

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

Capitão-Tenente (EN) William Romão Batista

Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM.

Maria Helena Campos Baeta Neves

Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM.

André Luiz Mazzei Albert

Departamento de Química Analítica do Instituto de Química – IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Rosângela Sabbatini Cerqueira Lopes

Departamento de Química Analítica do Instituto de Química – IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Jarí Nóbrega Cardoso

Departamento de Química Analítica do Instituto de Química – IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Cláudio Cerqueira Lopes

Departamento de Química Analítica do Instituto de Química – IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Resumo

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 que 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 lipídicos 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.

Palavras-chave

Antiincrustante. Biocida natural. Glicerofosfolipídios. Bioincrustação. Fator Ativador de Plaquetas (PAF).

Antifouling activity evaluation of the glycerophospholipids isolated from marine organisms from Arraial do Cabo region – Rio de Janeiro – Brazil

Abstract

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 (tributil-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.

Keywords

Antifouling. Natural biocide. Glycerophospholipids. Fouling. Platelet Activation Factor (PAF)

INTRODUÇÃO

Navios que trafegam ou permanecem em áreas tropicais ou subtropicais 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.

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 promover a diminuição da velocidade final da embarcação e 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, sendo estimado 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).

O fenômeno natural denominado de bioincrustação consiste de um processo natural, que ocorre com qualquer estrutura quando posta em contato com água onde exista a presença de microorganismos. 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, cracas e mexilhões. Tecnicamente o processo consiste de quatro estágios, não rigorosamente seqüenciais, porém, interdependentes.

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 (Figura 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

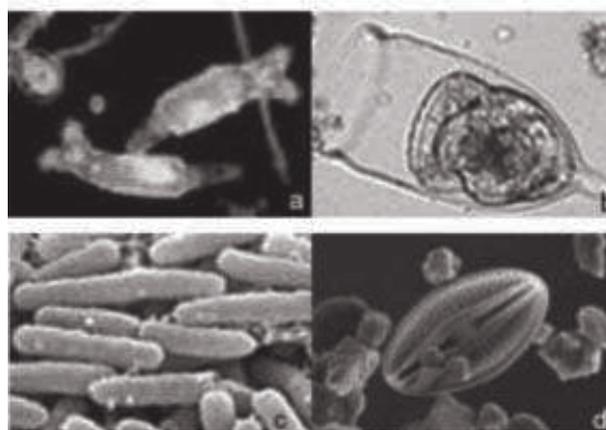


FIGURA 1
Rotíferas, Protozoário, Bactérias e Diatomáceas (na seqüência).

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

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 cracas, 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.

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.

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

Entre as décadas de 70 a 90, pesquisas demonstraram a correlação de deformidades em moluscos com a

presença de TBT no ambiente marinho, e que, para alguns organismos, concentrações tão baixas como 1 (ng/L) mostravam-se tóxicas (ARMSTRONG *et al.*, 2000). Isto levou o Comitê de Proteção ao Meio Ambiente Marinho – MEPC, pertencente a Organização Marítima Internacional – IMO, adotar uma resolução recomendando que os governos adotassem medidas para restringir o uso de tintas antiincrustantes com base no TBT, culminado na assembléia da IMO em 1999. Nesta assembléia, foi estabelecido um conjunto de ações, vigorando a partir 1º de janeiro 2003, para assegurar uma proibição global da aplicação dos compostos de organo-estanho que agem como biocidas em sistemas de pintura antiincrustante em navios e a proibição completa da presença de tais compostos até 1º de janeiro 2008.

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 componente de tintas marítimas antiincrustantes usadas na prevenção da bioincrustação, considerando 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 antiincrustante.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia antiincrustante de substâncias do grupo dos alquilglicerofosfolipídios análogos ao composto denominado *Platelet Activating Factor* (PAF) ou Fator Ativador de Plaquetas, que reconhecidamente possui potente ação celular (STAFFORINI *et al.*, 1997; DENNIS, 1994; VENABLE *et al.* 1993; PRESCOTT *et al.* 1990; STREMLER *et al.*, 1989; DEMOPOULOS *et al.*, 1979; BLANK *et al.*, 1979).

A hipótese básica assume que tais compostos, ao alcançar os invólucros celulares dos microorganismos, possam: (i) devido à característica hidrofóbica de seu radical alquíldico, ser facilmente adsorvido por camadas de peptidoglicanos, polissacarídeos, lipo-polissacarídeos ou fosfolipídios presentes na membrana plasmática e, agindo como um surfactante, causar danos

à 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.

A idéia da utilização de tais PAF-análogos como agente antiincrustante, tem como princípio o que acontece com outros tipos de células utilizadas na área médica e farmacológica (MARATHE *et al.*, 2001; BOTTTSI *et al.*, 1998; KULIKOV e MUZYA, 1997; VENABLE *et al.* 1993), que se baseia 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 trabalho se limitou 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.

METODOLOGIA

PAF-análogos disponíveis comercialmente e extraídos de organismos marinhos, tais como mexilhão e esponja marinha, 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 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 (Figura 2), *Perna perna* (Linnaeus, 1758), e três espécies de esponjas marinhas (Figura 3), *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 (FOLCH *et al.*, 1957) (Figura 4).



FIGURA 2
Mexilhão *Perna perna*



FIGURA 3
Esponjas marinhas *Aplysina fulva*, *Amphimedon viridis* e *Arenosclera brasiliensis* (Na seqüência).

O primeiro grupo de cada espécie, que não sofreu nenhuma inoculação e serviu como referência, teve o seu processo de extração iniciado imediatamente. O segundo grupo foi transferido para recipientes contendo água do mar filtrada, contendo baixos teores de organismos planctônicos e material orgânico particulado, mantida sob aeração forçada,

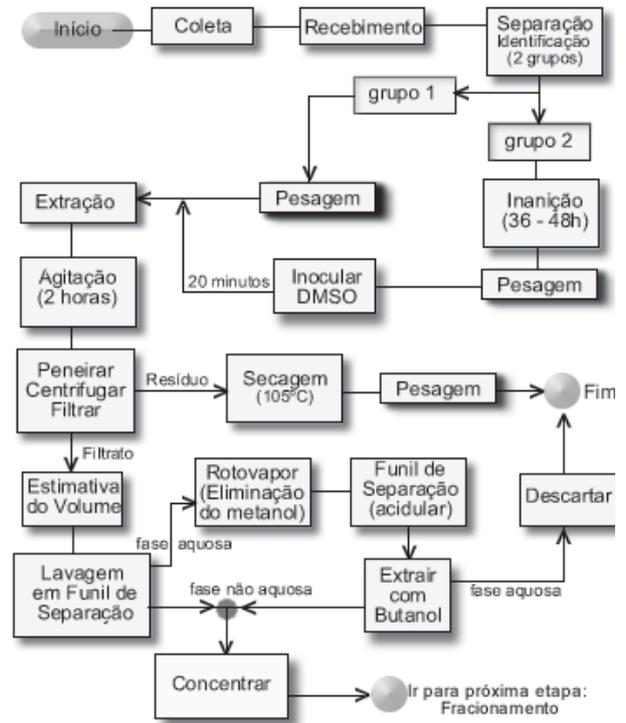


FIGURA 4
Fluxograma do processo de extração

permanecendo sob inanição por 36 horas para o início do processo de indução ao estresse, sendo, em seguida, inoculados com solvente dimetil-sulfóxido (DMSO).

Os extratos lipóides, obtidos após concentração, foram fracionados usando uma coluna cromatográfica de 1 cm de diâmetro, preenchida com 10 gramas de sílica (250 – 115 mesh), visando separar a fração mais polar contendo os glicerosfolipídios de interesse.

As frações mais polares dos extratos iniciais, bem como uma solução do branco de reagentes e uma solução contendo um padrão de PAF-análogo (1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine) foram incorporadas a gel de ágar-ágar e, então, usados para recobrir unilateralmente lâminas de microscopia (2,6 x 7,6 cm). As lâminas, assim preparadas, foram fixadas em painéis de acrílico (65 x 55 cm) e então dispostos em um tanque contendo água do mar in natura (Figura 5, a seguir).

Os painéis, quatro ao total, foram retirados individual e seqüencialmente a cada 48 horas. As lâminas foram reservadas para posterior avaliação quanto ao grupo e quantidade de microorganismos aderidos por meio de microscopia de epifluorescência.



FIGURAS 5
Tanque e painel utilizados nos experimentos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na apresentação gráfica dos dados (Figura 6), onde estão correlacionados o número total de bactérias gram-negativas aderidas por cm^2 de lâmina dos extratos inoculados e referência de cada espécie, tendo por base de comparação os valores obtidos pelos controles branco e padrão, 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.

A avaliação dos dados estatísticos, onde foi realizada uma abordagem não paramétrica semelhante ao teste de Friedman, 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) – cálculo aqui não apresentado – demonstrou que os extratos que possuíam indícios de PAF-análogos não apresentaram uma ação antiincrustante comparável ao controle do padrão, 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.

Com 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

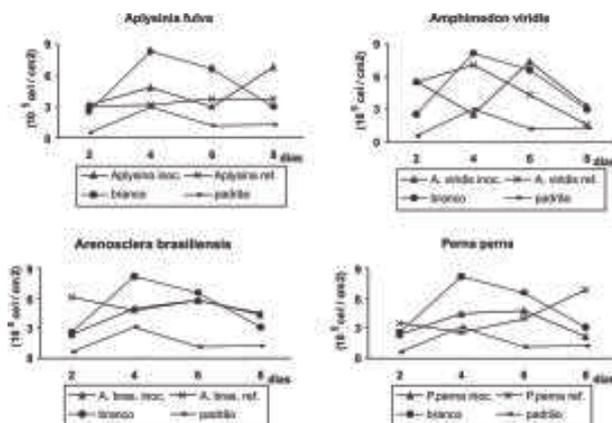


FIGURA 6
Número total de microorganismos aderidos nos extratos em comparação aos controles branco e padrão.

sinalização celular. Por outro lado, devido à 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.

CONCLUSÃO

A utilização de um composto análogo ao PAF como um agente antiincrustante, apresenta-se como uma promissora perspectiva na substituição do TBT, pois apresenta uma molécula de fácil síntese, ao contrário de outros biocidas naturais já pesquisados, e sua possível atuação como 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.

O presente trabalho serve como base para futuras avaliações da atividade antiincrustante de outros PAF-análogos, visando uma substituição plena, definitiva e comercialmente disponível do biocida TBT.

REFERÊNCIAS.

- 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
- 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.
- BOTTTSI, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- MARATHE, G.K.; SILVA, A.R.; NETO, H.C.C.F.; *et al.* (2001). *Lyso-phosphatidylcholine and lyso-PAF display PAF-like activity derived from contaminating phospholipids*. Journal of Lipid Research. Vol.42. pp 1430 – 1437.
- MILLER, J.N. e MILLER, J.C. (2000). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 4ª edição. Pearson Prentice Hall. London.
- PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. e MCINTYRE, T.M. (1990). *Platelet-activating factor*. The Journal of Biological Chemistry. Vol.265. Nº.29. pp 17381 – 17384.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- ZAR, J.H. (1996). *Biostatistical Analysis*. 3ª edição. New Jersey – USA.