

Claudia Guimarães

Efeito do ultrassom no comportamento natatório de larvas meroplanctônicas em fase de assentamento

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Orientador:
Prof. Dr. Rubens Mendes Lopes

São Paulo

2019

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Efeito do ultrassom no comportamento natatório de larvas meroplanctônicas em fase de
assentamento

Claudia Guimarães

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área
de Oceanografia Biológica.

VERSÃO CORRIGIDA

Julgada em ___/___/___

Prof(a). Dr(a)

Conceito

Prof(a). Dr(a)

Conceito

Prof(a). Dr(a)

Conceito

À Deus, aos meus pais e minha irmã,

Eu não sei onde estaria sem vocês

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rubens Mendes Lopes pela oportunidade de trabalhar e aprender no LAPS/ IOUSP.

Ao Prof. Dr. Julio Cezar Adamowski (Escola Politécnica da USP), Eng. Nilson Franceschetti (Escola Politécnica da USP) e Prof. Dr. Marco Aurélio Brizzott (Instituto de Física da USP), meus agradecimentos pelos ensinamentos sobre ultrassom e empréstimo dos equipamentos.

Ao Dr. Felipe Neves e M.Sc Leandro Ticlia pelo auxílio quanto aos meus dados. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e ajuda. Sou eternamente grata.

À Prof. Dra. Flávia Saldanha, à equipe da EcoReef, ao Dr. Damián Mizrahi (LAPS/ IOUSP) e ao Professor Anthony Clare (Newcastle University), pelas ajudas com relação ao cultivo de cracas.

Aos colegas de laboratório, Silvana, Luciana, Gelaysi, Maiá, Caroline, Rafaella, Cássia, Carolina, Amanda e Milena, pelos momentos de descontração.

A todos os funcionários da Base de Ubatuba, que tornaram possível a realização do meu trabalho e à secretaria de pós-graduação que, em todo momento, me auxiliaram com dúvidas e o que mais eu precisasse.

A Martinha, que a qualquer momento, com qualquer problema, se prontificava, me ajudava e ainda me arrancava um sorriso.

A Yumi e Josi pelos incentivos e momentos de lazer e descanso.

Às amigas Alessandra e Yonara, pela jornada até aqui e, espero, por toda a vida.

Aos demais amigos: obrigada por me ajudarem, me incentivando ou me distraindo nos momentos de descanso.

Às minhas tias Marilene e Priscila, que me deram todo apoio incondicional, desde o início, e sei que por tudo o mais.

Ao André, meu companheiro de vida. Pelo amor, companheirismo, amizade e tudo o que vem junto.

À minha irmã, Rebecca, por todos os bons momentos que me ajudaram.

Aos meus pais, Elidamar e Onésimo, cujas palavras faltam para agradecer o suficiente. "Eu amo vocês" é pouco perto do que são para mim. "Obrigada" não externa minha gratidão.

À Deus, pelo amor, compaixão e Graça mostradas a mim em todo o tempo.

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

Sumário

I. Lista de figuras.	vi
II. Lista de tabelas.	ix
III. Resumo	x
IV. Abstract.	xi
1. Introdução.....	1
2. Materiais e métodos	9
3. Resultados.....	19
4. Discussão.....	27
5. Considerações finais	34
6. Referências bibliográficas	36

I - Lista de figuras

- Figura 1 – Aquário de vidro com dimensões 21cm x 44 cm x 27 cm contendo água do mar filtrada (20 μm) e pedaço de rocha do costão com aproximadamente 30 cracas adultas *Tetraclita stalactifera*. A aeração foi garantida por duas bombas de aeração com pedras porosas, que podem ser visualizadas na foto.....10
- Figura 2 – Sistema de cultivo de larvas cypris. O aquário de vidro à direita contém as cracas adultas e os baldes cinzas são o local de crescimento dos náuplios, contendo 8 litros de água do mar filtrada e com densidade de 1 náuplio.mL⁻¹..... 11
- Figura 3 - Espécime de craca adulta da espécie *Tetraclita stalactifera* coletada para o cultivo de larva cypris (A); espécime de larva cypris cultivada usada nos experimentos (B)..... 11
- Figura 4 – Esquema da montagem do sistema óptico 3D onde: (A) LED Infravermelho; (B) Lente colimadora; (C) Lente focalizadora; (D) Câmera; (O) Objeto..... 12
- Figura 5 – Montagem utilizada para o mapeamento acústico dentro do aquário de quartzo utilizado para os experimentos. Na figura podem ser visualizados: Transdutor (A); Aquário de quartzo com o hidrofone (B); Osciloscópio usado para monitorar as pressões acústicas (C). 14
- Figura 6 - Interface do programa LPD (LAPS Plankton Recorder) durante a fase de detecção da larva cypris no vídeo 15
- Figura 7 - Interface do programa LPD com o plugin de trajetória à direita, mostrando exemplos de trajetórias detectadas no vídeo. 16
- Figura 8 - Exemplos de trajetórias 3D geradas a partir dos dados de posição obtidos com o programa LPD Tracking. As reconstruções foram feitas utilizando o programa MATLAB. Os gráficos representam trajetórias obtidas para cada um dos tratamentos, sendo "sem ultrassom" (A), 10 kPa (B) e 15 kPa (C). As cores das trajetórias indicam a transição dos pontos no tempo, sendo os pontos azuis os pontos iniciais e os vermelhos mais tardios. 16
- Figura 9 – Valores de pressão acústica ao longo do eixo vertical do aquário medidos com um hidrofone conectado a um osciloscópio. Os valores de pressão acústica foram medidos em kPa e a distância do eixo Y foi medida em mm, sendo que o 0 corresponde ao substrato e 18 corresponde à última medição possível com o hidrofone, próximo à superfície. 19

Figura 10 - Distribuição dos valores de velocidades instantâneas ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$) para tratamento, em cada uma das 4 projeções. O cinza escuro representa o controle sem ultrassom, o cinza claro representa o tratamento com 10 kPa e o verde representa 15 kPa. A barra mais escura representa a mediana e as barras mais claras indicam os limites superiores e inferiores dos intervalos interquartis. Na parte superior do gráfico estão apresentados os valores das medianas \pm intervalo interquartil. Cada um dos pontos no gráfico representa um conjunto de pontos das trajetórias para o cálculo das velocidades. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e NS denota "não significativo", sendo que * representa $p = 0,05$; ** representa $p = 0,01$; *** representa $p < 0,01$. (KW 26,54; $p = 0,01$ - 3D; KW 3,47; $p < 0,01$ - XY; KW 29,5; $p = 0,54$ - XZ; KW 31,51; $p < 0,01$ - YZ).....21

Figura 11 - Distribuição dos valores de NGDR para cada tratamento, em cada uma das 4 projeções. O cinza escuro representa o controle sem ultrassom, o cinza claro representa o tratamento com 10 kPa e o verde representa 15 kPa. A barra mais escura representa a mediana e as barras mais claras indicam os limites superiores e inferiores dos intervalos interquartis. Na parte superior do gráfico estão apresentados os valores das medianas \pm intervalo interquartil. Cada um dos pontos no gráfico representa um conjunto de pontos das trajetórias para o cálculo do NGDR. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e NS denota não significativo, sendo que * representa $p = 0,05$; ** representa $p = 0,01$; *** representa $p < 0,01$. (KW 5,67; $p \leq 0,05$ - 3D; KW 3,47; $p = 0,17$ - XY; KW 29,5; $p < 0,01$ - XZ; KW 2,65; $p = 0,27$ - YZ).....22

Figura 12 - Distribuição dos ângulos de rotação das larvas para cada tratamento, em cada plano. O cinza escuro representa o controle sem ultrassom, o cinza claro representa o tratamento com 10 kPa e o verde representa 15 kPa. O tamanho das barras indica a frequência do ângulo dentro da trajetória. Barras maiores indicam uma maior frequência do ângulo, assim como barras menor indicam menores frequências. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e NS denota "não significativo", sendo que * representa $p = 0,05$; ** representa $p = 0,01$; *** representa $p < 0,01$. As diferenças estatísticas entre os tratamentos, para as projeções, se encontram na tabela 1.24

Figura 13 - Figura 13 - (A) Mapas de calor representando a distribuição espacial das larvas cypris para cada um dos tratamentos em relação às três regiões pré-definidas: substrato, coluna de água e superfície. Para cada mapa, foram usados todos os pontos das trajetórias, para cada tratamento. O eixo x e o eixo y se referem às posições nos respectivos eixos,

medidos em mm, as linhas pontilhadas indicam a altura (em mm) dos limites estabelecidos para as três regiões do aquário e as linhas contínuas internas representam o limite das bordas do aquário. Os pontos do gráfico se referem à frequência de pontos das trajetórias encontrados naquela posição, em escala de log. (B) Comparações entre a porcentagem de tempo das larvas passadas em cada uma das regiões distintas. Cada gráfico corresponde ao mesmo tratamento do diagrama na parte (A). No eixo x, cada número se refere à uma região (1 = substrato; 2 = coluna de água; 3 = superfície), e no eixo y se encontram os valores de porcentagem de permanência da larva, até 100%. Os números acima de cada uma das barras se referem ao valor de porcentagem média \pm erro padrão. Para a comparação entre os tratamentos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn e para a comparação dentro dos tratamentos foi utilizado o teste de Wilcoxon. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e NS denota "não significativo", sendo que * representa $p = 0,05$; ** representa $p = 0,01$; *** representa $p < 0,01$26

II - Lista de tabelas

Tabela 1 - Resultados do teste estatístico de Mardia-Watson-Wheeler comparando a frequência dos ângulos entre cada um dos tratamentos, para cada um dos planos. A comparação foi feita entre o controle e cada um dos tratamentos e entre os dois tratamentos. SU = sem ultrassom23

Tabela 2 - Resultados do teste estatístico de Kuiper comparando a homogeneidade da distribuição dos ângulos para cada um dos planos. SU = sem ultrassom25

III - Resumo

A bioincrustação é a acumulação de organismos em superfícies. Na indústria naval, as consequências desse fenômeno são deletérias, levando a buscas de métodos para frear essa acumulação. Com o uso de muitas tintas anti-incrustantes biocidas tendo sido proibidas, novos métodos têm sido explorados, e o ultrassom tem mostrado boas perspectivas. Embora a maioria dos trabalhos envolvendo a exploração da eficácia de novos métodos se baseiem em estudos de assentamento, os estudos de comportamento têm crescido como forma de explicar os mecanismos de ação desses novos métodos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo observar se existem alterações comportamentais durante o processo pré-assentamento de larvas cypris de cirripédios. Através de filmagens em um sistema óptico tridimensional, foram obtidas as trajetórias 3D das larvas cypris com e sem a aplicação de ultrassom, com duas pressões distintas (10 e 15 kPa) e aspectos comportamentais dessas larvas foram comparados. Os resultados mostraram diferenças significativas no comportamento das larvas entre o controle e a pressão de 10 kPa, com alterações na velocidade da larva, no índice de tortuosidade (NGDR) e nos ângulos de rotação da larva. Neste nível de pressão, a larva permaneceu mais tempo na coluna de água do que explorando o substrato. Com 15 kPa, contudo, não houve diferenças quando comparado com o controle, e as larvas expostas a essa pressão acústica apresentaram comportamentos similares às que não tiveram exposição ao ultrassom. Sugere-se que, para pressões mais baixas, a vibração do substrato pelas ondas sonoras o tornaria não atrativo à larva, e dessa forma os comportamentos observados indicariam rejeição do substrato. Para a pressão mais alta, haveria algum nível de injúria da larva e seu comportamento estaria relacionado à sua desorientação durante a fase pré-assentamento, ao invés de rejeição do substrato.

Palavras-chave: Bioincrustação; Métodos anti-incrustantes; larvas cypris; comportamento pré-assentamento; trajetórias tridimensionais

IV - Abstract

Biofouling is the accumulation of organisms on surfaces. In the shipping industry, the consequences of this phenomenon are deleterious, leading to the search for methods to curb this accumulation. With the use of many biocidal antifouling paints being banned, new methods have been explored, and ultrasound has shown good prospects. Although most work on exploring the effectiveness of new anti-fouling methods is based on settlement studies, behavioral studies have been developed as a way of explaining the mechanisms of action of these new methods. The present study aimed to observe if there are behavioral changes during the pre-settlement process of cypris larvae with and without ultrasound application. Through filming in a three-dimensional optical system, the 3D trajectories of cypris larvae were obtained with and without ultrasound application, with two distinct pressures (10 and 15 kPa) and behavioral aspects of these larvae were compared. The results showed significant differences in larval behavior between control and 10 kPa pressure, with changes in larval velocity, tortuosity index (NGDR) and larval rotation angles. At this pressure level, the larvae stayed longer in the water column than exploring the substrate. At 15 kPa, however, there were no differences compared to the control, and larvae exposed to this acoustic pressure showed similar behaviors to those without ultrasound exposure. At lower pressures, it is suggested that vibration of the substrate by sound waves would make it unattractive to the larva, and thus the observed behaviors would indicate substrate rejection. For the higher pressure, there would be some level of larval injury and its behavior would be related to its disorientation during the pre-nesting phase rather than substrate rejection.

Key-words: Biofouling; antifouling methods; cyprid larvae; pre-settlement behaviour; three-dimensional tracking

1. Introdução

A bioincrustação marinha é definida como a acumulação de organismos em superfícies submersas, como cascos de navios, sensores oceanográficos, bóias, podendo também afetar estruturas internas de grandes embarcações, como o caso de canos e condutas (Benson *et al*, 1973). São diversos os efeitos causados pela bioincrustação, e esses efeitos apresentam consequências tanto no âmbito econômico quanto ambiental e social, fortalecendo a necessidade de desenvolvimento de medidas preventivas aos efeitos da bioincrustação.

Um dos grandes impactos da bioincrustação ocorre na indústria naval, particularmente com as grandes embarcações. O efeito mais conhecido advindo da bioincrustação é na propulsão de navios (Yebra *et al*, 2004). A presença dos organismos nos cascos de navios aumenta o atrito entre a água e a superfície do navio, levando ao aumento da força de arrasto necessária para o seu deslocamento, e, conseqüentemente, elevando o seu gasto de combustível (Schultz *et al*, 2011). O gasto com a manutenção da frota marinha americana, isto é, docagem, aplicação e manutenção de tintas anti-incrustantes, limpeza do casco e combustível foi estimado em 56 milhões de dólares por ano, apenas para uma classe de navios (Schultz *et al*, 2011). Dentre todos os gastos com manutenção, o maior deles continua sendo o aumento do uso de combustível, que pode chegar a ser 10,3% maior em uma embarcação incrustada do que em uma embarcação limpa (Schultz *et al*, 2011).

A colonização das superfícies submersas em água do mar ocorre em sucessão, onde algumas etapas podem ser distinguidas: formação do filme de condicionamento, formação do biofilme, colonização pelos organismos microincrustantes e colonização pelos organismos macroincrustantes (Lejars *et al*, 2012). A formação do filme de condicionamento ocorre dentro de minutos após a imersão da superfície na água, com a absorção de matéria orgânica dissolvida (Callow e Callow, 2002). Com a absorção desses compostos, as propriedades físico-químicas da superfície se alteram (Qian *et al*, 2007), facilitando a sua colonização por bactérias, algas unicelulares e cianobactérias, o que constitui o biofilme, ou microincrustação (Callow e Callow, 2002).

Sobre esse biofilme, pode se formar uma comunidade complexa, que constitui a última etapa da sucessão da bioincrustação (Lejars *et al*, 2012), comumente chamada de macroincrustação, por se tratar de organismos de maiores dimensões (Callow e Callow,

2011). Nessa comunidade, podem ser encontrados macroalgas, esponjas, anêmonas, tunicados, cracas, mexilhões, vermes tubulares, entre outros (Callow e Callow, 2002). O processo de bioincrustação é dinâmico e não necessariamente segue uma ordem certa (Lejars *et al*, 2012). Além disso, a sua composição é variável conforme a localização geográfica, substrato, estação e interações ecológicas entre os organismos (Callow e Callow, 2011).

A comunidade incrustante é bastante diversa. Uma lista com dois mil organismos incrustantes foi feita em 1952 (WHOI, 1952), e, atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil espécies de organismos incrustantes (Yebra *et al*, 2004), dentro dos quais os macroincrustantes mais comuns em embarcações são as algas, vermes tubulares, briozoários, mexilhões e, principalmente, cracas (Bressy e Lejars, 2014).

As cracas são crustáceos bentônicos pertencentes à infraclasse Cirripedia, podendo ser pedunculados ou não, e são encontrados aderidos a substratos duros, ou até mesmo a outros organismos (Newman e Abbott, 1980). Apesar de serem bentônicas quando adultas, os estágios larvais das cracas são planctônicos, sendo os seis primeiros estágios naupliares e o sétimo estágio uma larva cypris (Walley, 2016). A larva cypris é o estágio larval final dos cirripédios e é adaptada para a localização de um local apropriado para o assentamento. A maioria de suas estruturas sensoriais, incluindo o disco adesivo utilizado para a fixação da larva nas superfícies, se encontra entre os terceiros e quartos segmentos da antênula. Essas estruturas sensoriais são usadas para localizar "pistas" ou "pegadas" deixadas por outras larvas durante o processo de adesão temporária (Phang *et al*, 2008; Aldred *et al*, 2013), que precede o assentamento permanente. O período pré-assentamento, portanto, é um dos pontos-chave nas pesquisas de medidas antiincrustantes atuais, que visam impedir o assentamento das larvas cypris, ao contrário da remoção dos adultos (Aldred e Clare, 2008).

O crescente uso da indústria do transporte marinho para o comércio global, que compreende 80% das transações comerciais, em volume, e mais de 70% em valor comercial (UNCTAD, 2017), aumenta a urgência no desenvolvimento de novas medidas antiincrustantes. Diante das consequências deletérias advindas da presença de bioincrustação, tanto do ponto de vista de desempenho, quanto biológico e econômico, medidas de prevenção à formação dessa comunidade têm sido aplicadas, desde o estabelecimento das primeiras embarcações (WHOI, 1952). Uma das primeiras formas de proteção contra a bioincrustação empregada foi a cobertura das embarcações com cobre, que apresentava certo sucesso na sua prevenção. Isto impulsionou o aumento das buscas por soluções alternativas efetivas contra a

bioincrustação, levando ao desenvolvimento das tintas anti-incrustantes no meio do século 19 (Yebrá *et al*, 2004).

Com o desenvolvimento das tintas anti-incrustantes, compostos químicos como cobre, arsênico e mercúrio se tornaram bastante populares (Yebrá *et al*, 2004). Contudo, esses não eram efetivos para todos os grupos incrustantes, até a descoberta do tributílo-estanho (tributyltin - TBT), que foi o primeiro composto tóxico de amplo-espectro a ser utilizado em larga escala, alcançando 70-80% das frotas (Champ, 2003), pausando as buscas por novos métodos anti-incrustantes. Novas pesquisas, no entanto, mostraram que, apesar de sua eficiência, sua alta toxicidade causava impactos diversos sobre o ecossistema marinho (Dafforn, 2011), com consequências desde a má-formação de conchas de moluscos à sua acumulação nos tecidos de mamíferos marinhos e deficiências imunológicas em peixes (Yebrá *et al*, 2004). Estas descobertas levaram à recomendação do banimento do TBT no âmbito da "International Convention on the Control of Harmful Anti-Fouling Systems in Ships" da Organização Marítima Internacional ("AFS Convention"), concluída em 2001 (Champ, 2003). Essa legislação estimulou as pesquisas por alternativas de prevenção à bioincrustação, levando ao desenvolvimento de novos métodos químicos e físicos, muitos dos quais podem ser encontrados atualmente no mercado.

Em geral, os métodos químicos compreendem a aplicação de tintas que contêm compostos químicos, tóxicos ou não, para a prevenção do assentamento de organismos (Bressy e Lejars, 2014). Após o banimento do TBT, foi retomada a popularidade do cobre como composto ativo, contudo, seu uso também pode implicar em problemas ao meio-ambiente (Bressy e Lejars, 2014), o que resultou na restrição do seu uso em diversos países (Dafforn, 2011), aumentando a busca por métodos anti-incrustantes alternativos. Atualmente, os revestimentos anti-incrustantes são divididos em dois grupos: os biocidas e os revestimentos de liberação de incrustação (fouling release coatings - FRC). Os primeiros são compostos tóxicos, que frequentemente levam à morte dos organismos, e os FRCs são alternativas não-tóxicas.

A aplicação de tintas anti-incrustantes é o método mais utilizado para a prevenção da formação da bioincrustação (Thomas e Brooks, 2010). Atualmente, existe uma grande extensão de químicos usados como biocidas, e a regulamentação sobre seu uso é diferente para cada região, levando-se em conta a forma de sua liberação no ambiente, persistência, forma de ação, entre outros (Thomas e Brooks, 2010). Entre os biocidas disponíveis atualmente, alguns possuem distribuição global e, por isso seus efeitos são mais bem

conhecidos na literatura. São eles: cobre, Irgarol 1051 e diuron, os últimos dois sendo referidos como "*booster biocides*" (Dafforn *et al*, 2011).

Um dos pontos mais importantes ao se avaliar um biocida como agente anti-incrustante é a sua persistência no ambiente, o que aumenta as chances desse composto ser bioacumulado ao longo da teia trófica (Thomas e Brooks, 2010). Por exemplo, o cobre tende a ter sua toxicidade atenuada quando se associa à matéria orgânica. Contudo, quando a associação ocorre com matéria suspensa particulada, eventualmente esse composto afunda e se concentra no sedimento em concentração duas ou três vezes maior que na coluna de água (Thomas e Brooks, 2010). A ressuspensão de sedimento com altas concentrações de cobre aumenta a sua concentração na coluna de água, aumentando assim o seu risco para os organismos marinhos (Thomas e Brooks, 2010). Apesar de seu uso em larga escala por várias décadas, poucos trabalhos de monitoramento desses compostos biocidas em ambientes marinhos estão disponíveis, inclusive sobre o seu potencial para bioacumulação e a liberação de compostos secundários advindos de transformações químicas. As regulamentações a respeito do uso desses compostos, contudo, têm se tornado mais rígidas, o que explica a maior procura por métodos não-tóxicos contra a bioincrustação (Lejars, 2012).

Os FRCs são uma alternativa química não-tóxica aos biocidas. Sua forma de atuação ocorre ao minimizar a adesão entre o organismo e a superfície, facilitando a sua remoção por meio de um estresse hidrodinâmico (Lejars, 2012). Adicionalmente, a superfície das coberturas de FRCs é lisa o suficiente para também contribuir para a diminuição da força de arrasto necessária para o deslocamento da embarcação (Lejars, 2012). Os FRCs mais reportados com propriedades anti-incrustação têm como base o silicone ou o flúor. Apesar de sua aplicação ainda ser limitada às embarcações que alcançam velocidades maiores que 20 nós, a sua comercialização tem crescido, visto que agora já atende a 10% da frota mundial (Dafforn *et al*, 2011), e grande atenção tem sido voltada a essa tecnologia.

A biomimética tem aparecido com alternativa não-tóxica junto com os FRCs, tanto no desenvolvimento de compostos anti-incrustação naturais baseados em metabólitos secundários de organismos marinhos como de superfícies com topografia baseada em organismos livres de incrustação (Dafforn *et al*, 2011). A primeira ainda não é encontrada comercialmente devido aos altos custos envolvidos para a sua obtenção, mas estudos têm demonstrado a sua efetividade e possibilidade de seu uso (Yebra *et al*, 2004) A microestrutura da superfície pode ser decisiva no processo de assentamento de organismos incrustantes

(Bixler e Bhushan, 2012). Assim, a topografia de organismos marinhos que permanecem livres de incrustação tem sido alvo de estudos na área de biomimética, visando o desenvolvimento de materiais nanoestruturados que levariam à redução do assentamento da comunidade incrustante (Bazaka *et al.*, 2011). A microestrutura da pele de tubarão, por exemplo, foi usada como base para a criação de uma superfície que se mostrou efetiva no impedimento de assentamento de esporos de alga (Bixler e Bhushan, 2012). O uso de nanotecnologia como método anti-incrustante é novo e mostra potencial, em especial quando aplicada em conjunto com outros métodos, aumentando o espectro de abrangência de organismos (Nir e Reches, 2016). Uma das maiores dificuldades para a sua aplicação em larga escala atualmente é o alto custo e a impraticabilidade do revestimento de grandes embarcações (Lejars, 2012).

Outro método físico, o *grooming* tem sido aplicado para se referir à limpeza proativa e frequente de navios, como forma de prevenir a formação do biofilme, visto que o uso isolado de tintas anti-incrustantes pode ainda assim levar à acumulação da incrustação (Tribou e Swain, 2015). A limpeza feita apenas quando existe a comunidade macroincrustante, além de ser demorada e difícil, leva à deterioração das camadas de revestimentos, causando resistência adicional na propulsão de navios (Schultz, 2007). Assim, a pesquisa por métodos de limpeza com materiais menos abrasivos para a estrutura dos revestimentos anti-incrustantes passou a ser incrementada em anos recentes. Tribou e Swain (2015) demonstraram que o uso de escovas de polipropileno semanalmente em superfícies recobertas com tintas anti-incrustantes foi efetivo em controlar a formação do biofilme. Contudo, foi demonstrado também que a técnica não é efetiva quando se trata de macroincrustantes estabelecidos, sendo necessário o investimento em técnicas que possam ser aliadas ao *grooming*.

A formação da comunidade incrustante se inicia com a absorção de compostos orgânicos solúveis presentes na água pela superfície, formando-se assim o filme de condicionamento (Callow e Callow, 2002). A aplicação de pulsos elétricos em superfícies metalizadas também já foi apontada como efetiva na prevenção do biofilme, pois modifica as propriedades eletroquímicas do substrato (Sultana *et al.*, 2015). As alterações retardam a formação do filme de condicionamento, ou eventualmente removem as células já fixadas (Sultana *et al.*, 2015). De forma geral, são três as formas em que os pulsos elétricos podem atuar como método anti-incrustante: através da geração de oxidantes presentes na superfície, migração de íons e geração de oxigênio pela eletrólise da água e por forças repulsivas (Sultana *et al.*, 2015). Apesar de ser reportado na literatura há décadas, esse método demanda mais estudos para

melhor entendimento das condições necessárias para que seja efetivo ao ponto de ser aplicado em larga escala, visto que a literatura sobre o assunto ainda é conflitante (Cao *et al*, 2011).

Mais recentemente, a aplicação de bolhas causadas pela aplicação de ondas ultrassônicas se mostrou um método efetivo para a remoção do biofilme, quando associada à aplicação de FRCs (Salta *et al*, 2013). Resultados similares foram encontrados por Agarwal *et al* (2014), onde a ultrasonicação de microbolhas em cascos de navios removeu 75% da biomassa de biofilme fixada. Além disso, foi demonstrado que a rugosidade da superfície diminuiu a valores comparáveis a superfícies que não foram submersas, o que resultaria em uma menor fricção durante o deslocamento da embarcação (Salta *et al*, 2013). Este resultado mostra, portanto, vantagem em relação a outros métodos de remoção física do biofilme, que podem levar ao aumento da rugosidade e danos às tintas anti-incrustantes aplicadas. As microbolhas explodem formando uma onda de choque e um jato de água de alta velocidade que removem o biofilme (Agarwal *et al*, 2014). Além disso, as bolhas se infiltram por entre as microestruturas presentes na superfície, tornando-se um método efetivo para a limpeza inclusive de superfícies microtexturizadas (Salta *et al*, 2013). Os resultados sobre a aplicação de microbolhas são promissores e novos estudos são necessários com outras classes de coberturas anti-incrustantes.

A aplicação de ondas ultrassônicas para geração de bolhas não é a única forma de aplicar vibrações como método anti-incrustante. Ondas de som de baixa frequência (30 Hz) foram demonstradas como efetivas para impedir o assentamento de larvas de cracas (Branscomb e Rittschof, 1984). De forma similar à formação de bolhas, as ondas não são tóxicas e aparentemente não causam danos à estrutura da superfície das embarcações. Contudo, a baixa frequência destas ondas se encontra no espectro audível de humanos, o que gera poluição sonora, tornando sua aplicação limitada (Guo *et al*, 2012). Por essa razão, o ultrassom tem sido levantado como a alternativa mais aplicável de uso de ondas sonoras para prevenir a bioincrustação.

O ultrassom tem sido estudado e aplicado como método contra incrustação em embarcações, canos e tanques de água de lastro (Legg *et al*, 2015). A maioria dos estudos envolvendo o ultrassom como método anti-incrustante corresponde a ensaios laboratoriais que mostraram a eficiência das ondas para impedir a formação do biofilme ou do assentamento de organismos macroincrustantes (Legg *et al*, 2015). Por exemplo, Mott *et al* (1998) aplicaram pulsos de ultrassom de curta duração (30 s) em frequências de 20 kHz em tubos de vidro e

mais de 80% do biofilme foi removido, enquanto que, para frequências maiores (150 e 300 kHz), ainda que eficientes, a porcentagem de remoção foi menor. Similarmente, Bott (2000) mostrou que ocorre remoção do biofilme já estabelecido com pulsos de ultrassom. Além disso, a espessura do biofilme formado em canos de transferência de água foi significativamente menor quando houve a aplicação do ultrassom ao longo de todo o processo de formação do biofilme comparado ao controle, sem aplicação do ultrassom (Bott, 2000). Esses exemplos ilustram a efetividade da aplicação do ultrassom para a remoção do biofilme formado em sistema de transferência de calor.

No âmbito de bioincrustação marinha, poucos estudos feitos em campo estão disponíveis. Latour e Murphy (1981) aplicaram ultrassom de baixa frequência (5 kHz) em painéis de teste e cascos de navios e mostraram que após cinco meses e meio a superfície permanecia limpa de incrustação. Mais recentemente, Park e Lee (2018) fizeram testes em um navio onde seis transdutores foram dispostos a boreste e foram comparados após quatro meses com a face a bombordo, sem a presença de ultrassom. Os autores reportam que, onde houve a geração do ultrassom, nos pontos de inserção dos transdutores, onde a pressão acústica seria maior, a bioincrustação foi mínima, consistindo apenas no biofilme inicial. Contudo, como o período de observação foi curto, os autores reforçaram a necessidade de mais estudos em campo.

Em laboratório, Kitamura *et al* (1995) aplicaram o ultrassom em três frequências diferentes e observaram que frequências menores (19,5 kHz) eram as mais efetivas para matar os náuplios e larvas cypris de craca. Os mesmos autores indicaram que menores níveis de energia poderiam ser aplicados sem necessariamente causar injúrias detectáveis aos organismos, mas que também seriam efetivos para prevenir o assentamento. Guo *et al* (2011a) avaliaram o efeito inibitório do ultrassom no assentamento de larvas de cracas e encontraram que a menor frequência, entre as três testadas (23, 63 e 102 kHz), era a mais efetiva em diminuir a taxa de assentamento.

O comportamento de assentamento de larvas de craca tem sido explorado há bastante tempo. Um dos primeiros modelos que explicaria a escolha do local de assentamento da larva cypris foi proposto por Crisp (1976). Conforme o modelo de Crisp (1976), o processo de assentamento das larvas pode ser dividido em: (1) adesão (permanente ou não), (2) exploração e (3) fixação. Se o substrato explorado atender as necessidades da larva, essa então se torna permanentemente aderida e se inicia o processo de metamorfose. Caso contrário, ela retorna à coluna de água e o processo se reinicia. Este modelo foi confirmado por Aldred *et al* (2018),

a partir de análises que mostrando que a seleção do local do assentamento não é um processo aleatório, mas tem um padrão complexo e que pode durar horas.

Lagersson e Hoeg (2002) fizeram observações mais detalhadas de cada uma dessas etapas, mostrando alterações na posição das antênulas conforme a movimentação da larva em cada momento. Chaw e Birch (2009) avaliaram o comportamento de assentamento de larvas craca em termos quantitativos, medindo a distância percorrida e o tempo entre os "passos" das antênulas. Pradhan *et al* (2011) desenvolveram um algoritmo para quantificar o comportamento de larvas cypris de forma automática, semelhante a Alsaab *et al* (2017).

Convencionalmente, os estudos de avaliação dos métodos anti-incrustantes focados em organismos macroincrustantes observam somente as taxas de assentamento. Thomason *et al* (2002), Aldred e Clare (2008) e Aldred *et al* (2010) sugeriram que o comportamento de larvas cypris seria um indicador importante da eficiência de um método anti-incrustante e que o uso isolado de testes de assentamento não permite esclarecer totalmente os processos específicos que levam ao assentamento. Assim, os estudos comportamentais contribuiriam de forma significativa para o desenvolvimento de métodos mais eficazes de controle. Um exemplo é o estudo de Aldred *et al* (2010) comparando o uso de dois FRCs baseados em polímeros zwitteriônicos distintos, em que, apesar dos dados de taxa de assentamento terem sido semelhantes, a forma de ação de cada um dos polímeros possivelmente foi diferente, visto que as respostas comportamentais entre eles foram distintas.

Apesar de ainda não serem tão numerosos, existem alguns trabalhos que utilizaram o comportamento como forma de avaliar um método anti-incrustante. Berntsson *et al* (2000) avaliaram a rejeição das larvas cypris a superfícies com microestruturas utilizando o modelo de Crisp (1976) como base, observando o comportamento de exploração do substrato ou natação na coluna de água. De forma semelhante, Afsar *et al* (2003) observaram a porcentagem do tempo que a larva passava em determinado estado, com diferentes tratamentos de FRCs, para avaliar a melhor concentração de óleo de silicone usado nos revestimentos. Prendergast *et al* (2008) analisaram aspectos básicos de estudos de comportamento, como velocidade e aceleração também para avaliar a influência de microtexturas no substrato no comportamento exploratório de larvas cypris.

Com a aplicação do ultrassom, os estudos de comportamento são ainda mais escassos. Guo *et al* (2011), usando como base as quantificações do comportamento propostas por Chaw e Birch (2009), mostraram alterações significativas no comportamento de larvas expostas ao

ultrassom, como a duração e tamanho do passo, taxa de exploração e *pace* (número de passos dados em um intervalo de cinco minutos) a frequências de 23 e 102 kHz, e uma pressão constante de 20 kPa.

Os resultados disponíveis na literatura até o momento sugerem que o ultrassom é um método anti-incrustante com potencial para aplicação prática, inclusive no que se diz respeito à macroincrustação. Contudo, persistem dúvidas quanto às alterações comportamentais na larva cypris com a aplicação do ultrassom (Guo *et al*, 2012). Além disso, atualmente, os estudos que analisaram o comportamento de deslocamento larvas cypris foram baseados em observações em duas dimensões (Alsaab *et al*, 2017), e os poucos estudos com observações tridimensionais não avaliaram quantitativamente o deslocamento das larvas utilizando métricas extraídas de trajetórias (Seuront *et al*, 2005). Finalmente, até o momento, não foram feitos estudos de comportamento de deslocamento tridimensional de larvas cypris de cracas sob a aplicação de ultrassom. Assim, a presente dissertação teve como objetivo analisar o comportamento de deslocamento de larvas cypris em três dimensões, utilizando métricas quantitativas aplicadas para organismos planctônicos, para avaliar as possíveis alterações comportamentais resultantes da aplicação do ultrassom como método de controle da bioincrustação.

2. Materiais e métodos

Obtenção e cultivo de larvas cypris em laboratório

As cracas estão entre os organismos mais frequentes quando se trata de macroincrustação (WHOI, 1952; Gollasch, 2002), além de serem um dos mais deletérios para a indústria naval (Aldred *et al*, 2008) o que faz com que sejam organismos-modelo em testes de métodos anti-incrustação. O assentamento ocorre durante o último estágio larval, e por isso é o estágio com os quais os testes são realizados. Geralmente a densidade de larvas cypris em amostras naturais coletadas com rede de plâncton é baixa. Esta questão, aliada à dificuldade de distinguir as espécies de cracas a partir das larvas coletadas no ambiente, motivou o estabelecimento de um cultivo em laboratório.

Cracas adultas da espécie *Tetraclita stalactifera* (figura 3A) foram coletadas em ambiente de costão rochoso na praia do Flamengo, Ubatuba, São Paulo (coordenadas: -23.514231, -45.107339), no período da manhã (entre 8 e 10 horas), durante a maré baixa. Para a realização dos experimentos, foram realizadas três coletas entre Setembro e Dezembro de 2018. Para garantir a integridade das cracas, estas foram extraídas mantendo um fragmento de substrato em sua base. Após a coleta, os indivíduos foram levados imediatamente para o laboratório e colocados em um aquário de vidro contendo oito litros de água do mar do mesmo local da coleta, filtrada através de rede de malha de 20 μ m (figura 1). O aquário foi alocado em uma câmara de temperatura controlada, a 28°C (Rittschof *et al*, 1985), com luminosidade natural e aeração forte garantida por uma bomba de aquário e mangueira com pedra porosa na extremidade. Nenhum tipo de alimentação foi fornecido às cracas adultas e entre 24 e 48 horas após a coleta, os náuplios foram liberados, sem uso de estímulos externos.



Figura 1 – Aquário de vidro com dimensões 21cm x 44 cm x 27 cm contendo água do mar filtrada (20 μ m) e pedaço de rocha do costão com aproximadamente 30 cracas adultas *Tetraclita stalactifera*. A aeração foi garantida por duas bombas de aeração com pedras porosas, que podem ser visualizadas na foto.



Figura 2 – Sistema de cultivo de larvas cypris. O aquário de vidro à direita contém as cracas adultas e os baldes cinzas são o local de crescimento dos náuplios, contendo 8 litros de água do mar filtrada e com densidade de 1 náuplio.mL⁻¹.

O protocolo de criação dos náuplios de craca foi baseado, com modificações, em Rittschof *et al*, 1985. Os náuplios liberados pelos indivíduos adultos foram atraídos com um feixe de luz e alocados em baldes com oito litros de água do mar filtrada em filtro de malha de 20 μm (figura 2), sendo mantida a densidade de aproximadamente 1 náuplio.mL⁻¹, com aeração moderada com uso de regulador e alimentação composta por uma mistura de *Tetraselmis suecica* e *Thalassiosira* sp (Clare, dados não publicados). A alimentação foi fornecida a cada dois dias, num volume total de 40 mL. A metamorfose de larvas náuplio para cypris ocorreu entre 6 e 7 dias após a liberação (figura 3). À medida que as larvas metamorfoseavam, eram pipetadas e alocadas em béqueres com água do mar filtrada e aeração intensa mantendo-se a temperatura (28°C). As larvas metamorfoseadas em um certo dia eram mantidas em um mesmo frasco até completarem três dias de idade, quando eram separadas para serem usadas nos experimentos (Guo *et al*, 2014).

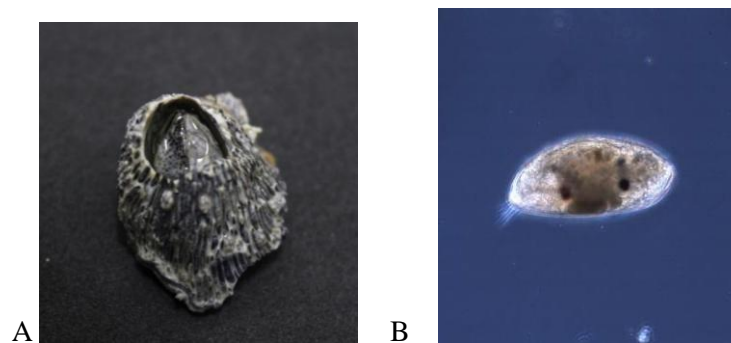


Figura 3 - Espécime de craca adulta da espécie *Tetraclita stalactifera* coletada para o cultivo de larva cypris (A); espécime de larva cypris cultivada usada nos experimentos (B).

2.3 Setup de filmagem

Para a observação e análise das alterações comportamentais das larvas cypris, foi montado um sistema óptico 3D baseado em Yen *et al* (2008) e Bianco *et al* (2013). O sistema 3D é constituído por dois sistemas 2D *in line* idênticos dispostos ortogonalmente, com o seu ponto de intersecção situado no centro do aquário de observação. Cada sistema foi composto por: (1) Fonte luminosa de LED infravermelho (comprimento de onda: 700 nm a 1 mm), (2) lente colimadora de 150 mm, (3) lente focalizadora de 150 mm e (4) câmara (Basler acA2040-25gm GigE Ethernet) (figura 4). A câmara possui sensor com tamanho de 2048 x 2048 pixels e taxa de aquisição de imagens de 20 quadros por segundo. Foi utilizada a equação de distância focal (1) para cálculo das distâncias entre cada um dos elementos do sistema, com base nas lentes usadas, resultando na configuração final. O aumento utilizado na instalação foi de 0,5 vezes.

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{p} + \frac{1}{p'} \quad (1)$$

onde f é a distância focal da lente utilizada, p é a distância focal do objeto e p' é a distância focal da imagem.

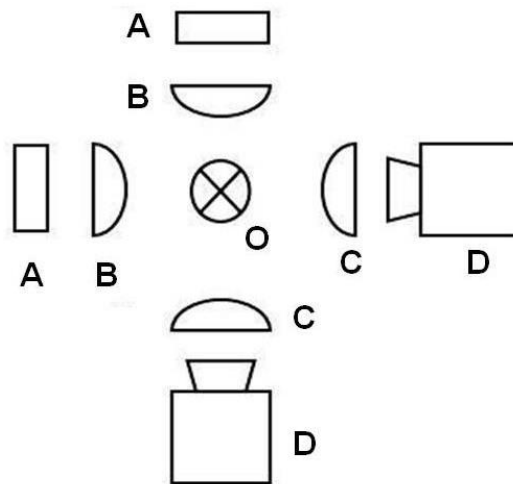


Figura 4 – Esquema da montagem do sistema óptico 3D onde: (A) LED Infravermelho; (B) Lente colimadora; (C) Lente focalizadora; (D) Câmera; (O) Objeto.

Um aquário de quartzo, com dimensões 22 x 22 x 38 mm, foi colocado no centro do sistema, sendo cada faceta filmada por um eixo 2D. A área total filmada pelo sistema foi 18 x 18 x 22 mm. As filmagens foram realizadas com o auxílio do *software* LCR (*LAPS Camera*

Recorder), desenvolvido pelo LAPS/IOUSP, capturando imagens monocromáticas. Cada câmera foi conectada a um computador e utilizados microcontroladores Arduino em cada sistema 2D para acioná-las simultaneamente, evitando interferências do operador. As filmagens foram realizadas em uma sala óptica sem interferência da luminosidade natural e com temperatura controlada (26°C). Cada larva foi filmada individualmente com aclimação de 10 minutos, tanto para as filmagens controle (sem ultrassom), quanto para os tratamentos com aplicação de ultrassom. Os dados de coordenadas (abscissas e ordenadas) das trajetórias extraídas de cada sistema 2D (XY , YZ) foram combinados para a formação das trajetórias em 3D (X , Y , Z).

Ultrassom

Para a aplicação do ultrassom, foi usado um transdutor de Langevin desenvolvido pelo Laboratório de Ultrassom do departamento de Engenharia Mecânica da Escola Politécnica da USP. O transdutor era circular, com diâmetro de 36 mm operando na frequência fixa de 26 kHz, excitado por um módulo eletrônico de oito canais controlado por um programa desenvolvido pelo mesmo laboratório. Foi aplicado um gel acoplador (Shear Gel, Magnaflux) para facilitar a transmissão da energia do som entre o transdutor e o aquário. A pressão foi ajustada no programa e medida por um hidrofone (8103, Brüel e Kjaer) acoplado a um osciloscópio (TBS 1102B, Tektronix). Para cada filmagem, a larva foi colocada dentro do aquário com o ultrassom desligado para a aclimação e, após esse período, o ultrassom era ligado e a filmagem se iniciava. As pressões testadas no presente trabalho foram 10, 15 e 30 kPa, valores que estão dentro do range de pressão testados na literatura (Guo *et al.*, 2011a; Guo *et al.*, 2011b; Guo *et al.*, 2012). As filmagens com 30 kPa, contudo, foram desconsideradas devido à presença de bolhas causadas pelo efeito de cavitação do ultrassom, prejudicando o processo de reconhecimento da larva pelo *software* de detecção de trajetórias.

Mapeamento do campo acústico

Com o objetivo de entender a distribuição das ondas acústicas dentro do aquário usado nos experimentos, foi feito um mapeamento vertical do campo acústico, utilizando o hidrofone acima citado fixo a um atuador micrométrico (figura 5). A pressão foi ajustada para 10 kPa (260 mV para esse modelo de hidrofone) com o hidrofone disposto no fundo e no centro do aquário (que corresponde ao centro do transdutor). Com o ultrassom funcionando, o hidrofone foi movido para cima e, para cada milímetro, a pressão foi medida novamente pelo

osciloscópio, até a ponta do hidrofone estar totalmente fora da água. O mapeamento lateral não foi feito porque dados anteriores (Andrade, dados não publicados) mostraram que a pressão não se altera ao longo da superfície do transdutor. Como toda a área do fundo do aquário estava em contato direto com o transdutor, assume-se que a pressão horizontal permaneceu constante.

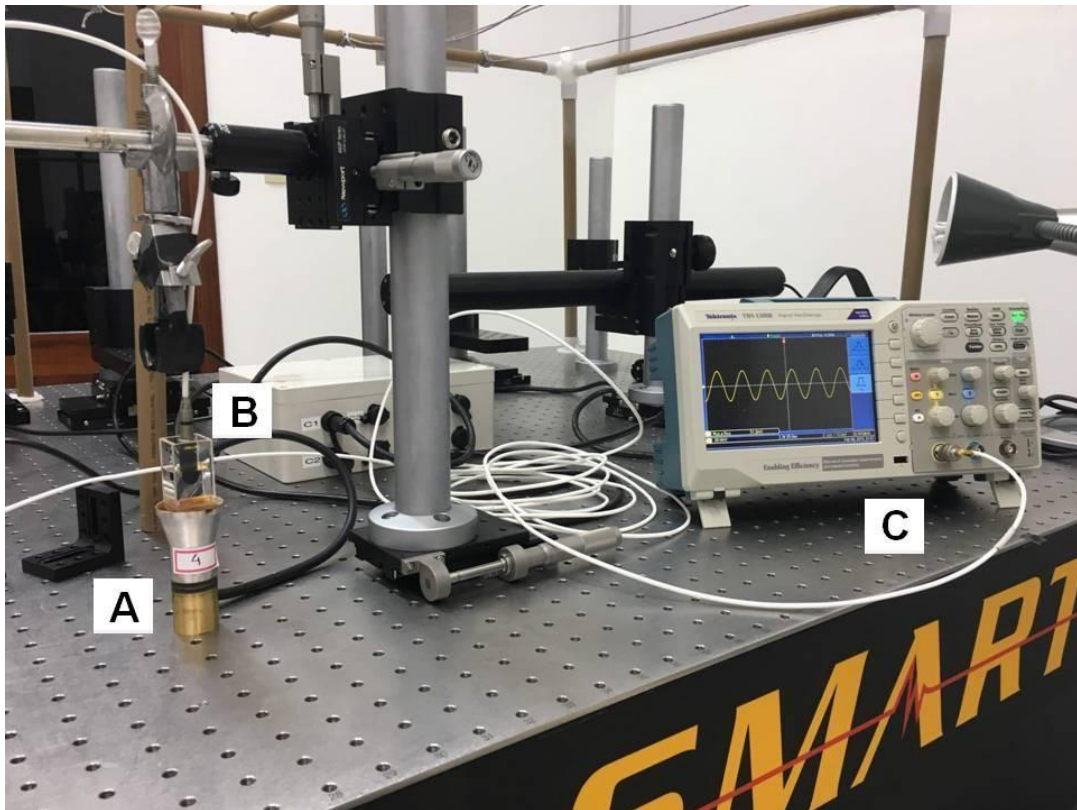


Figura 5– Montagem utilizada para o mapeamento acústico dentro do aquário de quartzo utilizado para os experimentos. Na figura podem ser visualizados: Transdutor (A); Aquário de quartzo com o hidrofone (B); Osciloscópio usado para monitorar as pressões acústicas (C).

2.4 Análise dos dados

A extração das trajetórias foi feita através do *plugin* de trajetórias do *software* LAPS Plankton Detector (LPD)(figura 6), que realizou sequencialmente a detecção automática da larva em cada imagem e a estimativa da posição do centróide da larva cypris, procedimentos repetidos para todos os quadros dos vídeos obtidos. A partir da identificação e concatenamento das posições, foi extraída a trajetória da larva no vídeo, em cada um dos eixos (X e Y) (figura 7). Esse processo foi realizado para as duas câmeras, obtendo-se a visão central e lateral da trajetória, ou seja, para os dois planos capturados por câmera, XY e YZ.

Com a equivalência do tempo para cada face do aquário, foi possível a identificação da posição X, Y e Z para cada quadro, e, utilizando o software MATLAB R2013 foram reconstituídas as trajetórias para os planos verticais (XY e YZ), horizontal (XZ) e em 3D (XYZ)(figura 8).

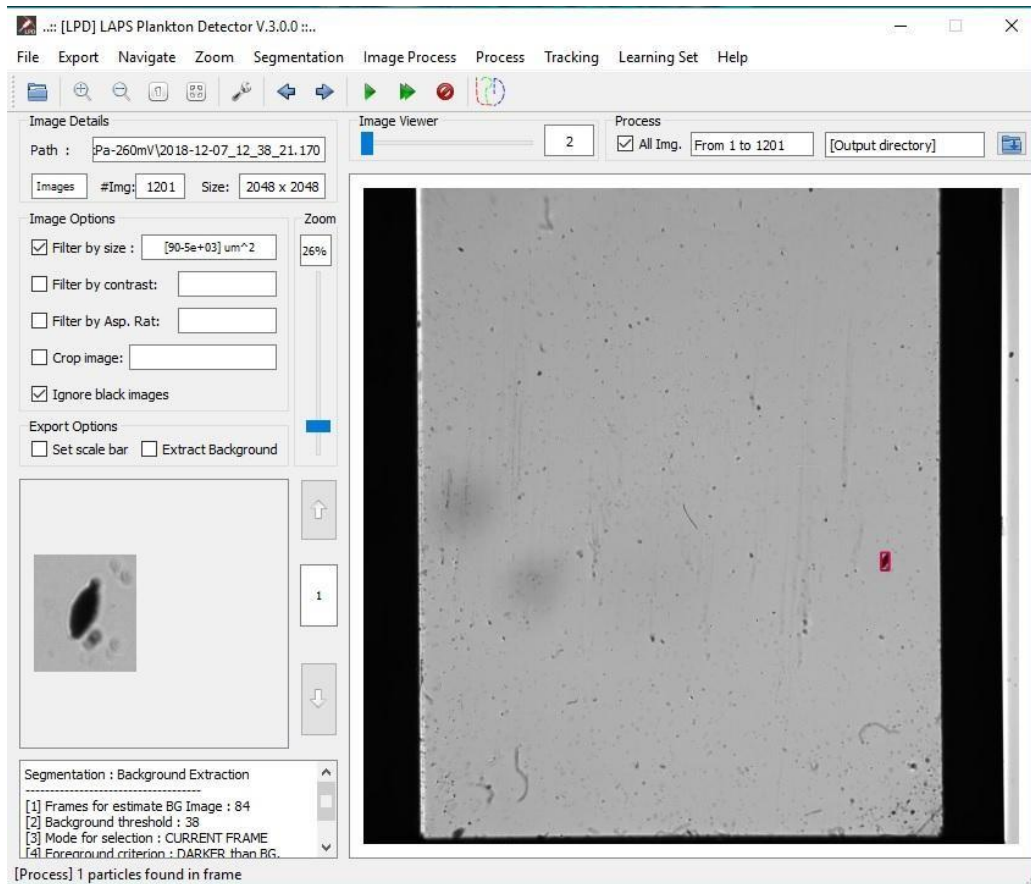


Figura 6 - Interface do programa LPD (LAPS Plankton Recorder) durante a fase de detecção da larva cypris no vídeo.

Com o objetivo de identificar possíveis alterações comportamentais na larva cypris com e sem a aplicação do ultrassom, foram utilizadas métricas aplicadas em estudos de trajetórias de organismos planctônicos: velocidade média e instantânea, NGDR (Net-to-gross Displacement Ratio) e distribuição dos ângulos de rotação (Seuront *et al*, 2005). As métricas foram calculadas para cada uma das projeções, sendo que as verticais correspondem aos planos XY e YZ e a projeção horizontal corresponde ao plano XZ. Devido a dependência de escala de algumas medidas, tais como o NGDR e a velocidade instantânea (Seuront *et al*, 2005; Visser e Kiørboe, 2006), os dados foram analisados em segmentos de tamanhos iguais (10 segundos, correspondendo a 200 quadros) e a distribuição dos ângulos foi analisada quadro a quadro.

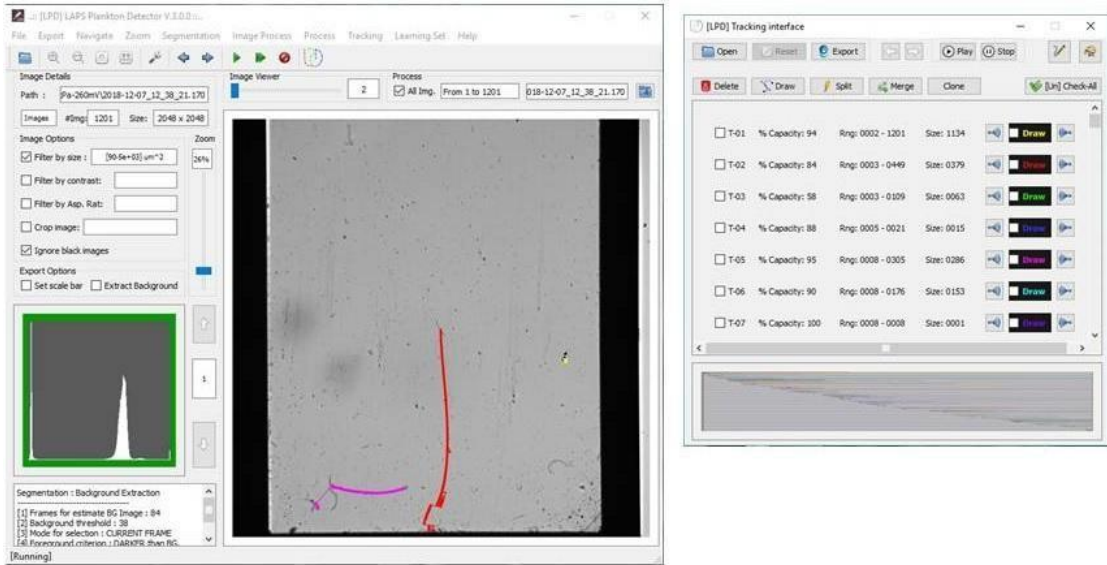


Figura 7 - Interface do programa LPD com o plugin de trajetória à direita, mostrando exemplos de trajetórias detectadas no vídeo.

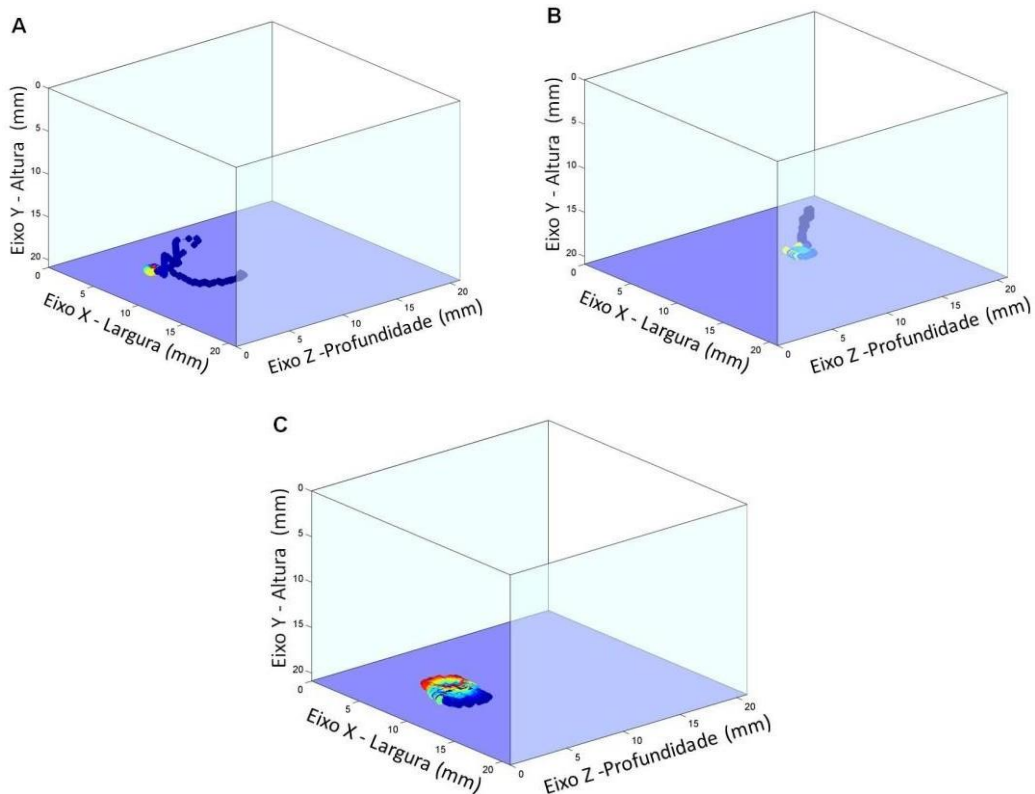


Figura 8 - Exemplos de trajetórias 3D geradas a partir dos dados de posição obtidos com o programa LPD Tracking. As reconstruções foram feitas utilizando o programa MATLAB. Os gráficos representam trajetórias obtidas para cada um dos tratamentos, sendo "sem ultrassom" (A), 10 kPa (B) e 15 kPa (C). As cores das trajetórias indicam a transição dos pontos no tempo, sendo os pontos azuis os pontos iniciais e os vermelhos mais tardios.

O deslocamento dt da larva entre dois pontos para cada projeção bidimensional e para a projeção 3D foi calculado através das seguintes fórmulas:

$$d_t = \sqrt{(x_{t+1} - x_t)^2 + (y_{t+1} - y_t)^2 + (z_{t+1} - z_t)^2} \quad (2)$$

$$d_t = \sqrt{(x_{t+1} - x_t)^2 + (y_{t+1} - y_t)^2} \quad (3)$$

$$d_t = \sqrt{(x_{t+1} - x_t)^2 + (z_{t+1} - z_t)^2} \quad (4)$$

$$d_t = \sqrt{(y_{t+1} - y_t)^2 + (z_{t+1} - z_t)^2} \quad (5)$$

Onde (x_t, y_t, z_t) e $(x_{t+1}, y_{t+1}, z_{t+1})$ são as posições da larva no tempo t e $t + 1$, respectivamente. A partir desses valores de deslocamento, a velocidade instantânea (V_t) foi calculada através do produto do deslocamento dt pela taxa de aquisição da câmera, pela equação:

$$V_t = d_t \times p, \quad (6)$$

sendo que p é taxa de aquisição utilizada no estudo (20 quadros. s^{-1}). Deste modo, foi calculada a velocidade instantânea para cada quadro, a velocidade instantânea média para cada segmento e a mediana geral de todas as trajetórias.

O NGDR é definido como o nível de linearidade de uma trajetória, e é calculado da seguinte forma:

$$NGDR = \frac{ND}{GD}$$

Onde ND (Net Displacement) representa a distância em linha reta entre os pontos inicial e final da trajetória e GD (Gross Displacement) representa a distância real percorrida pela larva, sendo que ND é calculado da seguinte forma:

$$ND = dt = \sqrt{(x_{t+1} - x_t)^2 + (y_{t+1} - y_t)^2 + (z_{t+1} - z_t)^2}, \quad (7)$$

GD é dado como a soma de todos os pontos percorridos pelo organismo ao longo da trajetória. Valores mais baixos de NGDR representam uma trajetória mais tortuosa e maiores valores de NGDR indicam uma trajetória mais retilínea.

O ângulo de rotação (*turning angle* em inglês), foi calculado a partir da diferença de direção do centróide entre dois movimentos consecutivos (Dodson *et al*, 1997; Schmitt e Seuront, 2001; Edgar *et al*, 2014). Esta métrica expressa a mudança de direção da larva ao se deslocar. A distribuição dos ângulos é exposta através de diagramas de rosas (análogo ao histograma, para dados angulares). A distribuição dos ângulos de rotação dos indivíduos foi comparada em relação a cada um dos tratamentos entre as projeções verticais e horizontal. Estatísticas apropriadas para dados circulares foram usadas e estão descritas na próxima seção.

A posição espacial dos indivíduos foi quantificada através do estabelecimento de três zonas espaciais no eixo vertical de movimentação das larvas, sendo estas: superfície (20 – 22,5 mm), coluna de água (2,6 – 19,9 mm) e substrato (0 – 2,5 mm). Estas zonas espaciais foram definidas em consonância com observações preliminares, nas quais foi detectada frequentemente a permanência da larva próxima à superfície ou ao substrato. As zonas de superfície e substrato foram delimitadas com tamanho igual, cada uma equivalendo a 11% da área total de cada imagem. O restante da coluna de água equivalente a 78% da área total. A porcentagem de tempo gasta por cada indivíduo em cada zona e a distribuição das posições das larvas no aquário foi estimada e comparada, inclusive dentre os tratamentos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (R Development Core Team, 2011), com o valor de $p \leq 0,05$. Como a normalidade não foi detectada nos dados através do Teste de Shapiro-Wilk (Shapiro *et al*, 1965), foram aplicados testes estatísticos não paramétricos descritos a seguir. Além disso, devido à não normalidade dos dados, foi expressa a mediana e o intervalo interquartil dos dados (IQR), em vez de média e desvio padrão (SD), com exceção da descrição da porcentagem do tempo gasto pelos indivíduos nas zonas espaciais. O erro padrão é uma medida de variação de uma média amostral em relação à média da população. O teste de Kruskal-Wallis (KW) é uma análise não paramétrica unidirecional da variância por postos para testar a igualdade de três ou mais medianas (pseudo-medianas dos postos) da população, sendo este o teste utilizado nos dados aqui apresentados. As diferenças *post-hoc* entre os dados em KW foram inspecionados usando o teste de Dunn (Dunn, 1964) pelo pacote *dunn.test* para o R (Dinno, 2015). A diferença entre os valores de NGDR, velocidade e entre as zonas espaciais de cada tratamento foram estimadas através do teste de KW.

Para comparar os dados de localização espacial dentro dos tratamentos, aplicou-se o teste de postos sinalizados de Wilcoxon pareados (WSR) devido à ligação (não independência) das

amostras entre pares de tratamentos. Os dados circulares (relativos à distribuição dos ângulos) foram comparados através do teste de Kuiper e o teste de Mardia–Watson–Wheeler, e ambos os testes foram executados através do pacote circular para o R (Agostinelli e Lund, 2017). O teste de Kuiper foi usado para avaliar as frequências dos ângulos, para cada tratamento e projeção. O teste de Kuiper é usado para se avaliar a uniformidade da distribuição de um conjunto de dados, com o diferencial de que existe sensibilidade para as pontas da distribuição dos dados, ao invés de ter sua sensibilidade concentrada apenas ao redor dos valores medianos. O teste Watson-Wheeler (ou Mardia-Watson-Wheeler) é um teste não paramétrico para comparar duas ou várias amostras circulares. A diferença entre as amostras pode estar na média ou na variância.

3. Resultados

Mapeamento do campo acústico

A distribuição das pressões acústicas medidas com o ultrassom conforme a altura do aquário usado para as observações comportamentais pode ser observada na figura 9.

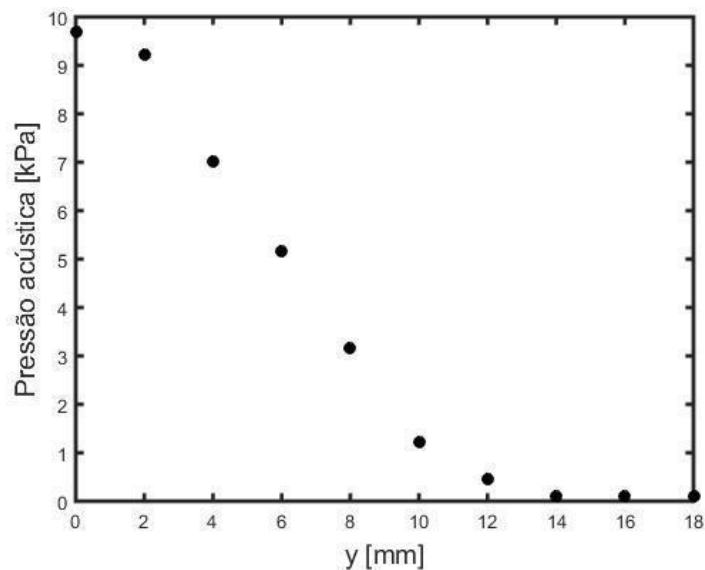


Figura 9 – Valores de pressão acústica ao longo do eixo vertical do aquário medidos com um hidrofone conectado a um osciloscópio. Os valores de pressão acústica foram medidos em kPa e a distância do eixo Y foi medida em mm, sendo que o 0 corresponde ao substrato e 18 corresponde à última medição possível com o hidrofone, próximo à superfície.

Esses resultados mostram que os maiores valores pressão acústica são encontrados na base do aquário, que está em contato direto com o transdutor, e que a pressão diminui até próxima de zero a cerca de 4 mm abaixo da superfície da água.

Comportamento da larva de craca com aplicação do ultrassom

A fim de se analisar quantitativamente os aspectos comportamentais das larvas cypris, com e sem a influência do ultrassom, foram medidos os valores de velocidade instantânea, NGDR e frequência dos ângulos nas trajetórias das larvas. Nos resultados aqui apresentados, os eixos X e Z se referem aos eixos horizontais e Y se refere ao eixo vertical.

Velocidade e NGDR

Na figura 10 estão as comparações nos valores das medianas da velocidade instantânea calculados para cada um dos tratamentos e nas diferentes projeções: 3D, plano horizontal (XZ) e planos verticais (XY e YZ).

Para os controles e o tratamento com 15 kPa de pressão, as velocidades encontradas foram baixas, com valores medianos menores que $0,2 \text{ mm.s}^{-1}$, e sem diferença significativa entre os dois. Esse mesmo padrão se repetiu para todas as projeções. Para o tratamento de 10 kPa de pressão, os valores medianos de velocidade foram sete vezes maiores que os do controle para as projeções verticais e tridimensional. Para o plano horizontal XZ, contudo, os valores de velocidade foram similares aos encontrados para os demais tratamentos (KW 29,5; $p=0,54$). As demais projeções tiveram diferenças significativas entre 10 kPa e o controle e 15 kPa (KW 26,54; $p < 0,01$ - 3D; KW 3,47; $p < 0,01$ - XY; KW 31,51; $p < 0,01$ - YZ).

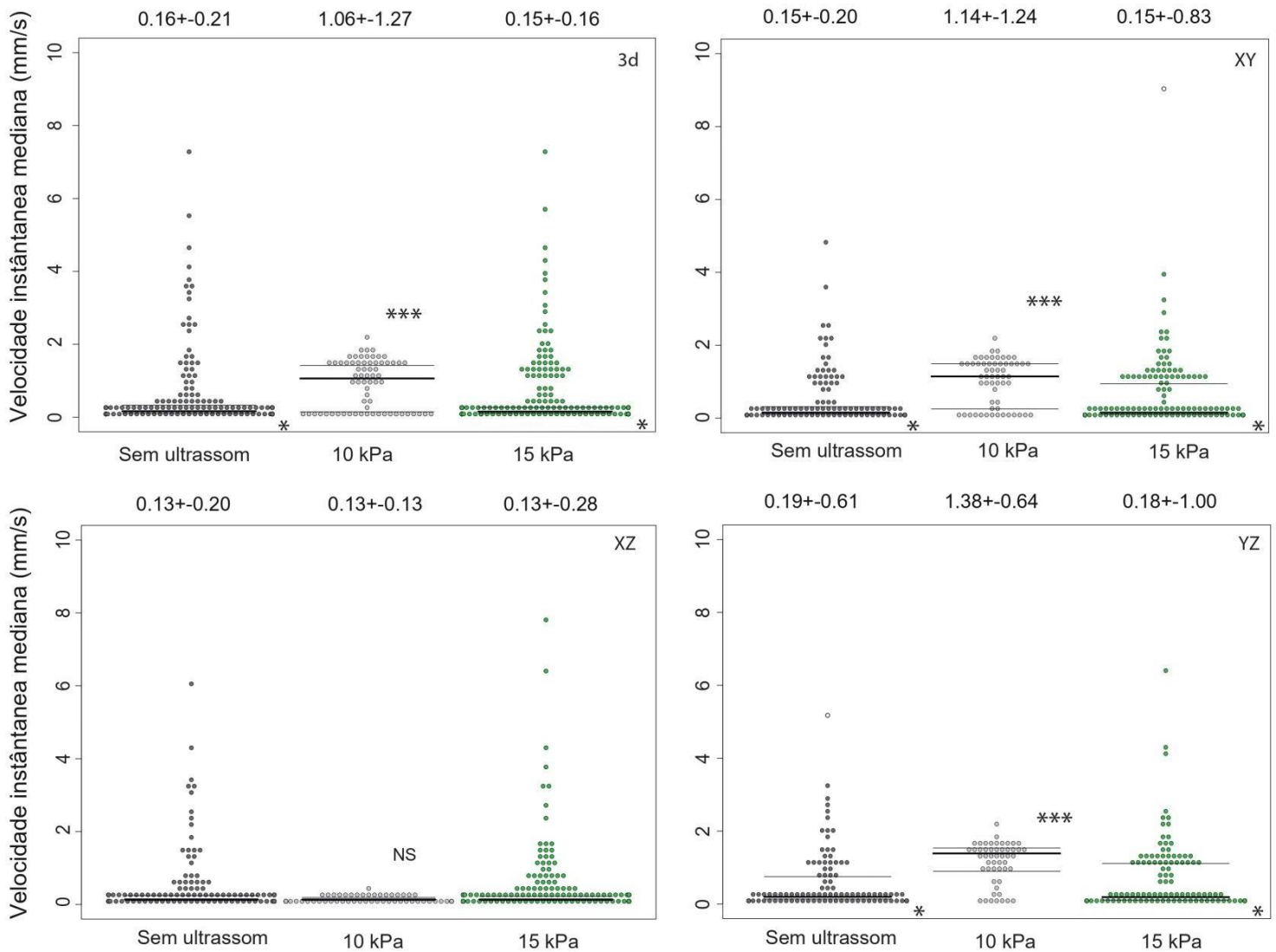


Figura 10 - Distribuição dos valores de velocidades instantâneas ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$) para tratamento, em cada uma das 4 projeções. O cinza escuro representa o controle sem ultrassom, o cinza claro representa o tratamento com 10 kPa e o verde representa 15 kPa. A barra mais escura representa a mediana e as barras mais claras indicam os limites superiores e inferiores dos intervalos interquartis. Na parte superior do gráfico estão apresentados os valores das medianas \pm intervalo interquartil. Cada um dos pontos no gráfico representa um conjunto de pontos das trajetórias para o cálculo das velocidades. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e NS denota "não significativo", sendo que * representa $p = 0,05$; ** representa $p = 0,01$; *** representa $p < 0,01$. (KW 26,54; $p = 0,01$ - 3D; KW 3,47; $p < 0,01$ - XY; KW 29,5; $p = 0,54$ - XZ; KW 31,51; $p < 0,01$ - YZ).

Os valores de NGDR para cada um dos tratamentos e projeções estão apresentados na figura 11. Observando a projeção tridimensional, para o NGDR, também foi encontrado o padrão observado para os valores de velocidade: para o controle e o tratamento com 15 kPa, os valores de NGDR foram mais baixos, entre 0,19 e 0,20, indicando que a trajetória das larvas foi mais curvilínea, enquanto que para o tratamento com 10 kPa, os valores

aumentaram, para 0,24, indicando uma trajetória mais retilínea para essa pressão. A diferença entre os tratamentos foi significativa (KW 5,67; $p \leq 0,05$). Com relação às demais projeções, observou-se que, para os planos verticais, não há alteração significativa (KW 3,47; $p = 0,17$ - XY; KW 2,65; $p = 0,27$ - YZ), mas para o plano horizontal a diferença é maior (KW 29,5; $p < 0,01$), com os valores de NGDR para 10 kPa chegando a 0,44, enquanto o controle e 15 kPa permaneceram com medianas entre 0,17 e 0,21.

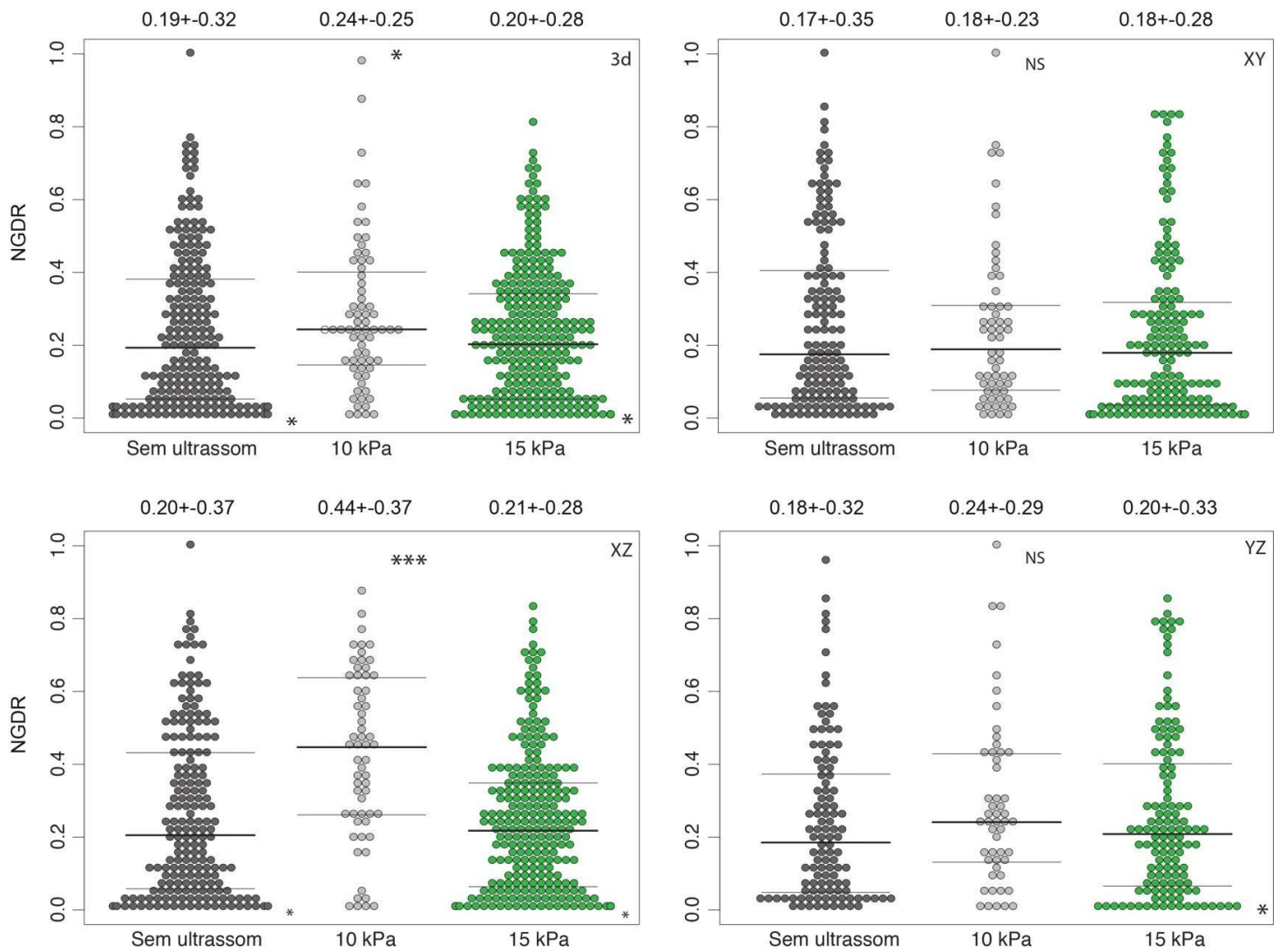


Figura 11 - Distribuição dos valores de NGDR para cada tratamento, em cada uma das 4 projeções. O cinza escuro representa o controle sem ultrassom, o cinza claro representa o tratamento com 10 kPa e o verde representa 15 kPa. A barra mais escura representa a mediana e as barras mais claras indicam os limites superiores e inferiores dos intervalos interquartil. Na parte superior do gráfico estão apresentados os valores das medianas \pm intervalo interquartil. Cada um dos pontos no gráfico representa um conjunto de pontos das trajetórias para o cálculo do NGDR. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e NS denota não significativo, sendo que * representa $p = 0,05$; ** representa $p = 0,01$; *** representa $p < 0,01$. (KW 5,67; $p \leq 0,05$ - 3D; KW 3,47; $p = 0,17$ - XY; KW 29,5; $p < 0,01$ - XZ; KW 2,65; $p = 0,27$ - YZ).

Na figura 12 estão os diagramas de rosa indicando a distribuição da frequência dos ângulos (0 a 360°) na trajetória da larva, para cada um dos tratamentos e para cada uma das projeções. Os resultados dos testes estatísticos estão disponíveis na tabela 1. Nos dois planos verticais foi observada uma maior frequência do ângulo de 0° e uma menor frequência do ângulo de 180°, quando comparadas aos outros dois tratamentos. Na projeção horizontal, em 10 kPa, a frequência do ângulo de 0° decaiu, se comparado com os demais planos, mas ainda foi possível observar uma diferença significativa na frequência dos ângulos de 180°, 90° e 270°, que permaneceram com frequências menores quando comparados aos outros tratamentos. Para as projeções verticais, tanto para o controle quanto para 15 kPa há uma diferença visível na frequência dos ângulos de 90° e 270°, que são maiores que o tratamento de 10 kPa. Isso indica que para 10 kPa há menos mudanças bruscas na angulação da trajetória, enquanto para os outros tratamentos isso ocorre mais frequentemente. Para todos os tratamentos e projeções, as comparações entre o tratamento de 10 kPa e os demais resultaram em diferenças significativas ($p < 0,01$, tabela 1).

Tabela 1 - Resultados do teste estatístico de Mardia-Watson-Wheeler comparando a frequência dos ângulos entre cada um dos tratamentos, para cada um dos planos. A comparação foi feita entre o controle e cada um dos tratamentos e entre os dois tratamentos. SU = sem ultrassom.

Teste de Mardia-Watson-Wheeler

<i>Plano XY</i>	SU		10 kPa	
10 kPa	W = 26,4	p < 0,01	-	
15 kPa	W = 33,0	p < 0,01	W = 166	p < 0,01
<i>Plano YZ</i>	SU		10 kPa	
10 kPa	W = 26,4	p < 0,01	-	
15 kPa	W = 33,0	p < 0,01	W = 166	p < 0,01
<i>Plano XZ</i>	SU		10 kPa	
10 kPa	W = 46	p < 0,01	-	
15 kPa	W = 136	p < 0,01	W = 21,597	p < 0,01

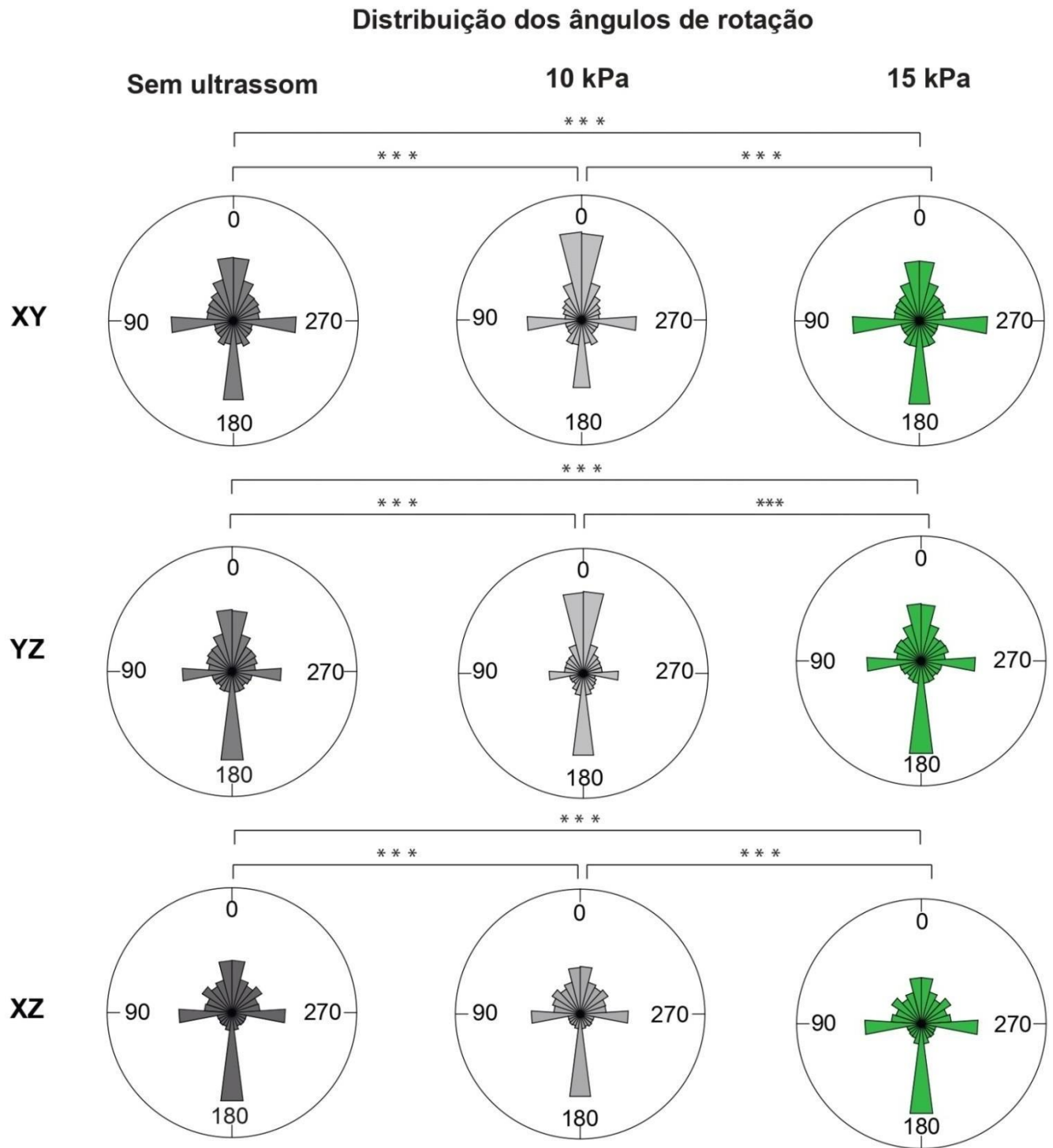


Figura 12 - Distribuição dos ângulos de rotação das larvas para cada tratamento, em cada plano. O cinza escuro representa o controle sem ultrassom, o cinza claro representa o tratamento com 10 kPa e o verde representa 15 kPa. O tamanho das barras indica a frequência do ângulo dentro da trajetória. Barras maiores indicam uma maior frequência do ângulo, assim como barras menores indicam menores frequências. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e NS denota "não significativo", sendo que * representa $p = 0,05$; ** representa $p = 0,01$; *** representa $p < 0,01$. As diferenças estatísticas entre os tratamentos, para as projeções, se encontram na tabela 1.

Com base nas distribuições dos ângulos encontrados na figura 12, foi aplicado o teste de Kuiper, cujos resultados se encontram na tabela 2. Para os tratamentos e projeções não foi encontrada uniformidade na distribuição dos ângulos ($p < 0,01$), indicando que existem ângulos com frequências maiores que outros, o que é observado visualmente nos diagramas da figura 12.

Tabela 2 - Resultados do teste estatístico de Kuiper comparando a homogeneidade da distribuição dos ângulos para cada um dos planos. SU = sem ultrassom.

Teste de Kuiper

	Tratamento	K	P
<i>Plano XY</i>	SU	139	$p < 0,01$
	10 kPa	101	$p < 0,01$
	15 kPa	149	$p < 0,01$
<i>Plano YZ</i>	SU	158	$p < 0,01$
	10 kPa	116	$p < 0,01$
	15 kPa	149	$p < 0,01$
<i>Plano XZ</i>	SU	161	$p < 0,01$
	10 kPa	102	$p < 0,01$
	15 kPa	157	$p < 0,01$

Distribuição do posicionamento da larva no aquário

A distribuição da posição das larvas dentro do aquário foi calculada para as três zonas distintas dos aquários e para cada um dos três tratamentos (figura 13A). Foi levada em consideração a posição em relação ao eixo Y para as trajetórias em cada um dos tratamentos. A quantidade de pontos em determinada região representa a quantidade de tempo que as larvas nela permaneceram. Para comparações quantitativas foi calculada a porcentagem do tempo que as larvas passaram em cada uma das zonas espaciais (figura 13B).

Os resultados da posição espacial da larva mostraram o mesmo padrão encontrado para a velocidade instantânea e o NGDR, ou seja, para o controle e 15 kPa não houve diferenças significativas. Para os três tratamentos, a região definida como substrato teve a maior porcentagem de permanência das larvas (próxima a 75%) e não foram encontradas diferenças significativas entre o controle, 10 e 15 kPa (figura 13B). Por outro lado, quando analisada a distribuição dos pontos dentro das regiões da coluna de água e superfície, o tratamento de 10 kPa mostrou um aumento da porcentagem de tempo na coluna de água e uma diminuição na região da superfície.

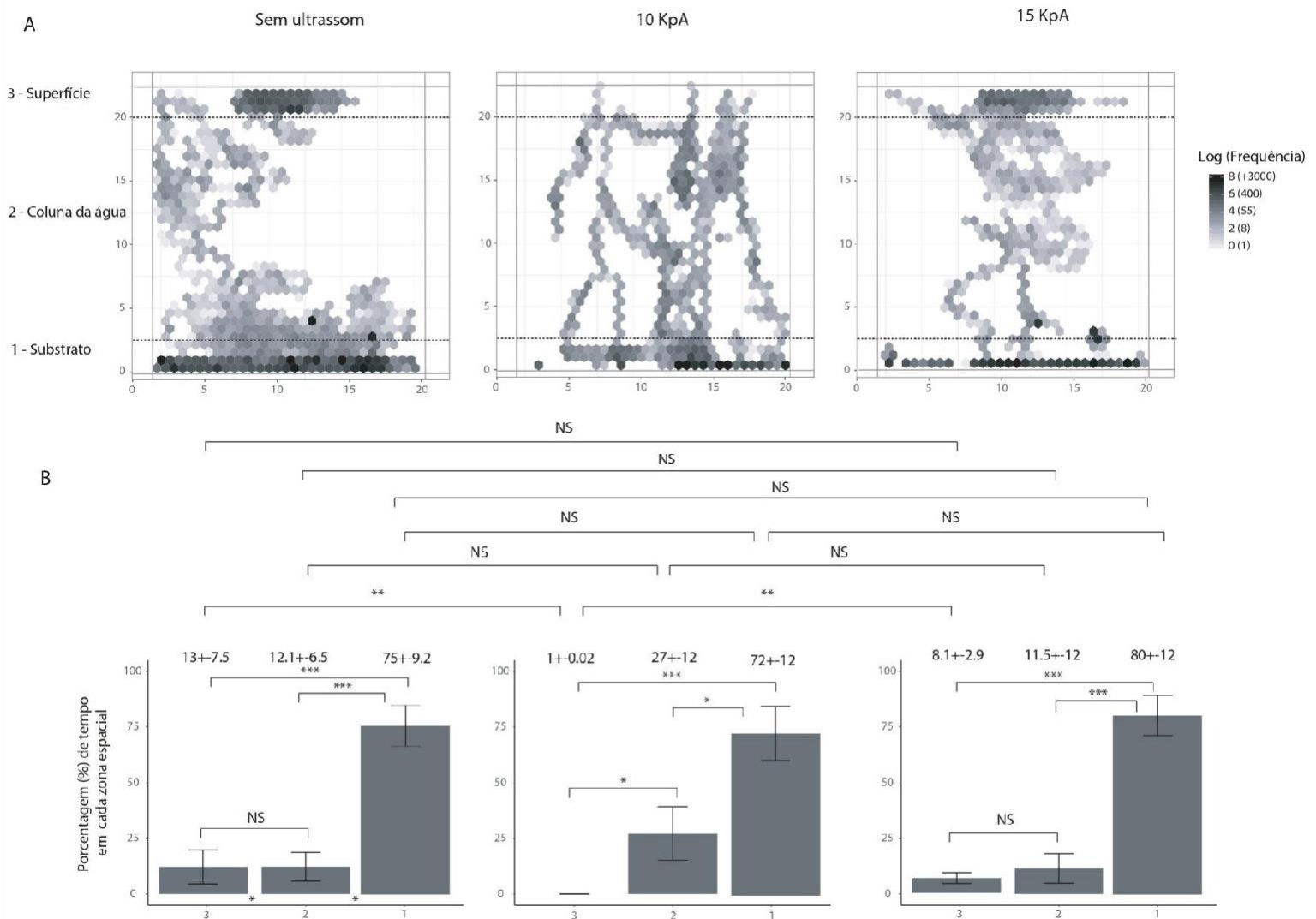


Figura 13 - (A) Mapas de calor representando a distribuição espacial das larvas cypris para cada um dos tratamentos em relação às três regiões pré-definidas: substrato, coluna de água e superfície. Para cada mapa, foram usados todos os pontos das trajetórias, para cada tratamento. O eixo x e o eixo y se referem às posições nos respectivos eixos, medidos em mm, as linhas pontilhadas indicam a altura (em mm) dos limites estabelecidos para as três regiões do aquário e as linhas contínuas internas representam o limite das bordas do aquário. Os pontos do gráfico se referem à frequência de pontos das trajetórias encontrados naquela posição, em escala de log. (B) Comparações entre a porcentagem de tempo das larvas passadas em cada uma das regiões distintas. Cada gráfico corresponde ao mesmo tratamento do diagrama na parte (A). No eixo x, cada número se refere à uma região (1 = substrato; 2 = coluna de água; 3 = superfície), e no eixo y se encontram os valores de porcentagem de permanência da larva, até 100%. Os números acima de cada uma das barras referem ao valor de porcentagem média \pm erro padrão. Para a comparação entre os tratamentos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn e para a comparação dentro dos tratamentos foi utilizado o teste de Wilcoxon. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e NS denota "não significativo", sendo que * representa $p = 0,05$; ** representa $p = 0,01$; *** representa $p < 0,01$.

4. Discussão

Novos métodos anti-incrustantes são geralmente validados a partir de ensaios para estimar as taxas de assentamento de organismos sob diferentes tratamentos e, embora importantes, são limitados à verificação de um único parâmetro e demoram mais tempo para a sua realização quando comparados com métodos comportamentais de movimento (Marechal *et al*, 2004). Os estudos que investigam as alterações comportamentais da larva têm se mostrado mais esclarecedores sobre o modo de ação dos métodos físicos ou químicos, e assim têm ganhado espaço entre os testes de eficácia de novos anti-incrustantes (Aldred *et al*, 2010). Estudos comportamentais têm sido empregados para avaliação de métodos químicos, como tintas e FRCs (Aldred *et al*, 2010; Afsar *et al*, 2003), assim como para superfícies texturizadas (Prendergast *et al*, 2008) porém para o ultrassom os dados ainda são bastante escassos.

Seuront *et al*. (2005) fizeram um compilado das principais métricas utilizadas para quantificar os comportamentos de organismos planctônicos, sendo que a velocidade dos organismos é a mais tradicionalmente utilizada, seguido por NGDR e ângulo de rotação (*turning angle*), que também foram usadas neste estudo. Ressalta-se que, neste trabalho, os cálculos de NGDR foram feitos utilizando segmentos de 10 segundos ou 200 quadros e não com base em toda a trajetória.

Os vídeos controle, ou seja, sem aplicação de ultrassom, foram marcados por trajetórias com baixo NGDR, ou seja, são mais curvas, com grande alteração angular do movimento e velocidades relativamente baixas. Essas características podem ser relacionadas ao elemento de busca próxima (*close search*) citada por Crisp (1976) e descrita em detalhes por Lagersson e Hoeg (2002). Neste último trabalho, os autores associam esse comportamento à busca mais detalhada de um possível substrato para o seu assentamento, movimento esse que é precursor do seu assentamento propriamente dito, que ocorre quando há a cimentação das ântenulas. Uma das características descritas pelos autores é que a inspeção do substrato nessa fase exploratória ocorre com apenas uma ântenula ancorada ao substrato e com a outra inspecionando a área circundante. A inspeção é marcada por uma alta quantidade de mudanças direcionais, principalmente na faixa de 180°, revertendo completamente o caminho original da larva. Como observado na figura 12, a frequência do ângulo de 180° para o controle é superior aos outros, em todas as projeções. De maneira similar, levando-se em

consideração as classificações comportamentais em três dimensões reportadas por Maleschlijski *et al* (2015), pode-se assumir que a larva estava realizando o comportamento denominado "*rotating*", em que a larva se encontra mais próxima do substrato. Essas duas categorias de classificação são tipificadas por baixas velocidades e movimentação curva, resultados encontrados nesse trabalho para o tratamento sem ultrassom, e que poderiam ser associadas ao aumento do comportamento exploratório da larva (Aldred *et al*, 2010)

Com a aplicação do ultrassom em pressão acústica de 10 kPa, há uma alteração significativa no comportamento da larva. A natação das larvas cypris se torna mais retilínea (valores de NGDR maiores, figura 11), houve menor mudança angular e maior frequência de ângulos próximos a 0°, e as trajetórias tiveram velocidades maiores. Um ponto a ser considerado é que a mudança com relação à velocidade ocorre nos planos XY e YZ e não para o plano horizontal (figura 10), ou seja, a larva teria uma maior tendência em nadar na coluna de água e não tanto no substrato.

Berntsson *et al* (2000) compararam a exploração de larvas cypris em superfícies lisas e texturizadas e encontraram uma alteração significativa entre os dois tratamentos. Enquanto para as superfícies lisas os indivíduos permaneceram mais tempo na fase de exploração, onde há contato das antênulas com a superfície, com a presença de texturização foi observado mais o comportamento de natação, onde não necessariamente existe o mesmo tipo de contato. Além disso, ao analisar o comportamento de exploração detalhadamente, os autores verificaram que o processo de inspeção, onde a larva se ancora com as duas antênulas em um ponto específico do substrato, ocorreu em maior frequência nas superfícies lisas do que nas texturizadas. Os autores sugeriram, a partir disso, que o comportamento de natação seria um processo de rejeição de um substrato não adequado ao assentamento da larva.

Maleschlijski *et al* (2015) tipificaram, em três dimensões, o comportamento de natação com velocidades variáveis e não constantes, podendo ter partes mais rápidas e partes mais lentas, e com alterações leves na angulação da trajetória. Essas características são similares aos resultados apresentados nesse trabalho. O comportamento que as larvas realizaram durante a aplicação de 10 kPa é relacionável com o comportamento "*swimming*" descrito. Levando-se em consideração a hipótese de Berntsson *et al* (2000), pode-se assumir, portanto, que a larva rejeita o substrato quando há aplicação do ultrassom, resultando em menores taxas de assentamento como as encontradas em outros trabalhos (Guo *et al*, 2011). Durante o comportamento de natação da larva, há o eventual contato dela com o substrato, mas não

necessariamente esse comportamento leva às próximas fases de exploração. Com valores de velocidade mais altos e a maior linearidade das trajetórias analisadas, sugere-se que a probabilidade de a larva ter realizado os padrões de busca proximal observados para os controles é menor com a aplicação do ultrassom.

Com o aumento da pressão para 15 kPa, contudo, as trajetórias retomaram os padrões de natação do controle, sendo a maioria dos pontos de NGDR e velocidade com valores baixos e maior frequência do ângulo de 180. Duas hipóteses podem explicar estes padrões: A primeira seria de que, a esta pressão, não haveria alteração aparente do comportamento da larva, mas ainda assim ela não seria capaz de realizar o assentamento. A segunda hipótese seria a de que o ultrassom causaria danos à integridade morfológica ou fisiológica da larva, podendo afetar o seu sistema nervoso, e as baixas velocidades e constantes mudanças na direção seriam resultado de uma desorientação da larva.

Não é a primeira vez que dois métodos anti-incrustantes de mesma natureza resultam em respostas comportamentais distintas. Aldred *et al* (2010) investigaram o comportamento de larvas cypris quando expostas a dois tipos de revestimentos à base de polímeros zwitteriônicos que atuam como FRCs. Apesar de serem de natureza química similar, a larva respondeu de forma distinta entre os dois: enquanto para um polímero a larva demonstrou uma redução significativa na velocidade, para o outro a velocidade encontrada foi próxima aos valores encontrados para o controle. Também foram encontradas distinções quanto à velocidade angular, distância total, entre outras variáveis. Foi sugerido que para um tipo de revestimento a larva não conseguiu assentar enquanto para o outro a larva não realizou a exploração e nadou para longe do substrato.

Um dos pontos levantados por Aldred *et al* (2010) é que para o SBMA, polímero associado a valores baixos de velocidade, não houve assentamento e as larvas não realizaram os comportamentos exploratórios em que há o contato da antênula com o substrato. Embora essa característica esteja frequentemente associada ao comportamento exploratório, nesse caso a larva estaria realizando uma prevenção ativa do assentamento ao invés de uma rejeição voluntária da superfície. Essa mesma suposição poderia ser aplicada nos resultados desse trabalho. Enquanto para a pressão de 10 kPa a larva estaria realizando a rejeição da superfície, sugerida por Berntsson *et al* (2000), para 15 kPa haveria uma prevenção do assentamento, resultado da vibração do substrato, tornando-o não atrativo à larva.

Com relação à segunda hipótese, Kitamura *et al* (1995) utilizaram o ultrassom para demonstrar a taxa de sobrevivência de náuplios e larvas cypris de acordo com a irradiação total (definida pelos autores como a pressão acústica vezes o tempo de exposição). Os autores relataram que a taxa de sobrevivência tanto das larvas cypris quanto dos náuplios decaiu significativamente com o aumento da irradiação total, dado que o tempo máximo de exposição ao ultrassom foi de 120 segundos. Seth *et al* (2010) também utilizaram o ultrassom com náuplios de craca e mostraram que, a certos níveis de energia aplicada, com menos de um minuto de exposição os náuplios foram pulverizados. Estévez-Calvar *et al* (2017) também mostraram como o ultrassom pode ser aplicado como forma de eliminar espécies incrustantes em tanques de água de lastro. Assim, não é uma impossibilidade pensar que pressões baixas de ultrassom, mesmo que não haja a morte do organismo, impactos subletais resultariam no comportamento observado.

O assentamento da larva cypris é um processo complexo que compreende 3 etapas (Crisp, 1976). Nessas etapas há a seleção do local de assentamento, que envolve a detecção dos *footprints* deixados por outras larvas cypris durante o processo de exploração do substrato (Phang *et al*, 2008). Essa complexidade é resultado de um sistema nervoso pequeno, com a maior porção destinada às antênulas, e que é organizado com o propósito de coordenar as respostas diante dos referenciais ("*cues*") de assentamento. Como já foi mostrado que o ultrassom pode causar injúrias físicas às larvas, sugere-se que com a aplicação do ultrassom a 15 kPa, o sistema nervoso da larva possa ser afetado, mas observações específicas quanto a esse aspecto são necessárias. Assim sendo, o comportamento demonstrado pela larva não necessariamente estaria ligado ao pré-assentamento de fato, mas sim à desorientação da larva, que não seria capaz de completar o processo de assentamento, levando à diminuição da taxa de assentamento reportada na literatura (Guo *et al*, 2011).

Embora as duas hipóteses possam ser aplicadas no caso do ultrassom, ainda não é claro o motivo para a alteração brusca entre as duas pressões aplicadas nos presentes experimentos, e novos trabalhos são necessários para o melhor esclarecimento dessa questão.

A posição da larva na coluna de água pode ser um bom indicativo da dinâmica de movimentação com relação a um substrato atrativo ou não ao assentamento. Nos presentes resultados, para todos os tratamentos, houve uma maior frequência (próxima a 75%) de posicionamento da larva na porção inferior do aquário, próxima ao substrato, enquanto que o posicionamento na coluna de água seria um indicativo de uma transição entre os outros dois

setores. Isto coincide com os argumentos de Maleschlijski *et al* (2014) em relação ao posicionamento vertical das larvas.

Comparando a influência de dois substratos diferentes (DDP, que seria atrativo à larva e HUDT, que não seria atrativo), Maleschlijski *et al* (2014) reportaram que houve diferença significativa na frequência da larva na porção intermediária do aquário. Em ambos os casos, a frequência na porção intermediária foi baixa, mas, com a presença de um substrato atrativo às larvas, a frequência nessa porção foi de apenas 6%, e com o outro substrato a frequência se elevou a 23%. Paralelamente, a velocidade média no DDP foi metade da velocidade para o HUDT, e a concentração da larva também foi diferente: para o substrato atrativo, as larvas tiveram uma natação mais retilínea e mais longa, enquanto para o HUDT as trajetórias foram mais curvas e concentradas.

Observando os mapas de calor da figura 13, observa-se que, com a aplicação do ultrassom em 10 kPa, a frequência de ocorrência nas porções intermediárias foi de 27%, o dobro da frequência encontrada para o controle na mesma região. Com base nas conclusões de Maleschlijski *et al* (2014), sugere-se que o substrato, com a vibração do ultrassom a 10 kPa, não seja atrativo à larva, e por isso a frequência na porção mediana seria superior à encontrada para o controle e o tratamento com 15 kPa. Embora a diferença não fosse significativa, houve um pequeno decaimento na proporção de tempo da larva no substrato para o tratamento com 10 kPa. Para o controle e 15 kPa, a larva permaneceu 75% do tempo no substrato, enquanto para 10 kPa, essa frequência caiu para 72%. As velocidades e valores de tortuosidade (NGDR) das trajetórias aqui obtidas também são equivalentes ao reportado por Maleschlijski *et al* (2014) com relação a substratos atrativos ou não às larvas. Substratos pouco atrativos são marcados por velocidades mais altas e baixa tortuosidade, enquanto, no controle, as trajetórias são mais lentas e com alta tortuosidade.

Outra explicação para a presença das larvas em porções superiores do recipiente estaria relacionada ao decaimento da pressão acústica ao longo da coluna de água. Guo *et al* (2012) sugeriram que a pressão acústica, quando medida a uma mesma faixa de altura, possui variação menor que 10%, assumindo-se que a pressão é distribuída uniformemente. Contudo, estes autores não fizeram a medição no eixo vertical. Com o mapeamento feito com o hidrofone (figura 9), observa-se que há uma diminuição considerável da pressão, chegando a valores próximos a 0 kPa quando próximo à superfície. Guo *et al* (2011) atribuíram a diminuição na taxa de assentamento das larvas cypris à cavitação, que é a formação de bolhas

devido à intensidade do ultrassom em um líquido. Essas bolhas podem danificar a larva e, dado que a formação delas tanto da frequência quanto da pressão aplicada, pode-se sugerir que as larvas se deslocariam a regiões de menor pressão, onde a ocorrência da cavitação seria menor ou nula.

Com relação ao tratamento de 15 kPa, as frequências da posição das larvas nas três regiões foram equivalentes às encontradas para o controle sem ultrassom, de forma similar aos resultados encontrados para NGDR, velocidade e distribuição dos ângulos de rotação. As razões da similaridade com o controle podem ter relação com as hipóteses descritas anteriormente, onde a larva estaria realizando o comportamento de prevenção do assentamento ou teria sofrido injúrias físicas, levando a um comportamento de desorientação marcado por grandes alterações angulares e baixa velocidade.

A maioria dos trabalhos com objetivo de compreender as etapas que levam ao assentamento de larvas cypris tem sido conduzida apenas na visão horizontal, sendo realizados em placas de Petri, onde não há observação real dos elementos verticais da natação das larvas, com apenas algumas exceções (Maleschlijski *et al*, 2012; 2014; 2015). Aldred *et al* (2018) afirmam que o interesse principal dos estudos de comportamento de larvas cypris se concentram justamente na etapa em que há o contato com o substrato ao invés do seu período pelágico, e propõe uma nova forma de tracking, onde se avalia quantitativamente o comportamento de caminhada e inspeção (*walking e inspection*).

Contudo, a natação compreende o elemento de comportamento mais frequente das larvas (Maleschlijski *et al*, 2015), e já foi demonstrado que os parâmetros de movimentação são um indicativo da preferência de assentamento das larvas (Maleschlijski *et al*, 2014). É sabido que o substrato pode influenciar a posição da larva dentro de um recipiente de teste (Maleschlijski *et al*, 2014) e que esse pode ser um bom indicativo de uma superfície adequada ou não ao assentamento da larva. As análises de comportamento e assentamento em laboratório são utilizadas para testar possíveis superfícies e métodos anti-incrustantes, assim como para determinar as melhores condições de sua aplicação antes dos testes em campo (Briand, 2009). Dessa forma, as análises em 3D podem ser aplicadas como um passo importante para a primeira avaliação de um método anti-incrustante.

Por muito tempo as análises quantitativas do comportamento de organismos planctônicos foram feitas em 2D, com apenas poucos trabalhos em 3D, e isso criou uma dificuldade quanto à comparação dos dados disponíveis. Para avaliar as diferenças entre as duas formas de

obtenção de informação do comportamento, Dur *et al* (2011) observaram as alterações entre os dois métodos e os compararam, e encontraram que, para a velocidade, houve uma discrepância nos valores médios calculados para as duas projeções. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas quanto ao NGDR e velocidade instantânea, os autores defendem que, ainda que a projeção horizontal seja um bom indicativo do comportamento geral do organismo, para se obter valores mais precisos, o ideal é que as observações sejam feitas em 3D. Os autores também encontraram que, para as projeções bidimensionais, um dos padrões de comportamento mostrou frequências maiores que em 3D, demonstrando que, quando apenas um plano é levado em consideração, pode-se obter interpretações errôneas de comportamentos, inclusive ao se estudar as influências de algum fator no comportamento dos organismos.

No presente trabalho houve uma alteração significativa quanto às projeções, tanto para a velocidade instantânea quanto para o NGDR. Na figura 10, onde estão os valores de velocidade instantânea para os tratamentos, observa-se que, analisando apenas a projeção horizontal (XZ) não há diferença significativa entre os valores encontrados. Mas, analisando as projeções verticais, assim como o 3D, as velocidades mostraram valores significativamente diferentes entre os tratamentos. Por outro lado, para os valores de NGDR, a projeção horizontal apresentou alterações significativas entre os tratamentos, o que não foi encontrado para as demais projeções, indicando que a natação da larva é tortuosa com relação ao substrato, mas não na coluna de água. Quando há apenas a projeção horizontal, ainda que se obtenha uma predição das alterações encontradas, por vezes a interpretação pode ser errônea ou pouco informativa.

Guo *et al* (2011) observaram alterações no comportamento da larva cypris quando houve aplicação do ultrassom a uma pressão de 20 kPa, em frequências de 23 e 102 kHz, e por 30 ou 300s de exposição. Como base de comparação, os autores utilizaram as medidas descritas por Chaw e Birch (2009): tamanho do passo (medido como o tamanho do espaço entre as duas antênulas ancoradas no substrato), duração do passo (tempo entre uma antênula se soltar do substrato e ancorar novamente), *pace* (número de passos dados dentro de cinco minutos) e taxa de exploração (número de larvas explorando o substrato em cinco minutos). Essas medidas estão mais associadas à exploração do substrato pela larva, e os resultados encontrados foram condizentes com o padrão observado por Chaw e Birch (2009), onde substratos menos favoráveis ao assentamento levariam a um menor tamanho e uma maior duração do passo.

Enquanto para a pressão de 20 kPa os autores tenham encontrado alterações comportamentais, para 5 kPa não foram encontradas alterações significativas no comportamento exploratório da larva, ainda que tenha havido diminuição na taxa de assentamento (Guo *et al*, 2012). Os autores levantaram a hipótese de que, com menores pressões, a vibração do substrato não teria magnitude suficiente para ser detectada pelas larvas. Embora não tenham sido encontradas alterações comportamentais quanto à exploração aproximada, não foram feitas observações quanto aos outros elementos envolvidos no assentamento que, como demonstrado nesse trabalho, também podem ser afetados pelos métodos anti-incrustantes.

5. Considerações finais

Neste trabalho foi estudado o comportamento de deslocamento de larvas cypris de cirripédios sob a aplicação de ultrassom. Foram observadas alterações significativas com relação à velocidade, NGDR, angulação e o posicionamento da larva dentro do aquário.

As diferenças entre as duas pressões aplicadas nesse trabalho indicam que o ultrassom pode atuar de formas distintas sobre a larva, conforme a pressão acústica aplicada. Sob pressões menores, o ultrassom modificaria a exploração do substrato pela larva, tornando-o não adequado ao assentamento, o que resultaria em uma menor fração de tempo da larva explorando o local. Para pressões maiores, a larva sofreria danos físicos, ou em sua morfologia ou em sua fisiologia, que prejudicariam o seu processo de busca por um substrato, tornando-o difícil de ser realizado.

O ultrassom possui suas vantagens como método anti-incrustante, visto que não causa alterações químicas no ambiente, cumprindo, assim, as novas diretrizes estabelecidas para o estudo de novos métodos anti-incrustantes. Contudo, mais testes devem ser realizados a fim de se chegar a uma configuração de pressão eficaz, com o mínimo de acumulação de organismos possível e com gastos de energia compatíveis ao seu uso embarcado. Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que, mesmo sob pressões baixas de ultrassom, há efeito sobre as larvas cypris. Mas os ensaios aqui descritos referem-se a um ambiente controlado, sem influências externas presentes no ambiente que podem afetar o

comportamento das larvas, assim como o seu assentamento. Sugere-se que, para os próximos passos, ensaios em campo sejam realizados, observando as alterações comportamentais de larvas cypris, com base nas observações de Matsumura *et al* (2000) e Prendergast *et al* (2008).

Dado que a comunidade incrustante é bastante diversa, sugere-se, para os próximos passos, que seja estudado o efeito do ultrassom sobre outras espécies de organismos incrustantes, como mexilhões, vermes tubulares, briozoários e ascídias. Uma das complicações com testes para o desenvolvimento de novos métodos anti-incrustantes é que tais testes se concentram na avaliação com um único organismo modelo. Os métodos anti-incrustantes, quando aplicados, devem ser eficientes em um amplo espectro de organismos, e por isso, sugere-se que testes mais abrangentes sejam feitos.

Também foi demonstrado que, com relação às alterações observadas entre as projeções, quando testes comportamentais são realizados apenas em duas dimensões, informações importantes sobre o modo de atuação de um método anti-incrustante podem ser perdidas e resultados não conclusivos podem ser obtidos. As filmagens realizadas no plano horizontal podem fornecer bons indicativos sobre a eficiência de um método. Porém, principalmente na fase de desenvolvimento, sugere-se que sejam realizadas as observações tridimensionais, visto que podem ser mais esclarecedoras quanto às alterações comportamentais ocorridas na coluna de água, além do substrato, e assim contribuir para aperfeiçoamentos que buscam a maior eficácia do ultrassom.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o ultrassom afeta o comportamento das larvas cypris de cirripédios e que essas alterações podem estar associadas à diminuição na taxa de assentamento, observada em estudos anteriores (Guo *et al*, 2011a; Guo *et al*, 2011b). Essas observações comportamentais reforçam a possibilidade do uso do ultrassom como método anti-incrustante.

5. Referências bibliográficas

Afsar, A., De Nys, R., Steinberg, P. (2003). The effects of foul-release coatings on the settlement and behaviour of cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite amphitrite* Darwin. **Biofouling**, 19(S1), 105-110.

Aldred, N., Clare, A. S. (2008). The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings. **Biofouling**, 24(5), 351-363.

Aldred, N., Li, G., Gao, Y., Clare, A. S., Jiang, S. (2010). Modulation of barnacle (*Balanus amphitrite* Darwin) cyprid settlement behavior by sulfobetaine and carboxybetaine methacrylate polymer coatings. **Biofouling**, 26(6), 673-683.

Aldred, N., Høeg, J. T., Maruzzo, D., Clare, A. S. (2013). Analysis of the behaviours mediating barnacle cyprid reversible adhesion. **Plos One**, 8(7), e68085.

Aldred, N., Alsaab, A., Clare, A. S. (2018). Quantitative analysis of the complete larval settlement process confirms Crisp's model of surface selectivity by barnacles. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 285(1872), 20171957.

Alsaab, A., Aldred, N., Clare, A. S. (2017). Automated tracking and classification of the settlement behaviour of barnacle cyprids. **Journal of the Royal Society Interface**, 14(128), 20160957.

Agarwal, A., Jern Ng, W., Liu, Y. (2014). Removal of biofilms by intermittent low-intensity ultrasonication triggered bursting of microbubbles. **Biofouling**, 30(3), 359-365.

Agostinelli, C., Lund, U. (2017). R package circular: Circular Statistics (version 0.4–93), CA: Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics, Ca'Foscari University, Venice, Italy. UL: Department of Statistics, California Polytechnic State University, San Luis Obispo, California, USA.

Bazaka, K., Crawford, R. J., Ivanova, E. P. (2011). Do bacteria differentiate between degrees of nanoscale surface roughness? **Biotechnology Journal**, 6(9), 1103-1114.

Benson, P. H., Brining, D. L., Perrin, D. W. (1973). Marine fouling and its prevention. **Marine Technology**, 10(3), 37.

Berntsson, K. M., Jonsson, P. R., Lejhall, M., Gatenholm, P. (2000). Analysis of behavioural rejection of micro-textured surfaces and implications for recruitment by the barnacle *Balanus improvisus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 251(1), 59-83.

Bianco, G., Botte, V., Dubroca, L., d'Alcalà, M. R., Mazzocchi, M. G. (2013). Unexpected regularity in swimming behavior of *Clausocalanus furcatus* revealed by a telecentric 3D computer vision system. **Plos One**, 8(6), e67640.

Bixler, G. D., Bhushan, B. (2012). Biofouling: lessons from nature. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, 370(1967), 2381-2417.

Bott, T. R. (2000). Biofouling control with ultrasound. **Heat Transfer Engineering**, 21(3), 43-49.

Branscomb, E. S., Rittschof, D. (1984). An investigation of low frequency sound waves as a means of inhibiting barnacle settlement. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 79(2), 149-154.

Bressy, C., Lejars, M. (2014). Marine fouling: an overview. **The Journal of Ocean Technology**, 9(4), 19-28.

Briand, J. F. (2009). Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. **Biofouling**, 25(4), 297-311.

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

Callow, J. A., Callow, M. E. (2011). Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. **Nature Communications**, 2, 244.

Cao, S., Wang, J., Chen, H., Chen, D. (2011). Progress of marine biofouling and antifouling technologies. **Chinese Science Bulletin**, 56(7), 598-612.

- Champ, M. A. (2003). Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. **Marine Pollution Bulletin**, 46(8), 935-940.
- Chaw, K. C., Birch, W. R. (2009). Quantifying the exploratory behaviour of *Amphibalanus amphitrite* cyprids. **Biofouling**, 25(7), 611-619.
- Crisp, D. J. (1976). Settlement responses in marine organisms. **Adaptation to Environment: Essays on the Physiology of Marine Animals**. (pp. 83-124). Butterworths, London.
- Dafforn, K. A., Lewis, J. A., Johnston, E. L. (2011). Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, 62(3), 453-465.
- Dodson, S. I., Ryan, S., Tollrian, R., Lampert, W. (1997). Individual swimming behavior of *Daphnia*: effects of food, light and container size in four clones. **Journal of Plankton Research**, 19(10), 1537-1552.
- Dunn, O. J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. **Technometrics**, 6(3), 241-252.
- Dinno, A. (2015). Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test. **The Stata Journal**, 15(1), 292-300.
- Edgar, R., Drolet, D., Ehrman, J. M., Kaczmarek, I. (2014). Motile male gametes of the araphid diatom *Tabularia fasciculata* search randomly for mates. **Plos One**, 9(7), e101767.
- Elbourne, P. D., Veater, R. A., Clare, A. S. (2008). Interaction of conspecific cues in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia) settlement assays: continued argument for the single-larva assay. **Biofouling**, 24(2), 87-96.
- Estévez-Calvar, N., Gambardella, C., Miraglia, F., Pavanello, G., Greco, G., Faimali, M., Garaventa, F. (2018). Potential use of an ultrasound antifouling technology as a ballast water treatment system. **Journal of Sea Research**, 133, 115-123.

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

Guo, S., Lee, H. P., Khoo, B. C. (2011). Inhibitory effect of ultrasound on barnacle (*Amphibalanus amphitrite*) cyprid settlement. **Journal of Experimental of Marine Biology and Ecology**, 409(1-2), 253-258.

Guo, S. F., Lee, H. P., Chaw, K. C., Miklas, J., Teo, S. L. M., Dickinson, G. H., Birch, W. R., Khoo, B. C. (2011). Effect of ultrasound on cyprids and juvenile barnacles. **Biofouling**, 27(2), 185-192.

Guo, S., Lee, H. P., Teo, S. L. M., Khoo, B. C. (2012). Inhibition of barnacle cyprid settlement using low frequency and intensity ultrasound. **Biofouling**, 28(2), 131-141.

Guo, S., Khoo, B. C., Teo, S. L. M., Zhong, S., Lim, C. T., Lee, H. P. (2014). Effect of ultrasound on cyprid footprint and juvenile barnacle adhesion on a fouling release material. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 115, 118-124.

Kitamura, H., Takahashi, K., Kanamaru, D. (1995). Inhibitory effect of ultrasonic waves on the larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite* in the laboratory. **Marine Fouling**, 12(1), 9-13.

Lagersson, N., Høeg, J. (2002). Settlement behavior and antennular biomechanics in cypris larvae of *Balanus amphitrite* (Crustacea: Thecostraca: Cirripedia). **Marine Biology**, 141(3), 513-526.

Latour, M., Murphy, P. V. (1981). Application of PVF2 transducers as piezoelectric vibrators for marine fouling prevention. **Ferroelectrics**, 32(1), 33-37.

Legg, M., Yücel, M. K., De Carellan, I. G., Kappatos, V., Selcuk, C., Gan, T. H. (2015). Acoustic methods for biofouling control: A review. **Ocean Engineering**, 103, 237-247.

Lejars, M., Margailan, A., Bressy, C. (2012). Fouling release coatings: a nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. **Chemical Reviews**, 112(8), 4347-4390.

- Maleschlijski, S., Sendra, G. H., Di Fino, A., Leal-Taixé, L., Thome, I., Terfort, A., Aldred, N., Grunze, M., Clare, A., Rosenhahn, B., Rosenhahn, A. (2012). Three dimensional tracking of exploratory behavior of barnacle cyprids using stereoscopy. **Biointerphases**, 7(1), 50.
- Maleschlijski, S., Bauer, S., Di Fino, A., Sendra, G. H., Clare, A. S., Rosenhahn, A. (2014). Barnacle cyprid motility and distribution in the water column as an indicator of the settlement-inhibiting potential of nontoxic antifouling chemistries. **Biofouling**, 30(9), 1055-1065.
- Maleschlijski, S., Bauer, S., Aldred, N., Clare, A. S., Rosenhahn, A. (2015). Classification of the pre-settlement behaviour of barnacle cyprids. **Journal of the Royal Society Interface**, 12(102), 20141104.
- Marechal, J. P., Hellio, C., Sebire, M., Clare, A. (2004). Settlement behaviour of marine invertebrate larvae measured by EthoVision 3.0. **Biofouling**, 20(4-5), 211-217.
- Matsumura, K., Hills, J. M., Thomason, P. O., Thomason, J. C., Clare, A. S. (2000). Discrimination at settlement in barnacles: laboratory and field experiments on settlement behaviour in response to settlement-inducing protein complexes. **Biofouling**, 16(2-4), 181-190.
- Mott, I. E. C., Stickler, D. J., Coakley, W. T., Bott, T. R. (1998). The removal of bacterial biofilm from water-filled tubes using axially propagated ultrasound. **Journal of Applied Microbiology**, 84(4), 509-514.
- Newman, W. A., Abbott, D. P. (1980). Cirripedia: the barnacles. **Intertidal Invertebrates of California**. Stanford University Press, Stanford, 504-535.
- Nir, S., Reches, M. (2016). Bio-inspired antifouling approaches: the quest towards non-toxic and non-biocidal materials. **Current Opinion in Biotechnology**, 39, 48-55.
- Park, J. S., Lee, J. H. (2018). Sea-trial verification of ultrasonic antifouling control. **Biofouling**, 34(1), 98-110.

Phang, I. Y., Aldred, N., Clare, A. S., Vancso, G. J. (2007). Towards a nanomechanical basis for temporary adhesion in barnacle cyprids (*Semibalanus balanoides*). **Journal of the Royal Society Interface**, 5(21), 397-402.

Pradhan, N. N., Gohad, N. V., Orihuela, B., Burg, T. C., Birchfield, S. T., Rittschof, D., Mount, A. S. (2011). Development of an automated algorithm for tracking and quantifying barnacle cyprid settlement behavior. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 410, 21-28.

Prendergast, G. S., Zurn, C. M., Bers, A. V., Head, R. M., Hansson, L. J., Thomason, J. C. (2008). Field-based video observations of wild barnacle cyprid behaviour in response to textural and chemical settlement cues. **Biofouling**, 24(6), 449-459.

Qian, P. Y., Lau, S. C., Dahms, H. U., Dobretsov, S., Harder, T. (2007). Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. **Marine Biotechnology**, 9(4), 399-410.

Rittschof, D., Hooper, I. R., Branscomb, E. S., Costlow, J. D. (1985). Inhibition of barnacle settlement and behavior by natural products from whip corals, *Leptogorgia virgulata* (Lamarck, 1815). **Journal of Chemical Ecology**, 11(5), 551-563.

Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R., Briand, J. F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, 15(11), 2879-2893.

Schmitt, F. G., Seuront, L. (2001). Multifractal random walk in copepod behavior. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, 301(1-4), 375-396.

Schultz, M. P. (2007). Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. **Biofouling**, 23(5), 331-341.

Schultz, M. P., Bendick, J. A., Holm, E. R., Hertel, W. M. (2011). Economic impact of biofouling on a naval surface ship. **Biofouling**, 27(1), 87-98.

Seth, N., Chakravarty, P., Khandeparker, L., Anil, A. C., Pandit, A. B. (2010). Quantification of the energy required for the destruction of *Balanus amphitrite* larva by ultrasonic treatment. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 90(7), 1475-1482.

Seuront, L., Hwang, J. S., Tseng, L. C., Schmitt, F. G., Souissi, S., Wong, C. K. (2004). Individual variability in the swimming behavior of the sub-tropical copepod *Oncaea venusta* (Copepoda: Poecilostomatoida). **Marine Ecology Progress Series**, 283, 199-217.

Shapiro, S. S., Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, 52(3/4), 591-611.

Sultana, S. T., Babauta, J. T., Beyenal, H. (2015). Electrochemical biofilm control: a review. **Biofouling**, 31(9-10), 745-758.

Thomas, K. V., Brooks, S. (2010). The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. **Biofouling**, 26(1), 73-88.

Thomason, J. C., Hills, J. M., Thomason, P. O. (2002). Field-based behavioural bioassays for testing the efficacy of antifouling coatings. **Biofouling**, 18(4), 285-292.

Tribou, M., Swain, G. (2015). Grooming using rotating brushes as a proactive method to control ship hull fouling. **Biofouling**, 31(4), 309-319.

UNCTAD Review of Maritime Transport (2017) **United Nations Publication**, (UNCTAD/RMT/2017)

Visser, A. W., Kiørboe, T. (2006). Plankton motility patterns and encounter rates. **Oecologia**, 148(3), 538-546.

Walley, L. J. (1969). Studies on the larval structure and metamorphosis of *Balanus balanoides* (L.). **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, 256(807), 237-280.

WHOI (1952) Marine fouling and its prevention. Contribution No. 580 from the Woods Hole Oceanographic Institute. **U.S. Naval Institute**, Annapolis, Maryland, (pp. 391).

Yebra, D. M., Kiil, S., Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, 50(2), 75-104.

Yen, J., Rasberry, K. D., Webster, D. R. (2008). Quantifying copepod kinematics in a laboratory turbulence apparatus. **Journal of Marine Systems**, 69(3-4), 283-294.