



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINCRUSTANTE DE
GLICEROFOSFOLIPÍDIOS ISOLADOS DE ORGANISMOS MARINHOS DA
REGIÃO DE ARRAIAL DO CABO – RJ.**

William Romão Batista

**Rio de Janeiro
2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Avaliação da atividade antiincrustante de glicerofosfolipídios isolados de organismos marinhos da região de Arraial do Cabo – RJ.

WILLIAM ROMÃO BATISTA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Química Analítica.

**Orientadores:
Cláudio Cerqueira Lopes. PhD
Rosângela Sabbatini C. Lopes. PhD**

**Rio de Janeiro
2006**

Romão, William.

Avaliação da atividade antiincrustante de glicerofosfolipídios isolados de organismos marinhos da região de Arraial do Cabo – RJ / William Romão Batista. Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2006. 139 p.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2006. Orientador: Cláudio Cerqueira Lopes / Rosângela Sabbatini C. Lopes

1. Antiincrustante natural. 2. Glicerofosfolipídios. 3. Bioincrustação. 4. Tese (Mestrado – UFRJ / IQ). 5. Cláudio Cerqueira Lopes / Rosângela Sabbatini C. Lopes I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

WILLIAM ROMÃO BATISTA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINCRUSTANTE DE GLICEROFOSFOLIPÍDIOS ISOLADOS DE ORGANISMOS MARINHOS DA REGIÃO DE ARRAIAL DO CABO – RJ.

Dissertação submetida ao corpo docente do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro -RJ, 10 de Maio de 2006.

Cláudio Cerqueira Lopes, PhD. Instituto de Química – UFRJ.

Rosângela Sabbatini Capela Lopes, PhD. Instituto de Química – UFRJ.

Jarí Nóbrega Cardoso, PhD. Instituto de Química – UFRJ.

Maria Helena Campos Baeta Neves, PhD. IEAPM – MB.

Antônio Jorge Ribeiro da Silva, PhD. NPPN.

Eduardo Cavalcanti, PhD. INT / SECTI – RJ. Suplente.

Júlio Carlos Afonso, PhD. IQ-UFRJ. Suplente.

DEDICATÓRIA

À minha esposa IVAMAR, pelo amor, apoio e confiança...

À minha filha AMANDA, pelo sorriso revigorante...

Aos meus pais, LOURDES e ANTÔNIO, pelo eterno carinho...

À minha irmã, RITA, pela fraterna amizade...

Aos AMIGOS, pelo prazer da presença...

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Cláudio Lopes, Rosângela Sabattini e Jarí Nóbrega, do Instituto de Química – UFRJ, pelo apoio e orientação dispensada durante o transcorrer deste trabalho.

À Dr^a Maria Helena Campos Baeta Neves, do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM, pelo fundamental apoio na realização da avaliação e quantificação microbiológica dos experimentos.

Ao M.Sc André Mazzei, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. FIOCRUZ, pelo apoio na realização da análise espectrométrica de massas.

Aos integrantes do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM, em especial ao grupo da Divisão de Química, pelo apoio disponibilizado durante o desenvolvimento da parte experimental.

RESUMO

ROMÃO, William. **Avaliação da atividade antiincrustante de glicerofosfolipídios isolados de organismos marinhos da região de Arraial do Cabo – RJ.** Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Um dos grandes problemas enfrentados ao dispor qualquer estrutura no mar é a ação natural denominada por bioincrustação ou somente incrustação, que é o processo de colonização por crescimento de bactérias, algas e invertebrados sésseis, o qual se desenvolve sobre estruturas submersas naturais ou artificiais. Visando eliminar ou amenizar este problema, o homem vem se utilizando de produtos que tenham o efeito de impedir ou retardar a evolução da bioincrustação nestas estruturas. Dentre os vários produtos até hoje utilizados, o TBT (tributil-estanho) foi o qual apresentou maior eficácia, porém devido a constatação do seu efeito nocivo ao meio ambiente, a sociedade optou por seu banimento.

O presente artigo avalia a utilização como agente antiincrustante de substâncias do grupo dos glicerofosfolipídios, onde um glicerofosfolipídio disponível comercialmente e oito extratos lipóides de quatro organismos marinhos, três espécies de esponjas marinhas e uma espécie de molusco marinho, os quais possivelmente contêm glicerofosfolipídios análogos, são utilizados em ensaios microbiológicos de incrustação, onde lâminas de microscopia recobertas unilateralmente com ágar-ágar contendo tais compostos e fixadas em quatro painéis de acrílico são submersas em um tanque contendo água do mar, sendo os painéis retirados em diferentes intervalos de tempo e avaliados quanto ao grupo e quantidade de microorganismos aderidos, sendo observado um efeito antiincrustante em relação a bactérias presentes na formação do biofilme, estágio inicial do processo de bioincrustação, servindo deste modo para subsidiar futuros trabalhos e possíveis aplicações destes produtos, para fins industriais, visando a substituição do TBT.

ABSTRACT

ROMÃO, William. **Avaliação da atividade antiincrustante de glicerofosfolipídios isolados de organismos marinhos da região de Arraial do Cabo – RJ.** Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

One of the great problems faced when any structure is placed in the sea, is the natural action known as biofouling, also called incrustation, which is the process of settling and growth of bacteria, algae and invertebrates sessil organisms, developed on natural or artificially submerged structures. Aiming to clarify up this problem, man has used products that have the effect to hinder or delay the evolution of biofouling in the structures placed in the seas and oceans. Amongst the products used so far, TBT (tributyl-tin) was the substance which presented greater effectiveness, however due to evidence of its harmful effect in the environment the society opted for its banishment.

This work evaluated the use as a natural antifouling of substances of the glycerophospholipid group. For this, one commercial available glycerophospholipid and eight lipid extracts of four marine organisms, including three species of sea sponges and one species of a marine mollusk, which could possibly contain analogs of these substances, have been used in microbiological fouling assays, where slides unilaterally covered with agar-agar containing such extracts, were fixed in four acrylic panels and submerged in a tank containing sea water. Each panel was removed at different moments and evaluated with respect to the type and amount of adhered microorganisms. The results had indicated an antifouling effect against the bacteria present in the biofilm, the early stage of biofouling formation, serving in this way to subsidize futures work and possible applications of these products, for industrial purposes, aiming at the TBT substitution.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	9
Capítulo 2 – REVISÃO LITERÁRIA	12
2.1 – Bioincrustação	12
2.2 – Controle da Bioincrustação em Navios. Da Raspagem ao TBT.	14
2.3 – Banimento e Substituição do TBT.	19
2.4 – Importância dos Antiincrustantes.	20
2.5 – Antiincrustantes em Embarcações. Substituindo o TBT.	22
2.5.1 – Sistema auto-limpante. “Fouling-release”.	24
2.5.2 – Compostos não-tóxicos.	27
2.6 – Produtos Naturais de Espécies Marinhas.	28
2.7 – Problemas Relacionados à Pesquisa e ao Uso de Biocidas Naturais.	32
2.8 – Lipídios como Inibidores de Bioincrustação.	35
2.8.1 – Lipídios. Função celular.	35
2.8.2 – Glicero-fosfolipídios como antiincrustante.	37
2.8.3 – PAF e análogos. Síntese enzimática e degradação.	41
Capítulo 3 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS	44
3.1 – Bioincrustação. Designando o Alvo.	44
3.2 – Biofilme.	45
3.2.1 – Formação do biofilme.	45
3.2.2 – Difusão no biofilme.	47
3.3 – Microorganismos. Estruturas de Proteção.	50
3.3.1 – Invólucro celular.	50
3.3.2 – Membrana plasmática.	52
3.4 – Biocida. Compostos Usados.	55
3.4.1 – PAF análogo adquirido comercialmente.	55
3.4.2 – PAF análogos obtidos de organismos vivos.	56
Capítulo 4 – Hipótese de Atuação do Biocida Utilizado.	58
Capítulo 5 – MATERIAL E MÉTODO	60
5.1 – Introdução.	60
5.2 – Material.	61

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi motivado pela questão relacionada ao banimento promulgado para 01 janeiro de 2008 do composto conhecido como tributílo estanho (TBT), principal e mais eficiente biocida utilizado em tintas marítimas antiincrustantes, e também por acreditar que o uso de um biocida não poluente é de fato a melhor resposta para sua substituição no combate a bioincrustação marinha. O mesmo se justifica pela necessidade da existência comercial de produtos com ação biocida ou antiincrustante, não agressivos ao meio ambiente, que possam ser utilizados na preparação de tintas marítimas antiincrustantes.

Tem-se como objetivo avaliar a eficácia antiincrustante de substâncias do grupo dos alquil-glicerofosfolípidios análogos a substância denominada *Platelet activating Factor* (PAF), ou Fator Ativador de Plaquetas, que reconhecidamente possui potente ação celular.

Supõe-se aqui que tais compostos, ao alcançar os invólucros celulares dos microorganismos, possam: (i) devido à característica hidrofóbica de seu radical alquídeo, ser facilmente adsorvido por camadas de peptidoglicanos, polissacarídeos, lipo-polissacarídeos ou fosfolípidios, e agindo como um surfactante causar danos à membrana plasmática da célula atingida, e (ii) devido a sua característica de PAF-análogo*, desencadear uma reação antagônica, *p ex.* inflamação, inibição de síntese celular ou apoptose, ocasionando a repulsão ou morte do microorganismo.

Para isto, PAF-análogos disponíveis comercialmente e extraídos de organismos marinhos, tais como mexilhões e esponjas marinhas, induzidos ao estresse por meio de inoculação de substância química irritante (SUGIURA *et al.*, 1991; THOMPSON e HANAHAN, 1963), foram avaliados em testes de laboratório quanto à eficácia antiincrustante contra microorganismos presentes na formação do biofilme, etapa fundamental ao processo de

* Palavras marcadas com asterisco estão definidas no Glossário.

bioincrustação marinha, sendo incorporados em lâminas para microscopia recobertas por gel ágar-ágar e dispostos em tanques contendo água bombeada diretamente do mar.

Os organismos marinhos utilizados, - uma espécie de mexilhão, *Perna perna* (Linnaeus, 1758), e três espécies de esponjas marinhas, *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), *Amphimedon viridis* (Duchassaing & Michelotti, 1864) e *Arenosclera brasiliensis* (Muricy & Ribeiro, 1999) -, foram classificados e separados em dois grupos, dentro de cada espécie, para o processo de extração com solventes (FOLCHS *et al.*, 1959).

O primeiro grupo de cada espécie, o qual não sofreu nenhuma inoculação e serviu como referência, teve iniciado imediatamente o seu processo de extração. O segundo grupo foi transferido para recipientes contendo água do mar filtrada, tendo baixo teores de organismos planctônicos e material orgânico particulado, mantida sob aeração forçada, permanecendo sob inanição por 36 horas para o início do processo de indução ao estresse, sendo em seguida inoculados com solvente dimetil-sulfóxido.

A idéia da utilização de tais PAF-análogos como agentes antiincrustantes, tem como princípio o que acontece em outros tipos de células amplamente utilizadas na área médica e farmacológica (MARATHE *et al.*, 2001; BOTITSI *et al.*, 1998; KULIKOV e MUZYA, 1998; VENABLE *et al.* 1993), baseando-se no possível desencadeamento de uma reação antagônica ou processo inflamatório nas células dos organismos incrustantes em contato com tais produtos. Deste modo, espera-se que um composto difundido no biofilme, que possa agir ocasionando o rompimento ou mau funcionamento desta estrutura, faça com que os organismos que iniciam e formam o biofilme, tais como bactérias, microalgas, protozoários, rotíferas, ovos e larvas, sejam repelidos ou mortos, implicando na conseqüente inibição do início do processo de incrustação.

O presente trabalho se delimitou a ensaios em laboratório utilizando água do mar *in natura*, e visou verificar o assentamento de microorganismos marinhos, tais como bactérias,

cianobactérias e diatomáceas, em lâminas de microscopia devidamente preparadas contendo as substâncias a serem avaliadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bioincrustação

Bioincrustação é um processo natural que ocorre com qualquer estrutura quando posta em contato com água onde exista a presença de microorganismo. Deste modo, o mar desponta como sendo o local ideal para que este processo venha ocorrer.

O processo da bioincrustação inicia-se imediatamente após o objeto ser colocado no mar, desenvolvendo-se até o ponto onde se verifica a presença de macroorganismos marinhos como algas, balanídeos* e mexilhões (CALLOW e CALLOW, 2002). Tecnicamente o processo consiste de quatro estágios, não rigorosamente seqüenciais, porém, interdependentes.

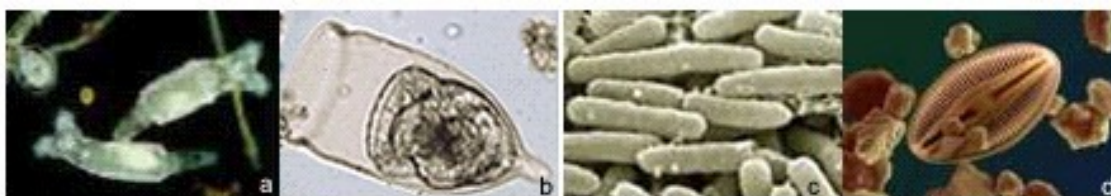


Figura 1. a -Rotíferas; b - Protozoário; c - Bactérias; d - diatomáceas.

Adaptado a partir das fontes www.ucmp.berkeley.edu e www.kuranvebilin.com

O

primeiro estágio inicia-se logo nos primeiros minutos de contato da superfície com a água, quando ocorre o acúmulo de moléculas orgânicas, tais como polissacarídeos e proteínas. Isto permite, nas próximas horas (24-96 h), o desenvolvimento do estágio primário de colonização por bactérias e diatomáceas*, as quais juntamente com cianobactérias, protozoários* e rotíferas* (fig.1), formam um filme microbiológico chamado de biofilme (segundo estágio).

A presença do biofilme permite que microorganismos tenham maior proteção contra predadores, toxinas e mudanças ambientais, além de permitir uma boa disponibilidade de nutrientes, apreendidos do meio ambiente marinho, que ficam dispersos no próprio biofilme.

O terceiro estágio é a colonização secundária feita por esporos de macroalgas, larvas de balanídeos, fungos, outras bactérias e protozoários, que transformam o biofilme, no decorrer da primeira semana, em uma composição mais complexa.

O quarto estágio envolve o assentamento e o crescimento de maiores organismos marinhos tais como moluscos, briozoários*, antozoários*, poliquetas*, tunicados* e crustáceos (FLEMMING *et al.*, 1996; BORENSTEIN, 1994).

O tipo, a extensão e a severidade da bioincrustação dependem de fatores como: tipo de substrato, salinidade da água, luz ambiente, temperatura, poluição e nutrientes disponíveis. Deste modo, a bioincrustação tende a ser um fenômeno sazonal relacionado à posição geográfica. Em zonas polares, com temperaturas abaixo dos 5°C, a ação da bioincrustação é baixa; em zonas temperadas com temperaturas de 5 a 20°C, o risco torna-se médio; já em zonas tropicais e subtropicais, onde as temperaturas são maiores que 20°C, o risco associado com bioincrustação é alto. Isto se deve a condição apropriada para multiplicação dos organismos incrustantes, as quais estima-se estejam presentes em mais de 4000 espécies com potencial para colonizar superfícies submersas (PROPELLER , 2004).

Deste modo, navios que trafegam ou permanecem em áreas tropical ou subtropical estão sujeitos aos mais severos ataques por bioincrustação, particularmente em águas mais rasas ou costeiras, onde há uma maior disponibilidade de luz, calor e nutrientes.

Problemas devido à presença de bioincrustações são abrangentes, indo desde o entupimento de canalizações, passando pelo comprometimento estrutural de plataformas e chegando a ação prejudicial da performance de embarcações.

Do ponto de vista militar, o crescimento das incrustações nos cascos das embarcações é tido como um sério e recalcitrante problema, devido ao fato de diminuir a velocidade final da embarcação e a sua manobrabilidade, obstruir janelas de resfriamento, aumentar o gasto de combustível e obrigar a docagens ou imobilizações mais freqüentes. Tudo isto contribui para a falha em potencial de qualquer ação militar.

Estima-se que a presença de 5% de incrustação no casco pode aumentar o gasto com combustível em 17%, e 1mm de espessura de lodo no casco pode causar a perda de 15% de velocidade final (LEWIS, 2001).

2.2 Controle da Bioincrustação em Navios. Da Raspagem ao TBT

A busca de produtos que atuem como biocida eficiente na pintura de embarcações, remonta à era inicial da navegação. Os problemas relacionados com a bioincrustação marinha vêm sendo enfrentados por alguns milhares de anos. Fenícios e Cartagineses usavam piche e possivelmente coberturas de cobre, enquanto outras culturas mais antigas usavam cera, alcatrão e asfalto para combater as incrustações nas obras-vivas* dos navios (YEBRA *et al.*, 2004).

Há dois mil anos atrás, os cascos de madeira dos navios eram parcialmente cobertos com chumbo e pintados com misturas de óleos impregnados com enxofre e arsênico. Em 1625 uma letal combinação de arsênico, cobre e pó de ferro foi considerado de valor suficientemente importante para receber, na Inglaterra, uma patente como um composto antiincrustante. (ANDERSON *et al.*, 2003; PROPELLER, 2002; CLARE, 1995).

Porém, até a primeira metade do século dezoito, o mais utilizado método de combater a bioincrustação das embarcações continuava sendo a adernagem* (fig.2) ou a docagem* regular

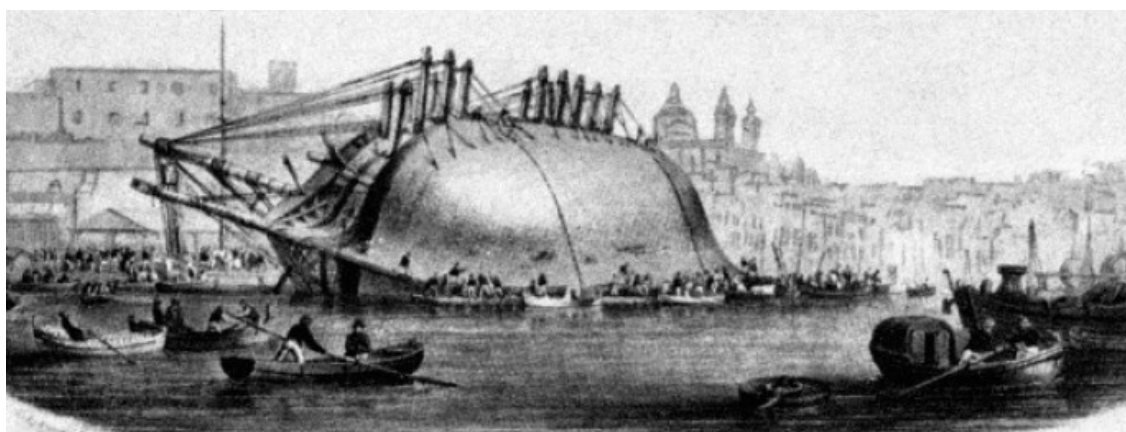


Figura 2. Adernagem do *HMS Formidable* para limpeza da incrustação do casco (1810).

Fonte: www.international-marine.com

para raspagem manual das obras-vivas, procedimento que requeria um enorme esforço humano, além do risco de danos materiais e perda de lucro.

Ainda no século dezoito, o problema foi basicamente solucionado com a aplicação de folhas de cobre aos cascos de madeira. Este método foi bem sucedido, minimizando o crescimento e diminuindo a necessidade de freqüentes raspagens nas obras-vivas das embarcações de madeira. Há um registro de que em 1758, a fragata inglesa *HMS Alarm*, teve seu casco revestido com pedaços de folhas de cobre, e que este experimento foi considerado um sucesso na época, encorajando tal procedimento por outros navios. (CALLOW, 1990).

Após a introdução dos navios com casco de ferro, o uso de folhas de cobre foi quase que completamente descontinuado devido a problemas relacionados à corrosão galvânica, a qual era praticamente ignorada naquela época. Como principal consequência desta nova engenharia, despontou a renovação do interesse de biocidas que pudessem ser adicionados às tintas usadas nas pinturas dos cascos de ferro. Tal perspectiva desencadeou o aparecimento de uma grande quantidade de produtos e patentes de compostos antiincrustantes, tendo sido, somente na Inglaterra, mais de 300 patentes foram produzidas no final do século dezanove.

Em 1860 James McInness usou sulfato de cobre como antiincrustante. Em 1863 James Tarr e Augustus Wonson estavam recebendo uma patente americana para uma tinta antiincrustante que usava óxido de cobre em alcatrão misturado com nafta e benzeno.

Em 1906, a Marinha americana testou várias tintas antiincrustantes no estaleiro de Norfolk, na Virginia. Já em 1908 começou a produção de tintas para pintura das obras vivas* de navios americanos.

Até 1926, algumas versões de tintas tinham como base óxido de mercúrio suspenso nas mais diversas resinas e solventes. Ainda neste período a Marinha americana substituiu as tintas à base de alcatrão, por formulações com resinas, com a consistência de vernizes mais

fluidos. Isto veio a facilitar a aplicação do esquema de pintura, pois não se necessitava de aquecimento para fluidizar a mistura.

A partir de 1940 grandes mudanças na tecnologia da pintura resultaram em uma ampla gama de produtos químicos e na introdução de novas preparações de superfícies. Porém a vida útil das pinturas antiincrustantes convencionais ainda era limitada devido ao desconhecimento de como controlar a liberação do biocida contido nas mesmas.

Após a 2ª Guerra Mundial, o aparecimento de novas resinas sintéticas derivadas do petróleo, proporcionou tintas que tinham melhores características mecânicas, que facilitavam sobremaneira a sua aplicação. Durante esta época o aparecimento de compostos organo-estanho melhorou a performance de tintas antiincrustantes, de modo que se parecia ter a resposta final para tais problemas (YEBRA *et al.*, 2004).

Em 1950 o primeiro registro sobre o amplo espectro de tintas antiincrustantes com TBT foi feito por Van de Kerk e colaboradores.

No início da década de sessenta a excelente propriedade do TBT como antiincrustante estava descoberta, tornando-o comercial (YEBRA *et al.*, 2004).

Apesar de ainda na década de setenta muitas das pinturas antiincrustantes estarem



Figura 3. Docagem devido a incrustações.
Fonte: www.cqjournal.com

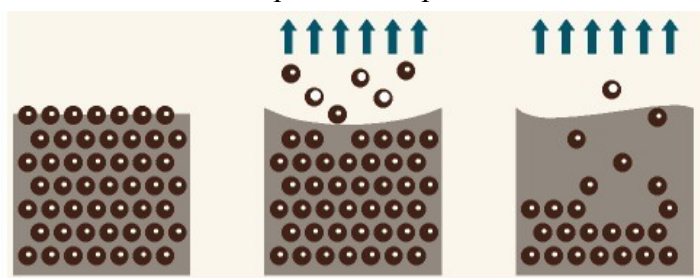
baseadas na utilização do cobre, a vida útil destes esquemas girava em torno de 24 meses, devido ao descontrole da liberação do biocida empregado, o que aumentava o custo com docagens e repinturas (fig.3).

Atualmente no combate a bioincrustação, várias ações podem ser tomadas. Dependendo da situação e da aplicabilidade, pode ser feita a remoção mecânica dos organismos incrustados de tempos em tempos; utilizar materiais menos propensos a bioincrustação; usar proteção eletroquímica, etc. Porém o mais efetivo e econômico método tem sido o uso de tintas antiincrustantes contendo TBT (tributil-estanho).

O tributil-estanho é o único entre os organo-estanho que é empregado como antiincrustante, o monobutil e o dibutil não apresentam tal propriedade, sendo empregados extensivamente como estabilizante no processamento de PVC.

Os compostos chamados organo-estanho são aqueles que contém no mínimo uma ligação entre um átomo de estanho e um átomo de carbono. Muitos destes compostos são os principais ingredientes ativos em biocidas usados para controlar uma ampla gama de organismos. Seu uso inclui ainda tratamento e preservação de madeira, fungicida em indústria têxtil e de papel, tratamento de sistemas de água de refrigeração, controle da esquistossomose e carrapatos em várias partes do mundo.

Inicialmente o TBT foi utilizado na forma de óxido (TBTO), onde era disperso na matriz de resina (fig.4), a partir da qual era liberado lentamente, sendo esta a base para os mais tradicionais esquemas de pintura antiincrustante. Entretanto tal esquema apresentava



uma fraca performance devido à rápida liberação do composto biocida e conseqüente perda do poder antiincrustante.

Figura 4. Esquema de liberação do TBTO disperso em resina.

Fonte: www.uniproductsonline.com

constantemente enfraquecida e erodida pelo movimento da embarcação, resultando na exposição de novas camadas contendo o TBT.

O esquema de pintura usando o TBT associado ao autopolimento pôde então prover performances positivas por cinco anos ou mais.

2.3 Banimento e Substituição do TBT

No final dos anos 70, pesquisas demonstraram a correlação de deformidades em moluscos com a presença de TBT, e que, para alguns organismos, concentrações tão baixas como 1 (ng/L) mostravam-se tóxicas (ARMSTRONG *et al.*, 2000).

Ostras que cresciam próximo aos portos e marinas da Baía *d'Arcachon*, na França, apresentaram uma alta incidência de má formação na casca (fig. 7), que afetava sua sobrevivência e comercialização (LEWIS, 2002).

Paralelamente ao avanço do uso do TBT, várias pesquisas relacionadas ao seu possível dano ambiental foram realizadas.

Em 1982, pesquisadores realizaram experiências mantendo ostras em tanques de 150 litros que eram sucessivamente enchidos e esvaziados de acordo com a maré, os quais



continham painéis pintados em uma face com TBT-fluoreto em concentrações de 0,2 a 2 µg/L, verificaram que 30% das ostras morreram decorrido 110 dias de exposição e todas morreram no final de 170 dias (W.H.O,1990).

Figura 7. Deforma 𠄎o em Ostra devido a exposi 𠄎o ao TBT. Fonte: www.uqar.quebec.ca/jpellerin/sem/02/etude_cas/neintures_antisalissures.htm

Foi estimado que concentrações de até 100 ng/L de TBT, em água do mar, causam significantes reduções no crescimento de mexilhões (SALAZAR e SALAZAR, 1996).

Anormalidades reprodutivas das ostras *Ostrea edulis* foram constatadas após exposição ao TBT por 75 dias em concentração de 0,24 µg/L, onde um atraso na mudança de sexo do

macho para fêmea foi observado e a produção larval foi completamente inibida. Este fenômeno chamado "imposex", que pode resultar em fêmeas com pênis, foi detalhado em meados dos anos oitenta (FERNANDEZ *et al.* 2002).

Como consequência de algumas destas pesquisas, países como França, Reino Unido, Estados Unidos e Japão, restringiram o uso de tintas com TBT. Uma das primeiras ações foi a proibição do uso do TBT por embarcações que tinham menos de 25 metros de comprimento.

Em 1990, o Comitê de Proteção ao Meio Ambiente Marinho – MEPC, pertencente a IMO, adotou uma resolução recomendando que os governos adotassem medidas para restringir o uso de tintas antiincrustantes com base no TBT.

Em novembro de 1999, a assembléia da IMO concordou que um conjunto de ações, a ser tomado pelo MEPC, deveria assegurar uma proibição global, a partir de 1º de janeiro 2003, da aplicação dos compostos do organo-estanho que agem como biocidas em sistemas de pintura antiincrustante em navios, e uma proibição completa da presença de tais compostos até 1º de janeiro 2008 (PROPELLER, 2000).

2.4 Importância dos Antiincrustantes

O uso de esquema de pintura antiincrustante tem como principal propósito evitar o consumo extra de combustível pela embarcação. Estima-se que o gasto relacionado ao combustível, na indústria de transporte marítimo, gira em torno de 50% do custo total de operação. O consumo anual de óleo pesado tipo Bunker, relacionado à frota comercial mundial, com um preço de aproximadamente US\$ 100.00 por tonelada (1998), foi estimado em 180 milhões de toneladas. A bioincrustação pode levar a um aumento de consumo de combustível de até 40%, o que aumentaria o gasto anual em mais 7,2 bilhões de dólares. Este aumento implica ainda em uma liberação para a atmosfera de 210 milhões de toneladas de CO₂ e 5.6 milhões de toneladas de SO₂ (PROPELLER , 1998).

Um problema paralelo ao consumo de combustível, que chama a atenção para a necessidade do controle da bioincrustação, é a transferência de espécies marinhas, componentes ou presentes na bioincrustação dos cascos, entre os deslocamentos das embarcações. Apesar de quantitativamente menor, comparado a transferência pela água de lastro, os organismos transferidos pelos cascos e ancoras são também fatores de preocupação ambiental. (N.R.C, 1996).

Na Austrália, a incrustação existente nos cascos dos navios foi tida como o maior vetor de introdução de espécies exóticas em suas águas jurisdicionais entre o final do século 19 e decorrer do século 20 (LEWIS, 2001a).



Figura 8. Mexilh 縷 Zebra.
Fonte: Great lakes net

Nos Estados Unidos, o mexilhão-zebra europeu, *Dreissena polymorpha* (fig. 8), infestou 40% das vias navegáveis daquele país, implicando em gastos que, segundo alguns analistas, variaram entre centenas de milhões a um bilhão de dólares com medidas de controle entre 1989 e 2000.

<http://www.great-lakes.net/envt/flora-fauna/invasive/zebra.html>.

Na Nova Zelândia, pesquisas conduzidas pelo *National Institute of Water & Atmospheric Research* têm demonstrado que no mínimo 150 espécies de organismos marinhos têm sido introduzidos em suas águas, e que uma nova espécie chega a cada ano trazida por embarcações que visitam seus portos. Estima-se que 69% das espécies registradas tenham sido introduzidas pelos cascos das embarcações (N.I.W.A, 2002).

No Brasil, a introdução da espécie invasora *Limnoperna fortunei*, conhecida como mexilhão dourado, se fez através da água de lastro de embarcações que cruzavam a Bacia do Rio da Prata, porém a dispersão pelo Rio Paraguai e pelas águas interiores tem sido feita principalmente pelo casco das embarcações de diferentes tipos e tamanhos.

A proliferação do mexilhão dourado vem causando entre outros problemas, o



Figura 9. Entupimento de Dutos.

entupimento de dutos e bombas (fig. 9). Os impactos econômicos observados são enormes, principalmente para as indústrias que dependem da captação de água diretamente dos rios, lagos e lagoas, como as usinas hidrelétricas e as companhias de abastecimento de água para as zonas urbanas.

2.5 Antiincrustantes em Embarcações. Substituindo o TBT

Devido à implementação do seu banimento mundial, uma corrida em busca de um produto substituto teve uma imposição, pois os fabricantes deverão passar a usar, a partir desta data, outros agentes antiincrustantes na composição das tintas comercializadas.

Como alternativas químicas ao uso de TBT podemos citar:

a) pinturas convencionais a base de cobre (cobre metálico, óxido cuproso ou tiocianato cuproso), a qual apesar de sua menor performance, é consideravelmente menos tóxica do que o TBT. Porém, especialistas relatam que os sais de cobre formados na superfície da pintura, quando em contato com a água do mar criam uma colmatação que impede a migração dos íons de cobre para esta superfície, o que ocasiona a perda prematura do poder biocida da pintura utilizada;

b) pinturas a base de cobre com resinas de autopolimento, onde compostos secundários (zinco-piritiona ou cobre-piritiona) reforçam a ação biocida. Seu uso deve estar vinculado a copolímeros que possam sofrer autopolimento tais como acrilatos, porém a ablação só torna-se efetiva a grandes velocidades (> 20 nós);

c) uso de pinturas não tóxicas com o uso de copolímeros que evitam ou minimizam a adesão de organismos quando a embarcação encontrar-se em movimento (*fouling release coatings*). O que seria uma espécie de um autopolimento de altíssima eficiência sem uso de

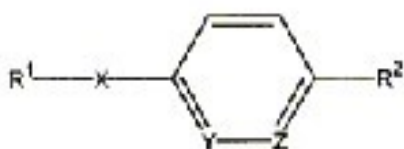
agentes biocidas. Algo tem sido tentado com o uso do Teflon, porém sem o alcance esperado. Outra variação com mais sucesso se faz usando polímeros de silicone.

Atualmente os dois mais promissores sistemas alternativos ao uso do TBT são os esquemas de pintura chamados de *fouling-release* e os que empregam tintas com base em compostos não-tóxicos, incluindo neste segmento os biocidas naturais (YEBRA *et al.*, 2004).

Antiincrustantes naturais têm sido isolados dos mais diversos organismos marinhos, os quais incluem bactérias, esponjas, corais, ascídias e diversas algas (BURGESS *et al.*, 2003; TEIXERA, 2002; HELLIO, 2001). Embora antiincrustantes naturais tenham sido pesquisados por mais de 10 anos, o desenvolvimento de tintas com esta base, ainda não se encontra plenamente disponível.

Enquanto alguns sistemas de “fouling-release” já se encontrem disponíveis no mercado, a disponibilidade comercial de um produto antiincrustante eficiente, baseado em biocidas naturais, parece ainda um pouco distante.

Produtos naturais, para uso como antiincrustantes, obtidos de vegetais, insetos e organismos marinhos têm sido pesquisados e várias patentes têm sido solicitadas. Henry Hovde e colaboradores receberam em 2001 uma patente que tinha como base a utilização de hormônios juvenis (fig. 10), encontrados entre insetos, os quais demonstraram ação biocida contra cracas (HOUBE *et al.*, 2001).



Ligantes:

R¹ - alquil

R² - hidrogênio ou alquil

X - oxigênio, enxofre, metileno, carbinol ou carbonil

Y - nitrogênio ou metileno

Z - nitrogênio ou NO

Figura 10. Hormônio juvenil

Lars Bohlin e colaboradores, receberam em 2004 uma patente que especifica o uso de uma mistura de peptídeos da família dos *cyclotides* <http://www.cyclotide.com>, uma nova classe de proteínas extraídas da planta *Viola odorata* (fig. 11), que apresenta além de ação antitumoral (LINDHOLM, 2002), uma potente ação antiincrustante contra cracas (BOHLIN *et al.*, 2004).



Figura 11. *Viola odorata*

O uso de compostos de amônio quaternário (SUSIC, 2004), derivados de terpenos (MATIAS, 2001) e de vitaminas (BONATI, 2001) também têm sido pesquisados e patenteados, porém ainda não comercializados.

2.5.1 Sistema autolimpante. *Fouling-release*

Os sistemas de pintura chamados de *fouling-release* podem ser considerados como verdadeiros sistemas antiaderentes, utilizando principalmente polímeros fluorados ou de silicone na sua composição (BRADY, 2000).

Polímeros fluorados, tais como o politetrafluoretileno (PTFE), além da maior dificuldade de manuseio e aplicação, geralmente sofrem rearranjos químicos na superfície em contato com ambientes polares, perdendo suas características de não molhabilidade, o que limita a sua aplicação comercial. Sua utilização em pinturas das obras vivas de embarcações necessita de um modo de estabilizar a sua superfície, e pesquisas visando eliminar esta dificuldade estão sendo buscadas, em particular com o uso de copolímeros semifluorados (YOUNGBLOOD, 2003; HAYAKAWA *et al.*, 2000; XIANG *et al.*, 2000).

Os sistemas usando silicone são baseados principalmente em borrachas ou elastômeros do polidimetilsiloxano (PDMS) e têm sido desenvolvidos desde a década de sessenta.

Nos Estados Unidos, Edward Robbart obteve uma patente em 1961 (ROBBART, 1961) e Alexander Milne obteve outra em 1977 (MILNE, 1977). Logo após a patente de Milne ser obtida, o foco da pesquisa e desenvolvimento de antiincrustantes voltou-se para os sistemas

de TBT- copolímero, uma outra pesquisa de Milne, que naquela época estava obtendo um grande sucesso comercial. Com isto, a tecnologia das tintas *fouling-release* autolimpantes, foi deixada de lado (ANDERSON *et al.*, 2003).

No início da década de oitenta, quando os problemas ambientais associados ao TBT começaram a aparecer; pesquisadores retomaram a atenção para programas de pesquisas baseados nas tintas *fouling-release*. Estes sistemas geralmente são isentos de biocidas ou em composição com produtos não-tóxicos, o que os tornam ambientalmente atrativo. Embora permitam que os organismos se fixem no casco quando a embarcação se encontra parada, em velocidades superiores a 20 nós (~32 Km/h) ocorre o descolamento de tais organismos deixando as obras vivas livres da bioincrustação.

A performance de tais esquemas é baseada em três propriedades:

a) energia superficial, a qual controla a capacidade de uma superfície se aderir a outra, onde baixas energias produzem minimização da força de adesão das incrustações;

b) módulo elástico da pintura, o qual influencia o mecanismo de junção entre a superfície e o organismo incrustante. Menores valores do módulo elástico implicam em adesões mais fracas;

c) Espessura da pintura, a qual está relacionada ao modo de liberação do organismo da superfície. Ficando condicionada a esfoliação ou descamação.

Em geral, esquemas utilizando polímeros fluorados agem por descamação enquanto os que utilizam silicone trabalham por esfoliação, a qual requer menos energia para ocorrer (LEWIS, 2002; BRADY, 2001; BRADY, 1999).

Embora tal sistema apresente alta eficiência para embarcações de alta velocidade, seja quimicamente durável e isento de biocida, o seu custo e a sua não eficácia para embarcações de baixa velocidade ou de alta velocidade e com pouca movimentação, e estruturas fixas, têm limitado o seu uso até o presente momento (PROPELLER, 1998).

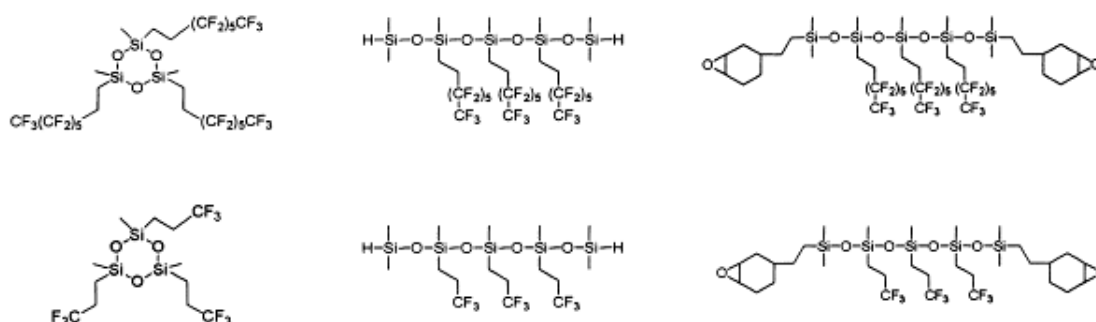


Figura 12. Exemplos de perfluoroalquilsiloxanos

Apesar da eficiência dos esquemas de pintura com compostos de silicone atualmente usados ser menor do que aqueles contendo TBT, muito se vem pesquisando sobre tais materiais devido a sua aparente não-toxicidade e principalmente a sua disponibilidade.

Compostos tais como fluorossilicones, que contém grupos pendentes de fluoroalquil em base de silicone (fig. 12), têm demonstrado melhores características de autolimpeza em relação aos polisiloxanos normalmente usados (GRULAN *et al.*,2004; MERA e WYNNE, 2001).

2.5.2 Compostos não-tóxicos

Devido ao banimento dos esquemas de pintura antiincrustantes utilizando o TBT e ao nível de pressão ambiental sobre tal questão, vários produtos teoricamente não-tóxicos têm sido incorporados em tintas e testados quanto a sua real eficiência e não toxicidade. Embora as propriedades antiincrustantes de muitos dos produtos levantados não tenham sido totalmente avaliadas no ambiente marinho, muitos construtores e proprietários de navios têm expressado interesse em usar uma tinta antiincrustante não-tóxica e que seja relativamente não onerosa, o que se reflete em baixo custo de aplicação e alto tempo de vida útil.

A capsaicina, composto natural não-tóxico e irritante, responsável pelo ardor da pimenta-do-reino e que tem sido utilizada como repelente animal, pode ser efetivo contra

organismos aquáticos que tenham um direto contato com o substrato pintado (RACE e KELLY, 1994), e pesquisas na Universidade de Akron, Ohio-US, vêm sendo conduzidas para avaliar a sua ação como antiincrustante no ambiente marinho (NEWBY, 2002).

Ensaio laboratoriais utilizando taninos obtidos de plantas dos gêneros *Mimosa pudica* (mimosa), *Castanea dentata* (american chestnut) e *Schinopsis brasiliensis* (quebracho ou braúna), (STUPAK *et al.*, 2003) e extratos da alga, *Bifurcaria bifurcata*, e da esponja *Raspaciona Aculeata*, (GERACI *et al.* 1999), demonstraram ter potencial bioatividade contra o assentamento de larvas de cracas *Balanus amphitrite* (fig. 13).

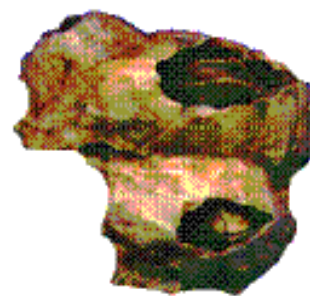


Figura 13. *Balanus amphitrite*

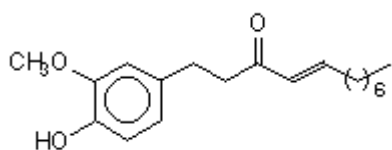


Figura 14. trans-8-shogaol

Os compostos trans-8-shogaol (fig. 14), isolado do extrato obtido da *Zingiber officinale* (gingibre), e o novo sesquiterpenóide 9-Oxo-neoprocucumenol (fig. 15), obtido da *Curcuma aromatica* (açafrão),

tradicionais ervas medicinais da cultura oriental, demonstraram uma alta eficiência contra a adesão de mexilhões *Blue mussel* (ETOH *et al.* 2003; ETOH *et al.* 2002).

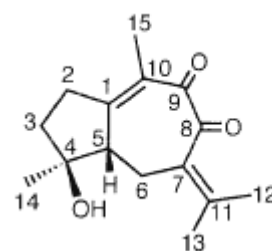


Figura 15. 9-Oxo-neoprocucumenol

2.6 Produtos Naturais de Espécies Marinhas

O meio ambiente marinho tem fornecido, desde épocas ancestrais, os mais diversos e efetivos compostos, principalmente medicamentos usados na terapia humana. Dentre os diversos organismos marinhos estudados, as algas, as bactérias e os invertebrados têm sido os

principais alvos de interesse, devido ao grande número de metabolitos que podem ser isolados. Entre este grupo de organismos, a esponja marinha destaca-se como o mais estudado em química de produtos naturais, sendo relacionado a metabolitos que incluem ação citotóxica, bactericida, anticâncer, antiviral, e de potencial valor comercial (BHADURY e WRIGHT, 2004; MÜLLER *et al.*, 2004a; KELECON, 2002).

Como exemplo, substâncias isoladas de uma esponja marinha *Cryptotethya crypta*, serviram de matéria prima para a síntese do medicamento D-Arabinosilcitosina ou ARA-C (Citarabina ou Aracytin da Upjohn Co.), que vem sendo empregado há muitas décadas na quimioterapia da leucemia e do conhecido medicamento AZT (3-azido-3-deoxitimidina), empregado para o tratamento da AIDS. A manoalida, um terpenóide isolado da esponja *Luffariela variabilis*, investigado pelo *Marine Sciences Institute, University of Califórnia – US*, foi tema de pesquisas e hoje é comercializado pelas empresas americanas RBI/Sigma Chemical CO, como um potente inibidor da liberação de Ca⁺⁺ nas células e sabe-se que 25 µg dessa substância custam US\$ 812.00. Esses fatos, aliados à grande biodiversidade marinha, vêm estimulando cada vez mais a prospecção de drogas originárias de organismos marinhos (MÜLLER *et al.*, 2004b; FREITAS, 2003; N.R.C, 2002).

A bioprospecção, a identificação e o isolamento de compostos bioativos de organismos marinhos têm sido por vários anos o principal foco de diversos grupos em todo o mundo, tais como: Centro de Pesquisa Marinha de Rovinj, na Croácia; Centro de Excelência Biotecnológica - BIOTECmarin, na Alemanha; PharmaMar, na Espanha; e nos Estados Unidos, Instituto de Pesquisa do Gulf of Maine-‘GMRI’, Centro de Biotecnologia Marinha de Maryland, *Florida Marine Biotechnology* e o Centro de Biomedicina e Biotecnologia Marinha de San Diego.

A biotecnologia marinha pode ser definida como o desenvolvimento de bens e serviços derivados de processos e organismos marinhos, e inclui: produtos farmacêuticos, produtos

químicos, alimentos, biomateriais, tecnologias ambientais, etc. É tida como um mercado multibilionário, o qual teve em 2001 uma estimativa de crescimento anual de 15 a 20% durante os cinco anos seguintes, e tais perspectivas de empreendimentos começam a despertar o interesse de vários países (YAN, 2004). Porém além do desejo, a qualidade da infraestrutura institucional do setor responsável pela pesquisa, bem como uma rica biodiversidade local, são pré-requisitos fundamentais.

No Brasil, o Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM, www.ieapm.mar.mil.br, organização pertencente à Marinha do Brasil, localizado na cidade de Arraial do Cabo – RJ, preenche satisfatoriamente tais requisitos, e já tem iniciado a sua capacitação para tais tarefas.

Embora grande parte das pesquisas mundialmente realizadas serem para fins biomédicos, interesses relacionados ao uso das propriedades antiincrustantes de variados metabolitos também despertam interesse e, desde o início dos anos 80, tal possibilidade vem sendo estudada (BAKUS, 1983).

Compostos designados por “Kalihenenos”, elucidados com base em técnicas de RMN, foram isolados de esponjas marinhas da espécie *Acanthella cavernosa*, e apresentaram potencial ação antiincrustante (OKINO *et al.* 1995).

O constituinte abaixo (fig. 16), obtido de esponjas marinhas australianas da espécie *Crella incrustans*, por exemplo, atua como antiincrustante, inibindo o assentamento ou estabelecimento de larvas de ascídia*, cracas, briozoários e de algas. (TEIXERA, 2002; BUTLER *et al.*, 1996).

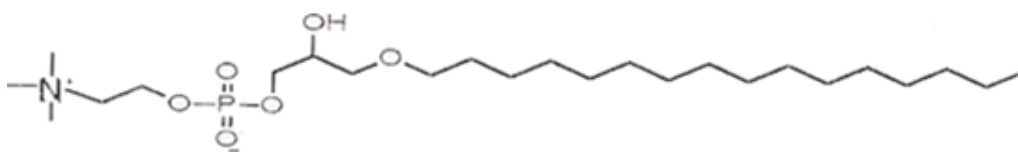


Figura 16. Glicerofosfolípido extraído de esponja marinha

Na busca por produtos que pudessem ser usados no combate a bioincrustação, foi avaliado que vários organismos marinhos não apresentam incrustações em sua superfície, embora permaneçam completamente sob tal coação ambiental, e que os mesmos possuíam, em geral, três modos de atuar contra esta coação:

a) pela tolerância ao organismo invasor, onde o mesmo não sofre nenhum dano em seus processos vitais de respiração, nutrição e locomoção;

b) pelo impedimento, podendo se fazer pelo deslocamento para um habitat menos pernicioso ou desenvolvimento de altas taxas de crescimento frente ao invasor, não comprometendo sua sobrevivência;

c) pela defesas propriamente dita, a qual pode ser mecânica, onde superfícies com estruturas especiais dificultam o assentamento; física, onde superfícies com baixa energia superficial impedem a adesão; e química, com a secreção de metabolitos nocivos aos predadores ou invasores (PEREIRA *et al.* 2003; ASSMANN *et al.*, 2000; BERENBAUM, 1995; PENNINGGS *et al.*, 1994).

Os possíveis compostos liberados na defesa química têm gerado um grande interesse devido a sua possível utilização na composição de uma tinta antiincrustante. Entre os principais compostos isolados que apresentam atividade antiincrustante estão os ácidos graxos, terpenóides, lipoproteínas, glicolípídios, fenóis, lactonas, peptídeos e esteróis.

Ainda na década de oitenta, vários ensaios começaram a ser realizados, visando avaliar a eficácia de inúmeros produtos naturais que pudessem vir a atuar como antiincrustantes no preparo de tintas marítimas. A principal abordagem tem sido a extração com solventes dos tecidos do organismo e subsequente emprego de bio-ensaios para avaliar o potencial antiincrustante dos extratos (WATERMANN, 1997).

John Faulkner relacionou 841 compostos isolados de organismos marinhos, em sua revisão

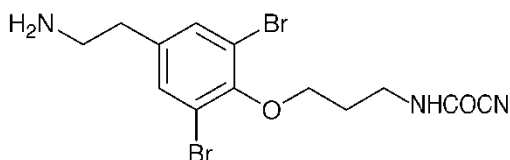


Figura 17. Ceratinamina

sobre o assunto, cobrindo os anos de 1977 a 1998. A grande maioria dos registros consultados tratava-se de metabolitos obtidos de esponjas marinhas, entre os quais, um composto chamado ceratinamina (fig. 17), obtido da *Pseudoceratina purpurea*, apresentava ação antiincrustantes (FAULKNER, 2000; TSUKAMOTO *et al.*, 1996).

Em 1981, na Universidade do Sul da Califórnia, Bakus e colaboradores submergiram painéis de madeira impregnados com extrato obtido de esponjas marinhas *Haliclona rubens* e *Haliclona viridis*, para verificar sua possível ação antiincrustante. (BAKUS *et al.*, 1983).

No extrato da esponja marinha *Acanthella cavernosa*, coletada na ilha Yakushima no Japão, que inibiu o assentamento e metamorfose das larvas de cracas *Balanus amphritite*, foram encontrados compostos de diterpenos conhecidos como kalihinenes (OKINO *et al.* 1995).

2.7 Problemas Relacionados à Pesquisa e ao Uso de Biocidas Naturais

Produtos naturais marinhos são de fato compostos instigantes que despertam amplo interesse mundial. Pesquisas biotecnológicas envolvendo tais produtos encontram ampla abordagem, englobando principalmente, entre outras áreas, fármacos e biocidas, incluindo neste último os antiincrustantes (MÜLLER, 2004a; KELECON, 2002; N.R.C., 2002; FAULKNER, 2000).

Apesar do incontestável potencial dos compostos bioativos isolados de organismos marinhos, problemas intrinsecamente relacionados a sua pesquisa e uso não podem ser negligenciados.

Alguns problemas inerentes à pesquisa do poder antiincrustante de produtos naturais de organismos marinhos devem ser enfrentados. Pequenas concentrações nos organismos e difícil reprodutibilidade das condições reais do ambiente marinho, *p ex.* temperatura, oxigenação e luminosidade, são exemplos pertinentes.

Problemas também estão presentes quando se necessita separar e identificar os compostos constituintes do extrato que produzem o efeito antiincrustante. Para isto, técnicas apuradas de preparação da amostra e de análises como cromatografia, ressonância magnética, espectrometria de massas e infravermelho, entre outras, devem ser empregadas.

Tendo em consideração que métodos de extração e concentração de compostos existentes em fluídos biológicos, para serem analisados por métodos cromatográficos, geralmente necessitam de um processo de separação e de cleanup devido à alta complexidade do tipo de amostra, especialmente quando em pequenas concentrações, procedimentos aprimorados de extração com solventes orgânicos, fracionamento ou cleanup e concentração devem ser empregados.

Técnicas de extração, cleanup e concentração permitem que a análise dos componentes de interesse seja efetuada de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes e que apresente altas recuperações, baixo custo, um tempo razoável de análise e boa exatidão e precisão para os analitos de interesse (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Dependendo do tipo de molécula que se quer analisar e da técnica de análise a ser empregada, a presença de radicais polares, o tamanho da molécula e sua volatilidade influenciam substancialmente no resultado da análise.

Estas análises geralmente são realizadas com uso de cromatografia em camada fina, eletroforese capilar ou cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de ultravioleta (UV), espalhamento de luz (light-scattering) ou de espectrometria de massa (MS). Muito destes métodos podem ser utilizados sem o emprego da derivatização química, porém a utilização de cromatografia gasosa ou líquida necessita de tal técnica para que viabilize a sua utilização e permita melhorar a seletividade e a sensibilidade de tais análises (WANG *et al.*, 2003).

Trabalhos também têm mostrado que variações de eficácia de tais compostos sofrem influência temporal relacionada à produção das defesas químicas. Tais variações podem existir devido a mudanças da temperatura, luz, pressão, estação do ano e localização geográfica (MARECHAL *et al.*, 2004; PUGLISI *et al.*, 2000).

Produtos naturais também são degradados química, fotoquímica e biologicamente, de modo que sua maior ou menor efetividade depende da sua disponibilidade na tinta, e de certo modo a sua ação biocida na superfície da pintura diminui com o tempo.

Algumas abordagens tecnológicas disseminadas na indústria farmacêutica, como microencapsulação (PIERUCCI, 2005) e controle de liberação (PARK, 2005), têm sido propostas para minimizar tais problemas.

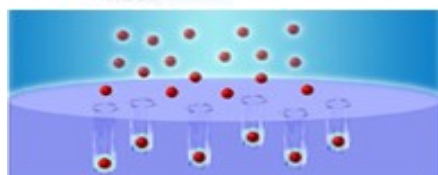


Figura 18. Microencapsula 鋳o.
Adaptado de www.sono-tek.com

Técnicas onde um spray do biocida, produzido por meio de atomização ultra-sônica (fig. 18), é passado em um banho líquido onde se formam as micro-cápsulas, ou um outro procedimento com a utilização de CO₂ supercrítico têm sido empregadas, permitindo que o biocida contido nas micro-cápsulas possa manter a sua efetividade por maiores períodos (YULU, 2004).

Em trabalhos com organismos, onde inevitavelmente enzimas estão presentes, procedimentos de coleta, armazenagem e preparo das amostras são essenciais. Deste modo, extremos cuidados devem ser tomados para que não haja, devido à ação enzimática, alteração, destruição ou geração de componentes (CHRISTIE, 1993).

Aspectos vinculados à síntese da molécula são também limitações que podem derrubar todo um projeto. Inúmeros compostos com efetiva ação antiincrustante são tecnicamente inviáveis ou, até mesmo, atualmente, impossíveis de sintetizar.

Outros fatores como compatibilidade entre o composto biocida e a tinta usada como veículo, e possíveis danos ambientais, devem ser também avaliados. Porém os mesmos só podem ser qualificados nos últimos passos do trabalho, ou seja, somente após o produto ser obtido.

Com relação ao tempo necessário para tais trabalhos, estima-se que partindo de uma hipótese, passando por coleta e preparo dos extratos, testes laboratoriais e de campo, chegando à identificação de uma molécula com ação antiincrustante, possam ser gastos até 4 anos de trabalho (YEBRA *et al.*, 2004). Com isto, dependendo do objetivo e urgência da aplicação, uma pesquisa pode se tornar imprópria ou inviável.

2.8 Lipídios Como Inibidores de Bioincrustação

2.8.1 Lipídios. Função celular

Lipídios são compostos ricos em carbono que formam um grupo heterogêneo de substâncias, geralmente relacionados aos sistemas vivos devido às funções biológicas desempenhadas como reservatório de energia e componente da sinalização celular. São geralmente insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos tais como metanol, clorofórmio, benzeno e acetona.

Dentro deste grupo incluem-se gorduras, óleos, graxas,

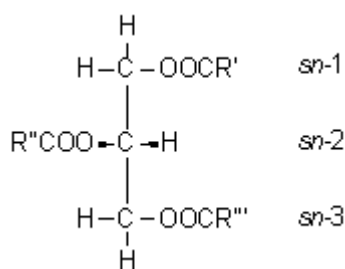


Figura 19. Acilglicerol

gliceróis derivados,

esfingolipídios, terpenos e esteróis (BERG *et al.*, 2002).

Entre os mais simples lipídios encontramos os acilgliceróis, que são ésteres de ácidos graxos ligados a uma estrutura de glicerol, podendo ser tri, di ou mono-substituído

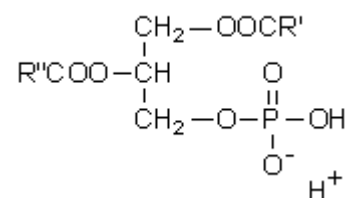


Figura 20. Ácido fosfat

(fig 19).

Monoacilgliceróis são intermediários da lipólise de tri e diacilgliceróis e são encontrados em baixíssimas quantidades em extratos celulares. Diacilgliceróis são importantes intermediários na biosíntese de triacilgliceróis e de fosfolípidios que têm importantes funções na sinalização e ativação de mecanismos celulares específicos.

Os triacilgliceróis são os mais importantes deste grupo e são encontrados profusamente em plantas e animais. Têm um amplo emprego industrial; seu uso vai desde a produção de alimentos até combustíveis automotivos conhecidos como biodiesel* (KHALIL e LEITE, 2005; MUSKETT e ANDERSON, 2004). São os mais importantes reservatórios de energia para os seres vivos, sendo, em ambientes marinhos, estocados por organismos presentes na coluna d'água e disponibilizados aos pequenos pelágicos* ou então transferidos, por gravidade, aos bentos* existentes no fundo oceânico (PARRISH *et al.*, 2000).

Uma outra classe de lipídios, bioquimicamente relacionada aos triacilgliceróis, porém mais complexos, que também tem uma vital importância biológica, são os glicerofosfolípidios. Estes lipídios possuem também como cadeia principal um glicerol, a qual são ligados ácidos graxo e fosfórico, sendo nomeados como derivados do ácido fosfatídico (fig. 20). Dentro desta classe, os compostos denominados glicerofosfatidilcolinas, glicerofosfatidiletanolamina e glicerofosfatidilserina (fig. 21), são usualmente os componentes essenciais da membrana citoplasmática das células de organismos procariontes* e eucariontes* (SUZUMURA, 2005).

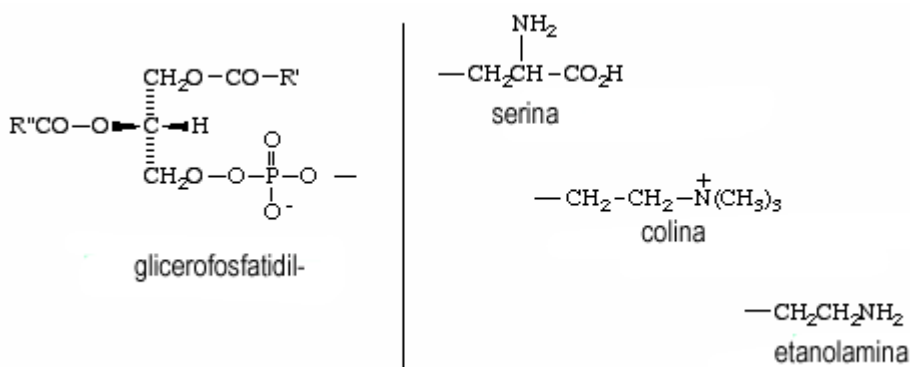


Figura 21. Principais glicerofosfolípidios constituintes das membranas plasmáticas.

Estas membranas são estruturas relativamente rígidas e organizadas, compostas por uma bicamada de fosfolipídios (fig. 22), que além de ajudar a proteger a célula do ambiente externo em que se encontra, promovem uma barreira impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis, tendo em conjugação variadas proteínas que atuam como sensores e receptores, permitindo a célula mudar seu comportamento em resposta aos sinais externos, e como canal de transporte de moléculas, nutrientes, íons e dejetos. Sem o seu correto funcionamento, a célula não pode manter a sua integridade e coordenar seu sistema químico (ALBERT *et al.*, 2002; LODISH *et al.* 1999).

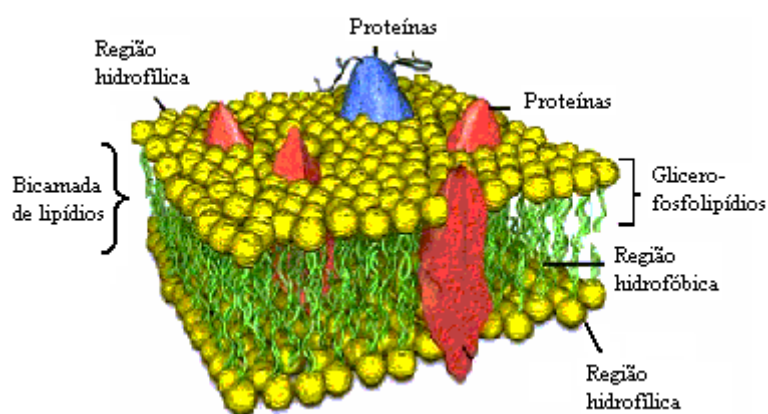


Figura 22. Segmento de uma Membrana Plasmática. (Ilustração).
Adaptado da Fonte HYPERLINK "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>" www.ncbi.nlm.nih.gov

2.8.2 Glicerofosfolipídios como antiincrustantes

Trabalhos realizados pelo departamento de química da Universidade de New Castle, Austrália, isolaram e identificaram certos lipídios presentes no extrato da esponja marinha *Crella incrustans*, os quais promoveram ação antiincrustante em vários ensaios. Estes compostos foram avaliados por meio de RMN, IR e MALDI-MS, como pertencentes à classe dos glicerofosfolipídios e, idênticos aos compostos *1-O-hexadecyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-*

phosphocholine (PAF “platelet-activating factor”) e *1-O-hexadecyl-sn-glycero-3-*

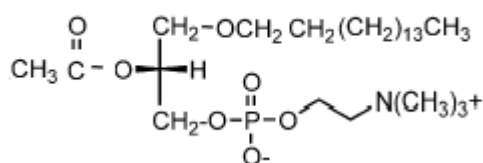


Figura 23. (PAF)

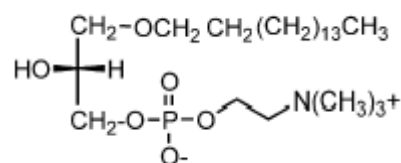


Figura 24. (Lyso-PAF)

phosphocholine (Lyso-PAF) (BUTLER, 1996) (figs. 23. e 24).

Ensaio com frações eluídas por solução de metanol e água do extrato da esponja marinha *Spirastrella abata*, demonstraram grande letalidade em ovos de camarões de água salgada, tendo sido identificados nestes extratos, principalmente, uma mistura de lyso-PAF análogos (ALAN *et al.*, 2001; SHIN *et al.*, 1999).

O glicerofosfolípido conhecido por *Platelet activating factor* (PAF) ou fator ativador de plaquetas é um potente mediador biológico produzido por vários tipos de células, o qual desencadeia várias reações fisiológicas, mesmo a baixíssimas concentrações, 10^{-12} a 10^{-9} M, (VENABLE *et al.* 1993; PRESCOTT *et al.* 1990).

Este composto foi elucidado simultaneamente pelos grupos dos professores Donald Hanahan, Departamento de Bioquímica da Universidade do Texas, e Fred Snyder, Divisão de Ciências Médicas do Instituto de Estudos Nuclear de Oak Ridge - Tennessee, os quais realizavam investigações independentes sobre anafilaxia* em coelhos, onde plaquetas eram ativadas, e ensaios da potencialidade anti-hipertensiva deste lipídio em ratos (DEMOPOULOS *et al.*, 1979; BLANK *et al.*, 1979). Após sua estrutura ser desvendada, um

novo campo de pesquisa foi aberto, tendo como principal alvo a pesquisa médica (VENABLE *et al.*, 1993).

O nome PAF apesar de incorretamente usado, pois descreve somente um dos vários efeitos que provoca, permaneceu vinculado ao composto sendo amplamente utilizado.

PAF e Lyso-PAF referem-se respectivamente ao *1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, e ao *1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, sem vínculo com o comprimento ou grau de insaturação do grupo alquila, podendo os compostos estruturalmente relacionados serem rotulados como PAF e Lyso-PAF análogos (TOKUMURA, 1995; TOKUMURA *et al.*, 1989).

O PAF demonstra sua conservação filogenética existindo em várias posições na escala evolucionária, estando presente ou sendo gerado em uma grande variedade de organismos, tais como: bactérias, protozoários, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados, incluindo mamíferos (ANTONOPOULOU *et al.*, 2002; KULIKOV e MUZYA, 1998; CALLIGEROU *et al.*, 1996; SUGIURA *et al.* 1995; BUSSOLINO *et al.* 1991; DENIZOT *et al.* 1989 a,b).

A sua composição em amostras biológicas é constituída principalmente por uma mistura contendo grupos alquídicos com 16 e 18 carbonos na posição sn-1 (McINTYRE *et al.*, 1999).

Estudos também têm demonstrado que PAF-análogos como o glicerofosfolípido sintético *1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, conhecido como “Et-18-OCH₃ ou Edelfosine” (fig. 25), promove uma ampla faixa de atividade antitumoral, e que diferentemente de outras drogas, este fosfolípido não afeta o DNA das células sob tratamento, mas atua seletivamente na membrana celular, perturbando o metabolismo de lípidios (VAN DER LUIT *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 1996).

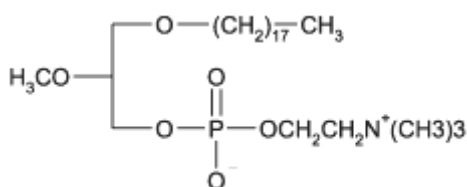


Figura 25. Edelfosine

As ligações tipo éter, presentes nos carbonos 1 e 2, tornam estes alquil-lyso-glicerofosfolípido resistentes às lípases*, permitindo desta forma que

se acumulem na membrana e em outras partes da célula, atrapalhando o seu desenvolvimento ou até mesmo levando-a a apoptose*.

Além do composto Edelfosine, outros alquil-glicerofosfolípidios e algumas alquil-fosfocolinas têm também apresentado ação citotóxica, *in vivo* e *in vitro*, principalmente contra protozoários, onde os estudos sobre tais compostos, apesar de ainda não totalmente esclarecido, supõem mecanismos envolvendo danos à membrana plasmática e a sinalização celular, com o comprometimento de vários metabolismos celulares (VERMA e DEY, 2004; PARIS *et al.*, 2004; CROFT *et al.*, 2003; VICTORIA *et al.*, 2001; SEIFERT *et al.*, 2001).

Outros PAF-análogos, com variação no radical da posição sn-1 ou sn-2, também têm sido testados, e substituições do radical alquídicico em sn-1, por um grupo acila ou arila e do radical acetil em sn-2, por propionil ou butiril, têm demonstrado redução na atividade biológica destes análogos (VENABLE *et al.*; PRESCOTT *et al.* 1990; TOKAMURA *et al.* 1989; WISSNER *et al.* 1984). Do mesmo modo, um maior número de grupos metilênicos, maior cadeia linear, entre o átomo de fósforo e o átomo de nitrogênio, ou a ausência do oxigênio ligado em sn-1 ou sn-2, também ocasionam uma diminuição na atividade de tais análogos. Porém a presença de um radical metila no carbono próximo ao grupo trimetilamônio ou uma substituição total deste grupo por grupos N-metil-piperidina ou N-metil-pirrolidina, aumentou de oito a dez vezes sua atividade em comparação a do PAF (KULIKOV e MUZYA, 1998; WISSNER *et al.* 1986).

A idéia da utilização de tais PAF-análogos como agente antiincrustantes, tem como princípio o que acontece em outros tipos de células amplamente utilizadas na área médica e farmacológica (MARATHE *et al.*, 2001; BOTITSI *et al.*, 1998; KULIKOV e MUZYA, 1998; VENABLE *et al.* 1993), baseando-se no possível desencadeamento de uma reação antagônica ou processo inflamatório nas células dos organismos incrustantes em contato com tais produtos.

2.8.3 PAF e análogos. Síntese enzimática e degradação

O PAF ocorre em uma ampla variedade de organismos, e sua produção pode ser desencadeada por diferentes estímulos, *p ex.* danos físicos, substâncias tóxicas, ambiente inóspito ou nocivo, etc. (SUGIURA *et al.* 1991; THOMPSON e HANAHAN, 1963).

Em células de mamíferos, o PAF é gerado de modo enzimático por dois caminhos distintos, conhecidos por (i) “remodeling” e (ii) “de novo” (VENABLE *et al.*, 1993; PRESCOTT *et al.* 1990) (fig. 26). O primeiro envolve a hidrólise de PAF-análogos de grandes cadeias acila na posição sn-2, e posterior reacetilação do lyso-PAF formado. O segundo caminho envolve a acetilação de compostos do tipo 1-O-alkil-sn-glicero-3-fosfato, que então são posteriormente convertidos a PAF.

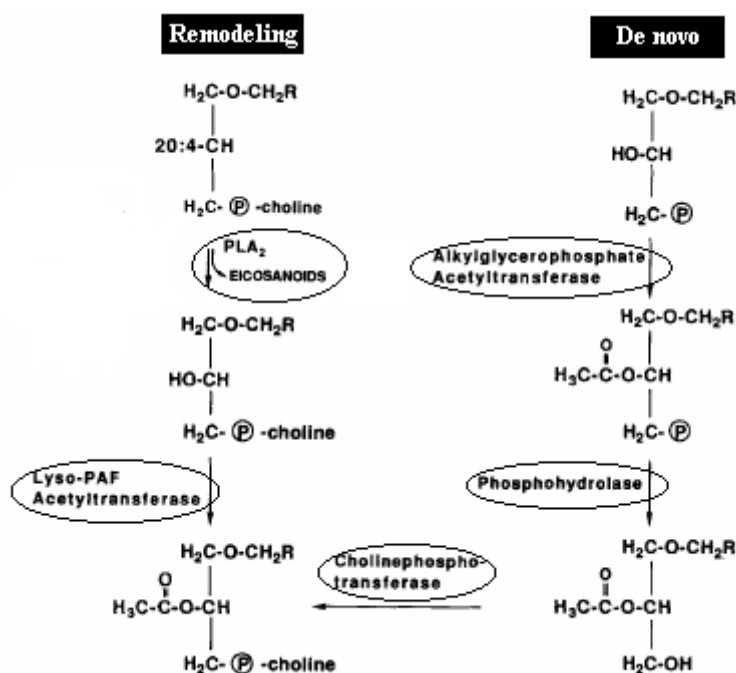


Figura 26. Caminhos para a síntese do PAF, em células de mamíferos. Adaptado de VENABLE *et al.* 1993.

Neste ponto devemos entender que a síntese do PAF tem como principal função torná-lo disponível para desencadear os processos celulares, de modo que em algum momento, devido ao comprometimento de um stress ou morte da célula, sua ação deve ser terminada. Esta terminação só é possível com a degeneração do PAF e, para isto, uma enzima específica

conhecida como “PAF acetylhydrolase”, catalisa a deacetilação do PAF reduzindo-o à Lyso-PAF (fig. 27), um agonista muito menos efetivo (STAFFORINI *et al.*, 1997; DENNIS, 1994; STREMLER *et al.*, 1989).

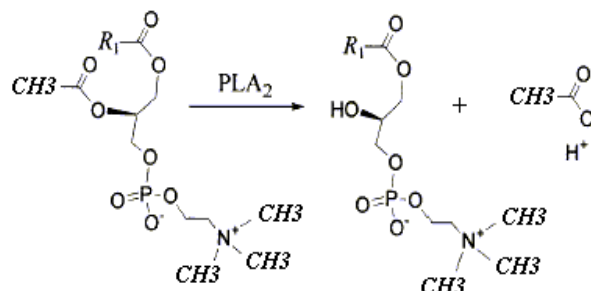


Figura 27. Deacetilação do PAF

A enzima *PAF acetylhydrolase* pertence a uma superfamília de enzimas chamadas de fosfolipases, que é dividida em quatro classes distintas: PLA (PLA1 e PLA2), PLB, PLC e PLD, de acordo com a ligação que especificamente ela hidrolisa no fosfolípido (fig. 28).

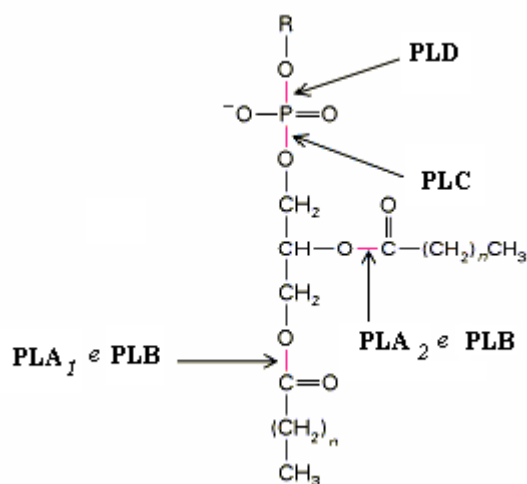


Figura 28. Ligações hidrolisadas por fosfolipases

As enzimas fosfolipase PLA₁ e PLA₂ hidrolisam o fosfolípido, clivando as acilas das posições sn1 e sn2 respectivamente, gerando ácidos graxos e lyso-fosfolípidios. A fosfolipase PLB atua clivando ambas as acilas, das posições sn1 e sn2.

A fosfolipase PLC hidrolisa a ligação entre o glicerol e o fosfato, gerando diacilgliceróis, e a fosfolipase PLD cliva no grupo polar, formando o ácido fosfatídico (BROW *et al.*, 2003; BALSINDE *et al.*, 2002; DENNIS, 1994).

Dentre destas classes, a enzima PLA₂ é a mais numerosa, com 14 grupos e 20 subgrupos, sendo encontradas em diversos organismos, *p ex.* mamíferos, cobras e abelhas (veneno), esponjas marinhas (NEVALEIN *et al.* 2004) e bactérias (DEKKER, 2000).

Dois fatos interessantes são: (i) esta mesma enzima, PLA₂, participa da síntese do PAF por “*remodeling*” (fig. 26) e, nesta síntese, sua ação libera eicosanóides, que também são mediadores de processos inflamatórios celulares, e (ii) sua ação na terminação do poder agonista do PAF, transformando-o em lyso-PAF, é altamente regioseletiva, ou seja, só pode ser exercido em uma ligação acila na posição sn-2, de modo que se esta ligação porventura não existir em um PAF-análogo, a hidrólise não ocorrerá e, conseqüentemente, o PAF-análogo será acumulado na célula ocasionando um stress ou sua morte.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Bioincrustação. Designando o Alvo

Usar produtos antiincrustantes é abordar o problema da bioincrustação de um modo preventivo, ou seja, evitar que este processo biológico se inicie. Para isto, devemos entender o desenvolvimento de tal processo, distinguir as classes de organismos envolvidos, bem como suas fisiologias e contribuição na formação da bioincrustação, e conhecer a interação destes organismos com os biocidas empregados.

Como descrito na Seção 2.1, podemos resumir o processo de formação da bioincrustação em quatro estágios (fig. 29). Nos dois últimos estágios, já se verifica a presença de vários tipos de organismos desenvolvidos e um contínuo assentamento de diversos outros, de modo que não se permite pensar nestes estágios como sendo o ponto focal de um trabalho preventivo.

Se a bioincrustação no casco de um navio alcançar estes estágios de desenvolvimento, fatalmente uma remoção eficaz só será possível por meios mecânicos, *p ex.* raspagem submersa, raspagem no dique ou hidrojateamento, e qualquer opção incorrerá em despesas e paradas indesejáveis.

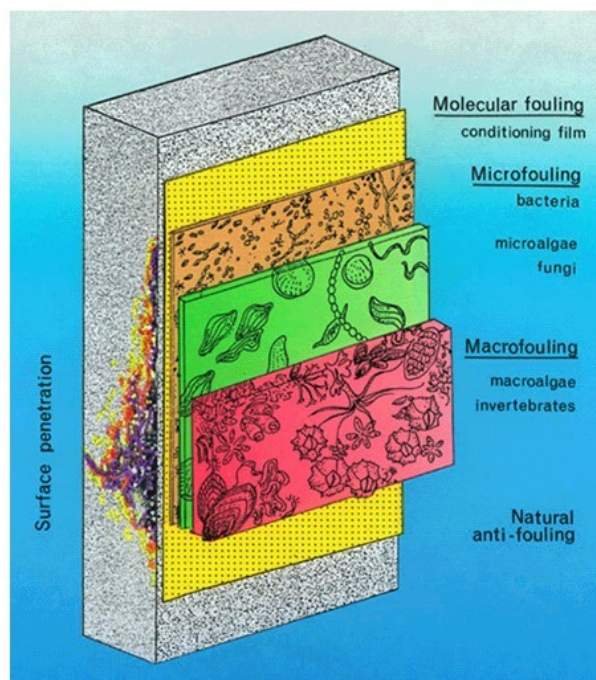


Figura 29. Ilustração dos estágios do processo de formação da bioincrustação. Condicionamento da superfície do substrato. (1º estágio); Formação do biofilme (2º estágio); Colonização secundária (3º estágio) e Desenvolvimento de macro-organismos (4º estágio). Por Adrian Davis & Phillip Williamson. Fonte: www.biosciences.bham.ac.uk

No entanto, devido aos tipos de microorganismos envolvidos e à condição *sine qua non* ao desenvolvimento do processo de bioincrustação, podemos conjecturar sobre os dois estágios

iniciais, quando efetivamente ocorre a formação do biofilme, como sendo o alvo mais promissor.

3.2 Biofilme

3.2.1 Formação do biofilme

Imediatamente após qualquer estrutura, *p ex.* navio, submarino, plataforma, etc., ser colocada no mar, inicia-se um processo espontâneo de condicionamento da superfície da mesma, que se faz pela aderência de moléculas orgânicas disponíveis no meio marinho. Este condicionamento modifica a molhabilidade e a carga da superfície, propiciando a adesão de bactérias marinhas, principalmente as do gênero *Coccus*^{*}, e permitindo, em uma sucessão, a adesão de (i) bactérias em outras formas (bacilos^{*} ou espirilos^{*}), (ii) diatomáceas e, posteriormente, (iii) cianobactérias^{*}.

As bactérias marinhas, *p ex.* *Pseudomonas*, *Leptothrix*, *Rhodopseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Beggiatoa*, as diatomáceas, *p ex.* *Navícula* e *Nitzschia*, e as cianobactérias, *p ex.* *Phormidium* e *Oscillatoria*, envolvidas nestas etapas, exsudam diferentes polissacarídeos, chamados de exopolissacarídeos (BHASKAR e BHOSLE, 2005; ARCE *et al.*, 2004), os quais em uma mistura complexa com ácidos nucleicos, proteínas, minerais, nutrientes, resíduos celulares e os próprios microorganismos, formam o que se denomina de biofilme (fig. 30).



Figura 30. Micrografia eletrônica do Biofilme da bactéria *P. aeruginosa*. Adaptado de www.genomenewsnetwork.com

Esta denominação, biofilme, não deve ser entendida no sentido estrito da palavra, pois na verdade o biofilme não se apresenta como uma camada contínua ou homogênea, ou como uma película (filme), estando a sua estrutura, heterogênea no espaço e no tempo, mudando devido a processos externos e internos (DONLAN, 2002; COSTERTON, *et al.* 1994).

A sua estrutura apresenta, mais freqüentemente, comunidades de microorganismos agrupados denominados *clusters* (fig.31), possuindo canalículos que permitem a passagem da água trazendo nutrientes, oxigênio e conseqüentemente outros possíveis compostos, tais



Figura 31. Micrografia eletrônica detalhando um Cluster.

como biocidas (DONLAN, 2002; DUNNE, 2002; SUTHERLAND, 2001; DAVEY e O'TOOLE, 2000).

A formação de um “*cluster*” (fig. 32) se inicia com o contato e adesão de bactérias a uma superfície condicionada, formando uma pequena colônia que cresce devido à multiplicação dos microorganismos e ao acúmulo de exopolissacarídeos exsudados, podendo adquirir formatos variando de montículos a estruturas parecidas com cogumelos, alcançando um estado de maturação onde se inicia um ativo processo de dispersão que permite a formação de novas colônias (STOODLEY, *et al.* 2004; LASPIDOU, 2003; LOOSDRECHT, *et al.*1990).



Figura 32. Ilustração da seqüência de formação de um Cluster. Adesão, colonização inicial, crescimento e formação de canais internos que permitem o acesso de nutrientes à parte interna do cluster e liberação e novas adesões de bactérias.

Adaptado da Fonte: <http://bordeaux.uwaterloo.ca/biology447/Biofilms/biofilmsoverview.htm>

exopolissacarídeos são os principais compostos do biofilme desidratado, contabilizando entre 50% e 90% do carbono orgânico total nele presente. Porém, quando totalmente hidratado, a água pode chegar a 97% de seu peso. Podem variar na suas propriedades físicas e químicas, mas geralmente são constituídos por polissacarídeos heteropoliméricos com massa molecular

da ordem de kiloDaltons, os quais, devido ao tipo de monossacarídeo base de sua formação *p*

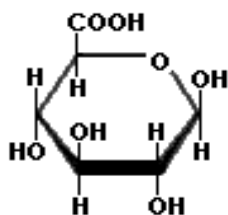


Figura 33. α -D-glucurônico

ex. ácidos glucurônico (fig.33), galacturônico, manurônico, etc., são geralmente aniônicos, casualmente neutros e raramente positivamente carregados, possuindo regiões hidrofílicas e hidrofóbicas.

Apesar de formarem sozinhos vários tipos de estruturas dentro do biofilme, estes polissacarídeos de um modo geral podem interagir com outros tipos de molécula, tais como proteínas e lipídios, formando o que se conhece por Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS)* (BHASKAR e BHOSLE, 2005; PARSEK e FUQUA, 2003; DONLAN, 2002; SUTHERLAND, 2001; DeBEER e KÜHL, 2001; ALLISON, 1998).

Do acima exposto, podemos inferir que a constituição básica inicial do biofilme, com base nos primeiros quatro ou cinco dias, é formada pela substância polimérica extracelular (EPS) hidratada e pelos microorganismos nela contidos, tais como bactérias, cianobactérias e diatomáceas.

3.2.2 Difusão do biocida no biofilme

Biocida é tecnicamente um produto com atividade antimicrobiana de amplo espectro, do qual se espera efeito bactericida, fungicida e algicida. Tais efeitos são, via de regra, dependentes de fatores como ambiente, solubilidade e concentração do biocida, tempo de contato, temperatura, tipo de organismo e pH (RUSSELL, 2003).

O ambiente de contato envolvido nesta interação geralmente é o próprio biofilme formado ou, possivelmente, a camada limite hidrodinâmica que o recobre (fig. 34).

Fora da camada limite hidrodinâmica, o mecanismo envolvido no transporte do biocida é principalmente a convecção, que geralmente é muito mais intensa devido ao movimento relativo entre o meio aquoso, que contém o organismo no estado planctônico, e o biocida ou seu carreador. Neste ponto devemos observar que o gradiente de concentração do biocida,

utilizado na pintura da superfície a ser protegida, está orientado da região fora da camada

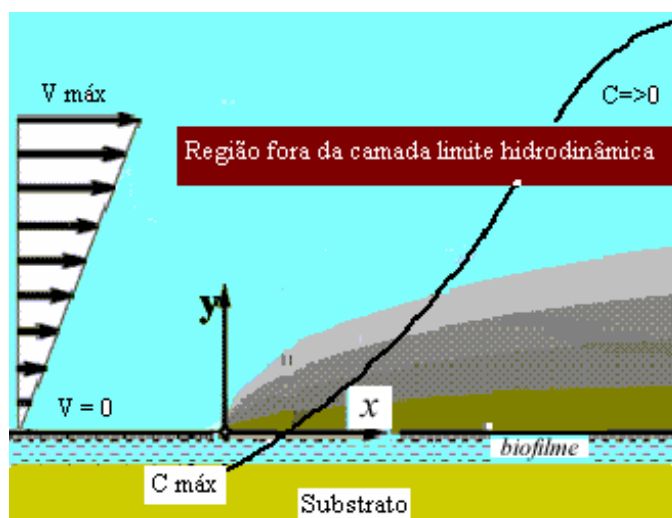


Figura 34. Ilustração da Camada Limite Hidrodinâmica. Gradientes de velocidade e concentração de biocida.

limite hidrodinâmica para a base do biofilme, onde se julga haver uma concentração máxima ($C_{máx}$) do mesmo. Deste modo, podemos assumir que a região fora da camada limite hidrodinâmica não é de interesse para este trabalho, pois a concentração de biocida torna-se nula.

No interior do biofilme, o principal mecanismo envolvido na transferência de massa é a difusão, o que dificulta a disponibilidade do biocida. Estima-se que uma camada de biofilme de dez células de espessura exiba um tempo de difusão 100 vezes maior que o tempo gasto em uma camada unicelular (STEWART, 2003).

Um modelo para descrever uma difusão neste ambiente exibe um certo grau de complexidade devido à heterogeneidade da composição e a densidade do biofilme, e, de um modo geral, é entendido que este emaranhado polimérico atua como um obstáculo restringindo ou atrasando a difusão de solutos, e que, apesar dos canais poderem carrear solutos até as partes mais internas do biofilme, não é garantido o acesso às células interiores componentes dos “clusters” (STEWART, 2003; LEWIS, 2001; DeBEER e KÜHL, 2001).

De modo geral, solutos com peso molecular de até 1000 Daltons movem-se livremente no biofilme, só que a uma taxa menor que a observada em água pura, pois no biofilme ocorre uma diminuição do coeficiente de difusão devido às presenças de microorganismos, substâncias poliméricas, partículas não orgânicas e gases dissolvidos. A difusão de moléculas maiores, 2000 – 4000 Daltons, é reduzida consideravelmente devido à obstrução física da

matriz de EPS (MARCOTTE *et al.*, 2004; DeBEER e KÜHL, 2001; COSTERTON *et al.* 1999). Philip Stewart, do “*Center for Biofilm Engineering, Montana State University - USA*”, tem definido em seus trabalhos a seguinte equação para estimar o tempo requerido para um biocida chegar ao outro extremo de uma camada de biofilme uniforme, com 90% de sua concentração inicial:

$$t_{90} = 1,03 \frac{L^2}{D_c}$$

onde L é espessura do biofilme e D_c é coeficiente de Difusão do biocida no biofilme, o qual pode ser estimado com base no coeficiente de Difusão efetivo do biocida na água D_{aq} , podendo, para solutos orgânicos, ser empregada a relação $(D_c / D_{aq}) = 0,25$. Esta equação é aplicável para casos onde o biocida não interage com o biofilme, de modo que o biocida pode se difundir muito rapidamente pelo biofilme. Entretanto, para biocidas que podem de algum modo apresentar interações reversíveis do tipo adsorção/ dessorção, obtêm-se, para uma mesma espessura e difusões de 50% da concentração iniciais, tempos dez vezes maiores (STEWART, 2003; STEWART *et al.*, 1998; STEWART, 1996).

Neste ponto devemos lembrar que a difusão do biocida no biofilme é a primeira das duas partes de um processo eficaz de utilização de agentes biocidas, pois, concomitante e obrigatoriamente, deve acontecer uma transposição do invólucro celular e da membrana plasmática dos microorganismos presentes no biofilme, para que uma real ação biocida possa acontecer.

3.3 Microorganismos. Estruturas de proteção

3.3.1 Invólucro celular

O invólucro celular pode ser considerado uma camada fronteira do microorganismo, o qual recobre diretamente a membrana plasmática e atua como uma barreira primária aos perigos externos, tais como ação de enzimas, choques osmóticos, danos físicos, mudanças de pH e substâncias tóxicas, *p ex.* biocidas. A sua composição é a responsável pela diminuição, retardo ou bloqueio do processo de absorção, e para que isto seja minimizado, conhecer as características do composto biocida e da composição do invólucro dos microorganismos alvos são de fundamental importância.

Microorganismos precursores do biofilme, tais como bactérias, diatomáceas e cianobactérias, possuem as seguintes composições para seus invólucros celulares, conforme pode ser visto na TABELA 1: (RUSSELL, 2003; HOICZYK e HANSEL, 2000; BEVERIDGE, 1999; ATLAS, 1996; BEVERIDGE e GRAHAM, 1991).

Tabela 1.
Composições dos invólucros celulares de bactérias, diatomáceas e cianobactérias.

Tipo de microorganismo	Tipo de invólucro	Composição (espessura)	Exemplos
Bactéria Gram-positiva	Parede celular	Peptidoglicanos (20 – 80 nm), Polissacarídeos e Proteínas.	Estafilococos
Bactéria Gram-negativa	Parede celular com Membrana externa (OM)	Peptidoglicanos (~2 nm), Lipoproteínas e Proteínas. Lipo-polissacarídeos (2 a 8nm), Fosfolípidios, Proteínas e Lipoproteínas.	<i>Pseudomonas</i> <i>Lepthotrix</i>
Microalga (diatomáceas)	Parede celular	Sílica, polissacarídeos e proteínas	<i>Navicula</i> <i>Nitzschia</i>
Cianobactéria	Parede celular	Peptidoglicanos (10 – 700 nm) e polissacarídeos	<i>Oscillatoria</i>

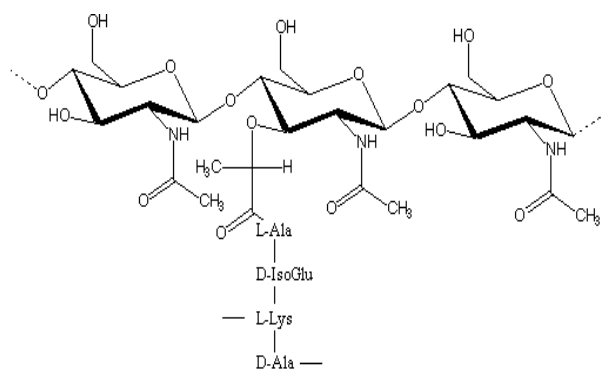


Figura 35. Unidade de repetição do Peptidoglicano.

Os peptidoglicanos (fig. 35), também conhecidos como mureína ou mucopeptídeos, são encontrados somente em bactérias, sendo constituídos por polissacarídeos (glicanos), baseados em unidades alternadas de N-acetilglucosamina e ácido N-

acetilmurônico, interligados por peptídeos (aminoácidos conectados por ligações peptídicas), em geral com quatro ou cinco aminoácidos (ATLAS, 1996).

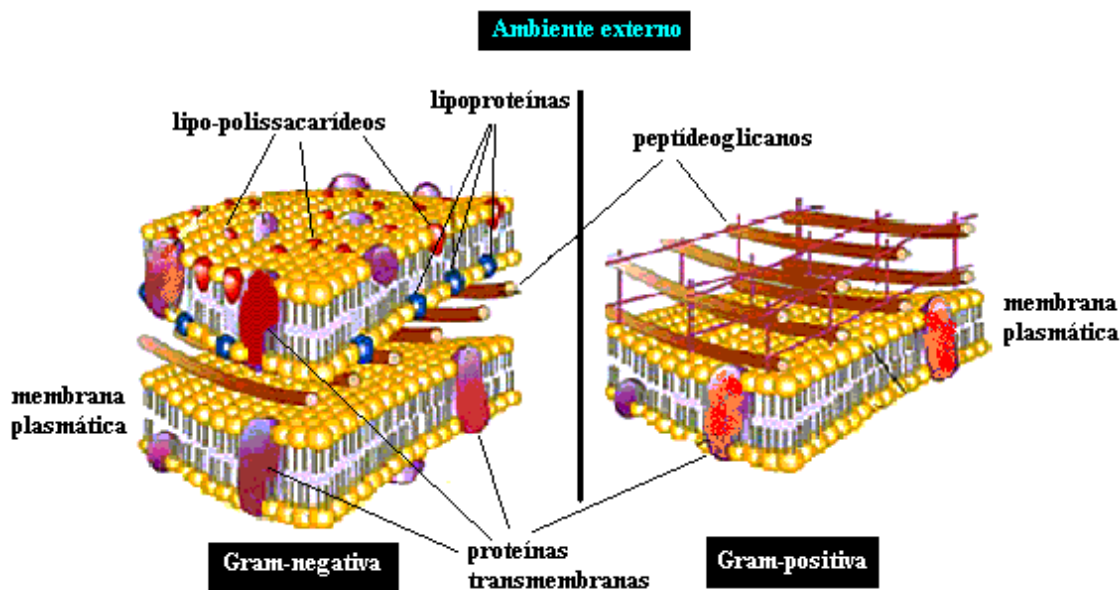


Figura 36. Ilustração dos invólucros celulares de bactérias gram-negativas e gram-positivas.

Comparativamente, membranas externas (OM) são mais porosas do que a própria membrana celular. Esta característica é devida a grande quantidade de proteínas transmembranas e lipoproteínas existentes em sua estrutura (fig. 36), as quais perfazem cerca de 50% da sua massa total. Além de membrana externa e/ou parede celular, algumas bactérias, devido a fatores externos extremos, *ex. temperatura, pressão, nutrientes, salinidade e umidade*, podem ainda apresentar outras superfícies, tais como cápsulas (fig. 37),

mucos, camada tipo “S” ou jaquetas, sendo tais camadas geralmente constituídas de polipeptídios, polissacarídeos e glicoproteínas.

3.3.2 Membrana plasmática

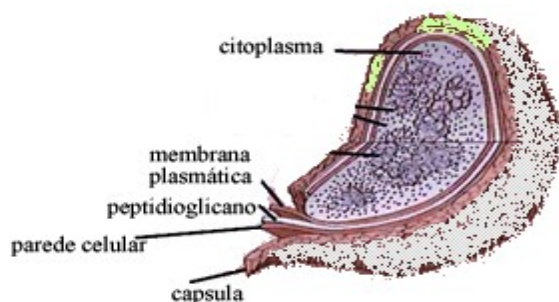


Figura 37. Invólucro celular de uma bactéria capsulada. Ilustração adaptada da Fonte H

VERI INK "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>" www.ncbi.nlm.nih.gov (PIRMEF)

A membrana plasmática é uma estrutura existente em todos os tipos de células, cuja integridade é de vital importância para a existência do organismo. Ela regula a passagem de substâncias para dentro e fora da célula, sendo a sua estrutura e composição química a chave para esta seletividade, regulando os específicos processos de transporte e determinando quais moléculas podem entrar ou sair.

Deste modo, podemos presumir que um composto difundido no biofilme, que possa agir ocasionando o rompimento ou mau funcionamento desta estrutura, faça com que os organismos que iniciam e formam o biofilme, tais como bactérias, microalgas, protozoários, rotíferas, ovos e larvas, sejam repelidos ou mortos, implicando na consequente inibição do início do processo de incrustação.

Este composto deve teoricamente, romper a adesão da bicamada de fosfolípidios (fig. 38), permitindo que se forme uma passagem na mesma, ocasionando uma perda da concentração intracelular, ou então interferir na sinalização das proteínas transmembranas presentes nesta camada, ocasionando um stress ou reação anormal em sua sinalização.

O efeito de rompimento pode ser executado por meio de uma ação surfactante, onde um composto semelhante a um detergente, pode, a partir de uma determinada concentração, invadir a barreira da bicamada de lipídios rompendo-a ou fragmentando-a em micelas (fig. 38) (GARAVITO e MILLER, 2001).



Figura 38. Desestruturação da bicamada de lipídios da membrana celular. Ilustração.

O efeito de interferência na sinalização celular é muito mais complexo e seletivo, onde proteínas estão envolvidas no recebimento do sinal externo, quando do contato do composto com a membrana plasmática, e na resposta a este sinal, com o desencadeamento de vários mecanismos intracelulares. Em geral, nestes processos, concentrações tão baixas como 10 nM já são capazes de deflagrar as reações de ativação celular.

A ativação celular pode ser feita exteriormente à célula, onde geralmente proteínas transmembranas estão envolvidas, ou pode ser feito no interior da célula, quando as moléculas do composto devem entrar na célula para efetivar a ativação. Esta passagem pela membrana plasmática pode ocorrer por simples difusão ou por transporte ativo.

Na simples difusão, a passagem pode se dar pela bicamada de lipídios ou através de proteínas transmembranas, não requerendo gasto de energia pela célula, ocorrendo devido ao gradiente de concentração, onde a molécula se difunde para um potencial de menor concentração, diminuindo a quantidade de Energia Livre ΔG e aumentando a de Entropia ΔS do sistema.

No transporte ativo, a passagem só pode ser realizada através de proteínas transmembranas, requerendo um gasto de energia (ALBERT *et al.*, 2002).

De um modo geral, as interações entre o biocida e o organismo podem ser reunidas em cinco diferentes padrões:

- a) ***S-shaped***. A molécula do soluto (biocida) encontra forte competição das moléculas do solvente ou de outras moléculas adsorvidas pela célula;
- b) ***Langmuir***. O preenchimento dos sítios de adsorção da célula se faz consecutivamente, tornando-se cada vez mais difícil o soluto encontrar sítios vazios para ser adsorvido;
- c) ***High affinity***. Quando a molécula do soluto é rápida e completamente adsorvida na célula;
- d) ***C (Constant partition)***. Quando a molécula do soluto penetra mais rapidamente na célula do que o próprio solvente que o carrega;
- e) **Tipo Z**. Quando há uma fuga do padrão de adsorção seguido por um aumento da entrada de soluto, que é interpretado como uma quebra na estrutura do substrato adsorvente com a geração de novos sítios adsorventes (RUSSELL, 2003).

Do acima exposto, pode-se então supor que o tipo, tamanho e solubilidade da molécula do biocida são fatores importantes a serem considerados em sua adsorção por microorganismos. Em geral, moléculas pequenas e mais hidrofóbicas ou não-polares são mais rapidamente difundidas através da bicamada de lipídios, de modo que moléculas como O₂ e CO₂ são prontamente dissolvidas e difundidas.

Moléculas com cadeias hidrofóbicas grandes geralmente não interagem com as membranas celulares em ambiente aquoso, pois se agregam neste meio, diminuindo a sua possível adsorção. Já as moléculas hidrofílicas não permeiam pela bicamada de fosfolípidios, só podendo ser adsorvidas através das proteínas transmembranas, e normalmente somente

moléculas bem específicas são adsorvidas devido à alta seletividade de tais proteínas. Por outro lado, moléculas anfífilas têm uma especial habilidade de difusão em meio aquoso e de permeação em membranas celulares, sendo possivelmente este o fator ou um dos fatores da alta eficiência antiincrustante do composto TBT, pois compostos contendo um metal e radicais orgânicos são também moléculas anfífilas (PRZETALSKI, 2000).

3.4 Biocida. Compostos Usados

3.4.1 PAF análogo adquirido comercialmente

O glicerofosfolípido PAF-análogo, 1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine, CAS #77286-66-9, adquirido da Sigma-Aldrich, aqui utilizado como biocida, apresenta algumas propriedades especiais vinculadas a sua estrutura molecular. É um composto anfílico, pois possui um sítio hidrofílico e outro hidrofóbico, e é também zwitteriônico, ou seja, apresenta cargas negativa e positiva (radical bipolar) em sua estrutura, além de também apresentar baixos pesos moleculares, PM ~ 500 Daltons.

Estas propriedades são importantes, quando as confrontamos com a difusão pelo EPS e com os possíveis caminhos de absorção pelos microorganismos.

Devido ao seu sítio hidrofóbico, uma longa cadeia alquílica saturada presa em um dos extremos da molécula, este composto pode ser facilmente absorvido através das bicamadas de lípidios componentes do invólucro celular e membrana plasmática dos organismos (JONES e OSBORN, 1977a, b).

Por ser uma molécula anfílica e ter baixo peso molecular (PM < 1000 Daltons), têm um bom potencial para se difundir no biofilme e esta mesma característica pode ainda permitir uma passagem pelas proteínas transmembranas presentes no invólucro celular e nas membranas plasmáticas, pois algumas destas proteínas, chamadas de Porins, têm baixa especificidade e em geral permitem a difusão de moléculas hidrofílicas com PM menores que 600 daltons (KOEJNIK *et al.*, 2000; NIKAIDO e VAARA, 1985).

Outro fator importante é que este composto é um PAF-análogo, sem radical tipo acila na posição sn-2, que o permite atuar como molécula sinalizadora, quando em contato ou absorvido pelos microorganismos, sem sofrer a terminação de sua ação agonista por enzimas PLA₂, possivelmente existentes. Assim, fatalmente irá se acumular no invólucro, parede ou interior das células, deflagrando um processo antagônico de resposta celular, que inibirá o desenvolvimento ou destruirá o microorganismo.

3.4.2 PAF-análogo obtido de organismos vivos

Os PAF-análogos aqui utilizados foram obtidos por fracionamento em coluna de sílica dos extratos lipóides obtidos de organismos vivos (RÜTTERS *et al.* 2002; RUIZ-GUTIÉRREZ e PÉREZ-CAMINO, 2000; CHRISTIE, 1992; PUGH *et al.*, 1977; HANAHAN *et al.*, 1957), induzidos ao choque por substância química irritante, e deste modo serão, possivelmente, uma mistura de diversos PAF-análogos. Porém espera-se que os PAF-análogos, presentes nestas frações, possam induzir o processo inflamatório nos organismos formadores do biofilme.

A indução à síntese do PAF se fará pela administração de solvente DMSO (dimetil-sulfóxido) no organismo ainda vivo, tais como moluscos e esponjas marinhas (SUGIURA *et al.*, 1991; THOMPSON e HANAHAN, 1963), sendo estes então tratados para extração dos lipídios com base no método de Folch (CHRISTIE, 1993; CHRISTIE, 1992; FOLCH *et al.*, 1957; FOLCH *et al.*, 1951).

A confirmação da presença de tais PAF-análogos, presentes em cada extrato, foi verificada com a utilização de técnicas de cromatografia em camada fina (ver fig. 46), espectrometria de infravermelho (ver apêndice C) e por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de massa (ver item 6.2).

4 HIPÓTESE DE ATUAÇÃO DO BIOCIDA UTILIZADO

De certo modo, ao se especular o caminho percorrido pelo biocida, pode-se supor que ocorram os seguintes passos:

1º- O glicerofosfolípido, utilizado como biocida na tinta antiincrustante, é liberado e atinge a parte inferior do biofilme;

2º- O glicerofosfolípido começa sua difusão pelo interior do biofilme, tendo como principal solvente a água do mar e, como superfície de interação o EPS (adsorção e dessorção);

3º- O glicerofosfolípido atinge os invólucros mais externos dos microorganismos componentes do biofilme. Sendo iniciada, deste modo, a sua absorção; e

4º- O glicerofosfolípido atinge a membrana plasmática e ocasiona a repulsão ou morte do microorganismo.

O primeiro passo acima mencionado não compõe e não afeta o objetivo deste trabalho, sendo o modo empregado na liberação do glicerofosfolípido, presente na tinta antiincrustante, um assunto que necessita ser abordado por outros trabalhos.

No segundo passo, as interações do glicerofosfolípido com a água do mar e com o EPS são de fundamental importância, pois o biocida não pode ser totalmente solúvel em água e nem ter alta afinidade pelo EPS. Se totalmente solúvel, o mesmo tenderá a permanecer na fase aquosa e, devido ao maior coeficiente de difusibilidade neste meio, será completamente retirado para fora do biofilme. Se o biocida tiver alta afinidade pelo EPS, a sua difusão torna-se muito lenta e menos abrangente, comprometendo o seu contato com os microorganismos. Deste modo, avaliando os compostos que interagem, (i) a água do mar, (ii) o EPS, formado principalmente por polissacarídeos, proteínas e lipídios, e (iii) o biocida, que é um glicerofosfolípido, pode-se presumir que este último, devido a sua característica zwitteriônica

(radical bipolar), terá uma mediana interação com o EPS e com a água, podendo, deste modo, mais facilmente se difundir pelo biofilme.

No terceiro passo, ao alcançar os invólucros celulares dos microorganismos, o glicerofosfolipídio, poderá atuar das seguintes maneiras: (i) devido à característica hidrofóbica de seu radical alquídic, poderá facilmente ser adsorvido por camadas de peptidoglicanos, polissacarídeos, lipo-polissacarídeos ou fosfolipídios, e agindo como um surfactante causará danos à membrana plasmática da célula atingida, e (ii) devido a sua característica de PAF-análogo, poderá desencadear uma reação antagônica, *p ex.* inflamação, inibição de síntese celular ou apoptose, ocasionando a repulsão ou morte do microorganismo.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 Introdução

Glicerofosfolipídios análogos ao composto *Platelet Activating Factor* (PAF) foram avaliados em testes de laboratório quanto à possível ação antiincrustante contra bactérias e diatomáceas presentes na formação do biofilme, etapa fundamental ao processo de bioincrustação marinha. Para isto, PAF-análogos disponíveis comercialmente e extraídos de organismos marinhos induzidos ao estresse por meio de inoculação de substância química irritante (SUGIURA *et al.*, 1991; THOMPSON e HANAHAN, 1963), foram avaliados sendo incorporados em lâminas para microscopia recobertas por gel ágar-ágar e dispostos em tanques contendo água bombeada diretamente do mar, sendo então acompanhados e avaliados quanto à presença de microorganismos e formação de biofilme.

Os PAF-análogos obtidos de organismos marinhos, uma espécie de mexilhão e três espécies de esponjas (ver Apêndice A), foram frações isoladas por cromatografia em coluna de sílica, de extratos lipóides obtidos após a indução de estresse por inoculação de solvente dimetil-sulfóxido (DMSO).

Um conjunto de duzentos e dezesseis lâminas (2,6 x 7,6 cm) recobertas unilateralmente com ágar-ágar incorporado com os compostos avaliados (8 extratos e 1 composto análogo, com 6 replicatas cada), e outras vinte e quatro lâminas de controle (branco), contendo somente ágar-ágar e o solvente utilizado na solubilização dos

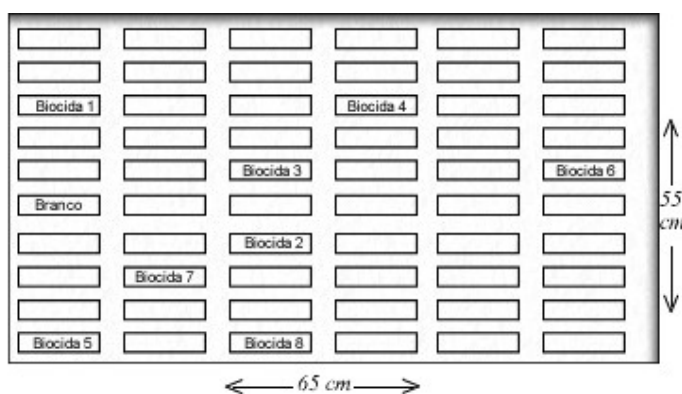


Figura 39. Painel de testes utilizados no laboratório. Ilustração

compostos avaliados, foram fixadas usando uma distribuição aleatória, em painéis de acrílico (4 unidades), medindo (55 x 65cm) cada um (fig 39).

Os painéis permaneceram constantemente submersos, sendo retirados seqüencialmente a cada ciclo de 48 horas a partir da submersão inicial, ocorrida simultaneamente para todos os painéis, sendo todas as lâminas avaliadas sob microscópio quanto à presença de microorganismos.

5.2 Material

5.2.1 Reagentes, solventes e outros produtos

Tabela 2.

Relação dos reagentes utilizados.

Classe	Produtos
Reagentes	(i) 1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine (ii) 1-O-hexadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine, foram adquiridos da Sigma-Aldrich.(Pureza >98%)
Solventes	Acetona P.A. QUIMEX. Ciclohexano e Hexano grau pesticida Mallinckrodt. 1-Butanol P.A., Diclorometano P.A., e Metanol P.A. VETEC. Dimetil-sulfóxido (DMSO) Sigma-Aldrich. Água (grau Milli-Q).
Outros	Ácido acético P.A. Ágar-ágar. Sílica. Lã de vidro. Gás nitrogênio. White Martins.

Os papéis de filtro utilizados nos ensaios foram previamente lavados com solvente hexano grau pesticida, por refluxo de 4 horas em extratores tipo Soxlet convencionais, secos em estufa a 105°C por 1 hora e mantidos em dessecador.

A sílica (250 – 175 mesh) utilizada nas colunas foi previamente lavada sob agitação magnética por 1 hora com uma solução de hexano grau pesticida e ácido acético PA. (100:0,2) v/v, filtrada e tratada termicamente a 105°C por 16 horas e mantida em dessecador.

5.2.2 Equipamentos

Tabela 3

Relação dos equipamentos utilizados.

Procedimento	Equipamentos utilizados
Avaliação microscópica	Microscópio de epifluorescência OLYMPUS BX51.
Concentração de extratos	Banho-maria. Bomba de vácuo. Cilindro de Nitrogênio. Roto-evaporador. Termômetro.
Espectrofotometria de Infravermelho	FTIR-ATR IR-300 Thermo-Nicolet.
Espectrometria de massas	Shimadzu LC-MS 2010.
Extração	Agitador mecânico. Becher 2000 ml. Liquidificador.
Filtração	Bomba de vácuo. Funil de Buchner. Kitasato.
Fracionamento dos extratos	Coluna cromatográfica de vidro com tampa de vidro e torneira de teflon, de 10 x 30mm com reservatório de 300ml. Kitasato 1l. Bomba de vácuo.
Inoculação	Seringa tipo hipodérmica (1000µl).
Lavagem do filtrato	Funil de Separação em vidro com tampa de vidro e torneira em teflon.
Pesagem	Balança analítica eletrônica Mettler PE360 (0,000-360,000)g. Balança mecânica (0 – 2000g).
Preparo do Ágar-ágar	Becher. Placa magnética com aquecimento. Bastão magnético. Termômetro.
Outros	Bomba de aeração. Centrífuga. Dessecador. Estufa. Frascos âmbar de 1000ml com tampa rosqueável e septo de teflon. Lâmina para microscopia. Peneira metálica. Placas de Petri. Vials de vidro âmbar com tampa rosqueável e septo de teflon.
Segurança	Capelas e Coifas exaustoras.

Os ensaios mencionados foram realizados em laboratório com capacidade para todas as operações e segurança do pessoal.

5.3 Preparo dos Extratos Lipóides

5.3.1 Coleta dos organismos marinhos e indução ao estresse

Uma espécie de mexilhão, *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (fig.40), e três espécies de esponjas marinhas (fig. 41), *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), *Amphimedon viridis* (Duchassaing & Michelotti, 1864) e *Arenosclera brasiliensis* (Muricy & Ribeiro, 1999), foram coletados na região de Arraial do Cabo-

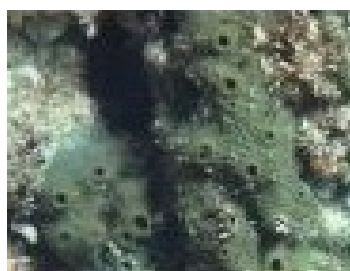


Figura 40. Mexilhão *Perna perna*

RJ, e transportados em recipientes contendo água do mar ao laboratório da Divisão de Química do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira -IEAPM.



Aplysina fulva



Amphimedon viridis



Arenosclera brasiliensis

Figura 41. Esponjas utilizadas no preparo dos extratos.

No laboratório, os organismos foram então classificados e separados em dois grupos dentro de cada espécie para o processo de extração (fig. 42). O primeiro grupo de cada espécie, o qual não sofreu nenhuma inoculação e serviu como referência, teve iniciado imediatamente o seu processo de extração. O segundo grupo foi transferido para recipientes contendo água do mar filtrada, tendo baixo teores de organismos planctônicos e material orgânico particulado, mantida sob aeração forçada, permanecendo sob inanição por 36 horas para o início do processo de indução ao estresse.

Terminado o período de inanição, os organismos foram pesados para inoculação com DMSO, na razão aproximada de 20 µl por grama do organismo tratado.

Após aproximadamente 20 minutos da inoculação com DMSO, os organismos foram transferidos para um becher de 2000ml para o início da extração com solventes.

5.3.2 Extração

Os organismos foram extraídos tendo como parâmetro o método de Folchs (FOLCHS *et al.* 1957; FOLCHS *et al.* 1951), o qual permite que todas as substâncias lipóides, *i.e* tri, di, e monoacilgliceróis, esteróis, ácidos graxos e fosfolípidios sejam extraídas, sendo efetuado a substituição do clorofórmio originalmente utilizado por diclorometano, o qual tem sido usado como um satisfatório substituto (DROUILLARD *et al.*, 2004; HALL e MURPHY, 1998; CHRISTIE, 1993), além de ter como vantagem sua reconhecida menor toxicidade (PLAA, 2000; CROWL e LOUVAR, 1990). (Ver tabela 4).

Tabela 4
Threshold Limit Values (TLV) e Permissible Exposure Level (PEL)*.*

Substância	TLV		OSHA (PEL)	
	ppm	mg/m ³	ppm	mg/m ³
Clorofórmio	10	50	2	10
Diclorometano	50	175	50	175
Butanol	50	150	50	150
Ciclohexano	300	1015	300	1015
Hexano	50	180	50	180
Metanol	200	260	200	260

Fonte (CROWL e LOUVAR, 1990).

Os organismos foram previamente liquefeitos, transferidos para um becher de 2 litros, sendo adicionados de uma solução de diclorometano-metanol (2:1) por volume, na proporção de 20 ml de solução para cada grama de tecido (peso seco), e então posto sob agitação mecânica por 2 horas para uma mais eficiente extração dos lipídios aderidos aos tecidos, conforme recomendado em trabalhos mais recentes (AMETAJ *et al.*, 2003; DREYFUS, 1997).

Terminado a agitação, todo o material foi passado em peneira metálica 0,25mm (60 Mesh), em seguida centrifugado e finalmente transferido para um funil de Buchner para

filtração a vácuo. Tal seqüência se fez necessária devido à consistência final dos extratos, próximo a algo como um gel, que tornou impraticável uma filtração direta.

O resíduo sólido foi então seco em estufa, 105°C por 24 horas, e pesado para futuras comparações.

Cada filtrato teve seu volume medido (V_m) e foi então transferido para um funil de separação, sendo então lavado com um volume total de 0,2 V_m de água destilada para a remoção de contaminantes não lipóides, descansando *overnight* para uma completa separação das fases. Após a separação das fases, reservou-se a fase inferior não-aquosa (diclorometano) em um frasco âmbar para subsequente concentração.

A fase superior (aquosa) foi transferida para um roto-evaporador onde se evaporou a porção presente do metanol e diclorometano residual. A porção aquosa restante foi retornada para o funil de separação, acidificada a pH 4,0 - 4,5, pela adição de solução de ácido acético, e extraída por duas vezes com um igual volume de 1-butanol, saturado em água, para recuperação dos possíveis lipídios presentes na fase aquosa (BODENNEC *et al.*, 2003; SUBBANAGOUNDER *et al.*, 2000; SIESS *et al.*, 1999; SHAIKH, 1994); BJERVE *et al.*, (1974).

Após a separação das fases, descartou-se a fase aquosa e juntou-se a fase superior alcoólica (1-butanol) com a fase inferior não-aquosa (diclorometano) anteriormente reservada. Algumas emulsões persistentes que se formaram durante este processo, foram desfeitas por centrifugação.

A mistura, fases alcoólica e não-aquosa, foi então concentrada em roto-evaporador sob vácuo, utilizando água resfriada para condensação. O extrato concentrado foi transferido quantitativamente para um vial, previamente pesado, com o auxílio de pequenas porções de hexano, sendo reduzido por corrente de nitrogênio e pesado para verificação da massa de lipídios totais extraídos.

Neste ponto, a seqüência utilizada na concentração do extrato foi primeiramente uma evaporação do diclorometano seguida por uma adição, quando necessária, de água para a formação e destilação do azeótropo 1-butanol / água, sob pressão menor que 50mmHg e temperatura do banho menor que 65°C, até volume residual de aproximadamente 10 ml, sendo então, na seqüência, diminuída a temperatura do banho para 45 - 50°C, realizado um polimento com n-hexano até um volume final de aproximadamente 10 ml, e finalmente, reduzido por corrente de nitrogênio gasoso.

Após a pesagem do extrato, foram adicionado 10 ml de ciclohexano grau pesticida em cada vial, sendo os mesmos armazenados sob refrigeração ($T < -20^{\circ}\text{C}$) até o momento do fracionamento.

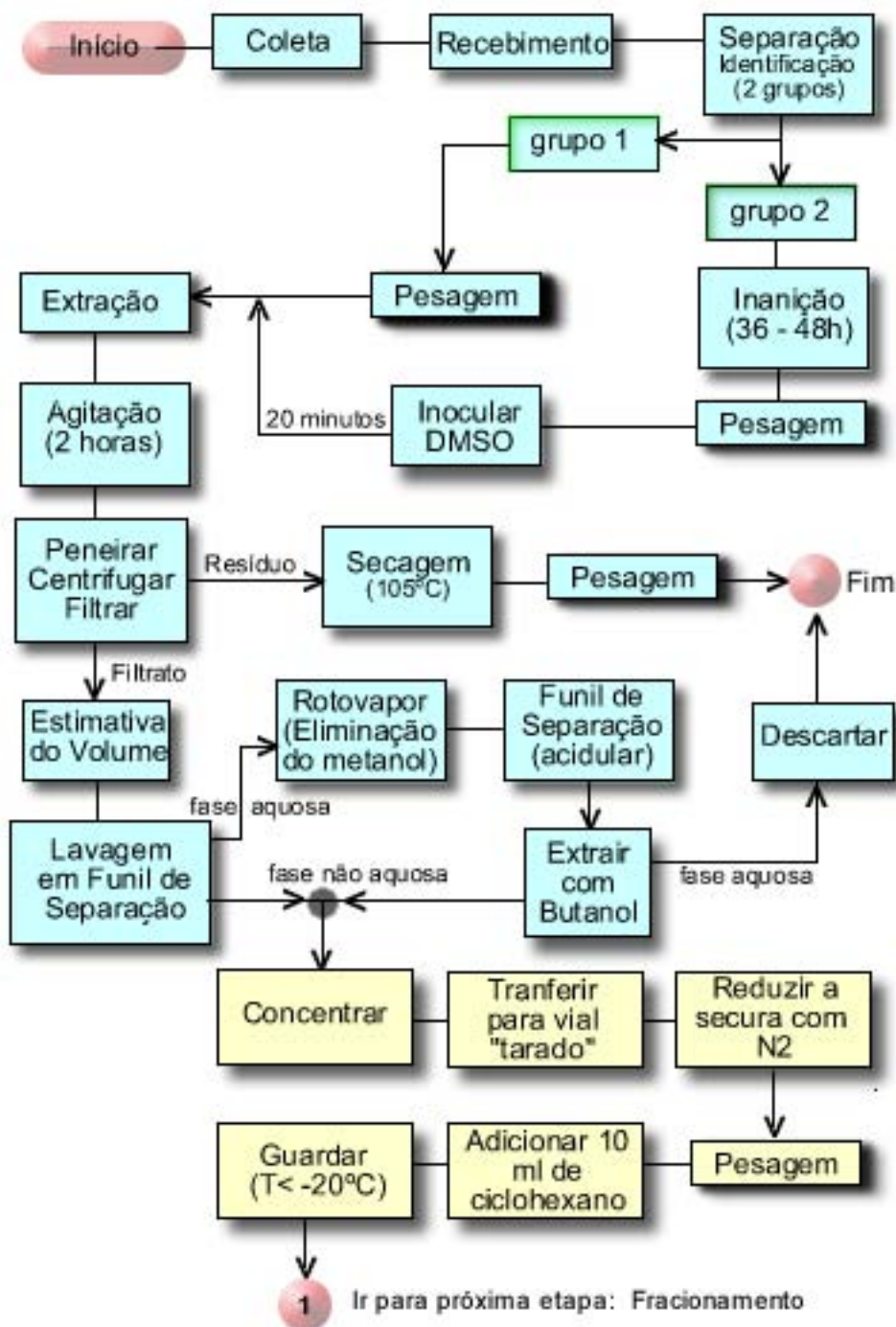


Figura 42. Fluxograma do processo de Extração.

5.3.3 Isolamento das frações

O isolamento da fração de interesse (fosfolípidios) foi realizado por cromatografia em coluna de sílica (250–115 mesh), onde 10 gramas da sílica pré-tratada foram transferidas para coluna cromatográfica com diâmetro interno de 1cm, contendo 50 ml de solvente hexano e restringida inferiormente com um pequeno pedaço de lã de vidro.

Para uma uniforme compactação e vazão, as colunas foram drenadas sob vácuo de 80mmHg (fig. 43), que, após a decantação formaram uma coluna com altura de aproximadamente 20 cm (fig. 44).



Figura 43. Sistema utilizado para fracionamento sob vácuo.

Antes da transferência do extrato a ser fracionado para a coluna cromatográfica, a mesma foi “zerada”, ou seja, o excesso de hexano foi drenado da mesma até o seu menisco ficar ligeiramente acima do topo da camada de sílica.

Na seqüência, uma alíquota contendo no máximo 300 mg do extrato a temperatura ambiente, para evitar uma possível saturação da coluna, foi depositado na coluna, sendo a coluna novamente “zerada”.

Esta quantidade, 30 mg de extrato lipóide por grama de sílica, tem sido recomendada como limite de uso, para evitar uma possível saturação da coluna (www.cyberlipid.org).

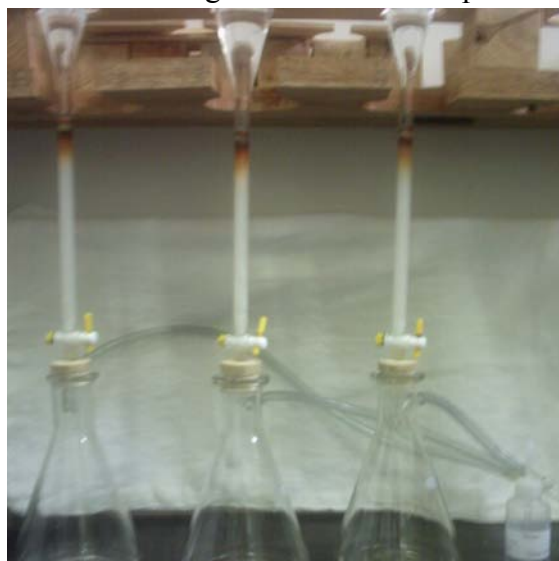


Figura 44. Colunas sendo eluídas sob vácuo.

Para evitar problemas de saturação da coluna e obter uma quantidade necessária para os testes, cada extrato foi fracionado em seis replicatas, sendo os eluídos de cada fração reunidos para posterior concentração em roto-evaporador (Tabela 5).

A vazão de trabalho se manteve na faixa de 2 a 3 ml /min, avaliada previamente e mantida com o auxílio do controle do vácuo (80 - 200 mm Hg).

Tabela 5.

Quantidades de extratos utilizados e de frações obtidas após concentração dos eluídos.

Extrato lipóide	Nº de colunas utilizadas	Quantidade por coluna (mg)	Quantidade total fracionada (mg)	Quantidade total obtida (mg)	
				F1 + F2	F3
Mexilhão <i>Perna perna</i> referência	6	268	1608	555	332
Mexilhão <i>Perna perna</i> inoculado	6	262	1572	369	423
Espinha marinha <i>Aplysina fulva</i> referência	6	280	1680	357	394
Espinha marinha <i>Aplysina fulva</i> inoculada	7	307	2149	343	248
Espinha marinha <i>Amphimedon viridis</i> referência	6	244	1464	309	173
Espinha marinha <i>Amphimedon viridis</i> inoculada	6	309	1854	569	199
Espinha marinha <i>Arenosclera bras.</i> inoculada	6	280	1680	414	344
Espinha marinha <i>Arenosclera bras.</i> referência	6	299	1794	334	300

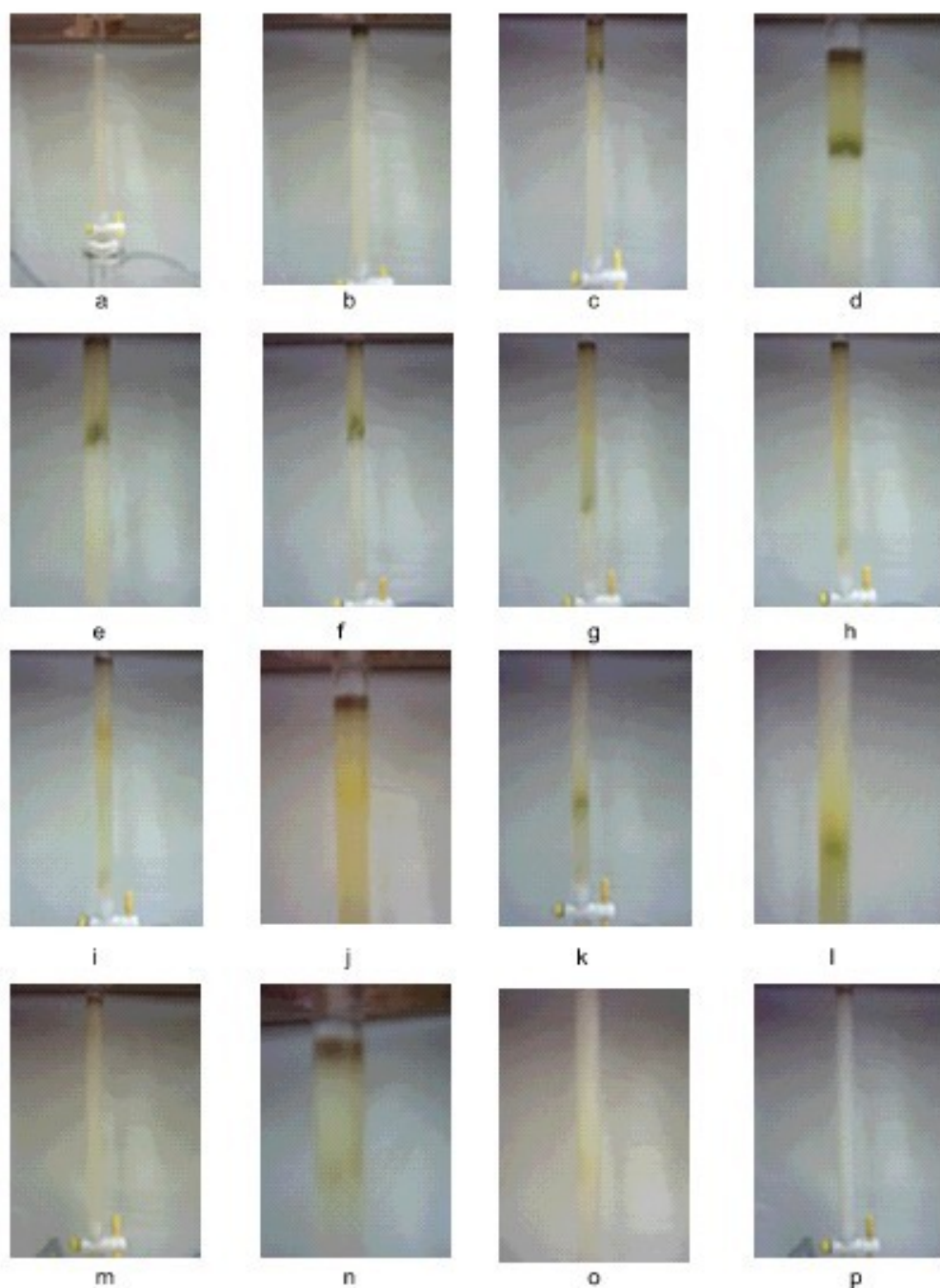


Figura 45. Seqüência mostrando a eluição, em coluna cromatográfica de sílica, do extrato lipóide obtido da esponja marinha *Arenosclera brasiliensis* submetida ao estresse.

a) coluna pronta para uso. **b)** colocação do extrato a ser fracionado. **c)** início da primeira eluição. **d,e)** imagem ampliada da eluição F1. **f, g)** separação da fração F1. **h)** término da eluição da fração F1. **i)** início da segunda eluição. **j)** imagem ampliada da eluição F2. **k, l)** separação da fração F2. **m)** início da terceira eluição. **n)** imagem ampliada da eluição F3. **o)** separação da fração F3. **p)** término da eluição da fração F3.

A seqüência de solventes utilizada nas eluições teve como base uma combinação de solventes utilizados separadamente para diferentes propósitos (RUIZ *et al.*, 2004; RÜTTERS *et al.*, 2002; MANIRAKIZA *et al.*, 2001; RUIZ-GUTIÉRREZ e PÉREZ-CAMINO, 2000; PINKART *et al.*, 1998; DREYFUS *et al.*, 1997; MYHER e KUKSIS, 1995; HOVING, 1995; CHRISTIE, 1992; KIM e SALEM, 1990; KALUZNY *et al.*, 1985; HAMILTON e COMAI, 1984; KRAMER e HULAN, 1978; PUGH *et al.*, 1977; HIRSCH e AHRENS, 1958; HANAHAN *et al.*, 1957), e teve como objetivo separar a fração contendo os fosfolípidios integrantes dos extratos (ver Apêndice B).

A primeira fração foi eluída com 100ml de uma solução de hexano e diclorometano (4:1) v/v, que foram adicionados ao reservatório da coluna, visando a eluição de possíveis ácidos graxos livres e lípidios neutros (fig. 45 a-h).

A segunda fração foi eluída com 100 ml de uma solução de diclorometano e acetona na proporção de 1:2 (v/v), visando a eluição de lípidios neutros (pigmentos, triglicerídios, esteróis) e glicolipídios presentes (fig. 45 i-l).

A terceira eluição foi realizada com 100 ml de uma solução de acetona e metanol, na proporção de 2:7 (v/v), visando eluir os fosfolípidios de interesse (fig. 45 m-p).

Todas as frações eluídas foram reservadas em frascos âmbar e guardadas sob refrigeração ($T < -20^{\circ}\text{C}$), até serem concentradas.

A concentração foi executada em roto-evaporador sob vácuo e $T \leq 50^{\circ}\text{C}$, até um volume de aproximadamente 2 ml, sendo transferido quantitativamente para um vial, previamente pesado, com o auxílio de pequenas porções do solvente da eluição, sendo reduzido por corrente de nitrogênio e então pesado para verificação da massa presente.

A fração relativa a terceira eluição de cada extrato lipóide total foi avaliada quanto à presença de fosfolípidios utilizando um equipamento de FTIR com detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS) e acessório de amostragem por refletância total atenuada com

ZnSe (ATR), verificando a presença de bandas características das ligações (C=O) éster de lipídio em $1697 - 1785 \text{ cm}^{-1}$, e (PO_2^-) assimétrica em $1193-1280 \text{ cm}^{-1}$ e simétrica em $1020-1132 \text{ cm}^{-1}$ (YU e IRUDAYARAJ, 2005; GAUGER e POHLE, 2005; POHLE *et al.*, 2001; GÓMEZ-FERNADEZ e VILLALAÍN, 1998; VILLÉ *et al.*, 1995; PUGH *et al.*, 1977; STANACEV e BAER, 1963). Os espectros foram coletados a cada 32 scans com uma resolução de 4 cm^{-1} na faixa de 650 a 4000 cm^{-1} , depositando-se o extrato dissolvido em metanol na fenda do ATR, sendo retirado espectros até a estabilização da evaporação do solvente residual (ver Apêndice C). Adicionalmente, para detecção do grupamento $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ colina, foi efetuada a cromatografia em camada fina (TLC) utilizando o reagente de Dragendorff como revelador (fig. 46), o qual dá reação positiva para compostos contendo amina quaternária (WAGNER *et al.*, 2000; KÜNZLER e EICHENBERGER, 1997; TOUCHSTONE, 1995; PUGH *et al.*, 1977; SCHNEIDER, 1966).

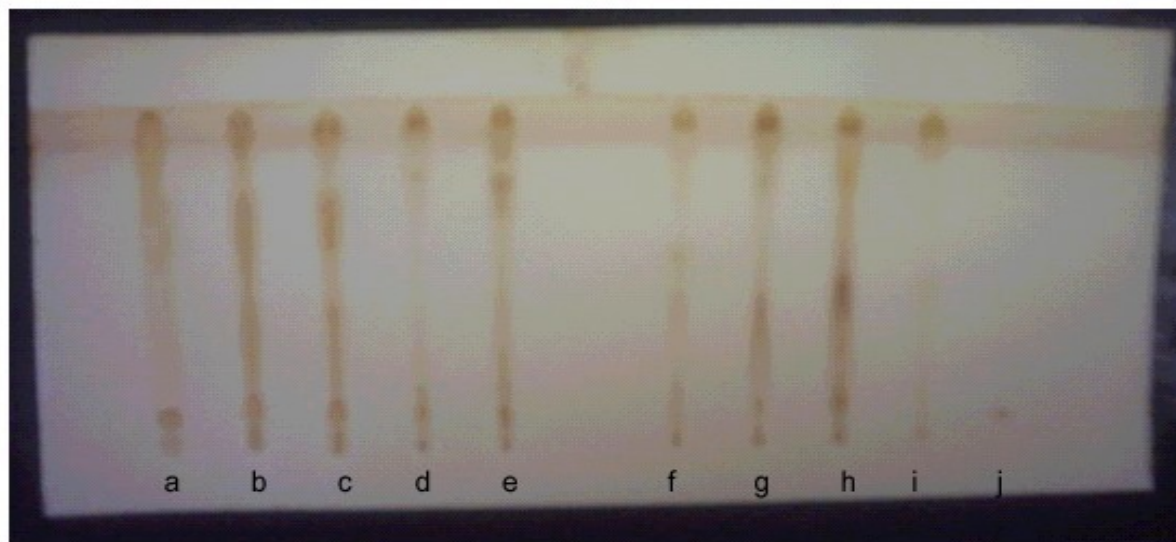


Figura 46. Placa TLC, revelada em câmara de iodo, contendo spots das frações polares (F3) dos extratos **a)** Lecitina comercial. **b)** mexilhão não inoculado. **c)** mexilhão inoculado. **d)** Esponja *Aplysina fulva* não inoculada. **e)** Esponja *Aplysina fulva* inoculada. **f)** Esponja *Amphimedon viridis* não inoculada. **g)** Esponja *Amphimedon viridis* inoculada. **h)** Esponja *Arenosclera brasiliensis* não inoculada. **i)** Esponja *Arenosclera brasiliensis* inoculada. **j)** Padrão do PAF análogo EDELFOSSINE. Corrida efetuada com solução de clorofórmio:metanol (1:1). Setas indicam reação positiva ao reagente de Dragendorff (positivo para colina).

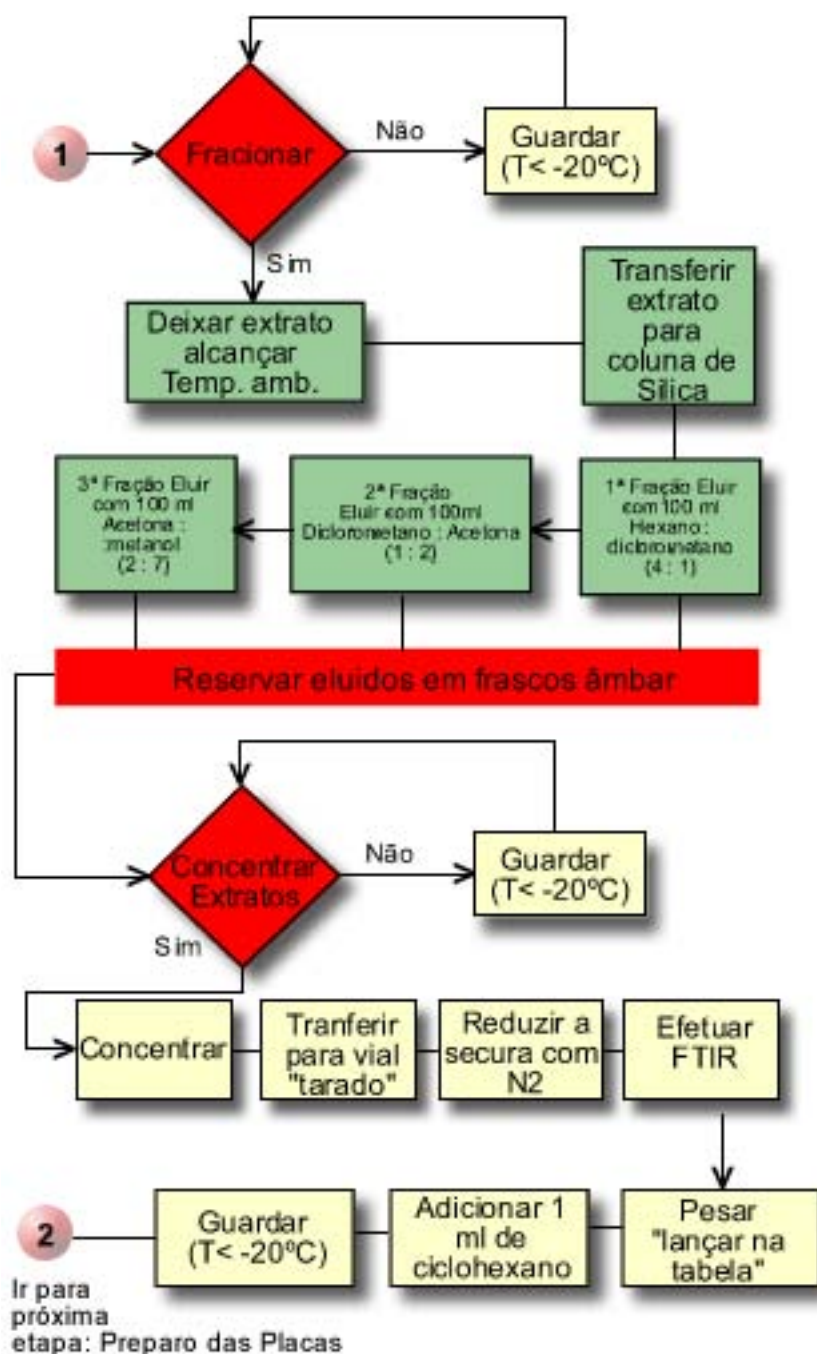


Figura 47. Fluxograma do processo de Fracionamento.

5.4 Preparo das lâminas de ensaios e fixação nos painéis

As 240 lâminas de microscopia, medindo (2,6 x 7,6 cm), usadas nos testes de laboratório foram preparadas conforme o protocolo mostrado no fluxograma (fig. 48), onde foram recobertas unilateralmente com uma camada de ágar-ágar contendo, dissolvido, as frações a serem avaliadas.

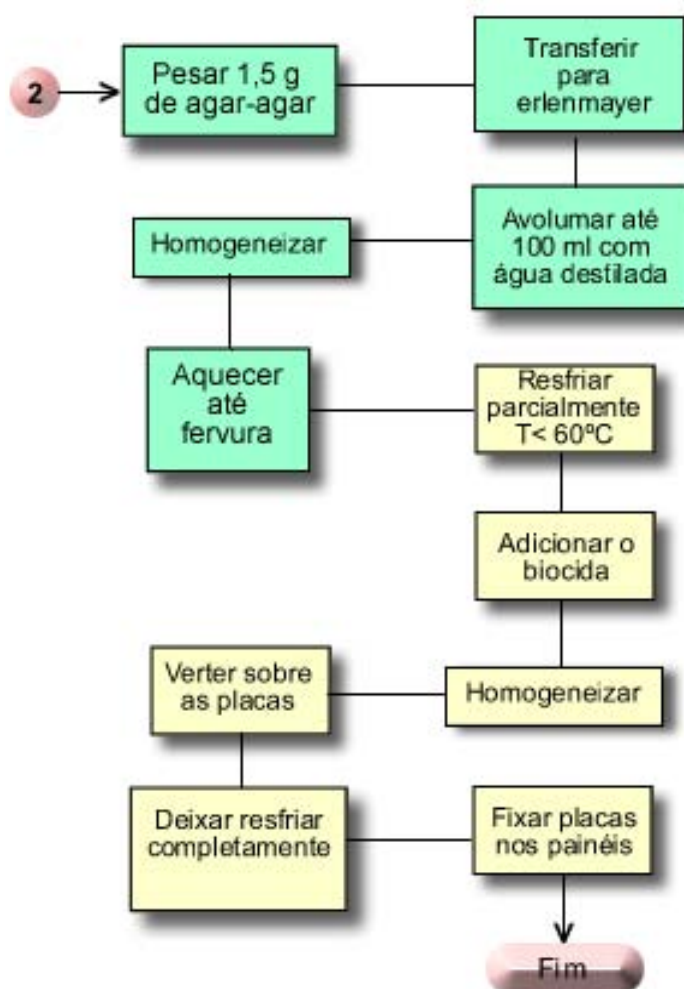


Figura 48. Fluxograma do processo de Preparo das Placas.

O ágar-ágar foi preparado em uma concentração de 15 gramas por litro, aquecido até fervura deixando-se resfriar até aproximadamente 55°C, adicionado da fração do extrato a ser avaliado e finalmente despejado sobre a lâmina devidamente identificada (fig. 49).

As lâminas, já contendo o ágar-ágar com as frações, foram colocadas em estufa (30° < T < 40 °C) overnight, para um parcial resfriamento e total desidratação, sendo então fixadas nos painéis correspondentes (fig.50).

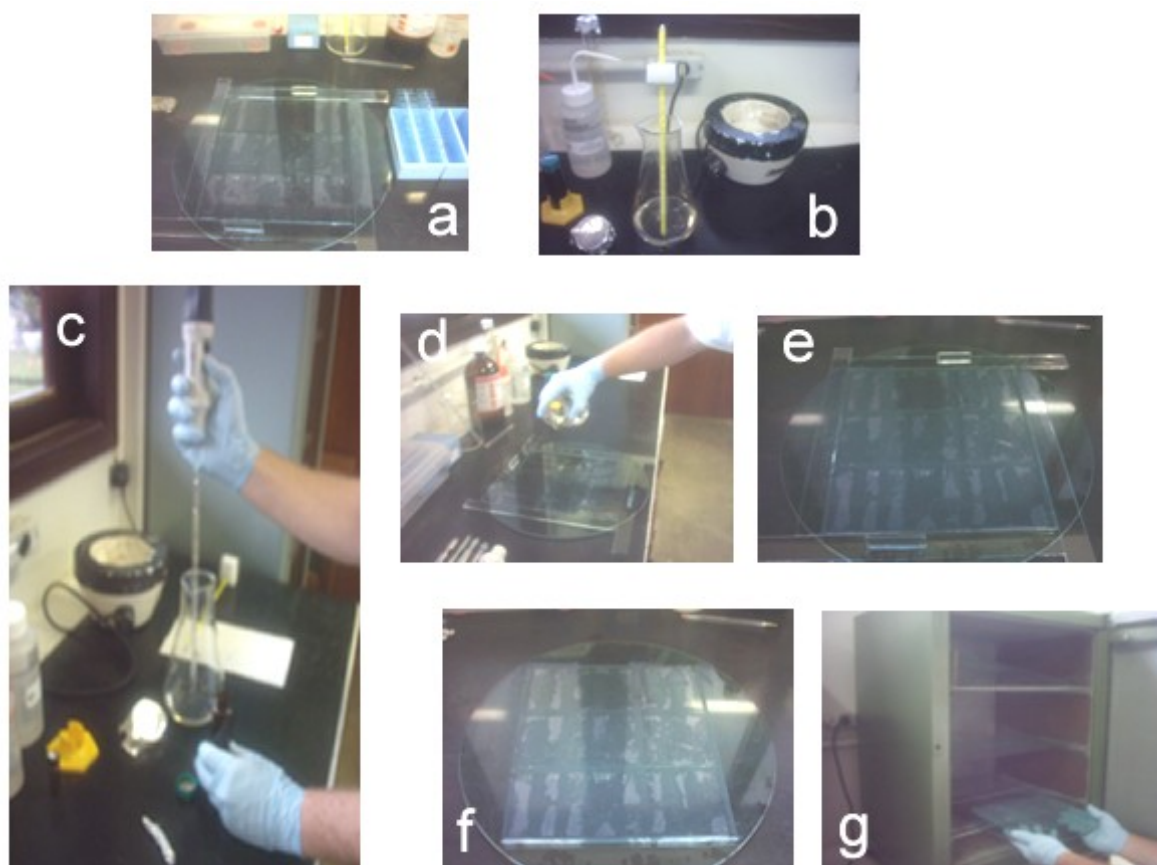


Figura 49. Preparo das lâminas. **a)** Lâminas de microscopia utilizadas; **b)** Preparo do ágar-ágar; **c)** Adição das frações dos extratos; **d)** Colocação do ágar-ágar sobre as lâminas; **e)** Iniciação do resfriamento do ágar-ágar; **f)** Ágar-ágar completamente solidificado; **g)** Colocação das placas na estufa, para desidratação.

Tabela 6.

Concentrações das frações dos extratos no ágar-ágar.

Extrato lipóide	Quantidade (mg)	Diluição em metanol (ml)	Volume utilizado de solução (ml)	Concentração final no ágar-ágar (mg/l)
Mexilhão <i>Perna perna</i> referência	332	20	0,30	49,80
Mexilhão <i>Perna perna</i> inoculado	423	20	0,25	52,87
Esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> referência	394	20	0,25	49,25
Esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> inoculada	248	20	0,40	49,60
Esponja marinha <i>Amphimedon viridis</i> referência	173	20	0,60	51,90
Esponja marinha <i>Amphimedon viridis</i> inoculada	199	20	0,50	49,75
Esponja marinha <i>Arenosclera bras.</i> referência	300	20	0,35	52,50
Esponja marinha <i>Arenosclera bras.</i> inoculada	344	20	0,30	51,60
Padrão de PAF	5	2	2	50,00
Branco	0	2	2	0

Os painéis contendo as lâminas foram submersos em um tanque de fibrocimento contendo 1000 litros de água do mar bombeada diretamente da enseada da Praia dos Anjos, Arraial do Cabo – RJ (fig. 50).



Figura 50. Painel e tanque utilizados nos experimentos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Gravimetria

A tabela 7 apresenta as quantidades referentes aos organismos e às frações obtidas durante o transcorrer dos trabalhos.

Tabela 7
Massa de Organismos, Extratos e Frações.

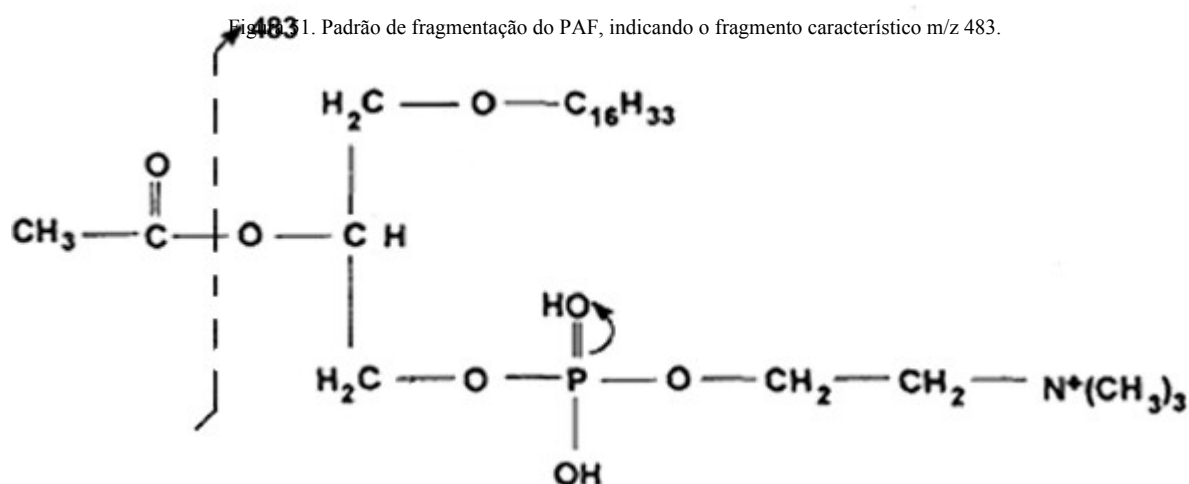
Organismo/ condição	Massa usada (g)	Peso seco (g)	Lipídios totais ^a (mg/g)	Lipídios polares ^b (mg/g)
Mexilhão referência	610	102	87,6	206,4
Mexilhão inoculado	405	74	174,9	269,0
Esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> referência	600	127	110,9	234,5
Esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> inoculada	370	92	83,5	115,4
Esponja marinha <i>Amphimedon viridis</i> referência	600	84	96,6	118,1
Esponja marinha <i>Amphimedon viridis</i> inoculada	310	56	92,1	107,3
Esponja marinha <i>Arenosclera bras.</i> referência	315	40	83,0	167,2
Esponja marinha <i>Arenosclera bras.</i> inoculada	282	c	-	204,7

a – mg/g peso seco. b – mg/g de lipídios totais. c – Houve perda de parte do material.

Estes dados mostram que cerca de 80% da massa dos organismos ensaiados é formado por água e somente um pequeno percentual está relacionado à massa lipóide, conforme valores usuais reportado para o mexilhão *Perna perna* (FURLAN, 2004) e algumas espécies de esponjas (DEMBITSKY, *et al.* 2003; CARBALLEIRA e SHALABI, 1994).

6.2 Espectrometria de massa das frações polares.

As frações polares relativas à terceira eluição de cada extrato lipóide, e um padrão comercial de PAF-análogo (*1-O-hexadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine*, Sigma Aldrich P-6034 CAS #85405-05-6), foram avaliadas com a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massa, em busca da confirmação da presença de picos dos fragmentos m/z 524 íon específico do PAF (fig. 51), m/z 184 correspondente a phosphocholine e m/z 483 correspondente ao Lyso-Paf ou a perda do acetil do PAF (MURPHY, *et al.*, 2001; SAVU, *et al.*, 1996; KERWIN, *et al.*, 1994; POLONSKY, *et al.*, 1980).



As separações foram efetuadas em um equipamento Shimadzu LC-UV-MS 2010 utilizando uma coluna STR ODS II, 150 x 20 mm, 5 micras. Fase móvel: a – solução 5% v/v ácido trifluoroacético (TFA); b – acetonitrila (MeCN), com gradiente até 85%. Fluxo de 0,2 ml/min. Volume injetado de 10 μl . UV 210 nm. Espectrômetro de Massas com interface de ionização por electrospray (ESI), modo de aquisição de íons positivos, faixa de 100 a 600 amu.

Com a utilização do composto padrão 1-O-hexadecyl-2-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine, confirmou-se o fragmento de m/z 483, indicador do composto lyso-PAF, eluindo próximo aos 18 minutos (fig. 52).

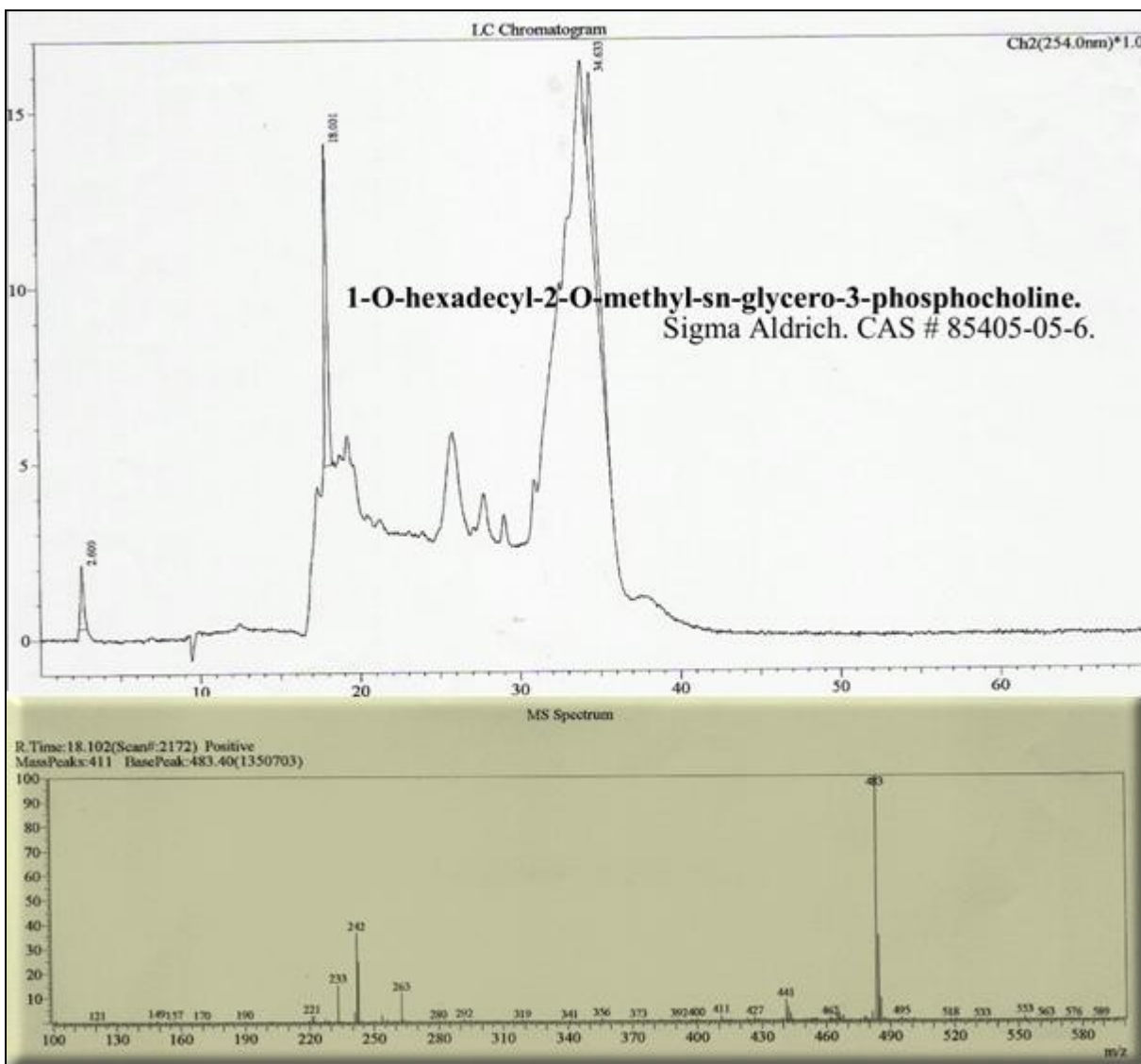


Figura 52. Cromatograma e Espectros de massa do Padrão de PAF – análogo.

Com base nestes parâmetros, verificou-se que os seguintes extratos: (i) mexilhão inoculado, (ii) mexilhão não inoculado (espectros de massa não apresentados), (iii) esponja marinha *Aplysina fulva* não inoculada, e (iv) esponja marinha *Amphimedon viridis* não inoculada, não apresentaram os fragmentos acima relacionados, indicando a inexistência de possíveis PAF-análogos em suas composições.

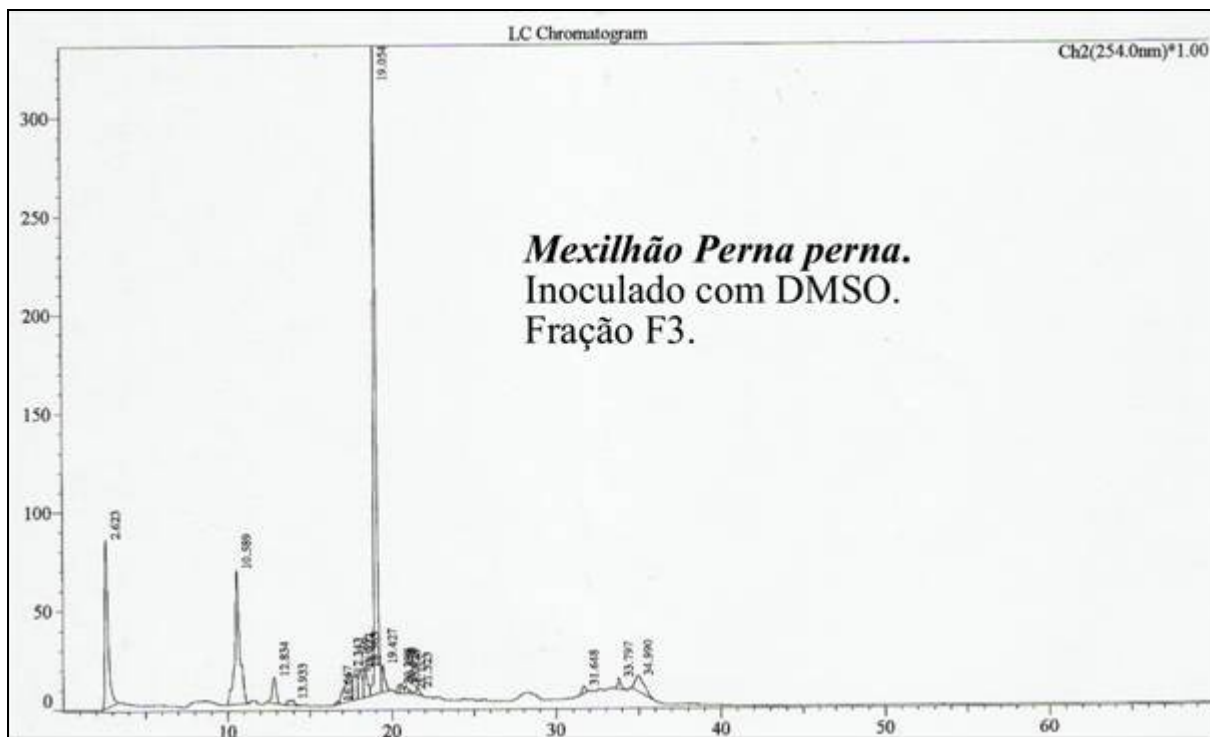
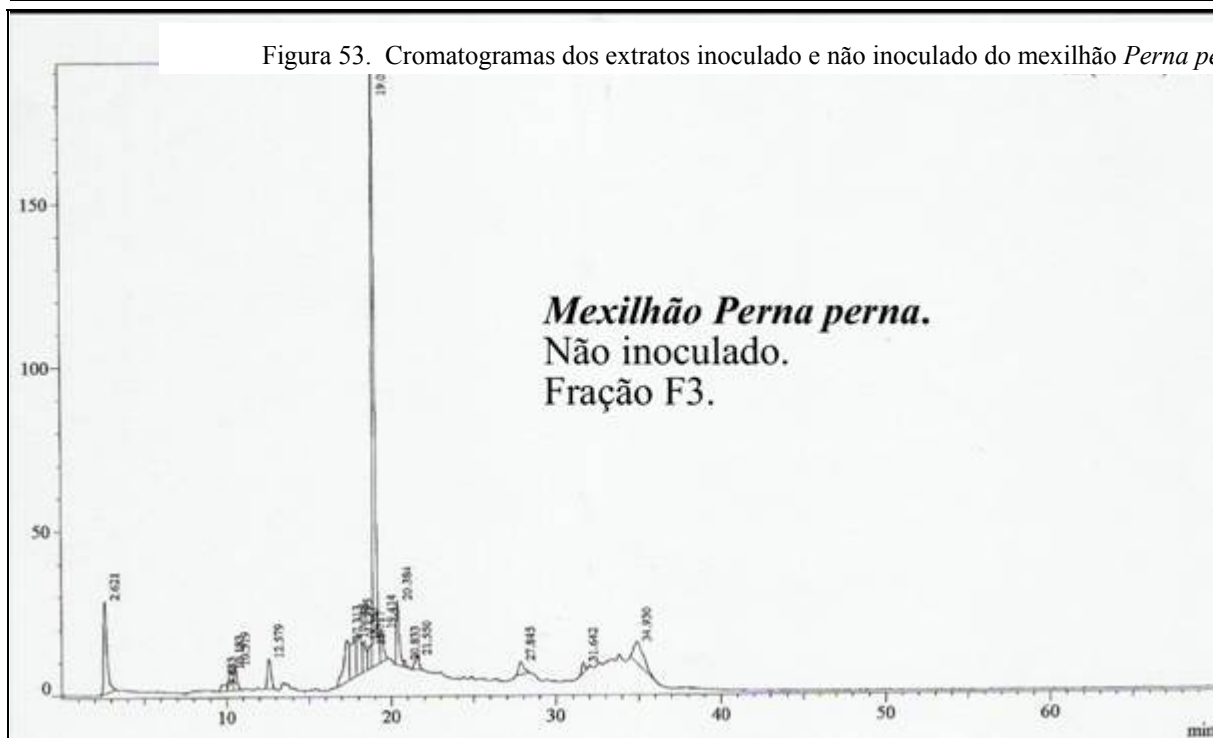


Figura 53. Cromatogramas dos extratos inoculado e não inoculado do mexilhão *Perna perna*.



Os cromatogramas apresentados na figura 53 mostram que os extratos relacionados ao mexilhão, não apresentaram picos de eluição no tempo de retenção de 18 minutos, o que indica não haver compostos análogos ao Lyso-PAF ou PAF degradado.

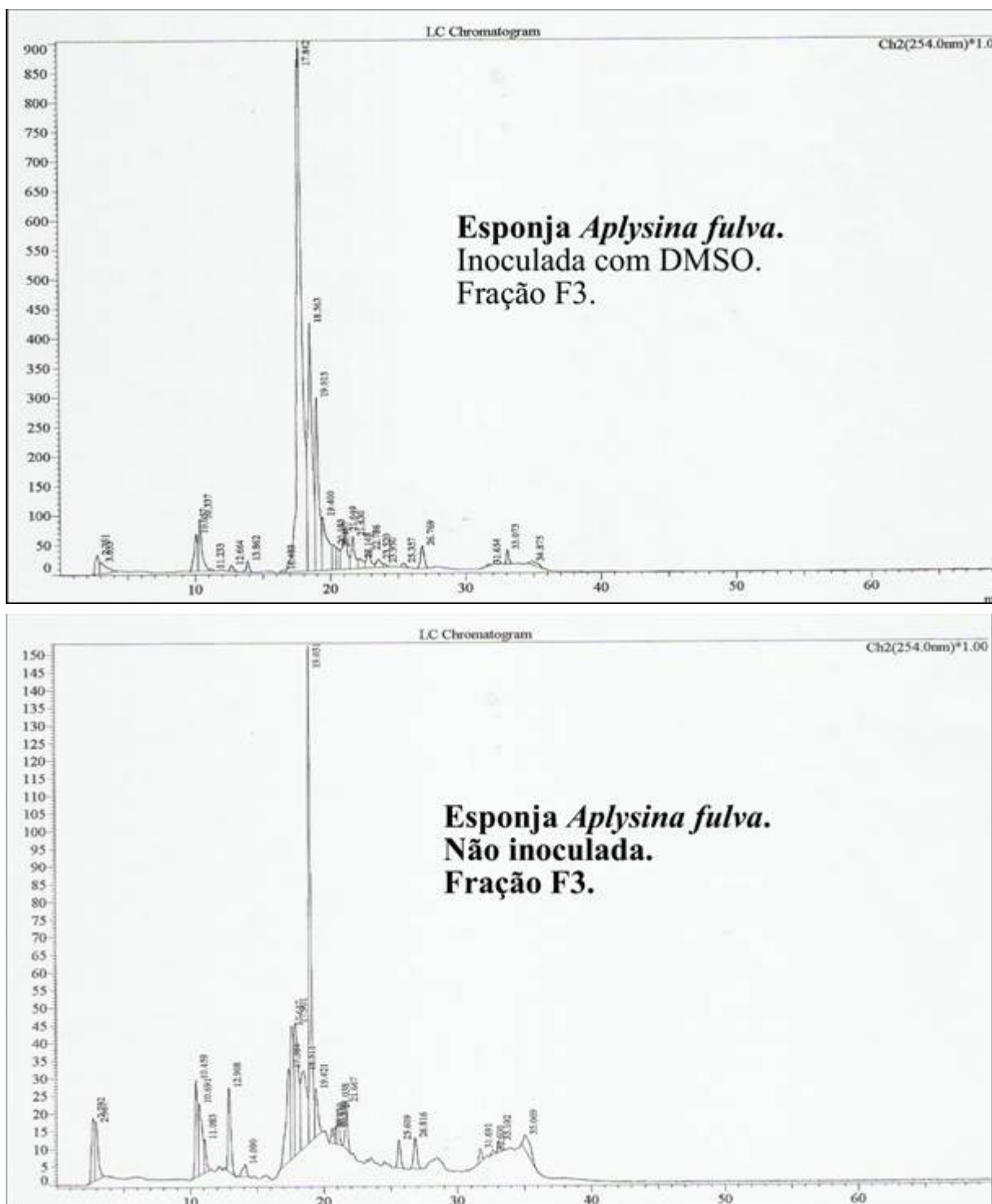


Figura 54. Cromatogramas dos extratos inoculado e não inoculado da esponja marinha *A. fulva*.

A figura 54 mostra a diferença existente entre os eluídos dos extratos relacionados à esponja marinha *Aplysina fulva*. Pode-se observar no cromatograma relativo ao organismo inoculado, a presença de um enorme pico eluindo próximo aos 18 minutos, fato não observado em relação ao organismo não inoculado. Isto indica, como igualmente reportado por outros estudos (SUBBANAGOUNDER et al.,2000; SUGIURA et al.,1991; THOMPSON e HANAHAM, 1963), que a indução ao estresse por inoculação de substância química irritante, desencadeou a produção de produtos PAF-análogos pelo organismo, fato que é ratificado pelos espectros de massa obtidos (fig. 55), os quais claramente indicam a presença do fragmento m/z 483, Lyso-PAF ou PAF degradado, somente para o organismo inoculado.

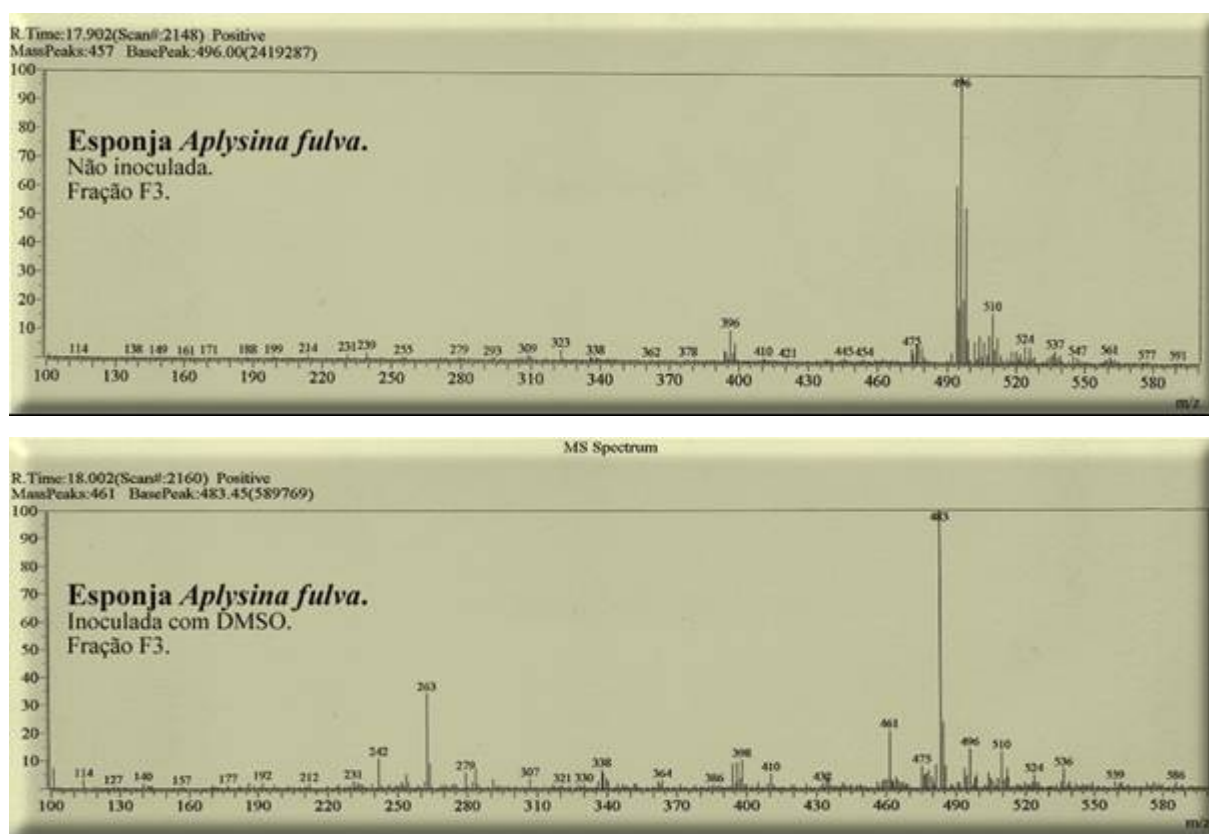


Figura 55. Espectros de massa dos extratos relacionados à esponja marinha *Aplysina fulva*.

Fatos semelhantes ocorreram também em relação aos extratos das demais esponjas marinhas, onde os cromatogramas relativos aos extratos não inoculados também não apresentaram picos relevantes próximos ao tempo de retenção de 18 minutos (fig. 56 e 57).

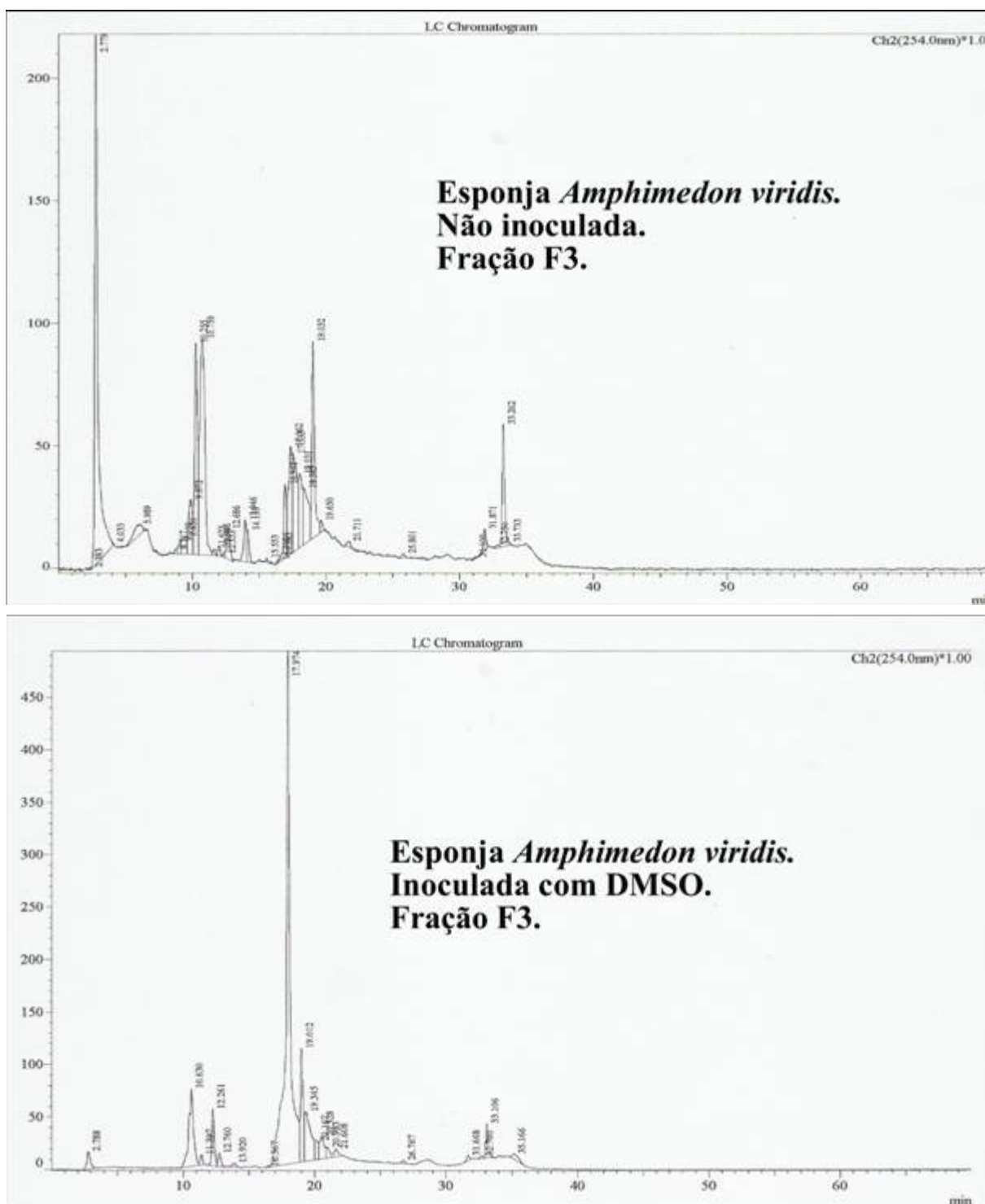


Figura 56. Cromatogramas dos extratos inoculado e não inoculado da esponja marinha *A. viridis*.

Ainda em relação aos espectros de massa, foi observada uma exceção referente à presença do fragmento m/z 483, obtido no extrato não inoculado da esponja marinha *Arenosclera*

brasiliensis. Apesar do cromatograma não permitir uma boa visualização do eluído próximo aos 18 minutos, parecendo o mesmo inexistente, o espectro de massa evidenciou o mencionado fragmento (fig. 58).

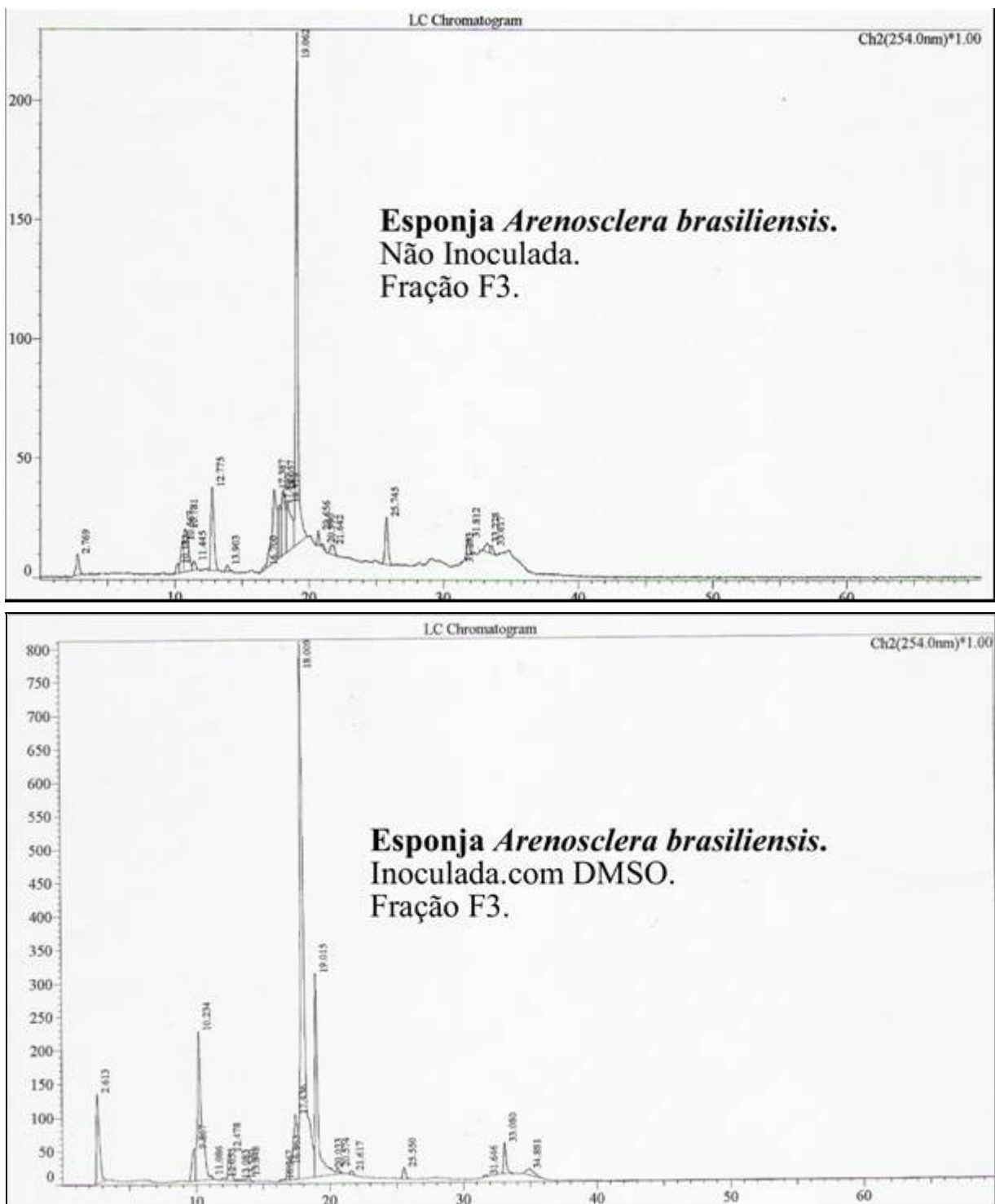


Figura 57. Cromatogramas dos extratos inoculado e não inoculado da esponja marinha *A. brasiliensis*.

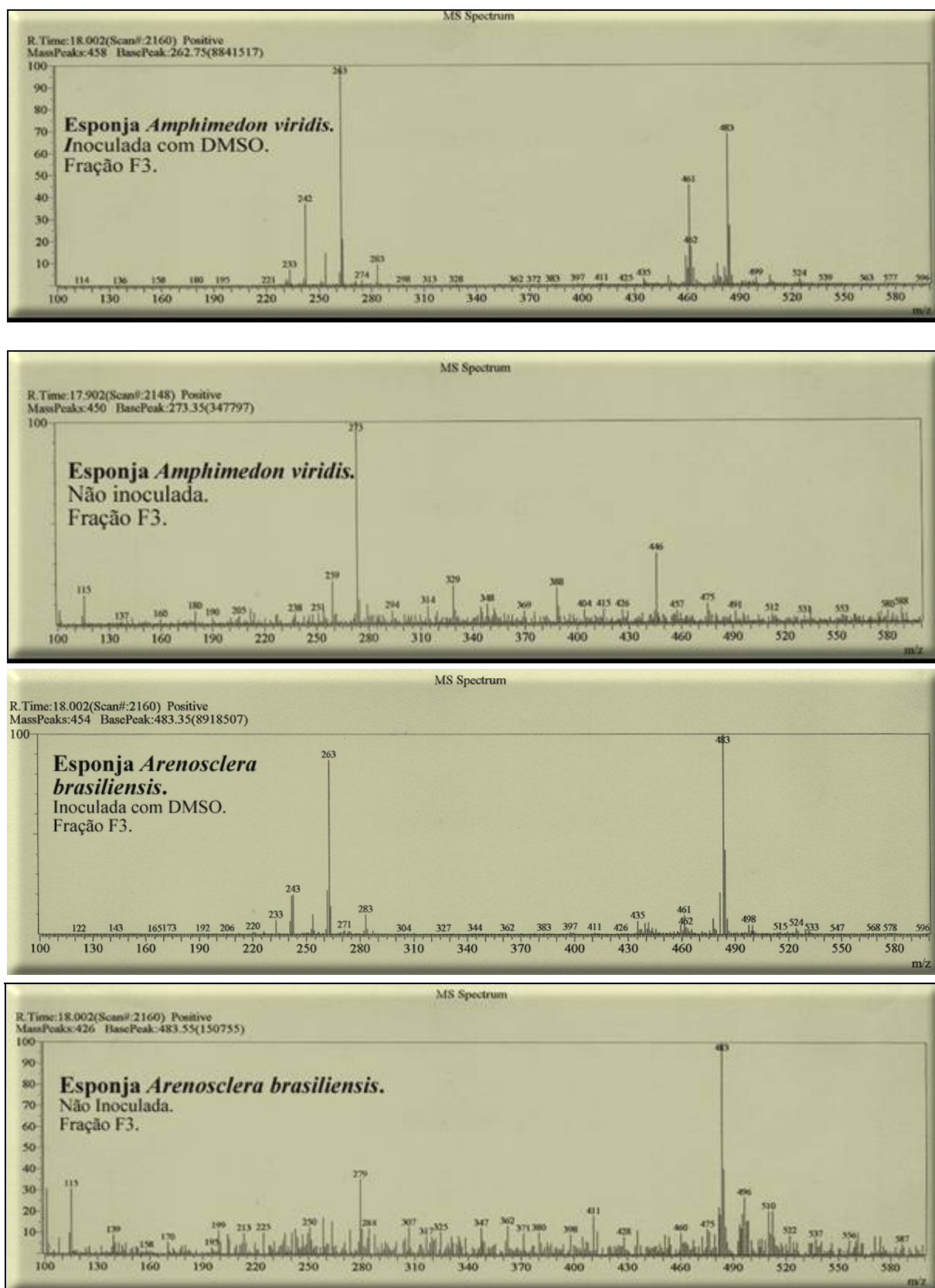


Figura 58. Espectros de massa dos extratos inoculado e não inoculado das espécies de esponja marinha *Arenosclera brasiliensis* e *Amphimedon viridis*.

6.3 Análises Químicas e Microbiológicas

6.3.1 Água do mar utilizada no tanque

Análises químicas dos nutrientes nitrito, nitrato, amônia e fosfato, do pH e do oxigênio dissolvido (OD) foram realizadas em amostras (triplicatas) de água coletadas durante os momentos da submersão e das retiradas de painéis (ver tabela 8), visando um conhecimento do ambiente gerado (STRICKLAND e PARSONS, 1972; GRASSHOFF et al., 1983; PARANHOS, 1966).

Tabela 8

Análise química das amostras da água do mar, utilizada nos experimentos, coletadas a cada amostragem. Valores médios.

Amostragem	Amônia μmol.l ⁻¹	Nitrato μmol.l ⁻¹	Nitrito μmol.l ⁻¹	Fosfato μmol.l ⁻¹	OD ml.l ⁻¹	pH
submersão	2,23	3,75	0,26	0,62	5,15	8,49
1 ^a retirada	1,98	3,90	0,27	0,55	4,82	8,62
2 ^a retirada	2,01	3,11	0,26	0,41	4,26	8,25
3 ^a retirada	3,09	2,57	0,25	0,44	4,03	8,62
4 ^a retirada	3,05	3,93	0,23	0,43	4,25	8,70
Média	2,47	3,45	0,25	0,49	4,50	8,53

Estes dados (tabela 8) mostram que as condições químicas do ambiente do tanque de ensaio não sofreram mudanças acentuadas ou eutroficação durante o tempo despendido no experimento, o que pode ser entendido como uma situação não interferente no processo de adesão por parte dos microorganismos.

A avaliação qualitativa inicial dos organismos disponíveis na água do tanque revelou a presença de bactérias gram-negativas, fitoflagelados, auxósporo de diatomáceas e fungos, não sendo constatada a presença de bactérias gram-positivas, as quais, como relatado em alguns estudos, são geralmente pouco abundantes em ambientes marinhos não poluídos (AGOGUÉ et al., 2005; COSTERTON et al., 1974).

6.3.2 Avaliação das lâminas e quantificação dos microorganismos

As placas foram retiradas e avaliadas diretamente através do microscópio de epifluorescência (ver Apêndice D) para análise qualitativa e quantitativa dos microorganismos aderidos ao ágar-ágar.

Inicialmente os microorganismos visualizados foram identificados e contabilizados dentro de três classes de trabalho: bactérias gram-negativas, diatomáceas e cianobactérias. Porém, foi constatada a ausência de bactérias gram-positivas em todas as lâminas avaliadas, inclusive no branco de reagentes. Com relação às diatomáceas e cianobactérias foi verificada a ausência das mesmas em grande parte das lâminas, tornando-se presentes em algumas lâminas somente após o sexto dia de imersão (ver tabela 9). Isto vem a ser condizente com a dinâmica da evolução de biofilmes marinhos, onde cianobactérias e diatomáceas tornam-se presentes geralmente após o quarto dia de imersão (BAETA NEVES, com. pess., 2005).

Tabela 9

Quantificação de Organismos aderidos as Lâminas. Valores da mediana das replicatas avaliadas a cada retirada de painel. Bactérias gram-negativas (G –), Cianobactérias (Ciano) e Diatomáceas (Diat).

Dias de imersão do Painel	Classe	Quantidade total de Microorganismos presentes (10^3 cel/cm ²)									
		Controles		<i>Perna perna</i>		<i>A. fulva</i>		<i>A. viridis</i>		<i>A. brasiliensis</i>	
		Branco	Padrão	Ref.	Inoc.	Ref.	Inoc.	Ref.	Inoc.	Ref.	Inoc.
2	G –	257	56	350	238	310	324	548	558	613	240
4		816	306	263	446	327	482	708	255	476	496
6		662	119	402	484	382	307	439	738	578	582
8		306	133	687	221	381	685	159	331	453	438
2	Ciano	0	0	0	0	2	0	3	0	0	0
4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8		0	32	19	13	390	8	418	669	302	0
2	Diat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8		8	0	5	0	0	0	0	0	0	0

Na avaliação estatística dos dados não foram considerados os valores referentes as cianobactérias e diatomáceas, devido à falta de dados positivos. Acredita-se que maiores

tempos de imersão dos experimentos sejam necessários para uma correta avaliação da adesão de tais microorganismos.

Na figura 59 é feita uma apresentação gráfica dos dados, correlacionando o número total de bactérias gram-negativas aderidas por cm² de lâmina, com os extratos inoculados e a referência de cada espécie, tendo por base de comparação os valores obtidos pelos controles branco e padrão. Nestes gráficos podemos observar a dissimilaridade da resposta do padrão em relação ao branco de reagentes e aos demais extratos avaliados, indicando em todas as comparações uma menor adesão.

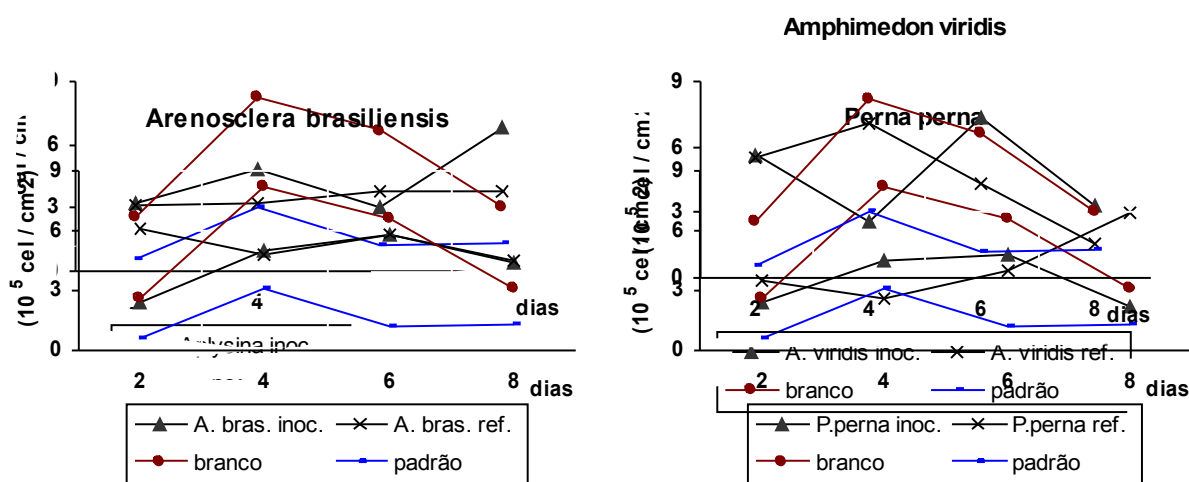


Figura 59. Gráficos comparativos do número total de microorganismos aderidos nos extratos em comparação aos controles branco e padrão.

Pôde ser observada uma tendência de diminuição da quantidade de adesões de bactérias gram-negativas após o sexto dia de imersão, o que pode ser esperado devido à sucessão da formação do biofilme, onde bactérias de um determinado grupo dão espaço a adesão e crescimento de outros determinados microorganismos, neste caso possivelmente as cianobactérias e diatomáceas.

Com relação aos extratos referência e inoculado de cada espécie, não foi observada nenhuma disparidade durante o transcorrer do experimento, o que pode estar relacionado à concentração final de compostos PAF-análogos em cada extrato avaliado, pois apesar da concentração de cada extrato ter sido inicialmente igualada (ver tabela 6), não pôde ser

estabelecido no momento dos experimentos a real concentração individual de PAF-análogos presentes, os quais devido a dificuldade de isolamento e identificação em amostras biológicas onde as concentrações são em geral várias vezes menores do que a de outras espécies de fosfolípidios presentes (DREYFUS *et al.*,1997; CHRISTIE, 1993; JACKSON *et al.*,1984), ficaram certamente com concentrações muito inferiores a 50 mg/l utilizado para o padrão puro e talvez por isto não pode ser observado o efeito biológico esperado.

6.4 Análise Estatística

Foi realizada uma abordagem não paramétrica semelhante ao teste de Friedman, porém considerando-se uma transformação dos dados por *ranking total* e posterior análise de variância com dois critérios de classificação, Two-way ANOVA (MILLER e MILLER, 2000; ZAR, 1996). (Ver Apêndice E).

Nesta avaliação foi considerado como fator controlado os diversos extratos utilizados, escolhidos dentro de pré-requisitos experimentais, e como fator não controlado os dias de imersão de cada painel, considerando-se que o tempo de imersão introduzirá variações devidas, principalmente, à dinâmica da evolução do biofilme formado.

As replicatas de cada um dos extratos sob avaliação foram reunidas e tratadas como uma única avaliação para cada retirada de painel (bloco), considerando-se ao final uma quantificação total de bactérias gram-negativas (G –) incrustadas por cada tipo de extrato utilizado e por painel retirado. A hipótese nula vinculada a ANOVA (H_0) questiona se os efeitos antiincrustante dos tratamentos podem ser considerados iguais (ver tabelas 10 a 13), sendo a hipótese aceita quando o valor calculado **F** for menor que o valor crítico tabelado da Distribuição F (Anexo 1). A aceitação da hipótese implica que não pode ser considerado qualquer tipo de efeito antiincrustante por parte dos extratos utilizados no referido experimento.

Tabela 10

ANOVA e comparação *Post Hoc* dos valores referentes aos extratos da Esponja marinha *Aplysina fulva*. P (padrão), Br (branco de reagentes), A (extrato referencia) e Ai (extrato inoculado).

	SS	DF	MS	F	F_(0,05;3;9)	Ho	
total	340	15					
Gi	178,5	3	59,5	5,35	3,86	rejeitado	
Bj	61,5	3	20,5	1,84			
resíduo	100	9	11,11				
Comparação entre grupos			Gi - Gi'	SE	q	q'_(0,05;∞;4)	Ho
Br ≤ P			29	3,65	7,94	2,06	rejeitado
Br ≤ A			-1	3,65	-0,27	2,06	aceito
Br ≤ Ai			-4	3,65	-1,09	2,06	aceito

Tabela 11

ANOVA referente aos extratos da Esponja marinha *Amphimedon viridis*. P (padrão), Br (branco de reagentes), B (extrato referencia) e Bi (extrato inoculado).

	SS	DF	MS	F	F_(0,05;3;9)	Ho
total	340	15				
Gi	149	3	49,67	3,26	3,86	aceito
Bj	54	3	18	1,18		
resíduo	137	9	15,22			

Tabela 12

ANOVA e comparação *Post Hoc* dos valores médios referentes aos extratos da Esponja marinha *Arenosclera brasiliensis*. P (padrão), Br (branco de reagentes), C (extrato referencia) e Ci (extrato inoculado).

	SS	DF	MS	F	F(0,05;3;9)	H₀	
total	340	15					
Gi	172,5	3	57,5	5,50	3,86	rejeitado	
Bj	73,5	3	24,5	2,34			
resíduo	94	9	10,4				
Comparação entre grupos			Gi - Gi'	SE	q	q'(0,05;∞;4)	H₀
Br ≤ P			31	3,65	8,49	2,06	rejeitado
Br ≤ Ci			7	3,65	1,91	2,06	aceito
Br ≤ C			-2	3,65	-0,54	2,06	aceito

Tabela 13

ANOVA referente aos extratos do mexilhão *Perna perna*. P (padrão), Br (branco de reagentes), M (extrato referencia) e Mi (extrato inoculado).

	SS	DF	MS	F	F(0,05;3;9)	H₀
total	340	15				
Gi	150,5	3	50,16	3,70	3,86	aceito
Bj	67,5	3	22,5	1,65		
resíduo	122	9	13,55			

Para comparação das eficiências antiincrustantes entre cada extrato e os grupos de controle (padrão e branco), ou seja, as médias dos tratamentos duas a duas, foi utilizado o teste de Dunnett, um teste semelhante ao teste de Tukey, porém aplicável a dados randomizados em blocos com transformação por *ranking* e com avaliação unilateral (ZAR, 1996).

Aqui a hipótese nula (*H₀*) questiona se a média dos valores de incrustação do branco de reagentes é menor do que aquelas dos tratamentos usados. Sendo ela aceita quando o valor calculado *q* for menor que o valor crítico tabelado de *q'* do teste de Dunnett (Anexo 2).

7 CONCLUSÃO

Os resultados cromatográficos apresentados indicam que os compostos denominados de PAF-análogos podem ter sua produção, no organismo, induzida por fatores externos tais como o estresse aplicado por inoculação com substância química irritante.

Os dados estatísticos mostram que os extratos que possuíam indícios de PAF-análogos, não apresentaram uma ação antiincrustante comparável ao padrão de controle (*1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine*, Sigma Aldrich O-9262 CAS #77286-66-9), um PAF-análogo comercialmente disponível, porém acredita-se que a concentração de tais compostos no extrato tenha sido inicialmente superestimada, o que pode ter ocasionado um resultado não significativo. Porém, em relação ao padrão de PAF-análogo utilizado, o mesmo mostrou-se eficaz como um agente inibidor da adesão bacteriana, o qual apresentou, em comparação ao branco de reagentes, uma menor adesão de bactérias gram-negativas. Contudo, nada se pode inferir sobre o mecanismo da ação inibidora, ou seja, se ela ocorreu por ação surfactante ou por sinalização celular. Por outro lado, devido a diminuta quantidade de adesão das cianobactérias e diatomáceas, não foi possível fazer qualquer avaliação relacionada a estes microorganismos. Para isto, devemos atentar para um maior tempo de imersão dos experimentos, permitindo que tal adesão venha a ocorrer, possibilitando assim obter uma maior quantidade de dados relacionados a estes microorganismos.

Finalizando, a utilização de um composto análogo ao PAF como um agente antiincrustante, apresenta-se como uma promissora perspectiva na substituição do TBT, pois ao contrário de outros biocidas naturais já pesquisados, o mesmo apresenta uma molécula de fácil síntese e, sua possível atuação como um mediador celular pode torná-lo mais eficaz em menores concentrações e permitir que o mesmo atue seletivamente na membrana citoplasmática dos microorganismos da bioincrustação, de modo que tal substância poderá

apresentar-se como um produto antiincrustante economicamente viável e principalmente ambientalmente correto.

8 RECOMENDAÇÕES

Tendo em vista que o presente trabalho se limitou a verificar a ação antiincrustante relacionada com uma única concentração, torna-se necessário a realização de ensaios que verifiquem esta ação para diferentes concentrações e diferentes PAF-análogos, de modo que se possa obter uma melhor conclusão sobre a eficácia da ação antiincrustante de tais substâncias, e que tais experimentos possam distinguir separadamente o modo de atuação desta ação antiincrustante, ou seja, se age como sinalizador celular, surfactante ou ambos.

Julga-se também necessário que trabalhos que permitam verificar a atividade antiincrustante de PAF-análogos em outros tipos de organismos, tais como os macroorganismos presentes no 3º e 4º estágios da bioincrustação, e que avaliem o seu comportamento em ambiente natural (testes de campo), devam ser realizados para que uma possível utilização de tais compostos seja completa e corretamente entendida.

A nova metodologia aqui utilizada, onde os extratos incorporados no ágar-ágar foram dispostos unilateralmente sobre lâminas de microscopia, permitiu uma leitura direta ao microscópio, o que pode ser entendido como uma técnica mais direta, sem necessidades de repiques para contagem de microorganismos. Porém o procedimento para preparo das lâminas deve ser aprimorado, de modo a diminuir perdas de replicatas tornando-o certamente mais eficiente.

APÊNDICE A – Organismos utilizados no preparo dos extratos

A.1 – Esponjas Marinhas

São animais pluricelulares, sésseis, de aspecto semelhante ao de várias plantas, consistindo de massas de células consolidadas em uma matriz gelatinosa (DEMBITSKY *et al.*, 2003; BELARBI *et al.* 2003). São predominantemente organismos marinhos, porém com algumas espécies adaptadas a água doce. São encontradas desde a zona intertidal até profundidades de 6000 metros. Estão distribuídas em todos os oceanos do mundo, desde regiões polares até as regiões tropicais, porém são mais abundantes em quantidade e espécies nas águas mais aquecidas.



Figura 60. Grupos das Poríferas. Ilustração.

conhecida, e o *Calcarea* (esponjas calcárias).

As espécies podem se apresentar como crostas finas e chatas, em forma de vaso, ramificadas, globulares ou de forma variada, de 1mm até 2 metros de diâmetro. Muitas são coloridas de cinzento ou pardo e outras são brilhantemente vermelhas, alaranjadas (fig 61), azuis, violáceas (fig.62) ou pretas.

Esponjas marinhas pertencem ao Filo chamado *Porifera*, em referência à estrutura porosa do corpo, no qual estão catalogadas aproximadamente 15.000 espécies. Estes animais são tidos como os mais primitivos do sub-reino *Parazoa*^{*}, e são organizados em três grupos distintos (fig. 60): o *Hexactinellida* (esponjas vítreas), o *Demospongiae*, o mais diverso de todos, reunindo 90% de toda espécie

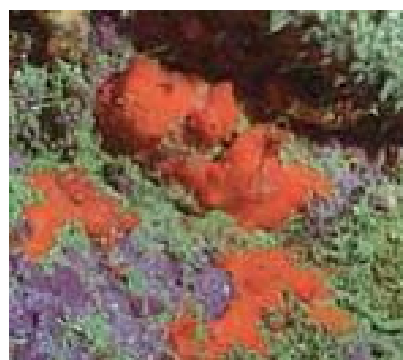


Figura 61. Esponja marinha *Crella incrustans*.
Fonte: www.seafriends.org.nz

Todas são fixas a rochas, conchas ou outros objetos sólidos. As esponjas estão entre os animais mais simples, com tecidos parcialmente diferenciados, porém sem músculos, sistema nervoso, nem órgãos internos.



Figura 62. Esponja Púrpura.
Fonte: www.scubaphoto.com

- Todas as suas células podem fagocitar partículas.
- Efetuam trocas gasosas por difusão.
- Podem possuir como simbiontes microalgas e bactérias.

Anatomia

A estrutura de uma esponja é simples, tem a forma de um tubo ou saco muitas vezes ramificado, com a extremidade fechada presa ao substrato. A extremidade aberta é chamada ósculo, e a cavidade interior é a esponjocele (fig. 63). As paredes são perfuradas por buracos microscópicos, chamados óstios, para permitir que a água flua para dentro da esponjocele trazendo oxigênio e alimento. Não possuem órgãos internos,

Fisiologia

- São filtradoras dependentes da corrente de água, a qual trás oxigênio e alimento e retira dejetos.
- Pode regular o fluxo de água através do ósculo e óstios (poros) (fig 63).

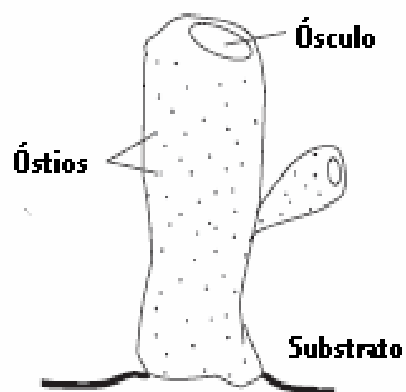


Figura 63. Poros das esponjas.
Ilustração.

sistemas nervoso, circulatório ou digestivo.

As espécies de esponja marinhas utilizadas neste trabalho foram:

Amphimedon viridis (Duchassaing & Michelotti, 1864)

Foto na Prainha, Arraial do Cabo (RJ), a 2-4 m de profundidade. Esta espécie (Fig. 64) possui alguns compostos bioativos já descritos, e seus extratos mostraram importantes atividades citotóxicas nos testes em laboratório (BERLINCK et al. 1996).



Figura 64. *Amphimedon viridis*.

Fonte: www.isqs.usp.br Foto de Eduardo Hajdu.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
<i>Animal</i>	<i>Porífera</i>	<i>Demospongiae</i>	<i>Haplosclerida</i>	<i>Niphatidae</i>	<i>Amphimedon</i>	<i>viridis</i>

Arenosclera brasiliensis (Muricy e Ribeiro, 1999).

Esponja comum e endêmica na região de Búzios a Arraial do Cabo. Extrato com atividades antitumorais e antibacterianas, substâncias Arenosclerinas A-C e Haliclonyclamine E.

Substrato sub-horizontal, rocha com areia, de 2 a 10 m de profundidade (fig. 65).



Figura 65. *Arenosclera brasiliensis*

Fonte: <http://acd.ufrj.br/labpor> Foto: G. Muricy

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
<i>Animal</i>	<i>Porífera</i>	<i>Demospongiae</i>	<i>Haplosclerida</i>	<i>Callyspongiidae</i>	<i>Arenosclera</i>	<i>brasiliensis</i>

***Aplysina fulva* (Pallas, 1766).**



Foto tirada na Pedra Vermelha, no Santuário Ecológico da Reserva Extrativista da Ilha do Cabo Frio, Arraial do Cabo (RJ) (fig. 66).

Figura 66. *Aplysina fulva*

Fonte: <http://acd.ufrj.br/labpor> Foto: Eduardo Hajdu.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
<i>Animal</i>	<i>Porífera</i>	<i>Demospongiae</i>	<i>Verongidae</i>	<i>Aplysinadae</i>	<i>Aplysina</i>	<i>fulva</i>

A.2 – Molusco Marinho

O filo *Mollusca* é o filo com a maior diversidade de espécies depois dos Artrópodes (cerca de 50.000 espécies viventes e 35.000 espécies fósseis) e inclui uma variedade de animais muito familiares. Essa popularidade se deve, em grande parte, às conchas desses animais que servem como peças para colecionadores. O filo abrange formas tais como as ostras, as lulas, os polvos e os caramujos.

Classificação

Existem nove classes de moluscos, oito ainda viventes e uma conhecida somente por seus fósseis:

- *Caudofoveata*
- *Aplacophora*

- *Polyplacophora*
- *Monoplacophora*
- *Bivalvia*
- *Scaphopoda*
- *Gastropoda*
- *Cephalopoda*
- *Rostroconchia* (fossil)

Os bivalves formam uma classe de moluscos que possuem uma concha feita em duas metades chamadas valvas. São animais exclusivamente aquáticos, podendo ocorrer em ambientes de salinidade diversa como água salgada, doce ou salobra. A maioria das espécies é bentônica e vive junto ao fundo. Alguns bivalves são organismos sésseis que se fixam ao substrato através do bisso, uma segregação fibrosa, enquanto que outras espécies vivem enterradas nos fundos arenosos. As espécies que vivem soltas podem deslocar-se através de propulsão conseguida por expulsão de água sob pressão.

Os bivalves se alimentam por filtração através dos sifões, as únicas partes do corpo mole que estes organismos conseguem fazer sair da concha. Os sifões são sempre dois, servindo um para aspirar a água carregada de pequenos organismos e algas e o outro para expelir.

A espécie utilizada neste trabalho foi o mexilhão *Perna perna* (fig. 67).



Figura 67. Mexilhão *Perna perna*

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
<i>Animal</i>	<i>Mollusca</i>	<i>Bivalvia</i>	<i>Mytiloidea</i>	<i>Mytilidae</i>	<i>Perna</i>	<i>perna</i>

APÊNDICE B – Avaliação da eficiência do esquema de fracionamento utilizado

Para verificação da eficiência da coluna e do esquema de fracionamento utilizado neste trabalho, uma alíquota de 262 mg do extrato do mexilhão inoculado foi fracionada conforme o procedimento de eluição adotado, sendo subfrações dos eluídos recolhidas conforme demonstrado na tabela 14.

Tabela 14

Subfrações obtidas para avaliação da eficiência do esquema de eluição.

Subfração	Volume (ml)	Comentários
F11	40	Subfração contendo hexano remanescente do preparo da coluna e solução de eluição hexano:diclorometano (4:1).
F12	20	Subfrações contendo solução de eluição hexano:diclorometano (4:1).
F13	20	
F14	20	
F15 / 21	20	Subfração intermediária da 1ª mudança de eluentes, podendo também conter quantidades da segunda solução de eluição: diclorometano:acetona (2:1).
F22	10	Subfrações contendo solução de eluição diclorometano:acetona (2:1).
F23	10	
F24	10	
F25	10	
F26	10	
F27	10	
F28	10	
F29	10	
F210 / 31	20	Subfração intermediária da 2ª mudança de eluentes. Podendo também conter quantidades da terceira solução de eluição, acetona:metanol (2:7).
F32	20	Subfrações contendo solução de eluição acetona:metanol (2:7).
F33	20	
F34	20	
F35	20	
F4	40	Subfração contendo metanol puro, o qual foi adicionado para um arraste final de possíveis lipídios não carregados anteriormente.

As subfrações foram então reduzidas até *secura* com corrente de nitrogênio sob leve aquecimento (banho-maria $T < 50^{\circ}\text{C}$), adicionadas de $100\mu\text{l}$ de uma solução clorofórmio:metanol (1:1), homogeneizadas e reservadas para o ensaio cromatográfico em camada fina unidimensional.

Foram utilizadas placas cromatográficas de sílica F_{254} (Kieselgel) $10 \times 20 \text{ cm}^2$, em alumínio (placa recortada pela metade), as quais foram submetidas a uma pré-corrida com metanol puro para remoção de qualquer contaminante porventura presente na sílica e em seguida ativadas a 115°C por 30 minutos.

Após efetuado os *spots* das subfrações, acima relacionadas, com auxílio de um gabarito (fig. 68), foi realizado a corrida utilizando como fase móvel uma solução de clorofórmio:metanol (1:1) para separação de lipídios neutros e polares, tendo como parâmetro padrões de lecitina comercial e do composto *1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine*.

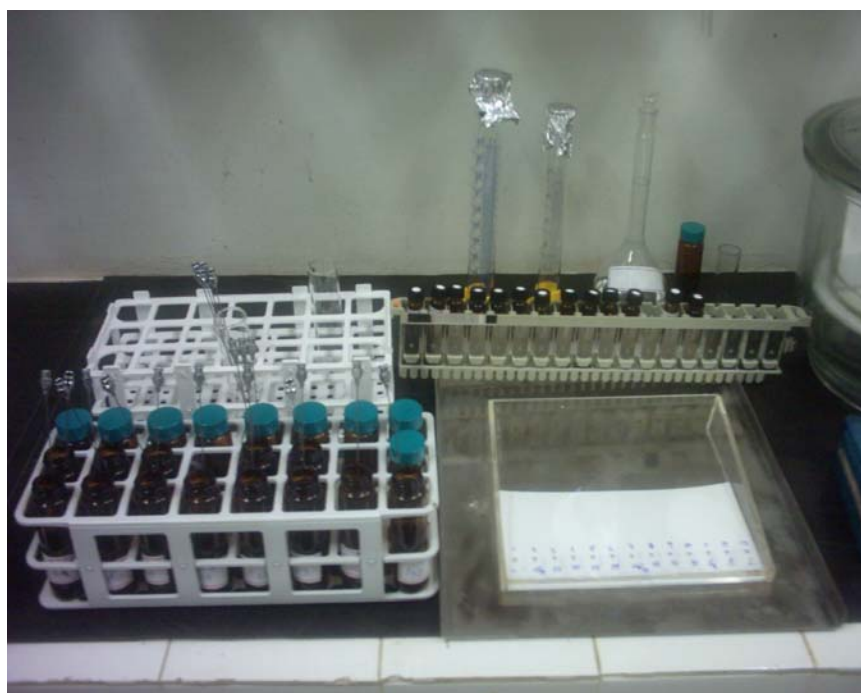


Figura 68. Aplicação das amostras utilizando um gabarito.

Completada a corrida, a placa foi seca e então colocada em uma câmara de iodo (fig. 69) para revelação dos lipídios presentes (fig. 70).



Figura 69. Cuba para corrida cromatográfica (TLC) e câmara de iodo para revelação da placa.

Após o iodo volatilizar da placa, foi efetuado um borrifo com reagente de Dragendorff para constatação da presença de fosfolípidios que contenham $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ *colina* em sua estrutura.

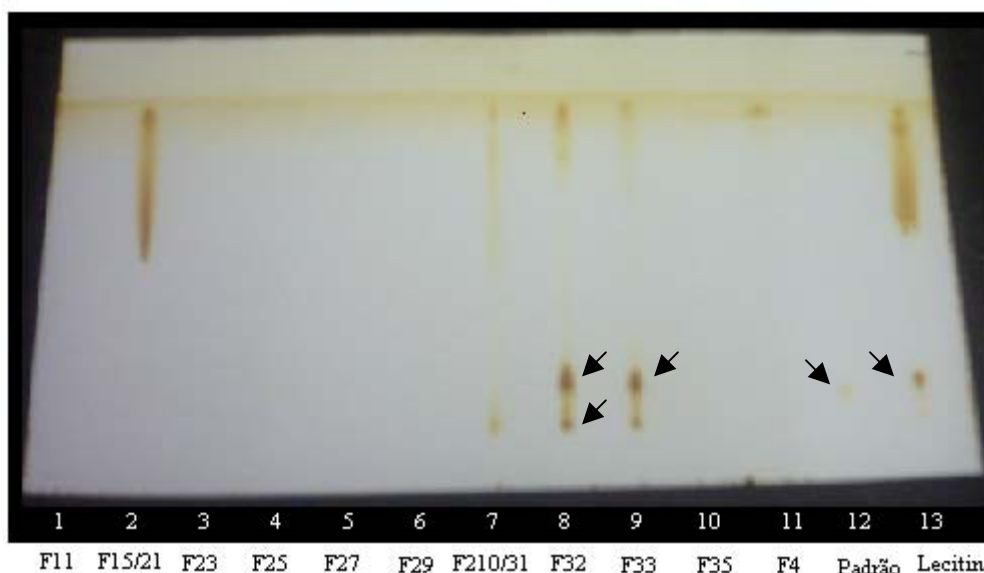


Figura 70. Placa revelada com Iodo. Setas indicam pontos com reação positiva ao reagente de Dragendorff.

Conforme mostrado pela figura 70, a presença de fosfolipídios (lipídios de interesse neste trabalho) só se faz na 3ª eluição, demonstrando a eficiência da seqüência do fracionamento utilizado.

APÊNDICE C – Espectroscopia de infravermelho das frações polares

A fração relativa à terceira eluição (fração polar) de cada extrato lipóide foi avaliada quanto à presença de fosfolipídios utilizando um equipamento de FTIR com detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS) e acessório de amostragem por refletância total atenuada (ATR) com ZnSe, sendo verificado a presença de bandas características das ligações (C=O) éster de lipídio em $1697 - 1785 \text{ cm}^{-1}$, e (PO₂⁻) assimétrica em $1193-1280 \text{ cm}^{-1}$ e simétrica em $1020-1132 \text{ cm}^{-1}$ (YU e IRUDAYARAJ, 2005; GAUGER e POHLE, 2005; POHLE *et al.*, 2001; GÓMEZ-FERNADEZ e VILLALAÍN, 1998; VILLÉ *et al.*, 1995; PUGH *et al.*, 1977; STANACEV e BAER, 1963).

As frações que se encontravam diluídas em metanol foram aplicadas ao FTIR nas quantidades mostradas na tabela 15. Os espectros mostrados abaixo (figs. 71 a 74) foram coletados sucessivamente até plena estabilização da leitura, ou seja, até que o solvente metanol fosse completamente evaporado.

Tabela 15

Quantidades utilizadas para espectroscopia de infravermelho.

Fração F3 do Extrato lipóide	Quantidade (mg)	Diluição em metanol (ml)	Volume utilizado de solução (µl)	Quantidade final (mg)
Esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> referência	394	20	100	1,97
Esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> inoculada	248	20	100	1,24
Esponja marinha <i>Amphimedon viridis</i> referência	173	20	200	1,73
Esponja marinha <i>Amphimedon viridis</i> inoculada	199	20	200	1,99
Esponja marinha <i>Arenosclera bras.</i> referência	300	20	100	1,50
Esponja marinha <i>Arenosclera bras.</i> inoculada	344	20	100	1,72
Mexilhão <i>Perna perna</i> referência	332	20	100	1,66
Mexilhão <i>Perna perna</i> inoculado	423	20	100	2,12

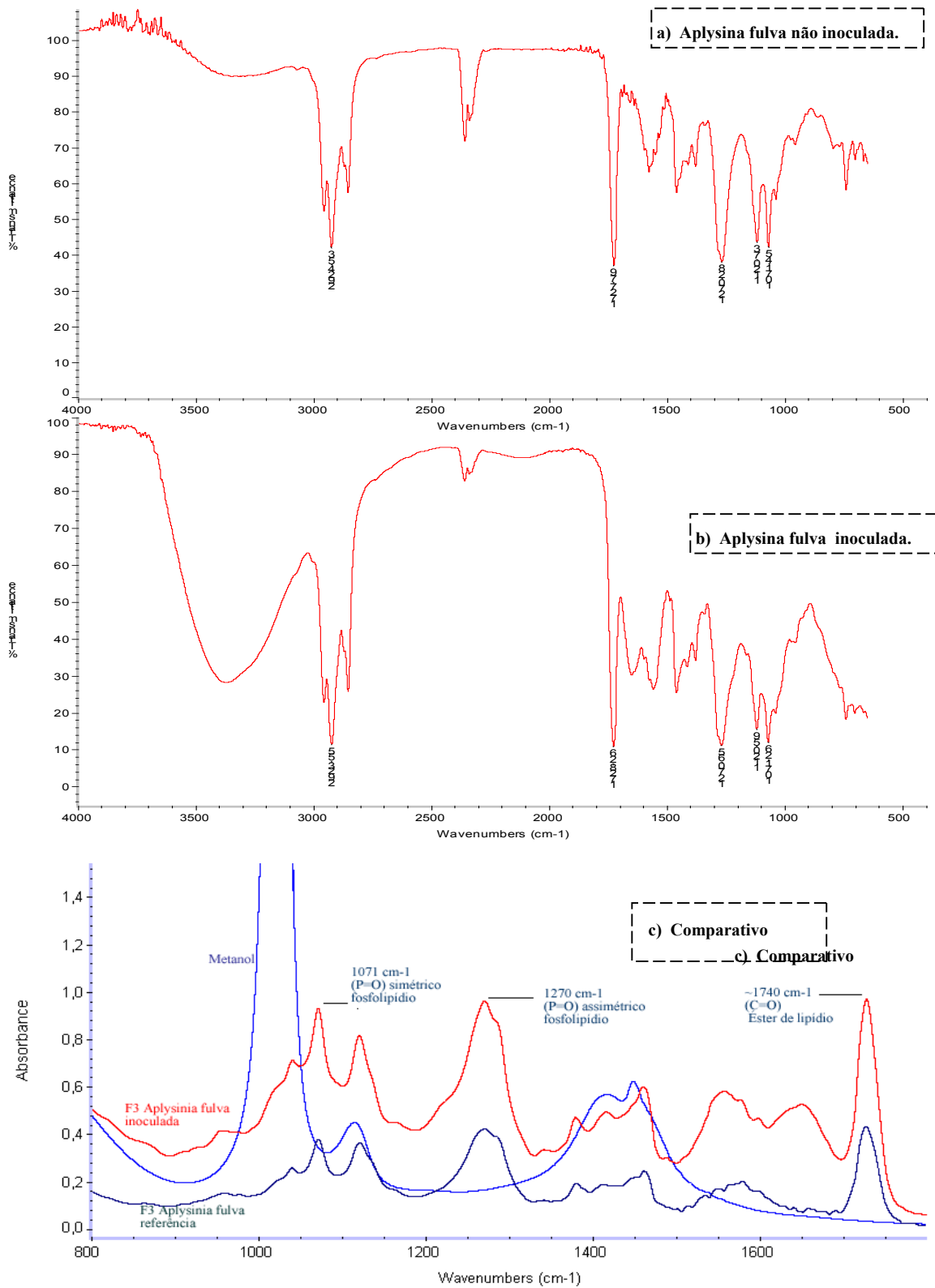


Figura 71. Espectros FTIR das frações F3 da esponja *Aplysina fulva* não inoculada (a), inoculada (b) e, apresentados em comparação ao metanol, utilizado na diluição, em modo Absorvância mostrando as regiões de possível indicação da presença de fosfolípidios (c).

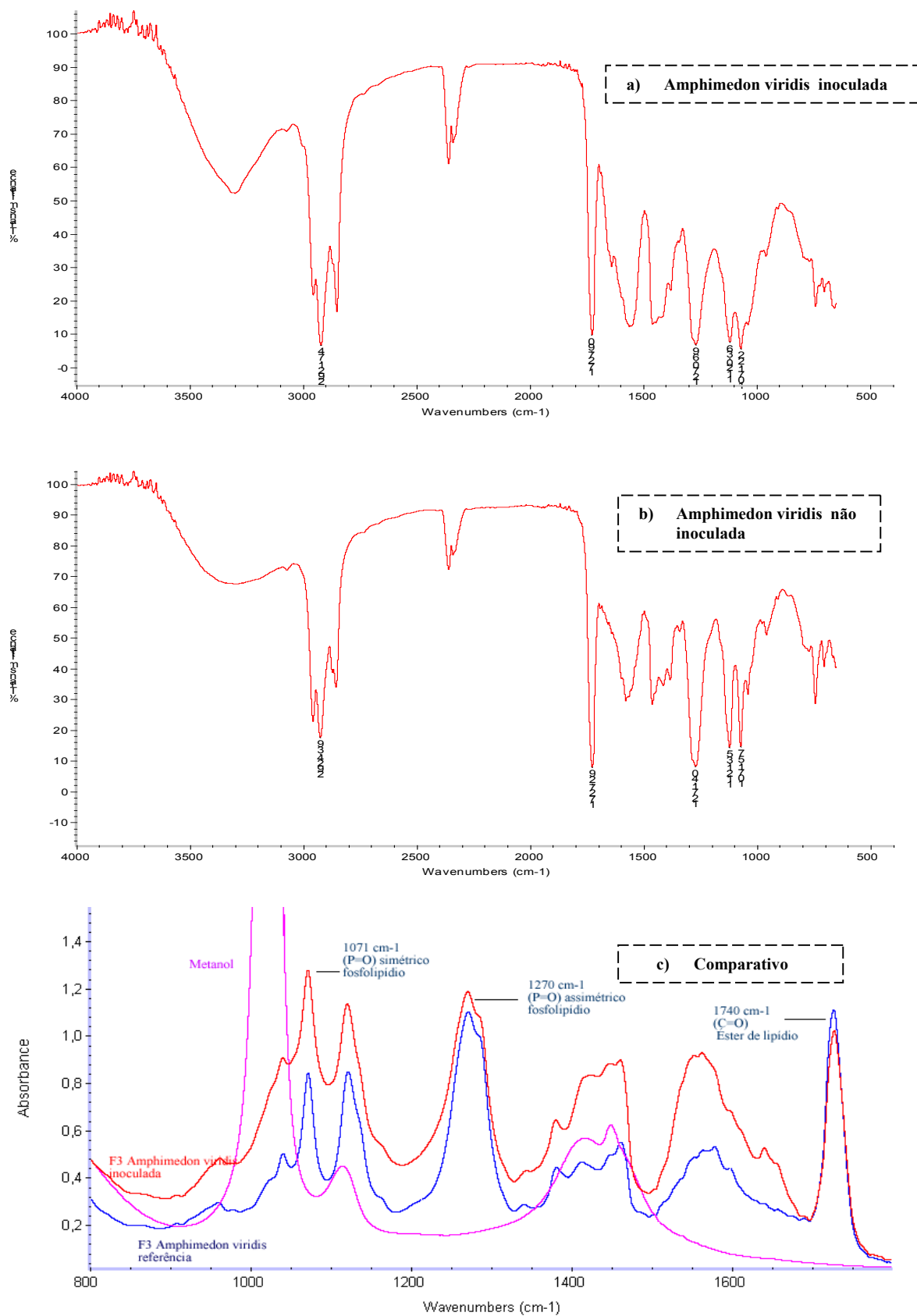


Figura 72. Espectros FTIR das frações F3 da esponja *Amphimedon viridis* inoculada (a), não inoculada (b) e, apresentados em comparação ao metanol, utilizado na diluição, em modo Absorvância mostrando as regiões de possível indicação da presença de fosfolípidios (c).

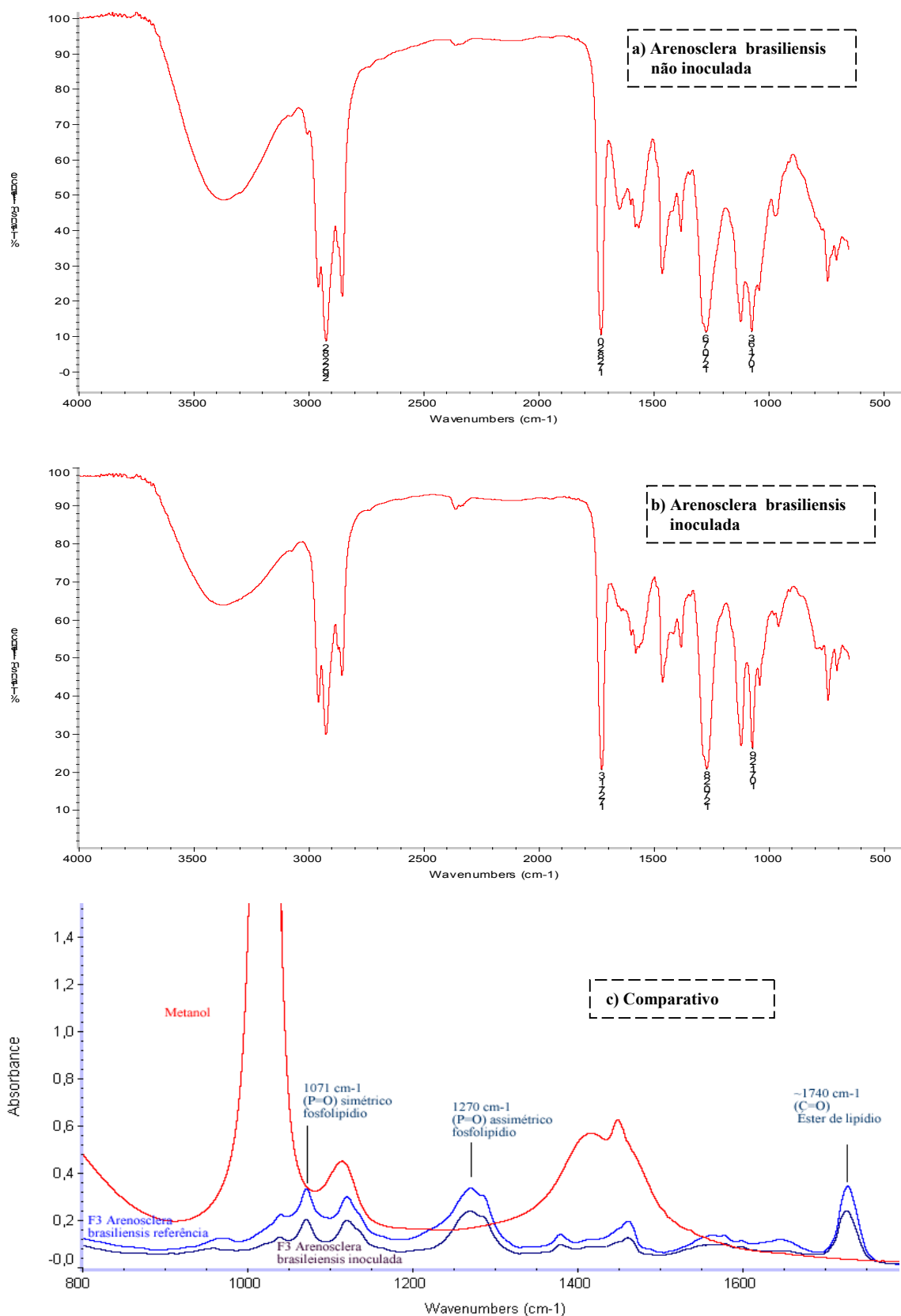


Figura 73. Espectros FTIR das frações F3 da esponja *Arenosclera brasiliensis* não inoculada (a), inoculada (b) e, apresentados em comparação ao metanol, utilizado na diluição, em modo Absorvância mostrando as regiões de possível indicação da presença de fosfolípidios (c).

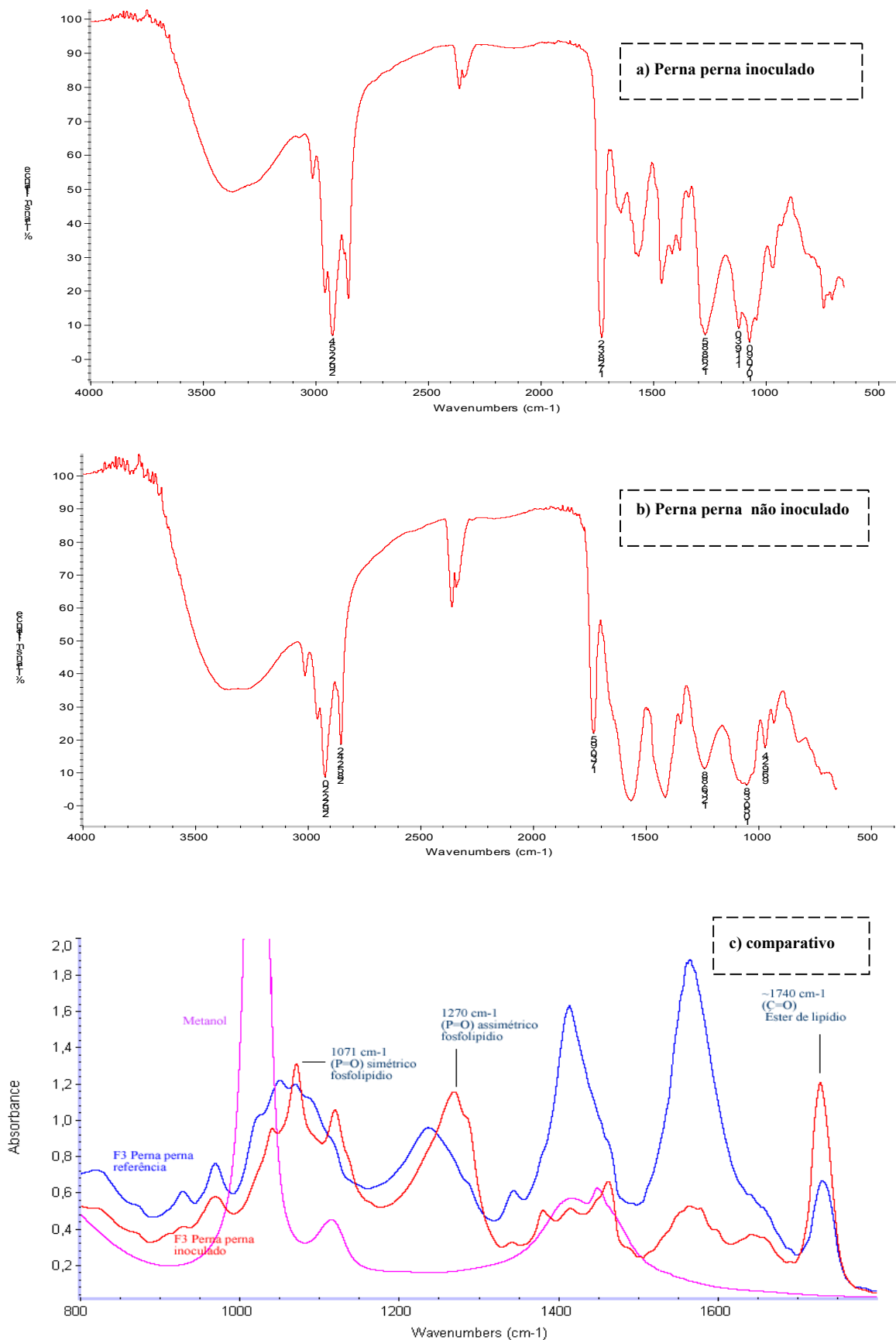


Figura 74. Espectros FTIR das frações F3 do mexilhão *Perna perna* inoculado (a), não inoculado (b) e, apresentados em comparação ao metanol, utilizado na diluição, em modo Absorvância mostrando as regiões de possível indicação da presença de fosfolípidios (c).

APÊNDICE D – Microscopia

Técnicas de microscopia podem ser usadas para avaliar a adesão, crescimento e formação do biofilme em superfícies, sendo a microscopia de epifluorescência uma ótima escolha para se determinar o número de organismos aderidos em superfícies transparentes e não transparentes (PARIZZI *et al.* 2004)

Neste trabalho, as lâminas retiradas dos painéis foram guardadas sob refrigeração (- 4°C) até o momento de sua avaliação, quando então foram deixadas aclimatar-se à temperatura da sala para serem avaliadas com um microscópio de epifluorescência (OLYMPUS BX51) equipado com iluminador vertical contendo uma torre de filtros e lâmpada de arco de xenônio (fig. 75).

Neste microscópio, a luz emitida por uma lâmpada de arco de xenônio passa através do



diafragma de abertura e atravessa os cubos da torre que contém filtros para comprimentos de onda de emissão e excitação. Após passar através da lente objetiva e ser focalizado, o feixe de excitação refletido e o de fluorescência secundária são filtrados ao retornarem pelo cubo e direcionadas ao detector para formação da imagem. A imagem formada é então digitalizada pelo software do equipamento e gravada para pós-tratamento em computador. (figs. 76 e 77).

Figura 75. Microscópio de epifluorescência OLYMPUS BX51

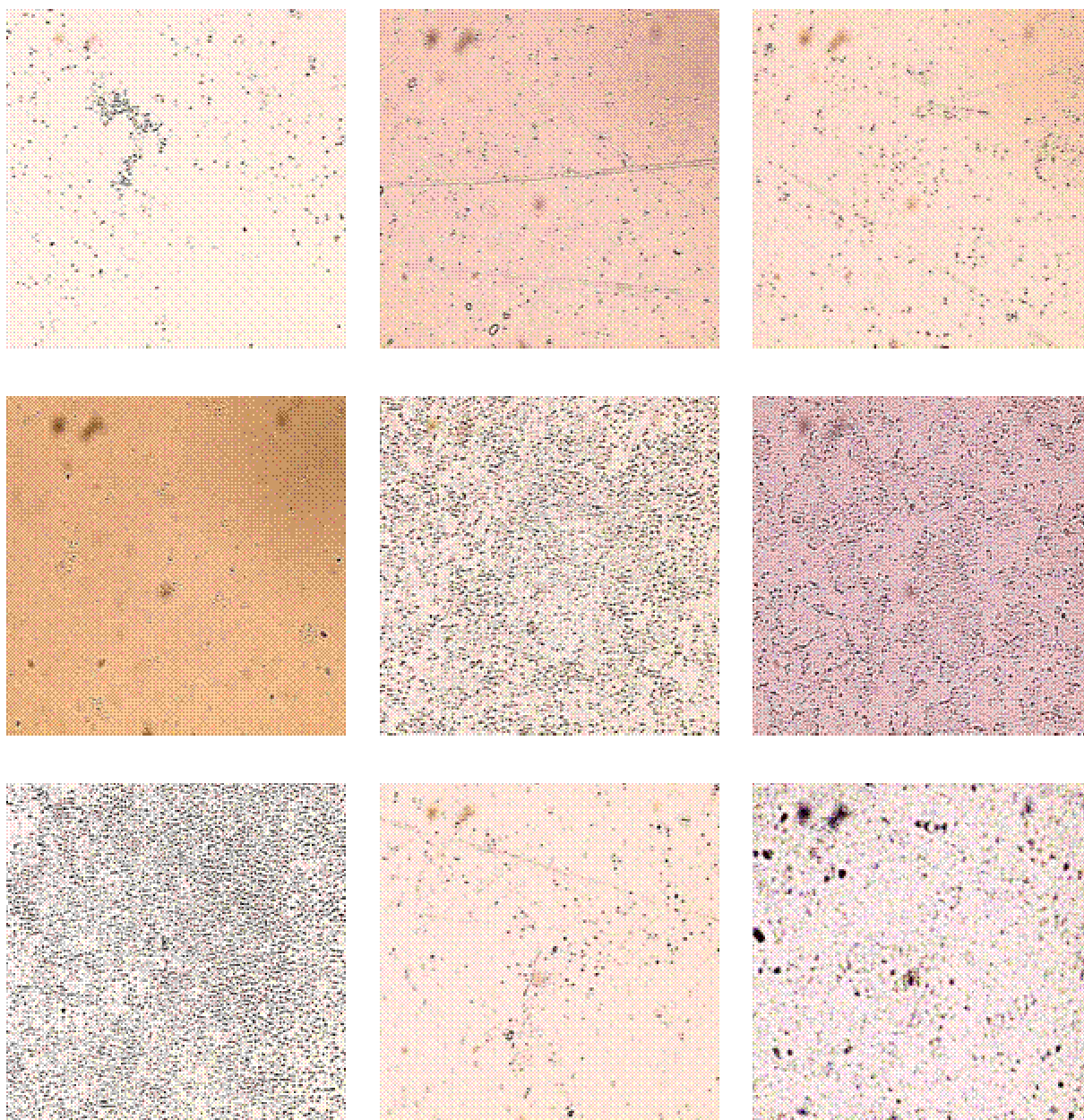


Figura 76. Imagens das lâminas do branco de reagentes da 1ª retirada (2 dias após imersão). Imagens mostram predominância de bactérias tipo *coccus*.

Entre os microorganismos avaliados destacaram-se bactérias gram-negativas *Coccus*, *Myxococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Nitrobacter*, *Thiocapsa*, *Chlorobium*, *Beijerinckia*, *Nitrosococcus*, *Desulfovibrio* e *Leptothrix*.

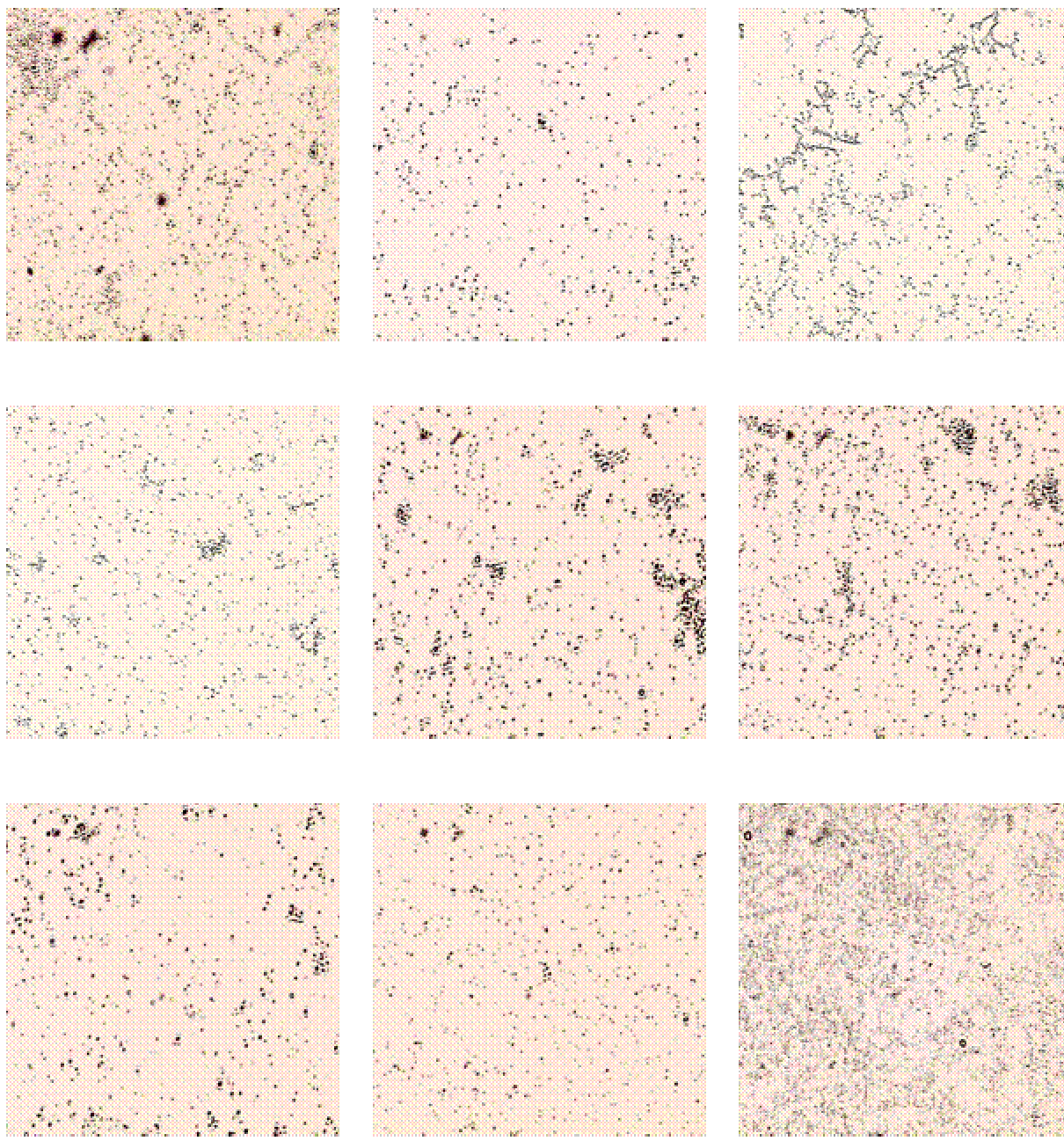


Figura 77. Imagens das lâminas do padrão PAF análogo EDELFOSSINE da 1ª retirada (2 dias após imersão). Imagens mostram predominância de bactérias tipo *coccus*.

APÊNDICE E – Análise Estatística dos Dados

A estatística dos dados foi efetuada usando uma abordagem não paramétrica utilizando-se de uma transformação dos dados por *ranking total* e posterior análise de variância com dois critérios de classificação, Two-way ANOVA, conforme descrito em ZAR, 1996. (ver tabelas 16 – 21).

Nesta avaliação foi considerado como fator controlado os diversos extratos utilizados dentro dos pré-requisitos experimentais, e como fator não controlado os dias de imersão de cada painel, pois se imagina que o tempo de imersão pode introduzir variações devidas principalmente à dinâmica da evolução do biofilme formado. Sendo assumido também, poder haver efeito de interação entre os fatores extrato e tempo.

As replicatas de cada um dos extratos sob avaliação foram reunidas e tratadas como uma única avaliação para cada retirada de painel (bloco), considerando-se ao final uma quantificação total de bactérias gram-negativas (G –) incrustadas por cada tipo de extrato utilizado e por painel retirado.

Tabela 16
ANOVA Two-way sem replicatas.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Quadrado Médio (MS)
Total	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b X_{ij}^2 - C$	ab – 1	
Fator A	$\frac{\sum_{i=1}^a \left(\sum_{j=1}^b X_{ij} \right)^2}{b} - C$	a - 1	$\frac{SS}{DF}$
Fator B	$\frac{\sum_{j=1}^b \left(\sum_{i=1}^a X_{ij} \right)^2}{a} - C$	b – 1	$\frac{SS}{DF}$
Resíduo	SS Total – SS fator A – SS fator B	(a-1) (b-1)	$\frac{SS}{DF}$

$$, \text{ onde } C = \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b X_{ij} \right)^2}{ab}. \text{ Fonte: (Zar, 1996).}$$

A hipótese nula (H_0) vinculada a ANOVA questiona se os efeitos antiincrustantes dos tratamentos podem ser considerados iguais a um nível de significância de 5%, sendo o fator calculado de **F** comparado ao valor crítico unilateral da Distribuição F (Anexo 1), sendo esta hipótese aceita quando o valor calculado **F** for menor que o valor crítico tabelado.

Na comparação das eficiências antiincrustantes entre cada extrato e o grupo de controle (branco de reagentes), foi utilizado o teste de Dunnett unilateral, um teste semelhante ao teste de Tukey, porém aplicável à abordagem não paramétrica de dados randomizados em blocos com transformação por *ranking* (ZAR, 1996).

Aqui, a hipótese nula (H_0) questiona se os valores de incrustação do branco de reagentes é menor do que aquelas dos tratamentos usados a um nível de significância de 5%, sendo o fator calculado de **q** comparado ao valor do **q'** crítico unilateral de Dunnett com grau

de liberdade dos resíduos igual a infinito (anexo 2), onde: $q = \frac{\sum Gi_{\text{controle}} - \sum Gi_{\text{tratamento}}}{SE}$; **Gi**

= ranking dentro do grupo (i-ésimo), e erro padrão, $SE = \sqrt{\frac{ba(a+1)}{6}}$, sendo **a** o nº de

tratamentos (grupos) e **b** o nº de blocos.

Tabela 17
Quantidade total de Microorganismos presentes (10^3 cel/cm^2).

Controles		<i>Perna perna</i>		<i>A. fulva</i>		<i>A. viridis</i>		<i>A. brasiliensis</i>	
Branco	Padrão	Ref.	Inoc.	Ref.	Inoc.	Ref.	Inoc.	Ref.	Inoc.
257	56	350	238	310	324	548	558	613	240
816	306	263	446	327	482	708	255	476	496
662	119	402	484	382	307	439	738	578	582
306	133	687	221	381	685	159	331	453	438

Obs. (Ver tabela 9)

Tabela 18
Estatística dos dados para a Esponja marinha *Aplysina fulva*

Dias de imersão		A	Ai	Branco	Padrão		
2 dias		310	324	257	56	*10 ³ cell/cm ²	
4 dias		327	482	816	306		
6 dias		382	307	662	119		
8 dias		381	685	306	133		
Transformação por ranking							
grupos	4	A	Ai	Branco	Padrão		
blocos	4					ΣB_j	
2 dias		8	9	4	1	22	
4 dias		10	13	16	5	44	
6 dias		12	7	14	2	35	
8 dias		11	15	6	3	35	
		ΣG_i	41	44	40	11	$\Sigma \Sigma X_{ij}$ 136
		Ranking ΣG_i	3°	4°	2°	1°	ΣG^{2i} 5338
						$\Sigma \Sigma X^{2ij}$ 1496	
						ΣB_j^2 4870	
						C 1156	

Análise da Variância: H_0 o efeito antiincrustante é o mesmo para todos os extratos.

	SS	DF	MS	F	F _(0,05;3;9)	
total	340	15				H_0
Gi	178,5	3	59,5	5,35	3,863	rejeitado
Bj	61,5	3	20,5	1,84		
resíduo	100	9	11,11			

Tabela de comparações: H_0 os valores de incrustação do branco de reagentes é menor do que aqueles dos tratamentos usados.

Comparação	Gi - Gi'	SE	q	q'(0,05;∞;4)	H^o
2° vs 1° Br ≤ P	29	3,65	7,94	2,06	rejeitado
2° vs 3° Br ≤ A	-1	3,65	-0,27	2,06	aceito
2° vs 4° Br ≤ Ai	-4	3,65	-1,09	2,06	aceito

Tabela 19
Estatística dos dados para a Esponja marinha *Amphimedon viridis*

Dias de imersão		B	Bi	Branco	Padrão	
2 dias		548	558	257	56	*10 ³ cel/cm ²
4 dias		708	255	816	306	
6 dias		439	738	662	119	
8 dias		159	331	306	133	
Transformação por ranking						
grupos	4	B	Bi	Branco	Padrão	
blocos	4					ΣBj
2 dias		11	12	6	1	30
4 dias		14	5	16	7	42
6 dias		10	15	13	2	40
8 dias		4	9	8	3	24
	ΣGi	39	41	43	13	ΣΣ Xij 136
	Ranking ΣGi	2°	3°	4°	1°	ΣG²i 5220
						ΣΣ X²ij 1496
						ΣB²j 4840
						C 1156
Análise da Variância: <i>H₀</i> o efeito antiincrustante é o mesmo para todos os extratos.						
	SS	DF	MS	F	F _(0,05;3;9)	
total	340	15				H₀ aceito
Gi	149	3	49,66	3,26	3,86	
Bj	54	3	18	1,18		
resíduo	137	9	15,22			

Tabela 20
Estatística dos dados para a Esponja marinha *Arenosclera brasiliensis*

Dias de imersão		C	Ci	Branco	Padrão	
2 dias		613	240	257	56	*10 ³ cel/cm ²
4 dias		476	496	816	306	
6 dias		578	582	662	119	
8 dias		453	438	306	133	
Transformação por ranking						
grupos	4	C	Ci	Branco	Padrão	
blocos	4					ΣBj
2 dias		14	4	5	1	24
4 dias		10	11	16	6	43
6 dias		12	13	15	2	42
8 dias		9	8	7	3	27
ΣGi		45	36	43	12	ΣΣ Xij 136
Ranking ΣGi		4°	2°	3°	1°	ΣG ² i 5314
						ΣΣ X ² ij 1496
						ΣB ² j 4918
						C 1156

Análise da Variância: H_0 o efeito antiincrustante é o mesmo para todos os extratos.

	SS	DF	MS	F	F _(0,05;3;9)	
total	340	15				H_0 rejeitado
Gi	172,5	3	57,5	5,50	3,86	
Bj	73,5	3	24,5	2,34		
resíduo	94	9	10,44			

Tabela de comparações: H_0 os valores de incrustação do branco de reagentes é menor do que aqueles dos tratamentos usados.

Comparação	Gi - Gi'	SE	q	q'(0,05;∞;4)	H_0
3° vs 1° Br ≤ P	31	3,65	8,49	2,06	rejeitado
3° vs 2° Br ≤ Ci	7	3,65	1,91	2,06	aceito
3° vs 4° Br ≤ Ci	-2	3,65	-0,54	2,06	aceito

Tabela 21
Estatística dos dados para o Mexilhão *Perna perna*

Dias de imersão		M	Mi	Branco	Padrão		
2 dias		350	238	257	56	*10 ³ cel/cm ²	
4 dias		263	446	816	306		
6 dias		402	484	662	119		
8 dias		687	221	306	133		
		Transformação por ranking					
grupos	4	M	Mi	Branco	Padrão		
blocos	4					ΣB_j	
2 dias		10	5	6	1	22	
4 dias		7	12	16	8	43	
6 dias		11	13	14	2	40	
8 dias		15	4	9	3	31	
		ΣG_i	43	34	45	14	$\Sigma \Sigma X_{ij}$ 136
		Ranking ΣG_i	3°	2°	4°	1°	ΣG_i^2 5226
							$\Sigma \Sigma X^2_{ij}$ 1496
							ΣB_j^2 4894
							C 1156
Análise da Variância: H_0 o efeito antiincrustante é o mesmo para todos os extratos.							
	SS	DF	MS	F	$F_{(0,05;3;9)}$		
total	340	15				Ho aceito	
Gi	150,5	3	50,16	3,7	3,86		
Bj	67,5	3	22,5	1,65			
resíduo	122	9	13,55				

ANEXO 1 – Tabela de Valores Críticos da Distribuição F. (ZAR, 1996)

App22 Statistical Tables and Graphs Appendix B

TABLE B.4 (cont.) Critical Values of the F Distribution

Numerator DF = 3

Denom. DF	α(2): α(1): 0,25	0,20	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,002	0,001
1	8,20	53,6	216	364	5400	21600	86500	540000	2160000
2	3,15	9,16	19,2	39,2	99,2	199	399	999	2000
3	2,36	5,39	9,28	15,4	29,5	47,5	76,1	141	225
4	2,05	4,19	6,59	9,98	16,7	24,3	35,0	56,2	80,1
5	1,88	3,62	5,41	7,76	12,1	16,5	22,4	33,2	44,4
6	1,78	3,29	4,76	6,60	9,78	12,9	16,9	23,7	30,5
7	1,72	3,07	4,35	5,89	8,45	10,9	13,8	18,8	23,5
8	1,67	2,92	4,07	5,42	7,59	9,60	12,0	15,8	19,4
9	1,63	2,81	3,86	5,08	6,99	8,72	10,7	13,9	16,8
10	1,60	2,73	3,71	4,83	6,55	8,08	9,83	12,6	15,0
11	1,58	2,66	3,59	4,63	6,22	7,60	9,17	11,6	13,7
12	1,56	2,61	3,49	4,47	5,95	7,23	8,65	10,8	12,7
13	1,55	2,56	3,41	4,35	5,74	6,93	8,24	10,2	11,9
14	1,53	2,52	3,34	4,24	5,56	6,68	7,91	9,73	11,3
15	1,52	2,49	3,29	4,15	5,42	6,48	7,63	9,34	10,8
16	1,51	2,46	3,24	4,08	5,29	6,30	7,40	9,01	10,3
17	1,50	2,44	3,20	4,01	5,19	6,16	7,21	8,73	9,99
18	1,49	2,42	3,16	3,95	5,09	6,03	7,04	8,49	9,69
19	1,49	2,40	3,13	3,90	5,01	5,92	6,89	8,28	9,42
20	1,48	2,38	3,10	3,86	4,94	5,82	6,76	8,10	9,20
21	1,48	2,36	3,07	3,82	4,87	5,73	6,64	7,94	8,99
22	1,47	2,35	3,05	3,78	4,82	5,65	6,54	7,80	8,82
23	1,47	2,34	3,03	3,75	4,76	5,58	6,45	7,67	8,66
24	1,46	2,33	3,01	3,72	4,72	5,52	6,36	7,55	8,51
25	1,46	2,32	2,99	3,69	4,68	5,46	6,28	7,45	8,38
26	1,45	2,31	2,98	3,67	4,64	5,41	6,22	7,36	8,27
27	1,45	2,30	2,96	3,65	4,60	5,36	6,16	7,27	8,16
28	1,45	2,29	2,95	3,63	4,57	5,32	6,10	7,19	8,07
29	1,45	2,28	2,93	3,61	4,54	5,28	6,05	7,12	7,98
30	1,44	2,28	2,92	3,59	4,51	5,24	6,00	7,05	7,89
35	1,43	2,25	2,87	3,52	4,40	5,09	5,80	6,79	7,56
40	1,42	2,23	2,84	3,46	4,31	4,98	5,66	6,59	7,33
45	1,42	2,21	2,81	3,42	4,25	4,89	5,55	6,45	7,15
50	1,41	2,20	2,79	3,39	4,20	4,83	5,47	6,34	7,01
60	1,41	2,18	2,76	3,34	4,13	4,73	5,34	6,17	6,81
70	1,40	2,16	2,74	3,31	4,07	4,68	5,28	6,06	6,57
80	1,40	2,15	2,72	3,28	4,04	4,61	5,19	5,97	6,57
90	1,39	2,15	2,71	3,26	4,01	4,57	5,14	5,91	6,49
100	1,39	2,14	2,70	3,25	3,98	4,54	5,11	5,86	6,43
120	1,39	2,13	2,68	3,23	3,95	4,50	5,05	5,78	6,34
140	1,38	2,12	2,67	3,21	3,92	4,47	5,01	5,73	6,28
160	1,38	2,12	2,66	3,20	3,91	4,44	4,98	5,69	6,23
180	1,38	2,11	2,65	3,19	3,89	4,42	4,95	5,66	6,19
200	1,38	2,11	2,65	3,18	3,88	4,41	4,94	5,63	6,16
300	1,38	2,10	2,63	3,16	3,85	4,36	4,88	5,56	6,08
500	1,37	2,09	2,62	3,14	3,82	4,33	4,84	5,51	6,01
∞	1,37	2,08	2,61	3,12	3,78	4,28	4,77	5,42	5,91

ANEXO 2 – Tabela de Valores Críticos de q' Teste unilateral de Dunnett. (ZAR, 1996)

App72 Statistical Tables and Graphs Appendix 8
TABLE B.6 Critical Values of q' for the One-Tailed Dunnett's Test
 $\alpha = 0.05$

v	$k=2$	3	4	5	6	7	8	9	10
5	2.02	2.44	2.68	2.85	2.98	3.08	3.16	3.24	3.30
6	1.94	2.34	2.56	2.71	2.83	2.92	3.00	3.07	3.12
7	1.89	2.27	2.48	2.62	2.73	2.82	2.89	2.95	3.01
8	1.86	2.22	2.42	2.55	2.66	2.74	2.81	2.87	2.92
9	1.83	2.18	2.37	2.50	2.60	2.68	2.75	2.81	2.86
10	1.81	2.15	2.34	2.47	2.56	2.64	2.70	2.76	2.81
11	1.80	2.13	2.31	2.44	2.53	2.60	2.67	2.72	2.77
12	1.78	2.11	2.29	2.41	2.50	2.58	2.64	2.69	2.74
13	1.77	2.09	2.27	2.39	2.48	2.55	2.61	2.66	2.71
14	1.76	2.08	2.25	2.37	2.46	2.53	2.59	2.64	2.69
15	1.75	2.07	2.24	2.36	2.44	2.51	2.57	2.62	2.67
16	1.75	2.06	2.23	2.34	2.43	2.50	2.56	2.61	2.65
17	1.74	2.05	2.22	2.33	2.42	2.49	2.54	2.59	2.64
18	1.73	2.04	2.21	2.32	2.41	2.48	2.53	2.58	2.62
19	1.73	2.03	2.20	2.31	2.40	2.47	2.52	2.57	2.61
20	1.72	2.03	2.19	2.30	2.39	2.46	2.51	2.56	2.60
24	1.71	2.01	2.17	2.28	2.36	2.43	2.48	2.53	2.57
30	1.70	1.99	2.15	2.25	2.33	2.40	2.45	2.50	2.54
40	1.68	1.97	2.13	2.23	2.31	2.37	2.42	2.47	2.51
60	1.67	1.95	2.10	2.21	2.28	2.35	2.39	2.44	2.48
120	1.66	1.93	2.08	2.18	2.26	2.32	2.37	2.41	2.45
∞	1.64	1.92	2.06	2.16	2.23	2.29	2.34	2.38	2.42

v	$k=2$	3	4	5	6	7	8	9	10
5	3.37	3.90	4.21	4.43	4.60	4.73	4.85	4.94	5.03
6	3.14	3.61	3.88	4.07	4.21	4.33	4.43	4.51	4.59
7	3.00	3.42	3.66	3.83	3.96	4.07	4.15	4.23	4.30
8	2.90	3.29	3.51	3.67	3.79	3.88	3.96	4.03	4.09
9	2.82	3.19	3.40	3.55	3.66	3.75	3.82	3.89	3.94
10	2.76	3.11	3.31	3.45	3.56	3.64	3.71	3.78	3.83
11	2.72	3.06	3.25	3.38	3.48	3.56	3.63	3.69	3.74
12	2.68	3.01	3.19	3.32	3.42	3.50	3.56	3.62	3.67
13	2.65	2.97	3.15	3.27	3.37	3.44	3.51	3.56	3.61
14	2.62	2.94	3.11	3.23	3.32	3.40	3.46	3.51	3.56
15	2.60	2.91	3.08	3.20	3.29	3.36	3.42	3.47	3.52
16	2.58	2.88	3.05	3.17	3.26	3.33	3.39	3.44	3.48
17	2.57	2.86	3.03	3.14	3.23	3.30	3.36	3.41	3.45
18	2.55	2.84	3.01	3.12	3.21	3.27	3.33	3.38	3.42
19	2.54	2.83	2.99	3.10	3.18	3.25	3.31	3.36	3.40
20	2.53	2.81	2.97	3.08	3.17	3.23	3.29	3.34	3.38
24	2.49	2.77	2.92	3.03	3.11	3.17	3.22	3.27	3.31
30	2.46	2.72	2.87	2.97	3.05	3.11	3.16	3.21	3.24
40	2.42	2.68	2.82	2.92	2.99	3.05	3.10	3.14	3.18
60	2.39	2.64	2.78	2.87	2.94	3.00	3.04	3.08	3.12
120	2.36	2.60	2.73	2.82	2.89	2.94	2.99	3.03	3.06
∞	2.33	2.56	2.68	2.77	2.84	2.89	2.93	2.97	3.00


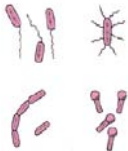

Values in Table B.6 are reprinted, with the permission of the author and publisher, from the tables of C. W. Dunnett (1955, *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096–1121).


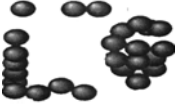




Examples:


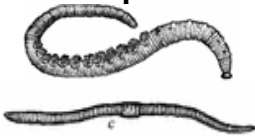

$$q'_{0.05(1),16,4} = 2.23 \text{ and } q'_{0.01(1),24,3} = 2.77.$$

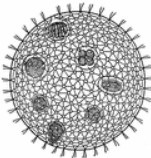

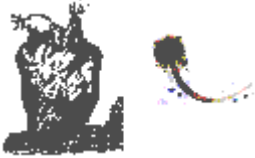
If a critical value is required for degrees of freedom not on this table, one may conservatively use the critical value with the next lower degrees of freedom. Or, the critical value may be estimated by harmonic interpolation.

GLOSSÁRIO

<p>Adernagem</p>	<p>Prática marinheira utilizada para inclinar uma embarcação até que um lado da mesma esteja completamente fora d'água, permitindo que serviços de manutenção do casco sejam realizados sem a necessidade de docagem em dique seco.</p>
<p>Apoptose</p>	<p>Morte celular onde a própria célula utiliza-se de sua “maquinaria” celular para se destruir; um mecanismo suicida da célula que permite que o organismo controle o número de células ou elimine as células que ameaçam a sua sobrevivência.</p>
<p>Anafilaxia</p>	<p>Hipersensitividade causada por uma exposição a uma substância, que causa uma reação resultando na vasodilatação e contração dos músculos lisos, incluindo os brônquios, podendo resultar na morte do animal. Reação sistêmica rápida e severa.</p>
<p>Antozoários</p> 	<p>Organismos marinhos da classe <i>Anthozoa</i>, tais como coral e anêmonas, que têm segmentos radiais. Crescem sozinhos ou em colônias, e reproduzem-se liberando esperma e óvulos.</p>
<p>Ascídia</p>	<p>Ver Tunicados.</p>
<p>Autacóide</p>	<p>Substância orgânica, tal como hormônios, produzida em uma parte e transportada até outra parte do organismo, onde exerce um efeito fisiológico particular.</p>
<p>Bacilos</p> 	<p>Gênero de bactéria que se apresenta em forma de bastonete, medindo em regra, de 1 a 15 micra.</p>
<p>Balanídeos</p> 	<p>Crustáceos marinhos com apêndices, semelhantes a penugens, usados para capturar os alimentos. Quando larva, é móvel. Depois de assentado a um substrato desenvolve uma casca dura, forma adulta, e vive fortemente aderido a superfícies submersas. Conhecidos vulgarmente como cracas.</p>
<p>Bentos</p>	<p>São organismos que habitam o fundo do oceano, rios e lagos. Vivem sobre o fundo ou enterrados nele, aderidos ou livres mas apresentando em geral pouca mobilidade. Estas formas de vida incluem bactérias, algas, plantas aquáticas superiores, microfauna e macrofauna.</p>

<p>Biodiesel</p>	<p>Combustível composto por mono-álquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivado de óleos vegetal ou animal. Geralmente produzido pela reação destes óleos com álcool, tais como metanol e etanol, na presença de catalisador, tendo como subproduto glicerina.</p>
<p>Briozoários</p> 	<p>Animais aquáticos sessies formadores de colônias de pequenos pólipos, tendo tentáculos curvados.</p>
<p>Cianobactérias</p>	<p>Bactérias fotossintéticas que contêm clorofila <i>a</i> capazes de produzir oxigênio pela quebra da água. Antes conhecida como alga verde-azulada.</p>
<p>Coccus</p> 	<p>Gênero de bactéria de formato esférico, podendo se formado por um ou vários cocos. cujo tamanho, em geral, situa-se entre 0,2 e 5 micra de diâmetro. Apresentam-se isoladas ou formando colônias. e.g. Diplococos, estreptococos, estafilococos, etc.</p>
<p>Diatomáceas</p> 	<p>Tipo de alga microscópica e unicelular, cuja parede celular é impregnada com sílica. Apresentam diversas formas e padrões geométricos.</p>
<p>Docagem</p>	<p>Procedimento onde o navio, a ser repintado ou consertado, é posto sobre cavaletes dentro de um dique, o qual é drenado para permitir o completo acesso ao casco.</p>
<p>Espirilos</p> 	<p>São bactérias que têm a forma de um bastonete recurvado. Os espirilos propriamente ditos, formam filamentos helicoidais. Já os vibrões são bactérias curtas, com espirais incompletas, e têm a forma de vírgula.</p>
<p>Eucariontes</p> 	<p>Organismo cuja célula possui um núcleo bem definido, podendo ser unicelular (Protistas) ou multicelulares (animais, plantas e fungos).</p>
<p>Filo</p>	<p>Taxonomia. A divisão primária de um Reino</p>
<p>Fitoplâncton</p> 	<p>Comunidade de vegetais microscópicos que vivem em corpos d'água e que são constituídos principalmente por algas: cianofíceas, clorofíceas, diatomáceas, euglenofíceas, crisofíceas, rodofíceas, xantofíceas e feofíceas.</p>

Lípases	Classe de enzimas, presentes em animais e vegetais, que decompõem os glicerofosfolipídios a glicerol e ácidos graxos.
Obras-vivas	Parte do casco da embarcação, abaixo do plano de flutuação a plena carga, que fica permanentemente submersa.
Parazoa 	Sub-reino que compreende os organismos multicelulares tendo células menos especializadas e compreende o único Filo <i>Porifera</i> . Usualmente existindo como colônias sésseis.
PAF-análogos	Classe de fosfolipídios quimicamente caracterizados como 1-O-alkil-2-acetil-glicerofosfolipídio (PAF) ou 1-O-alkil-sn-glicerofosfolipídio (lyso-PAF), que possuem alta atividade biológica ao nível de mediação celular de processos alérgicos, inflamatórios e anafiláticos.
PEL TLV-TWA	<u>Permissible Exposure Level</u> . Conforme a Occupational Safety and Health Administration (OSHA). <u>Threshold Limit Value. Time Weighted Average</u> . Conforme a American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). É o valor da concentração limite de uma substância presente na atmosfera de trabalho, sob a qual nenhum efeito nocivo é normalmente esperado ao trabalhador. Tendo como base uma jornada de trabalho de 8 horas por dia e cinco dias por semana.
Pelágicos	Animais que se deslocam e habitam a coluna d'água. Constituem principalmente os peixes.
Peptidoglicanos	Rígido componente da parede celular de várias bactérias, consistindo em geral de uma cadeia principal de glicano (açúcar) com ramificações alternadas de N-acetil-glucosamina e ácido N-acetil-muramico.
Poliquetas 	Vermes da classe <i>Polychaeta</i> , incluem na maior parte vermes marinhos e são caracterizados por um par de apêndices macios com minúsculos pêlos em cada segmento.
Polissacarídeos	São polímeros complexos compostos por numerosos monossacarídeos, mais de dez unidades. Formam moléculas muito grandes e amorfas, geralmente insolúveis em água.
Procariontes 	Organismos formados por uma só célula que não possui um núcleo distinto. Bactéria.

<p>Protozoários</p> 	<p>Organismos constituídos por uma única célula nucleada, não apresentando parede celular. Amebas, flagelados e ciliados, pertencentes ao sub-reino <i>Protozoa</i>.</p>																
<p>Rotíferas</p> 	<p>Diminutos organismos celulares, constituintes do plâncton, que possui um órgão ciliado para alimentação e locomoção.</p>																
<p>Substâncias poliméricas extracelulares, EPS</p>	<p>Complexa mistura de macromoléculas tais como polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Sendo sua composição variável com a espécie de microorganismo e fatores ambientais.</p>																
<p>Taxonomia</p>	<p>Classificação de plantas e animais de acordo com sua presumida relação natural e origem, e cumprimento de uma ordem hierárquica, e.g:</p> <table border="1" data-bbox="518 1120 1385 1294"> <thead> <tr> <th>Nome comum</th> <th>Reino</th> <th>Filo</th> <th>Classe</th> <th>Ordem</th> <th>Família</th> <th>Gênero</th> <th>Especie</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cão Doméstico</td> <td><i>Animalia</i></td> <td><i>Chordata</i></td> <td><i>Mammalia</i></td> <td><i>Carnivora</i></td> <td><i>Canidae</i></td> <td><i>Canis</i></td> <td><i>familiaris</i></td> </tr> </tbody> </table>	Nome comum	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Especie	Cão Doméstico	<i>Animalia</i>	<i>Chordata</i>	<i>Mammalia</i>	<i>Carnivora</i>	<i>Canidae</i>	<i>Canis</i>	<i>familiaris</i>
Nome comum	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Especie										
Cão Doméstico	<i>Animalia</i>	<i>Chordata</i>	<i>Mammalia</i>	<i>Carnivora</i>	<i>Canidae</i>	<i>Canis</i>	<i>familiaris</i>										
<p>Transmembranas (proteínas)</p>	<p>Proteínas que se estendem através da bicamada de lipídios, tendo uma parte de sua massa em cada lado da membrana plasmática. Possuem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. São responsáveis pelo transporte de moléculas através da membrana plasmática e pela sinalização celular.</p>																
<p>Tunicados</p> 	<p>Pertencentes ao subfilo <i>Tunicata</i>, que incluem as ascídias marinhas sésseis e algumas formas pelágicas. O corpo é vestido por um envoltório externo denominado túnica, que contém celulose. A grande faringe perfurada está adaptada para a alimentação por filtração. São hermafroditas e possuem a larva em forma de girino.</p>																

REFERÊNCIAS

- Agogué, H; Casamayor, E.O.; Bourrain, M. *et al.* (2005). **A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems.** FEMS Microbiology Ecology. Vol. 54. pp. 269 – 280.
- Alam, N.; Bae, B.H.; Hong, J.; *et al.* (2001). **Additional bioactive lyso-PAF congeners from the sponge *Spirastrella abata*.** Journal of Natural Products. Vol. 64. pp 533 – 535.
- Albert, B.; Johnson A.; Lewis, J.; *et al.* (2004). **Molecular biology of the cell.** 4ª edição. Cap 10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em 18 de Fevereiro de 2005.
- Allison, D.G. (1998). **Exopolysaccharides production in bacterial biofilms.** Biofilm. Vol. 3. <http://www.bioline.org.br/bf> Acesso em 18 de Fevereiro de 2005.
- Ametaj, B.N.; Bobe, G.; Lu, Y.; *et al.* (2003). **Effect of sample preparation, length of time, and sample size on quantification of total lipids from bovine liver.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 51. pp 2105 – 2110.
- Anderson, C.; Atlar M.; Callow, M.; *et al.* (2003). **The development of foul-release coatings for seagoing vessels.** Journal of Marine Design and Operations. Vol. B4 pp 11 – 23.
- Antonopoulou, S.; Oikonomou, A.; Karantonis, H.C.; *et al.* (2002). **Isolation and structural elucidation of biologically active phospholipids from *Scytonema julianum* (cyanobacteria).** Biochemical Journal. Vol.367. pp 287 – 293.
- Arce, F.T.; Avci, R.; Beech, I.B.; Cooksey, K.E. e Cooksey, B.W. (2004). **A live bioprobe for studying diatom-surface interactions.** Biophysical Journal. Vol.87. pp 4284 – 4297.
- Armstrong, E.; Boyd, K.G. e Burgess, J.G. (2000). **Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms.** Biotechnology Annual Review Vol. 6 pp 221 -237
- Assmann, M.; Lichte, E.; Pawlik, J.R. e Köck, M. (2000). **Chemical defenses of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*.** Marine Ecology Progress Series. Vol. 207 pp 255 – 262.
- Atlas, R.M. (1996). **Principles of microbiology.** 2ª edição. Cap.3 e 17. William C. Brown Publishers. Iowa – USA.
- Bakus, G.J.; Evans, T.; Mading, B.; *et al.* (1983). **The use of natural and synthetic toxins as shark repellents and antifouling agents.** Toxicon (Suppl.). Vol. 3 pp 25-27.
- Balsinde, J.; Winstead, M.V. e Dennis, E.A. (2002). **Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization.** FEBS Letters. Vol. 531. pp 2 – 6.

Belarbi, E.H, Gómez, A.C.; Chisti, Y.; *et al.* (2003). **Producing drugs from marine sponges**. *Biotechnology Advances*. Vol. 21 pp 585 – 598.

Ben-Menachem, G.; Byström, T.; Rechnitzer, H.; *et al.* (2001). **The physico-chemical characteristics of the phosphocholine-containing glycosphingolipid MfGL-II govern the permeability properties of mycoplasma fermentans**. *European Journal of Biochemistry*. Vol.268 pp 3694 – 3701.

Berenbaum, M.R. (1995). **The chemistry of defense: theory and practice**. In: *Chemical Ecology: the chemistry of biotic interaction*. pp 1 – 16. T. Eisner & J. Meinwald [Editores]. National Academic Press – Washington DC.

Berlinck, R.G.S., Ogawa, C.A., Almeida, A.M.P., Sanchez, M.A.A., Costa, L.V., Malpezzi, E.L.A., Freitas, J.C., Hajdu, E. (1996). **Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast**, *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 115C, pp. 155-163.

Berg, J.M.; Tymoczko, J.L. e Stryer, L. (2002). **Biochemistry**. 5ª edição. Cap. 12. Lipids and Cell Membranes. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=stryer.chapter.1626>
Acesso em 10 de Fevereiro de 2005

Beveridge, T.J. (1999). **Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles**. *Journal of Bacteriology*. Vol.181 N°16 pp 4725 – 4733.

Beveridge, T.J. e Graham, L.L. (1991). **Surface layers of bacteria**. *Microbiological Reviews*. Vol. 55 N°4. pp 684 – 705.

Bhadury, P e Wright, P.C. (2004). **Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications**. *Planta*. Vol.219. pp 561 – 578.

Bhaskar, P.V. e Bhosle, N.B. (2005). **Microbial extracellular polymeric substance in marine biogeochemical process**. *Current Science*. Vol. 88 N°1. pp 45 – 53.

Bjerve, K.S.; Daae, L.N.W. e Bremer, J. (1974). **The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid-extraction procedures**. *Analytical Biochemistry*. Vol.58. pp 238 – 245.

Blank, M.L.; Snyder, F.; Byers, L.W. *et al.*; (1979). **Antihypertensive activity of alkyl ether analog of phosphatidylcholine**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 90. pp 1194 – 1200.

Bodenec, J.; Pelled, D. e Futerman, A.H. (2003). **Aminopropyl solid phase extraction and 2D TLC of neutral glycosphingolipids and neutral lysoglycosphingolipids**. *Journal of Lipids Research*. Vol.44 pp 218 – 225.

Bohlin, L.; Sjögren, M.; Claesson, P.; *et al.* (2004). **On-growth inhibiting compounds**. Patent WO 2004/055044A1. World Intellectual Property Organization. International Bureau. Genebra - Suíça.

Bonati, S. e Monteleone, F. (2001). **Biocidal-antifouling agents with low ecotoxicity index**. Patent WO 01/28328A1 World Intellectual Property Organization. International Bureau. Genebra Suíça.

Borenstein, S.W. (1994). **Microbiologically influenced corrosion handbook**. Woodhead publishing Ltd. Cambridge England. pp 1 – 7.

Botitsi, E.; Mavri-Vavayanni, M. e Siafaka-Kapadai, A. (1998). **Metabolic fate of platelet-activating factor (PAF 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and lyso-PAF (1-O-alkyl-2-lysosn-glycero-3-phosphocholine) in FRTL5 cells**. Journal of Lipid Research. Vol.39. pp 1295 – 1304.

Brady, R.F. (1999). **Properties which influence marine fouling resistance in polymers containing silicon and fluorine**. Progress in Organic Coatings. Vol 35 pp 31 – 35.

Brady, R.F. (2000). **Clean hulls without poisons: devising and testing nontoxic marine coatings**. Journal of Coatings Technology. Vol.72 pp 45 – 56.

Brady, R.F. (2001). **A fracture mechanical analysis of fouling release from nontoxic antifouling coatings**. Progress in Organic Coatings. Vol. 43 issue 1-3. pp 188-192.

Brow, W.J.; Chambers, K. e Doody, A. (2003). **Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function**. Traffic. Vol. 4. pp 214 – 221.

Burgess, J.G.; Boyd, K.G.; Armstrong, E.; *et al.* (2003). **The development of a marine natural product-based antifouling paint**. Biofouling. Vol 19 (suppl.) pp 197-205.

Bussolino, F.; Sordano, C.; Benfenati, E. e Bozzaro, S.(1991). **Dictyostelium cells produce platelet-activating factor in response to cAMP**. European Journal of Biochemistry. Vol.196. pp 609 – 615.

Butler, A.J.; van Altna, I.A. e Dunne, S.J. (1996). **Antifouling activity of lyso-platelet-activating factor extracted from Australian sponge *Crella incrustans***. Journal of Chemical Ecology. Vol. 22 N°11 pp 2041 -2061.

Calligerou, M.; Siafaka-Kapadal, A.; Galanopoulou, D.; *et al.* (1996). Platelet activating factor and Lyso-phosphatidylcholines from strawberry. Phytochemistry. Vol. 41. N°1. pp 89 – 92.

Callow, M.E. (1990). **Ship fouling: problems and solutions**. Chemistry and Industry. <http://www.highbeam.com/library/doc1.asp?ctrlInfo=Round9c%3APr>. Acesso em 26 Janeiro 2005.

Callow, M.E. e Callow, J.A.(2002). **Marine biofouling: a sticky problem**. Biologist. Vol.49. pp 1 – 5.

Carballeira, N.M. e Shalabi, F. (1994). **Unusual lipids in the caribbean sponges *Amphimedon viridis* and *Desmapsamma anchorata***. Journal of Natural Products. Vol. 57. Nº8. pp. 1152 – 1159.

Christie, W.W. (1992). **Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids**. In Advances in Lipid Methodology. One. pp. 1 – 17. <http://www.lipidlibrary.co.uk> Acesso em 02 fevereiro 2005.

Christie, W.W. (1993). **Preparation of lipid extracts from tissues**. In Advances in Lipid Methodology. Two. pp. 195 – 213. <http://www.lipidlibrary.co.uk> Acesso em 02 fevereiro 2005.

Clare, A. S. (1995). **Natural ways to banish barnacles**. New Scientist. Vol. 145 pp 38 - 41

Costerton, J.W.; Ingram, J.M. e Cheng, K.J. (1974). **Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria**. Bacteriological Reviews. Vol.38. Nº 1. pp. 87 – 110.

Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; Debeer, D.; *et al.* (1994). **Biofilms the customized microniche**. Journal of Bacteriology. Vol.178 Nº8. pp 2137 – 2142.

Costerton, J.W.; Camper, A.K.; Stewart, P.S. *et al.* (1999). **The problem: not just bacteria-bacterial biofilms**. www.awt.org/members/publications/anlyst/1999/1999.htm Acesso em 02 de março de 2005.

Croft, S.L.; Seifert, K.; Duchêne, M. (2003). **Antiprotozoal activities of phospholipids analogues**. Molecular & Biochemical Parasitology. Vol. 126 pp 165 - 172.

Crowl, D.A. e Louvar, J.F. (1990). **Chemical process safety. Fundamentals with applications**. 1ª edição. Prentice Hall, New Jersey.

Davey, M.E. e O'toole, G.A. (2000). **Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics**. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol.64 Nº4 pp 847 – 867.

de Beer, D. e Kühn, M. (2001). **Interfacial microbial mats and biofilms**. In: **The Benthic Boundary Layer**. Capítulo 15. pp. 374 – 394. B.P. Boudreau & B.B. Jørgensen (editores.), Oxford University Press, New York.

Dekker, N. (2000). **Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function**. Molecular Microbiology. Vol. 35. Nº 4. pp 711 – 717.

Dennis, E.A. (1994). **Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂**. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 269. Nº18. pp 13057 – 13060.

Dembitsky, V.M.; Rezanka, T. e Srebnik, M. (2003). **Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae class Demospongiae**. Chemistry and Physics of Lipids. Vol 123 pp116 – 155.

Demopoulos, C.A.; Pinckard, R.N. e Hanahan, D.J. (1979). **Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators)**. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 254. Nº19. pp 9355 – 9358.

Denizot, Y.; Dassa, E.; Benveniste, J. e Thomas, Y. (1989a). **Paf-acether production by Escherichia coli**. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 161. nº 2 pp. 939 – 943.

Denizot, Y.; Dassa, Kim, H., Bossant, M., Salem, N., J. Thomas, e Y. E.; Benveniste (1989b). **Synthesis of paf-acether from exogenous precursors by the prokaryote Escherichia coli**. FEBS Letters. Vol. 243. nº 1. pp. 13 – 16.

Donlan, R.M. (2002). **Biofilm: microbial life on surfaces**. Emerging Infectious Diseases. Vol. 8 Nº9 pp 881 – 890.

Dreyfus, H.; Guérol, B.; Freysz, L. e Hicks, D. (1997). **Successive isolation and separation of major lipid fractions including gangliosides from single biological samples**. Analytical Biochemistry. Vol. 249. pp 67 – 78.

Drouillard, K.G.; Hagen, H. e Haffner, G.D. (2004). **Evaluation of chloroform/methanol and dichloromethane/hexane extractable lipids as surrogate measures of sample partition capacity for organochlorines in fish tissues**. Chemosphere. Vol. 55. pp 395 – 400.

Dunne, Jr.W.M. (2002). **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** Clinical Microbiology Reviews. Vol. 15 Nº2 pp 155 – 166.

Etoh, H.; Kondoh, T.; Noda, R.; *et al.* (2002). **Shogaols from Zingiber officinale as promising antifouling agents**. Bioscience Biotechnology Biochemistry. Vol. 66 (8) pp 1748 – 1750.

Etoh, H.; Kondoh, T.; Yoshioka, N.; *et al.* (2003). **9-Oxo-neoprocumamol from Curcuma aromatica (Zingiberaceae) as an attachment inhibitor against the Blue mussel Mytilus edulis galloprovincialis**. Bioscience Biotechnology Biochemistry. Vol. 67 (4) pp 911 – 913.

Faulkner, D.J. (2000). **Marine natural products**. Natural Products Report. Vol. 17 pp 7 - 55

Fernandez, M.A.; Limaverde, A.M.; Castro, I.B. (2002). **Occurrence of imposex in Thais haemastoma: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil**. Caderno de Saúde Pública. Vol.18 Nº2 pp 463 – 476.

Flemming, H.; Griebe, T. e Schaule, G. (1996). **Antifouling strategies in technical systems – a short review**. Water Science and Technology Vol 34 Nº5-6 pp 517–524

Folch, J.; Lees, M. e Stanley, G.H.S. (1957). **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.** The Journal of Biological Chemistry. Vol.226. pp 497 – 509.

Folch, J.; Ascoli, I.; Lees, M.; *et al.* (1951). **Preparation of lipid extracts from brain tissues.** The Journal of Biological Chemistry. Vol.191. pp 833 – 841.

Freitas, J.C. (2003). **O potencial farmacológico das toxinas marinhas.** <http://www.comciencia.br/reportagens/litoral/lit20.sthtml> . Acesso em 10 de janeiro de 2005.

Furlan, E. F. (2004). **Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos.** Tese de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP.

Garavito, R.M. e Ferguson-Miller, S. (2001). **Detergents as tools in membrane biochemistry.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 276 N°35 Issue 31 pp 32403 - 32406.

Gauger, D.R. e Pohle, W. (2005). **FT-IR spectroscopy for exposing the CH vibrational bands from the polar parts of phospholipids.** Journal of Molecular Structure. Vol. 744 – 747. pp 211 – 215.

Geraci, S.; Faimali, M.; Piovetti, L. e Cimino, G. (1999). **Antifouling from nature: laboratory test with *Balanus amphitrite* Darwin on algae and sponges.** In: 10th International Congress on Marine Corrosion and Fouling University of Melbourne February 1999: <http://www.dsto.defence.gov.au/corporate/conferences/icmcf/published.html> Acesso em 10 janeiro 2005.

Grunlan, M.A.; Lee, N.S.; Cai, G.; *et al.* (2004). **Synthesis of α ω -Bis epoxy oligo (1'H 1'H 2'H 2'H-perfluoroalkyl siloxane)s and properties of their photo-acid cross-linked films.** Chemistry of Materials. Vol. 16 pp 2433 – 2441.

Gómez-Fernandez, J.C. e Villalaín, J. (1998). **The use of FT-IR for quantitative studies of the apparent pKa of lipid carboxyl groups and the dehydration degree of the phosphate group of phospholipids.** Chemistry and Physics of Lipids. Vol. 96. pp 41 – 52.

Hall, L.M. e Murphy, R.C. (1998). **Analysis of stable oxidized molecular species of glycerophospholipids following treatment of red blood cell ghosts with t-butylhydroperoxide.** Analytical Biochemistry. Vol. 258 pp 184 – 194.

Hamilton, J.G. e Comai, K. (1984). **Separation of neutral lipids and free fatty acids by high-performance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection.** Journal of Lipid Research. Vol. 25. pp1142 – 1148.

Hanahan, D.J.; Dittmer, J.C. e Warashina, E. (1957). **A column chromatographic separation of classes of phospholipids.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 228. pp 687 – 700.

Hayakawa, T.; Wang, J.; Xiang, M.; *et al.* (2000). **Effect of changing molecular end groups on surface properties: synthesis and characterization of poly(styrene-*b*-semifluorinated isoprene) block copolymers with – CF₂H end groups.** *Macromolecules*. Vol. 33 pp 8012 – 8019.

Hellio, C.; De La Broise, D.; Dufossé, L. *et al.* (2001). **Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae potential use for environmentally friendly antifouling paints.** *Marine Environmental Research*. Vol.52. pp 231 – 247.

Hirsch, J. e Ahrens Jr., E.H. (1958). **The separation of complex lipid mixture by the use of silicic acid chromatography.** *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 233. pp 311 – 320.

Hoiczuk, E. e Hansel, A. (2000). **Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope.** *Journal of Bacteriology*. Vol. 182 N° 5. pp 1191 – 1199.

Houve, H.; Kleveland, K.; Nilsen, O.N.; *et al.* (2001). **Novel juvenile hormone analogues and their use as antifouling agents.** Patent WO 01/06853 A2 World Intellectual Property Organization. International Bureau. Genebra Suíça.

Hoving, E.B. (1995). **Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids.** *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. Vol. 671. pp 341 – 362.

Jones, N.C. e Osborn, M.J. (1977a). **Interaction of salmonella typhimurium with phospholipid vesicles. Incorporation of exogenous lipids into intact cells.** *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 252. N°20. pp 7398 – 7404.

Jones, N.C. e Osborn, M.J. (1977b). **Translocation of phospholipid between the outer and inner membranes of salmonella typhimurium.** *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 252. N°20. pp 7405 – 7412.

Kaluzny, M.A.; Duncan, L.A.; Merritt, M.V e Epps, D.E. (1985). **Rapid separation of lipid class in high yield and purity using bonded phase columns.** *Journal of Lipid Research*. Vol. 26. pp 135 – 140.

Kelecon, A. (2002). **Secondary metabolites from marine microorganisms.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Vol. 74. pp 151 – 170.

Kerwin, J.L.; Tuininga, A.R. e Ericsson, L.H. (1994). **Identification of molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry.** *Journal of Lipid research*. Vol. 35. pp. 1102 -1114.

Kim, H. e Salem Jr., N. (1990). **Separation of lipid classes by solid phase extraction.** *Journal of Lipid Research*. Vol. 31. pp 2285 – 2289.

Khalil, C.N. e Leite, L.C.F. (2005). **Process for producing biodiesel.** Patent US 2005/0011112. United States Patent Office.

Koebnik, R.; Locher, K.P. e Gelder, V. (2000). **Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell.** *Molecular Microbiology*. Vol. 37. pp 239 – 253.

Kramer, J.K.G. e Hulan, H.W. (1978). **A comparison of procedures to determine free fatty acids in rat heart.** *Journal of Lipid Research*. Vol. 19. pp 103 – 106.

Kulikov, V.I. e Muzya, G.I. (1998). **Review: The bioregulatory role of platelet-activating factor in intracellular process and cell-cell interaction.** *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 63 (1). pp 47 – 54.

Künzler, K. e Einchenberger, W. (1997). **Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi.** *Phytochemistry*. Vol.46. N°. 5. pp 883 – 892.

Laspidou, C.S. (2003). **Modeling Heterogeneous Biofilms Including Active Biomass Inert Biomass and Extracellular Polymeric Substances.** Ph.D. Thesis. Northwestern University USA. <http://www.scirus.com/srsapp/sciruslink?src=web&url=http%3A%2F%2Fkatie.at.northwestern.edu%2Fetd%2Fflaspidou%2Fflaspidou.pdf> Acesso em 05 de março de 2005.

Lewis, J.A. (2001). **Ship anti-foulants - tributyltin and substitutes.** National Shipping Industry Conference Sydney Australia. pp 1 - 6. http://www.amsa.gov.au/about_amsa/Corporate_information/AMSA_speeches/Shipping_In_The_Asia-Pacific_Conference/PDFs/dsto.pdf. Acesso em 10 de janeiro de 2005.

Lewis, J.A. (2001a). **Hull Fouling as a Vector for the Translocation of Marine Organisms.** Report No. 1. Revisão 0. Marine Science & Ecology Pty. Ltd. (AMOG Consulting).

Lewis, J.A. (2002). **The Significance of the Prospective Ban on Tributyltin Antifouling Paints on the Introduction & Translocation of Marine Pests in Australia.** Report No. 2. Revisão 0. Marine Science & Ecology Pty. Ltd. (AMOG Consulting).

Lewis, K. (2001a). **Riddle of biofilm resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 45 N° 4. pp 999 – 1007.

Lindholm, P.; Göransson, U.; Johansson, S.; *et al.* (2002). **Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents.** *Molecular cancer Therapeutics*. Vol.1. pp 365 – 369.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; *et al.* (1999). **Molecular Cell Biology.** 4ª edição. Cap.5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em 18 de Fevereiro de 2005.

Loosdrecht, M.C.M.van, Lyklema, J.; Norde, W. e Zehnder, A.J.B. (1990). **Influence of interfaces on microbial activity.** *Microbiological Reviews*. Vol. 54. N°1. pp 75 – 87.

Marathe, G.K.; Silva, A.R.; Neto, H.C.C.F.; *et al.* (2001). **Lysophosphatidylcholine and lyso-PAF display PAF-like activity derived from contaminating phospholipids.** *Journal of Lipid Research*. Vol.42. pp 1430 – 1437.

Marcotte, L.; Therien-Aubin, H.; Sandt, C.; *et al.* (2004). **Solute size effects on the diffusion in biofilms of streptococcus mutans.** Biofouling. Vol. 20 (4/5). pp 189 – 201.

Maréchal, J.P.; Culioli, G.; Hellio, C.; *et al.* (2004). **Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of brown alga *Bifurcaria bifurcate* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas halopanktis*.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. Vol.313 Issue 1. pp 47 – 62.

Matias, J.R. (2001). **Non-toxic coating composition methods of use thereof and articles protected from attachment of biofouling organisms.** Patent WO 01/95718A1. World Intellectual Property Organization. International Bureau. Genebra Suíça.

McIntyre, T.M.; Zimmerman, G.A. e Prescott, S.M. (1999). **Biologically active oxidized phospholipids.** The Journal of Biological chemistry. Vol.274. Nº36. pp 25189 – 25192.

Mera, A.E. e Wynne, K.J. (2001). **Fluorinated silicone resin fouling release composition.** Patent 6 265 515. United States Patent Office.

Miller, J.N. e Miller, J.C. (2000). **Statistics and chemometrics for analytical chemistry.** 4ª edição. Pearson Prentice Hall. London.

Milne, A. e Hails, G. (1974). **Marine paint.** Patent GB1457590. UK Patent Office.

Milne, A. (1977). **Anti-fouling marine compositions.** Patent 4 025 693. United States Patent Office.

Morita, T e Assumpção, R.M.V. (1972). **Manual de soluções, reagentes e solventes.** 2ª edição. Editora. Edgard Blücher Ltda. São Paulo.

Müller, W.E.G.; Batel, R.; Schröder, H.C.; *et al.* (2004a). **Traditional and modern biomedical prospecting: Part-I. The History.** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. Vol. 1 Issue 1. pp 71 – 82.

Müller, W.E.G.; Schröder, H.C.; Wiens, M.; *et al.* (2004b). **Traditional and modern biomedical prospecting: Part-II. The Benefits.** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. Vol. 1 Issue 2. pp 133 – 144

Murphy, R.C.; Fiedler, J. e Hevko, J. (2001). **Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry.** Chemical Reviews. Vol. 101. Nº2. pp 479 – 526.

Muskett, R. e Anderson, A.C. (2004). **Method for production of alkyl esters.** Patent WO 2004/048311. World Intellectual Property Organization. International Bureau. Genebra Suíça.

Myher, J.J. e Kuksis, A. (1995). **General strategies in chromatographic analysis of lipids.** Journal of Chromatography B: Biomedical Applications. Vol. 671. pp 3 – 33.

Nevalainen, T.J.; Quinn, R.J. e Hooper, J.N.A. (2004). **Phospholipase A2 in porifera**. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Vol. 137. pp 413 – 420.

Newby, B.Z. (2002). **Project description: in search of non-toxic antifouling coatings** <http://gozips.uakron.edu/~bimin/projectdescription.pdf>. Acesso em 10 Janeiro 2005.

Nikaido, H. e Vaara, M. (1985). **Molecular basis of bacterial outer membrane permeability**. Microbiological Reviews. Vol. 49. N°1. pp 1 – 31.

NIWA – National Institute of Water & Atmospheric Research (2002). **Protecting our aquatic biodiversity**. <http://www.niwa.co.nz/pubs/mr/archive/ncabb/abb/2002-01/>. Acesso em 14 de janeiro de 2005.

NRC – National Research Council (1996). **Stemming the Tide: controlling introduction of nonindigenous species by ships' ballast water**. Marine Board Commission on Engineering and Technical Systems. National Academic Press. Washington DC.

NRC – National Research Council (2002). **Marine biotechnology in the twenty-first century: problems promise and products**. Committee on Marine Biotechnology. National Academic Press. Washington DC.

Okino, T.; Yoshimura, E.; Hirota, H. e Fusetani, N. (1995). **Antifouling kalihinenes from the marine sponge *Acanthella cavernosa***. Tetrahedron Letters. Vol.36 pp 8637 -8640.

Paris, C.; Loiseau, P.M.; Bories, C. e Bréard, J. (2004). **Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 48 N°3 pp 852 - 859.

Park, J.H.; Ye, M.; Park, K. (2005). **Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs**. Molecules. Vol. 10. pp 146 – 161.

Parrish, C. C.; Abrajano, T.A.; Budge, S.M.; *et.al* (2000). **Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications**. In: The Handbook of Environmental Chemistry. Vol.5 part D. pp 193 -223. Marine Chemistry. P. Wangersky [Editor]. Springer-Verlag Berlin.

Parsek, M.R. e Fuqua, C. (2003). **Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life**. Journal of Bacteriology. Vol.186 N°14. pp 4427 – 4440.

Pennings, S.C.; Pablo, S.R.; Paul, V.J. e Duffy, E. (1994). **Effects of sponge secondary metabolites in different diets on feeding by groups of consumers**. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. Vol 180. pp 137 – 149.

Pereira, R.C.; Carvalho A.G.V.; da Gama, B.A.P. e Coutinho R. (2002). **Field experimental evaluation of secondary metabolites from marine invertebrates as antifoulants**. Brazilian Journal of Biology. Vol. 62. pp 311 – 320.

Pereira, R.C.; da Gama, B.A.P.; Teixeira, V.L.; *et al.* (2003). **Ecological roles of natural products of the brazilian red seaweed *Laurencia obtuse***. Brazilian Journal of Biology. Vol. 63 (4). pp 665 – 672.

Perez-Victoria, J.M.; Perez-Victoria, J.; Parodi-Talice, A.; *et al.* (2001). **Alkyl-Lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-Like transporter modulator**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 45 N°9 pp 2468 - 2474.

Pierucci, A.P.T.R. (2005). **Microencapsulamento de vitaminas antioxidantes para fortificação de um suplemento energético para atletas**. Tese Doutorado. I.Q – UFRJ.

Pinkart, H.C.; Devereux, R. e Chapman, P.J. (1998). **Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns**. Journal of Microbiological Methods. Vol. 34 pp 9 – 15.

Plaa, G.L. (2000). **Chlorinated methanes and liver injury: Highlights of the past 50 years**. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. Vol.40. pp 42 – 65.

Pohle, W.; Gauger, D.R.; Fritzsche, H. *et al.* (2001). **FTIR-spectroscopic characterization of phosphocholine-headgroup model compounds**. Journal of Molecular Structure. Vol. 563. pp 463 – 467.

Polonsky, J.; Tencé, M.; Varenne, P. *et al.* (1980). **Release of 1-O-alkylglyceryl 3-phosphorylcholine, O-deacetyl platelet-activating factor, from leukocytes: Chemical ionization mass spectrometry of phospholipids**. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Vol. 77. N° 12. pp 7019 – 7023.

Prescott, S.M.; Zimmerman, G.A. e McIntyre, T.M. (1990). **Platelet-activating factor**. The Journal of Biological Chemistry. Vol.265. N°29. pp 17381 – 17384.

PROPELLER magazine 1ªed.. Janeiro 2000. International Marine Coatings. www.international-marine.com . Acesso em 10 de janeiro de 2005.

PROPELLER magazine 14ªed. Agosto 2002. International Marine Coatings. www.international-marine.com. Acesso em 10 de janeiro de 2005.

PROPELLER magazine 17ªed. Abril 1998. International Marine Coatings. www.international-marine.com. Acesso em 10 de janeiro de 2005.

PROPELLER magazine 17ªed. Março 2004. International Marine Coatings. www.international-marine.com. Acesso em 10 de janeiro de 2005.

Przestalski, S.; Sarapuk, J.; Kleszczynska, H.; *et al.* (2000). **Influence of amphiphilic compounds on membranes**. Acta Biochimica Polonica. Vol.47 N°3. pp 627 – 638.

Pugh, E.L.; Kates, M. e Hanahan, D.J. (1977). **Characterization of the alkyl ether species of phosphocholine in bovine heart**. Journal of Lipid Research. Vol. 18. pp 710 – 716.

Puglisi, M.P.; Paul, V.J. e Slattery, M. (2000). **Biogeographic comparisons of chemical and structural defenses of the Pacific gorgonians *Annella mollis* and *A. reticulata***. Marine Ecological Progress Series. Vol.207 pp 263 – 272.

Queiroz, S.C.N.; Collins, C.H. e Jardim, I.C.S.F. (2001). **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica**. *Quim. Nova* vol. 24 No. 1: pp 68-76.

Race, T.D. e Kelly, M.A. (1994). **A comparison of metal leachate rate and zebra mussel control efficacy for coatings and materials**. www.sgnis.org/publicat/proceed/1994/319.pdf. Acesso em 10 janeiro 2005.

Robbart, E. (1961). **Ship hull coated with anti-fouling silicone resin and method of coating**. Patent US 2 986 474. Unites State Patent Office.

Ruiz, J.; Antequara, T.; Andres, A.I. *et al.* (2004). **Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipids fractions in muscle foods**. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 520. pp 201 – 205.

Ruiz-Gutiérrez, V. e Pérez-Camino, M.C. (2000). **Update on solid-phase extraction for analysis of lipid classes and related compounds**. *Journal of Chromatography A*. Vol.885. pp 321 – 341.

Russell, A.D. (2003). **Similarities and differences in the response of microorganisms to biocide**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol.52 pp 750 – 763.

Rütters, H.; Sass, H.; Cypinoka, H. e Rullkötter, J. (2002). **Phospholipid analysis as tool to study microbial communities**. *Journal of Microbiological Methods*. Vol.48. pp 149 – 160.

Salazar, M.H. e Salazar, S.M. (1996). **Mussels as bioindicators: effects of TBT on survival bioaccumulation and growth under natural conditions**. In: **Organotin: Environmental Fate and Effects**. Chapter 15 pp. 305-330. M. A. Champ and P. F. Seligman (Editor) Editora Chapman & Hall. Londres.

Savu, S.R.; Silvestro, L.; Sörgel, F.; *et al.* **Determination of 1-O-acyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine, platelet-activating factor and related phospholipids in biological samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. Vol. 682. pp. 35 – 45.

Schneider, P.B. (1966). **Permanent sensitive stain for choline-containing phospholipids on thin-layer chromatograms**. *Journal of Lipid Research*. Vol. 7. pp 169 – 170.

Seifert, K.; Duchêne, M.; Wernsdorfer, W.H.; *et al.* (2001). **Effects of miltofosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 45 N°5 pp 1505 - 1510.

Shaikh, N. (1994). **Assessment of various techniques for the quantitative extraction of lysophospholipids from myocardial tissues.** Analytical Biochemistry. Vol. 216. pp 313 – 321.

Shin, B.A.; Kim, Y.R.; Lee, I.; *et al.* (1999). **Lyso-PAF analogues and lysophosphatidylcholines from the marine sponge *Spirastrella abata* as inhibitors of cholesterol biosynthesis.** Journal of Natural Products. Vol. 62. pp 1554 – 1557.

Siess, W.; Zangl, K.J.; Essler, M. *et al.* (1999). **Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of Platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Vol. 96. pp 6931 – 6936.

Stafforini, D.M.; McIntyre, T.M.; Zimmerman, G.A. e Prescott, S.M. (1997). **Platelet-activating factor acetylhydrolases.** The Journal of Biological Chemistry. Vol.242. Nº29. pp 17895 – 17898.

Stanacev, N.Z. e Baer, E. (1963). **Diether analogues of lecithins.** Journal of Biological Chemistry. Vol. 239. pp 410 – 413.

Stewart, P.S. (1996). **Theoretical aspect of antibiotic diffusion into microbial biofilms. Antimicrobial agents and Chemotherapy.** Vol. 40. Nº11 pp 2517 – 2522.

Stewart, P.S.; Grab, L. e Diemer, J.A. (1998). **Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system.** Journal of Applied Microbiology. Vol. 85. pp 495 – 500.

Stewart, P.S. (2003). **Diffusion in biofilms.** Journal of Bacteriology. Vol. 185. Nº5 pp 1485 – 1491.

Stoodley, L.H.; Costerton, J.W. e Stoodley, P. (2004). **Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.** Nature Reviews. Vol.2 pp 95 – 108.

Stremler, K.E.; Stafforini, D.M.; Prescott, S.M. *et al.* (1989). **An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 264. Nº10. pp 5331 – 5334.

Strickland, J.D.H e Parsons, T.R. (1972). **A practical handbook of seawater analysis.** 2ª edição. Ottawa, Canadá.

Stupak, M.E.; García, M.T. e Pérez, M.C. (2003). **Non-toxic alternative compound for marine antifouling paints.** International Biodeterioration & Biodegradation. Vol.52 issue 1. pp 4

Subbanagounder, G.; Watson, A.D. e Berliner, J.A. (2000). **Bioactive products of phospholipids oxidation: isolation, identification, measurement and activities.** Free Radical Biology & Medicine. Vol. 28. Nº12. pp 1751 – 1761.

Sugiura, T.; Ojima, T.; Fukuda, T. *et al.* (1991). **Production of platelet-activating factor in slugs.** Journal of Lipid Research. Vol. 32. pp 1795 – 1803.

Sugiura, T.; Yamashita, A.; Kudo, N.; *et al.* (1995). **Platelet-activating factor and its structural analogues in the earthworm *Eisenia foetida*.** Biochimica et Biophysica Acta (Lipids and Lipids Metabolism). Vol. 1258. pp 19 – 26.

Susic, M. (2004). **Novel quaternary ammonium compounds.** Patent WO 2004/029017A1. World Intellectual Property Organization. International Bureau. Genebra Suíça.

Sutherland, I.W. (2001). **Biofilm exopolysaccharides: a strong and stick framework.** Microbiology. Vol. 147 pp 3 – 9.

Suzumura, M. (2005). **Phospholipids in marine environments: a review.** Talanta. The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry. Vol.66. pp 422 – 434.

Teixeira, V.L. (2002). **Produtos naturais marinhos** In: *Biologia Marinha*. Capítulo 12. R.C. Pereira [editor] Editora Interciência Rio de Janeiro.

Thompson, G.A. e Hanahan, D.J. (1963). **Identification of α -glyceryl ether phospholipids as major lipid constituents in two species of terrestrial slug.** The Journal of Biological Chemistry. Vol.238. Nº 8. pp 2628 – 2631.

Tokumura, A. (1995). **A family of phospholipids autacoids: occurrence, metabolism and bioactions.** Progress in Lipid Research. Vol. 34. Nº2. pp 151 – 184.

Tokumura, A.; Takauchi, K.; Asai, T. *et al.* (1989). **Novel molecular analogues of phosphatidylcholines in a lipid extract from bovine brain: 1-long-chain acyl-2-short-chain acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholines.** Journal of Lipid Research. Vol.30 pp 219 – 224.

Touchstone, J.C. (1995). **Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation.** Journal of Chromatography B: Biomedical Applications. Vol. 671. pp 169 – 195.

Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H. e Fusetani, N. (1996). **Ceratinamides A and B: New antifouling dibromotyrosine derivatives from marine sponge *Pseudoceratina purpurea*.** Tetrahedron. Vol52. Issue 24. pp 8181-8186.

U.S Environmental Protection Agency (2003). **Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin (TBT) Final.** Washington D.C

van der Luit, A. H.; Budde, M.; Ruurs, P.; *et al.* (2002). **Alkyl-lysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 277. Nº42. pp 39541 – 39547.

Venable, M.E.; Zimmerman, G.A.; McIntyre, T.M. e Prescott S.M. (1993). **Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions.** Journal of Lipid Research. Vol.34 pp 691 – 702.

Verma, N.K. e Dey, C.S. (2004). **Possible mechanism of miltofosine-mediated death of *Leishmania donovani***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 48 N°8. pp 3010 - 3015.

Villé, H.; Maes, G.; De Schrijver, R.; *et al.* (1995). **Determination of phospholipids content of intramuscular fat by Fourier transform infrared spectroscopy**. Meat Science. Vol. 41 N°3. pp 283 – 291.

Wang, Y.; Krull, I. S.; Liu, C. e Orr, J.D. (2003). **Derivatization of Phospholipids**. Journal of Chromatography B vol 793: pp 3-14.

Watermann, B. (1997). **Alternative antifouling techniques: present and future**. German Journal Hydrograph. Vol. 7 pp 99 – 108.

Wissner, A.; Sum, P.E.; Schaub, R.E.; *et al.* (1984). **Analogues of platelet activating factor (PAF). 1. Some modifications of the alkoxy chain**. Journal of Medicinal Chemistry. Vol.27. pp 1174 – 1181.

Wissner, A.; Sum, P.E.; Schaub, R.E.; *et al.* (1984). **Analogues of platelet activating factor (PAF). 4. Some modifications of the phosphocholine moiety**. Journal of Medicinal Chemistry. Vol.29. pp 328 – 333.

White, T.; Bursten. S.; Federighi. D. *et al.* (1998). **High-resolution separation and quantification of neutral lipid and phospholipids species in mammalian cells and sera by multi-one-dimensional thin-layer chromatography**. Analytical Biochemistry. Vol. 258. pp 109 – 117.

World Health Organization. (1990). **Tributyltin Compounds. Environmental Health Criteria**. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc116.htm>. Acesso em 10 de janeiro de 2005.

Xiang, M.; Li, X.; Ober, C.K.; *et al.* (2000). **Surface stability in liquid-crystalline block copolymers with semifluorinated monodendron side groups**. Macromolecules. Vol.33. pp 6106 – 6119.

Yan, H.Y. (2004). **Harvesting Drugs From The Seas and How Taiwan Could Contribute to This Effort**. Changhua Journal of Medicine Vol 9 N°1 pp 1 – 6.

Yebra, D.M.; Kiil, S. e Dam-Johansen, K. (2004). **Antifouling technology – past present and future steps towards efficient and environmental friendly antifouling coating**. Progress in Organic Coatings. Vol.50 pp 75-104.

Youngblood, J.P.; Andruzzi, L.; Ober, C.K.; *et al.* (2003). **Coatings Based on Side-chain Ether-linked Poly(ethyleneglycol) and Fluorocarbon Polymers for the Control of Marine Biofouling**. Biofouling. Vol 19 pp 91–98

Yu, C e Irudayaraj, J. (2005). **Spectroscopic characterization of microorganisms by fourier transform infrared microspectroscopy.** Biopolymers. Vol. 77. pp 368 – 377.

Yulu, W.; Pfeffer, R. e Dave, R. (2004). **Polymer coating encapsulation of nanoparticles using a supercritical antisolvent process.** Patent WO 2004/091571 A2. World Intellectual Property Organization. International Bureau. Genebra Suíça

Zar, J.H. (1996). **Biostatistical Analysis.** 3ª edição. New Jersey – USA.

Zhou, X.; Lu, X.; Richard, C.; *et al.* (1996). **1-O-Octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured mcf-7 cells.** Journal of Clinical Investigation. Vol. 98 N° 4. pp 937 – 944.