa do tecido das colônias do coral, o esqueleto (seco) de cada uma das colônias foi pesado após o processo de extração e sua massa foi subtraída do massa total das colônias.

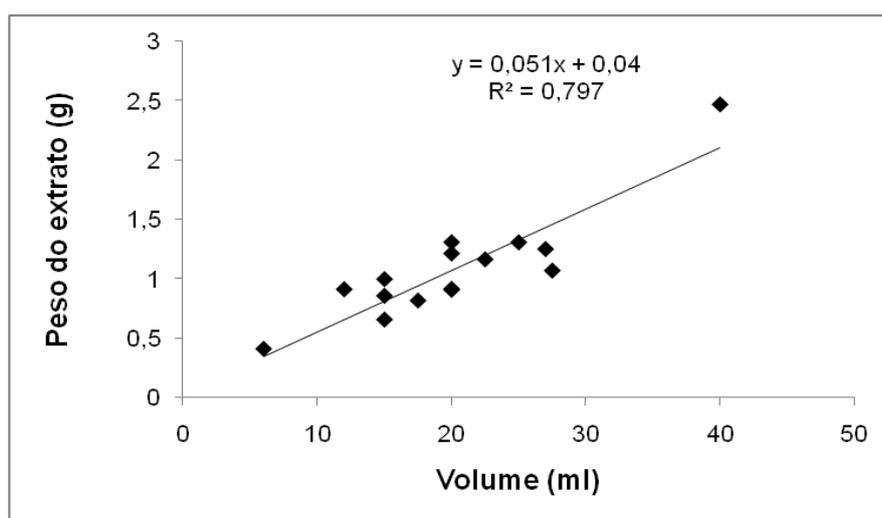


Figura 4: Relação entre peso dos extratos e volume das colônias de *Tubastraea coccinea*.

1.2.4 Experimentos de laboratório

1.2.4.1 Preparação dos testes de assentamento e toxicidade

Para a realização dos bioensaios de incrustação, o extrato bruto de *T. coccinea* foi testado em diferentes concentrações (0,05 g/ml (100%), 0,005 g/ml (10%), 0,0005 g/ml (1%), 0,00005 g/ml (0,1%) e 0,00005 g/ml (0,01%). As concentrações de 10%, 1%, 0,1% e 0,01% foram obtidas através da diluição da concentração natural (100%). O extrato foi solubilizado em diclorometano e metanol (1:1) e incorporado a béqueres de vidro com capacidade para 10 ml, e deixado evaporar a temperatura ambiente. O controle foi constituído pelos solventes DCM e metanol (1:1), utilizados na solubilização do extrato, enquanto que, o controle nulo consistiu apenas de água do mar filtrada (controle padrão para o desenvolvimento natural dos organismos-testes). Cada condição experimental (extrato, controle e controle nulo) foi replicada oito vezes. Vale ressaltar que o volume de solvente incorporado nos tratamentos com extrato e no controle foi o mesmo.

1.2.4.2 *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854)

Indivíduos adultos de *A. amphitrite* (Figura 5 A), coletados no Canal de Itajuru, Cabo Frio (RJ), foram levados para o laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos no Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e mantidos em recipientes de plástico com aeração (Figura 5 B).

Para induzir a liberação de larvas, os indivíduos adultos foram deixados no seco por aproximadamente 12h. Após este período, os cirripédios foram colocados em água do mar, liberando assim larvas em seu primeiro estágio de náuplio (Figura 5 C). O estresse causado pelo período de dessecação induz a liberação de larvas quando os indivíduos são colocados novamente em contato com a água do mar. Os náuplios foram atraídos por um ponto de luz, coletados com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocados em um béquer contendo 500 ml de água do mar. Foi feita uma estimativa do número de larvas/ml através da contagem de três alíquotas homogêneas de 1 ml em placa escavada de Kline. Com base nessa contagem foi feita a extrapolação para a quantidade total de larvas.

Os náuplios foram transferidos para bacias (20 litros) com água do mar filtrada, a $\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidade 35, aeração constante e foi adicionado 1 ml de antibiótico (36,5mg/ml Sulfato de Estreptomicina e 21,9 mg/ml Penicilina G-sódica diluídos em água destilada) por litro mantido para evitar a contaminação por bactérias (Rittschof *et al.* 1992).

O volume de água utilizado nos cultivos foi o equivalente a 1 ml/larva (Rittschof *et al.* 1992). As bacias foram mantidas em incubadora com fotoperíodo 12:12 (claro:escuro). As larvas no estágio de náuplio foram alimentadas diariamente durante sete com as microalgas *Skeletonema costatum* e *Chaetoceros calcitrans* na proporção de 1:1 até chegarem ao estágio de cipris. Ao alcançar o estágio de cipris, as larvas foram filtradas em redes acopladas de 300 μm , 200 μm e 160 μm . Após a filtração, as larvas foram armazenadas em placas de Petri com água do mar filtrada e mantidas sob refrigeração (aproximadamente 6 $^{\circ}\text{C}$). Este procedimento de estocagem em baixa temperatura é usualmente utilizado para cipris, deixando-as inativas e impedindo o assentamento das mesmas (Rittschof *et al.*, 1984).

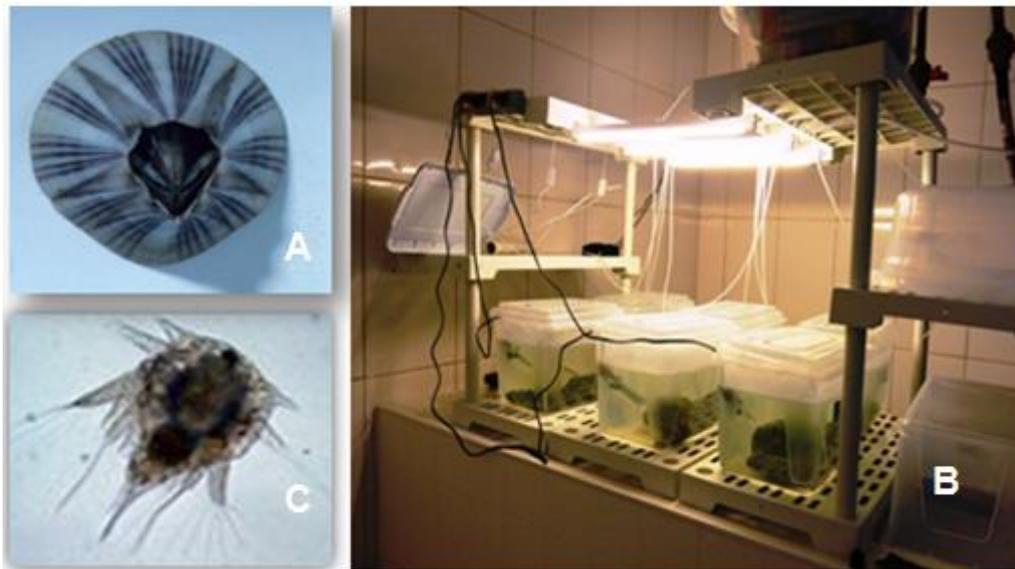


Figura 5: Indivíduo adulto do cirripédio *Amphibalanus amphitrite* (A); Organismos adultos de *A. amphitrite* mantidos em recipientes de plástico com aeração no laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos do IEAPM (B); Larva do cirripédio no estágio de náuplio (C).

1.2.4.3 *Bugula neritina* (Linnaeus, 1758)

Colônias de *Bugula neritina* (Figura 6 A) foram coletadas em cascos de embarcações no Canal de Itajuru, Cabo frio (RJ), com auxílio de espátula e levadas para o Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos do IEAPM onde foi feita a retirada de organismos associados. As colônias foram mantidas em aquário com aeração, a aproximadamente 24 °C e salinidade 35, por um período de 24 horas, no escuro constante. Após esse período, as colônias foram colocadas em um béquer de cinco litros (Figura 6 B) (para facilitar a coleta das larvas) e expostas à luz solar para induzir a liberação de larvas. A liberação teve início após aproximadamente 30 minutos de exposição.

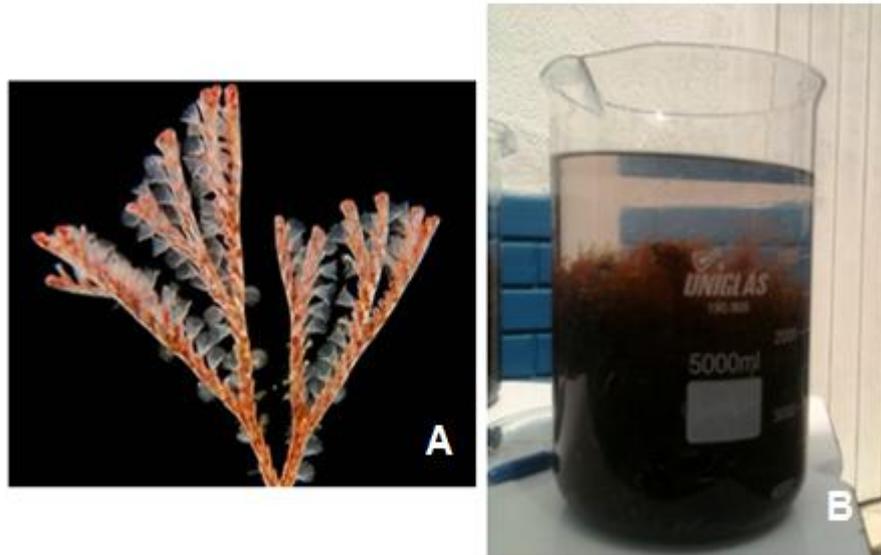


Figura 6: Indivíduo adulto do briozoário *Bugula neritina* (A); Colônias colocadas em um béquer de cinco litros para facilitar a coleta das larvas (B).

1.2.4.4 *Tubastraea coccinea* Lesson 1829

Colônias de *T. coccinea* (Figura 7 A) foram coletadas na Ilha dos Porcos em Arraial do Cabo (RJ) através de mergulho autônomo. A coleta foi realizada com auxílio de marreta e espátula. As colônias foram armazenadas em sacos plásticos com vedação e transportadas dentro de uma caixa térmica com água do mar para o Laboratório de Recursos Marinhos (LAREMAR) do Instituto de Estudos do Mar

Almirante Paulo Moreira (IEAPM) onde foi feita a retirada de organismos epibiontes.

As colônias foram mantidas em aquários com água do mar (Figura 7 B), aeração constante, temperatura de aproximadamente 22 °C e com fotoperíodo 12:12 (claro:escuro). O monitoramento das colônias foi feito diariamente a fim de obtenção das larvas para realização dos experimentos.

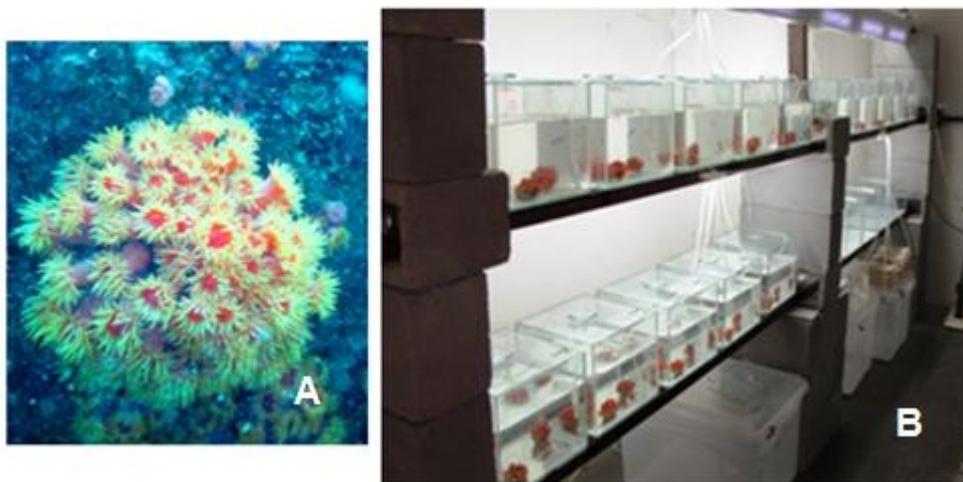


Figura 7: Colônia do coral invasor *T. coccinea* no costão rochoso da Ilha dos Porcos em Arraial do Cabo (RJ) (A); Colônias mantidas em aquários no Laboratório de Recursos Marinhos (LAREMAR).

1.2.4.5 Testes de assentamento e toxicidade

Amphibalanus amphitrite

Cipris deixadas sob refrigeração (6 °C) por três dias foram usadas para testar cinco concentrações (0,05 g/ml – 100%, concentração natural; 0,005g/ml – 10%; 0,0005 g/ml – 1%; 0,00005 g/ml – 0,1% e 0,000005 g/ml – 0,01%) do extrato bruto de *T. coccinea*. A cada um dos béqueres foram adicionados 8 ml de água do mar filtrada e de 8 a 10 larvas do organismo-teste. As larvas foram coletadas com pipeta Pasteur sob microscópio estereoscópico. Após esse procedimento as réplicas foram mantidas em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

Para avaliar a atividade anti-incrustante do extrato bruto do coral invasor, o número de larvas natantes (Figura 8A) e o número de larvas assentadas (Figura

8B) foi contabilizado diariamente durante 10 dias. Estudos anteriores mostraram que, cipris deixadas sob as mesmas condições de temperatura tiveram uma taxa de assentamento máximo no período de dez dias (Marechal *et al.* 2012). A toxicidade foi registrada após 24 horas a partir do número de larvas mortas (Figura 8C). Os indivíduos considerados como assentados foram aqueles que permaneceram fixos e que sofreram metamorfose. Indivíduos que não se moviam; não respondiam ao toque com uma agulha entomológica; e que apresentaram coloração turva ou escurecida foram considerados mortos.



Figura 8: Larvas cipris de *A. amphitrite*: natantes (A); assentada e metamorfoseada (B); mortas (C).

Bugula neritina

As larvas de *B. neritina* (Figura 9A) liberadas foram expostas a cinco diferentes concentrações (0,05 g/ml – 100%, concentração natural; 0,005g/ml – 10%; 0,0005 g/ml – 1%; 0,00005 g/ml – 0,1% e 0,000005 g/ml – 0,01%) do extrato bruto de *T. coccinea*. Foi adicionado 6 ml de água filtrada em cada um dos béqueres e de 4 a 7 larvas do organismo-teste. O assentamento das larvas desta espécie ocorre em um período relativamente curto (geralmente após as duas primeiras horas) (Dahms *et al.* 2004). Deste modo, o número de larvas assentadas foi contabilizado, sob microscópio estereoscópico, de hora em hora nas primeiras 6 horas e após 24 horas. O número de larvas mortas após 24 h também foi registrado com a finalidade de avaliar a toxicidade do extrato.

Os indivíduos considerados como assentados (Figura 9B) foram aqueles que se fixaram no substrato e sofreram metamorfose. Indivíduos que exibiram coloração esbranquiçada foram considerados mortos (Figura 9C).

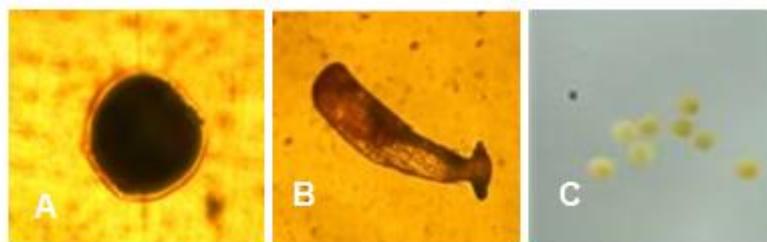


Figura 9: Larvas do briozoário *B. neritina*: natante (A); assentada e metamorfoseada (B); mortas (C).

Tubastraea coccinea

As larvas de *T. coccinea* liberadas nos aquários foram coletadas com o auxílio de pipeta Pasteur e usadas para testar cinco diferentes concentrações (0,05 g/ml – 100%, concentração natural; 0,005g/ml – 10%; 0,0005 g/ml – 1%; 0,00005 g/ml – 0,1% e 0,000005 g/ml – 0,01%) do extrato bruto de *T. coccinea*. A cada um dos béqueres foram adicionados 8 ml de água do mar filtrada e de 8 a 10 larvas. Durante o experimento, as larvas foram mantidas na mesma temperatura dos adultos (22 °C). Em laboratório, as larvas desta espécie podem permanecer competentes para o assentamento por um período de até 18 dias (Paula *et al.* 2014). Desta forma, para avaliar a atividade anti-incrustante do extrato, o número de larvas natantes (Figura 10A) e o número de larvas assentadas (Figura 10B) foi contabilizado diariamente durante 10 dias. A toxicidade foi registrada após 24 horas a partir do número de larvas mortas (Figura 10C). Foram considerados como assentados os indivíduos que se fixaram no substrato e sofreram metamorfose. Indivíduos que exibiram coloração turva; sofreram rompimento ou desintegração foram considerados como mortos.

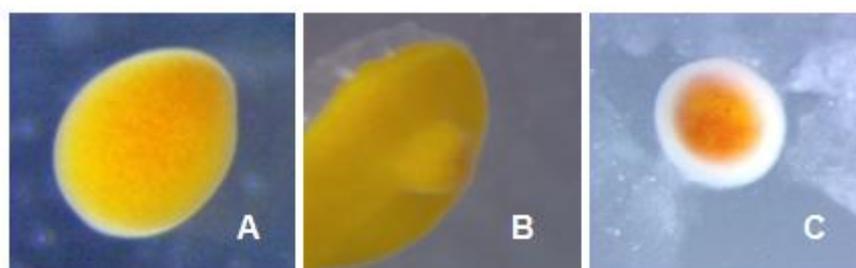


Figura 10: Larvas do coral invasor *T. coccinea*: natante (A); assentada e metamorfoseada (B); morta (C).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de assentamento de *A. amphitrite*, *B. neritina* e *T. coccinea*, expressos em porcentagem, foram comparados através de uma Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas. A significância das diferenças observadas na porcentagem de larvas mortas de *A. amphitrite*, *B. neritina* e *T. coccinea* entre os tratamentos, foi testada através de uma ANOVA unifatorial. As premissas da normalidade e homeocedaticidade foram verificadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados que não atenderam as premissas citadas foram transformados para arco-seno.

Nos casos em que foi detectada diferença significativa entre os tratamentos, o teste *a posteriori* de Fisher (LSD) foi aplicado. O nível de significância estabelecido foi $\alpha = 0,05$.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Bioensaio com *Amphibalanus amphitrite*

Mortalidade larvar

A mortalidade foi observada apenas nas concentrações de 1%, 10% e 100% após 24 horas de exposição das larvas ao extrato bruto de *T. coccinea* (Figura 11). Não foi observado mortalidade nos demais tratamentos (controle nulo, controle, extrato a 0,01% e extrato a 0,1%). A porcentagem de larvas mortas variou significativamente entre os tratamentos (ANOVA; $F_6 = 451,06$; $p < 0,05$). A mortalidade foi significativamente maior nas larvas expostas ao extrato bruto de *T. coccinea* nas concentrações de 1%, 10% e 100% quando comparadas as condições controle, controle nulo e as demais concentrações do extrato bruto. Não houve diferença significativa entre os tratamentos controle (com água do mar e solvente) e as menores concentrações (0,01% e 0,1%). A mortalidade foi significativamente maior nas concentrações de 100% e 10% quando comparadas a concentração de 1%, no entanto, não foi observada diferença significativa entre as duas maiores concentrações (10% e 100%). Não foi observada diferença

significativa na mortalidade das larvas entre o controle com solvente e o controle nulo.

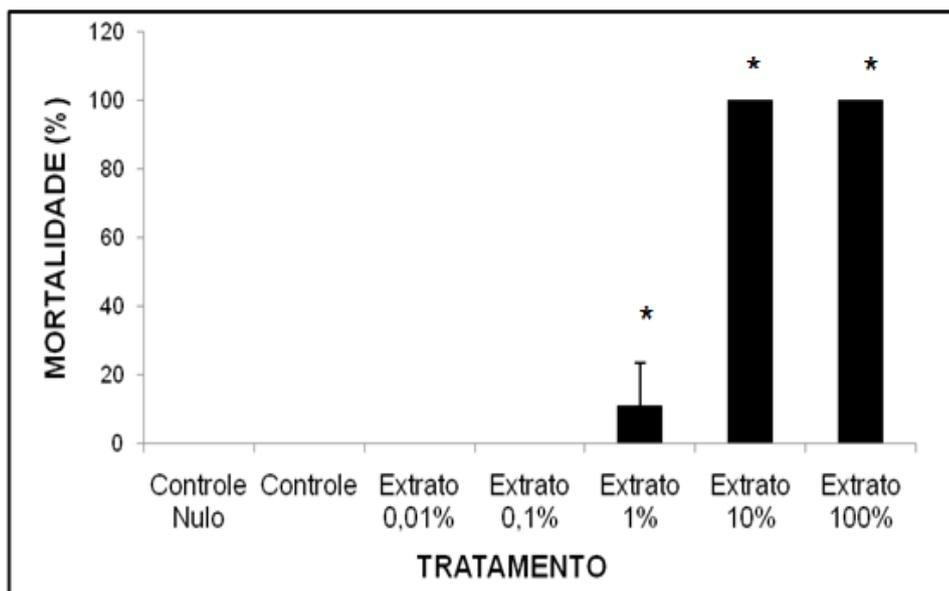


Figura 11: Média e desvio padrão da mortalidade das larvas do cirripédio *A. amphitrite* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente), em um período de 24 horas. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

Assentamento larvar

A porcentagem de larvas assentadas (Figura 12) diferiu significativamente entre os tratamentos ao longo do tempo de experimento (ANOVA; $F_{36} = 8,5$; $p < 0,05$). É importante destacar que, as concentrações de 10% e 100% não foram utilizadas nas análises estatísticas devido à mortalidade de todas as larvas após o intervalo de 24h. Nos tratamentos com extrato bruto de *T. coccinea* foi observado assentamento apenas nas concentrações de 0,01% e 0,1% e nos tratamentos controle (com água do mar e solvente). Na concentração de 1% o assentamento foi significativamente menor em comparação ao controle nulo a partir do quarto dia de experimento e a partir do quinto dia em comparação ao controle com solvente. A concentração de 0,1% não apresentou diferença significativa quando comparada ao tratamento com solvente. Já na concentração de 0,01% o assentamento foi significativamente maior quando comparada ao controle com solvente nos tempos T4 a T7. O assentamento foi significativamente maior na concentração de 0,01% comparada a concentração de 0,1% a partir do sétimo dia, e as mesmas não diferiram significativamente do controle com água do mar. O assentamento na

concentração de 1% foi significativamente menor quando comparada as concentrações de 0,01% e 0,1% a partir do quarto dia de experimento. A porcentagem de assentamento no tratamento com solvente foi significativamente menor no sexto dia quando comparado ao controle com água do mar.

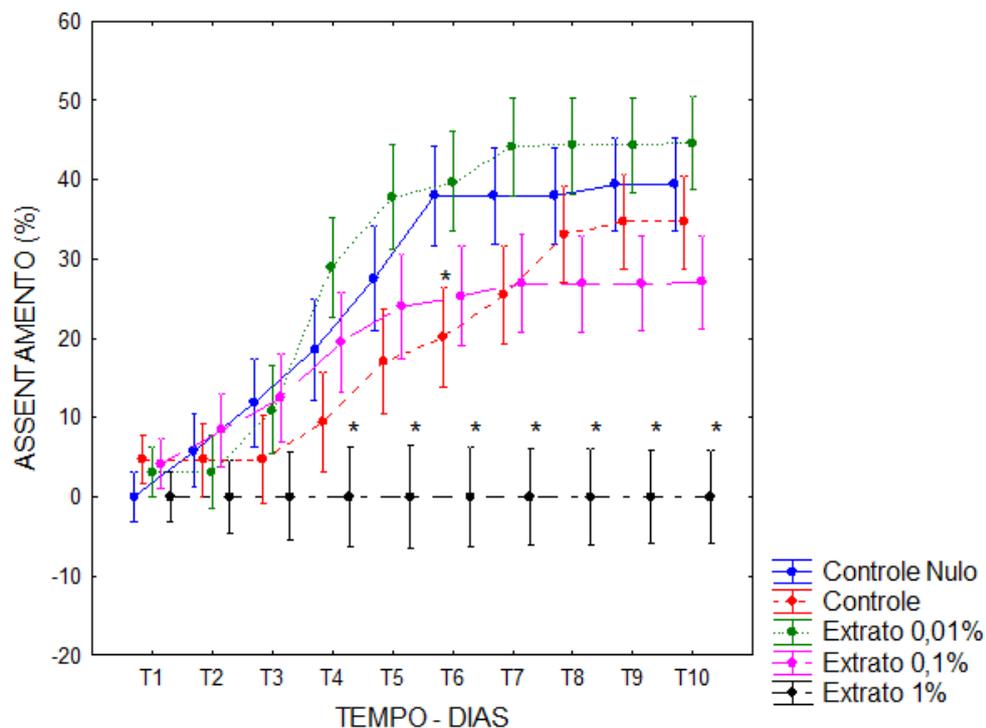


Figura 12: Média e intervalo de confiança do assentamento das larvas do cirripédio *A. amphitrite* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T.coccinea* em três concentrações (0,01%, 0,1%,1%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 10 dias. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

1.3.2 Bioensaio com *Bugula Neritina*

Mortalidade larvar

Foi observada mortalidade em todas as concentrações do extrato bruto de *T. coccinea* após 24 horas de exposição ao extrato (Figura 13). A mortalidade das larvas foi maior nas concentrações de 10% e 100%, visto que, todas as larvas morreram após 24 horas. A porcentagem das larvas variou significativamente entre os tratamentos (ANOVA; $F_6 = 36,65$; $p < 0,05$). A porcentagem de larvas mortas em todas as concentrações do extrato bruto foi significativamente maior comparada ao

controle com água do mar e solvente. A mortalidade foi significativamente maior nas concentrações de 1%, 10% e 100% quando comparadas as demais concentrações do extrato bruto (0,01% e 0,1%). A mortalidade foi significativamente maior nas concentrações de 10% e 100%, que não diferiram significativamente entre si, em comparação a concentração de 1%. Não foi observada diferença significativa na mortalidade das larvas entre o controle com solvente e água do mar.

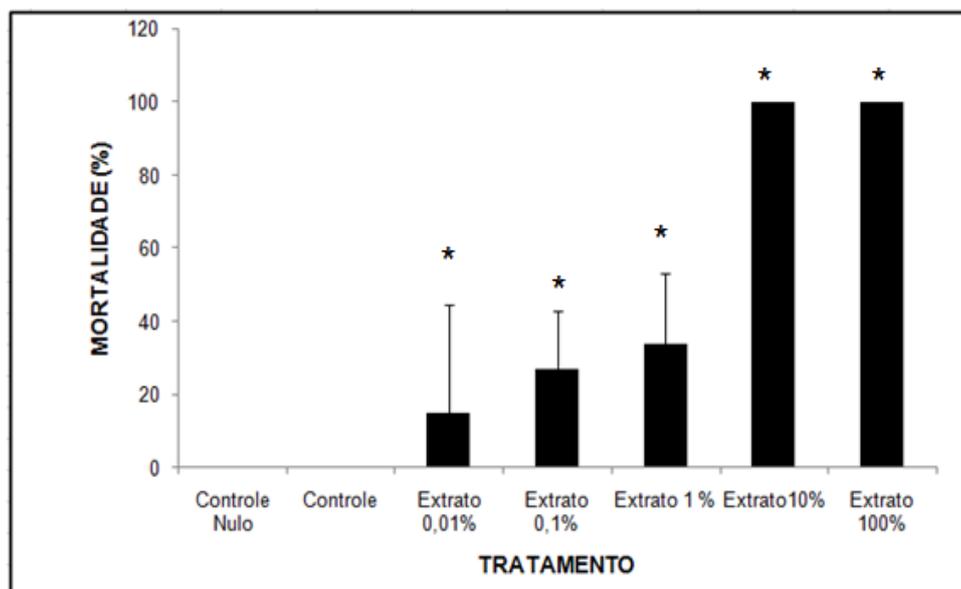


Figura 13: Média e desvio padrão da mortalidade das larvas do briozoário *B. neritina* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

Assentamento larvar

Neste bioensaio, o assentamento (Figura 14) foi observado nos tratamentos nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%, no controle com solvente e água do mar. Visto que, não foi registrado assentamento nas duas primeiras horas de experimento, não foi possível realizar o teste da ANOVA nos T1 e T2, já que a variância entre os tratamentos foi nula. O assentamento diferiu significativamente entre os tratamentos (ANOVA; $F_{24} = 2,8$; $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre o assentamento na concentração de 0,01% e o controle nulo (com água do mar), no entanto, quando comparado ao controle com solvente, o assentamento na concentração de 0,01% foi significativamente maior no T7. A porcentagem de

larvas assentadas foi significativamente maior na concentração de 0,01% quando comparada as demais concentrações do extrato bruto no T7. A porcentagem de larvas assentadas foi significativamente menor nas concentrações de 0,1%, 1%, 10% e 100% quando comparadas ao controle com água do mar, mas apenas no T7. O assentamento nas concentrações de 0,1% e 1% não diferiram significativamente do controle com solvente. Já nas concentrações de 10% e 100%, o assentamento foi significativamente menor do que o controle no T7. Não houve diferença significativa entre as concentrações de 0,1% e 1%. O assentamento foi significativamente menor nas concentrações de 10% e 100% em comparação a concentração de 0,1% no T7. Não houve diferença significativa entre as concentrações de 1%, 10% e 100%. A porcentagem de larvas assentadas foi significativamente maior no controle com água do mar comparada ao controle com solvente no T7.

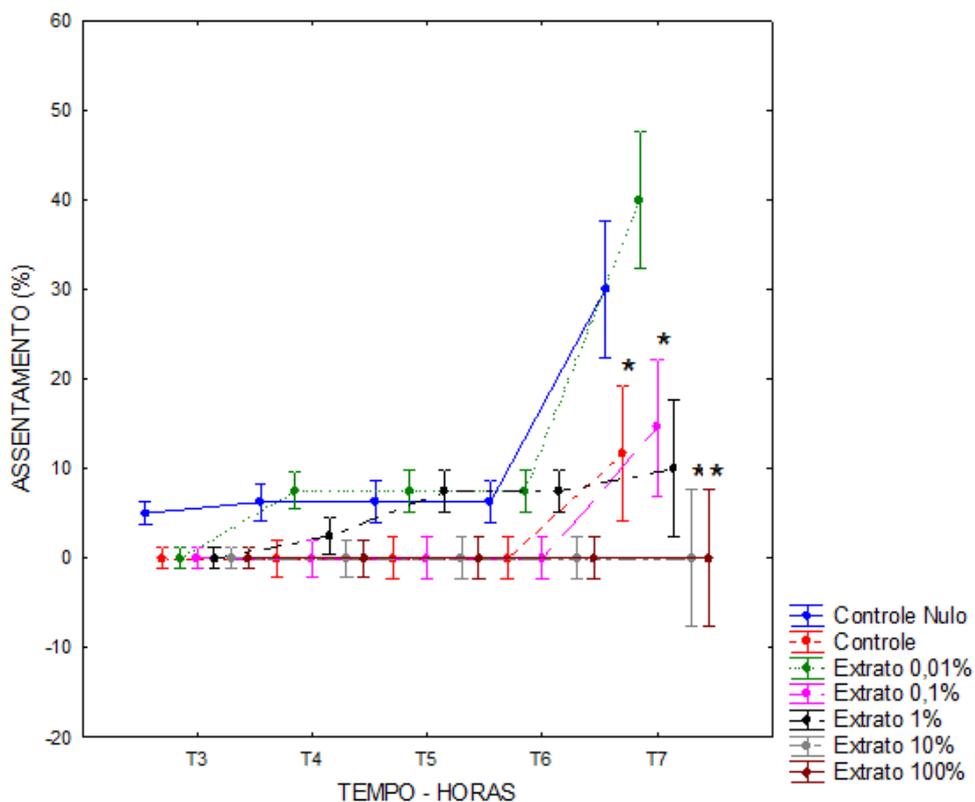


Figura 14: Média e intervalo de confiança do assentamento das larvas do briozoário *B. neritina* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) nas primeiras 6 horas e após 24 horas. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

1.3.3 Bioensaio com *T. coccinea*

Mortalidade larvar

A mortalidade das larvas de *T. coccinea* foi observada nas concentrações de 1%, 10% e 100% do extrato bruto de *T. coccinea*, sendo que nas duas últimas concentrações, todas as larvas morreram após 24 horas (Figura 15). A porcentagem das larvas variou significativamente entre os tratamentos (ANOVA; $F_6 = 1144,11$; $p < 0,05$). A mortalidade foi significativamente maior nas concentrações de 10% e 100% quando comparadas a concentração de 1%, mas não diferiram entre si. A mortalidade nas concentrações de 1%, 10% e 100% do extrato bruto foi significativamente maior em comparação aos demais tratamentos com extrato (0,01% e 0,1%) e aos controles. Não houve diferença significativa entre o controle com água do mar, o controle com solvente e as menores concentrações (0,01% e 0,1%) do extrato bruto.

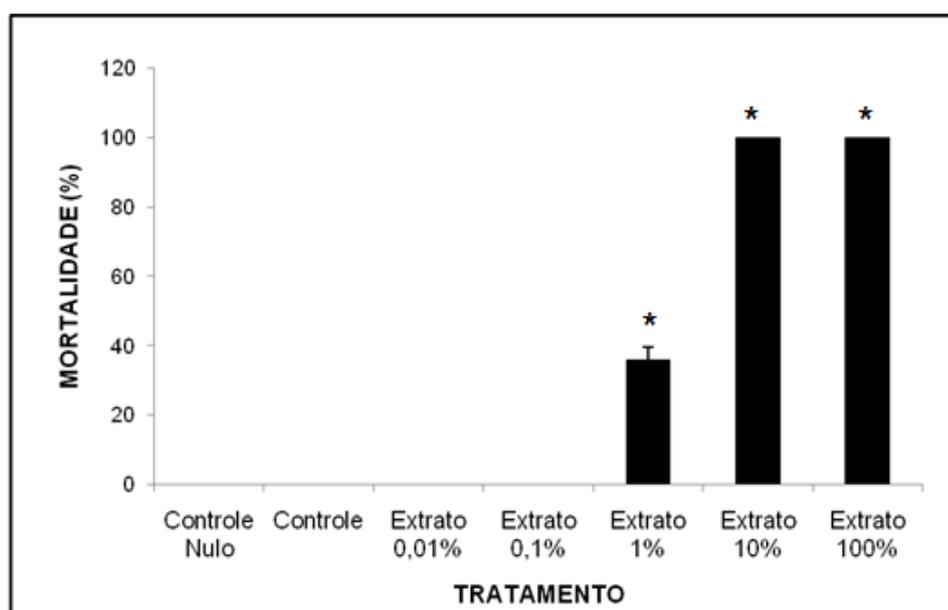


Figura 15: Média e desvio padrão da mortalidade das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

Assentamento larvar

Neste experimento o assentamento foi observado a partir do quinto dia de experimento (Figura 16). Desta forma, o teste ANOVA só foi realizado com os dados obtidos a partir do quinto dia, já que a variância entre os tratamentos nos dias anteriores foi nula.

A porcentagem de larvas assentadas variou significativamente (ANOVA; $F_{20}=4,48$; $p<0,05$) entre os tratamentos ao longo do tempo de experimento. É importante destacar que as concentrações de 10% e 100% não foram utilizadas nas análises estatísticas devido à mortalidade de todas as larvas após o intervalo de 24h. Não houve assentamento na concentração de 1%, que não diferiu significativamente do controle com solvente, mas foi significativamente menor a partir do sétimo dia quando comparada ao controle com água do mar e as concentrações de 0,01% e 0,1%. A porcentagem de larvas assentadas foi significativamente maior na concentração de 0,01% quando comparada ao controle com solvente e ao controle com água do mar a partir do sétimo e oitavo dia, respectivamente. O assentamento das larvas na concentração de 0,1% não apresentou diferença significativa quando comparada ao tratamento controle com água do mar, mas foi significativamente maior a partir do oitavo dia ao ser comparado ao tratamento com solvente. A porcentagem de larvas assentadas foi significativamente maior na concentração de 0,01% do que na concentração 0,1% a partir do sétimo dia. O assentamento foi significativamente maior no controle com água do mar quando comparada ao controle com solvente nos tempos T7 a T9.

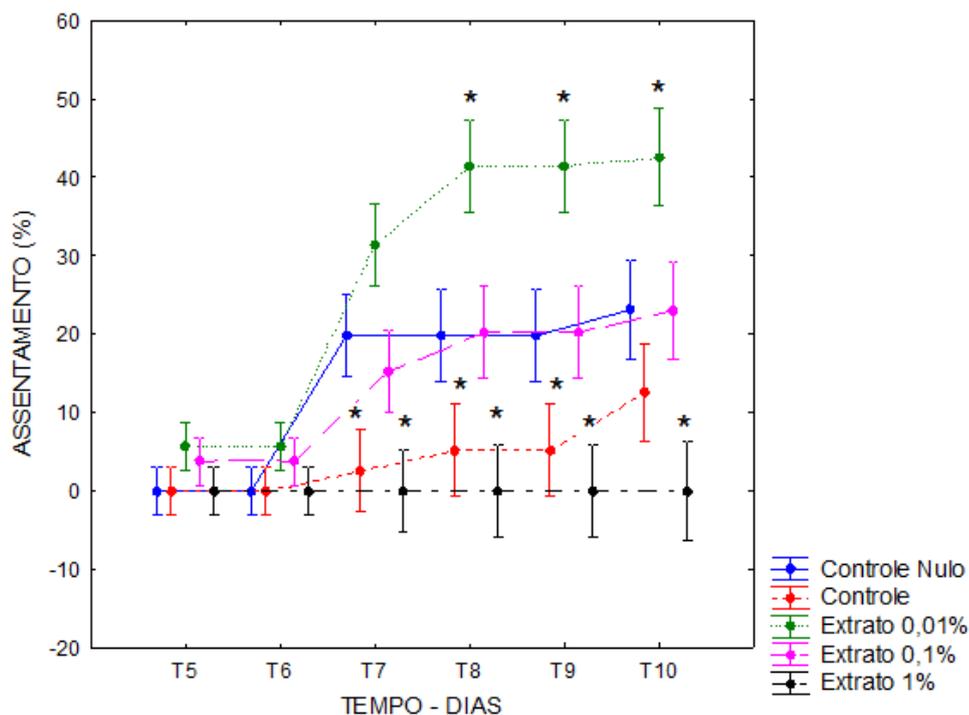


Figura 16: Média e intervalo de confiança do assentamento das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T.coccinea* em três concentrações (0,01%, 0,1%,1%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 10 dias. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

1.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, o extrato bruto de *T. coccinea* nas concentrações de 100%, 10% e 1% inibiu o assentamento larvar e apresentou toxicidade aguda severa para as larvas de *A. amphitrite*, principalmente nas duas maiores concentrações, visto que, todas as larvas morreram após 24 horas de exposição. O extrato também foi altamente tóxico para as larvas de *B. neritina* em todas as concentrações testadas (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100%), sendo que nas duas maiores concentrações (100% e 10%) a mortalidade foi de 100% após 24h de experimento. Altvater (2014) obteve resultados similares utilizando o extrato bruto do octocoral *Stragulum bicolor* Van Ofwegen & Haddad, 2011 para testar a atividade anti-incrustante em larvas de *A. amphitrite* e *B. neritina*. Além de inibir o assentamento larvar, o extrato foi altamente tóxico para as larvas de *A. amphitrite* nas concentrações de (90 µg/ ml,

900 µg/ ml e 9000 µg/ ml) e para as larvas de *B. neritina* na concentração de 4500 µg/ ml. Qi e colaboradores (2008), testaram um composto bioativo (5β-pregn-3, 20-dione) isolado da gorgônia *Subergorgia suberosa* frente as larvas de *A. amphitrite* e *B. neritina* que resultou na morte de 98% de ambas as espécies na concentração de 50 µg/ml. No entanto, os mesmos autores obtiveram respostas diferentes quanto ao extrato bruto das gorgônias *S. suberosa* e *Scripearia gracillis*, visto que, estes inibiram o assentamento larvar de ambas as espécies (*A. amphitrite* e *B. neritina*) apresentando 0% de mortalidade na concentração de 100 µg/mL. Estes resultados demonstram que é de fundamental importância a realização de ensaios toxicológicos com os produtos naturais (em diferentes concentrações) extraídos de diversos organismos marinhos, a fim de avaliar as respostas dos organismos tanto ao extrato bruto quanto a compostos isolados. Além disso, a escolha das concentrações a serem testadas é de grande importância, já que cada uma pode apresentar resultados distintos dentro de um mesmo experimento ou em diferentes experimentos com a mesma abordagem.

Ainda no presente estudo, o assentamento foi observado apenas nos tratamentos controle (com água do mar e solvente) e nos tratamentos com o extrato de *T. coccinea* nas menores concentrações (0,01% e 0,1%) para as larvas de *A. amphitrite* e nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1% para as larvas de *B. neritina*. Aparentemente as concentrações de 0,01% e 0,1% não apresentaram efeito (indutor ou inibidor) aparente sobre o assentamento das larvas de *A. amphitrite*, visto que, estes tratamentos não diferiram estatisticamente do controle com água do mar. Já a concentração de 1% teve um efeito inibidor no assentamento larvar do cirripédio. Para as larvas de *B. neritina*, as concentrações de 0,01%, 0,1% e 1% não apresentaram efeito (indutor ou inibidor) aparente sobre o assentamento larvar, já que, o assentamento nestas concentrações não diferiu significativamente do controle nulo (com água do mar). Outro trabalho realizado com o extrato bruto do gênero *Tubastraea* na concentração natural afetou a motilidade das larvas do coral *Porites astreoides* após 12 horas de exposição (Oliveira, 2016). Desta forma, a produção de metabólitos secundários possui um papel importante, já que, é uma estratégia utilizada por diversos organismos marinhos para persistir no ambiente marinho, inibir o assentamento e a distribuição das larvas de outras espécies (Jackson & Buss, 1975; Maida *et al.* 1995).

Em relação aos efeitos do extrato de *T. coccinea* sobre a mortalidade das larvas de coespecíficos, as concentrações de 100%, 10% e 1% foram letais. Ainda, as duas maiores concentrações causaram 100% de mortalidade após 24 horas de exposição. Um trabalho semelhante realizado na Ilha de Búzios (SP) com extratos brutos do antozoário *Carijoa riisei* e do coral invasor *T. coccinea* apresentou alta toxicidade, causando a mortalidade de todas as larvas de *T. coccinea* expostas no período máximo de 48h (Mizrahi, 2014). Em contra partida, Koh & Sweatman (2000) demonstraram que compostos químicos produzidos pelo coral escleractíneo *Tubastraea faulkneri* não foram letais para as larvas coespecíficas, mesmo na maior concentração testada (200 µg/mL). Estes estudos demonstram que não se pode generalizar quanto aos efeitos das substâncias químicas produzidas pelos organismos adultos sobre suas larvas, já que estas não estão completamente protegidas da toxicidade dessas substâncias (Koh & Sweatman, 2000).

Ainda em relação ao presente estudo, nas concentrações mais baixas do extrato bruto de *T. coccinea* (0,1% e 0,01%), foi observado assentamento das larvas coespecíficas. A concentração de 0,01% teve um efeito indutor no assentamento larvar, visto que, o assentamento foi estatisticamente maior quando comparado ao controle nulo, enquanto que a concentrações de 0,1% teve um efeito inibidor sobre o assentamento. A concentração de 1% também foi inibitória, visto que nenhuma larva assentou nessa concentração. Como já foi dito anteriormente, as diferentes concentrações testadas podem apresentar respostas distintas mesmo dentro do mesmo experimento. Vale ressaltar que, a concentração natural utilizada no presente trabalho pode não representar exatamente a concentração natural liberada pelo coral invasor no ambiente marinho, já que impediu o assentamento e matou todas as larvas coespecíficas.

Os corais escleractíneos, até pouco tempo, não despertavam muita atenção dos pesquisadores da área de produtos naturais, pois se acreditava que esses corais por possuírem um esqueleto formado por carbonato de cálcio, apresentavam um mecanismo de defesa suficiente contra predadores e competidores (Lages *et al.* 2012). No entanto, alguns estudos realizados com corais escleractíneos do gênero *Tubastraea*, revelaram a produção de substâncias bioativas com uma diversidade de funções ecológicas (Guella *et al.* 1988; Fusetani *et al.* 1986; Koh & Sweatman, 2000; Lages *et al.* 2010 a, b; Creed, 2006). A produção destas

substâncias químicas é um mecanismo de defesa importante que contribui para a introdução, facilidade de colonização e expansão de espécies deste gênero em novos habitats marinhos (Silva *et al.* 2014).

No presente trabalho, o extrato bruto do coral invasor apresentou atividade anti-incrustante para todas as larvas testadas, principalmente nas maiores concentração, tendo, portanto, potencial como anti-incrustante natural.

1.5 REFERÊNCIAS

ALTVATER, L. Potencial invasor de *Stragulum bicolor* Van Ofwegen & Haddad, 2011 (Cnidaria, Octocorallia, Alcyonacea). 2014. Tese de Doutorado (Biologia Marinha), Universidade Federal Fluminense, Nitéroi, 125 p.

CAO, S.; WAHG, J. D.; CHEN, H. S; CHEN, D. R. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin*, v. 56, p. 598-612. 2011.

CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático, *Química Nova*, v. 34, p. 1021-1031, 2011.

CHAMBERS, S. A. Epitaxial growth and properties of thin Im oxides. *Surface Science Reports*, v. 39 p. 105 - 180, 2000.

CHAMBERS, L. D.; WHARTONA, J. A.; WOODA, R. J. K.; WALSHA, F. C.; STOKESA, K. R. Techniques for the measurement of natural product incorporation into an antifouling coating. *Progress in Organic Coatings*, v. 77, p. 473-484, 2014.

CREED, J. C. Two invasive alien azooxanthellate corals, *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*, dominate the native zooxanthellate *Mussismilia hispida* in Brazil. *Coral Reefs*, v. 25, p. 350, 2006.

DAFFORN, K. A.; LEWIS, J. A.; JOHNSTON, E. L. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 453–465, 2011.

DAHMS, H.-U; JIN, T.; QIAN, P.-Y. Adrenoceptor Compounds Prevent the Settlement of Marine Invertebrate Larvae: *Balanus amphitrite* (Cirripedia), *Bugula neritina* (Bryozoa) and *Hydroides elegans* (Polychaeta). *Biofouling*, p. 1-9, 2004.

DAROS, B. N. Indução de imposex em *stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Gastropoda: Muricidae) exposto a água contaminada com tributilestanho (TBT). 2014. Bacharel em Ciências Biológicas, Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, 2014.

FAIMALI, M.; GARAVENTA, F.; PIAZZA, V.; GRECO, G.; CORRA, C.; MAGILLO, F.; PITTORE, M.; GIACCO, E.; GALLUS, L.; FALUGI, C.; TAGLIAFIERRO, G. Swimming speed alteration of larvae of *Balanus Amphitrite* as a behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. *Marine Biology*, v. 149, p. 87 - 96, 2006.

FERNANDEZ, M. A.; PINHEIRO, F. M. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. *Int. J. Environment and Health*, v. 1, p. 427-448, 2007.

FENG, L.; WU, Z.; YU, X. Quorum sensing in water and wastewater treatment biofilmes. *Journal of Environmental Biology*, v. 34, p. 437 – 444, 2013.

FUSETANI, N.; ASANO, M.; MATSUNAGA, S.; HASHIMOTO, K. Bioactive marine metabolites – XV. Isolation of aplysinopsin from the scleractinian coral *Tubastraea áurea* as na inhibitor of development of fertilized sea urchin eggs. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 85B, p. 845-846, 1986.

GUARDIOLA, F. A.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Risks of Using Antifouling Biocides in Aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 1541-1560, 2012.

GUELLA, G.; MANCHI, I.; ZIBROWIUSBF, H.; F'IETRA, F. 87. Novel Aplysinopsin-Type Alkaloids from Scleractinian Corals the Family Dendrophylliidae of the Mediterranean and the Philippines. Configurational-Assignment Criteria, Stereospecific Synthesis, and Photoisomerization. *Helvetica Chimica Acta*, v.71, p.773-782, 1988.

HAY, M. E. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *Journal of Exuerimental Marine Biology and Ecology*, v. 200, p. 103-134, 1996.

HAY, M. E.; FENICAL, W. Chemical Ecology and marine biodiversity: Insights and products from the sea. *Oceanography*, v. 9, p. 10-20, 1996.

HELLIO, C. The potential of marine biotechnology for the development of new antifouling solutions. *J. Sci. Hal. Aquat.*, v. 2, p. 35-4, 2010.

JACKSON, J. B. C.; BUSS, L. Allelopathy and spatial competition among coral reef invertebrates. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 72, p. 5160 – 5163, 1975.

KOH, E. G. L.; SWEATMAN, H. Chemical warfare among scleractinians: bioactive natural products from *Tubastraea faulkneri* Wells kill larvae of potential competitors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 251, p. 141-160, 2000.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; PINTOS, A. C.; CREED, J.C. Chemical defenses against generalist fish predators and fouling organisms in two invasive ahermatypic corals in the genus *Tubastraea*. *Marine Ecology*, v. 31, p. 473–482, 2010 a.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. Chemical composition and release in situ due to injury of the invasive coral *Tubastraea* (Cnidaria, scleractinia)*. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 58, p. 47-56, 2010 b.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. Proximity to competitors changes secondary metabolites of nonindigenous cup corals, *Tubastraea* spp. in the southwest Atlantic. *Mar Biol*, v. 159, p. 1551–1559, 2012.

LEWIS, J. A. Marine biofouling and its prevention on underwater surfaces. *Materials fórum*, v. 22, p. 41-61, 1998.

LINDQUIST, N.; HAY, M. E. Palatability and chemical defense of marine invertebrate larvae. *Ecological Monographs*, v. 66, p. 431-450, 1996.

MAIDA, M.; SAMMARCO, P. W.; COLL, J. Effects of soft corals on scleractinian coral recruitment. I: Directional allelopathy and inhibition of settlement. *Marine Ecology Progress Series*, v. 121, 191 – 202, 1995.

MARECHAL, J.- P.; MATSUMURA, K.; CONLAN, S.; CLAIRE, H. Competence and discrimination during cyprid settlement in *Amphibalanus amphitrite*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 72, p. 59-66, 2012.

MIZHARI, D. Influência de processos pré e pós-assentamento no padrão de ocorrência do coral sol, *Tubastraea coccinea*, no litoral norte do Estado de São Paulo. 2014. 158 p. Tese de Doutorado (Ciências), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, São Paulo, 2014.

OLIVEIRA, G. J. G. de. Efeito alelopático do extrato bruto dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis* sobre as larvas do coral nativo *Porites astreoides*. Dissertação de Mestrado (Dinâmica dos Oceanos e da Terra), Universidade Federal Fluminense, Niterói, p. 44, 2016.

PAULA, A. F.; CREED, J. C. Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: a case of accidental introduction. *Bulletin of marine science*, v. 74, p. 175- 183, 2004.

PAULA, A. F.; CREED, J. C. Spatial distribution and abundance of nonindigenous coral genus *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) around Ilha Grande, Brazil. *Braz. J. Biol.*, v. 65, p. 661-673, 2005.

PAULA, A. F. de; PIRES, D. de O.; CREED, J. C. Reproductive strategies of two invasive Sun corals (*Tubastraea* spp.) in the southwestern Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 93, p. 481–492, 2014.

PAWLIK, J. Marine Invertebrate Chemical Defenses. *Chem. Rev.* v. 93, p. 1911-1922, 1993.

QI, S. H.; ZHANG, S.; YANG, L. H.; QIAN, P. Y. Antifouling and antibacterial compounds from the gorgonians *Subergorgia suberosa* and *Scripearia gracillis*. *Natural Product Research*, v. 22:2, p. 154-166, 2008.

RIBEIRO, A. Produtos Naturais da alga parda marinha *Styopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta) do litoral brasileiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, p. 192, 2005.

RITTSCHOF, D.; BRANSCOMB, E. S; COSTLOW, J. D. Settlement and behavior in relation to flow and surface in larvae barnacles, *Balanus amphitrite* Darwin. *J. Exp. Mar. Biol. Eco*, v. 82, p. 131-146, 1984.

RITTSCHOF, D.; CLARE, A. S.; GERHART, D. G; SISTER AVELIN MARY.; BONAVENTURA, J. Barnacle in vitro assays for biologically active substances:

Toxicity and Settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite* amphitrite darwin, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, v. 6, p.115-122, 1992.

SANTOS, L. A. H. dos; RIBEIRO, F. V.; CREED, J. C. Antagonism between invasive pest corals *Tubastraea spp.* And the native reef-builder *Mussismilia hispida* in the southwest Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 449, p. 69-76, 2013.

SILVA, A. G.; LIMA, R. P., GOMES, A. N.; FLEURY, B. G; CREED, J. C. Expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* into the Tamoios Ecological Station Marine Protected Area, Brazil. *Aquatic Invasions*, v. 6, p. 105 – 110, 2011.

SILVA, A. G.; PAULA, A. F. FLEURY, B. G.; CREED, J. C. Eleven years of range expansion of two invasive corals (*Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*) through the southwest Atlantic (Brazil). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 141, p. 9-16, 2014.

SOUZA, R. C. C. L; CALAZANS, S. H.; SILVA, E. P. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. *Ciência e Cultura*, v. 61 (1), p. 35-41, 2009.

WANG, H.; LI, Y.; HUANG, H.; XU, X.; WANG, Y. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides using the *strongylocentrotus intermedius* sea urchin embryo test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, p. 692–703, 2011.

YEBRA, D. M.; KILL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, v. 20, p. 75–104, 2004.

CAPÍTULO 2: EFEITO QUÍMICO DO EXTRATO BRUTO DE POTENCIAIS COMPETIDORES NAS LARVAS DO CORAL INVASOR *TUBASTRAEA COCCINEA* LESSON, 1829

RESUMO

A introdução de novas espécies pode provocar efeitos negativos, à medida que as mesmas se tornem um competidor agressivo, competindo por recursos vitais (espaço e nutrientes, por exemplo) com outras espécies. No ambiente marinho a competição por espaço é muita intensa e a produção de substâncias químicas é um mecanismo de defesa para que invertebrados sésseis sobrevivam neste tipo de hábitat. A partir de observações de campo em diversos pontos do costão rochoso de Arraial do Cabo (RJ), foi possível perceber a proximidade da esponja *Darwinella* sp. , do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* e do coral *Tubastraea tagusensis* com as colônias do coral invasor *T. coccinea*. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do extrato bruto de potenciais competidores no assentamento e na mortalidade das larvas do coral invasor *T. coccinea*. As colônias dos potenciais competidores foram congeladas, liofilizadas e embebidas em diclorometano (DCM) e metanol (1:1) para obtenção do extrato bruto. As colônias de *T. coccinea* foram mantidas em aquários na temperatura de aproximadamente 22 °C para obtenção das larvas. Para a realização dos bioensaios, o extrato bruto foi incorporado a béqueres de 10 ml em diferentes concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100% da concentração natural). O controle consistiu na incorporação dos solventes DCM: MeOH (1:1) na mesma proporção usada nos tratamentos com extrato. O controle nulo foi composto apenas por água do mar filtrada. A cada um dos béqueres foram adicionados 8 ml de água do mar filtrada e de oito a dez larvas do organismo teste. O assentamento larvar foi registrado diariamente durante dez dias e a mortalidade foi registrada após o período de 24h. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que metabólitos secundários produzidos pelos potenciais competidores podem representar uma ferramenta importante no controle do coral invasor *T. coccinea*, visto que apresentaram toxicidade, principalmente nas concentrações de 10% e 100% e inibiram o assentamento larvar em praticamente todas as concentrações testadas.

ABSTRACT

The introduction of new species can cause negative effects since they may become aggressive competitors, competing for vital resources (e.g. space and nutrients) with native species. In marine environments, competition for space is very intense and the production of chemical substances is one of the defense mechanisms that contributes for the survival of sessile invertebrates in this type of habitat. The sponge *Darwinella* sp., the zoanthid *Palythoa caribaeorum* and the coral *Tubastraea tagusensis* frequently occur near colonies of the invasive coral *T. coccinea* on the rocky shores of Arraial do Cabo (RJ). These species are probably competing for space with *T. coccinea*. Thus, this study aimed to verify the effect of the crude extract of potential competitors on settlement and mortality of *T. coccinea* larvae. Colonies of *D. cf. oxeata*, *P. caribaeorum* and *T. tagusensis* were collected, frozen, lyophilized and soaked in dichloromethane (DCM) and methanol (1: 1) for the crude extract preparation. Colonies of *T. coccinea* were collected and kept in aquaria at a temperature of approximately 22 °C in order to obtain the larvae for the experiments. The crude extract was incorporated into 10 ml beakers at five different concentrations, that correspond to 0.01%, 0.1%, 1%, 10% and 100% of the natural concentration. The control consisted in the incorporation of the solvents DCM: MeOH (1: 1) at the same proportion used in the treatments with the crude extract. The null control was filtered sea water. For the bioassays, 8 ml of filtered sea water and 8-10 larvae of the organism tested were added to the beakers. The larval settlement was recorded daily for ten days and mortality was recorded after the first 24 hours. The results obtained in the present study suggest that the secondary metabolites produced by potential competitors may be an important tool in the control of the invasive coral *T. coccinea*, since they were toxic, mainly at concentrations of 10% and 100% and inhibited larval settlement in practically all the concentrations tested.

2.1 INTRODUÇÃO

No ambiente marinho a competição entre os organismos sésseis por espaço é considerada muito intensa (Koh e Sweatman, 2000) sendo manifestada através do crescimento excessivo sobre outras espécies e produção de substâncias alelopáticas, por exemplo, (Koh e Sweatman, 2000; Porter e Targett, 1998). Estas substâncias são chamadas de metabólitos secundários ou produtos naturais e não estão envolvidas no crescimento, desenvolvimento e reprodução. Em ambientes recifais a produção de substâncias alelopáticas comum em invertebrados sésseis de corpo mole, tais como esponjas, octocorais e ascídias, é uma estratégia importante para aumentar as chances de sobrevivência nestes habitats com intensa competição (Lindquist, 2002). Elas podem provocar efeitos deletérios em organismos adultos considerados potenciais competidores (Creed, 2006, Lages *et al.* 2012; Lages *et al.* 2006; Miranda *et al.* 2016) e impedir o assentamento de suas larvas (Fearon & Cameron, 1997; Koh & Sweatman, 2000).

Muitos invertebrados marinhos bentônicos possuem uma fase larval planctônica, podendo permanecer por longos períodos na coluna d' água antes de encontrar substrato adequado para assentar (Dahms *et al.* 2004). A transição da fase planctônica para a fase bentônica é uma etapa considerada crítica no ciclo de vida desses organismos, pois o sucesso do assentamento e estabelecimento depende de alguns fatores como textura do substrato, luz, temperatura, fluxo de água, pistas químicas, competição e predação, por exemplo, (Denley & Underwood, 1979; Pawlik, 1992; Maldonado & Young, 1996; Walters *et al.* 1996; Wieczorek & Todd, 1998; Boxshall, 2000; Bers, 2006; Hadfield, 2011; Mizrahi, 2014).

A introdução de espécies exóticas, uma problemática crescente devido ao processo de globalização e ao aumento no comércio internacional, pode aumentar a competição em ambientes marinhos (Cohen & Carlton, 1998; Cohen, 2005). O coral invasor *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 (Scleractinia: Dendrophyllidae) é considerado um dos primeiros corais escleractíneos invasores do Atlântico Sul (Paula & Creed, 2005). Esta espécie provavelmente chegou ao Brasil incrustada em plataformas de petróleo no final da década de 1980 (Castro & Pires, 2001). Esta espécie, originária do Pacífico, é ahermatípica (não construtora de recifes) e

azooxantelada, sendo, portanto, independente da luz solar para o seu desenvolvimento (Cairns, 1994; Paula & Creed, 2005). *Tubastraea coccinea* é uma espécie hermafrodita (Ayre & Resing, 1986; Paula *et al.* 2014) e pode se reproduzir tanto assexuadamente como sexuadamente. A reprodução é mais intensa nos meses de novembro, janeiro e fevereiro, mas pode ocorrer ao longo do todo o ano. As larvas podem permanecer competentes para o assentamento por até 18 dias em condições de laboratório (Paula *et al.* 2014).

Algumas espécies do gênero *Tubastraea* produzem substâncias químicas bioativas que provocam efeitos deletérios em colônias dos corais nativos *Mussismilia hispida* (Creed, 2006; Miranda *et al.* 2016), *Siderastrea stellata*, *Montastraea cavernosa* e *Madracis decactis* (Miranda *et al.* 2016). Estas substâncias também comprometem a motilidade das larvas do coral *Porites astreoides* (Oliveira, 2016) e são tóxicas para larvas de corais escleractíneos (Koh & Sweatman, 2000). Em contrapartida, foi observado que a esponja *Desmapsamma anchorata* Carter, 1882 possui um crescimento agressivo sobre colônias do coral *T. coccinea*, provocando a mortalidade das mesmas. A agressividade desta esponja pode estar relacionada à produção de substâncias químicas (Meurer *et al.* 2010). Ainda, o extrato bruto do antozoário *Carijoa riisei* mostrou-se altamente tóxico para larvas de *T. coccinea*, causando a mortalidade de todas as larvas em um período de até 48h (Mizrahi, 2014).

Estudos mais detalhados sobre as substâncias de defesa produzidas por potenciais competidores do coral invasor tornam-se necessários, a fim de obter respostas que sejam capazes de melhor explicar as interações ecológicas entre eles. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi realizar testes em laboratório para verificar a toxicidade aguda e o efeito do extrato bruto de potenciais competidores nativos (*Palythoa caribaeorum*) e não-nativas (*Darwinella sp.* , e *Tubastraea tagusensis*) no assentamento de larvas do coral invasor *T. coccinea*. Estas espécies foram selecionadas a partir de observações em campo, onde foi possível registrar a proximidade ou mesmo o contato das espécies selecionadas com o coral invasor *T. coccinea*.

As hipóteses testadas nesse estudo foram:

H₁: O extrato bruto de potenciais competidores inibe o assentamento de larvas do coral invasor *T. coccinea*.

H₂: O extrato bruto de potenciais competidores é tóxico para as larvas do coral invasor *T. coccinea*.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Escolha e coleta dos organismos

Três espécies que possivelmente competem com *T. coccinea* por recursos foram selecionadas: a esponja *Darwinella* sp., o zoantídeo *Palythoa caribaeorum* e o coral *Tubastraea tagusensis*. A escolha das espécies fez-se a partir de observações de campo em vários pontos da enseada dos Anjos, onde foi possível registrar a proximidade ou mesmo o contato das espécies selecionadas com o coral invasor *T. coccinea* e da abundância das mesmas no ambiente natural. Colônias de *Darwinella* sp. (Figura 17A), *Palythoa caribaeorum* (Figura 17B) e *Tubastraea tagusensis* (Figura 17C) foram coletados no costão rochoso da Ilha dos Porcos em Arraial do Cabo (RJ) (Figura 3), através de mergulho autônomo, a uma profundidade de aproximadamente 7 m. Após a coleta, os organismos foram colocados separadamente em sacos plásticos (Ziploc) com água do mar e armazenados em uma caixa térmica. Os espécimes foram levados para o Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), onde se fez a retirada dos organismos epibiontes com o auxílio de uma pinça.

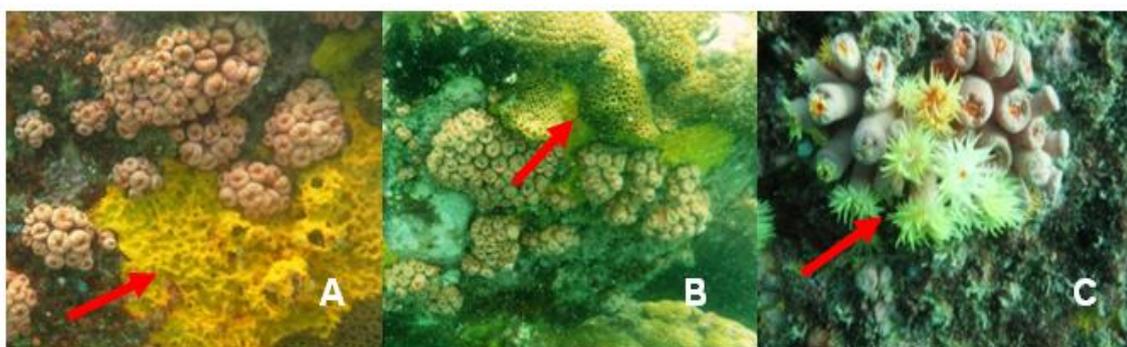


Figura 17: Colônias de *T. coccinea* próximas à esponja *Darwinella* sp. (A); ao zoantídeo *P. caribaeorum* (B); e ao coral *T. tagusensis* (C). As colônias dos potenciais competidores estão sinalizadas pelas setas em vermelho.

2.2.2 Peso e volume dos organismos

As colônias das espécies coletadas foram devidamente identificadas e separadas para determinação do peso úmido e volume. O volume foi determinado

através do deslocamento de líquido em proveta graduada, após a imersão dos organismos e o peso úmido foi obtido utilizando balança de precisão com cinco casas decimais. Após este procedimento, as colônias foram congeladas. Após serem retiradas do freezer, as colônias foram liofilizadas para que toda água fosse removida de seus tecidos. Em seguida, obteve-se o peso seco das colônias utilizando balança de precisão com cinco casas decimais. Para determinar o peso do tecido das colônias do coral *T. tagusensis*, o esqueleto (seco) de cada uma das colônias foi pesado após o processo de extração e subtraído do peso total das colônias.

2.2.3 Preparação dos extratos

Para a obtenção dos extratos as colônias foram colocadas, separadamente, em recipientes de vidro e embebidas em diclorometano (DCM) e metanol (1:1) e foram extraídas exaustivamente e sucessivamente em três intervalos (48h, 72h, 48h). Após cada extração o material foi filtrado e evaporado. Nas duas primeiras extrações, a evaporação foi realizada em capela e na última os extratos foram evaporados com auxílio de um rotaevaporador (Turbo Vap) em banho Maria, a uma temperatura de 50 °C para aumentar a eficiência no processo de evaporação dos solventes. O material remanescente foi pesado para determinar a concentração natural do extrato bruto das espécies coletadas, estabelecida a partir da relação entre o peso do extrato e volume (Figura 18A, 18B, 18C).

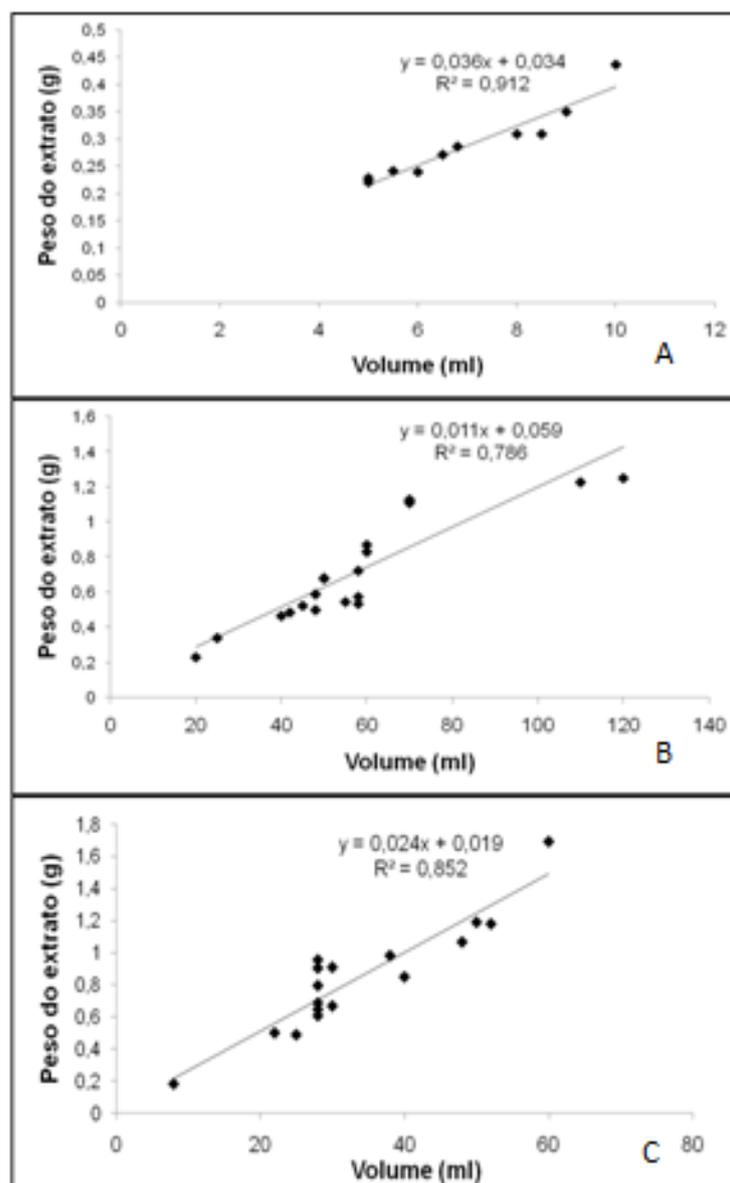


Figura 18: Gráficos dos potenciais competidores demonstrando a relação entre peso dos extratos e volume das colônias. Relação entre peso dos extratos e volume da esponja *Darwinella sp.* (A); Relação entre peso dos extratos e volume do zoantídeo *P. caribaeorum* (B); Relação entre peso dos extratos e volume do coral invasor *T. tagusensis* (C).

2.2.3 Experimentos de laboratório

2.2.3.1 *Tubastraea coccinea* Lesson 1829

Colônias de *T. coccinea* (Figura 19) foram coletadas na Ilha dos Porcos em Arraial do Cabo (RJ) através de mergulho autônomo. A coleta foi realizada com auxílio de marreta e espátula. As colônias foram armazenadas em sacos plásticos

com vedação e transportadas dentro de uma caixa térmica com água do mar para o Laboratório de Recursos Marinhos (LAREMAR) do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). No laboratório foi feita a retirada de organismos epibiontes com uma pinça.

As colônias foram mantidas em aquários com água do mar, aeração constante, temperatura de aproximadamente 22 °C e fotoperíodo 12:12 (claro:escuro). As colônias foram monitoradas diariamente a fim de detectar a liberação de larvas. As larvas de *T. coccinea* foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur e mantidas em béqueres de 2 litros. Nos bioensaios foram utilizadas larvas de no máximo 48 horas, já que nem sempre foi possível a obtenção em um único dia da quantidade necessária para a realização dos experimentos.



Figura 19: Colônia do coral invasor *Tubastraea coccinea* no costão rochoso da Ilha dos Porcos em Arraial do Cabo (RJ)

2.2.3.2 Preparação dos testes de assentamento e toxicidade

O efeito do extrato bruto dos potenciais competidores (*Darwinella sp.*, *P. caribaeorum* e *T. tagusensis*) foi testado em diferentes concentrações (100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01%) (tabela 1), sobre o assentamento e a mortalidade das larvas de *T. coccinea*. As concentrações de 10%, 1%, 0,1% e 0,01% foram obtidas através diluição da concentração natural (100%). O extrato foi solubilizado em diclorometano e metanol (1:1) e incorporado a béqueres de vidro com capacidade

para 10 ml, e deixado evaporar a temperatura ambiente. O controle foi constituído pelos solventes DCM e metanol (1:1), no mesmo volume utilizado nos tratamentos com os extratos, enquanto que, o controle nulo consistiu apenas de água do mar filtrada (controle padrão para o desenvolvimento natural dos organismos-testes). Cada condição experimental (extrato, controle e controle nulo) foi replicada oito vezes.

Tabela 1: Extrato bruto dos potenciais competidores do coral invasor *T. coccinea* em diferentes concentrações.

| Espécies | Concentrações (g/ml) | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|-------------|-----------|------------|-------------|
| | 0,01% | 0,1% | 1% | 10% | 100% |
| <i>Darwinella sp.</i> | 0,000005 | 0,00005 | 0,0005 | 0,005 | 0,05 |
| <i>Palythoa caribaeorum</i> | 0,00000125 | 0,0000125 | 0,000125 | 0,00125 | 0,0125 |
| <i>Tubastraea tagusensis</i> | 0,0000025 | 0,000025 | 0,00025 | 0,0025 | 0,025 |

A cada um dos béqueres foram adicionados 8 ml de água do mar filtrada e de 8 a 10 larvas de *T. coccinea*. Durante todo o experimento, as larvas foram mantidas na mesma temperatura de liberação (22 °C). Em laboratório, as larvas desta espécie podem permanecer competentes para o assentamento por um período de até 18 dias (Paula *et al.* 2014). Desta forma, para avaliar a atividade anti-incrustante do extrato, o número de larvas natantes e o número de larvas assentadas foi contabilizado diariamente durante 10 dias.

Os indivíduos considerados como assentados foram aqueles que se fixaram no substrato e sofreram metamorfose. Indivíduos que exibiram coloração turva; sofreram rompimento ou desintegração foram considerados como mortos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As premissas da ANOVA, normalidade e homeocedatiscidade, foram verificadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados que não atenderam as premissas citadas foram transformados para arcoseno, já que os dados de assentamento e mortalidade foram expressos em porcentagem.

O assentamento das larvas *T. coccinea* foram comparados entre o controle, o controle nulo e os tratamentos através da Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas. Nos casos em que foi detectada diferença significativa, o teste *a posteriori* de Fisher foi aplicado.

A significância da diferença na mortalidade das larvas de *T.coccinea* entre o controle, o controle nulo e os tratamentos foi testada através de uma ANOVA unifatorial. O teste *a posteriori* de Fisher (LSD) foi aplicado em todos os casos em que foi detectada diferença significativa. O nível de significância estabelecido foi $\alpha = 0,05$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Bioensaio com extrato bruto de *Darwinella sp.*

Mortalidade larvar

Houve mortalidade em todas as concentrações testadas do extrato bruto de *Darwinella sp.* e também no tratamento controle (com solvente) após 24 horas de exposição (Figura 20). A porcentagem das larvas mortas variou significativamente entre os tratamentos (ANOVA; $F_6 = 44,26$; $p < 0,05$). A mortalidade das larvas foi maior nas concentrações de 10% e 100% quando comparadas às demais concentrações do extrato bruto, ao controle e ao controle nulo. As duas maiores concentrações do extrato bruto (10% e 100%) não diferiram entre si. Nestas concentrações todas as larvas morreram após 24 horas de experimento. Não houve diferença significativa na mortalidade das larvas nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%.

A mortalidade em todas as concentrações com o extrato bruto foi significativamente maior comparadas ao controle nulo. Já em comparação com o controle com solvente apenas as concentrações de 1%, 10% e 100% foram significativamente maiores. Não houve diferença significativa entre os tratamentos controle com água do mar e solvente.

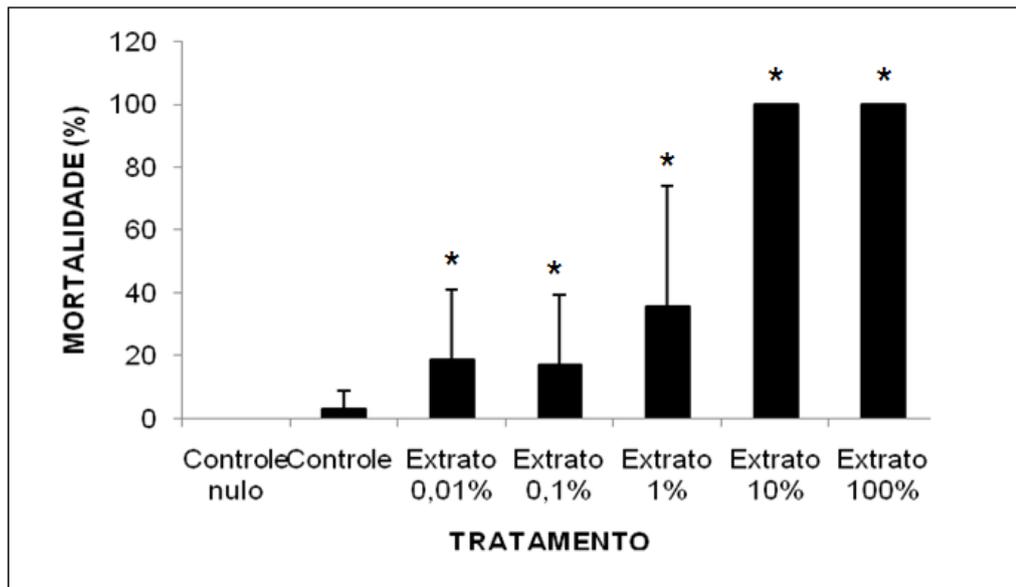


Figura 20: Média e desvio padrão correspondente a mortalidade das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto da esponja *Darwinella sp.* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

Assentamento larvar

A porcentagem de larvas assentadas variou significativamente (ANOVA; $F_{36}=3,02$; $p<0,05$) entre os tratamentos ao longo do experimento (Figura 21). É importante destacar que, as concentrações de 10% e 100% não foram utilizadas nas análises estatísticas de assentamento, devido à mortalidade de todas as larvas após o intervalo de 24h.

Nos tratamentos com extrato bruto de *Darwinella sp.* foi observado o assentamento larvar apenas nas concentrações de 0,01% e 0,1%, que não diferiram significativamente entre si. O assentamento na concentração de 1% não apresentou diferença significativa quando comparada à concentração de 0,1%, mas foi significativamente menor do que na concentração de 0,01%. O assentamento na concentração de 0,01% foi significativamente menor nos intervalos de T5 a T8 quando comparada ao controle nulo. Nas demais concentrações (0,1% e 1%) o assentamento foi significativamente menor do que no controle nulo a partir do quinto dia. O assentamento na concentração de 0,01% em comparação ao controle com solvente foi significativamente menor apenas no sétimo dia. Já as concentrações de 0,1% e 1% quando comparadas ao controle

com solvente apresentaram assentamento significativamente menor a partir do sétimo dia. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com água do mar e solvente.

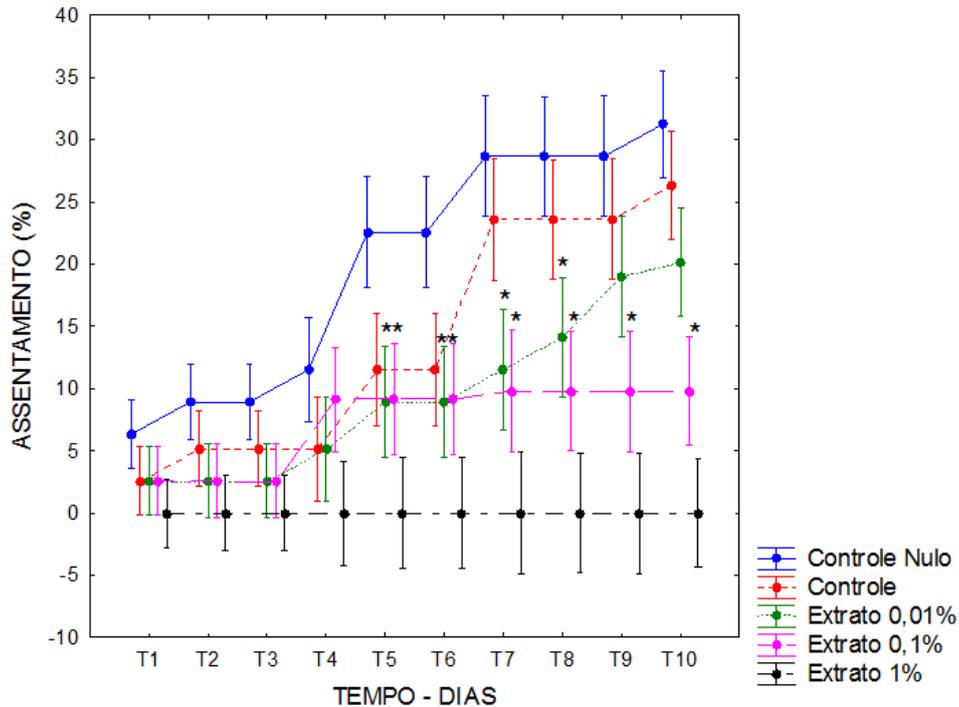


Figura 21: Média e intervalo de confiança correspondente ao assentamento das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto da esponja *Darwinella sp.* em três concentrações (0,01%, 0,1%,1%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 10 dias. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

2.3.2 Bioensaio com extrato bruto de *Palythoa caribaeorum*

Mortalidade larvar

Foi observada mortalidade das larvas de *T. coccinea* apenas nas concentrações de 10% e 100% do extrato bruto de *P. caribaeorum* (Figura 22). Todas as larvas morreram após 24 horas de exposição ao extrato na concentração 100%. A porcentagem das larvas variou significativamente entre os tratamentos (ANOVA; $F_6=1690, 64; p<0,05$). A porcentagem de larvas mortas nas concentrações de 10% e 100% do extrato bruto foi significativamente maior comparada aos outros tratamentos com extrato (0,01%, 0,1% e 1%) e aos

tratamentos controle (água do mar e solvente). A mortalidade foi significativamente maior na concentração de 100% do que na concentração de 10%. Não houve diferença significativa entre os tratamentos controle com água do mar, controle com solvente e as concentrações 0,01%, 0,1% e 1% do extrato bruto

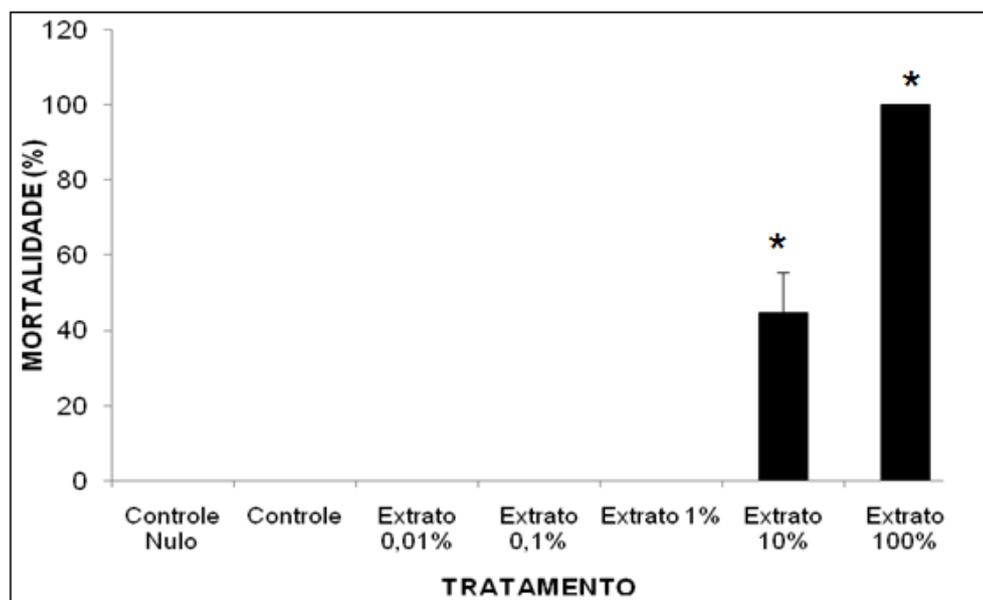


Figura 22: Média e desvio padrão correspondente a mortalidade das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do zoantídeo *P. caribaeorum* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

Assentamento larvar

Neste experimento foi observado assentamento larvar apenas a partir do quarto dia de experimento (Figura 23). A porcentagem de larvas assentadas variou significativamente (ANOVA; $F_{30} = 4,92$; $p < 0,05$) entre os tratamentos ao longo do tempo de experimento. É importante destacar que a concentração de 100% não foi utilizada nas análises estatísticas, pois todas as larvas morreram após 24h de exposição a essa concentração.

Nos tratamentos com extrato bruto de *T. coccinea* foi observado assentamento apenas nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%. Não houve diferença significativa no assentamento entre as duas menores concentrações do extrato bruto de *P. caribaeorum* (0,01% e 0,1%). A porcentagem de larvas assentadas foi significativamente maior na concentração de 0,01% nos dois últimos

dias de experimento quando comparada as concentrações de 1% e 10%. O assentamento na concentração de 0,01% do extrato bruto foi significativamente menor comparado ao tratamento controle apenas no sétimo e oitavo dias. Não foi observada diferença significativa no assentamento entre as concentrações de 0,1%, 1% e 10%. O assentamento larvar foi significativamente maior no tratamento controle nulo quando comparado a todos os tratamentos com extrato bruto do zoantídeo ao longo do experimento. O assentamento no controle com solvente foi significativamente maior a partir do sexto dia em comparação a concentração de 10%; a partir sétimo dia em comparação a concentração de 1% e a partir do oitavo dia quando comparado a concentração de 0,1%. A porcentagem de assentamento foi significativamente maior no controle com água do mar em comparação ao controle com solvente nos intervalos de T4 a T7 e T9 a T10.

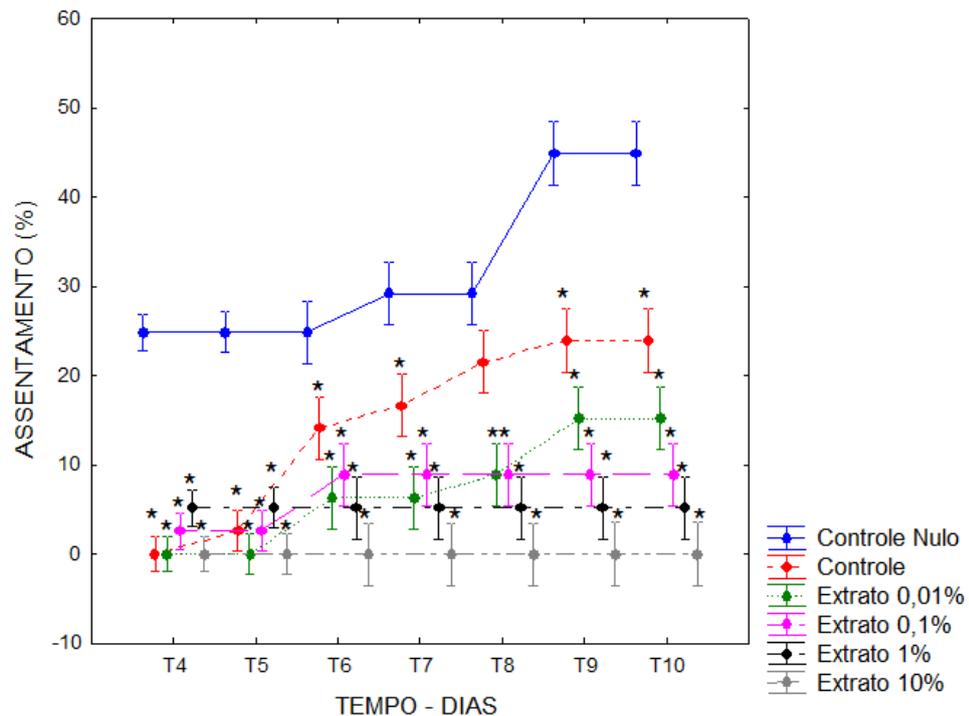


Figura 23: Média e intervalo de confiança correspondente ao assentamento das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do zoantídeo *P. caribaeorum*, em quatro concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 10 dias. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

2.3.3 Bioensaio com extrato bruto de *T. tagusensis*

Mortalidade larvar

Neste bioensaio foi observada a mortalidade nas larvas de *T. coccinea* expostas ao extrato bruto de *T. tagusensis* apenas nas concentrações de 1%, 10% e 100%, sendo que nas duas últimas concentrações, todas as larvas morreram após 24 horas (Figura 24). A porcentagem de larvas mortas variou significativamente entre os tratamentos (ANOVA; $F_6 = 955,11$; $p < 0,05$). A mortalidade nas concentrações de 1%, 10% e 100% do extrato bruto foi significativamente maior comparada aos demais tratamentos com extrato e aos controles com água do mar e solvente. A mortalidade foi significativamente menor na concentração de 1% quando comparada as concentrações de 10% e 100%, que não diferiram entre si. Não houve diferença significativa entre os tratamentos controle com água do mar, controle com solvente e as concentrações 0,01%, 0,1% do extrato bruto.

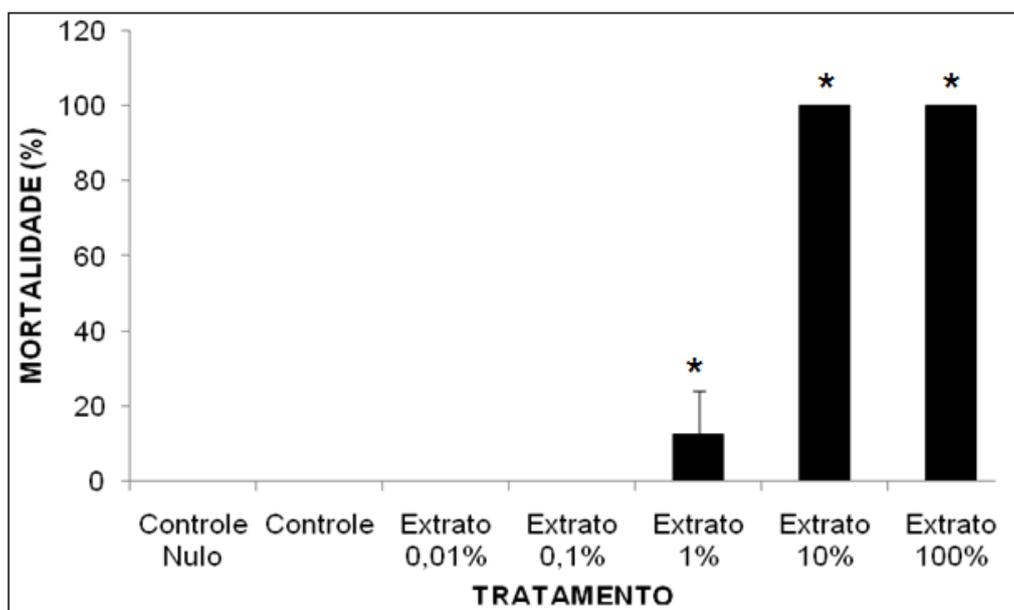


Figura 24: Média e desvio padrão correspondente a mortalidade das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. tagusensis* em cinco concentrações (0,01%, 0,1%, 1%, 10% e 100%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 24 horas. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

Assentamento larvar

Neste experimento, foi observado assentamento larvar (Figura 25) a partir do segundo dia de experimento. A porcentagem de larvas assentadas variou significativamente (ANOVA; $F_{32} = 5,49$; $p < 0,05$) entre os tratamentos ao longo do tempo de experimento. É importante destacar que, as concentrações de 10% e 100% não foram utilizadas nas análises estatísticas devido à mortalidade de todas as larvas após o intervalo de 24h de experimento. Nos tratamentos com extrato bruto de *T. tagusensis* foi observado o assentamento larvar apenas nas concentrações de 0,01% e 0,1%. A porcentagem de assentamento na concentração de 0,01% não diferiu do controle nulo, mas foi significativamente maior do que nas concentrações de 0,1% e 1% a partir do sexto dia. O assentamento na concentração 0,01% foi ainda significativamente maior do que no controle com solvente. O assentamento foi significativamente menor nas concentrações de 0,1% e 1% (que não diferiram entre si), quando comparado ao controle nulo a partir do sexto dia. Não houve diferença significativa entre o controle com solvente e as concentrações de 0,1% e 1%. O assentamento foi significativamente maior no tratamento controle nulo a partir do sexto dia quando comparado ao tratamento controle com solvente.

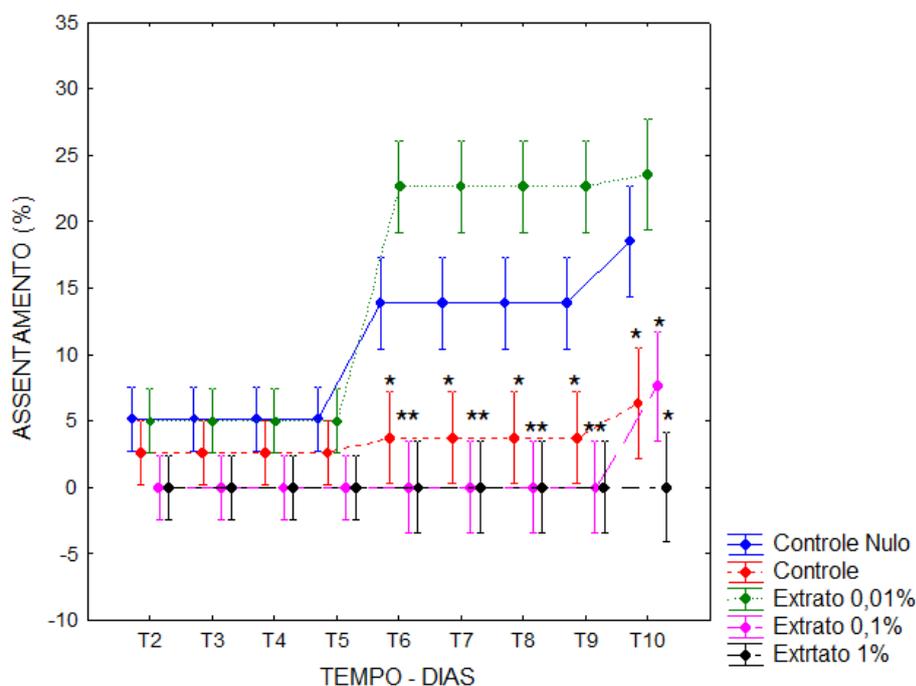


Figura 25: Média e intervalo de confiança correspondente ao assentamento das larvas do coral invasor *T. coccinea* expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. tagusensis* em três concentrações (0,01%, 0,1%, 1%) e dois tratamentos controle (água do mar e solvente) no período de 10 dias. Os asteriscos (*) indicam os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle com água do mar (controle nulo).

2. 4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito do extrato bruto de potenciais competidores (*Darwinella sp.*, *Palythoa caribaeorum* e *Tubastraea tagusensis*) sobre o assentamento e mortalidade de larvas do coral invasor *T. coccinea*. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que, em todas as concentrações testadas, o extrato bruto de *Darwinella sp.* foi tóxico para as larvas do coral invasor, principalmente as concentrações de 10% e 100%, visto que, todas as larvas morreram após o período de 24 horas de experimento. De forma semelhante, Costa (2016) também utilizou larvas do coral invasor *T. coccinea* para testar a toxicidade do composto 1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina (análogo ao encontrado em espécies de esponjas marinhas). Este composto não foi letal nas concentrações $\leq 10 \mu\text{g}/\text{m}$ e apresentou toxicidade nas concentrações $\geq 50 \mu\text{g}/\text{mL}$, que corresponde à concentração natural do extrato bruto da esponja *Darwinella sp.* testada no presente trabalho. De acordo com o trabalho realizado por Ramírez (2015), substâncias isoladas de *Darwinella cf. oxeata*. permitem propor que trata-se de uma espécie exótica no Estado do Rio de Janeiro, já que é encontrada em ambientes marinhos da Nova Zelândia. Esponjas deste gênero produzem uma variedade de metabólitos secundários que podem ser usados como forma de defesa contra predadores (Dowle, 2008). Além disso, o presente trabalho mostrou que substâncias químicas produzidas pela esponja apresentam efeitos deletérios para as larvas do coral invasor ocasionando a mortalidade das mesmas em determinadas concentrações.

Ainda no presente estudo, o assentamento ocorreu apenas nos tratamentos controle nulo, controle e nas concentrações de 0,01% e 0,1% do extrato bruto da esponja *Darwinella sp.*. Na concentração de 0,01%, o extrato não apresentou efeito (indutor ou inibidor) no assentamento larvar, visto que, não foi significativamente diferente do tratamento com água do mar no término do experimento. No entanto, nas concentrações de 0,1% e 1%, o extrato inibiu o assentamento das larvas do coral invasor. Em ambientes recifais, as esponjas são consideradas importantes

competidores por espaço, apresentando muitas vezes crescimento excessivo sobre as espécies vizinhas (Aerts & Soest, 1997). Além disso, também produzem substâncias químicas que funcionam como repelentes naturais inibindo o assentamento larvar ou provocando efeitos deletérios como necrose e morte em potenciais competidores (adultos e larvas) (Koh & Sweatman, 2000; Porter & Targett, 1998; Meurer *et al.* 2010).

Em relação aos efeitos do extrato de *P. caribaeorum* sobre as larvas de *T. coccinea*, apenas as concentrações de 10% e 100% apresentaram toxicidade aguda, sendo maior na última concentração, visto que, todas as larvas morreram após o período de 24 horas de experimento. O zoantídeo *P. caribaeorum* apresenta uma ampla distribuição na costa brasileira e é considerado um forte competidor, podendo crescer próximo ou sobre outros invertebrados sésseis (Suchanek e Green, 1981; Neves *et al.* 2002). Cnidários do gênero *Palythoa* produzem uma substância química considerada altamente tóxica, a palytoxina (Moore e Scheuer, 1971). Morton e colaboradores (1982) mostraram que esta toxina inibiu a motilidade de espermatozoides do ouriço marinho *Tripneustes gratilla*. No entanto, os efeitos da palytoxina no desenvolvimento larvar de invertebrados ainda são pouco estudados e conhecidos (Ramos & Vasconcelos, 2010).

No experimento de assentamento das larvas de *T. coccinea* expostas ao extrato bruto de *P. caribaeorum*, foram observadas larvas assentadas em todos os tratamentos, com exceção apenas das concentrações 100 e 10% do extrato bruto. As concentrações de 0,01%, 0,1% e 1% inibiram o assentamento larvar, visto que, a taxa de assentamento foi estatisticamente menor quando comparadas ao tratamento com água do mar. Um estudo similar realizado por Maida e colaboradores (1995) em laboratório mostrou que metabólitos secundários extraídos do octocoral *Sinularia flexibilis* incorporado a placas inibiu o assentamento das larvas de corais escleractíneos. Desta forma, metabólitos secundários produzidos por diferentes espécies de cnidários podem ter a mesma função ecológica, funcionando como repelentes naturais, impedindo o assentamento, recrutamento e colonização das larvas de espécies vizinhas (Koh & Sweatman, 2000).

O extrato bruto de *T. tagusensis* apresentou letalidade para as larvas de *T. coccinea* nas concentrações de 1%, 10% e 100%, sendo maior nas duas últimas

concentrações, visto que, todas as larvas morreram após o período de 24 horas de experimento. Um trabalho similar realizado por Mizrahi (2014) mostrou que o extrato bruto do antozoário *Carijoa riisei* apresentou alta toxicidade para as larvas do coral invasor *T. coccinea*, visto que, todas as larvas expostas ao extrato morreram no período máximo de 48 horas. Outro trabalho realizado com o extrato bruto do gênero *Tubastraea* na concentração natural afetou a motilidade das larvas do coral *Porites astreoides* após 12 horas de exposição (Oliveira, 2016). Vale ressaltar que, a escolha das espécies, assim como das concentrações a serem testadas, é de fundamental importância, já que cada uma pode apresentar resultados distintos dentro de um mesmo experimento ou em diferentes experimentos com a mesma abordagem.

O assentamento das larvas de *T. coccinea* expostas ao extrato bruto de *T. tagusensis* foi observado nos tratamentos controle nulo, controle e nas concentrações de 0,01% e 0,1%. A concentração de 0,01% não apresentou nenhum efeito (indutor ou inibidor) sobre assentamento larvar, visto que, não diferiu do tratamento com água do mar. No entanto, as concentrações de 0,1% e 1% apresentaram efeito inibidor no assentamento larvar. Corais do gênero *Tubastraea* produzem substâncias químicas que provocam necrose nos tecidos dos corais *Siderastrea stellata*, *Montastraea cavernosa* e *Madracis decactis* (Miranda *et al.* 2016); que afetam a motilidade das larvas do coral *Porites astreoides* (Oliveira, 2016); e são tóxicos para larvas de corais escleractíneos (Koh & Sweatman, 2000). Desta forma, a produção de substâncias químicas pelo coral invasor *T. tagusensis* é um mecanismo que auxilia na sua expansão, distribuição e colonização, visto que, é capaz de inibir o assentamento larvar ou mesmo matar as larvas de potenciais competidores.

Neste estudo, a concentração natural (100%) dos extratos de todas as espécies testadas, foi capaz de impedir o assentamento e ser altamente letal para as larvas do coral invasor *T. coccinea*. Desta forma, substâncias químicas bioativas produzidas pelos potenciais competidores podem estar funcionando como uma forma de controle da espécie invasora, impedindo maior expansão e colonização no ambiente invadido.

2.5 REFERÊNCIAS

AERTS, L. A. M., R.; VAN SOEST, W. M. Quantification of sponge/coral interactions in a physically stressed reef community, NE Colombia. *Marine Ecology Progress series*, v. 148, p. 125-134, 1997.

AYRE, D. J.; RESING, J. M. Sexual and asexual production of planulae in reef coral. *Marine Biology*, v. 90, p. 187-190, 1986.

BERS, A. V. Antifouling Protection at Different Scales - Multiple defence in *Mytilus edulis* and the global performance of mytilid microtopographies. Tese de Doutorado (Matemática e Ciências Naturais), Universidade de Kiel, Alemanha, 77 p, 2006.

BOXSHALL, A. J. The importance of flow and settlement cues to larvae of the abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*, v. 254, p. 143-167, 2000.

CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. BRAZILIAN CORAL REEFS: WHAT WE ALREADY KNOW AND WHAT IS STILL MISSING. *Bulletin of Marine Science*, v. 69, p. 357–371, 2001.

CAIRNS, S.D. Scleractinia of the temperate North Pacific. *Smithson. Contr. Zool.*, v. 557: 150 pp, 1994.

COHEN, A. N.; CARLTON, J. T. Accelerating Invasion Rate in a Highly Invaded Estuary. *Science*, v. 279 , p. 555 – 558, 1988.

COHEN, A. N. Overview of 2004/05 Rapid Assessment Shore and Channel Surveys for Exotic Species in San Francisco Bay. *Overview of Rapid Assessment Surveys*, p. 1 – 7, 2005.

COSTA, R. S. Avaliação ecotoxicológica e anti-incrustante de um glicerofosfolipídeo sintético análogo ao encontrado em esponjas marinhas. Dissertação de Mestrado (Dinâmica dos Oceanos e da Terra), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2016.

CREED, J. C. Two invasive alien azooxanthellate corals, *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*, dominate the native zooxanthellate *Mussismilia hispida* in Brazil. *Coral Reefs*, v. 25, p. 350, 2006.

DAHMS, H.-U.; JIN, T.; QIAN, P.-Y. Adrenoceptor Compounds Prevent the Settlement of Marine Invertebrate Larvae: *Balanus amphitrite* (Cirripedia), *Bugula neritina* (Bryozoa) and *Hydroides elegans* (Polychaeta). *Biofouling*, p. 1-9, 2004.

DENLEY, E. J.; UNDERWOOD, A. J. Experiments on factors influence settlement survival, and growth of two species of barnacles in new south wales. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, v. 36, p. 269-293, 1979.

DOWLE, K. O. New Nitrogenous Spongian Diterpenes from the New Zealand Marine Sponge *Darwinella oxeata*. Dissertação de Mestrado (Química), Victoria University of Wellington, Nova Zelândia, 2008.

FEARON, R. J.; CAMERON, A. N. N. M. Preliminary evidence supporting the ability of hermatypic corals to affect adversely larvae and early settlement stages of hard coral competitors. *Journal of Chemical Ecology*, v. 23, p. 1769 – 1780, 1997

HADFIELD, M. G. Biofilms and marine invertebrate larvae: What bacteria produce that larvae use to choose settlement sites. *Annu. Rev. Marine. Sci.* , v. 3, p. 453-470, 2011.

KOH, E. G. L.; SWEATMAN, H. Chemical warfare among scleractinians: bioactive natural products from *Tubastraea faulkneri* Wells kill larvae of potential competitors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 251, p. 141-160, 2000.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; FERREIRA, C. E. L.; PEREIRA, R. C. Chemical defense of an exotic coral as invasion strategy. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 328, p. 127 - 135, 2006.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. Proximity to competitors changes secondary metabolites of nonindigenous cup corals, *Tubastraea* spp. in the southwest Atlantic. *Mar Biol*, v. 159, p. 1551–1559, 2012.

LINDQUIST, N. Chemical defense of early life stages of benthic marine invertebrates. *Journal of Chemical Ecology*, v. 28, p. 1987 - 2000, 2002.

MAIDA, M.; SAMMARCO, P. W.; COLL, J. Effects of soft corals on scleractinian coral recruitment. I: Directional allelopathy and inhibition of settlement. *Marine Ecology Progress Series*, v. 121, 191 – 202, 1995.

MALDONADO, M.; YOUNG, C. M. Effects of physical factors on larval behavior, settlement and recruitment of four tropical demosponges. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 138, p. 169-180, 1996.

MEUER, B. C.; LAGES, N. S.; PEREIRA, O. A.; PALHANO, S.; MAGALHÃES, G. M. First record of native species of sponge overgrowing invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* in Brazil. *Marine Biodiversity Records*, v. 3, p. 1 – 3, 2010

MIRANDA, R. J.; CRUZ, I. C. S.; BARROS, F. Effects of the alien coral *Tubastraea tagusensis* on native coral assemblages in a southwestern Atlantic coral reef. *Marine Biology*, v. 163, p. 45, 2016.

MIZHARI, D. Influência de processos pré e pós-assentamento no padrão de ocorrência do coral sol, *Tubastraea coccinea*, no litoral norte do Estado de São Paulo. 2014. 158 p. Tese de Doutorado (Ciências), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, São Paulo, 2014.

MOORE R. E.; SCHEUER P. J. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science*, v. 172, p. 495-498, 1971

MORTON, B. E.; FRASER, C. F.; THENAWIDJAJA, M.; ALBAGLI, L.; RAYNER, M. D. Potent inhibition of sperm motility by palytoxin. *Experimental Cell Research*, v. 140, p. 261-265, 1982.

PAULA, A. F.; CREED, J. C. Spatial distribution and abundance of nonindigenous coral genus *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) around Ilha Grande, Brazil. *Braz. J. Biol.*, v. 65, p. 661-673, 2005.

PAULA, A. F. de; PIRES, D. de O.; CREED, J. C. Reproductive strategies of two invasive Sun corals (*Tubastraea* spp.) in the southwestern Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 93, p. 481–492, 2014.

PAWLIK, J. Chemical Ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol.*, v. 30, p. 273-335, 1992.

PORTER, J. W.; TARGETT, N. M. Allelochemical Interactions Between Sponges and Corals. *Biol. Bull.*, v. 175, p. 230 - 239, 1998.

OLIVEIRA, G. J. G. de. Efeito alelopático do extrato bruto dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis* sobre as larvas do coral nativo *Porites*

astreoides. Dissertação de Mestrado (Dinâmica dos Oceanos e da Terra), Universidade Federal Fluminense, Niterói, p. 44, 2016.

RAMOS, V.; VASCONCELO, V. Palytoxin and Analogs: Biological and Ecological Effects. *Marine Drugs*, p. 2021-2037, 2010.

RAMÍREZ, M. C. A. Terpenos rearranjados da esponja *Darwinella* sp. com potencial leishmanicida. Dissertação de Mestrado (Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, 112 p., 2015.

SUCHANEK, T. H.; GREEN, D. J. Interspecific competition between *Palythoa caribaeorum* and other sessile invertebrates on St. Croix Reefs, U. S. Virgin Islands. *Coral Reef Symposium*, v. 2, p. 679 – 684, 1981.

WALTERS, L. J.; HADFIELD, M. G.; SMITH. Waterborne chemical compounds in tropical macroalgae: positive and negative cues for larval settlement. *Marine Biology*, v. 126, p. 383-393, 1996.

WIECZOREK, S. K.; TODD, C. D. Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues. *Biofouling*, v. 12, p. 81-118, 1998.

CAPÍTULO 3: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO DE *TUBASTRAEA COCCINEA* LESSON, 1829

RESUMO

O coral invasor *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 é uma das primeiras espécies de corais escleractíneos invasores do Atlântico sul. Esta espécie azooxantelada e ahermatípica é originária do Pacífico. *Tubastraea coccinea* produz compostos químicos com funções ecológicas tais como defesa contra competidores, predadores e organismos incrustantes. A produção de tais compostos pode ser uma ferramenta poderosa que propicia a expansão, colonização e perpetuação desta espécie na costa brasileira. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi verificar a atividade antibacteriana do extrato bruto do coral invasor *T. coccinea*. O extrato bruto foi testado na concentração natural (100%) contra oito bactérias marinhas, das quais três são patogênicas (*Vibrio communis*, *Vibrio Corallilyticus* e *Vibrio alginolyticus*), quatro são incrustantes (*Vibrio estuarians*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Polibacter irgensis* e *Pseudomonas fluorescens*) e uma é corrosiva (*Shewanella putrefaciens*). Discos de papel filtro impregnados com: 1) o extrato bruto de *T. coccinea* solubilizado em diclorometano:metanol (1:1); 2) os solventes diclorometano:metanol (1:1); e 3) o antibiótico rifampicina foram colocados em placas de petri inoculadas com as bactérias para verificar o grau de sensibilidade aos tratamentos. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o extrato bruto do coral invasor produz substâncias químicas com grande potencial antibacteriano, já que inibiu o crescimento de duas bactérias marinhas patogênicas (*Vibrio communis* e *Vibrio Corallilyticus*) e duas bactérias responsáveis pela formação do biofilme marinho (*Polibacter irgensis* e *Shewanella putrefaciens*).

ABSTRACT

The orange cup coral *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 is one of the first species of scleractinian corals considered invasive to the South Atlantic. This azooxanthellate and ahermatypic species originates from the Indo-Pacific. *Tubastraea coccinea* produce chemical compounds with ecological functions such as defense against competitors, predators and fouling organisms. The production of these compounds can be a powerful tool that facilitates the expansion, colonization and perpetuation of this species in the Brazilian Coast. Therefore, the aim of this study was to verify the antibacterial activity of the crude extract of the invasive coral *T. coccinea*. The crude extract at the natural concentration was tested against eight marine bacteria, of which three are pathogenic (*Vibrio comunis*, *Vibrio Coralliliticus* and *Vibrio alginolyticus*), four are encrusting (*Vibrio estuarians*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Polibacter irgensis* and *Pseudomonas fluorescens*) and one is corrosive (*Shewanella putrefaciens*). Filter paper disks impregnated with: 1) the crude extract of *T. coccinea* solubilized in dichloromethane: methanol (1: 1); 2) the solvents dichloromethane: methanol (1: 1); and 3) the antibiotic rifampicin, were placed in petri dishes and inoculated with the bacteria to verify the degree of sensitivity to the treatments. The results obtained in this study showed that the crude extract of the invasive coral presents a high antibacterial potential, since it inhibited the growth of two pathogenic marine bacteria (*Vibrio communis* e *Vibrio Coralliliticus*) and two bacteria responsible for the formation of the marine biofilm (*Polibacter irgensis* e *Shewanella putrefaciens*).

3.1 INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é colonizado por uma variedade de micro-organismos (Benkendorff *et al.* 2001; Kelman *et al.* 2006), e muitos deles podem provocar efeitos deletérios em diversos organismos marinhos tais como peixes, corais, crustáceos, estrela do mar, por exemplo, (Santavy *et al.* 1999; Cervino *et al.* 2001; Ben-Haim *et al.* 2003; Austin & Zhang, 2006; Rivera-Posada *et al.* 2011). Além disso, outros micro-organismos estão presentes na formação do biofilme (primeira etapa da bioincrustação marinha), facilitando o assentamento e crescimento de macro-organismos, tais como cirripédios, mexilhões e briozoários, provocando vários problemas a indústria naval (Chambers *et al.* 2000; Cao *et al.* 2011). Ainda no ambiente marinho encontramos diversas espécies tais como esponjas, algas, octocorais que produzem substâncias químicas chamadas de metabólitos secundários que apresentam papéis ecológicos contra predadores, competidores, organismos incrustantes e também atividade contra micro-organismos marinhos, inibindo sua proliferação e crescimento; e impedindo também o processo de infecção (Devi *et al.* 1997; Hellio *et al.* 2000; Zheng *et al.* 2001; Kelman *et al.* 2006; Gochfeld & Aeby, 2008; Qi *et al.* 2008; Lages *et al.* 2006, Lages *et al.* 2010a,b; Limna Mol *et al.* 2010). Corais escleractíneos, embora menos estudados do que os corais moles, também produzem substâncias químicas com diversos papéis ecológicos, tais como defesa contra predadores (Lages *et al.* 2010 a), organismos incrustantes (Lages *et al.* 2010 a), competidores (Koh & Sweatman, 2000; Lages *et al.* 2012; Miranda *et al.* 2016), atividade antibacteriana (Koh 1997; Kelman *et al.* 2006; Gochfeld & Aeby, 2008) e atividade citotóxica (Guella *et al.* 1988; Cachet *et al.* 2013).

Tubastraea coccinea Lesson, 1829 (Scleractinia: Dendrophyllidae), conhecido como coral sol é uma das primeiras espécies de corais escleractíneos invasores do Atlântico sul. Esta espécie, originária do Pacífico, não apresenta associação com algas simbióticas (zooxantelas) e não é formadora de recifes (ahermatípica) (Cairns, 1994; Paula & Creed, 2005). Creed (2006) demonstrou que este coral produz substâncias bioativas capazes de provocar efeitos deletérios (necrose) em colônias do coral nativo *Mussimilia hispida*. Em experimentos de campo, o extrato bruto do coral invasor mostrou ser um mecanismo de defesa contra predadores

(peixes generalistas) e inibiu o crescimento de algas incrustantes, tais como *Cladophora* sp. e *Lithophyllum* sp. (Lages *et al.* 2010 a). Além disso, foi demonstrado no capítulo 1 que o extrato bruto desta espécie foi capaz de inibir o assentamento de larvas de organismos incrustantes nas concentrações de 0,1%, 1%, 10% e 100%; foi altamente tóxico nas duas maiores concentrações (10%, 100%), visto que, todas as larvas morreram após o período de 24 horas; e induziu as larvas de coespecíficos na menor concentração testada (0,01%). As substâncias químicas de defesa produzidas por espécies de corais do gênero *Tubastraea*, além de funcionar como uma ferramenta de defesa parece ter um papel importante no processo de expansão, colonização e perpetuação em novos habitats (Lages *et al.* 2010 b; Moreira e Creed, 2012; Lages *et al.* 2015).

Tendo em vista que *T. coccinea* é capaz de produzir substâncias químicas com diferentes ações ecológicas, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato bruto desse coral sobre o crescimento de oito bactérias marinhas.

As bactérias selecionadas para o presente estudo foram: três bactérias patogênicas (*Vibrio communis*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio Corallilyticus*), quatro incrustantes (*Vibrio estuarians*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Polibacter irgensis* e *Pseudomonas fluorescens*) e uma corrosiva (*Shewanella putrefaciens*). Vale ressaltar que, as bactérias patogênicas não são específicas de coral, infectando também outros grupos como peixes, equinodermos, crustáceos, por exemplo, (Santavy *et al.* 1999; Cervino *et al.* 2001; Ben-Haim *et al.*, 2003; Austin & Zhang, 2006; Rivera-Posada *et al.* 2011, Ye *et al.* 2016). Nos corais, estas bactérias são responsáveis pela lise e necrose tecidual, branqueamento, fotoinibição das zooxantellas, síndrome do branco e doença de banda amarela (Santavy *et al.* 1999; Cervino *et al.* 2001; Cervino *et al.*, 2008; Zhenyu *et al.* 2013). O Laboratório de Biofilme do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira disponibiliza as bactérias (IEAPM) para utilização nos diversos tipos de bioensaios. Desta forma, optou-se em testar o extrato bruto do coral invasor em todas as bactérias marinhas disponíveis neste laboratório para avaliar sua atividade antibacteriana.

A hipótese testada nesse estudo foi:

H₁: O extrato bruto de *T. coccinea* inibe o crescimento das bactérias marinhas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta e triagem dos organismos

Colônias de *Tubastraea coccinea* foram coletadas no costão da Ilha dos Porcos em Arraial do Cabo (RJ), através de mergulho autônomo, em uma profundidade de aproximadamente 7 m. Após a coleta, os organismos foram colocados separadamente em sacos plásticos com água do mar e armazenados em uma caixa térmica. Os espécimes foram levados para o Laboratório de Recursos Marinhos (LAREMAR) no Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, onde se fez a retirada dos organismos epibiontes com o auxílio de uma pinça.

3.2.2 Peso e volume dos organismos

As colônias coletadas foram devidamente identificadas para determinar o peso úmido e volume. O volume foi determinado através do deslocamento de líquido em proveta graduada, após a imersão dos organismos e o peso úmido utilizando balança de precisão com cinco casas decimais. Após este procedimento, as colônias foram congeladas. Após serem retiradas do freezer, as colônias foram liofilizadas para que toda água fosse removida de seus tecidos. Em seguida, obteve-se o peso seco das colônias utilizando balança de precisão com cinco casas decimais. Para determinar o peso do tecido, após a extração, o esqueleto (seco) de cada uma das colônias foi pesado e este foi subtraído do peso total da colônia.

3.2.3 Preparação dos extratos

Para a extração, as colônias foram colocadas, separadamente, em recipientes de vidro e embebidas em diclorometano e metanol (1:1) e foram extraídas sucessivamente em três intervalos (48h, 72h, 48h). Após cada extração o material foi filtrado e evaporado. Nas duas primeiras extrações, a evaporação foi realizada em capela e na última, os extratos foram evaporados com auxílio de um rotaevaporador (Turbo Vap) em banho Maria, a uma temperatura de 50 °C, para

aumentar a eficiência no processo de evaporação dos solventes. O material remanescente foi pesado para determinar a concentração natural do extrato.

Para determinar a concentração natural a ser utilizada nos bioensaios, foi estabelecida a relação entre o peso do extrato e volume das colônias de *T. coccínea*.

3.2.4 Bioensaio da atividade antibacteriana do extrato bruto de *T. coccínea*

3.2.4.1 Organismos testados

Para realização dos bioensaios foram utilizadas sete espécies de bactérias marinhas Gram negativas, sendo três bactérias patogênicas (*Vibrio comunis*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio Corallilyticus*), quatro incrustantes (*Vibrio estuarians*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Polibacter irgensis* e *Pseudomonas fluorescens*) e uma espécie de bactéria marinha Gram positiva corrosiva (*Shewanella putrefaciens*). As bactérias utilizadas nos bioensaios foram disponibilizadas pelo Laboratório de Biofilme do IEAPM.

3.2.4.2 Preparação do meio de cultura e Crescimento bacteriano

No laboratório de Biofilme do IEAPM, a preparação do meio sólido consistiu na mistura de 37,4 g de Luria-Bertani (LB) ágar e 20g de ágar sólido em 1L de água destilada. Já o meio líquido foi preparado com 37,4 g de LB ágar em 1L de água destilada. Os meios (sólido e líquido) foram autoclavados a uma temperatura de 120 °C, durante 30 minutos. Após a preparação dos meios de cultura, 1000 µl de bactérias foram crescidas em meio sólido vertidas em placas de petri (90 x 15 mm) e deixadas por 48 horas na estufa a uma temperatura de 30 °C. Após este intervalo, as bactérias foram colocadas em 5 µl de meio líquido com o auxílio de uma alça estéril e deixadas na estufa por mais 24 horas a mesma temperatura. Essas etapas foram realizadas com a finalidade de aumentar a densidade ótica (OD) (forma mais simples de inferir a biomassa de micro-organismos) das bactérias, que foi calculada com o auxílio do espectrofotômetro, variando de 1.9 - 2.1 no comprimento de onda de 630 nm.

3.2.5 Teste de sensibilidade em discos

Placas de petri com meio de cultura foram preparadas, inoculadas com 3 µl de bactérias e deixadas para secar durante 5 minutos dentro da capela. Discos de papel filtro estéreis com 5 mm de diâmetro embebidos com: 1) solvente (DCM e metanol) (controle negativo); 2) com o extrato bruto de *T. coccinea*; e 3) com antibiótico rifampicina (controle positivo) foram colocados em uma mesma placa já inoculada (Figura 26A). Este procedimento foi replicado cinco vezes para cada bactéria testada. Por fim, as placas foram incubadas a 30 °C durante 24 horas. O grau de sensibilidade dos organismos foi determinado através da medição da zona de inibição, em milímetros com auxílio de uma régua de 30 cm (Figura 26B). A média e o desvio padrão da zona de inibição foram calculados para cada tratamento. A zona de inibição foi categorizada como: baixa (1 - 2 mm), moderada (3 - 5 mm) e alta (> 5 mm) (Limna Mol *et al.* 2010).

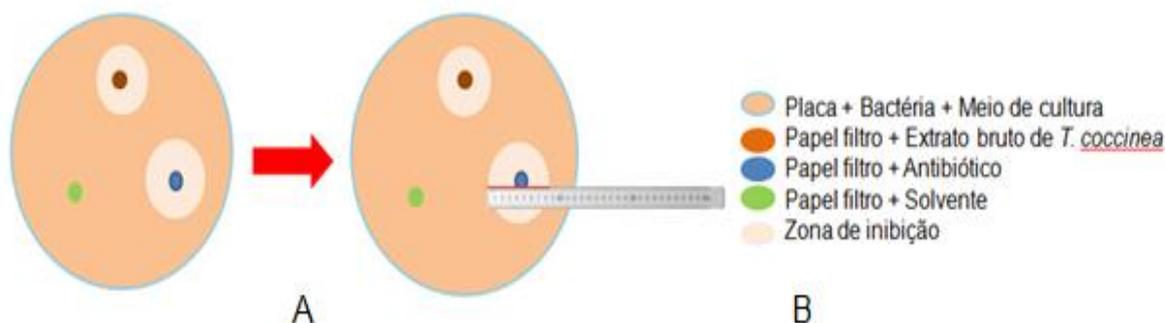


Figura 26: Atividade antibacteriana: crescimento de bactérias marinhas expostas ao extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* na concentração natural, ao controle positivo com antibiótico e ao controle negativo com os solventes DCM: metanol (1:1) (A); medição da zona de inibição em milímetros com o auxílio de uma régua de 30 cm (B).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Teste de sensibilidade em discos

Os resultados obtidos (Tabela 2) no presente estudo mostraram que o extrato bruto apresentou atividade moderada contra duas espécies de bactérias patogênicas, *Vibrio communis* e *Vibrio Corallilyticus*, com zona de inibição média

de 4,8 mm e 3,6 mm, respectivamente. Mas, não apresentou atividade contra a bactéria patogênica *Vibrio alginolyticus*, visto que, a zona de inibição média foi zero. Quanto às bactérias incrustantes, o extrato bruto apresentou alta atividade contra a bactéria *Polibacter irgensis*, com zona de inibição média de 9,6 mm. No entanto, não apresentou atividade (zona de inibição foi zero) contra as bactérias incrustantes *Vibrio estuarians*, *Pseudoalteromonas elyakovii* e *Pseudomonas fluorescens*. Por fim, em relação à atividade antibacteriana contra a bactéria corrosiva *Shewanella putrefaciens*, o extrato bruto mostrou atividade moderada com zona de inibição média de 4,8 mm.

Em relação ao tratamento controle com antibiótico, foi observado que o mesmo inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas. O antibiótico apresentou atividade moderada contra as bactérias incrustantes *Polibacter irgensis* e *Pseudoalteromonas elyakovii*, com zonas de inibição média de 3,2 e 3,4, respectivamente. Já para as bactérias *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio alginolyticus*, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio communis*, *Vibrio estuarians*, *Vibrio Coralliliticus*, o antibiótico apresentou alta atividade com zona de inibição média de 10mm - 13,2mm - 14,4mm - 15,8mm - 16,2mm - 17,4mm, respectivamente. O tratamento controle com solvente só teve efeito inibidor de crescimento contra uma bactéria testada (*Vibrio communis*), apresentando atividade moderada com zona de inibição média de 3,4 mm.

Tabela 2: Média e desvio padrão do crescimento de bactérias marinhas expostas a diferentes tratamentos: extrato bruto do coral invasor *T. coccinea* na concentração natural, controle negativo representado pelos solventes diclorometano:metanol (1:1) e o controle positivo representado pelo antibiótico rifampicina.

| Bactérias | Extrato bruto <i>T.coccinea</i> Concentração Natural | Controle (solvente) | Controle (antibiótico) |
|------------------------------------|---|------------------------|---------------------------|
| <i>Shewanella putrefaciens</i> | 4,8 ± 4,6 | 0 | 14,4 ± 0,89 |
| <i>Vibrio estuarians</i> | 0 | 0 | 16,2 ± 1,3 |
| <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> | 0 | 0 | 3,4 ± 4,9 |
| <i>Polibacter irgensis</i> | 9,6 ± 5,7 | 0 | 3,2 ± 4,3 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0 | 0 | 10 ± 6,0 |
| <i>Vibrio comunis</i> | 4,8 ± 4,4 | 3,4 ± 4,7 | 15,8 ± 2,8 |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | 0 | 0 | 13,2 ± 2,4 |
| <i>Vibrio Coralliliticus</i> | 3,6 ± 4,9 | 0 | 17,4 ± 1,8 |

Zona de inibição de 1 a 2 mm = baixa atividade; 3 a 5 mm = moderada atividade; > 5 mm = alta atividade (Limna Mol et al. 2010).

3.4 DISCUSSÃO

O presente trabalho explorou a atividade antibacteriana do extrato bruto do coral *T. coccinea* contra diferentes espécies de bactérias marinhas (3 patogênicas, 4 incrustantes e 1 corrosiva). Estudos anteriores comprovaram que as substâncias químicas produzidas por esta espécie de coral funcionam como uma ferramenta de defesa contra predadores, competidores e organismos incrustantes (Creed, 2006, Lages *et al.* 2010 a,b). Entretanto, não há nenhum estudo testando sua atividade antibacteriana. Desta forma, o presente trabalho é importante, porque contribui para novas descobertas do potencial dessas substâncias produzidas pelo coral.

Neste estudo o extrato bruto do coral invasor inibiu o crescimento de duas bactérias patogênicas (*Vibrio communis* e *Vibrio Corallilyticus*) mostrando que é eficiente na defesa contra determinados patógenos. No entanto, um estudo realizado em laboratório por Terra (2016) mostrou que, estas espécies de bactérias quando inoculadas em altas concentrações no tecido do coral a uma temperatura de 28 °C são capazes de causar infecção, provocando diversos efeitos deletérios, tais como lise do tecido e manchas escuras, acarretando na morte do coral. Vale ressaltar que, a inoculação direta das bactérias no tecido do coral, ultrapassa a barreira natural de proteção química que o coral possui. Deste modo, mais experimentos são necessários para fornecer respostas quanto à defesa química do coral, quando este se encontra em ambientes com altas temperaturas e grande proliferação destas bactérias.

Bactérias do gênero *Vibrio* estão amplamente distribuídas em ambientes aquáticos, principalmente nos oceanos, vivendo livremente ou em associação com organismos simbiotes (Thompson *et al.* 2004, Xie *et al.* 2005; Chimetto *et al.* 2011). Tanto o *Vibrio communis* quanto o *Vibrio corallilyticus* são patógenos de uma variedade de organismos aquáticos tais como peixes, crustáceos, corais e estrelas do mar (Santavy *et al.* 1999; Cervino *et al.* 2001; Ben-Haim *et al.*, 2003; Austin & Zhang, 2006; Rivera-Posada *et al.* 2011). Em corais, essas bactérias podem causar fotoinibição das zooxantelas, lise e necrose tecidual, branqueamento e uma doença denominada de banda amarela (yellow band), caracterizada por manchas circulares com coloração amarelada na borda, devido à

destruição de algas simbiôntes (Santavy *et al.* 1999; Cervino *et al.* 2001; Cervino *et al.*, 2008), podendo acarretar a morte dos corais.

A proliferação e infecção desses patógenos estão fortemente associadas ao aumento da temperatura da água do mar e poluição (Alves Jr. *et al.* 2010; Santos *et al.* 2011; Kimes *et al.* 2012). Um estudo semelhante realizado no Havai avaliou a atividade antibacteriana do extrato bruto de três espécies de corais (*Montipora capitata*, *Porites lobata* e *Pocillopora meandrina*) e mostrou que todos os organismos testados foram capazes de inibir o crescimento da bactéria *V. coralliilyticus* (Gochfeld & Aeby, 2008). Outro estudo testou o extrato bruto de seis espécies de corais escleractíneos (*Acropora variabilis*, *Fungia scutaria*, *Fungia granulosa*, *Turbinaria sp.*, *Stylophora pistillata* e *Favia fava*) contra quatro cepas de bactérias marinhas (*Arthrobacter sp.* KP17, *Arthrobacter sp.* Muzt-E04, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio sp.* 1B07) do Mar Vermelho. Das seis espécies testadas apenas os extratos de *Fungia scutaria*, *Fungia granulosa* e *Turbinaria sp.* apresentaram atividade antibacteriana (Kelman *et al.* 2006).

Em relação à atividade contra bactérias incrustantes, o extrato bruto de *T. coccinea* inibiu apenas o crescimento da bactéria *Polibacter irgensis*. A primeira etapa da bioincrustação marinha é caracterizada pela formação do biofilme, que facilita a proliferação de micro-organismos, o assentamento e crescimento de macro-organismos (Cao *et al.* 2011). O assentamento e acúmulo de organismos marinhos em substratos tais como cascos de navios provocam vários danos à industrial naval como aumento do arrasto hidrodinâmico, diminuição na capacidade de manobra do navio, aumento no consumo de combustível, consumo extra de energia, custos altos para a manutenção e aumento da corrosão (Chambers *et al.* 2000; Shan *et al.* 2011) e facilita a introdução de espécies invasoras (Souza *et al.* 2009; Dafforn *et al.* 2011). Limna Mol e colaboradores (2010) também apresentaram resultados quanto à inibição do crescimento das bactérias incrustantes *Pseudomonas chlororaphis* e *Bacillus cereus* quando expostas ao extrato bruto das esponjas *Fasciospongia cavernosa* e *Oceanapia fistulosa*, mostrando uma alta atividade com de zona de inibição ≥ 8 mm. Desta forma, substâncias químicas produzidas por organismos marinhos podem ser uma alternativa mais promissora para evitar ou reduzir o processo de bioincrustação e os seus impactos no ambiente marinho (Chambers *et al.* 2014; Ribeiro, 2005).

Além disso, a produção de substâncias químicas produzidas por várias espécies marinhas podem impedir que organismos incrustantes colonizem sua superfície, tendo desta forma um papel importante na proteção das mesmas (Gerhart *et al.* 1988). Do mesmo modo, a inibição dessas bactérias pelo extrato bruto do coral invasor pode inibir a formação do biofilme e conseqüentemente proteger o coral contra o crescimento de organismos incrustantes, tais como cracas, hidróides, algas, entre outros e aumentar as chances de sobrevivência em diferentes habitats marinhos e substratos artificiais, facilitando também sua entrada e dispersão em novas localidades.

Ainda neste estudo, a bactéria corrosiva *Shewanella putrefaciens* também teve seu crescimento inibido pelo extrato bruto do coral invasor. Esta bactéria é capaz de aderir em diferentes tipos de substratos e formar o biofilme (Bagge *et al.* 2001). Além disso, a aderência desta bactéria em superfícies de aço inoxidável é responsável pela corrosão a partir da redução de óxidos de Mn e Fe em condições anóxicas (Dichristina & DeLong, 1993). Uma vez que existem condições para a formação do biofilme (fator biológico que influencia na corrosão), é de extrema importância que se busque alternativas que possibilitem a prevenção ou remoção dos organismos formadores do biofilme (Silva, 2011). Com intuito de minimizar os impactos gerados pela corrosão, a utilização de substâncias químicas produzidas por organismos marinhos pode ser uma forma mais eficiente para resolver esta problemática, já que estão envolvidos em diversas funções ecológicas.

É importante ressaltar que, o fato de não ocorrer inibição do crescimento bacteriano, não indica necessariamente que as bactérias não foram afetadas, pois as substâncias químicas produzidas pelos organismos marinhos podem agir seletivamente em partículas fenotípicas ou características que são expressas pelas bactérias (Kelman *et al.* 2006). Os resultados reportados no presente estudo demonstraram que as substâncias químicas produzidas pelo coral invasor têm grande potencial de defesa contra bactérias marinhas específicas, já que foram eficientes na inibição do crescimento das mesmas.

3.5 REFERÊNCIAS

AUSTIN, B.; ZHANG, X-H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Microbiology*, v. 44, p.119–124, 2006.

ALVES JR., N.; NETO, O. S. M.; SILVA, B. S. O.; MOURA, R. L. de, FRANCINI-FILHO, R. B.; CASTRO, C. B.; PARANHOS, R.; BITNER-MATHE, B. C.; KRUGER, R. H.; VICENTE, A. C. P.; THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L. Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. *Environmental Microbiology Reports*, v. 2, p. 90–95, 2010.

BAGGE, D.; HJELM, M.; JOHANSEN, C.; HUBER, I.; GRAM, L. *Shewanella putrefaciens* Adhesion and Biofilm Formation on Food Processing Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 2319–2325, 2001.

BEN-HAIM, Y.; ZICHERMAN-KEREN; ROSENBERG, E. Temperature-Regulated Bleaching and Lysis of the Coral *Pocillopora damicornis* by the Novel Pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4236–4242, 2003.

BENKENDORFF, K.; DAVIS, A. R.; BREMNER, J. B. Chemical Defense in the Egg Masses of Benthic Invertebrates: Na Assessment of Antibacterial Activity in 39 Mollusks and 4 Polychaetes. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 78, 109–118 2001.

CACHET, N.; LOFFREDO, L.; VICENTE, O. O.; THOMAS, O. P. Chemical diversity in the scleractinian coral *Astroides calycularis*. *Phytochemistry Letter*, v. 6, p. 205 – 208, 2013.

CAIRNS, S.D. Scleractinia of the temperate North Pacific. *Smithson. Contr. Zool.*, v. 557: 150 pp, 1994.

CAO, S.; WAHG, J. D.; CHEN, H. S; CHEN, D. R. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin*, v. 56, p. 598-612. 2011.

CERVINO, J.M., GOREAU, T.J., NAGELKERKEN, I., SMITH, G.W. HAYES, R. Yellow band and dark spot syndromes in Caribbean corals: distribution, rate of spread, cytology, and effects on abundance and division rate of zooxanthellae. *Hydrobiologia*, v. 460, p. 53–63, 2001

CERVINO, J.M.; THOMPSON, F.L.; GOMEZ-GIL, B.; LORENCE, E. A.; GOREAU, T. J.; HAYES, R. L.; WINIARSKI-CERVINO, K. B.; SMITH, G. W.; HUGHERN, K.; BARTELS, E. The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105 p. 1658–1671, 2008.

CHAMBERS, S. A. Epitaxial growth and properties of thin Im oxides. *Surface Science Reports*, v. 39 p. 105 - 180, 2000.

CHAMBERS, L. D.; WHARTON, J. A.; WOODA, R. J. K.; WALSHA, F. C.; STOKESA, K. R. Techniques for the measurement of natural product incorporation into an antifouling coating. *Progress in Organic Coatings*, v. 77, p. 473-484, 2014.

CHIMETTO, L. A.; CLEENWERCK, I.; ALVES, N.; SILVA, B. S.; BROCCHI, M.; WILLEMS, VOS, P. de, THOMPSON, F. L. *Vibrio communis* sp. nov., isolated from the marine animals *Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p. 362–368, 2011.

CREED, J. C. Two invasive alien azooxanthellate corals, *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*, dominate the native zooxanthellate *Mussismilia hispida* in Brazil. *Coral Reefs*, v. 25, p. 350, 2006.

DAFFORN, K. A.; LEWIS, J. A.; JOHNSTON, E. L. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 453 - 465, 2011.

DEVI, P.; SOLIMABI, W.; D'SOUZA, L.; SONAK, S.; KAMAT, S. Y.; SINGBAI, Y. S. Screening of Some Marine Plants for Activity against Marine Fouling Bacteria. *Botanica Marina*, v. 40, p. 87-91, 1997.

DICHRISTINA, T. J., E. F. DELONG. Design and application of rRNA targeted oligonucleotide probes for the dissimilatory iron- and manganese-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, p. 4152 – 4160, 1993.

GERHART, D. G.; RITTSCHOF, D.; MAYO, S. W. CHEMICAL ECOLOGY AND THE SEARCH FOR MARINE ANTIFOULANTS: Studies of a Predator-Prey Symbiosis. *Journal of Chemical Ecology*, v. 14, p. 1905 - 1917, 1988.

GOCHFELD, D. J.; AEBY, G. S. Antibacterial chemical defenses in Hawaiian corals provide possible protection from disease. *Marine Ecology Progress Series*, v. 362, p.119–128, 2008.

GUELLA, G.; MANCHI, I.; ZIBROWIUSBF, H.; F' IETRA, F. 87. Novel Aplysinopsin-Type Alkaloids from Scleractinian Corals the Family Dendrophylliidae of the Mediterranean and the Philippines. Configurational-Assignment Criteria, Stereospecific Synthesis, and Photoisomerization. *Helvetica Chimica Acta*, v.71, p.773-782, 1988

HELIO, C.; BREMER, G.; PONS, A. M.; LE GAL, Y.; BOURGOUGNON, N. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 54, p. 543 - 549, 2000.

KELMAN, D.; KASHMAN, Y.; ROSENBERG, E.; KUSHMARO, A.; LOYA, Y. Antimicrobial activity of Red Sea corals. *Marine Biology*, v. 149, p. 357–363, 2006.

KIMES, N. ME.; GRIM, C.J.; JOHNSON, W. R.; HASAN, N. A; TALL, B. D.; KOTHARY, M. H.; KISS, H.; MUNK, A. C.; TAPIA, R.; GREEN, L.; DETTER, C.; BRUCE, D. C.; BRETTIN, T. S.; COLWELL, R. R.; MORRIS, P. J. Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *International Society for Microbial Ecology*, v. 6, p.835 - 846, 2012.

KOH, E.G.L. Do scleractinian corals engage in chemical warfare against marine microbes? *Journal Chemical Ecology*, v. 23, p. 379–398, 1997.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; FERREIRA, C. E. L.; PEREIRA, R. C. Chemical defense of an exotic coral as invasion strategy. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 328, p. 127 - 135, 2006.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; PINTOS, A. C.; CREED, J.C. Chemical defenses against generalist fish predators and fouling organisms in two invasive ahermatypic corals in the genus *Tubastraea*. *Marine Ecology*, v. 31, p. 473 - 482, 2010 a.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. Chemical composition and release in situ due to injury of the invasive coral *Tubastraea* (Cnidaria, scleractinia)*. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 58, p. 47-56, 2010 b.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; CREED, J. C. A Review of the Ecological Role of Chemical Defenses in Facilitating Biological Invasion by Marine Benthic Organisms. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 46, p. 1-26, 2015.

LIMNA MOL, V. P.; RAVEENDRAN, T. V.; ABHILASH, K. R.; PARAMESWARAN, P. S. Inhibitory effect of Indian Sponge extracts on bacterial strains and larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, v. 64, p. 506 - 510, 2010.

MIRANDA, R. J.; CRUZ, I. C. S.; BARROS, F. Effects of the alien coral *Tubastraea tagusensis* on native coral assemblages in a southwestern Atlantic coral reef. *Marine Biology*, v. 163, p. 45, 2016.

MOREIRA, T. S. G.; CREED, J. Invasive, non-indigenous corals in a tropical rocky shore environment: No evidence for generalist predation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 438, p. 7 - 13, 2012.

PAULA, A. F.; CREED, J. C. Spatial distribution and abundance of nonindigenous coral genus *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) around Ilha Grande, Brazil. *Braz. J. Biol.*, v. 65, p. 661-673, 2005.

QI, S. H.; ZHANG, S.; YANG, L. H.; QIAN, P. Y. Antifouling and antibacterial compounds from the gorgonians *Subergorgia suberosa* and *Scripearia gracillis*. *Natural Product Research*, v. 22:2, p. 154-166, 2008.

RIBEIRO, A. Produtos Naturais da alga parda marinha *Styopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta) do litoral brasileiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niterói, p. 192, 2005.

RIVERA-POSADA, J. A; PRATCHETT, M.; CANO-GOMES, A; ARANGO-GOMEZ, J. D.; OWENS, L. Injection of *Acanthaster planci* with thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar (TCBS). I. Disease induction. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 97, p. 85–94, 2011.

SANTAVY, D.L., PETERS, E.C., QUIROLO, C., PORTER, J.W. AND BIANCHI, C.N. Yellow blotch disease outbreak on reefs of the San Blas Islands, Panama. *Coral Reefs* v.18, p. 97, 1999.

SANTOS, A. O.; dos., BRITTA, E. A.; BIANCO, E. M.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. F.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. 4-Acetoxydolastane

Diterpene from the Brazilian Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis* as Antileishmanial Agent. *Marine Drugs*, v. 9, p. 2369-2383, 2011.

SILVA, A. G.; LIMA, R. P., GOMES, A. N.; FLEURY, B. G; CREED, J. C. Expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* into the Tamoiós Ecological Station Marine Protected Area, Brazil. *Aquatic Invasions* , v. 6, p. 105 – 110, 2011.

SOUZA, R. C. C. L; CALAZANS, S. H.; SILVA, E. P. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. *Ciência e Cultura*, v. 61 (1), p. 35-41, 2009.

TERRA, C. S. S. EFEITO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM *Tubastraea coccinea* LESSON, 1829. Dissertação de Mestrado em Dinâmica dos Oceanos e da Terra, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2016.

THOMPSON, F.; LIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, p. 403–43, 2004.

YE, Y.; XIA, M.; MU, C.; LI, R.; WANG, C. Acute metabolic response of *Portunus trituberculatus* to *Vibrio alginolyticus* infection. *Aquaculture* , v. 463, p. 201–208, 2016.

ZHENG, Y.; CHEN, Y.; LU, H. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian Coast of China withy three different solvents. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, v. 19, p. 327 – 331, 2001.

ZHENYU, X.; SHAOWEN, K.; CHAOQUN, H.; ZHIXIONG, Z.; SHIFENG, W.; YONGCAN, Z. First Characterization of Bacterial Pathogen, *Vibrio alginolyticus*, for *Porites andrewsi* White Syndrome in the South China Sea. *PLOS ONE*, v. 8, p. 1 – 8, 2013.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que as substâncias químicas produzidas pelo coral invasor possuem potencial como anti-incrustante natural, nas maiores concentrações para todas as larvas testadas. No entanto, não apresentou nenhum efeito (indutor ou inibidor) aparente nas menores concentrações (0,01% e 0,1%) para as larvas de *A. amphitrite* e *B. neritina* e induziu o assentamento de larvas coespecíficas na menor concentração (0,01%)

Quanto aos efeitos dos metabólitos secundários produzidos por potenciais competidores, os resultados sugerem que estas substâncias químicas podem servir como forma de controle do coral invasor *T. coccinea*, já que apresentaram toxicidade e inibiram o assentamento larvar desta espécie.

Em relação à atividade antibacteriana, as substâncias produzidas pelo coral possuem grande potencial, já que inibiu o crescimento de duas bactérias marinhas patogênicas e duas bactérias responsáveis pela formação do biofilme marinho.