



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Carolina Gonçalves de Amorim

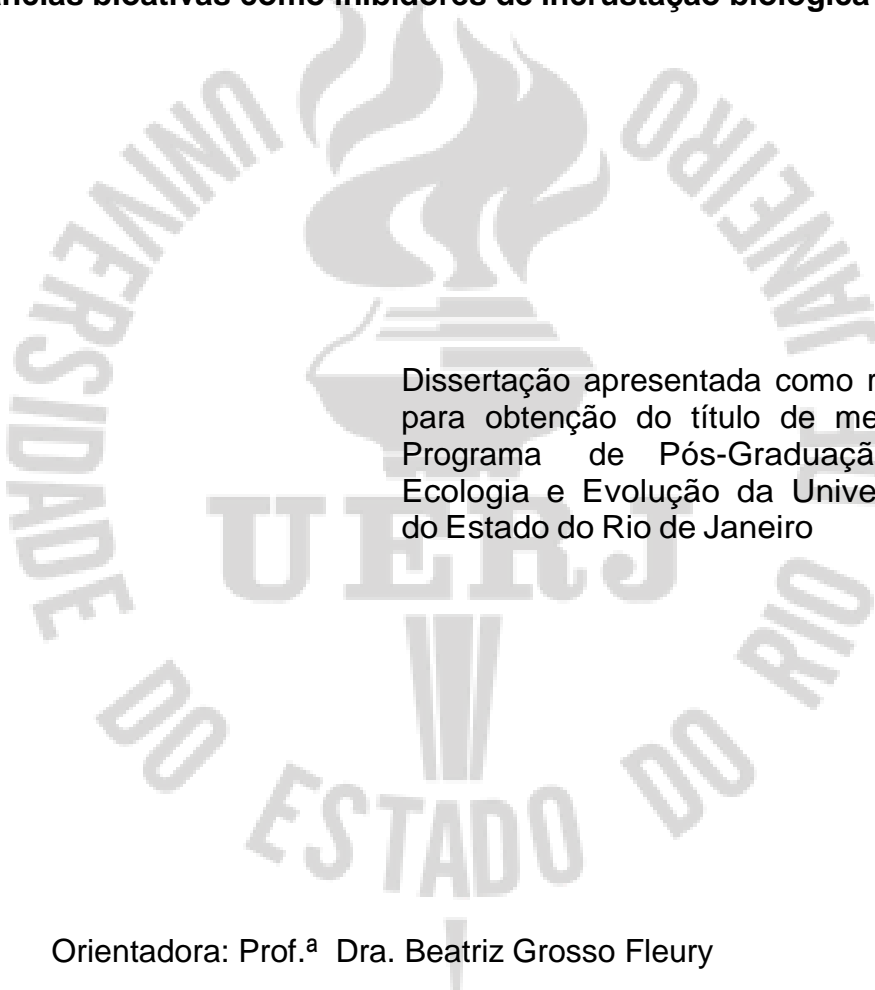
**Substâncias bioativas como inibidores de incrustação  
biológica**

Rio de Janeiro

2022

Carolina Gonçalves de Amorim

**Substâncias bioativas como inibidores de incrustação biológica**



Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz Grosso Fleury

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CTC/A

A524 Amorim, Carolina Gonçalves de.  
Substâncias bioativas como inibidores de incrustação biológica/  
Carolina Gonçalves de Amorim. – 2022.  
64 f.: il.

Orientadora: Beatriz Grosso Fleury  
Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara  
Gomes.

1. Ecologia marinha - Teses. 2. Incrustações marinhas - Organismos  
- Ilha Grande, Baía da (RJ) - Teses. I. Fleury, Beatriz Grosso. II.  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto  
Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 574.5

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

## ERRATA

AMORIM, C.G. Substâncias bioativas como inibidores de incrustação biológica. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Folha	Onde se lê	Leia-se
34 até 44	Alga turfo	Hidrozoário

Carolina Gonçalves de Amorim

**Substâncias bioativas como inibidores de incrustação biológica**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de agosto de 2022

Orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz Grosso Fleury  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Lobo Hajdu  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda Araujo Casares  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Joel Campos de Paula  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Rio de Janeiro

2022

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha mãe, Marta, a mulher mais forte e determinada que eu conheço, mesmo passando por um câncer durante boa parte desse trabalho, nunca deixou de me incentivar e me dar suporte emocional pra continuar, fonte de inspiração diária, a maior incentivadora de toda minha vida acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças todos os dias, ser fonte de paz e esperança na minha vida.

À minha mãe, Marta, que é minha fonte de força para seguir em frente, por ter me incentivado tanto a estudar mesmo quando não tinha entusiasmo, que me ensina tanto todos os dias, a ser uma pessoa boa e caridosa.

Ao meu pai Erivando, pelo silêncio em casa quando precisava estudar e escrever essa dissertação, por ser meu entretenimento diário de piadas sem graça e mesmo assim me fazendo rir.

Agradeço a minha família, tios (as) e primos (as), por estarem comigo em todas as fases da minha vida, por compartilharem momentos de alegria em encontros de família, em especial meu Tio Valderi que sempre morou próximo a mim e pôde acompanhar minha trajetória de perto.

À melhor amiga que a UERJ me deu, Erika Rodrigues, dona da melhor risada, fonte de alegria, minha afilhada de casamento. Obrigada por me permitir fazer parte da sua vida, me levando nas festas da sua família e compartilhando todos os desesperos acadêmicos.

À minha amiga Gisele Lyra, que compartilhou todos os sofrimentos de um mestrado online na pandemia, mesmo não sendo da mesma pós-graduação fez muita diferença poder dividir esse momento com você.

Às minhas amigas Daiana Soares e Kênya Calado, por serem minha rede de apoio, por tantos momentos de pandemia compartilhados, tantas angústias e por sempre torcerem por mim.

Aos amigos que o Crossfit me deu, é maravilhoso compartilhar manhãs de exercício com pessoas tão especiais.

Agradeço a todos os meus amigos, por me proporcionarem tanta alegria, por estarem sempre disponíveis para me ouvir e sair, por toparem todas as minhas loucuras, por terem entendido a ausência em tantos momentos nesses últimos dois anos.

À todos os amigos que conquistei na Biologia UERJ, vocês foram essenciais para chegar até aqui. Obrigada pelos momentos de trote, cerveja no Loreninha, social na catacumba, noites sem dormir para estudar e fazer trabalho, pelos trabalhos de campo.

À todos os professores do PPGEE, essenciais para a minha formação profissional.

À minha orientadora Profa. Beatriz Fleury, pela oportunidade de trabalhar no LEMARqui, por todo o incentivo a não desistir desse trabalho.

À Yollanda Vançato, por ter me acolhido desde o dia que iniciei no laboratório, por ter tanta paciência em tirar todas as minhas dúvidas, ter me ensinado técnicas de laboratório, por ter me ajudado a desenvolver esse trabalho, por todas as trocas profissionais e pessoais que compartilhamos sobre nosso destino acadêmico.

As minhas amigas que fiz no LEMARqui, Ana Lea Lopes e Izabele Blanc, mesmo não estando mais no laboratório, continuam me apoiando em tudo que eu faço, duas grandes amigas que me ajudaram muito com palavras de conforto.

Aos alunos de iniciação científica do LEMARqui, Maria Eduarda Martins, Gabriela Lira, Isadora Assis, Lais Lima, Fernanda Dias, Sidnei Honorio, Felipe Gouvêa, Nayara Lima e Leticia Ferreira que me ajudaram muito na execução desse trabalho.

À todos os membros da banca, Dra. Gisele Hajdu, Dra. Fernanda Casares, Dr. Joel Campos, Dr. Humberto Fortunato e Dr. Cesar Amaral, pela disponibilidade em comporem a banca examinadora.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À FAPERJ/Pensa Rio pelo auxílio financeiro coordenado pelo Prof. Joel Creed(DECOL/UERJ).

Ao DEPEQS/UERJ pela bolsa Prociência para Profa. Beatriz Fleury. À UERJ, Instituição que me fez crescer muito como pessoa.

A todos os profissionais que fizeram a minha coleta dar certo, Caio barqueiro, Meire do aluguel de cilindros e Carolina Côrrea da Elite Diver Center, Yollanda e Sidnei.



## RESUMO

AMORIM, C.G. **Substâncias bioativas como inibidores de incrustação biológica**. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Bioincrustação é o acúmulo indesejado de organismos em superfícies artificiais submersas. A bioincrustação causa grande perda econômica, pois aumenta o peso das embarcações, dificultando a locomoção, causa corrosão das superfícies e também é um problema ambiental, por ser um meio de introdução de espécies invasoras. Produtos naturais de alguns organismos marinhos têm se mostrado promissores como agentes anti-incrustantes. Neste trabalho foi avaliada a eficiência anti-incrustante de duas esponjas marinhas, *Desmapsamma anchorata* e *Iotrochota arenosa* (Demospongiae). Amostras desses organismos, coletados na Baía da Ilha Grande, foram submetidas à extração química com diferentes solventes orgânicos. Também foi testado o muco produzido pelas esponjas. As concentrações naturais e dobradas dos extratos brutos e dos mucos das esponjas foram avaliadas em bioensaios de laboratório utilizando os mexilhões *Perna perna*. Após 14 horas aproximadamente de exposição aos tratamentos foi contabilizada a quantidade de biscoitos fixados tanto nos tratamentos, quanto nas placas ou conchas de mexilhões. A quantidade de biscoitos totais fixados nos diferentes tratamentos foram submetidos à análise ANOVA (One Way). Os tratamentos que mostraram ser mais promissores em laboratório foram também avaliados em bioensaio de campo, no píer do Clube Guanabara, na Baía de Guanabara (BG), RJ. Os extratos de *D. anchorata* inibiram a fixação dos biscoitos, diferente da esponja *I. arenosa*, que não obteve resultado significativo. No campo, os diferentes extratos de *D. anchorata* foram colocadas em placas de Petri, e imersas na água da BG, e usado uma metodologia de pontos de interseção para o cálculo da porcentagem de cobertura. Esses bioensaios ocorreram no verão e no outono, os extratos da esponja *D. anchorata* mostraram resultado significativo na análise de PERMANOVA apenas na estação verão. Durante o bioensaio de campo foram encontrados sete grupos diferentes de organismos marinhos, biofilme, alga turfo, *Bugula neritina*, *Bugulina turbinata*, *Amphibalanus amphitrite* e organismos das famílias Serpulidae e Spionidae. As comunidades incrustantes do outono apresentaram maior riqueza, e índices de diversidade e equitabilidade.

**Palavras chave:** Bioincrustação. Esponja marinha. Extração química. Análise de comunidade. Ecologia aplicada.

## ABSTRACT

AMORIM, C.G. **Bioactive substances as biofouling inhibitors**. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Biofouling is the unwanted accumulation of organisms on submerged artificial surfaces. Biofouling causes great economic loss, as it increases the weight of vessels, making locomotion difficult, causes surface corrosion and is also an environmental problem, as it is a means of introducing invasive species. Natural products from some marine organisms have shown promise as antifouling agents. In this work, the antifouling efficiency of two marine sponges, *Desmapsamma anchorata* and *Iotrochota arenosa* (Demospongiae) was evaluated. Samples of these organisms, collected in Ilha Grande Bay, were subjected to chemical extraction with different organic solvents. The mucus produced by the sponges was also tested. The natural and doubled concentrations of raw extracts and mucus from sponges were evaluated in laboratory bioassays using *Perna perna* mussels. After approximately 14 hours of exposure to the treatments, the amount of byssal threads fixed both in the treatments and in the plates or mussel shells was counted. The amount of total byssal threads fixed in the different treatments were submitted to ANOVA (One Way) analysis. The treatments that showed to be most promising in the laboratory were also evaluated in a field bioassay, at the Clube Guanabara pier, in Guanabara Bay (BG), RJ. The extracts of *D. anchorata* inhibited the fixation of the byssal threads, unlike the sponge *I.arenosa*, which did not obtain a significant result. In the field, the different extracts of *D. anchorata* were placed in Petri dishes, and immersed in the BG water, an intersection point methodology was used to calculate the percentage of coverage. These bioassays occurred in summer and autumn, extracts from the sponge *D. anchorata* showed significant results in the analysis of PERMANOVA only in the summer season. During the field bioassay, seven different groups of marine organisms were found, biofilm, algae turf, *Bugula neritina*, *Bugulina turbinata*, *Amphibalanus amphitrite* and organisms from the Serpulidae and Spionidae families. The autumn fouling communities showed greater richness, diversity and evenness indices.

**Keywords:** Biofouling. Marine sponge. Chemical extraction. Community analysis. Applied ecology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas da bioincrustação.....	15
Figura 2 -	Estruturas prejudicadas pela bioincrustação.....	16
Figura 3 -	Ácidos graxos isolados de <i>Laurencia</i> sp.....	19
Figura 4 -	Diterpenos isolados de <i>Dichotella gemmacea</i> .....	19
Figura 5 -	Esponjas marinhas <i>Iotrochota arenosa</i> e <i>Desmapsamma anchorata</i> .....	20
Figura 6 -	Processo de extração química.....	24
Figura 7 -	Bioensaio com mexilhão <i>Perna perna</i> .....	26
Figura 8 -	Placas preparadas com os tratamentos.....	27
Figura 9 -	Esquema das placas de acrílico no píer.....	28
Figura 10 -	Metodologia de Pontos de Meese e Tomich, 1992.....	29
Figura 11 -	Quantidade de bissos fixados nos tratamentos de <i>D.anchorata</i> e desvios padrão ( $\pm$ ).....	32
Figura 12 -	Quantidade de bissos fixados nos tratamentos de <i>I.arenosa</i> e desvios padrão ( $\pm$ ).....	33
Figura 13 -	Organismos encontrados no bioensaio de campo na Baía de Guanabara.....	35
Figura 14 -	Média da porcentagem de cobertura dos grupos mais abundante encontrados no verão com erros padrão ( $\pm$ ).....	36
Figura 15 -	Escalonamento Multidimensional das comunidades incrustantes durante o período de verão.....	38
Figura 16 -	Média da porcentagem de cobertura dos grupos mais encontrados no bioensaio do outono e erros padrão ( $\pm$ ).....	39
Figura 17 -	Escalonamento Multidimensional das comunidades incrustantes durante o período de outono.....	41
Figura 18 -	Média da porcentagem de cobertura de Biofilme verão x outono.....	43
Figura 19 -	Média da porcentagem de cobertura alga turfo verão x outono.....	44
Figura 20 -	Porcentagem média de cobertura de Serpulidae verão x outono.....	45
Figura 21 -	Média da porcentagem de cobertura de <i>Amphibalanus amphitrite</i>	

	verão x outono.....	46
Figura 22 -	Média do peso seco comparando verão x outono (gramas) com erros padrão ( $\pm$ ).....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mortalidade dos mexilhões <i>P. perna</i> expostos aos extratos e mucos de <i>D. anchorata</i> .....	32
Tabela 2 - Mortalidade dos mexilhões <i>P. perna</i> expostos aos extratos e mucos da esponja <i>I.arenosa</i> .....	34
Tabela 3 - Valor de p na comparação do peso da biomassa entre verão (n=10) e outono (n=7).....	47
Tabela 4 - Dados de riqueza, índice de diversidade de Shannon(H') e Índice de Pielou's (J') da última semana de imersão (verão- 3ª semana) e outono (4ª semana).....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: acetato de etila

BIG: Baía da Ilha Grande

CN: controle negativo

CP: controle positivo

DCM: diclorometano

EB: extrato bruto

Hex: hexano

IMO: Organização Marítima Internacional

MDS: escalonamento multidimensional

MeOH: metanol

TBT: tributilestanho

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>BIOINCRUSTAÇÃO MARINHA</b> .....	14
1.1	<b>O problema da bioincrustação</b> .....	15
1.2	<b>Prevenção da bioincrustação marinha</b> .....	17
1.3	<b>Bioativos marinhos como anti-incrustantes</b> .....	18
2	<b>OBJETIVO</b> .....	21
2.1	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	21
3	<b>HIPÓTESE</b> .....	22
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
4.1	<b>Coleta de espécimes</b> .....	23
4.2	<b>Extração orgânica</b> .....	23
4.3	<b>Bioensaio de bioincrustação com mexilhão <i>Perna perna</i></b> .....	24
4.4	<b>Bioensaio de campo na Baía de Guanabara- RJ</b> .....	27
4.5	<b>Peso seco da comunidade incrustante</b> .....	29
5	<b>RESULTADOS</b> .....	31
5.1	<b>Bioensaio de laboratório com mexilhão <i>Perna perna</i></b> .....	31
5.1.1	<u>Esponja <i>Desmapsamma anchorata</i></u> .....	31
5.1.2	<u>Esponja <i>Iotrochota arenosa</i></u> .....	33
5.2	<b>Bioensaio de campo</b> .....	34
5.2.1	<u>Bioensaio verão</u> .....	34
5.2.2	<u>Bioensaio outono</u> .....	39
5.2.3	<u>Comparação Verão x Outono dos bioensaios de incrustação</u> .....	42
5.2.4	<u>Biomassa</u> .....	47
5.2.5	<u>Riqueza, Índice de Shannon e Pielou comparando verão x outono</u> .....	48
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	53
	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	54
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
	<b>ANEXO A - Média das porcentagens de cobertura do verão e erros padrão(±)</b> .....	61

<b>ANEXO B</b> - Porcentagem de cobertura e erro padrão ( $\pm$ ) do outono .....	62
<b>ANEXO C</b> - Valor de p das PERMANOVAS AOS PARES verão e outono	63
<b>ANEXO D</b> - Teste T para comparar tratamentos do verão x outono.....	64



## INTRODUÇÃO

### 1 BIOINCRUSTAÇÃO MARINHA

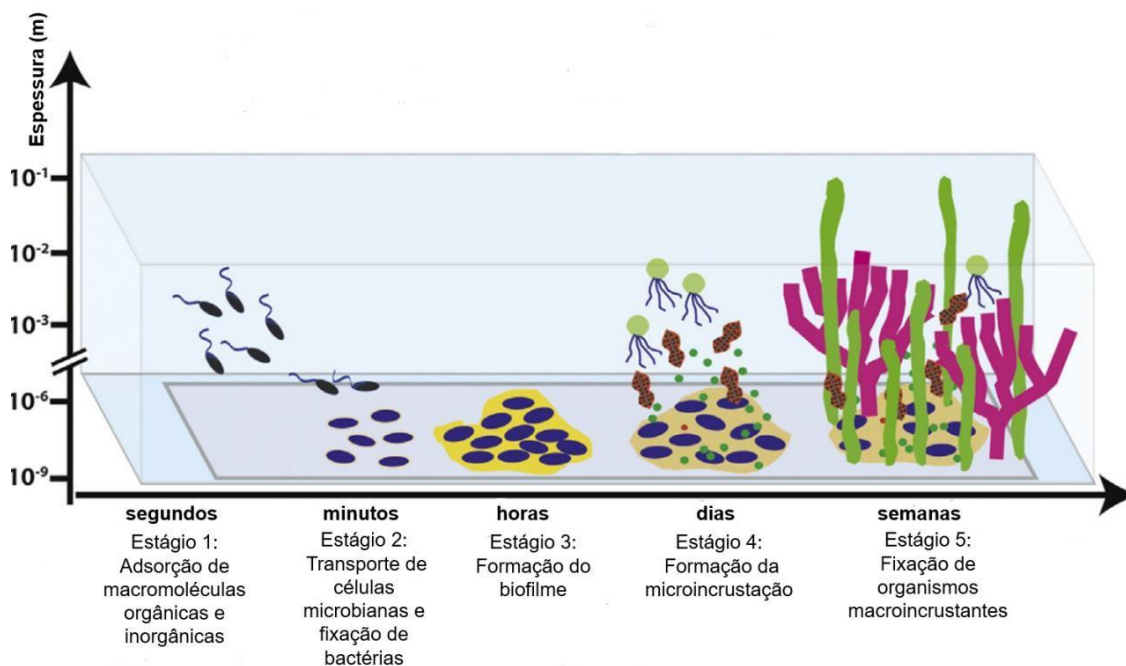
Bioincrustação ou incrustação biológica é a acumulação indesejada de microrganismos, algas e animais em superfícies artificiais submersas (Yebra et al., 2004). São consideradas superfícies artificiais aquelas construídas pelo homem, como plataformas de petróleo e gás, barcos, cais, dutos de óleo e gás, navios de perfuração, monobóias e boias de apoio (Wahl, 1989; Creed et al., 2016). Por outro lado, comunidade incrustante é o termo que se refere ao crescimento de organismos em superfícies naturais, por exemplo, em costões rochosos ou até mesmo sobre outros organismos vivos (epibiose).

A epibiose é uma interação entre um organismo hospedeiro (basibionte) e um organismo incrustante (epibionte) que cresce sobre ele (Wahl, 2008). Organismos marinhos bentônicos sésseis sofrem constantemente a epibiose, o que pode ser prejudicial à maioria das espécies (Ribeiro et al., 2013). Os organismos utilizam outros organismos vivos para se fixarem, afetando a reprodução e o crescimento do organismo que serve de substrato (Jackson & Buss, 1975; Orth & Van Montfrans, 1984). As consequências ecológicas para o organismo hospedeiro e o organismo colonizador podem ser positivas e negativas. Com isso, essa interação promove diversas estratégias de defesas químicas e físicas para o basibionte se proteger dos epibiontes (Harder, 2008).

O processo da bioincrustação clássico ocorre em cinco etapas (Figura 1). Tem início na adsorção de moléculas orgânicas e inorgânicas. No segundo estágio ocorre o transporte de células microbianas para a superfície e fixação das bactérias. No terceiro estágio, há a consolidação das bactérias, através da produção de polímeros formando um biofilme. A quarta etapa é a consolidação da micro-incrustação que consiste na chegada de fungos, microalgas, diatomáceas, entre outros. Na última etapa ocorre a macro-incrustação, com a fixação de invertebrados como cracas, mexilhões e macroalgas (Wahl, 1989; Lehaitre & Compère, 2008; Mohammed, 2015).

**Figura 1 - Etapas da bioincrustação.**

Fonte: Adaptado de Mohammed, 2015.



### 1.1 O problema da bioincrustação

A bioincrustação é prejudicial e têm sido uma grande preocupação na indústria naval (Figura 2), levando a uma grande perda econômica há várias décadas. É considerado um problema para o transporte marítimo, aquacultura e estações de tratamento de águas. Pode causar perda de velocidade dos navios, aumentar o consumo de combustível levando a uma grande emissão de CO<sub>2</sub>, aumentar o peso de estruturas submersas diminuindo a flutuabilidade e facilitar a corrosão de qualquer estrutura que sofrer incrustação (Yebra et al., 2004; Schultz et al., 2011; Abioye et al., 2019).

**Figura 2** – Estruturas prejudicadas pela bioincrustação.



Legenda: A – Dutos de óleo com bioincrustação; B e C – Cascos de embarcações incrustadas. Fonte: Yebra et al., 2004; Google (acesso em julho/2022).

Outro problema relacionado à bioincrustação é a disseminação de espécies invasoras para outros ambientes naturais. Organismos marinhos incrustantes podem se fixar em cascos de navios, plataformas de óleo e gás e outras estruturas móveis, como monobóias e serem transportados para outros ambientes, invadindo e competindo com espécies nativas (Ruiz & Carlton, 2003). Uma boa parte de espécies invasoras já estiveram associadas às estruturas artificiais por algum tempo ao longo de sua vida, essas estruturas servem como trampolins ou corredores para alcançarem outros locais (Mineur et al., 2012). Um exemplo são os corais invasores *Tubastraea coccinea* Lesson, 1830 e *Tubastraea tagusensis* Wells, 1982, conhecidos como coral sol, que chegaram ao Brasil na década de 1980, incrustados em plataformas de

petróleo/gás (Castro & Pires, 2001; Paula & Creed, 2004), e atualmente competem por espaço com as espécies nativas, como o coral *Mussismilia hispida* (Verrill, 1901) (coral cérebro) (Creed, 2006), e estão em plena expansão ao longo da costa (Silva et al., 2014).

Assim, os estudos para prevenir a bioincrustação são altamente necessários, tanto para evitar problemas econômicos como a perda de velocidade dos navios, o aumento do consumo de combustível, que leva a uma grande emissão de CO<sub>2</sub>, quanto para a conservação do meio ambiente, evitando a bioinvasão de organismos incrustantes (Wang & Cao, 2016).

## 1.2 Prevenção da bioincrustação marinha

Relatos da utilização de revestimentos para evitar a incrustação iniciaram por volta do século V a.C., quando eram utilizados os revestimentos feitos de uma mistura de arsênio, enxofre e óleo para evitar a incrustação. Porém, só a partir do século VII a.C. foram apresentados os primeiros relatórios sobre tentativas de proteger estruturas da incrustação, utilizando madeira revestida de chumbo, no entanto, a utilização de chumbo aumentava a ferrugem e foi proibido posteriormente (Kiil et al., 2007). Em 1860, o cobre começou a ser utilizado, associado à resina, na forma de plástico quente. Além da tinta composta de cobre, era necessário o uso de uma camada de produtos anticorrosivos. Contudo, o cobre não é tão eficiente, por ser caro e não ter uma boa durabilidade (Selim et al., 2017).

Na década de 1960, a indústria naval começou a utilizar tintas com organoestanhos. Essas tintas liberavam a substância tributilestanho (TBT), um biocida muito eficaz para a anti-incrustação (IMO, 2002). Porém, o TBT, apresenta uma taxa de degradação muito lenta no ambiente, tornando biodisponível para espécies não-alvo. Um dos efeitos causados pelo TBT é um dano no sistema endócrino, levando a um quadro de distúrbios sexuais como o *impossex*, que são fêmeas apresentando características masculinas em alguns gastrópodes (Oehlmann et al., 1998; Sjollema et al., 2014). A Organização Marítima Internacional (IMO) apresentou dados mostrando a acumulação de TBT em organismos marinhos, como mamíferose

peixes (Iwata et al., 1995; Kannan & Falandysz, 1997). Levando em consideração que a vida aquática nos fornece mais de 70% de oxigênio, a IMO banuiu globalmente o uso do TBT desde 2008 (IMO, 2002; Wang & Cao, 2016).

Tintas com baixa tensão superficial, compostas de silicone ou flúor, também são utilizadas como anti-incrustantes. Apesar de serem bons inibidores, terem boa durabilidade e resistirem à água, revestimentos a base de silicone não possuem boa aderência ao substrato, enquanto que as resinas de fluorcarbono possuem baixa solubilidade em solventes comuns (Coneski et al., 2013; Lin et al., 2014; Azemar et al., 2015).

Atualmente, pesquisadores tentam encontrar formas ambientalmente amigáveis para impedir a incrustação biológica, como mimetizar a superfície de outros organismos vivos, como a pele de tubarão (Damodaran & Murthy, 2016) e utilizando bioativos de organismos marinhos (Qi & Ma, 2017; Da Gama et al., 2008).

### 1.3 Bioativos marinhos como anti-incrustantes

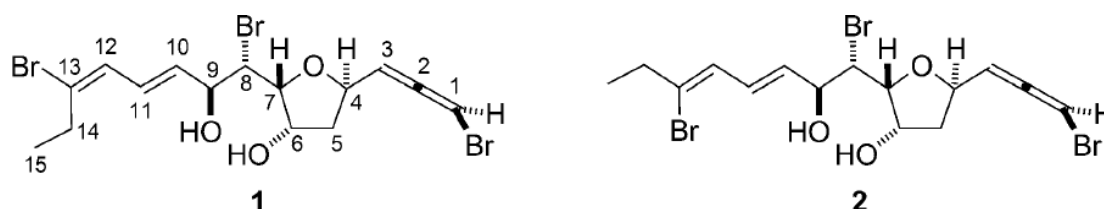
Organismos marinhos bentônicos como poríferos, cnidários, macroalgas e microrganismos (bactérias e fungos marinhos) produzem substâncias químicas (metabólitos secundários) capazes de impedir a epibiose (Da Gama et al., 2009).

A produção de metabólitos secundários contendo propriedades inibidoras de incrustação é uma importante vantagem ecológica para organismos sésseis (Da Gama et al., 2009). Os produtos naturais marinhos são muito promissores para o desenvolvimento de tintas anti-incrustantes ambientalmente amigáveis, por serem de origem natural, biodegradáveis e não tóxicos aos organismos marinhos não-alvos (Bhadury & Wright, 2004; Omae, 2006).

Substâncias de origem marinha, pertencentes às classes dos terpenos, esteróis, alcaloides, ácidos graxos e policetídeos, já foram identificadas com ação anti-incrustantes (Da Gama et al., 2008; Hellio et al., 2009; Fusetani, 2011; Qian et al., 2015). Novos ácidos graxos, chamados de omaenzalenos, isolados da alga vermelha *Laurencia* sp., mostraram atividade anti-incrustante para larvas de craca da espécie *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1984) (Umezawa et al., 2014) (Figura 3). Outro

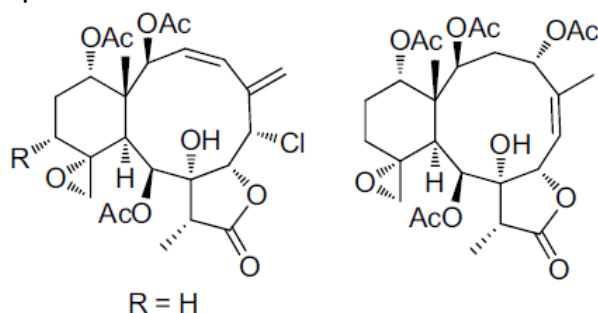
exemplo são os diterpenos isolados da gorgônia *Dichotella gemmacea* (Sun et al., 2013) (Figura 4).

**Figura 3-** Ácidos graxos anti-incrustantes isolados de *Laurencia* sp.



Fonte: Umezawa et al., 2014.

**Figura 4-** Diterpenos anti-incrustantes isolados de *Dichotella gemmacea*.



Fonte: Sun et al., 2013.

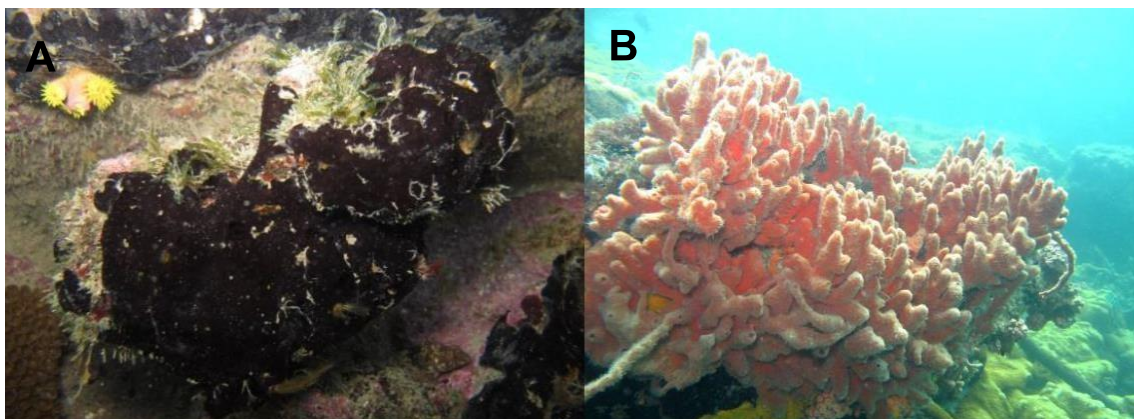
Segundo Ribeiro e colaboradores (2013), algumas esponjas da Classe Demospongiae possuem atividade anti-incrustante. A *Iotrochota arenosa* Rützler, Maldonado, Piantoni & Riesgo, 2007 (Figura 5A) é encontrada no Caribe (Rützler et al., 2007) e no Brasil, nos estados da Bahia e Rio de Janeiro (Castello-Branco e Menegola, 2014), ela é uma espécie com forma de crescimento incrustante e produz um muco escuro. Além disso, essa espécie de esponja possui propriedades antibacterianas (Quintana et al., 2015).

A *Desmapsamma anchorata* (Carter, 1882) (Figura 5B) é encontrada no Atlântico Noroeste, no Golfo do México, no Caribe e no Brasil, sendo que a sua distribuição no Brasil, ocorre desde o Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro (Hajdu et al., 2011). Essa espécie tem aspecto que varia de incrustante à ramosa, semelhante a dedos e possui alta taxa de crescimento (Hajdu et al., 2011; Ferreira,



2016), e também possui atividade anti- incrustante contra bisco de mexilhão (Ribeiro et al., 2013), contra o assentamento larval da craca *Amphibalanus amphitrite* (Willemsen 1994), além de possuir atividade alelopática (McLean 2006).

**Figura 5-** Esponjas marinhas *Iotrochota arenosa* e *Desmapsamma anchorata*



Legenda: A: *Iotrochota arenosa*, B: *Desmapsamma anchorata*. Fonte: Juliana Magalhães e Amanda Silva.

Existe uma pressão para a indústria marítima investir em pesquisas de agentes que inibam a incrustação (Qian et al., 2015). Por isso, os estudos sobre possíveis organismos que produzem substâncias naturais com potencial anti-incrustante são necessários para acelerar a substituição de tintas que agridem o meio ambiente. Desta forma, no presente estudo damos continuidade a busca de substâncias naturais de esponjas marinhas com potencial anti-incrustante, que está de acordo com o Objetivo do Desenvolvimento Sustentável (ODS) 14, chamado de “vida na água” estabelecido pela Organização das Nações Unidas.

Este estudo avaliou o potencial anti-incrustante de duas espécies da classe Demospongiae, *Iotrochota arenosa* (ordem Poecilosclerida, família Iotrochotidae) e *Desmapsamma anchorata* (ordem Poecilosclerida, família Desmacididae), que além de serem produtoras de metabólitos secundários, elas também são eficientes na estratégia de crescimento excessivo, sobre as espécies invasoras de coral-sol na Baía da Ilha Grande, BIG (Silva et al., 2017; Rodrigues 2019; Amaral 2019; Guilherme da Silva et al., 2022).

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de extratos naturais e mucos de esponjas marinhas (Demospongiae) da Baía de Ilha Grande, RJ, como anti-incrustantes, através de estudos de defesas químicas em bioensaios em laboratório e em bioensaios de campo.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar através de bioensaios de laboratório, a eficiência de extratos brutos e dos mucos, na concentração natural e o dobro da concentração natural, das esponjas marinhas *Desmapsamma anchorata* e *Iotrochota arenosa* contra a fixação de biscoos do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758).
2. Avaliar a eficiência dos extratos brutos (com resultados promissores nos bioensaios de laboratório) em inibir as comunidades incrustantes, através de bioensaios de campo na Baía de Guanabara, RJ.
3. Avaliar o efeito temporal (verão e outono) das atividades anti-incrustantes de extratos brutos (diferentes polaridades) de *D. anchorata*, através de bioensaios de campo na Baía de Guanabara, RJ.



### 3 HIPÓTESES

1. Os extratos brutos e os mucos, nas concentrações naturais e o dobro das concentrações naturais, das esponjas marinhas *Desmapsamma anchorata* e *Iotrochota arenosa* irão inibir significativamente a fixação de biscoitos produzidos pelo mexilhão *Perna perna*, comparado ao controle negativo.
2. Haverá variação na estrutura da comunidade no processo de incrustação será diferente e mais rápido durante o período de verão comparado ao período do outono, em ambos os períodos do ano, os extratos irão inibir significativamente as comunidades incrustantes quando comparadas aos controles negativos.
3. Os parâmetros de comunidade serão maiores no verão por apresentarem o processo de incrustação mais rápido.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta de espécimes

A coleta dos organismos foi realizada através de mergulho autônomo entre 2-5 metros de profundidade na Baía da Ilha Grande (BIG), Angra dos Reis- RJ. Vários indivíduos da espécie de esponjas *Desmapsamma anchorata* foram coletados em junho de 2017, na Ilha do Sabacu (23°00'26"S, 44°22'56"W), enquanto a espécie *Iotrochota arenosa* foi coletada na Lagoa Azul (23°5'8.541" S, 44°14'21.852" W), em março de 2022. Após a coleta, os organismos foram identificados e transportados para o laboratório em uma caixa térmica com gelo. As amostras foram mantidas em freezer até a data da extração química. Para os bioensaios de laboratório, os espécimes de mexilhão *Perna perna* foram coletados na Praia Vermelha, Urca, RJ (22°57'15.019" S, 43°9'50.501" W), e levados até o laboratório em água do mar com aeração contínua.

### 4.2 Extração orgânica

Para a extração das substâncias orgânicas, as esponjas foram descongeladas, o excesso de água retirado e foram limpas de epibiontes. Os organismos úmidos foram submetidos às extrações exaustivas. Os espécimes foram (separadamente) embebidos em diferentes polaridades de solventes orgânicos até estarem totalmente submersos e colocados em ultrassom (para promover a lise celular) durante uma hora, dividido em três etapas de 20 minutos. No término de cada hora, as amostras foram filtradas no papel de filtro e as soluções resultantes foram submetidas à evaporação no evaporador rotatório à vácuo para retirada dos solventes orgânicos e obtenção dos diferentes extratos brutos (EBs) (Figura 6). Esse processo foi realizado de forma sequencial para os quatro solventes orgânicos de diferentes polaridades: Hexano (Hex), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH).

**Figura 6 - Processo de extração química**



Legenda: A: Extração de substâncias das esponjas através do uso de ultrassom, B: Filtração das amostras e C: evaporação do solvente no evaporador rotatório. Fonte: A autora.

#### 4.3 Bioensaio de bioincrustação com mexilhão *Perna perna*

O bioensaio utilizado foi adaptado de Da Gama et al. (2003) e Akuzov et al. (2016). Os mexilhões da espécie *Perna perna*, molusco incrustante de hábito

gregário e, abundante nos costões rochosos do Rio de Janeiro, foram coletados em maré baixa na área costeira rochosa da Praia Vermelha, Rio de Janeiro, RJ (22° 57' 15.019" S, 43° 9' 50.501" W). A coleta foi feita com auxílio de talhadeira e martelo. Os mexilhões utilizados foram os juvenis, com tamanhos de 3 a 5 centímetros, que apresentavam maior atividade no início do experimento. Além dos mexilhões, também foi coletada água do mar, necessária para a manutenção dos animais em aquário. Ao chegar ao laboratório, os mexilhões foram limpos, os biscoitos foram cortados com tesoura e os animais foram aclimatados em aquário contendo água do mar, por 10 horas, sob aeração e temperatura constantes.

Placas de Petri de vidro foram forradas com papéis de filtro. O papel recebeu os tratamentos (extratos brutos ou mucos), na concentração natural existente nos organismos. A concentração natural dos extratos foi calculada através da razão do rendimento dos extratos pelo peso úmido dos organismos. Essa concentração foi multiplicada pelo peso dos papéis filtro (n=10) utilizados para cada tratamento, obtendo-se a quantidade de extrato necessária para ser diluído em solvente e embeber os papéis filtro. Os bioensaios anti-incrustantes avaliaram a concentração natural e o dobro da concentração natural de cada extrato bruto. Para os mucos foram utilizados 20 mL e 40 mL de muco.

Para controle positivo, o papel filtro foi embebido em 4 mg de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), substância conhecida como anti-incrustante, dissolvido em metanol e para o controle negativo os papéis foram lavados com os solventes metanol e diclorometano, os mesmos das preparações dos extratos brutos.

Três espécimes juvenis de mexilhão foram distribuídos em cada placa, cada tratamento foi testado em 10 réplicas, totalizando 30 mexilhões para cada tratamento (Figura 7). As placas foram preenchidas até a borda com água do mar natural coletada do mesmo ambiente que os mexilhões foram retirados.

**Figura 7-** Bioensaio de atividade anti-incrustante, em laboratório, com mexilhão *P. perna*.



Foto: Maria Eduarda Martins, 2022.

A contagem de bissos ocorreu após 12 horas de exposição dos animais aos tratamentos (extratos brutos e mucos). Foram contabilizados os bissos fixados no papel filtro, na placa e em outro mexilhão.

Posteriormente, após o término do bioensaio, os mexilhões foram agrupados por tratamentos, em tecido permeável e acondicionados em aquários contendo água do mar, sob aeração contínua por 24 horas. Após esse período foi realizada a contagem dos mexilhões mortos. A taxa de mortalidade foi calculada através da razão quantidade de mexilhões mortos e a quantidade de mexilhões em cada bioensaio (n=30) e transformado em porcentagem.

Para analisar estatisticamente a fixação dos bissos, foi utilizado um teste ANOVA (One-way) com *Post Hoc* Dunnett no programa SPSS (IBM SPSS Statistic 25).



#### 4.4 Bioensaio de campo na Baía de Guanabara, RJ

Os extratos brutos promissores nos bioensaios de laboratório descritos acima serão implantados em bioensaios de campo na Baía de Guanabara, RJ.

O método utilizado foi adaptado de Henrikson e Pawlik (1995). Placas de Petri de seis (6) cm de diâmetro e 25 mL de volume foram coladas com massa epóxi Tubolit<sup>®</sup> em placas de acrílico, formando blocos com cinco placas de Petri, distribuídas aleatoriamente sobre as placas de acrílico (Figura 8). Cada tratamento (extratos brutos de diferentes polaridades) foi misturado com Phytigel<sup>®</sup> para ser gelificado na placa. O Phytigel<sup>®</sup> foi pesado (1,085 gramas) e misturado em água destilada (25 mL) até desfazer todos os grumos, após esse processo, a mistura foi esquentada no microondas aproximadamente quatro vezes de 15 segundos até se tornar líquida. Posteriormente, cada tratamento de *D. anchorata* em concentrações naturais de EB MeOH e Hex foi misturado à solução de Phytigel<sup>®</sup> e despejado na placa (Figura 8).

**Figura 8** — Placas preparadas com os tratamentos

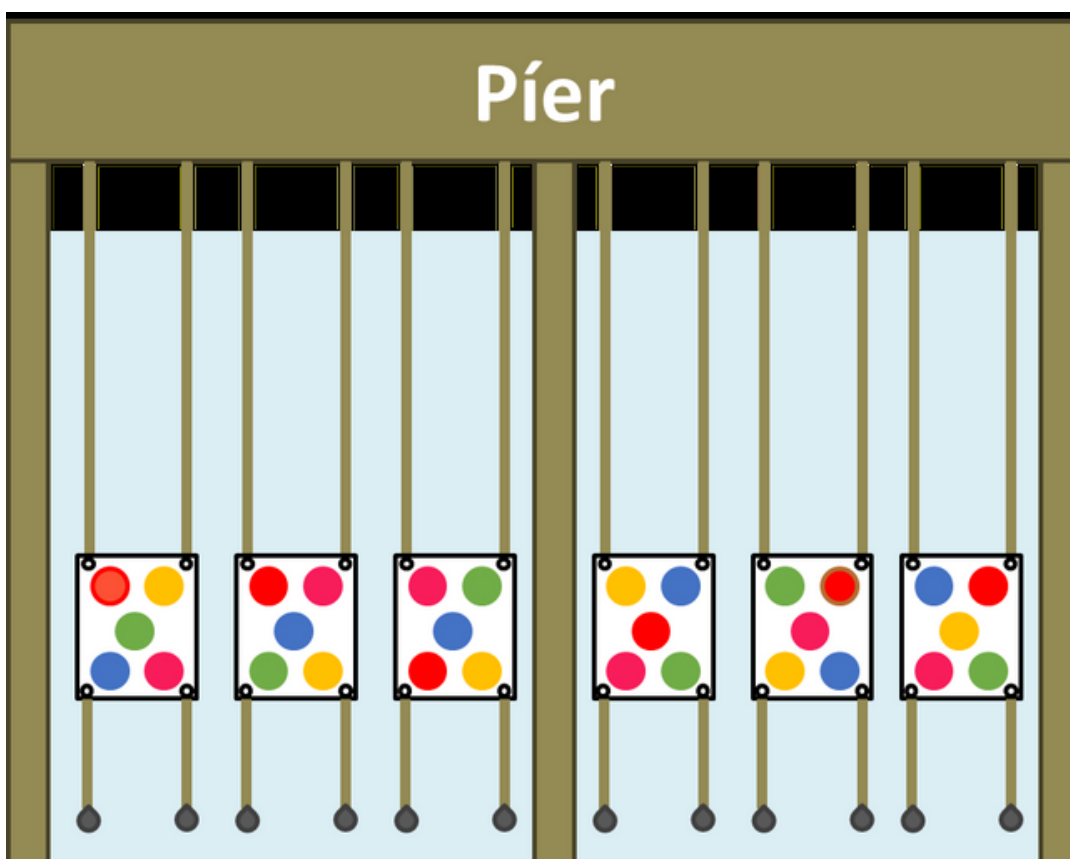


Foto: A autora, 2022.

As placas de acrílico foram penduradas com cordas de nylon, entre 1 e 2 m

de profundidade, no píer do Clube de Regatas de Guanabara, Botafogo, RJ. A fim de avaliar a eficiência anti-incrustante dos extratos naturais isolados das esponjas marinhas, o processo de sucessão das comunidades incrustantes sobre as placas foi monitorado semanalmente (Figura 9). O monitoramento foi realizado através da porcentagem de cobertura, utilizando a metodologia de pontos de interseção equidistantes (Meese & Tomich, 1992). Foi utilizada uma folha de acetato com o contorno de cada placa de Petri desenhado com pontos de interseção das linhas separados por 0,7 cm, totalizando 62 pontos, retiramos os pontos em torno da borda para evitar o efeito de borda, utilizando assim, apenas 56 pontos da folha de acetato. O acetato foi colocado sobre as placas incrustadas e os organismos que ficavam sob cada ponto foram contabilizados e transformados em porcentagem (Figura 10).

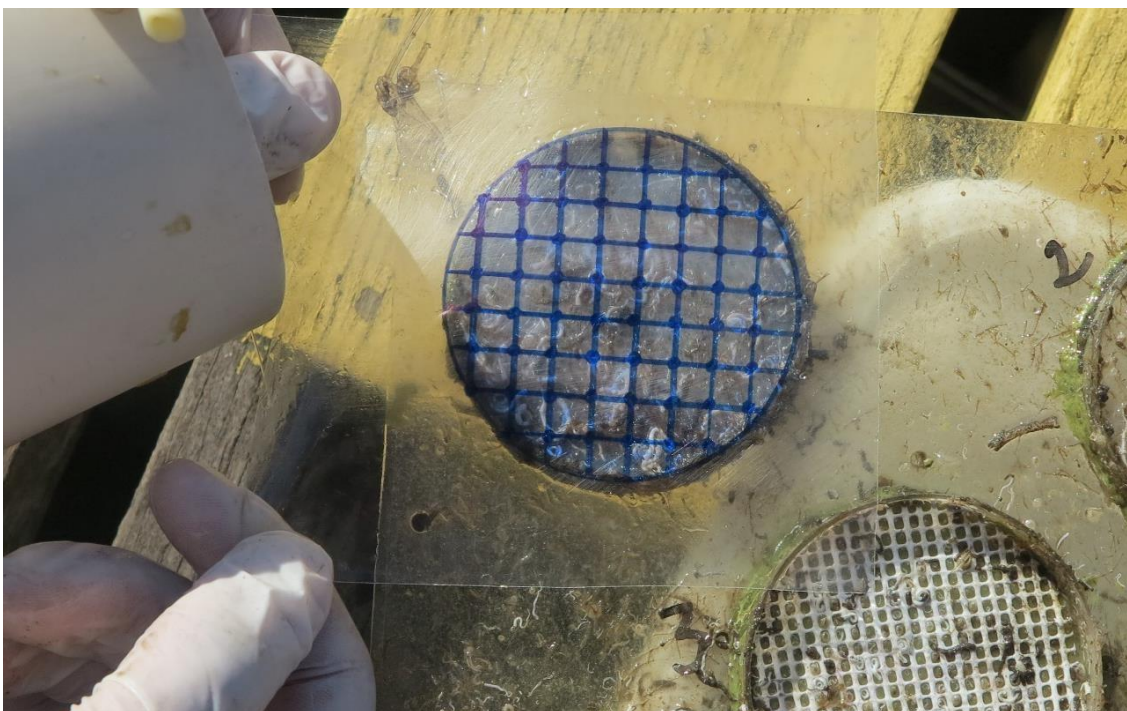
**Figura 9** - Esquema das placas de acrílico no píer.



Legenda: Placas aleatorizadas, cada cor é um tratamento diferente.

Fonte: Ferreira-Vançato, 2021.

**Figura 10-** Metodologia de Pontos de Meese e Tomich, 1992.



Fonte: A autora, 2022.

Para a avaliação estatística, a porcentagem de cobertura da comunidade incrustante foi transformada em raiz de quarta e avaliada através de análise PERMANOVA, Análise de escalonamento multidimensional (MDS), SIMPER e ANOSIM, riqueza (S), diversidade de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J'), utilizando o programa PRIMER 6 & PERMANOVA (Clarke & Gorley, 2006).

Além disso, comparamos os organismos de cada tratamento de cada tempo do verão e do outono, através do Teste T, a fim de avaliar se houve alguma diferença entre os tratamentos de cada estação. Essa análise foi realizada usando o programa SPSS (IBM SPSS Statistic 25).

#### 4.5 Biomassa da comunidade incrustante

O potencial anti-incrustante também foi avaliado através do peso da comunidade incrustante de cada tratamento. Após o término do bioensaio de campo, as placas foram retiradas do mar e levadas imediatamente para o laboratório, dentro



de um saco lacrado contendo água do mar, e resfriado num cooler contendo gelo. No laboratório, as placas foram retiradas separadamente dos sacos plásticos e o excesso de Phytigel<sup>®</sup> (parte inferior do disco de Phytigel<sup>®</sup>, sem a presença de incrustações, cerca de 0,8 cm da base) foi retirado com auxílio de um estilete, enquanto a porção superior, contendo os organismos incrustantes foram secas em uma estufa a 50°C até a obtenção do peso estabilizado (em torno de 15 dias). Após a secagem, as comunidades incrustantes foram pesadas (peso seco). A avaliação estatística foi feita através do Teste T, comparando o peso de cada tratamento de cada tempo do verão e do outono. Essas análises foram realizadas usando o programa SPSS (IBM SPSSStatistic 25).

## 5 RESULTADOS

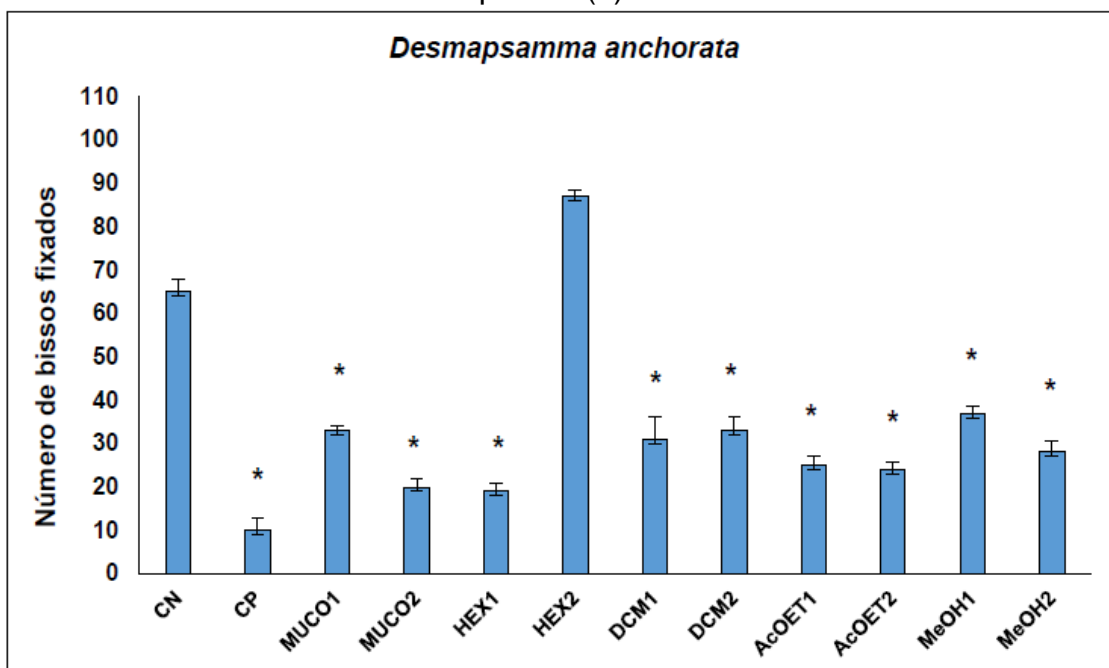
### 5.1 Bioensaio de laboratório com mexilhão *Perna perna*

#### 5.1.1 Espõnja *Desmapsamma anchorata*

Ao avaliar a eficiência anti-incrustante de extratos de diferentes polaridades e o muco de *D. anchorata*, foi possível observar que apenas o extrato hexânico, na concentração natural dobrada (Hex 2), não inibiu significativamente a fixação de bissos do mexilhão *P. perna* em comparação ao controle negativo. Esse tratamento, ao contrário, induziu a fixação de bissos de acordo com o gráfico (Figura 11). Podemos observar ainda, que apenas as concentrações dobradas (2x a concentração natural) de extratos de AcOEt, MeOH e o muco produziram menos bissos do que a concentração natural.

Em relação à mortalidade dos mexilhões, após o controle positivo (com 80 % de mortalidade), os mucos (concentração natural e dobrada) de *D. anchorata* apresentaram maiores taxas de mortalidade comparada aos demais tratamentos (Tabela 1).

**Figura 11** - Quantidade de biscoitos do mexilhão *P. perna* fixados nos tratamentos de *D. anchorata*. Barra de erro: erro padrão ( $\pm$ ). n=30.



Legenda: \*Resultados significativos para inibição da incrustação comparando com controle negativo ( $p < 0,05$ ), ANOVA (One-way). CN=controle negativo (apenas solvente), CP=controle positivo (4mg de  $\text{CuSO}_4$ ), Muco 1=20 mL, muco 2=40 mL, Hex1= EB de hexano concentração natural e 2=concentração natural dobrada, DCM1=extrato de diclorometano concentração natural e 2=concentração natural dobrada, AcOEt1=extrato de acetato de etila em concentração natural e 2=concentração natural dobrada, MeOH1=extrato de metanol em concentração natural e 2=concentração natural dobrada.

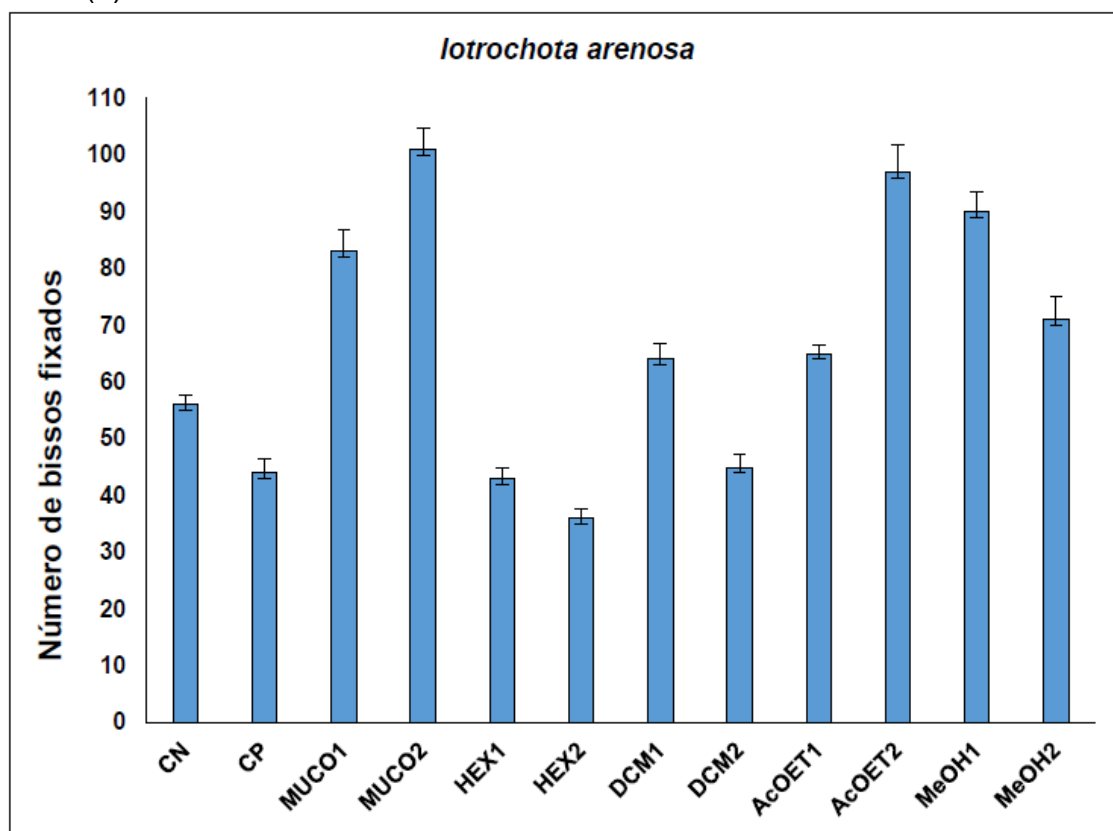
**Tabela 1-** Porcentagem de mortalidade dos mexilhões *P. perna* expostos aos extratos e mucos da esponja *D. anchorata*, durante 24 h após bioensaio de laboratório anti- incrustante

Tratamentos	Mortalidade (%)
Controle negativo	0
Controle positivo	80
Muco 1	26,6
Muco 2	10
Metanol 1	0
Metanol 2	0
Acetato de etila 1	3,3
Acetato de etila 2	0
Hexano 1	0
Hexano 2	3,3
Diclorometano 1	0
Diclorometano 2	0

### 5.1.2 Esponja *Iotrochota arenosa*

Ao avaliar a eficiência anti-incrustante dos extratos brutos de diferentes polaridades e o muco da esponja marinha *I.arenosa*, nenhum tratamento se mostrou eficaz estatisticamente contra a fixação de bisco do mexilhão *P.perna*, quando comparados ao controle negativo. Ao analisar o gráfico, podemos observar que os tratamentos de Hex 1 e 2 tiveram uma tendência a inibir a fixação, e por outro lado, omuco, e os EBs de DCM1, AcOeT1 e 2 e MeOH1 e 2 mostraram uma tendência a indução da fixação de bisco (Figura 12). Além disso, nenhum tratamento, além do controle positivo, se mostrou tóxico aos mexilhões (Tabela 2).

**Figura 12** - Quantidade de bisco do mexilhão *P. perna*, fixados nos tratamentos de *I.arenosa*, durante o bioensaio de laboratório anti-incrustante. Barra de erro: erro padrão ( $\pm$ ).n=30.



Legenda: CN=controle negativo (apenas solvente), CP=controle positivo (4mg de CuSO<sub>4</sub>), Muco 1=20 mL, muco 2=40mL, Hex1= EB de hexano concentração natural e 2=concentração natural dobrada, DCM1=extrato de diclorometano concentração natural e 2=concentração natural dobrada, AcOEt1=extrato de acetato de etila em concentração natural e 2=concentração natural dobrada, MeOH1=extrato de metanol em concentração natural e 2=concentração natural dobrada.

**Tabela 2** - Porcentagem da mortalidade dos mexilhões *P. perna* expostos aos extratos e mucos da esponja *I.arenosa*, durante o bioensaio anti-incrustação.

<b>Tratamentos</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
Controle negativo	0
Controle positivo	40
Muco 1	0
Muco 2	0
Hexano 1	0
Hexano 2	0
DCM 1	0
DCM 2	0
Ac.etila 1	0
Ac.etila 2	0
MeOH 1	0
MeOH 2	6,6

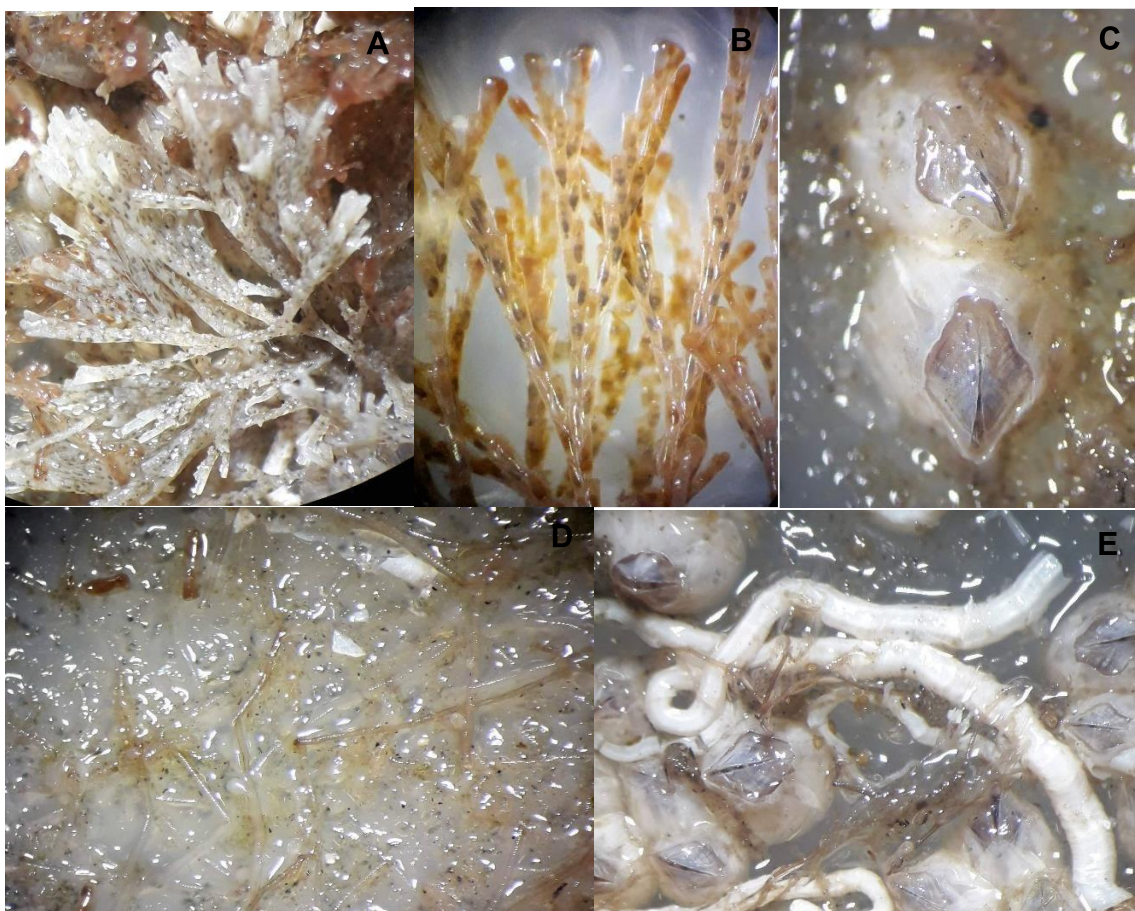
## 5.2 Bioensaio de campo

As comunidades incrustantes foram analisadas em dois períodos do ano: verão (janeiro de 2021) e outono (final de maio até início de junho de 2022). Foram avaliados em campo apenas os extratos que foram eficazes na inibição dos bissos em laboratório: os extratos brutos hexânico e metanólico da esponja *D. anchorata*.

### 5.2.1 Bioensaio verão

Ao analisar a comunidade incrustante crescendo sobre as placas contendo os extratos de *D. anchorata* no verão, os grupos encontrados foram: biofilme, alga turfo, poliquetas da família Serpulidae, Spionidae, cirripédios *Amphibalanus amphitrite* Darwin 1854 (exótico) e os briozoários *Bugula neritina* Linnaeus, 1758 (exótico) e *Bugulina turbinata* Alder, 1857 (Figura 13).

**Figura 13** - Organismos encontrados no bioensaio de campo na Baía de Guanabara



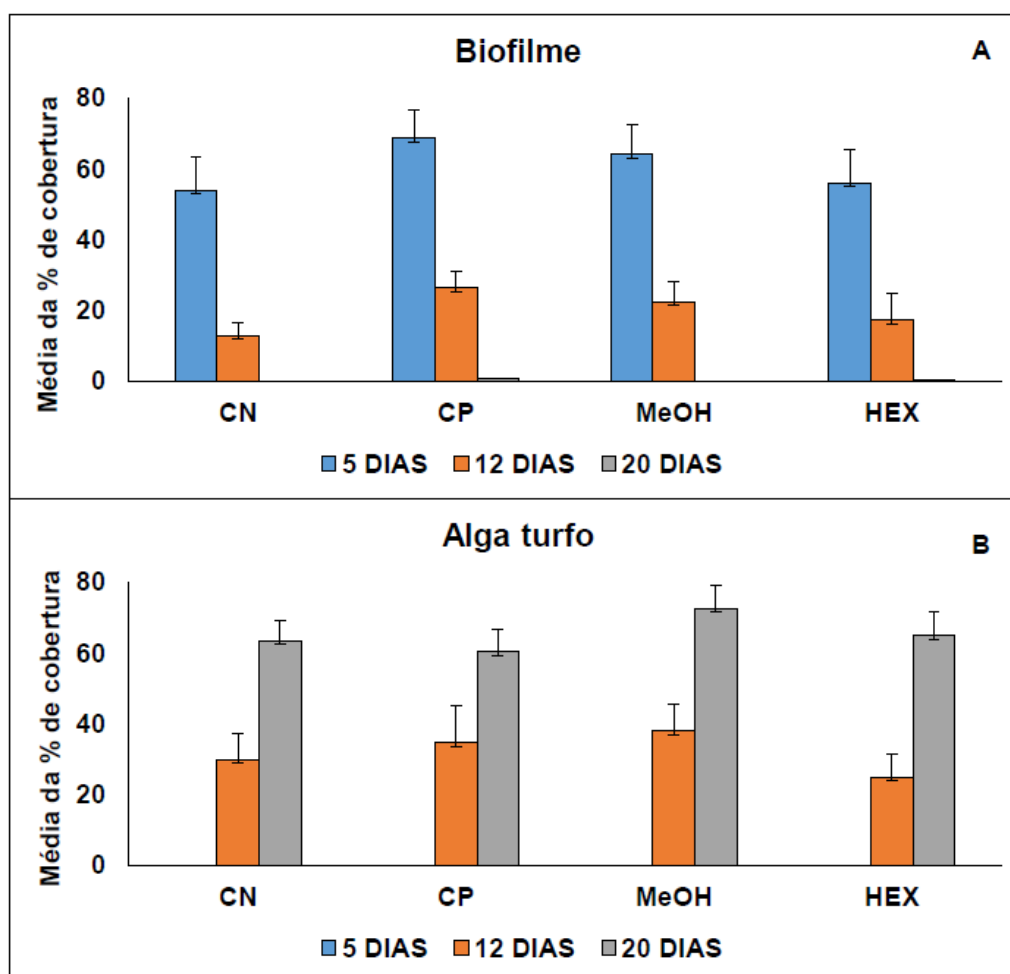
Legenda: A: *Bugulina turbinata*, B: *Bugula neritina*, C: *Amphibalanus amphitrite*, D: alga turfo, E: Serpulidae.

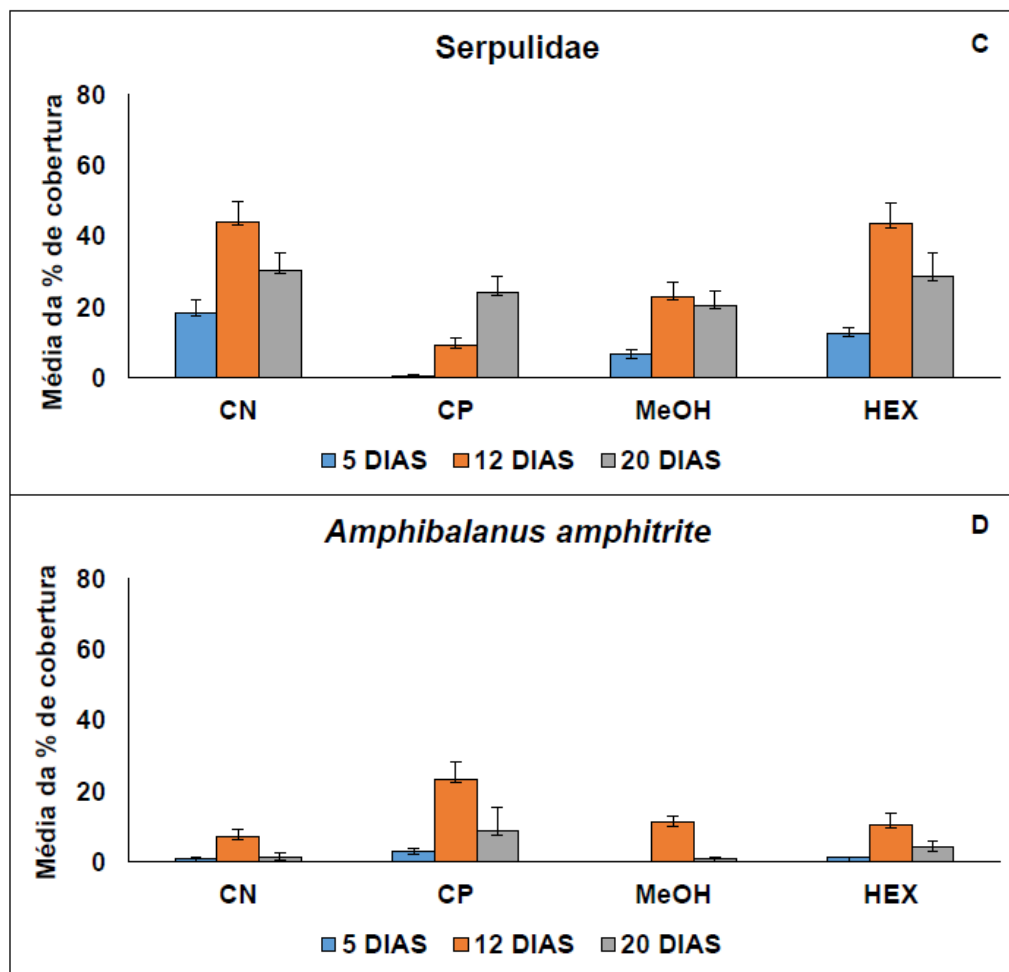
Fotos: Ferreira-Vançato, 2020

Analisando os gráficos de porcentagem de cobertura dos organismos incrustantes (Figura 14), podemos observar uma diminuição acentuada do biofilme em todos os tratamentos, a partir da segunda semana de imersão das placas (Figuras 14A), e a substituição por outros organismos no decorrer do tempo, como o surgimento de alga turfo (Figura 14B), Serpulidae (Figura 14C) e *A. amphitrite* (Figura 14D). A alga turfo foi ocupando mais espaços durante as semanas, enquanto a craca *A. amphitrite* diminuiu sua porcentagem de cobertura da 2ª para 3ª semana. Na análise estatística de PERMANOVA main test, obtivemos resultado significativo ( $df=9$ , pseudo  $F=3,1$ ,  $p(\text{perm})=0,001$ ). No teste aos pares, encontramos resultado significativo na primeira semana de imersão, entre o controle positivo e o extrato hexânico e metanólico, ambos com  $p(\text{perm})=0,001$ . A porcentagem de cobertura das

demais espécies incrustantes, com porcentagem de cobertura menor que 10% que foram encontradas nas placas, e o resultado da PERMANOVA aos pares, podem ser encontrados no anexo A e C.

**Figura 14** - Média da porcentagem de cobertura dos organismos incrustantes mais abundantes encontrados no verão. Barra de erro: erro padrão ( $\pm$ ). Número de réplicas (n=10).

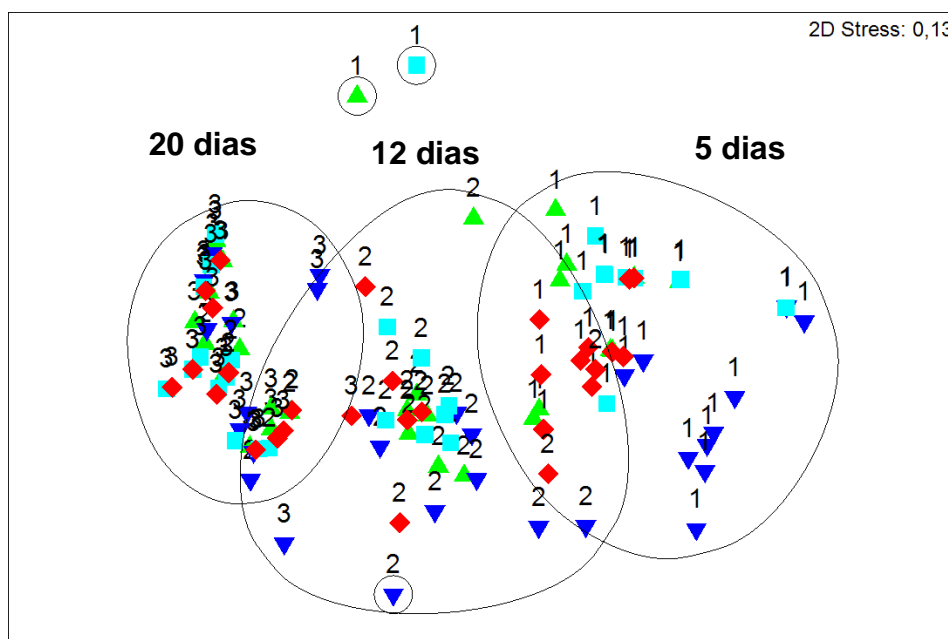




Na análise de escalonamento multidimensional (MDS) foi possível observar o agrupamento das comunidades incrustantes de acordo com o tempo de monitoramento (Figura 15). Por outro lado, não foi possível identificar um agrupamento das comunidades em relação aos diferentes tratamentos.



**Figura 15** – Escalonamento Multidimensional das comunidades incrustantes durante o período de verão



Legenda: CN: controle negativo, CP: controle positivo, MeOH: metanol, Hex: hexano. ▲: controle negativo, ▼: controle positivo, ■: MeOH, ◆: Hex

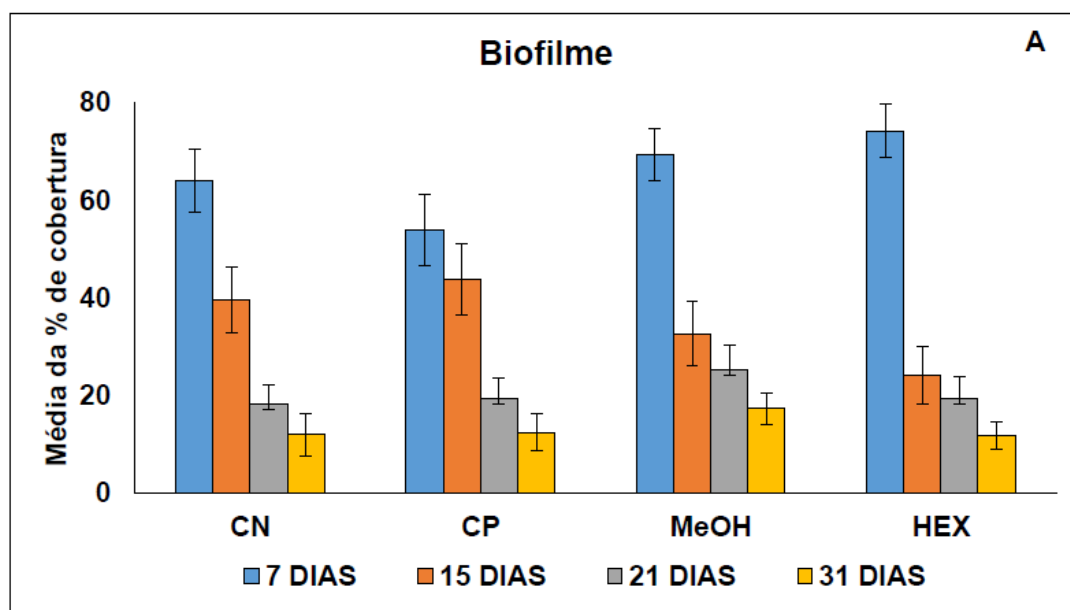
Esse resultado foi corroborado com a análise de ANOSIM, que mostrou diferença significativa para o fator tempo ( $R=0,734$ ,  $p=0,001$ ), mas não para o fator tratamento ( $R=-0,287$ ,  $p=0,97$ ). Na análise de SIMPER, houve diferença de 49,49 % entre as comunidades incrustantes da 1ª semana e 2ª semana, as espécies que mais contribuíram para a dissimilaridade foram principalmente alga turfo (30,68%), biofilme (18,74%) e a espécie de craca *Amphibalanus amphitrite* (16,93%). Já entre a 1ª e 3ª semana, houve 71,22% de dissimilaridade, e os grupos que mais contribuíram para essa diferença foram alga turfo (34,96%) e biofilme (30,75%). Entre a 2ª e 3ª semana, houve 39,44% de dissimilaridade, sendo biofilme (25,26%), *Amphibalanus amphitrite* (21,26%) e alga turfo (14,59%), os grupos que mais contribuíram para essa diferença. Na comparação entre os tratamentos, a maior dissimilaridade foi observada entre o controle negativo e o controle positivo, com 33,72% de dissimilaridade, as espécies que mais contribuíram para essa diferença foram a família Serpulidae (26,91%), a craca *Amphibalanus amphitrite* (20,14%) e biofilme (16,42%). A segunda maior dissimilaridade ocorreu entre controle positivo e hexano, com 30,87% de

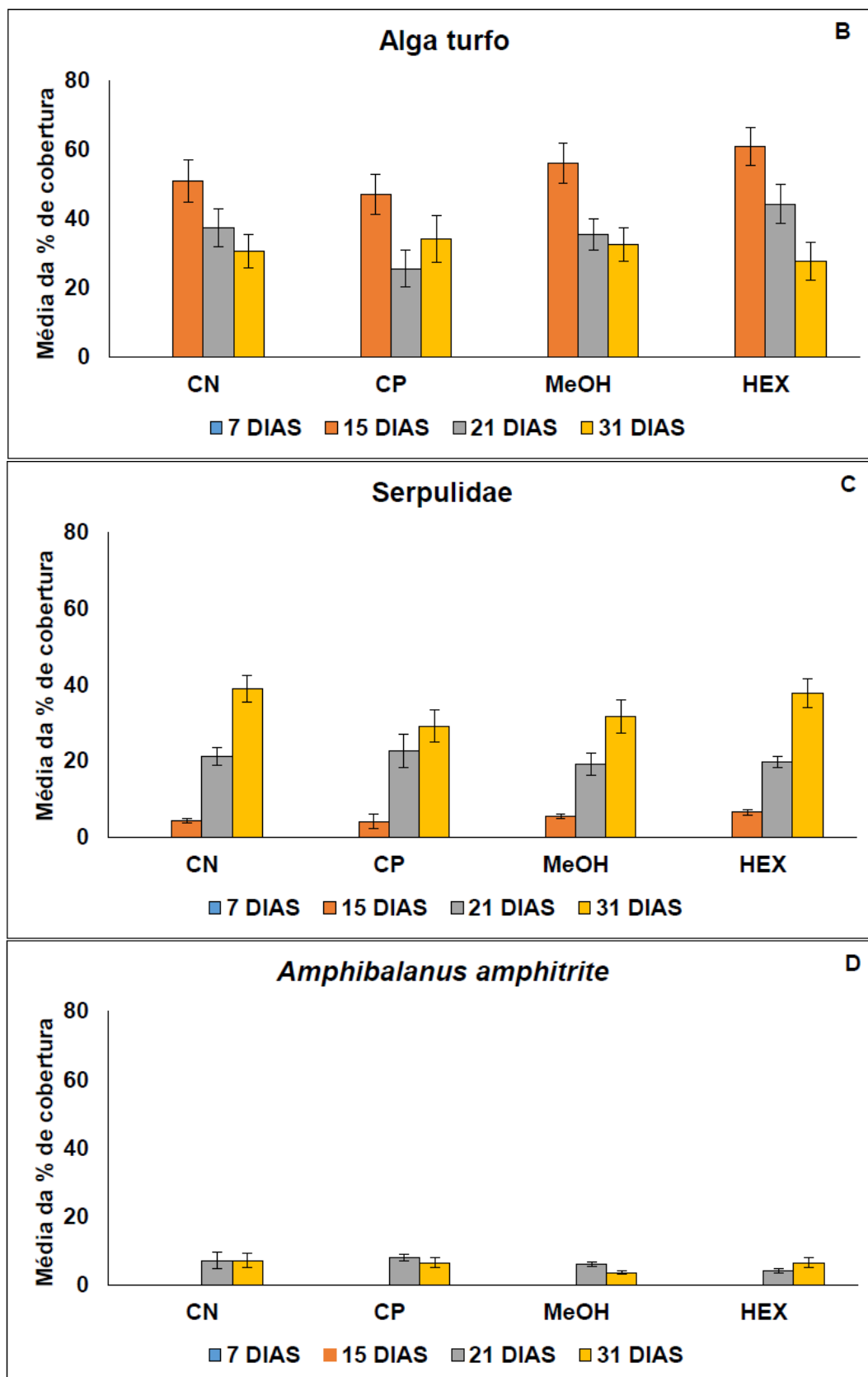
dissimilaridade, onde Serpulidae (28,20%) foi o grupo que mais contribuiu, seguido da craca *Amphibalanus amphitrite* (19,93%) e biofilme (15,64%).

### 5.2.2 Bioensaio outono

Ao analisar o bioensaio de incrustação, realizado no outono, observamos que as comunidades incrustantes que cresceram sobre as placas contendo os diferentes extratos de *D. anchorata* foram os mesmos grupos de organismos observados no verão. Ao analisar os gráficos (Figura 16), observamos que o biofilme (Figura 16A) foi diminuindo ao longo das semanas, enquanto isso, um processo sucessório foi observado, já que outros organismos incrustaram nas placas, como alga turfo (Figura 16B), organismos da família Serpulidae (Figura 16C) e a craca exótica *A. amphitrite* (Figura 16D). Os organismos da família Serpulidae foram dominando as placas com o decorrer do tempo. Na análise de PERMANOVA main test o resultado não foi significativo,  $df=16$ , pseudo  $F=0,7459$  e  $p(\text{perm})=0,775$ . (Figura 16).

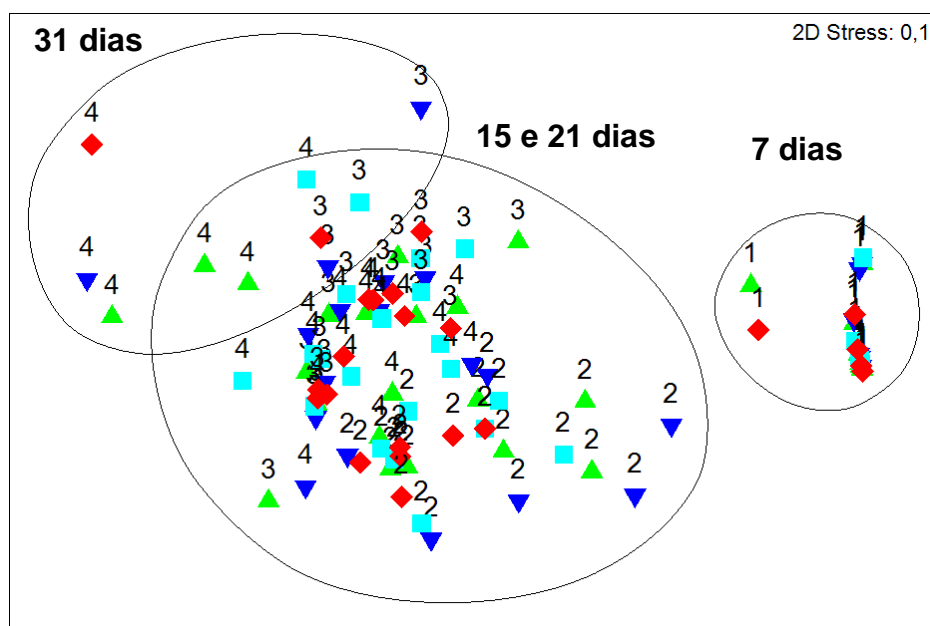
**Figura 16** - Grupos de organismos incrustantes encontrados no bioensaio do outono. Barra de erro: erros padrão ( $\pm$ ). Número de réplicas ( $n=7$ ).





Na análise de escalonamento multidimensional (MDS), o resultado foi o mesmo que no verão: foi possível observar o agrupamento das comunidades incrustantes de acordo com o tempo de monitoramento (Figura 17), mas não foi possível identificar um agrupamento das comunidades em relação aos tratamentos.

**Figura 17** - Escalonamento Multidimensional das comunidades incrustantes durante o período de outono



Legenda: ▲: controle negativo, ▼: controle positivo, ■: MeOH, ◆: Hex. 1= 1ª semana de imersão, 2=2ª semana de imersão, 3= 3ª semana de imersão, 4= 4ª semana de imersão.

Esse resultado foi corroborado com a análise de ANOSIM, que mostrou diferença significativa para o fator tempo ( $R=0,736$ ,  $p=0,001$ ) e não para o fator tratamento ( $R=-0,238$ ,  $p=0,997$ ). Na análise de SIMPER, a comunidade diferiu 59,55% entre a 1ª semana e 2ª semana. Essa diferença ocorreu principalmente pela presença de alga turfo (39,62%), Serpulidae (18,71%) e a espécie *Bugulina turbinata* (15,02%). Já entre a 1ª e 3ª semana, houve 71,53% de dissimilaridade, os grupos que contribuíram para essa diferença foram alga turfo (23,45%), Serpulidae (21,50%), *Amphibalanus amphitrite* (13,49%) e *Bugula neritina* (12,69%). Entre a 1ª e 4ª semana, houve 76,04% de dissimilaridade, sendo Serpulidae (24,38%), alga turfo (21,91%) e Spionidae (15,20%) os grupos que mais contribuíram para essa diferença. A

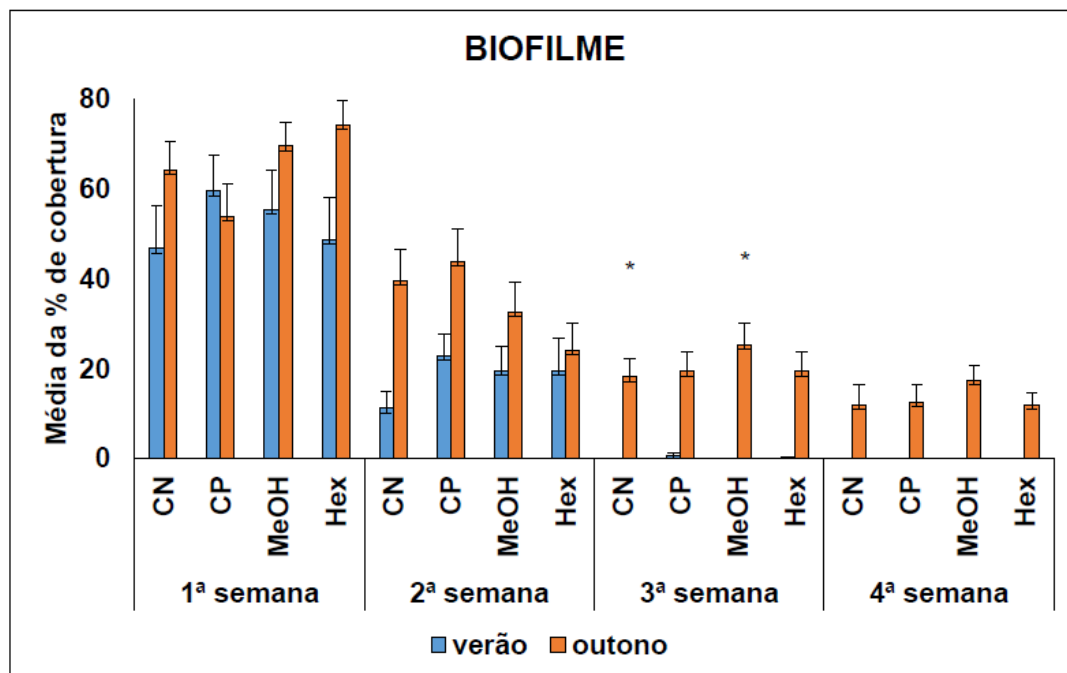
dissimilaridade entre a 2ª e 3ª semana foi de 32,41%, as espécies que mais contribuíram para essa diferença foram *Amphibalanus amphitrite* (21,30%), *Bugula neritina* (18,09%), *Bugulina turbinata* (13,62%) e Serpulidae (13,42%). Entre a 2ª e 4ª semana, ocorreu 35,70% de dissimilaridade, os grupos que mais contribuíram para essa diferença foram: *Amphibalanus amphitrite* (20,12%), Serpulidae (17,38%), biofilme (16,33%) e *Bugulina turbinata* (15%). A diferença entre a 3ª e 4ª semana foi de 26,90%, as espécies que contribuíram foram *Bugula neritina* (19,73%), *Bugulina turbinata* (17,11%), biofilme (16,51%) e alga turfo (13,85%). Na comparação entre os tratamentos, a maior dissimilaridade ocorreu entre o controle negativo e o controle positivo, com 22,57%. As espécies que mais contribuíram para essa diferença foram biofilme (24,91%), *Bugulina turbinata* (15,73%), Spionidae (14,40%) e alga turfo (12,84%). Entre o controle positivo e hexano ocorreu 20,86% de dissimilaridade, os grupos que mais contribuíram para essa diferença foram biofilme (23,63%), *Bugulina turbinata* (16,56%), Spionidae (15,26%) e alga turfo (14,74%).

### 5.2.3 Comparação temporal (verão x outono) dos bioensaios de incrustação

Ao comparar as comunidades incrustantes crescendo sobre os diferentes tratamentos no período de verão e outono, verificamos uma diferença no tempo de crescimento dos organismos, visto que no outono as placas ficaram uma semana a mais imersas (quatro semanas de imersão), enquanto que no verão, já na terceira semana de imersão, as placas já estavam totalmente incrustadas e foram retiradas da água.

Foi observado que houve diferença significativa no crescimento de biofilme. Quando comparamos a porcentagem de cobertura média da incrustação de biofilme nas diferentes épocas do ano, no verão e no outono, do mesmo tratamento, através da análise estatística de Teste T, obtivemos resultado significativo na comparação entre a 3ª semana do controle negativo do verão com a 3ª semana do controle negativo do outono ( $p=0,05$ ) e entre os tratamentos de extrato metanólico ( $p=0,029$ ) da mesma semana de imersão (Figura 18).

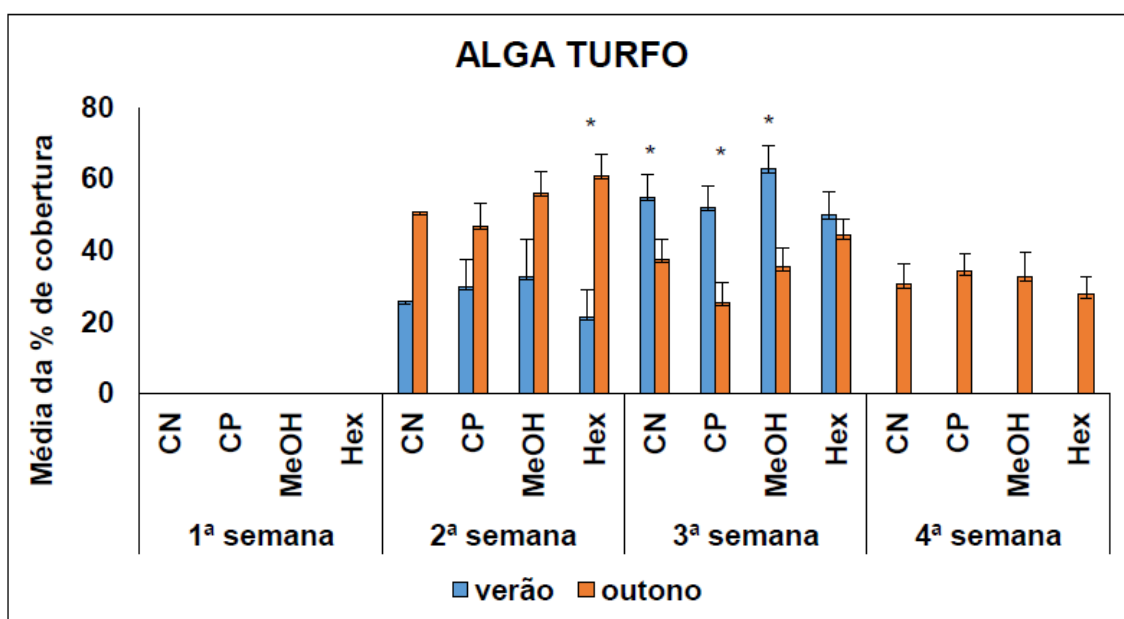
**Figura 18** - Média da porcentagem de cobertura de biofilme verão (n=10) x outono (n=7). Barra de erro: erro padrão ( $\pm$ ).



Legenda: \*: resultados significativos

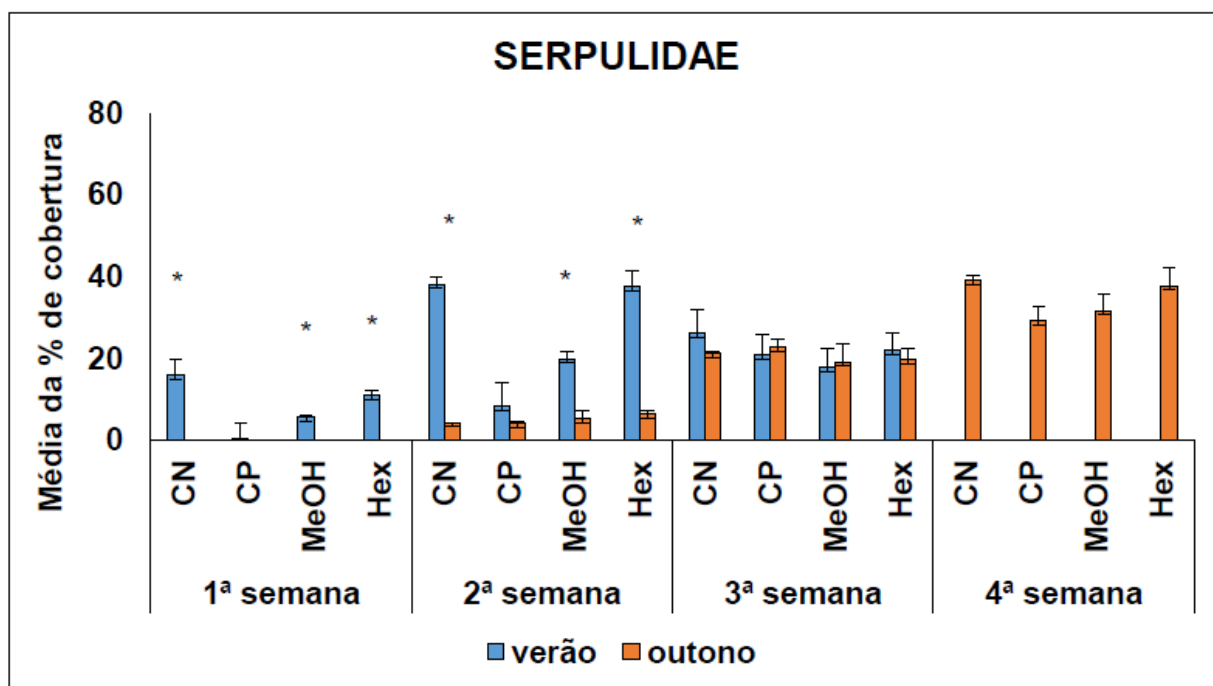
Com a alga turfo, obtivemos resultado significativo na 2ª semana com extrato hexânico do verão comparado com outono ( $p=0,012$ ), na 3ª semana com controle negativo ( $p=0,042$ ), controle positivo ( $p=0,014$ ) e com metanol ( $p=0,005$ ) (Figura 19).

**Figura 19** - Média da porcentagem de cobertura alga turfo verão (n=10)x outono (n=7). Barra de erro: erro padrão ( $\pm$ ).



Para os organismos incrustantes da família Serpulidae foi encontrado resultado significativo na 1ª semana com controle negativo ( $p=0,002$ ), com MeOH ( $p=0,004$ ) e com Hex ( $p=0,000$ ). Já na 2ª semana, os resultados significativos foram no controle negativo ( $p=0,000$ ), com metanol ( $p=0,004$ ) e com hexano ( $p=0,000$ ) (Figura 20).

**Figura 20** – Média da porcentagem de cobertura de Serpulidae verão (n=10) x outono (n=7). Barra de erro: erro padrão ( $\pm$ ).

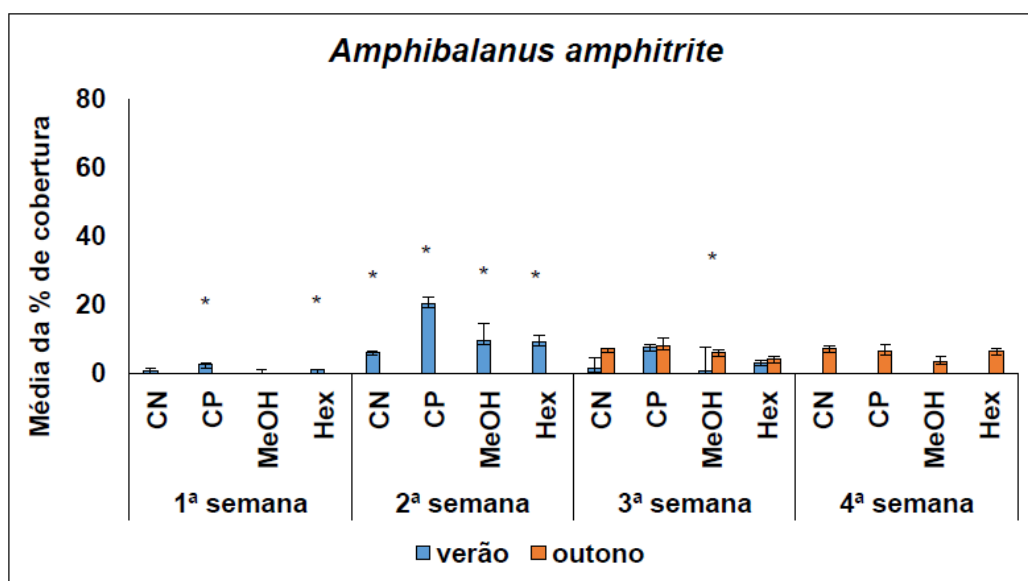


Legenda: \*: resultados significativos

Para a espécie de craca *Amphibalanus amphitrite* foi encontrado resultado significativo na 1ª semana de imersão no controle positivo ( $p= 0,012$ ) e com extrato hexânico ( $p=0,003$ ). Na 2ª semana, todos os tratamentos obtiveram resultado significativo, controle negativo ( $p= 0,010$ ), controle positivo ( $p= 0,002$ ), MeOH ( $p= 0,001$ ) e Hex ( $p= 0,015$ ). Na 3ª semana, apenas o extrato metanólico obteve resultado significativo ( $p= 0,001$ ) (Figura 21).



**Figura 21** - Média da porcentagem de cobertura de *Amphibalanus amphitrite* verão (n=10) x outono (n=7). Barra de erro ( $\pm$ ): erro padrão.



Legenda: \*: resultados significativos

Os organismos das espécies de briozoários *B. neritina*, *B. turbinata* e da família Spionidae apresentaram baixa cobertura nas placas ao longo do tempo. Os resultados estatísticos desses organismos se encontram no anexo D.

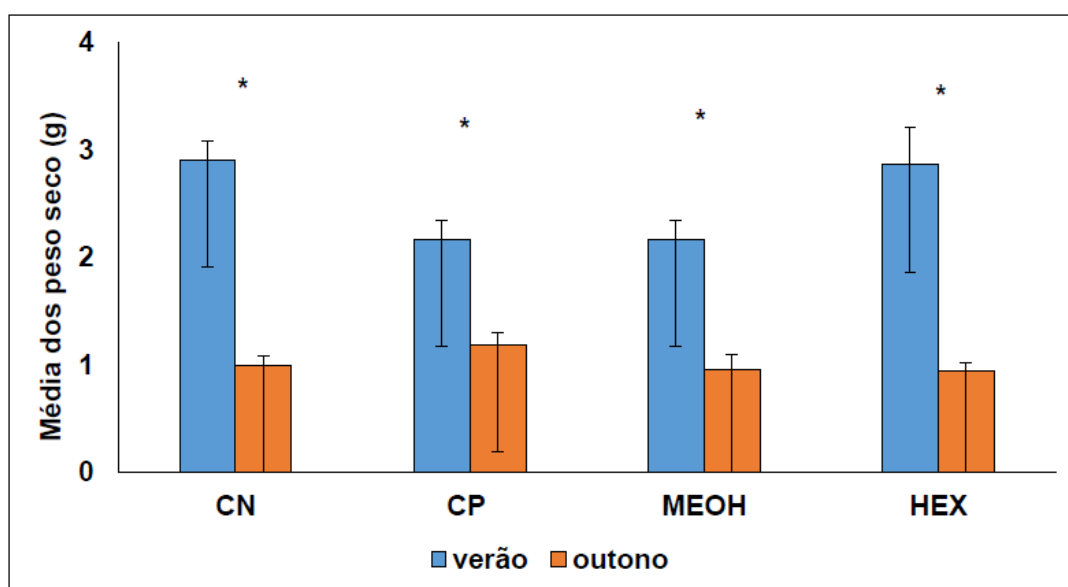
#### 5.2.4 Biomassa

Quando comparamos temporalmente (verão x outono) o acúmulo de biomassa das placas, de todos os tratamentos dos bioensaios de incrustação de campo, observamos diferença significativa entre eles no Teste T (Tabela 3). Ao observar o gráfico, podemos ver que todos os tratamentos no verão tiveram peso maior, mesmo ficando imerso uma semana a menos que os tratamentos no outono (Figura 22).

**Tabela 3** - Valor de p na comparação do peso da biomassa entre os mesmos tratamentos dos bioensaios anti-incrustantes no campo, durante o período de verão (n=10) e outono (n=7)

Tratamentos	Valor de p
CN	0,000
CP	0,001
MeOH	0,000
Hex	0,000

**Figura 22** - Média do peso seco (g) comparando verão x outono. Barra de erro: erro padrão ( $\pm$ ). Verão (n=10), outono (n=7).



Legenda: \*: resultados significativos

### 5.2.5 Riqueza, Índice de Diversidade de Shannon (H') e Pielou (J') comparando verão x outono

Comparando a riqueza obtida no bioensaio do último tempo do verão com a riqueza obtida no bioensaio do último tempo do outono, concluímos que o outono apresentou a maior riqueza, isso aconteceu pela ausência de biofilme e Spionidae na última semana do verão (Tabela 4).

O Índice de Diversidade de Shannon, mostrou que a comunidade do outono foi

a mais diversa (Tabela 4).

Já o Índice de Pielou também mostrou o quanto a comunidade é uniforme, Ao observar o gráfico, concluímos que estação do outono possui maior equitabilidade (uniformidade ou homogeneidade, da distribuição de abundância de espécies em uma comunidade) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Dados de riqueza, índice de diversidade de Shannon (H') e Índice de Pielou (J') da última semana de imersão verão (3ª semana) e outono (4ª semana).

<b>VERÃO</b>	<b>Riqueza</b>	<b>H'</b>	<b>J'</b>
<b>CN</b>	5	0,87	0,54
<b>CP</b>	6	1,09	0,61
<b>MeOH</b>	5	0,78	0,48
<b>Hex</b>	6	0,88	0,49
<b>OUTONO</b>	<b>Riqueza</b>	<b>H'</b>	<b>J'</b>
<b>CN</b>	7	1,53	0,79
<b>CP</b>	7	1,60	0,82
<b>MeOH</b>	7	1,58	0,81
<b>Hex</b>	7	1,59	0,82

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, os extratos brutos da esponja *D. anchorata* se mostraram eficazes contra a fixação de bissos do mexilhão *P. perna*. A inibição da produção de bissos foi observada em tratamentos com extratos brutos de diferentes polaridades de solventes, mostrando que podemos encontrar produtos naturais anti-incrustantes em diferentes polaridades. Além disso, apenas os extratos na concentração dobrada de Hexano e de Diclorometano não mostraram uma menor fixação de bissos nas placas, quando comparados às concentrações naturais. Em Ribeiro e colaboradores (2014) foi observado resultado não significativo para a mesma esponja e bioensaio semelhante, porém com extrato de acetona. Outro estudo com esponja marinha, como a calcária *Paraleucilla magna* também mostrou que o extrato etanólico teve um resultado significativo contra fixação de bissos da espécie de mexilhão, *Mytilus galloprovincialis* (Longo et al., 2021). Um estudo (WILLEMSEN, 1994) com extrato combinado de MeOH/H<sub>2</sub>O da *D. anchorata*, comparando duas concentrações (0,01 e 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>), contra a fixação da larva de craca *Amphibalanus amphitrite*, mostrou que apenas a concentração maior apresentou inibição do assentamento larval.

O muco de *D. anchorata* também se mostrou eficaz contra a fixação de bissos do mexilhão *P. perna*, diferente do muco da esponja *I. Arenosa*, que não obteve resultado significativo. Segundo Dyrinda (1986), o muco é uma defesa contra a epibiose, especialmente na inibição de assentamento larval. As larvas do briozoário do gênero *Bugula* não fixaram na esponja do gênero *Myxilla* (Classe Demospongiae), por entrarem em contato com o muco superficial. Outros estudos sobre muco produzidos por esponjas marinhas coletadas em Arraial do Cabo, RJ (*Polymastia janeirensis*, *Pseudaxinella lunaecharta* e *Amphimedon viridis*) demonstraram que elas podem conter substâncias antibacterianas contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (Muricy et al., 1993).

Os extratos brutos (Hex, DCM, AcOEt e MeOH) e o muco de *I. arenosa* não apresentaram resultados significativos contra a fixação de bissos do mexilhão *P. perna*. Resultado diferente foi observado por Quintana e colaboradores (2015), onde o extrato de diclorometano:metanol (1:1) dessa esponja mostrou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativa *Pseudomonas putida* e *Escherichia*

*coli*; além disso, nesse mesmo estudo, os autores mostraram que o extrato bruto da *I. arenosa* não foi inibidor de *quorum sensing* (comunicação bacteriana durante a formação do biofilme).

Neste estudo encontramos organismos de diferentes grupos nas placas dos bioensaios de campo, como organismos incrustantes de poliquetas, das famílias Serpulidae e Spionidae, a espécie de craca exótica *Amphibalanus amphitrite*, a espécie exótica de briozoário *Bugula neritina*, esses organismos também foram encontrados em outros pontos da Baía de Guanabara, como na Praia da Urca, local próximo ao Clube Guanabara (Breves-Ramos et al., 2005). Em um bioensaio de campo em *La Paz*, no Golfo da Califórnia, também foi encontrado espécies incrustantes de algas, poliquetas, cracas e briozoários (Sánchez-Lozano et al., 2019), assim como nesse estudo.

Como já mencionado acima, os extratos brutos de *I. arenosa* não apresentaram inibição da fixação de bisco de mexilhão, porém, por outro lado, os extratos de *D. anchorata* se mostraram significativos tanto nos testes de laboratório quanto nos bioensaios de campo. Entretanto, não houve resultado significativo na PERMANOVA global, mas as análises estatísticas aos pares mostraram diferença significativa na 1ª semana de imersão entre controle positivo e extrato metanólico; e entre o controle positivo e o extrato hexânico. Segundo Puentes e colaboradores (2014), as tintas com extrato bruto de diclorometano:metanol (1:1) de esponjas da mesma classe, Demospongiae (*Agelas tubulata*, *Neopetrosia proxima*, *Oceanapia peltata* e *Aplysina lacunosa*), apresentaram atividades anti-incrustantes durante 45 dias de campo. Bioensaios contra o assentamento de bactérias incrustantes mostraram que o extrato metanol:acetona da esponja *Iotrochota baculifera* não apresentou atividade anti-incrustante contra bactérias *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *P. putida* e *P. aeruginosa*. Porém, nesse mesmo estudo, esta esponja apresentou atividade anti-incrustante contra a fixação das larvas da craca *Amphibalanus amphitrite* (Limna Mol et al., 2010).

Os extratos hexânico e metanólico da esponja *D. anchorata* inibiram a incrustação de alguns organismos incrustantes, quando comparados aos controles positivos. Resultado de campo semelhante foi encontrado em Sánchez-Lozano e colaboradores (2019), onde obtiveram resultados significativos anti-incrustantes do

extrato de diclorometano da macroalga *Sargassum horridum* e do extrato de acetona:metanol (1:1) da esponja *Haliclona caerulea*, apresentando porcentagem de cobertura de organismos incrustantes apenas de 52,7% e 60,1%, respectivamente.

Neste estudo, não observamos diferença temporal significativa entre as comunidades incrustantes do verão e outono. Obtivemos resultados significativos em apenas alguns tratamentos para organismos incrustantes, como para biofilme, para a craca *A. amphitrite*, e para os organismos da família Serpulidae. Segundo Puga e colaboradores (2019), em estudos sazonais de campo na Baía de Guanabara, houve resultado significativo na análise de PERMANOVA, porém, segundo os autores, o estudo também não revelou um forte padrão de sazonalidade, visto que na análise aos pares só apresentou resultado significativo em algumas estações, mas, não houve resultado significativo entre verão e outono.

A craca *A. amphitrite* mostrou diferença significativa, principalmente na 2ª semana de imersão, em todos os tratamentos, quando comparado o verão com outono. Resultado semelhante foi encontrado em Puga e colaboradores (2019), onde a mesma espécie de craca também revelou diferença sazonal entre todas as estações do ano, durante sete anos de estudo na Baía de Guanabara.

As espécies encontradas de briozoário *Bugula neritina* e craca *Amphibalanus amphitrite* foram introduzidas no Brasil (Miranda et al., 2018; Puga et al., 2019), e são comuns em ambientes artificiais como portos e marinas. Porém, elas apresentaram menos de 10% da porcentagem de cobertura nas placas, nas duas estações do ano estudadas. Segundo Puga e colaboradores (2019), a craca *A. amphitrite* foi considerada uma das cinco espécies mais abundantes encontrada ao longo dos sete anos de estudo na Praia de Boa Viagem (Baía de Guanabara, RJ).

Ao analisar os gráficos da biomassa, podemos observar que a biomassa do verão foi maior do que a do inverno em todos os tratamentos, além de apresentar resultado estatístico significativo quando comparado cada tratamento entre as estações. Já que as altas taxas de crescimento dos organismos no verão está ligada à época de maior produtividade primária nas águas da baía, as espécies podem crescer mais rápido por capitalizar os recursos alimentares disponíveis (McCarthy et al., 2007; Lord, 2017). Além disso, segundo Santos (2015) a Baía de Guanabara foi considerada eutrofizada, principalmente os locais mais próximos às áreas urbanizadas, devido ao desenvolvimento urbano, econômico e industrial no entorno.

Todos os dados aqui compartilhados estão de acordo com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 14- “Vida na água”. São 17 ODSs com propostas da ONU para alcançarmos até 2030. A ODS 14 busca “Conservação e uso sustentável dos oceanos, dos mares e dos recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável”, este trabalho busca solucionar um problema econômico-ambiental marinho, onde a descoberta de organismos com potencial anti-incrustante, pode auxiliar na redução da disseminação de espécies invasoras, conseguir utilizar substâncias naturais biodegradáveis nas tintas anti-incrustantes e auxiliar com a diminuição de custos e redução de emissão de combustíveis, que uma embarcação muito incrustada utiliza para conseguir se locomover.

## CONCLUSÃO

- Os extratos brutos e o muco da esponja *D. anchorata* se mostraram significativos contra a fixação do mexilhão *P. perna*, corroborando a hipótese 1.
- Refutando a hipótese 1, os extratos brutos e muco da esponja *I. arenosa* não foram significativos contra a fixação do mexilhão *P. perna*.
- Alguns tratamentos com concentração dobrada de *D. anchorata* (muco e extrato bruto hexânico) e de *I. arenosa* (muco e extrato bruto de acetato de etila), induziram a fixação de biscoos em relação a concentração natural, refutando a hipótese 2.
- Houve diferença significativa na análise de PERMANOVA entre os tratamentos no bioensaio de campo do verão, corroborando a hipótese 3, e na comparação aos pares, mostrou que essa diferença ocorreu na 1ª semana de imersão.
- Não houve diferença significativa entre os tratamentos no bioensaio de campo do outono, refutando a hipótese 3.
- No bioensaio que ocorreu no verão, o processo de incrustação ocorreu mais rápido, ficando imerso uma semana a menos que no outono. O peso da biomassa seca foi maior do que no outono e apresentou diferença significativa quando comparados verão e outono, corroborando a hipótese 3.
- Os parâmetros de comunidade foram maiores no outono, refutando a hipótese 4.



## PERSPECTIVAS FUTURAS

- Analisar o perfil químico dos extratos brutos eficazes contra a incrustação biológica;
- Testar os extratos ativos contra espécies invasoras do coral-sol;.
- Testar os extratos ativos com tintas navais e testar em campo;.
- Tentar isolar as substâncias bioativas desses extratos.

## REFERÊNCIAS

- Abioye OP, Loto CA, Fayomi OSI. 2019. Evaluation of Anti-biofouling Progresses in Marine Application. *J Bio- Tribo-Corrosion*. 5(1):0. doi:10.1007/s40735-018-0213-5.
- Akuzov D, Vladkova T, Zamfirova G, Gaydarov V, Nascimento MV, Szeglat N, Grunwald I. 2016. in Laboratory and Marine Conditions. *Prog Org Coatings*. doi:10.1016/j.porgcoat.2016.10.028.
- Azemar F, Faÿ F, Réhel K, Linossier I. 2015. Development of hybrid antifouling paints. *Prog Org Coatings*. 87:10–19. doi:10.1016/j.porgcoat.2015.04.007.
- Bhadury P, Wright PC. 2004. Exploitation of marine algae: Biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta*. 219(4):561–578. doi:10.1007/s00425-004-1307-5.
- Breves-Ramos A, Lavrado HP, Junqueira A de OR, da Silva SHG. 2005. Succession in rocky intertidal benthic communities in areas with different pollution levels at Guanabara Bay (RJ-Brazil). *Brazilian Arch Biol Technol*. 48(6):951–965. doi:10.1590/S1516-89132005000800012.
- Castello-Branco C, Menegola C. 2014. Sponges from the Ilha Grande Bay, Rio de Janeiro State: Two new records for Brazilian south-east region. *Mar Biodivers Rec*. 7:1–6. doi:10.1017/S1755267214000116.
- Castro CB, Pires DO. 2001. Brazilian coral reefs: What we already know and what is still missing. *Bull Mar Sci*. 69(2):357–371.
- Coneski PN, Weise NK, Fulmer PA, Wynne JH. 2013. Development and evaluation of self-polishing urethane coatings with tethered quaternary ammonium biocides. *Prog Org Coatings*. 76(10):1376–1386. doi:10.1016/j.porgcoat.2013.04.012.
- Creed JC. 2006. Two invasive alien azooxanthellate corals, *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*, dominate the native zooxanthellate *Mussismilia hispida* in Brazil. *Coral Reefs*. 25(3):350. doi:10.1007/s00338-006-0105-x.
- Creed JC, Fenner D, Sammarco P, Cairns S, Capel K, Junqueira AOR, Cruz I, Miranda RJ, Carlos-Junior L, Mantelatto MC, et al. 2016. The invasion of the azooxanthellate coral *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) throughout the world: history, pathways and vectors. *Biol Invasions*. 19(1):283–305. doi:10.1007/s10530-016-1279-y.
- Da Gama BAP, Carvalho AGV, Weidner K, Soares AR, Coutinho R, Fleury BG, Teixeira VL, Pereira RC. 2008. Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. *Botanica Marina* 51 (2008): 191–201. doi: 10.1515/BOT.2008.027.
- Da Gama, B.A.P., Pereira, R.C. & Coutinho, R. 2009. Bioincrustação marinha. In:

Pereira, R.C. & Soares-Gomes, A. (orgs.) *Biologia Marinha*. 2a edição, editora Interciência, Rio de Janeiro, pp. 299-318.

Da Gama BAP, Pereira RC, Soares AR, Teixeira VL, Yoneshigue-Valentin Y. 2003. Is the mussel test a good indicator of antifouling activity? A comparison between laboratory and field assays. *Biofouling*. 19(SUPPL.):161–169. doi:10.1080/0892701031000089534.

Damodaran VB, Murthy SN. 2016. Bio-inspired strategies for designing antifouling biomaterials. *Biomater Res*. 20(1):1–11. doi:10.1186/s40824-016-0064-4.

Dyrynda PE. 1986. Defensive strategies of modular organisms. *Philos Trans - R Soc London, Ser B*. 313(1159):227–243. doi:10.1098/rstb.1986.0035.

FERREIRA, Yollanda Carolina da Silva. *Variação temporal e espacial de metabólitos secundários da esponja *Desmapsamma anchorata* (Demospongiae)*. 2016. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Fusetani N. 2011. Antifouling marine natural products. *Nat Prod Rep*. 28(2):400–410. doi:10.1039/c0np00034e.

Guilherme da Silva A, Carlos-Júnior LA, Sasada Sato CY, Lages BG, Neres-Lima V, Sá de Oliveira FM, Maia LF, Cappa de Oliveira LF, Fleury BG. 2022. Living with an enemy: Invasive sun-coral (*Tubastraea* spp.) competing against sponges *Desmapsamma anchorata* in southeastern Brazil. *Mar Environ Res*. 174(September 2021). doi:10.1016/j.marenvres.2022.105559.

Harder, T. (2009). Marine Epibiosis: Concepts, Ecological Consequences and Host Defence. In: Flemming, HC., Murthy, P.S., Venkatesan, R., Cooksey, K. (eds) *Marine and Industrial Biofouling*. Springer Series on Biofilms, vol 4. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-69796-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-540-69796-1_12)

Hellio C, Maréchal J-P, Gama B a. PD a., Pereira RC, Clare a. S. 2009. *Natural marine products with antifouling activities*. Woodhead Publishing Limited.

Henrikson AA, Pawlik JR. 1995. A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *J Exp Mar Bio Ecol*. 194(2):157–165. doi:10.1016/0022-0981(95)00088-7.

International Maritime Organization (IMO). 2002. Anti-fouling systems. *Focus IMO*. 44(October 2001):1–31. doi:10.1097/TA.0b013e31817de3f4.

Iwata H, Tanabe S, Mizuno T, Tatsukawa R. 1995. High Accumulation of Toxic Butyltins in Marine Mammals from Japanese Coastal Waters. *Environ Sci Technol*. 29(12):2959–2962. doi:10.1021/es00012a011.

Jackson JBC, Buss L. 1975. Alleopathy and spatial competition among coral reef invertebrates. *Proc Natl Acad Sci*. 72(12):5160–5163. doi:10.1073/pnas.72.12.5160.

Kannan K, Falandysz J. 1997. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea. *Mar Pollut Bull.* 34(3):203–207. doi:10.1016/S0025-326X(96)00146-4.

Kiil S, Weinell CE, Yebra DM, Dam-Johansen K. 2007. Chapter 7 Marine biofouling protection: design of controlled release antifouling paints. Elsevier B.V.

Lehaitre M, Compère C. 2008. BIOFOULING and UNDERWATER MEASUREMENTS. Prot sensors against fouling.:463–493.

Limna Mol VP, Raveendran T V., Abhilash KR, Parameswaran PS. 2010. Inhibitory effect of Indian sponge extracts on bacterial strains and larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *Int Biodeterior Biodegrad.* 64(6):506–510. doi:10.1016/j.ibiod.2010.06.003.

Lin CH, Yeh YH, Lin WC, Yang MC. 2014. Novel silicone hydrogel based on PDMS and PEGMA for contact lens application. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 123:986–994. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.10.053.

Longo C, Trani R, Marzano CN, Mercurio M, Lazic T, Cotugno P, Santobianchi E, Gravina MF. 2021. Anti-fouling activity and toxicity of the Mediterranean alien sponge *Paraleucilla magna* Klautau, Monteiro & Borojevic, 2004 (Porifera, Calcarea). *PeerJ.* 9:1–18. doi:10.7717/peerj.12279.

Lord JP. 2017. Impact of seawater temperature on growth and recruitment of invasive fouling species at the global scale. *Mar Ecol.* 38(2):1–10. doi:10.1111/maec.12404.

McCarthy A, Osman RW, Whitlatch RB. 2007. Effects of temperature on growth rates of colonial ascidians: A comparison of *Didemnum* sp. to *Botryllus schlosseri* and *Botrylloides violaceus*. *J Exp Mar Bio Ecol.* 342(1 SPEC. ISS.):172–174. doi:10.1016/j.jembe.2006.10.036.

McLean EL. 2006. Ecology of the Encrusting Sponge *Desmapsamma anchorata*. M.S. Thesis.

Meese RJ, Tomich PA. 1992. Dots on the rocks: a comparison of percent cover estimation methods. *J Exp Mar Bio Ecol.* 165(1):59–73. doi:10.1016/0022-0981(92)90289-M.

Miranda AA, Almeida ACS, Vieira LM. 2018. Non-native marine bryozoans (Bryozoa: Gymnolaemata) in Brazilian waters: Assessment, dispersal and impacts. *Mar Pollut Bull.* 130(March):184–191. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.03.023.

Mohammed JS. 2015. Micro- and nanotechnologies in plankton research. *Prog Oceanogr.* 134(September):451–473. doi:10.1016/j.pocean.2015.03.010.

Oehlmann J, Bauer B, Minchin D, Schulte-Oehlmann U, Fioroni P, Markert B. 1998.

Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. *Asp Littorinid Biol.*:199–213. doi:10.1007/978-94-011-5336-2\_22.

Omae I. 2006. General aspects of natural products antifoulants in the environment. *Handb Environ Chem Vol 5 Water Pollut.* 5(PART O):227–262. doi:10.1007/698-5-057.

Orth RJ, Van Montfrans J. 1984. Epiphyte-seagrass relationships with an emphasis on the role of micrograzing: A review. *Aquat Bot.* 18(1–2):43–69. doi:10.1016/0304-3770(84)90080-9.

Paula AF de, Creed JC. 2004. Coral Reef Paper Two Species of the Coral *Tubastraea* (Cnidaria , Scleractinia) in Brazil: a Case of Accidental Introduction. *Coral Reef.* 74(1):175–183.

Puentes C, Carreño K, Santos-Acevedo M, Gómez-León J, García M, Pérez M, Stupak M, Blustein G. 2014. Anti-fouling Paints Based on Extracts of Marine Organisms from the Colombian Caribbean. 8(July):75–90. doi:1909-8642.

Puga CA, Torres ASS, Paiva PC, Yoneshigue-Valentin Y, Junqueira AOR. 2019. Multi-year changes of a benthic community in the mid-intertidal rocky shore of a eutrophic tropical bay (Guanabara Bay, RJ – Brazil). *Estuar Coast Shelf Sci.* 226(August 2018):106265. doi:10.1016/j.ecss.2019.106265.

Qian PY, Li Z, Xu Y, Li Y, Fusetani N. 2015. Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009–2014. *Biofouling.* 31(1):101–122. doi:10.1080/08927014.2014.997226.

Qi SH, Ma X. 2017. Antifouling compounds from marine invertebrates. *Mar Drugs.* 15(9). doi:10.3390/md15090263.

Quintana J, Brango-Vanegas J, Costa GM, Castellanos L, Arévalo C, Duque C. 2015. Marine organisms as source of extracts to disrupt bacterial communication: Bioguided isolation and identification of quorum sensing inhibitors from *Ircinia felix*. *Brazilian J Pharmacogn.* 25(3):199–207. doi:10.1016/j.bjp.2015.03.013.

Ribeiro SM, Rogers R, Rubem a C, Da Gama B a P, Muricy G, Pereira RC. 2013. Antifouling activity of twelve demosponges from Brazil. *Braz J Biol.* 73(3):501–6. doi:10.1590/S1519-69842013000300006.

RODRIGUES, V. A. *Esponja nativa é capaz de controlar Tubastraea spp. (Coral-sol) na Baía de Ilha Grande?*. 2019. 52f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Rützler K, Maldonado M, Piantoni C, Riesgo A. 2007. *Iotrochota* revisited: a new sponge and review of species from the western tropical Atlantic (Poecilosclerida:Iotrochotidae). *Invertebr Syst.* 21(2):173. doi:10.1071/is06040.

Sánchez-Lozano I, Hernández-Guerrero CJ, Muñoz-Ochoa M, Hellio C. 2019. Biomimetic approaches for the development of new antifouling solutions: Study of incorporation of macroalgae and sponge extracts for the development of new environmentally-friendly coatings. *Int J Mol Sci.* 20(19):1–18. doi:10.3390/ijms20194863.

SANTOS, S. J. C. Determinação do estado trófico a partir da aplicação dos índices o'boyle e trix nos compartimentos da Baía de Guanabara, RJ. 2015. 102f. Dissertação apresentada ao Curso de Pós – Graduação em Geociências da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Geoquímica Ambiental.

Schultz MP, Bendick JA, Holm ER, Hertel WM. 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling.* 27(1):87–98. doi:10.1080/08927014.2010.542809.

Selim MS, Shenashen MA, El-Safty SA, Higazy SA, Selim MM, Isago H, Elmarakbi A. 2017. Recent progress in marine foul-release polymeric nanocomposite coatings. *Prog Mater Sci.* 87:1–32. doi:10.1016/j.pmatsci.2017.02.001.

Silva AG, Fortunato HFM, Lôbo-Hajdu G, Fleury BG. 2017. Response of native marine sponges to invasive *Tubastraea corals*: a case study. *Mar Biol.* 164(4):1–11. doi:10.1007/s00227-017-3112-2.

Silva AG da, Paula AF de, Fleury BG, Creed JC. 2014. Eleven years of range expansion of two invasive corals (*Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*) through the southwest Atlantic (Brazil). *Estuar Coast Shelf Sci.* 141:9–16. doi:10.1016/j.ecss.2014.01.013.

Sjollema SB, Martínezgarcía G, Van Der Geest HG, Kraak MHS, Booij P, Vethaak AD, Admiraal W. 2014. Hazard and risk of herbicides for marine microalgae. *Environ Pollut.* 187:106–111. doi:10.1016/j.envpol.2013.12.019.

Sun JF, Han Z, Zhou XF, Yang B, Lin X, Liu J, Peng Y, Yang XW, Liu Y. 2013. Antifouling briarane type diterpenoids from South China Sea gorgonians *Dichotella gemmacea*. *Tetrahedron.* 69(2):871–880. doi:10.1016/j.tet.2012.10.102.

Umezawa T, Oguri Y, Matsuura H, Yamazaki S, Suzuki Masahiro, Yoshimura E, Furuta T, Nogata Y, Serisawa Y, Matsuyama-Serisawa K, et al. 2014. Omaezallene from red alga *Laurencia* sp.: Structure elucidation, total synthesis, and antifouling activity. *Angew Chemie - Int Ed.* 53(15):3909–3912. doi:10.1002/anie.201311175.

Wahl M. 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar Ecol Prog Ser.* 58:175–189.

Wahl M. 2008. Ecological lever and interface ecology: epibiosis modulates the interactions between host and environment. *Biofouling.* 24(6):427–438. doi:10.1080/08927010802339772.

Wang W, Cao Z. 2016. Opinion on the recent development of environmentally friendly marine anti-fouling coating. *Sci China Technol Sci.* 59(12):1968–1970. doi:10.1007/s11431-016-0800-4.

Willemsen PR. 1994. The screening of sponge extracts for antifouling activity using a bioassay with laboratory-reared cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Int Biodeterior Biodegrad.* 34(3–4):361–373. doi:10.1016/0964-8305(94)90094-9.

Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K. 2004. Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coatings.* 50(2):75–104. doi:10.1016/j.porgcoat.2003.06.001.

**ANEXO A** - Média das porcentagens de cobertura do verão e erros padrão ( $\pm$ ).

Tratamentos	Tempo de imersão	Biofilme	Alga turfo	<i>Bugula neritina</i>	<i>Bugulina turbinata</i>	Spionidae	Serpulidae	<i>A. amphitrite</i>
<b>Controle negativo</b>	<b>5 dias</b>	53,93 ( $\pm 9,52$ )	-----	1,68 ( $\pm 0,68$ )	-----	0,44 ( $\pm 0,29$ )	18,42 ( $\pm 3,80$ )	1,01 ( $\pm 0,49$ )
	<b>12 dias</b>	12,92 ( $\pm 3,74$ )	30 ( $\pm 7,29$ )	3,03 ( $\pm 0,93$ )	1,79 ( $\pm 1,55$ )	1,01 ( $\pm 0,68$ )	44,04 ( $\pm 6,04$ )	7,19 ( $\pm 1,90$ )
	<b>20 dias</b>	-----	63,42 ( $\pm 5,93$ )	0,56 ( $\pm 0,29$ )	4,07 ( $\pm 2,14$ )	-----	30,36 ( $\pm 5,17$ )	1,57 ( $\pm 0,97$ )
<b>Controle positivo</b>	<b>5 dias</b>	68,65 ( $\pm 8,07$ )	----	0,33 ( $\pm 0,29$ )	----	----	0,56 ( $\pm 0,33$ )	3,14 ( $\pm 0,86$ )
	<b>12 dias</b>	26,40 ( $\pm 4,75$ )	34,71 ( $\pm 10,50$ )	2,35 ( $\pm 0,68$ )	1,34 ( $\pm 0,70$ )	2,24 ( $\pm 1,05$ )	9,43 ( $\pm 1,91$ )	23,48 ( $\pm 4,81$ )
	<b>20 dias</b>	0,89 ( $\pm 0,53$ )	60,30 ( $\pm 6,52$ )	0,56 ( $\pm 0,39$ )	5,43 ( $\pm 1,94$ )	----	24,15 ( $\pm 4,53$ )	8,65 ( $\pm 6,84$ )
<b>Metanol</b>	<b>5 dias</b>	64,04 ( $\pm 8,48$ )	----	0,89 ( $\pm 0,42$ )	----	----	6,62 ( $\pm 1,40$ )	0,11 ( $\pm 0,09$ )
	<b>12 dias</b>	22,47 ( $\pm 5,48$ )	37,86 ( $\pm 7,57$ )	1,57 ( $\pm 0,41$ )	3,70 ( $\pm 2,13$ )	0,22 ( $\pm 0,19$ )	23,03 ( $\pm 3,95$ )	11,12 ( $\pm 1,95$ )
	<b>20 dias</b>	----	72,73 ( $\pm 6,31$ )	0,56 ( $\pm 0,33$ )	5,42 ( $\pm 3,21$ )	----	20,49 ( $\pm 4,06$ )	0,78 ( $\pm 0,58$ )
<b>Hexano</b>	<b>5 dias</b>	56,06 ( $\pm 9,32$ )	----	0,56 ( $\pm 0,39$ )	----	0,11 ( $\pm 0,09$ )	12,58 ( $\pm 1,83$ )	1,23 ( $\pm 0,26$ )
	<b>12 dias</b>	17,30 ( $\pm 7,44$ )	24,83 ( $\pm 6,63$ )	2,24 ( $\pm 0,70$ )	0,33 ( $\pm 0,29$ )	1,12 ( $\pm 0,70$ )	43,48 ( $\pm 5,87$ )	10,67 ( $\pm 3,08$ )
	<b>20 dias</b>	0,22 ( $\pm 0,19$ )	64,86 ( $\pm 6,75$ )	1,05 ( $\pm 0,55$ )	1,01 ( $\pm 0,46$ )	----	28,68 ( $\pm 6,56$ )	4,15 ( $\pm 1,76$ )



ANEXO B - Porcentagem de cobertura e erro padrão ( $\pm$ ) do outono

Tratamentos	Tempo de imersão	Biofilme	Alga turfo	<i>Bugula neritina</i>	<i>Bugulina turbinata</i>	Spionidae	Serpulidae	<i>Amphibalanus amphitrite</i>
<b>Controle negativo</b>	<b>7 dias</b>	64,03 ( $\pm 6,48$ )	----	----	----	0,25 ( $\pm 0,14$ )	----	----
	<b>15 dias</b>	39,54 ( $\pm 6,85$ )	51,02 ( $\pm 6,11$ )	0,25 ( $\pm 0,14$ )	2,80 ( $\pm 0,78$ )	2,04 ( $\pm 0,34$ )	4,33 ( $\pm 0,57$ )	----
	<b>21 dias</b>	18,11 ( $\pm 4,14$ )	37,5 ( $\pm 5,42$ )	6,37 ( $\pm 1,37$ )	3,06 ( $\pm 0,89$ )	6,63 ( $\pm 0,99$ )	21,17 ( $\pm 2,21$ )	7,14 ( $\pm 2,34$ )
	<b>31 dias</b>	11,98 ( $\pm 4,32$ )	30,61 ( $\pm 4,91$ )	1,53 ( $\pm 0,85$ )	4,59 ( $\pm 2,11$ )	5,10 ( $\pm 0,82$ )	39,03 ( $\pm 3,41$ )	7,14 ( $\pm 1,98$ )
<b>Controle positivo</b>	<b>7 dias</b>	53,86 ( $\pm 7,19$ )	----	----	----	----	----	----
	<b>15 dias</b>	43,75 ( $\pm 7,36$ )	47,02 ( $\pm 5,86$ )	0,29 ( $\pm 0,16$ )	3,57 ( $\pm 0,68$ )	1,19 ( $\pm 0,33$ )	4,16 ( $\pm 1,76$ )	----
	<b>21 dias</b>	19,34 ( $\pm 4,33$ )	25,59 ( $\pm 5,34$ )	3,86 ( $\pm 1,27$ )	7,14 ( $\pm 1,65$ )	2,67 ( $\pm 0,42$ )	22,61 ( $\pm 4,43$ )	8,03 ( $\pm 0,88$ )
	<b>31 dias</b>	12,5 ( $\pm 3,75$ )	34,22 ( $\pm 6,89$ )	0,29 ( $\pm 0,16$ )	7,73 ( $\pm 4,16$ )	9,52 ( $\pm 0,80$ )	29,16 ( $\pm 4,22$ )	6,54 ( $\pm 1,38$ )
<b>Metanol</b>	<b>7 dias</b>	69,38 ( $\pm 5,36$ )	----	----	----	----	----	----
	<b>15 dias</b>	32,65 ( $\pm 6,62$ )	56,12 ( $\pm 5,76$ )	1,02 ( $\pm 0,36$ )	1,78 ( $\pm 0,37$ )	3,06 ( $\pm 1,06$ )	5,35 ( $\pm 0,61$ )	----
	<b>21 dias</b>	25,25 ( $\pm 4,94$ )	35,45 ( $\pm 4,61$ )	9,69 ( $\pm 1,73$ )	1,02 ( $\pm 0,36$ )	3,31 ( $\pm 0,63$ )	19,13 ( $\pm 2,87$ )	6,12 ( $\pm 0,68$ )
	<b>31 dias</b>	17,34 ( $\pm 3,23$ )	32,65 ( $\pm 4,90$ )	2,04 ( $\pm 0,82$ )	5,61 ( $\pm 2,49$ )	7,14 ( $\pm 0,81$ )	31,63 ( $\pm 4,43$ )	3,57 ( $\pm 0,53$ )
<b>Hexano</b>	<b>7 dias</b>	74,10 ( $\pm 5,45$ )	----	----	----	0,29 ( $\pm 0,16$ )	----	----
	<b>15 dias</b>	24,10 ( $\pm 5,84$ )	61,01 ( $\pm 5,54$ )	0,29 ( $\pm 0,16$ )	3,57 ( $\pm 0,63$ )	4,46 ( $\pm 1,31$ )	6,54 ( $\pm 0,71$ )	----
	<b>21 dias</b>	19,34 ( $\pm 4,46$ )	44,34 ( $\pm 5,74$ )	7,14 ( $\pm 1,54$ )	1,48 ( $\pm 0,54$ )	3,86 ( $\pm 0,60$ )	19,64 ( $\pm 1,43$ )	4,16 ( $\pm 0,76$ )
	<b>31 dias</b>	11,90 ( $\pm 0,73$ )	27,67 ( $\pm 5,48$ )	0,89 ( $\pm 0,5$ )	7,14 ( $\pm 2,96$ )	8,03 ( $\pm 0,99$ )	37,79 ( $\pm 3,70$ )	6,54 ( $\pm 1,30$ )

**ANEXO C - Valor de p das PERMANOVAS AOS PARES verão e outono**

Tratamentos (Verão)	Tempo de Imersão	P(perm)	Tratamentos (Outono)	Tempo de imersão	P(perm)
CN x CP	5 dias	0,001 *	CN x CP	7 dias	0,658
CN x MeOH		0,313	CN x MeOH		0,667
CN x Hex		0,381	CN x Hex		0,658
CP x MeOH		0,001 *	CP x MeOH		0,341
CP x Hex		0,001 *	CP x Hex		0,151
MeOH x Hex		0,051 *	MeOH x Hex		0,64
CN x CP	12 dias	0,081	CN x CP	15 dias	0,639
CN x MeOH		0,542	CN x MeOH		Negativo
CN x Hex		Negativo	CN x Hex		0,603
CP x MeOH		0,322	CP x MeOH		0,24
CP x Hex		0,1	CP x Hex		0,117
MeOH x Hex		0,752	MeOH x Hex		0,731
CN x CP	20 dias	0,884	CN x CP	21 dias	0,073
CN x MeOH		0,459	CN x MeOH		0,228
CN x Hex		0,607	CN x Hex		0,624
CP x MeOH		0,64	CP x MeOH		0,145
CP x Hex		0,874	CP x Hex		0,204
MeOH x Hex		0,648	MeOH x Hex		0,875
			CN x CP	31 dias	0,797
			CN x MeOH		0,564
			CN x Hex		0,882
			CP x MeOH		0,891
			CP x Hex		0,907
			MeOH x Hex		0,772

Legenda: \* valores significativos no teste aos pares na PERMANOVA, tratamento alinhado com o tempo

## ANEXO D - Teste T para comparar tratamentos do verão x outono

Organismos	Tempo de imersão	Tratamentos	Valor de p	Tratamentos	Valor de p	Tratamentos	Valor de p	Tratamentos	Valor de p
<b>Biofilme</b>	<b>1ª semana</b>	<b>CN</b>	0,549	<b>CP</b>	0,360	<b>MeOH</b>	0,885	<b>Hex</b>	0,276
	<b>2ª semana</b>		0,077		0,180		0,467		0,628
	<b>3ª semana</b>		0,050*		0,063		0,029*		0,062*
<b>Alga turfo</b>	<b>1ª semana</b>	<b>CN</b>	----	<b>CP</b>	----	<b>MeOH</b>	----	<b>Hex</b>	----
	<b>2ª semana</b>		0,143		0,456		0,198		0,012*
	<b>3ª semana</b>		0,042*		0,014*		0,005*		0,144
<b><i>Bugula neritina</i></b>	<b>1ª semana</b>	<b>CN</b>	0,062	<b>CP</b>	0,458	<b>MeOH</b>	0,195	<b>Hex</b>	0,358
	<b>2ª semana</b>		0,032*		0,033*		0,497		0,097
	<b>3ª semana</b>		0,056		0,210		0,025*		0,078
<b><i>Bugulina turbinata</i></b>	<b>1ª semana</b>	<b>CN</b>	----	<b>CP</b>	----	<b>MeOH</b>	----	<b>Hex</b>	----
	<b>2ª semana</b>		0,687		0,138		0,536		0,005*
	<b>3ª semana</b>		0,784		0,642		0,343		0,647
<b>Spionidae</b>	<b>1ª semana</b>	<b>CN</b>	0,682	<b>CP</b>	----	<b>MeOH</b>	----	<b>Hex</b>	0,502
	<b>2ª semana</b>		0,356		0,534		0,187		0,129
	<b>3ª semana</b>		0,010*		0,017*		0,026*		0,015*
<b>Serpulidae</b>	<b>1ª semana</b>	<b>CN</b>	0,002*	<b>CP</b>	0,177	<b>MeOH</b>	0,004*	<b>Hex</b>	0,000*
	<b>2ª semana</b>		0,000*		0,182		0,004*		0,000*
	<b>3ª semana</b>		0,273		0,878		0,878		0,293
<b><i>Amphibalanus amphitrite</i></b>	<b>1ª semana</b>	<b>CN</b>	0,108	<b>CP</b>	0,012*	<b>MeOH</b>	0,396	<b>Hex</b>	0,003*
	<b>2ª semana</b>		0,010*		0,002*		0,001*		0,015*
	<b>3ª semana</b>		0,240		0,954		0,001*		0,997

Legenda: \* valores significativos no Teste T. CN: controle negativo, CP: controle positivo, MeOH: metanol, Hex: hexano.