



**Naturalis**

Repositorio Institucional  
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



# Las incrustaciones biológicas [biofouling] y metodología para su control

**Pérez, Miriam Cristina**

Doctor en Ciencias Naturales

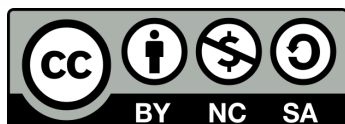
Dirección: García, Mirta L.

Co-dirección: Blustein, Guillermo

Facultad de Ciencias Naturales y Museo  
2012

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20120919001261>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



**Naturalis**

Repositorio Institucional  
FCNyM - UNLP



Facultad de Ciencias  
**Naturales y Museo**

## **TESIS DOCTORAL**

# **Las incrustaciones biológicas (biofouling) y metodología para su control**

**Lic. Miriam Cristina Pérez**

Tesis para la obtención del Título de  
Doctor en Ciencias Naturales

**Director**

**Dra. Mirta L. García**

**Co-Director**

**Dr. Guillermo Blustein**

**La Plata, Argentina - 2012**

*A mi familia*

## *Agradecimientos*

La realización de un trabajo de Tesis Doctoral representa una tarea ardua y generalmente contrarreloj por las presiones que impone el sistema científico. En mi caso particular significó un gran esfuerzo pero también un enorme placer, no solo por el deseo de concretar la “asignatura pendiente” en mi carrera profesional sino también porque me permitió integrar y relacionar una gran cantidad de información que demandó muchas horas de estudio y trabajo que espero se encuentren reflejadas en los capítulos de esta Tesis.

A su vez esta gran tarea de llevar a cabo la Tesis no podría haberse concretado sin la ayuda invaluable de colegas, amigos e instituciones, a todos ellos mi más sincero agradecimiento.

En particular, quiero agradecer muy especialmente a:

Mis directores, la Dra. Mirta L. García y el Dr. Guillermo Blustein, por la dedicación, paciencia y estímulo que me brindaron para concretar este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio, Lic. Mirta E. Stupak y Lic. Mónica T. García, por el apoyo incondicional tanto en el aspecto laboral como en lo afectivo y por el impulso constante para lograr mi objetivo.

Al Dr. Vicente J. Rascio y el Dr. Roberto Menni, mis primeros directores de beca porque marcaron mis primeros pasos en la investigación científica.

Al personal del CIDEPINT que me facilitó el acceso a distintos equipos.

Al personal del Club del Motonáutica por ofrecer gentilmente las marinas y sus instalaciones para realizar los muestreos.

Al personal de la Base Naval de Puerto Belgrano, en particular a Gustavo y a Marcelo, por ayudarnos a realizar las riesgosas tareas en la balsa, muchas veces con vientos helados o bajo la lluvia. También a la Sargento Escobar de la Base Naval de Puerto Belgrano porque a pesar de poner innumerables trabas para el ingreso a la “Zona reservada” donde estaba fondeada la balsa experimental del CIDEPINT, finalmente (...y después de mucho trabajo) accedía a nuestro pedido. Muchas gracias por las anécdotas graciosas que esta actitud generó y que amenizaron largas horas de observación de paneles bajo lupa.



Al Dr. Francisco “Pancho” Vetere por ayudarme con todo lo referente a la parte química.

Al Téc. Qco. Iasi por ayudar a familiarizarme en el manejo de instrumental en el laboratorio e interpretación de resultados de espectrofotometría.

A la Dra. Alda González por incentivarme a realizar este trabajo Tesis.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET) y al Departamento de Posgrado de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP) por el apoyo recibido.

A Roxana, Malena y Carolina de la Cátedra de Zoología General por apoyarme en este emprendimiento.

A mis amigos de distintas etapas de la carrera Mirta G., Ceci, Bea, Richard, Silvia, Grace, Isabel, Vivi, Negro, Dorita, Mónica, Guille y Mirta S., por permitirme compartir con ellos hermosas charlas en rondas de mate.

A mis padres, por inculcarnos a mí y a mis hermanos el amor al estudio y solventar nuestras carreras.

A Sergio, por insistir fervientemente que escriba esta Tesis.

A Josefina, Julieta y Sergio, por el amor de todos los días y estar siempre conmigo.

## Resumen

Se denomina “biofouling” o incrustaciones biológicas a la comunidad de micro y macroorganismos que se asienta sobre cualquier sustrato duro sumergido natural o construido por el hombre. La secuencia de eventos que llevan a su formación sigue un orden universal, inmediatamente del contacto inicial, la superficie se modifica por adsorción de biopolímeros y luego ocurre la fijación y proliferación de células pioneras (bacterias, diatomeas y protozoos). En el caso de las incrustaciones biológicas sobre sustratos sumergidos en el mar esa fijación inicial es seguida por otras algas e invertebrados (cirripedios, poliquetos, mejillones, colonias de briozoos, ascidias, etc.). El carácter de la comunidad resultante está determinado por la naturaleza del sustrato, la disponibilidad y diversidad de los colonizadores, la eficiencia de su fijación y los eventos bióticos/abióticos que ocurren durante y después de la fijación.

El crecimiento y desarrollo de la comunidad puede ocasionar graves perjuicios económicos sobre los distintos sustratos como por ejemplo, impedir el movimiento de los barcos, desestabilizar estructuras oceánicas sumergidas, disminuir el intercambio de calor en torres de enfriamiento, obstruir cañerías, bloquear redes de granjas marinas de cultivo de peces o bivalvos, propiciar fenómenos de corrosión, entre otros.

Hasta el presente, el modo más efectivo para controlar el “biofouling” en estructuras sumergidas es, indudablemente, aplicando pinturas antiincrustantes a base de tóxicos que son lentamente lixiviados al agua y que generan una interfase altamente concentrada que evita la fijación de organismos. Sin embargo, los pigmentos antiincrustantes corrientemente incluidos en las formulaciones son a base de cobre y/o compuestos organoestánicos como el TBT (tributilestaño) que son altamente contaminantes del agua y de los sedimentos. Las estrictas regulaciones vigentes impuestas por organizaciones internacionales de preservación del medio ambiente imponen la necesidad de buscar nuevos compuestos alternativos que sean igualmente efectivos pero que no afecten la integridad de los ecosistemas acuáticos. Por ello se plantea como objetivo hallar pigmentos antiincrustantes que sean efectivos, de bajo costo y que se degraden incorporándose naturalmente a los ciclos biogeoquímicos.

Con esta finalidad se realizaron estudios en el laboratorio y en el mar para evaluar el efecto de distintos compuestos que, básicamente, se enmarcan en dos líneas de investigación. Dado que la implementación en el mercado de pinturas

“amigables con el medio ambiente” demandará tiempo se proponen por un lado, una serie de compuestos que poseen una reducción en el contenido de cobre y, por otro, la utilización de compuestos no tóxicos, biodegradables, ya sea de origen natural o sintético y de conocida acción antibacteriana; en este último caso se propone que pudiendo evitar la formación del film primario inicial se logre interrumpir la secuencia de fijación del “biofouling”.

Con el fin de disponer de larvas y adultos para los bioensayos se realizaron cultivos en laboratorio de *Balanus amphitrite* (Cirripedia, Balanidae) y de *Polydora* sp. (Polychaeta, Spionidae), especies consideradas agresivas dentro de la comunidad incrustante. Se llevaron a cabo tests de toxicidad y de asentamiento con el objeto de estimar el efecto de la exposición a soluciones de concentraciones crecientes de compuestos en estudio tanto en la fase nadadora como en estadios próximos a la etapa de fijación al sustrato. Eventualmente, estos ensayos también se llevaron a cabo con larvas colectadas con red de plancton y adultos obtenidos por raspado con espátula sobre pilotes del área de estudio. Asimismo, se realizaron tests de recuperación para determinar si el efecto del compuesto es temporario o permanente.

Los ensayos de campo se llevaron a cabo en dos importantes áreas portuarias de la provincia de Buenos Aires: Mar del Plata y Puerto Belgrano. La estimación de la fijación de organismos sobre paneles expuestos con o sin formulaciones en el mar en función del tiempo se evaluó por medio de una grilla de puntos al azar. Se registró la abundancia para cada especie del macro y del microfouling utilizándose para ello una tabla de abundancias relativas.

El punto de partida de la fase experimental fue la evaluación del efecto tóxico del cobre sobre los organismos, la performance de pinturas conteniendo óxido cuproso como tóxico principal y la de formulaciones alternativas con disminución en el contenido de cobre. El pigmento que se propone para disminuir el contenido de cobre de las formulaciones es tiocianato cuproso cuyo poder antiincrustante se estudia en solución e incluido en una pintura. Por otra parte, se estudió el comportamiento de pigmentos preparados con una estructura *core-shell*, es decir, formados por un núcleo inerte inorgánico recubierto por una delgada capa de tiocianato cuproso.

En lo que respecta a la utilización de compuestos no tóxicos se realizaron experimentos empleando sustancias naturales como taninos de quebracho, mimosa y castaño y de origen sintético como benzoato de sodio y benzoato de hierro, todos ellos de bajo costo y accesibles en el mercado. También se probó la efectividad del tanato cúprico, producto obtenido por síntesis en laboratorio en el que se combina un producto de origen natural con pequeñas cantidades de cobre.

Los resultados respecto de la cría de organismos incrustantes en laboratorio fueron exitosos dado que se logró completar el ciclo de vida de *Balanus amphitrite* y de *Polydora* sp. Los porcentajes de supervivencia de *Balanus amphitrite* durante la fase larval desde el estadio nauplius I hasta la etapa de fijación de las cypris oscilaron entre 9 y 14% en tanto que en la etapa post-fijación osciló entre el 15 y 38%; estos porcentajes fueron similares partiendo de larvas tomadas del plancton como de adultos del laboratorio.

Se comprobó que el cobre *per se* fue altamente tóxico determinándose en 0,06 mg Cu/L el valor que evita la fijación del 50% de las cypris de *B. amphitrite* (EC<sub>50</sub>). Las pinturas tradicionales conteniendo óxido cuproso demostraron muy buena performance en el mar aún durante 12 meses. Sin embargo, las pinturas formuladas con un menor contenido de cobre resultaron igualmente efectivas. Las pinturas con tiocianato cuproso presentan una disminución de 3,32 veces por unidad de volumen y en las formuladas con pigmentos *core-shell* la reducción es de 35 veces en el contenido de cobre respecto de las de óxido cuproso.

En lo referente a la experimentación con pigmentos no tóxicos, se determinó que las soluciones de tanatos de quebracho, de castaño y de mimosa tienen un fuerte poder antiincrustante y que el efecto sobre las larvas es temporario o narcótico. Estos tanatos incorporados a películas de pintura afectaron la colonización de *B. amphitrite* e interfirieron en el proceso de cementación al sustrato de numerosos organismos de la comunidad del “biofouling”. En experimentos con geles conteniendo tanato de aluminio, los cirripedios lograron fijarse lo que indica la necesidad de ajustes de formulación. Por su parte, el tanato cúprico en solución mostró un efecto inhibitor y temporario sobre las larvas nadadoras, evitó el asentamiento de cypris de *B. amphitrite* y provocó una débil cementación de los tubos de *Polydora* sp. Las pinturas antiincrustantes a base de tanato cúprico expuestas en el mar, resultaron muy efectivas. El contenido de cobre empleado en esta formulación es del orden de 40 veces menor en relación al que se utiliza habitualmente en las pinturas tradicionales de óxido cuproso.

Los resultados empleando productos sintéticos como benzoato de sodio fueron también muy alentadores ya que se observó un fuerte efecto narcótico sobre nauplii, cypris y adultos de *B. amphitrite* y muy buena performance incorporado a pinturas en el mar. Por otra parte, la utilización de benzoato de hierro mejoró aún más las propiedades antiincrustantes en función de la acción combinada del efecto narcótico y un descenso en los valores de pH generado por su hidrólisis.

En conclusión, se hallaron pigmentos que tienen la posibilidad de incluirse en pinturas antiincrustantes y que reúnen las condiciones óptimas en cuanto a efectividad, bajo costo y mínimo efecto contaminante. Se lograron muy buenas formulaciones antifouling con una importante reducción del contenido de cobre empleando pigmentos tipo *core-shell* y tanato cúprico. Por otra parte, las formulaciones con benzoato de hierro y con taninos resultaron las más promisorias como pinturas no-tóxicas.

Los resultados obtenidos indican que estas formulaciones pueden transferirse al sector productivo para la industrialización y que, a su vez, contribuirán a la preservación de los ecosistemas acuáticos.

## **Abstract**

Natural or man-made substrates submerged in the sea experience a series of universal events which results in the formation of a complex layer of attached micro and macroorganisms known as biofouling. The sequence of events follows a universal order; the first event is the adsorption of biopolymers making the surface suitable for the arrival of pioneers cells (bacteria, diatoms, protozoans). Then, larvae of invertebrates (barnacles, tube-worms, mussels, bryozoan colonies, ascidians, etc.) attach themselves to the microfouling film. Biofouling community is the result of several factors like substrate nature, availability and diversity of colonizers, efficiency of cementation and biotic/abiotic factors that occurs during and after settlement.

The growth and development of the fouling community may cause serious economical losses. Biofouling on ship' hulls leads to a reduction of speed, extrafrictional resistance and increase on fuel consumption. Shipping is not the only industry affected by biofouling; other examples include destabilization of submerged oceanic structures, reduction in thermal efficiency in heat exchangers, block pipes and aquaculture nets. Additionally, biofouling may promote corrosion processes.

Up to now, the most effective mechanism to control biofouling is by applying antifouling paints. These are a particular type of coating because they release chemical compounds at a constant rate into the sea in order to generate a toxic interface that avoid the attachment of organisms. The most common antifouling pigments are copper-based and organotin compounds; undoubtedly, they are very effective but also they contaminate seawater and sediments. Due to risk in application for human beings and the environment they have come under increasing governmental regulations. For this reason there is a growing need to find non toxic alternative pigments for the prevention of biofouling without polluting aquatic ecosystems.

The aim of the present project is to find environmental friendly antifouling pigments of low cost, as effective as traditional pigments and with natural incorporation to biogeochemical cycles.

This challenge was carried out taking into account two different research lines. Due to the incorporation and acceptance of new non toxic products in the market will take time, a series of compounds with low-copper content is proposed. On the other hand, it is hypothesized that the use of known antibacterial compounds of natural or

synthetic origin could interrupt biofouling sequence; for these reason, a series of non toxic and biodegradable compounds were chosen.

Laboratory cultures of *Balanus amphitrite* (Cirripedia, Balanidae) and *Polydora* sp. (Polychaeta, Spionidae) were carried out. These species are considered aggressive in fouling community.

In the laboratory, the effect of different compounds on larvae was analyzed. Toxicity and settlement tests were conducted using swimming larvae and larvae close to settlement, respectively. In some cases, bioassays were carried out with larvae collected in the sea using a zooplankton net. Also, adults fixed to the piles were obtained by scraping in the study area. Additionally, recovery tests were carried out in order to establish if the effect of compounds were temporary o permanent.

Field trials were conducted in two important areas of Buenos Aires province, Mar del Plata and Puerto Belgrano. The evaluation of organism settlement on panels with or without coatings along time was analyzed by a grid of random points. Then, relative abundances of micro and macrofouling species were determined.

In the lab, the toxicity of copper on organisms was studied. The performance of cuprous oxide antifouling paints and alternative formulations with low-copper content in the sea was evaluated. The pigment proposed to reduce copper content is cuprous thiocyanate; antifouling properties of this pigment in both, solutions and included into paints, were studied. Moreover, core-shell pigments, i.e. pigments composed by an inorganic core recovered by a thin layer of cuprous thiocyanate were prepared.

In relation to the employment of non-toxic compounds, experiments with natural products as quebracho, mimosa and chestnut tannins and synthetic compounds as sodium and ferric benzoate were done. These pigments are available at low cost and are readily obtainable in the market. Also, the effect of cupric tannate, a compound synthetized in the lab from a natural origin compound and small quantities of copper, was determined.

The methodology applied for rearing fouling organisms was successful because life cycles of *Balanus amphitrite* and *Polydora* sp. could be completed. Survival percentages of *Balanus amphitrite* during larval stages from nauplius I to cyprids ranged between 9 and 14% and in the post-settlement stage ranged between 15 and 38%. These percentages were similar for larvae collected from the plankton as reared in the lab from adult barnacles.



It could be demonstrated that copper is highly toxic and EC<sub>50</sub> (concentration to avoid 50% of larval settlement) was established at 0,06 mg Cu/L. Traditional antifouling paints based on cuprous oxide shown good performance in the sea during 12 months. However, paints formulated in CIDEPINT with a low copper content were as effective as traditional paints. Cuprous thiocyanate and core-shell antifouling paints contain 3,32 times and 35 times, respectively, less copper per unit volume than traditional copper based antifouling paints.

In relation to the use of non toxic pigments, it could be concluded that solutions of quebracho, mimosa and chestnut tannins have marked antifouling properties and this effect is temporary (or narcotic). When these tannates were incorporated into paints affected colonization of *B. amphitrite* and interfered in cementation processes to substrate of many organisms of fouling community. In contrast, results of experiments carried out using aluminum tannate included in Phytigel® shown barnacle settlement that indicates it is necessary make adjustments in the formulation.

Cupric tannate in solution showed an inhibitory and temporary effect on swimming larvae. Also, it avoided *B. amphitrite* cyprid settlement and affected cementation of *Polydora* sp. tubes. Cupric tannate antifouling paints exposed in the sea were very effective. The content of copper was 40 times lesser than traditional cuprous oxide based paints.

The use of synthetic products has also presented successful results. The pigment sodium benzoate demonstrated a strong narcotic effect on nauplii, cyprids and adults of *B. amphitrite* and good performance in the sea included in a paint. Additionally, the experiments with ferric benzoate shown that the combination of two effects, i.e. narcotic effect of benzoate anion and decrease in pH values as a consequence of the hydrolysis, enhanced antifouling properties.

In conclusion, a number of promising pigments were found. All of them could be incorporated to antifouling paints and are very effective, low cost and have a minimum contaminant effect. The employment of core-shell and cupric tannate pigments represent an advance in formulations with low copper content. Moreover, paints containing ferric benzoate and tannins were the most promising non toxic formulations studied.

Results obtained in this Thesis project indicated that these formulations could be transferred to industry and will contribute to preservation of aquatic ecosystems.

## ÍNDICE

<b>Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
Objetivos.....	6
Antecedentes sobre la problemática del “biofouling”.....	8
Breve reseña histórica de los estudios de “biofouling”.....	8
Influencia de los factores abióticos en el desarrollo del “biofouling” y en el funcionamiento de las pinturas antifouling.....	11
Efectos ocasionados por el “biofouling” sobre objetos sumergidos.....	12
Relación entre “biofouling” y procesos de corrosión.....	15
Generalidades de pinturas.....	17
Prevención del “biofouling” por medio de pinturas antiincrustantes.....	20
Tipos de pinturas antiincrustantes.....	21
Pigmentos antiincrustantes.....	24
Principales organismos del “fouling”.....	26
<b>Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
Área de estudio.....	39
Cultivo de organismos incrustantes marinos en laboratorio.....	40
Metodología para los ensayos con distintos compuestos en laboratorio.....	45
<b>Capítulo 3. ENSAYOS DE CRÍA DE LARVAS EN LABORATORIO.....</b>	<b>50</b>
Objetivos .....	50
Cría en laboratorio de <i>Balanus amphitrite</i> .....	50
Crecimiento de adultos de <i>B. amphitrite</i> .....	56
Cría de <i>Polydora</i> sp.....	58
Bioensayos con cypris de <i>B. amphitrite</i> para estimar preferencias en el asentamiento.....	60
Resultados de preferencias de asentamiento.....	61
<b>Capítulo 4. LA UTILIZACIÓN TRADICIONAL DEL COBRE EN PINTURAS ANTIINCRUSTANTES. EL ÓXIDO CUPROSO.....</b>	<b>65</b>
Introducción.....	65
Materiales y métodos.....	68
Resultados.....	70
<b>Capítulo 5. HACIA UNA REDUCCIÓN EN EL CONTENIDO DE COBRE DE LAS PINTURAS. EL ROL DEL TIOCIANATO CUPROSO Y SU EFECTO ANTIINCRUSTANTE.....</b>	<b>75</b>
Introducción.....	75
Materiales y métodos.....	76

Composición de las pinturas y metodología para su elaboración.....	77
Resultados.....	79
Síntesis del pigmento tiocianato cuproso.....	79
Caracterización del pigmento tiocianato cuproso.....	79
Solubilidad.....	79
Oxidabilidad.....	80
Distribución de tamaño de partícula.....	81
Absorción de aceites.....	81
Ensayos con organismos incrustantes en laboratorio.....	81
Ensayos con pinturas antifouling en el mar.....	83
Exposición de las pinturas en Puerto Belgrano.....	83
Exposición de las pinturas en el puerto de Mar del Plata.....	83
<b>Capítulo 6. EL TIOCIANATO CUPROSO EN LA PREPARACIÓN DE PIGMENTOS TIPO CORE –SHELL</b>	86
Introducción.....	86
Materiales y métodos.....	86
Preparación de los pigmentos.....	87
Composición de las pinturas.....	87
Resultados.....	89
<b>Capítulo 7. LOS TANINOS, COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL: PROPIEDADES ANTIFOULING</b>	94
Introducción.....	94
Materiales y métodos.....	97
Ensayos de laboratorio.....	97
Técnica colorimétrica.....	98
Ensayos de toxicidad.....	98
Test de recuperación.....	99
Ensayos en campo.....	99
Resultados.....	100
<b>Capítulo 8. HACIA UNA REDUCCIÓN EN EL CONTENIDO DE COBRE DE LAS PINTURAS. TANINOS COMBINADOS CON COBRE</b>	108
Introducción.....	108
Materiales y métodos .....	108
Caracterización del pigmento.....	109
Elaboración de las pinturas y ensayos de toxicidad.....	109
Ensayos de asentamiento en laboratorio.....	110
Obtención de larvas.....	110

Ensayos en el mar.....	110
Resultados.....	111
Ensayos de toxicidad.....	113
Ensayos de asentamiento.....	114
Test de recuperación.....	114
Ensayos en el mar.....	115
<b>Capítulo 9. HACIA LA ELIMINACION DEL COBRE EN LAS PINTURAS ANTIFOULING. EXPERIENCIAS CON TANATO DE ALUMINIO...</b>	119
Introducción.....	119
Materiales y métodos.....	119
Preparación de geles.....	120
Recolección de muestras en el puerto de Mar del Plata.....	120
Ensayos en campo.....	121
Resultados.....	121
Ensayos en el mar.....	123
<b>Capítulo 10. EFECTO DEL BENZOATO DE SODIO Y BENZOATO DE HIERRO COMO AGENTES ANTIINCRUSTANTES.....</b>	129
Introducción.....	129
Materiales y métodos.....	131
Composición de las pinturas y metodología de experimentación.....	133
Obtención de organismos.....	134
Test de recuperación en laboratorio.....	135
Ensayos en el mar.....	135
Resultados.....	135
<i>Benzoato de sodio</i> .....	135
Efecto del benzoato de sodio sobre nauplii.....	135
Efecto del benzoato de sodio sobre cypris. Test de asentamiento.....	138
Efecto del benzoato de sodio sobre adultos.....	138
Test de recuperación.....	138
Ensayos en el mar.....	139
<i>Benzoato de hierro</i> .....	141
Efecto del pH de la solución sobre la supervivencia larval.....	141
Ensayos en el mar.....	143
<b>Capítulo 11. DISCUSIÓN.....</b>	149
Cría en laboratorio y experimentación con organismos incrustantes.....	149
Textura superficial.....	152

Incorporación de productos al sustrato.....	155
Aplicación de pinturas.....	155
Nuevas tendencias.....	159
<b>Capítulo 12. CONCLUSIONES.....</b>	<b>161</b>
<b>Capítulo 13. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>165</b>

# Capítulo 1

## Introducción



## Introducción

Algunas de las numerosas especies que pueblan los océanos y son llevadas por las corrientes, deben encontrar una superficie dura para fijarse con el propósito de completar sus ciclos de vida. La escasez de sustratos duros naturales en el medio marino, trae como consecuencia que cada espacio disponible sea disputado y cubierto por una variedad de organismos, como bacterias, algas, cirripedios y mejillones, entre otros. Los cascos de los barcos, así como otras estructuras sumergidas, están también expuestos a esta fijación potencial de organismos, comúnmente llamada "biofouling" (Sghibartz, 1984).

El término "biofouling" ("fouling" biológico) puede ser usado en un sentido amplio incluyendo la fijación y crecimiento de micro y macroorganismos sobre cualquier sustrato sumergido natural o construido por el hombre (Evans y Hoagland, 1986).

El proceso del "biofouling" comienza cuando un sustrato duro se sumerge en un medio acuático con organismos. La secuencia de eventos continúa hasta un nivel de desarrollo de la comunidad incrustante que, eventualmente, puede impedir el movimiento de los barcos, desestabilizar estructuras oceánicas sumergidas y disminuir el intercambio de calor en torres de enfriamiento (Goupil, *et. al*, 1980; Sghibartz, 1984; Stupak *et al.*, 1990).

Esta secuencia sigue un orden universal, inmediatamente del contacto inicial, una superficie es modificada por adsorción de biopolímeros y luego ocurre la fijación y proliferación de células pioneras. En el caso de las incrustaciones biológicas sobre sustratos sumergidos en el mar esa fijación inicial es seguida por algas e invertebrados. El carácter de la comunidad resultante es determinado por la naturaleza del sustrato, la disponibilidad y diversidad de los colonizadores, la eficiencia de su fijación y los eventos bióticos/abióticos que ocurren durante y después de la fijación.

El desarrollo del "biofouling" sobre una superficie sumergida es rápido y secuencial (Fig. 1).



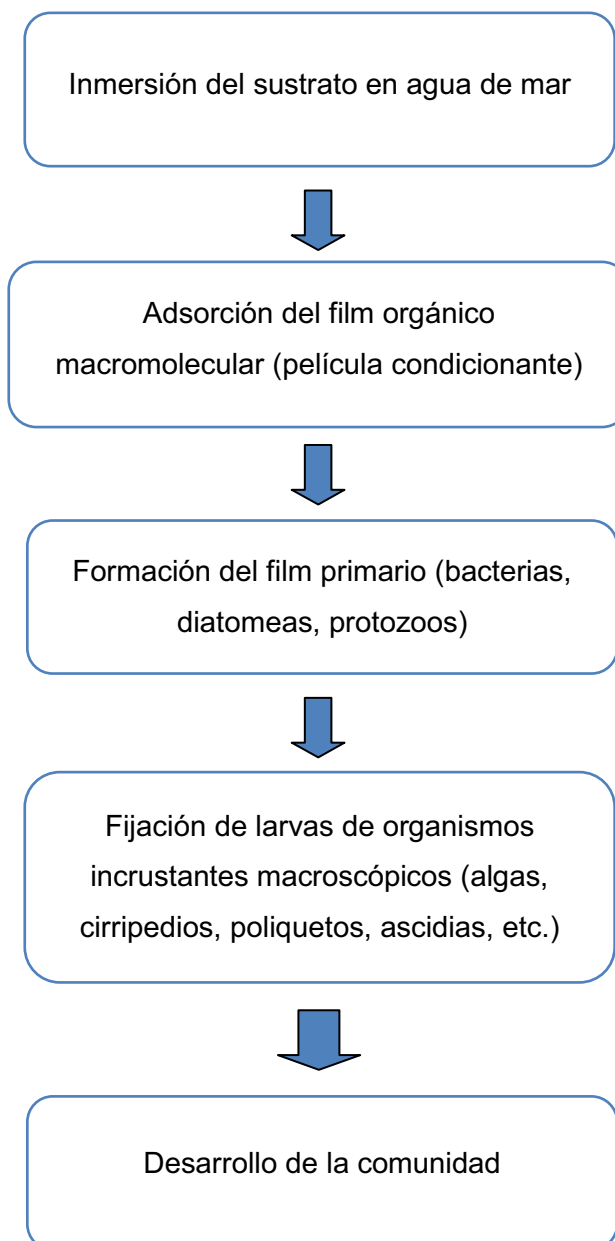


Figura 1. Secuencia de la fijación del “biofouling” marino.

La inmersión en agua de mar de un sustrato sólido produce la adsorción inmediata de material orgánico disuelto dando origen a la formación de la película condicionante, esta película se encuentra completamente formada al cabo de dos horas y su naturaleza química está discutida. Baier (1972) la describió como un film de

glicoproteínas en tanto que otros autores sostienen que está compuesta por ácidos grasos y materiales lipídicos (Wangersky, 1976) o por sustancias húmicas macromoleculares (Loeb y Neihof, 1975; Hunter, 1980).

La película condicionante modifica las propiedades de la superficie sólida alterando, entre otras, sus características de humectación e influyendo en la posterior fijación bacteriana (Baier *et al.*, 1968; Dexter, 1979). Se ha postulado que el material orgánico acumulado en la interfase sólido/agua puede servir como fuente de alimento para las bacterias creando así un ambiente más favorable para su desarrollo y crecimiento. El acercamiento de las bacterias hacia la superficie se produce por medio de fuerzas de naturaleza físicoquímica de atracción y repulsión (fuerzas de London-van der Waals, movimiento browniano, atracción electrostática) seguidas por la formación de una red de polímeros extracelulares. Este proceso de fijación irreversible puede realizarse en forma permanente o temporaria (Marshall *et al.*, 1971; Marshall, 1978; Fletcher, 1980).

Esta primera fase de la colonización de las superficies sólidas sumergidas está caracterizada por la presencia no sólo de bacterias sino también de protozoos y diatomeas. Este primer film de organismos se denomina *film primario*, *biopelícula* o *microfouling*. Básicamente este film se conforma secuencialmente y está compuesto por una intrincada asociación de microorganismos, sus productos de secreción y partículas de material orgánico e inorgánico. Los primeros microorganismos que llegan al sustrato son pequeñas bacterias en forma de bastón (menores de 0,8  $\mu\text{m}$ ) seguidas por formas cocoidales y espiraladas (*Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Flavobacterium*, principalmente) durante las primeras 6 a 8 horas. Al cabo de 24 horas de inmersión se encuentran bacterias pediceladas, otras con forma de capullo (*Caulobacter* e *Hyphomicrobium*) y aparecen las primeras diatomeas y protozoos (Corpe, 1972).

Es muy discutida la forma en que la biopelícula puede influir sobre la fijación de los organismos del macrofouling, algunos autores (Wood, 1950; Young y Mitchell, 1973; Cook y Henschel, 1984) han sugerido que su presencia es un prerrequisito para el proceso de fijación y para iniciar la metamorfosis de los organismos que se asientan, en tanto que otros consideran que ciertas larvas se fijan sobre sustratos limpios (Scheer, 1945; Crisp y Ryland, 1960; Barnes, 1970). Los macroorganismos que se encuentran asentados son, entre otros, cirripedios, mejillones, ascidias, colonias de hidrozooos, gusanos tubícolas y algas. El tipo de cementación que se observa varía a nivel específico, siendo los más comunes los cementos de naturaleza proteica.

El “biofouling” varía latitudinalmente y para aplicar medidas más efectivas de prevención y control, es necesario el conocimiento de la biología de los organismos que intervienen. La estructura y composición del “fouling” muestra amplias variaciones temporales y regionales que son en general determinadas por las condiciones hidrológicas y geográficas. Los cambios en la estructura de la comunidad bentónica a lo largo del tiempo resultan del balance entre interacciones físicas y biológicas, las corrientes adyacentes a la superficie, las condiciones en la columna de agua y las características físicas del sustrato. Este último puede prevenir el asentamiento de los propágulos planctónicos o por el contrario, promoverlo (Williams, 1964; Dayton, 1971; Foster, 1975; Connell, 1985; Possingham y Roughgarden, 1990). Además, las especies sucesionales tempranas pueden favorecer o inhibir el asentamiento de otras especies, ofrecer sustrato secundario para otros organismos, atrapar sedimento y así favorecer la fijación de especies formadoras de hábitáculos de sedimento o proveer refugio contra predadores. La mayoría de los invertebrados poseen la habilidad de elegir el sitio donde ubicarse y la decisión definitiva está influida por estímulos que se reciben del medio circundante, factores ambientales como la luz, gravedad, presión hidrostática, temperatura y salinidad son los que afectan, principalmente, la distribución de las larvas en la columna de agua y los patrones de asentamiento (Boltovskoy, 1981; Grosberg, 1982; Pawlik, 1992). Entre los factores que influyen en la fijación pueden destacarse la topografía del sustrato (Crisp y Barnes, 1954), las condiciones fisicoquímicas de la superficie (Raimondi, 1988a), la energía superficial (Roberts *et al.*, 1991) y el régimen de flujo (Mullineaux y Butman, 1991). Respecto de los aspectos biológicos y químicos los factores más relevantes son la presencia de adultos conoespecíficos (Knight-Jones, 1953; Crisp, 1961; Yule y Walker, 1985; Clare *et al.*, 1994; Miron *et al.*, 1996; Bryan *et al.*, 1997), la presencia de un film bacteriano (Kirchman *et al.*, 1982; Maki *et al.*, 1988; Wieckzorek y Todd, 1998; Dobretsov y Qian, 2004) y de microalgas previamente formado (Raimondi, 1988b).

Para los organismos bentónicos marinos con una fase adulta sésil, la fase larval es generalmente un importante factor de dispersión de las especies (Thorson, 1950; Olson, 1985; Strathmann, 1985; Wares *et al.*, 2001). La dispersión larval está afectada por factores tales como la duración de la fase nadadora (Wendt, 1996, 1998), el comportamiento (Forward *et al.*, 1984; Young, 1995) y la plasticidad fisiológica para adaptarse a cambios del entorno, por ejemplo las modificaciones en la temperatura del agua (Scheltema, 1986; Wares *et al.*, 2001). Los organismos adultos tienen potencialmente la capacidad de “navegar” grandes distancias adheridos a sustratos

naturales u objetos artificiales tales como cascos de barcos y buques o en el agua de balasto, representando un mecanismo adicional de dispersión y migración.

La adhesión de organismos sobre cascos de embarcaciones comerciales o recreacionales es reconocida como uno de los mecanismos más importantes para la transferencia de especies invasoras (Brancato, 1999; Reise *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2000; Minchin y Gollasch, 2003; Floerl *et al.*, 2004; Floerl *et al.*, 2005). Entre los ejemplos más emblemáticos referidos al avance de especies exóticas se encuentra el caso del alga feofita *Undaria pinnatifida*, originaria de Japón, Corea y China que ha invadido las costas patagónicas (Martín y Cuevas, 2006; Martín y Bastida, 2008) y el de *Limnoperna fortunei*, mejillón de agua dulce originario del sudeste asiático que invadió la Cuenca del Plata durante la década del '90 y llegó rápidamente a las represas de Yacyretá e Itaipú (Darrigran y Pastorino, 1995; Sardiña *et al.*, 2008).

La disponibilidad de espacio es un factor sumamente importante para los organismos bentónicos sésiles ya que deben encontrar un lugar adecuado para el asentamiento y la metamorfosis. En los alrededores del sustrato es común que las larvas adopten un comportamiento exploratorio.

La fijación y asentamiento sobre distintos sustratos artificiales genera graves problemas de índole económica tales como perjuicios sobre cascos de embarcaciones, en estructuras off-shore, en boyas de señalización, redes de granjas marinas de cultivo de peces o bivalvos, en cañerías destinadas a refrigeración de plantas desalinizadoras y usinas termoeléctricas, entre otros.

Hasta el presente, el modo más efectivo para controlar la presencia del “biofouling” en estructuras sumergidas es, indudablemente, aplicando pinturas antiincrustantes a base de biocidas que son lentamente lixiviados al agua y que generan una interfase altamente concentrada que evita la fijación de organismos. Sin embargo, los pigmentos tóxicos antiincrustantes corrientemente incluidos en las formulaciones son a base de cobre y/o TBT (tributilestaño) que son altamente contaminantes del agua y de los sedimentos. Las estrictas regulaciones vigentes impuestas por organizaciones internacionales de preservación del medio ambiente imponen la necesidad de buscar nuevos compuestos alternativos que sean igualmente efectivos pero que no afecten la integridad de los ecosistemas acuáticos.

## **Objetivos**

El proyecto de esta Tesis Doctoral está dirigido al conocimiento de la estructura de la comunidad incrustante y a evaluar la efectividad de distintos compuestos antifouling. Se plantea la necesidad de hallar pigmentos antiincrustantes que sean efectivos, de bajo costo y que se degraden sin contaminar el agua y/o los sedimentos, incorporándose naturalmente a los ciclos biogeoquímicos.

Para concretar este proyecto se plantearon los siguientes objetivos:

- Cultivar especies representativas del biofouling del puerto de Mar del Plata y Puerto Belgrano para realizar ensayos de laboratorio.
- Analizar en laboratorio y en el mar el efecto antiincrustante de compuestos con reducción en el contenido de cobre y comparar los resultados con pinturas convencionales.
- Analizar en laboratorio y en el mar el efecto antiincrustante de compuestos no tóxicos, biodegradables y comparar los resultados con pinturas convencionales.

## **Hipótesis de trabajo**

La utilización de compuestos de origen natural o sintético con propiedades antibacterianas evita la formación del film primario y, consecuentemente, interrumpe la secuencia de fijación del “biofouling”.

Tanto los taninos (compuestos de origen natural) como los benzoatos (compuestos de origen sintético) son ampliamente reconocidos por sus propiedades antibacterianas y son fácilmente asequibles.

Ambos tipos de compuestos en combinación con pequeñas cantidades de cobre constituyen pigmentos novedosos para ser incorporados a una pintura de matriz soluble.

De este modo se pretenden lograr formulaciones de alta performance y amigables con el medio ambiente.

## **Transferencia**

Las pinturas antiincrustantes elaboradas con esta nueva propuesta podrán ser transferibles al sector productivo para su industrialización y contribuirán a la preservación de los ecosistemas acuáticos.

Estas formulaciones representarán una etapa de transición hacia pinturas no tóxicas cuya optimización demandará tiempo de experimentación en laboratorio y en campo.

## **Antecedentes de la problemática del “biofouling”**

### **Breve reseña histórica de los estudios de “biofouling”**

Desde tiempos muy remotos el hombre construyó embarcaciones y tuvo la necesidad de proteger la parte sumergida. En el capítulo VI del Génesis puede leerse: “...Viendo Dios que la tierra estaba corrompida, dijo a Noé: ...Haz para tí un arca de madera de gopher bien acepillada; en el arca dispondrás de celditas y la calafatearás por dentro y por fuera...” siendo ésta una de las primeras citas donde queda en claro la necesidad de proteger la carena.

A través de los poemas de Homero se conocen las “navis lunga” (galeras primitivas) de los micenos (1300-1100 a.C.), quienes con el fin de conferir estanqueidad al casco y protegerlo de las “bromas” (moluscos perforadores de madera) aplicaban una pintura a base de pez (naves negras) o de minio (naves rojas). Aristóteles (siglo IV a.C.) hizo referencia al efecto “frenador de barcos” causado por las rémoras, peces del género *Echeneis* que poseen la aleta dorsal modificada en forma de ventosa por medio de la cual se adhieren. Hacia el año 412 a.C. comenzaron a utilizarse mezclas con alquitrán, sulfuro y arsénico para proteger los barcos de madera del ataque de gusanos tubícolas. En virtud de los descubrimientos realizados al comienzo de este siglo, pudo establecerse que hacia el 480 a.C. se utilizaban bronce y láminas de plomo para proteger los cascos de los barcos de guerra. A fines del siglo I Plutarco mencionó, además de las rémoras, la presencia de otros organismos, enfatizando sobre las ventajas de raspar las algas y el limo adherido a los cascos de los barcos para que pudieran avanzar más fácilmente en el agua.

Las evidencias arqueológicas indican que los normandos y los vikingos (siglos VII y VIII) no protegían sus embarcaciones; sus barcos eran livianos y se retiraban del agua cuando no se los utilizaban evitando de esta manera la fijación de organismos. Los griegos y romanos utilizaron con éxito placas metálicas para recubrir barcos, mientras que en la Edad Media esta metodología cayó en desuso. Los cascos de madera de las carabelas utilizadas por Colón estaban protegidos con sebo y alquitrán y las embarcaciones de Vasco da Gama con carbón; siglos después, en Inglaterra seguía utilizándose esta técnica. En 1559 Laevinus Lemnius hizo también referencia al efecto frenador producido por las rémoras y moluscos y a la necesidad de eliminarlos por medio de cepillos, debiendo cubrirse los barcos con sebo para que navegaran más rápidamente.



La primera patente antifouling fue concedida a William Beale en 1625 en Inglaterra; la pintura para evitar la fijación de los gusanos tubícolas, estaba basada en polvo de hierro, cemento y probablemente compuestos de cobre. En el siglo XVIII se otorgaron licencias para implementar métodos de protección con recubrimientos metálicos. Comenzó a utilizarse estaño, al principio en forma de polvo y simultáneamente se obtuvieron resultados exitosos con recubrimientos de cobre en gran cantidad de embarcaciones inglesas y americanas. Una de las primeras embarcaciones con el casco recubierto con lámina de cobre fue la corbeta inglesa *Dolphin* que recorrió las costas argentinas a fines del siglo XVIII (Anon., 1952; Dick, 1970).

Los primeros antecedentes sobre barcos de metal están referidos a un buque construido en 1777 en Inglaterra y a un barco a vapor, botado en 1820.

El capitán FitzRoy a bordo del *Beagle* (1831-1835) compró en Islas Malvinas una goleta ballenera que fue enviada al Río de la Plata donde se le aplicó en el fondo una lámina de cobre; revestido con este metal las lapas no eran atraídas lo que permitía navegar con mucha rapidez. Este procedimiento constituyó el éxito de la Marina Real durante muchos años. Durante este viaje Charles Darwin, recogió entre otras, información sobre cirripedios, que le permitió publicar sus monografías (Darwin, 1851; 1854) donde detalla los sustratos naturales y/o artificiales sobre los cuales se fijan. Cita ejemplares de *Balanus improvisus* adheridos a la lámina de cobre del casco del *Beagle* varado en las costas de Santa Cruz, *Balanus amphitrite* sobre cañas, maderas flotantes, guijarros y valvas de moluscos y menciona que las especies más ampliamente distribuidas son las que se adhieren con mayor facilidad a los cascos de los barcos planteando uno de los mecanismos de dispersión para las especies del “biofouling” (Caillet-Bois, 1944; Destefani, 1967; Pischky, 1971; Marks, 1994).

Paralelamente, en Europa, las reservas de madera se iban agotando por lo que surgió la necesidad de buscar nuevos materiales para la construcción de barcos. Comienza a utilizarse el hierro, que resultaba más resistente que la madera. En 1849, la Armada Argentina adquiere el primer buque a vapor con casco de hierro, de fabricación inglesa. En 1851, en Alemania, los barcos de hierro comenzaron a protegerse con barnices oleosos, pero el método resultaba muy caro debido a los largos períodos de secado en dique. Posteriormente, el uso de sistemas de pinturas solubles en benceno posibilitó una combinación más efectiva y menos costosa de resinas que se utilizan hasta el presente. En 1860 fue el primer buque de guerra realizado totalmente en hierro. En el mismo año el capitán Rahtjen desarrolló una

pintura “antifouling” basada en una solución de goma laca alcohólica con dos sustancias activas, el arsénico y óxido de mercurio. La formulación dio excelentes resultados pero acarreó muchos problemas económicos y técnicos.

En la década de 1870, comenzó a sustituirse el hierro por el acero, por ser más económico, de fácil producción y por su elevada resistencia, que además, permitió aligerar la estructura de los cascos (Jones, 2009).

Alrededor de 1920 comienzan a utilizarse pinturas para la protección de la parte sumergida de las embarcaciones. Las investigaciones sobre formulaciones “antifouling” comenzaron a complementarse con investigaciones biológicas como las descripciones de la forma, ciclos de vida y comportamiento de numerosos grupos del “biofouling”.

A partir del año 1964 y hasta la actualidad en el CIDEPINT (Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas) se han realizado estudios de las comunidades incrustantes y de los sistemas de control, en el área portuaria de Mar del Plata y de Puerto Belgrano. Se obtuvieron resultados satisfactorios de control del “biofouling” con pinturas formuladas empleando, como tóxico principal, óxido cuproso. También se utilizaron óxido de cinc, arseniatos, compuestos de tributil y trifenil estaño y diferentes extendedores (Giúdice *et al.*, 1984). Algunas de estas sustancias están hoy excluidas por normativas de distintos países por los graves daños que provocan al medio ambiente (Bastida, 1968, 1969, 1971; Bastida y L'Hoste, 1976; Bastida *et al.*, 1974, 1980; Bastida y Adabbo, 1977; Bastida y Bastida, 1978; Stupak *et al.*, 1980; Stupak, 1982, 1985; Pezzani *et al.*, 1996; Rascio, *et al.*, 1980, 1990; Rascio, 1981, 1985; Giúdice *et al.*, 1982, 1984; Candries, 2000).

Existen métodos alternativos para controlar las incrustaciones, como las ondas de sonido de baja frecuencia, sonidos de alta intensidad y superficies de baja energía, que han sido utilizados con diferentes resultados, algunos exitosos pero extremadamente caros y otros con serias dificultades para ser llevados a la práctica (Murphy *et al.*, 1980; Branscomb y Rittschof, 1984; Fletcher *et al.*, 1984; Lindner *et al.*, 1988). Cabe mencionar también la posibilidad del control biológico, como la utilización de lapas para controlar el “biofouling” marino dominado por *Balanus amphitrite* (Safriel y Erez, 1991; Safriel *et al.*, 1994; Shkedy *et al.*, 1995).

## **Influencia de los factores abióticos en el desarrollo del “biofouling” y en el funcionamiento de las pinturas antifouling**

Los parámetros ambientales como la temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, luz y tipo de sustrato juegan un rol fundamental en la composición, desarrollo y sucesión de la comunidad y afectan también el funcionamiento de las pinturas “antifouling” matriz soluble (Rascio *et al.*, 1977; Kinne, 1978; Rascio *et al.*, 1988a).

La temperatura del agua ejerce una gran influencia sobre la distribución y funciones vitales de los organismos (maduración sexual, crecimiento y desarrollo). Con respecto a las pinturas antiincrustantes, se determinó que un aumento de temperatura disminuye su vida útil, por el incremento de la disolución del tóxico y del ligante.

La salinidad afecta los fenómenos de ósmosis de los organismos. La mayor parte de las especies marinas han desarrollado estrategias adaptativas para mantenerse en equilibrio osmótico con el medio que los rodea. Además, los cambios en la salinidad varían la densidad específica del agua influyendo en la flotabilidad de los organismos. En general, la salinidad del agua de mar oscila entre 34-36<sup>0</sup>/00, aunque en las zonas costeras se registran variaciones debidas a los aportes de agua dulce, desagües pluviales y evaporación, entre otros. En lo referente a las pinturas “antifouling” el aumento de la concentración de cloruro de sodio aumenta la solubilidad de la colofonia (resina más utilizada) y, consecuentemente, la lixiviación del tóxico (Rascio *et al.*, 1988b).

El pH normal del agua de mar es de alrededor de 8,2; las variaciones influyen sobre la actividad enzimática y las reacciones fisiológicas de los organismos. El pH afecta la solubilidad de la resina colofonia de las pinturas antiincrustantes; a mayor valor de pH mayor solubilidad de la colofonia y menor del óxido cuproso.

El oxígeno es un elemento de vital importancia para los organismos, a excepción de las bacterias anaeróbicas. Los aportes principales de oxígeno al agua son debidos a la actividad fotosintética de las algas y al intercambio con el medio aéreo por agitación y turbulencia. La cantidad de oxígeno disuelto puede variar, disminuyendo la concentración, en áreas relativamente cerradas con polución, o aumentando la concentración, en zonas litorales con gran abundancia de algas. En cuanto a las pinturas “antifouling”, el oxígeno no afecta la disolución de la colofonia.

La luz es uno de los factores más importantes que determina la distribución vertical de los organismos. Las algas están distribuidas en la zona eufótica para disponer de energía y gran parte de los organismos heterótrofos se alimentan de ellas.

Las variaciones lumínicas determinan migraciones del fito y zooplancton, movilizand o toda la trama trófica. La luz no causa efectos directos sobre el funcionamiento de las pinturas antiincrustantes.

El sustrato es el factor fundamental ya que los organismos incrustantes necesitan una superficie donde desarrollarse. Las características de dureza, textura, composición química, color e inclinación condicionan el asentamiento de las distintas especies.

Debido a la importancia económica del biodeterioro de los sustratos artificiales sumergidos se debe tener en cuenta la preparación del sustrato a proteger (acero, aluminio, madera, fibra de vidrio) para lograr una adecuada adhesión del sistema de pinturas.

Los factores abióticos no actúan en forma independiente sino que están estrechamente relacionados; por ejemplo, la fotosíntesis que produce la vegetación algal modifica los niveles de oxígeno y de dióxido de carbono, afectando al pH del agua. Cuando disminuye el oxígeno, aumenta el dióxido de carbono y desciende el pH, lo que provoca una rápida descomposición bacteriana. La temperatura afecta la solubilidad del oxígeno, teniendo mayor concentración en aguas más frías. Las altas temperaturas favorecen la evaporación modificando en consecuencia la salinidad del agua.

### **Efectos ocasionados por el “biofouling” sobre objetos sumergidos**

El asentamiento y fijación de organismos bentónicos sobre objetos sumergidos provoca distintos tipos de perjuicios desde el punto de vista económico (Dafforn *et al.*, 2011).

Entre los sustratos más afectados se encuentran los cascos de las embarcaciones. Las condiciones, prácticamente estáticas, del agua en los puertos favorecen el asentamiento de larvas. Uno de los inconvenientes más relevantes de la fijación sobre la carena es el deterioro del esquema de pinturas, es decir no sólo de la película antiincrustante sino también de las pinturas subyacentes.

Los organismos pueden afectar de distintos modos los recubrimientos de protección. Por ejemplo, el desprendimiento de una parte de la comunidad puede arrastrar parte de la pintura antiincrustante y debilitar la película base por acción de

metabolitos o excretas en el lugar de fijación; la exposición de la superficie metálica en contacto con el agua de mar provoca procesos de corrosión.

El microfouling y particularmente las bacterias, pueden atacar también a los componentes del ligante de las pinturas y contribuir al deterioro de las cubiertas protectoras. Como consecuencia de la fijación del “biofouling”, los costos generales del mantenimiento en una embarcación se incrementan en un 77% (Abbott *et al.*, 2000).

En los equipos de sonar la fijación del “biofouling” reduce la sensibilidad y transmisión del sonido, aumentando los ruidos por cavitación. Las medidas de emisión y recepción de señales con transductores sumergidos colonizados muestran una reducción de sensibilidad axial entre 0 y 10 dB en el intervalo de frecuencias de 1 a 20 KHz.

La fijación de organismos en el interior de sistemas de cañerías provoca una disminución del diámetro de las tuberías y por lo tanto un descenso en el flujo de agua. Los sistemas de refrigeración de plantas generadoras de energía eléctrica y de plantas desalinizadoras, utilizan agua de mar sin tratamiento previo. De esta forma ingresa también, plancton y las larvas encuentran en el interior de las cañerías un lugar propicio para asentarse y alimento disponible.

En la central termoeléctrica de puerto Quequén (provincia de Buenos Aires) el asentamiento del serpulido *Hydroides elegans* obturó las tuberías formando los denominados “bochones” que impiden el pasaje de agua. Otro ejemplo de bloqueo de cañerías, en este caso por la presencia del mejillón de agua dulce, *Limnoperna fortunei*, es el que ocurre desde hace más de una década en la Central Hidroeléctrica Yacyretá, que produce el cese periódico de funcionamiento de las turbinas para limpieza y reparación y que ha obturado también los sistemas de incendio.

En estaciones off-shore y en sistemas OTEC (Ocean-Thermal Energy Conversion), sistemas que generan electricidad a partir de la diferencia de temperatura entre aguas profundas y superficiales, el peso de los organismos puede afectar la flotabilidad y estabilidad de las estructuras, además aceleran los procesos de corrosión y obturan los sistemas de enfriamiento y filtrado.

En granjas marinas, la adhesión del “biofouling” provoca la obstrucción de redes para acuicultura impidiendo la llegada del alimento a los organismos cultivados (peces y bivalvos) y a su vez, la salida de productos de desecho. Esta situación genera stress y hace que la población se encuentre más vulnerable a enfermedades. Paralelamente, la comunidad del “biofouling” compite por alimento con los organismos en cultivo (Phillipi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2002; Willemsen, 2006).

En superficies de plástico y de vidrio, lentes de cámaras y ventanas, se produce el bloqueo de las estructuras requiriendo limpieza y reacondicionamiento.

En la Tabla 1 se presentan los perjuicios que ocasiona el “fouling” sobre distintos sustratos sumergidos (Muraoka, 1968; Pipe, 1979; Thorhaug y Marcus, 1980; Edyvean *et al.*, 1985; Terry y Picken, 1986; Santhakumaran, 1990).

Tabla 1. Acción del “biofouling” sobre las estructuras sumergidas.

Actividad de los organismos	Efectos de la fijación
Fijación en cascos de embarcaciones	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reducción de la velocidad de desplazamiento</li> <li>▪ Incremento en el consumo de combustible</li> <li>▪ Deterioro de la película protectora</li> <li>▪ Inicio de procesos de corrosión</li> <li>▪ Mayor frecuencia de entradas a dique seco con pérdidas económicas: lucro cesante, alquiler de dique, limpieza del casco, reparación y/o reposición de partes deterioradas, pintura y mano de obra</li> </ul>
Fijación en equipos de sonar	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reducción de la sensibilidad y transmisión del sonido</li> <li>▪ Disminución de la efectividad del sonar al aumentar los ruidos por cavitación</li> </ul>
Fijación en sistemas de cañerías en plantas desalinizadoras o en sistemas de refrigeración en plantas de energía eléctrica	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reducción del diámetro interior de cañerías y por ende del flujo de agua</li> </ul>
Fijación externa y en sistemas de filtrado en estructuras “off-shore” y en sistemas OTEC (Ocean Thermal Energy Conversion)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El peso de los organismos del “fouling” puede afectar la flotabilidad y estabilidad de las estructuras y acelerar los procesos de corrosión.</li> <li>▪ Obstrucción de los sistemas de enfriamiento y filtrado, que produce la interrupción del funcionamiento de los equipos</li> </ul>
Superficies metálicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Debajo de caparazones de cirripedios se produce corrosión por picado debido a la formación de celdas de concentración de oxígeno. Otras condiciones favorables para la corrosión son las generadas por productos metabólicos, particularmente óxidos y sulfuros. Las bacterias sulfato reductoras promueven la corrosión anaeróbica.</li> </ul>
Recubrimientos protectores	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El “fouling” daña los recubrimientos en varias formas; provoca la pérdida de adherencia del recubrimiento exponiendo, eventualmente, a la superficie metálica base y puede deteriorar la pintura por acción bacteriana</li> </ul>
Redes para acuicultura	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bloqueo de redes que producen retraso en el crecimiento y desarrollo de los organismos en cultivo</li> </ul>
Superficies plásticas y de vidrio	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ventanas de estructuras sumergidas y lentes de cámaras comienzan a bloquearse y requieren frecuente limpieza</li> </ul>

## **Relación entre “biofouling” y procesos de corrosión**

Los mecanismos y aspectos ecológicos relacionados con el “fouling” marino microbiano son conocidos, sin embargo, su asociación con la corrosión metálica es muy compleja. La corrosión por acción bacteriana puede ocurrir en forma directa debida a la acción de compuestos corrosivos como el sulfuro de hidrógeno, el amoníaco y los ácidos orgánicos e inorgánicos, entre otros; o en forma indirecta debido al metabolismo bacteriano (Iverson, 1968; Rogers, 1968; Iverson y Brinckman, 1978; Gerchakov y Sallman, 1979). Los factores que influyen en la corrosión metálica son:

### *Fisicoquímicos*

- Acción de las sustancias poliméricas extracelulares
- Formación de celdas de aireación diferencial: las colonias de bacterias al respirar generan diferencias entre la concentración de oxígeno de su microambiente y del área circundante.
- Cambios químicos en la interfase metal/solución debidos a la actividad metabólica (cambios en el pH y liberación de metabolitos, entre otros)
- Remoción de productos de corrosión
- Naturaleza del metal

### *Biológicos*

- Formación de celdas de concentración de oxígeno: se inician por la diferencia de concentración de oxígeno disuelto entre dos puntos de la superficie metálica, el área de mayor concentración de oxígeno actúa como cátodo mientras que la de menor concentración, como ánodo. Estas celdas pueden formarse en zonas altamente aireadas, como las de salpicado y también en las deficientes en oxígeno, debajo de la capa de “fouling” o de sedimento. Experimentalmente se han detectado valores reducidos de tensión de oxígeno inferiores al 10% de saturación debajo de anémonas de mar, entre 25 y 40% debajo de colonias de hidozoos y hasta valores próximos al 40% de saturación debajo de colonias de tunicados (Edyvean y Terry, 1983). Por lo tanto, es probable que las celdas de concentración de oxígeno puedan generarse



también cuando la cubierta de “biofouling” es discontinua (Woolmington y Davenport, 1983).

- Efecto barrera del “fouling”: algunos autores (LaQue y Clapp, 1945; Ruimu *et al.*, 1984) afirman que la fauna viva con caparazones calcáreos parece no afectar la corrosión de metales, pero que los organismos muertos estimulan el ataque localizado. Otros investigadores sostienen que el “biofouling”, fundamentalmente en el que están presentes caparazones duros, reduce el ataque del acero al disminuir la velocidad relativa del agua que lleva el oxígeno disuelto hasta la superficie metálica y al actuar como una barrera para la difusión de oxígeno a los sitios catódicos. Sobre estos últimos se puede depositar carbonato de calcio e hidróxido de magnesio que proveen una barrera semejante a la del “biofouling” (LaQue, 1975; Obuekwe *et al.*, 1981; Terry y Edyvean, 1986).
- El efecto protector de la cubierta de “biofouling” disminuye apreciablemente cuando es suficientemente gruesa y bioactiva como para excluir el oxígeno de la superficie del metal y generar en la interfase metal/película de “fouling” un medio anaeróbico generado por las bacterias sulfato reductoras (BSR) (Edyvean y Terry, 1983; Iverson, 1972). Se ha demostrado que este proceso adquiere un nuevo estado estacionario al formarse una capa de sulfuro cuya velocidad de crecimiento puede alcanzar los 70  $\mu\text{m}$  por año y que la combinación del nivel natural de ion sulfato en agua de mar con la fuente de alimentos orgánicos el “fouling”, provee las condiciones necesarias para que el proceso bacteriano continúe a lo largo del tiempo (Freeman, 1977).
- La corrosión bajo condiciones anaeróbicas es un fenómeno complejo y está afectada por los diferentes macroorganismos fijados. Por ejemplo, el crecimiento activo del alga verde *Enteromorpha* puede balancear, gracias a la fotosíntesis, las condiciones para el desarrollo de las bacterias sulfato reductoras (BSR) y, en consecuencia, reducir la corrosión (Edyvean y Terry, 1983). Se ha demostrado que el oxígeno producido por fotosíntesis en agua de mar natural y el oxígeno burbujeado en soluciones de cloruro de sodio inducen la misma velocidad de ataque sobre el acero (Hache *et al.*, 1959). El ataque de las BSR, originado en muchos casos por cambios marcados en la composición del agua de mar, un bajo contenido de oxígeno disuelto, una alta disponibilidad de sulfato y el estancamiento de productos sulfurados sobre la superficie del metal, indica que la corrosión estaría influida fundamentalmente por las

condiciones en el seno de la solución más que las de la interfase metal/película de “biofouling” (Eashwar *et al.*, 1988).

- El mecanismo clásico de corrosión por despolarización catódica establece que, bajo condiciones anaeróbicas, las BSR utilizan mediante la acción de la enzima hidrogenasa, el hidrógeno producido por la reacción catódica favoreciendo de esta forma la reacción (Booth y Tiller, 1960; Pankhania, 1988). Los sistemas productores de enzima hidrogenasa no están restringidos a los microorganismos ya que han sido encontrados en *Ulva lactuca*, *Ascophyllum nodosum*, *Porphyra umbilicalis*, *Porphyridium cruentum* y en algunas cianofitas, por lo que estas algas estarían incrementando la corrosión por esta vía.
- Otros mecanismos para explicar la corrosión por BSR involucran agentes corrosivos tales como el sulfuro de hierro, iones sulfuro y azufre elemental producidos por el metabolismo bacteriano (Cragolino y Tuovinen, 1984; Iverson, 1985). Además de los productos sulfurados, las BSR generan compuestos fosforados altamente corrosivos y volátiles que, se supone, aumentan la disolución del metal en condiciones anaeróbicas.
- El ataque por debajo de la incrustación de organismos marinos es común en aceros inoxidable, los más susceptibles son los aceros AISI 410 y los menos susceptibles los del tipo 317. Según pudo observarse, en estos aceros la corrosión se localiza debajo de cirripedios muertos y, en muy pocos casos, debajo de organismos vivos. Evidentemente los efectos colaterales de las bacterias y otros productos de descomposición de los macroorganismos juegan un rol importante en la destrucción de la capa pasivante del metal en contacto con los organismos. En contraste, el titanio y las aleaciones base níquel con cromo y molibdeno permanecen prácticamente libres de cirripedios y otros organismos marinos (LaQue, 1972).

### **Generalidades de pinturas**

Las pinturas son *materiales compuestos* que desde el punto de vista físico-químico pueden ser considerados como sistemas heterogéneos constituidos por una o más fases sólidas finamente divididas (pigmentos), dispersas en un medio fluido denominado vehículo (ligante y solventes) y por otros constituyentes que, agregados en bajas proporciones, aportan alguna función a la pintura en estado líquido o como película seca (aditivos) (Fig 2). Cuando este material se aplica en forma de capas

delgadas se obtiene una película sólida, ya sea por secado o curado (Rascio *et al.*, 1977). Los ligantes son los responsables de la formación de la película, los solventes aportan la fluidez necesaria para que la pintura pueda ser aplicada y regulan la velocidad de secado; por otra parte, los pigmentos le dan a las pinturas propiedades específicas tales como dureza, adhesión, opacidad, resistencia a las radiaciones, a agentes químicos, a la corrosión, al asentamiento de organismos, entre otras.

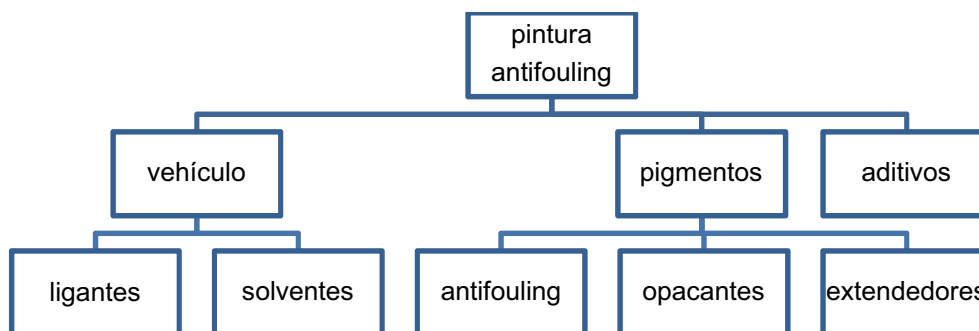


Figura 2. Esquema de los componentes básicos de una pintura antifouling.

Los ligantes son las sustancias formadoras de película por excelencia y, como tales, tienden a controlar la difusión del agua, oxígeno y electrolitos hacia el metal. Son responsables de mantener en íntima unión a los pigmentos dentro de la película seca de pintura y de permitir la adhesión de la misma al sustrato. Una vez que la pintura fue aplicada sobre una superficie, el ligante necesita secar o “curar” y asegurar la adhesión; este proceso por el cual los polímeros líquidos se convierten en sólidos puede ocurrir por evaporación del solvente, por oxidación o por reacción química. En general determinan la mayoría de las propiedades físicas y químicas de la pintura como así también sus características de aplicación y prestaciones posteriores.

En tecnología de pinturas existen numerosos ligantes cuya elección adecuada dependerá del rol a cumplir. Se clasifican en tres grandes grupos: ligantes y resinas naturales, resinas sintéticas base solvente y resinas sintéticas base acuosa (Rascio *et al.*, 1977).

En general, las formulaciones de pinturas emplean mezclas o sistemas de solventes que están diseñados para facilitar la fabricación y aplicación de las pinturas, mejorar las propiedades de flujo y nivelado de la película formada, disminuir la concentración de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y el costo total de la pintura. Estos sistemas contienen un *disolvente* de la resina y también *diluyentes* que, además de diluir el producto, permiten reducir los costos de fabricación y facilitar la aplicación. La elección de la mezcla solvente es importante ya que debe mantener la resina

solubilizada hasta se que haya evaporado toda la mezcla. La composición del sistema de solventes varía durante la evaporación; los solventes con mayor presión de vapor evaporan más rápido que los de menor presión de vapor, quedando estos últimos retenidos en la película por más tiempo. Así, en el diseño del sistema de solventes debe tenerse en cuenta que el solvente con menor presión de vapor sea el que disuelve la resina dado que, si esto no ocurre, la resina precipitaría y la película resultaría débil y porosa (Hare, 1991a). Además, la selección de los solventes adecuados es de gran importancia para la formación de la película seca; si los solventes evaporan excesivamente rápido, la película aparecerá con defectos en su superficie tales como cráteres o burbujas, o bien puede resultar un mojado inadecuado del sustrato causando problemas en la adhesión de la pintura. En cambio, si los solventes evaporan lentamente, la pintura puede “chorrear” y aparecerá un “efecto cortina” en la película seca que puede afectar el curado.

Entre los solventes más empleados en la formulación de pinturas se encuentran los VOCs que, debido a su toxicidad y a las restricciones impuestas a su uso, están siendo reemplazados por agua (Hare, 1991d; Stout, 1998). Los VOCs incluyen hidrocarburos alifáticos, aromáticos, alcoholes, cetonas, ésteres, éteres glicoles, etc. El alifático más utilizado es el aguarrás mineral, mezcla de destilados del petróleo usado fundamentalmente con resinas alquídicas; los aromáticos más utilizados son el xileno y tolueno, productos con bajo costo y aptos para su empleo como disolventes y/o diluyentes (Hare, 1991b). Otros solventes empleados en la formulación de pinturas son las cetonas (Chatfield, 1962; Ellis, 1986), los ésteres (Hare, 1991c), los alcoholes y los éteres glicoles (Ellis, 1986).

El empleo de agua como solvente requiere el diseño de nuevos polímeros y demanda innovación ya que solubiliza pocas resinas debido a sus características polares. A pesar de esto, ya existen en el mercado resinas que pueden ser utilizadas en pinturas acuosas y tienen buena aceptación y rendimiento.

Los pigmentos son sustancias sólidas finamente divididas, minerales u orgánicas, generalmente insolubles en los constituyentes de una pintura a la que le otorgan diferentes propiedades; se mantienen dispersos en forma estable y proporcionan a la película un color característico, tienen poder cubritivo y resistencia a la intemperie. En una pintura antiincrustante existen básicamente tres tipos de pigmentos: opacantes, extendedores y antiincrustantes (Hare, 1990a).

Los pigmentos opacantes tienen un índice de refracción mayor que el de las resinas utilizadas por lo cual la luz que penetra en la película pigmentada es refractada

varias veces antes de llegar al sustrato. El efecto final es que el sustrato no resulta visible (Balfour, 1992).

Los pigmentos extendedores son utilizados para proporcionar a la película ciertas características tales como dureza, adhesión y durabilidad. También juegan un papel importante en la estabilización del brillo, en las propiedades reológicas, en ciertas propiedades mecánicas, aplicación y procesos de nivelado y flujo, a su vez, pueden actuar como pigmentos auxiliares en la optimización de las propiedades funcionales de la pintura. Según su naturaleza química se los clasifica en carbonatos, sulfatos y silicatos. Los más utilizados en pinturas son tiza (carbonato de calcio), barita (sulfato de bario), talco y mica (Hare, 1990b).

Los aditivos son generalmente definidos como aquellos componentes que, incorporados a la formulación de la pintura en pequeñas cantidades (entre 0,05 y 2%), sirven para controlar las propiedades de la pintura tanto al estado líquido como una vez que ha curado. La función de cada aditivo es específica, entre ellos se encuentran emulsificadores, agentes humectantes, agentes reológicos, promotores de adhesión, absorbedores UV, secantes, antiespumantes, plastificantes, dispersantes, surfactantes, inhibidores de "flash rusting", entre otros (Cowley y Gallon, 1988; Athey y Porowska, 1995; Reinhardt, *et al*, 1998; Verkholantsev, 1999).

### **Prevención del "biofouling" por medio de pinturas antiincrustantes**

Durante décadas las pinturas "antifouling" han sido la mejor vía de protección de los cascos de los barcos. Existe un caudal de información considerable sobre resultados de su comportamiento en proyectos de planta piloto, en balsas experimentales y en la aplicación efectiva en servicio.

Las pinturas antiincrustantes o antifouling son películas que producen una liberación controlada del o los pigmentos que contienen generando una interfase altamente tóxica que evita la fijación de organismos (Caprari y Lecot, 2001). Una pintura antiincrustante posee características muy particulares que, por su modo de acción, se diferencia totalmente de los demás tipos conocidos; la película de pintura modifica permanentemente sus características cuando está sumergida.

En la formulación de las pinturas antiincrustantes se emplean sustancias tóxicas que deben ser liberadas desde el film con la finalidad de proteger la parte sumergida de las embarcaciones. El objetivo fundamental es lograr la adecuada solubilización de tóxico. La pérdida de tóxico tiene un valor mínimo crítico que

depende del tóxico usado y de la formulación de la pintura, por debajo de ese valor, la pintura no tiene acción preventiva.

La solubilización inicial del biocida (*leaching rate* inicial) es generalmente elevada ya que resulta del exceso de tóxico acumulado en la película de pintura. Este valor es importante ya que la pintura debe comenzar a actuar inmediatamente después de la inmersión y la efectividad dependerá de la solubilidad del tóxico, de las características del vehículo, del área superficial de partículas de tóxico y de las condiciones de temperatura, salinidad y pH del agua. Después de varios días de inmersión se alcanza un valor de lixiviación constante (*leaching rate* constante).

Si la pintura funciona correctamente, el tóxico expuesto en la superficie se disolverá dentro de los valores previstos, pero puede ocurrir que la acción de la pintura se anule rápidamente, no por excesiva solubilización de tóxico o agotamiento, sino porque quede bloqueado en el interior del film.

Las pinturas deben ser aplicables con facilidad en grandes superficies, secar rápidamente y proporcionar un film bien adherido y libre de irregularidades. Se debe preparar el sustrato a proteger con una imprimación con buena adhesión y con rugosidad adecuada.

#### *Tipos de pinturas antiincrustantes*

Las pinturas antiincrustantes pueden clasificarse en tres tipos, las de matriz soluble, las de matriz insoluble y las autopulimentables.

En las pinturas de matriz soluble, el tóxico y el vehículo se solubilizan conjuntamente, con disminución del espesor del film (Fig. 3). Para la formulación del vehículo se emplea la resina colofonia, de naturaleza ácida, que es el principal material formador de película. La resina colofonia es de origen natural, se extrae de coníferas y es soluble o erosionable por el agua, es de naturaleza ácida y está compuesta por un 90% de ácidos resínicos, principalmente ácido abiético y levopimárico (Rascio *et al.*, 1988b). Los grupos carboxílicos libres (-COOH) permiten que reaccione con el agua de mar alcalina (pH 8) formando resinatos solubles y facilitando la liberación del tóxico. Sin embargo, la colofonia genera un film excesivamente soluble, poco adherente y quebradizo, por lo que se la plastifica incorporando aceites o barnices a la formulación; su solubilidad en agua de mar es afectada por el tiempo de secado (Rascio *et al.*, 1977).

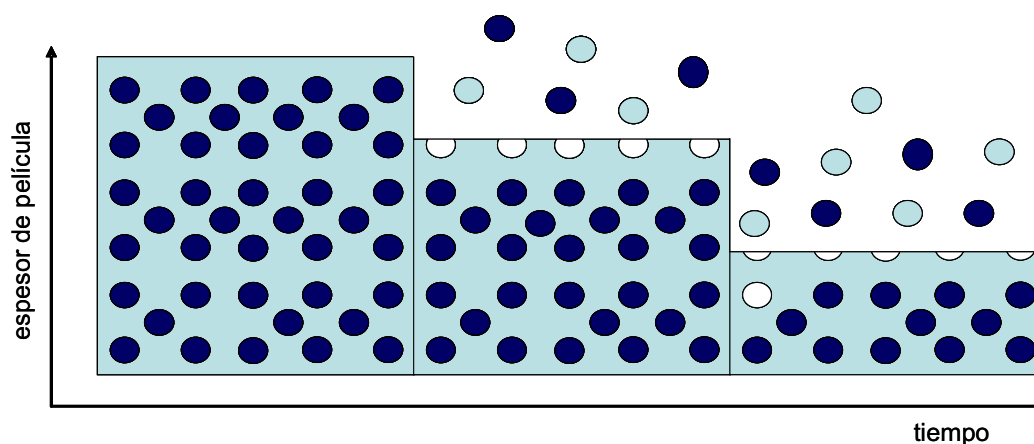


Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de una pintura de matriz soluble a lo largo del tiempo.

Las pinturas de matriz insoluble son conocidas como pinturas de lixiviación por contacto continuo o sistemas de larga vida útil (Fig.4). El componente resinoso es insoluble y no es erosionado por el agua. Hay una gran variedad de polímeros que pueden ser efectivos, como las resinas vinílicas (copolímeros de cloruro-acetato de polivinilo), acrílicas, caucho-acrílico, caucho clorado y epoxídicas. También se incluye a la resina colofonia como componente del ligante. El mecanismo de acción es por difusión del tóxico que se encuentra en cantidad elevada para asegurar el contacto continuo entre las partículas, es decir cuando las partículas más superficiales se disuelven y difunden en el agua, quedan expuestas otras partículas disponibles para la disolución posterior. Se diferencian de las pinturas de matriz soluble en que la lixiviación del pigmento forma “galerías” que aumentan la permeabilidad de la película y la salida del biocida de las capas más internas, sin producir disminución del espesor de película del sistema. El vehículo en general es un material suficientemente resistente como para mantener la integridad del film.

La desventaja de este tipo de formulaciones es que, a medida que el contenido de tóxico se va lixiviando, el esqueleto de la matriz agotada se mantiene, lo que modifica la textura superficial del film aumentando la rugosidad y favoreciendo de este modo la adhesión de esporas o larvas. Por otra parte, las partículas de biocida deben atravesar un espesor mayor de película agotada por lo que la eficiencia de la pintura puede disminuir.

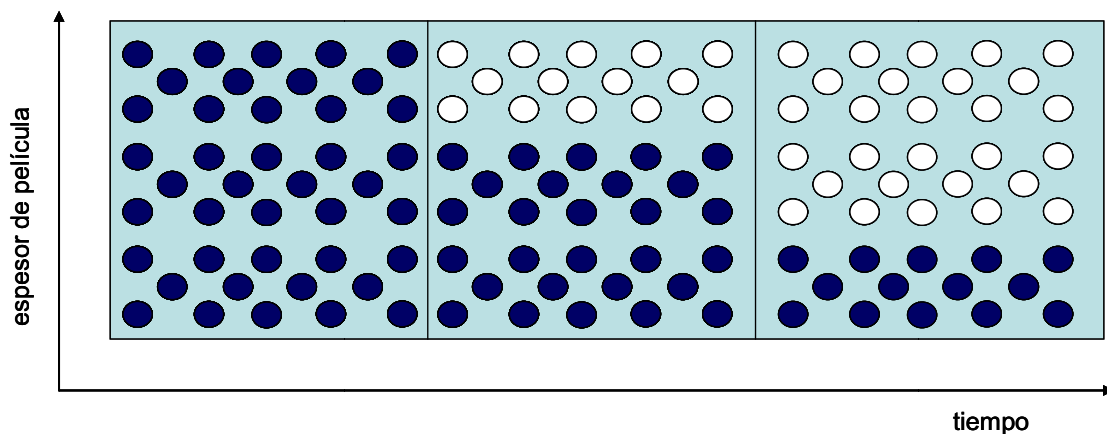


Figura 4. Esquema del mecanismo de acción de una pintura de matriz insoluble a lo largo del tiempo.

Las pinturas autopulimentables (SPC: self-polishing copolymer) están formuladas con un polímero acrílico, usualmente metil metacrilato, que se combina con el biocida (TBT) por una unión éster. Estas pinturas liberan el tóxico a partir de una reacción de hidrólisis que se lleva a cabo lentamente permitiendo la salida del tóxico y extendiendo así la zona de reacción (Anderson *et al.*, 2003) (Fig. 5).

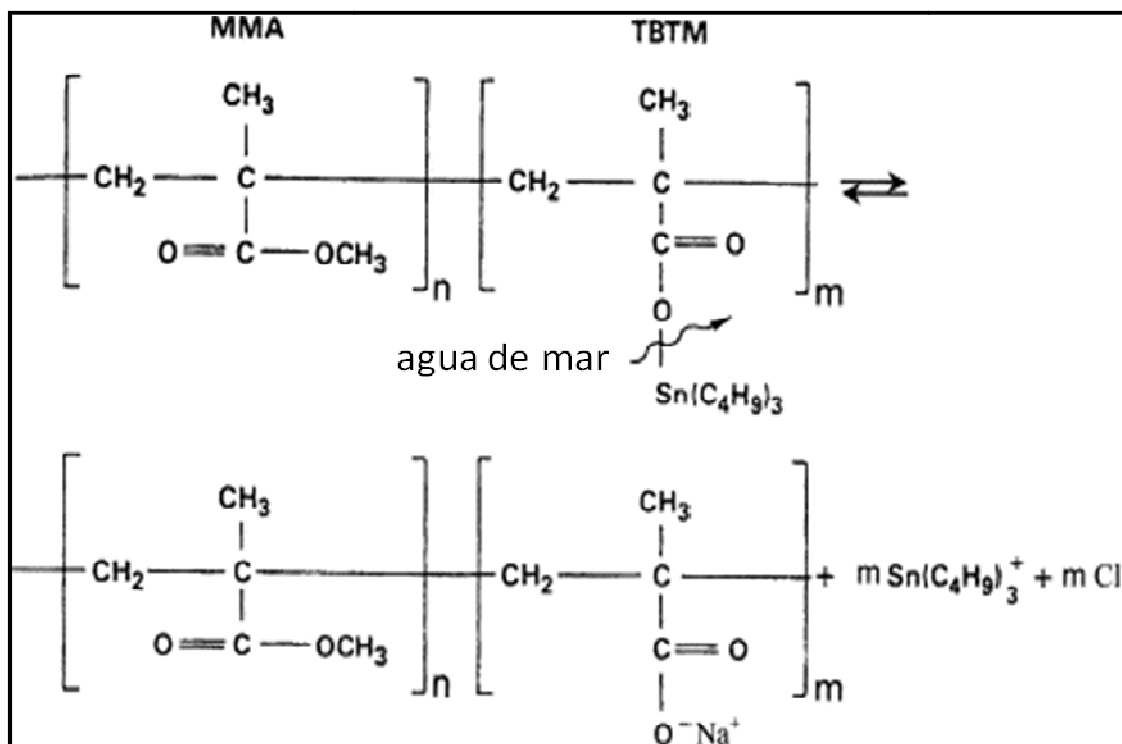


Figura 5. Reacción de hidrólisis.



### *Pigmentos antiincrustantes*

Entre los pigmentos más utilizados se encuentra el óxido cuproso, es uno de los compuestos más efectivos incorporados como biocida en pinturas antiincrustantes, actúa a muy bajas concentraciones sobre una amplia variedad de organismos marinos dependiendo de la solubilidad del ligante (Yebra *et al.*, 2003).

El cobre es un elemento esencial para el normal crecimiento de organismos, aunque altas concentraciones pueden ser letales (Voulvoulis *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha determinado que no posee efecto antiincrustante sobre el alga verde *Enteromorpha*, abundante en nuestras costas (Voulvoulis *et al.*, 1999). El cobre posee muy baja solubilidad en agua dulce y aumenta, aunque no de manera sustancial, en agua de mar.

El efecto tóxico del cobre aumenta en presencia de óxido de cinc que es un compuesto de 99% de pureza, muy poco soluble en agua y que contiene impurezas como pequeñas cantidades de plomo, hierro, azufre y cadmio; cristaliza en el sistema hexagonal, como un polvo blanco, aunque el color varía según el tamaño de las partículas que lo forman. De acuerdo al proceso de elaboración se puede obtener un producto de partículas aciculares o nodulares que aumenta la dureza de la película y la resistencia a la descomposición del ligante. Posee propiedades fungicidas y bactericidas (Koleske, 1995).

En pinturas, se lo emplea sólo o acompañado con óxido cuproso, con el que ejerce una acción sinérgica y mejoran su acción en presencia de pequeñas cantidades de biocidas orgánicos.

En las últimas cuatro décadas se han utilizado pigmentos antifouling de excelente poder biocida pero altamente contaminantes y nocivos para la biota. Entre ellos se encuentran el óxido de mercurio ( $\text{HgO}$ ), el arseniato mercurioso ( $\text{AsO}_4\text{Hg}_3$ ), el trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), el arsenito cuproso ( $\text{AsO}_3\text{Cu}_3$ ) y los organometálicos, principalmente el óxido de tributilestaño (TBTO) y el óxido de trifenil estaño (TPTF).

Desde la década del '80, se ha enfatizado en los efectos nocivos de los compuestos organoestánicos sobre organismos marinos y su relación directa con el aumento en la utilización de pinturas antiincrustantes (Pereira *et al.*, 1999). Posteriormente, la IMO (Internacional Maritime Organization) dispuso la prohibición del uso de compuestos organoestánicos como pigmentos antifouling. De acuerdo a esta legislación, la aplicación de estas pinturas sobre cascos de embarcaciones debió

interrumpirse el 1º de enero de 2003 y se prohibiría la circulación de las ya pintadas a partir del 1º de enero de 2008.

Esta legislación ha llevado a la necesidad de hallar nuevas alternativas no tóxicas, no contaminantes y de bajo impacto ambiental.

En virtud de las restricciones impuestas al uso del TBT en formulaciones antifouling han sido desarrollados posibles reemplazantes tales como Irgarol 1051®, Sea-Nine 211®, clorothalonil, dichlofluanid, tolilfluanid y zinc piritiona (Voulvoulis *et al.*, 1999; Kostantinou y Albanis, 2004; Bellas, 2005). Sin embargo, estos compuestos han sido encontrados en concentraciones relativamente altas en puertos, marinas y zonas costeras (Voulvoulis *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2001; Voulvoulis *et al.*, 2002; Reitsema, 2008).

Las investigaciones actuales sobre este tema están enfocadas básicamente hacia la búsqueda de compuestos “amigables con el medio ambiente”. Se ha puesto énfasis en la identificación de principios activos existentes en organismos que naturalmente no presentan epibiontes y que han desarrollado mecanismos de inhibición o de repulsión para proteger su superficie corporal (Harder, 2009) o bien en aquéllos que han desarrollado defensas químicas contra predadores, por lo que se asume que los metabolitos secundarios son potenciales agentes antifouling (Davis y Wright, 1989; Clare *et al.*, 1992; Pawlik, 1992; Abarzua y Jakubowski, 1995; Clare, 1996; da Gama *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2007; Raveendran *et al.*, 2011). El efecto que provocan en los organismos del “fouling” es variado, numerosos compuestos actúan como anestésicos, otros como repelentes de la fijación o como inhibidores de las propiedades que determinan los mecanismos de la adhesión sin tener efectos biocidas (Omae, 2003).

En los últimos veinte años una amplia variedad de compuestos naturales extraídos de algas y organismos sésiles marinos han sido identificados como inhibidores del asentamiento de *Balanus amphitrite*, como por ejemplo diterpenos del “orejón de mar” *Renilla reniformis* (Keifer *et al.*, 1986), pukalidos del coral *Leptogorgia virgulata* y otros gorgonáceos (Gerhart *et al.*, 1988; Vrolijk *et al.*, 1990; Wahl *et al.*, 1998), compuestos obtenidos de esponjas (Sarma *et al.*, 1991; Goto *et al.*, 1993; Thirionet *et al.*, 1998; Hellio *et al.*, 2005; Dobretsov *et al.*, 2005; Nogata y Kitano, 2006), ácido cinámico del alga *Zostera marina* (Todd *et al.*, 1993), juncelinas del octocoral *Juncella juncea* (Avelin *et al.*, 1993), furanonas, ácido isetiónico y floridósidos de algas rojas (de Nys *et al.*, 1995; Hellio *et al.*, 2004; de Nys *et al.*, 2006), florotaninos de algas pardas (Ragan y Glombitza, 1986), compuestos fenólicos (Lau y Qian, 2000),

extractos de briozoos (Kawamata *et al.*, 2006) y extractos de nudibranquios (Nogata y Kitano, 2006). Sin embargo, la producción a escala industrial de cualquiera de estos compuestos está aún lejos de alcanzarse dado que si bien los compuestos activos han sido identificados, la síntesis en laboratorio es compleja y hasta el momento no ha sido perfeccionada.

### Principales organismos del “fouling”

Por cuestiones prácticas, el “fouling” biológico se lo divide en dos grandes grupos de acuerdo al tamaño de los organismos:

- **microfouling**, u organismos que se visualizan bajo microscopio, que incluye bacterias, protozoos y diatomeas (Fig. 6).
- **macrofouling**, u organismos que se visualizan a ojo desnudo, que incluye algas, cirripedios, serpúlidos, mejillones, ascidias, etc. (Figs. 7 y 8).

Es interesante resaltar que en la comunidad del “fouling” se encuentran representados prácticamente todos los phyla de organismos y las especies presentes contribuyen en mayor o menor grado al biodeterioro. Se considera biodeterioro a cualquier cambio indeseable e irreversible en las propiedades de un material como consecuencia de la actividad de organismos.

Los protozoos son organismos unicelulares microscópicos, solitarios de vida libre, sésiles solitarios o sésiles coloniales. Colonizan los sustratos sumergidos luego de bacterias y diatomeas que les sirven de alimento y básicamente se fijan por presencia de pedúnculos como en el caso de *Zoothamnium* y *Vorticella*. Otros protozoos, si bien son vágiles, están presentes comúnmente en la comunidad formando parte del film primario, por ej., *Euplotes*.

Las algas marinas juegan un rol importante en el “fouling”, particularmente sobre sustratos artificiales sumergidos en aguas someras donde la luz es suficiente para que lleven a cabo sus funciones fotosintéticas, por ello es común encontrar distintas especies de algas en la parte superior de estructuras fijas o flotantes.

Las diatomeas son algas unicelulares microscópicas que pueden vivir aisladas o en colonias, pudiendo encontrarse suspendidas formando parte del plancton, como la diatomea *Skeletonema costatum*, o fijadas a sustratos sumergidos como la diatomea bentónica *Achnanthes longipes*. Sin embargo, es factible que, por procesos de sedimentación, se encuentren especies del plancton formando parte de las

comunidades incrustantes. En el caso de las diatomeas sésiles los sistemas adhesivos tienen morfologías variadas y están compuestos por polisacáridos ácidos mucilaginosos, según Molino y Wetherbee (2008) estos mucílagos extracelulares consisten en una compleja mezcla de proteínas, proteoglicanos y carbohidratos, siendo estos últimos los componentes mayoritarios. Entre las diatomeas registradas con mayor abundancia en el puerto de Mar del Plata y en Puerto Belgrano se encuentran especies de los géneros *Melosira*, *Achnanthes*, *Nitzschia*, *Skeletonema*, *Pleurosigma* y *Synedra*.

Aunque hay diversos grupos de algas marinas, sólo un reducido número de especies se consideran importantes desde el punto de vista del biodeterioro; principalmente se encuentran Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) y Rodophyta (algas rojas).

Las algas en general forman característicos cinturones constituidos fundamentalmente por distintas especies de *Enteromorpha* (algas verdes) y *Ectocarpus* (algas pardas), ambas de distribución cosmopolita. Son particularmente tolerantes al estrés ambiental como se evidencia a través de su elevada densidad en la inestable línea de flotación y sobre la zona de salpicadura de las estructuras flotantes. Además tienen un alto potencial reproductivo, por ejemplo, cada filamento de *Enteromorpha* es capaz de producir cien millones de células reproductoras. Como consecuencia del carácter intermareal de su ambiente natural, tienen la capacidad de soportar condiciones extremas de temperatura, salinidad y desecación; otra característica que contribuye al éxito dentro del “fouling” es su capacidad para adherirse y crecer rápidamente sobre las superficies. Aunque la propagación vegetativa puede jugar un rol exitoso en la dispersión de muchas algas marinas, indudablemente el mecanismo predominante por el cual se alcanza la colonización de nuevos sustratos es a través de la liberación y asentamiento de estadios reproductivos por esporas móviles (flageladas). En la mayoría de las algas, el asentamiento inicial es seguido rápidamente por un proceso de adhesión activo que involucra la secreción de un material adhesivo entre la membrana que reviste la espora y el sustrato. Estudios de microscopía electrónica de varias esporas algales han demostrado que este material adhesivo es producido por pequeñas vesículas subcelulares del aparato de Golgi durante los últimos estadios de diferenciación de las esporas. En el caso de la clorofita *Enteromorpha*, la sustancia producida es un mucopolisacárido consistente en proteínas y carbohidratos (Evans y Christie, 1970; Chamberlain, 1976; Campbell, 1982; Callow *et al.*, 2000), la secreción cura y se torna insoluble (Martenson, 2005).

Las esporas recientemente adheridas son muy vulnerables al ataque de predadores tales como bacterias o a la acción tóxica de compuestos antifouling dado que están rodeadas sólo por una membrana simple y delgada. Sin embargo, luego de unos minutos la pared comienza a desarrollarse alrededor de las células y luego de cuatro horas alcanza un grosor considerable. De este modo, en un corto período se logra una importante protección física y química, que impide remover con facilidad una zoospora una vez adherida a una superficie. Aunque es extremadamente dificultoso medir cuantitativamente la fuerza de la adhesión entre las zoosporas y el sustrato, se logró obtener información usando chorros de agua estandarizados a diferentes tiempos luego del asentamiento, este método demuestra que la adhesión de las esporas al vidrio mejora rápidamente durante las primeras horas luego de la adhesión, presumiblemente debido a los cambios físicos que ocurren por la descarga del adhesivo (Christie *et al.*, 1975). Luego que las esporas se fijan a la superficie, comienza un período de rápido crecimiento que generalmente comprende la producción inicial de una capa protectora externa de idéntica composición que la pared celular. El proceso de germinación continúa con la formación de un sistema de anclaje eficiente que asegura el futuro desarrollo del talo que se realiza por medio de células rizoidales especializadas, incoloras, que otorgan fuerzas de adhesión. Estos rizoides se producen en forma continua para soportar el incremento de tamaño del sistema erecto, a medida que emergen de la base, toman un aspecto compacto para formar la característica estructura de sostén ('holdfast'). Juntamente con el proceso de establecimiento de un sistema de anclaje eficiente, ocurre el crecimiento y desarrollo de la porción macroscópica superior del cuerpo del talo (Callow *et al.*, 2002).

Por distintas experiencias, pudo comprobarse que esporas de *Enteromorpha* pueden asentarse sobre sustratos en flujos de agua con velocidades superiores a 10 nudos, lo cual permitiría la fijación de estas algas mientras los barcos están en movimiento (Houghton *et al.*, 1972; Christie y Evans, 1975).

En el puerto de Mar del Plata, *Enteromorpha intestinalis* es la especie que se ha registrado constantemente sobre los paneles experimentales variando su abundancia y distribución batimétrica en función del grado de transparencia del agua; otras clorofitas como *Bryopsis plumosa* y *Chaetomorpha* sp. se encuentran en densidades menores. El alga parda *Ectocarpus* sp. y las algas rojas *Bangia* sp., *Porphyra* sp., *Polisiphonia* sp. y *Ceramium* sp. se encuentran en bajas densidades y con ciclos de fijación estacionales.

En Puerto Belgrano *Enteromorpha intestinalis* presenta también un ciclo de fijación anual con un pico de reclutamiento en los meses más cálidos. *Ectocarpus* sp. es la feofita que se encuentra presente durante todo el año aunque con bajas densidades. De un modo similar las rodofitas *Bangia* sp., *Ceramium* sp., *Griffithsia* sp. y *Porphyra* sp. se presentan en bajas densidades pero en forma estacional.

Los Poríferos (esponjas) forman un importante grupo del zoobentos sésil y se encuentran distribuidos en todas las profundidades y latitudes (Sarà, 1974; ODEMA, 1974). En la cementación al sustrato se ha identificado la presencia de un polipéptido, la galectina (Müller, 1997). En Puerto Belgrano se registraron especies de demosponjas de los géneros *Haliclona* y *Halichondria* sp.

Los hidrozoos son cnidarios polimórficos, es decir que pueden presentarse con morfologías diferentes (pólipos o medusas), solitarios o coloniales. Desde el punto de vista del “fouling” interesa la fase pólipo debido a que representa la forma sésil que se asienta sobre sustratos duros. Las colonias tienen diversas formas de acuerdo a las familias o géneros, en general son filamentosas o arborescentes, se originan por un pólipo primario que se adhiere al sustrato por una hidrorriza filiforme y desarrolla nuevos pólipos (sésiles o pedicelados) por medio de reproducción asexual. Especies de las familias Tubulariidae (*Tubularia crocea*) y Campanulariidae (*Obelia dichotoma*, *O. longissima*) son frecuentes en la comunidad del “fouling” del puerto de Mar del Plata, siendo en general los primeros colonizadores sobre sustratos sumergidos. En Puerto Belgrano *Obelia* sp. fue la única especie de hidrozoos presente en estos muestreos aunque en trabajos previos (Bastida *et al.*, 1974) se habían registrado *Tubularia crocea*, *Plumularia setacea* y campanuláridos indeterminados. Por otra parte, los antozoos son cnidarios polipoides presentes en la comunidad tanto por sus formas solitarias (anémonas de mar) como coloniales (corales).

Las especies de anélidos que resultan relevantes desde el punto de vista de las incrustaciones pertenecen al grupo de los poliquetos sedentarios que construyen tubos arenosos o calcáreos. Sin embargo, existen numerosas especies vágiles que utilizan el sustrato en forma ocasional buscando alimento, refugio y/o soporte que también resultan de importancia.

Los adultos de la familia Spionidae son poliquetos que forman tubos arenosos generalmente poco conspicuos debido a su talla pequeña (raramente sobrepasan los 50 mm). Habitan en la zona intermareal y son particularmente abundantes en playas arenosas o areno-fangosas, aunque algunas especies son perforantes de conchillas de moluscos (Fauchald, 1977; Fauvel, 1977; Amaral y Nonato, 1981; Bastida *et al.*,

1995). *Polydora* sp. es la especie más abundante registrada en el puerto de Mar del Plata, es de fácil identificación bajo microscopio por la presencia de espinas especializadas en el quinto setígero (Read, 1975). Esta especie posee un primer estadio larval libre, (larva trocófora, planctónica), luego se alarga y segmenta hasta llegar al estadio de 15-16 segmentos (=setígeros) en que busca un sustrato donde adherirse para formar su habitáculo. Este estadio es el que reviste mayor interés desde el punto de vista de los sistemas de control del "fouling" (Hannerz, 1956; Blake, 1969). Por medio de la secreción de mucus y ayudado por sus palpos captura los granos de arena para construir tubos sinuosos y ramificados, en general de mayor tamaño que la longitud del gusano que lo habita, favoreciendo los fenómenos de epibiosis. Se encuentran entre los primeros colonizadores de los sustratos inertes limpios y en etapas más avanzadas de desarrollo de la comunidad ofrecen sustrato secundario para el asentamiento de individuos de su misma u otras especies. El tamaño de los adultos de *Polydora* sp. alcanza alrededor de 17 mm y un máximo de 70 segmentos. Se debe considerar su estudio en particular ya que es resistente a los distintos sistemas de control (Pérez y Stupak, 1992).

Los poliquetos formadores de tubos calcáreos *Hydroides elegans*, *Ficopomatus enigmaticus* y *Spirorbis* spp. (Serpulidae) se encuentran distribuidos en la mayoría de los puertos del mundo (Anon., 1967; Fauchald, 1977; Fauvel, 1977). Los serpulidos secretan largos tubos calcáreos, sinuosos al comienzo, que luego se extienden casi en línea recta ya sea sobre el sustrato o en forma perpendicular al mismo, en tanto que otros integrantes de la familia secretan tubos más pequeños y enrollados en una espiral plana (espirorbinos). En el puerto de Mar del Plata comúnmente también se encuentran otros poliquetos asociados a la comunidad pero que no forman tubos por ejemplo, Syllidae (*Syllis*, *Typosyllis*), Polynoidae (*Halosydnella australis*), Capitellidae (*Capitella capitata*) y Cirratulidae (*Protocirrineris angelicollatio*). En Puerto Belgrano se comprobó la presencia de *Spirorbis* sp.

Los moluscos incluyen una gran variedad de formas marinas y de agua dulce importantes desde el punto de vista del "fouling". Entre ellas se destacan las formas bisadas presentes en nuestras costas como *Mytilus platensis* (mejillón) y *Brachydontes rodriguezi* (mejillín) y los que se adhieren al sustrato por cementado directo de una de sus valvas como *Ostrea* (ostra). Para la formación del filamento del biso, el pie ejerce presión contra el sustrato duro, fluye una secreción glandular a lo largo del mismo y sale por su extremo endureciéndose en contacto con el agua de mar, al retirarse el pie, queda por detrás un filamento completamente formado. Seguidamente, el pie

secreta nuevos filamentos en una nueva localización quedando el molusco amarrado por una masa de filamentos. La mayoría de las especies pueden desprenderse y readherirse permitiendo al individuo moverse de un lugar a otro.

Según DeVore *et al.* (1984) el cemento secretado es de naturaleza proteica y la formación del adhesivo incluye la interacción de al menos tres secreciones exocrinas: una proteína polifenólica, una sustancia mucosa y quizás colágeno. Otros autores consideran que el cemento está compuesto principalmente por tirosina y su mecanismo de entrecruzamiento sería similar al de las quinonas (Nanishi *et al.*, 1988). Recientemente se ha sugerido que la composición del cemento es proteico con la presencia de DOPA (3,4 dihidroxifenilalanina), molécula modificada de la tirosina (Lee *et al.*, 2006).

Para concretar su colonización los representantes de este grupo necesitan, por lo general, que la comunidad incrustante se encuentre bastante desarrollada. Es por ello que sobre los paneles limpios suelen estar poco representados.

Además de los moluscos mencionados, existen otros representantes importantes desde el punto de vista del biodeterioro por las perforaciones o excavaciones que hacen sobre distintos sustratos. *Teredo*, de distribución cosmopolita, produce grandes daños en pilotes y cascos de barcos de madera, las galerías que excava se van agrandando a medida que el animal aumenta de longitud y los adultos pueden alcanzar hasta 30 cm. La actividad perforante de muchas especies del género *Petricola* queda restringida a bancos de arcilla y roca blanda, otras son capaces de perforar cemento armado y roca relativamente dura como especies de los géneros *Pholas* y *Barnea*; otra especie, *Hiatella arctica*, puede destruir diques y muelles de cemento, llegar a 2,5 cm de longitud y excavar agujeros de unos 15 cm de profundidad. El bivalvo *Litophaga* taladra piedras calizas por medio de un proceso químico que incluye la secreción de un mucus ácido que ablanda la roca a nivel del punto a excavar.

Como integrante de la comunidad del “fouling” suele encontrarse también al nudibranquio *Tenellia pallida* (molusco sin valva) que vive sobre colonias de campanuláridos.

Indudablemente, desde el punto de vista de las incrustaciones biológicas los cirripedios representan uno de los grupos más perjudiciales y a su vez más ampliamente estudiado (Darwin, 1854; Anon., 1952; Southward y Crisp, 1963; Forbes *et al.*, 1971). Es el único grupo sésil de crustáceos y en consecuencia uno de los más



atípicos. Los cirripedios adultos tienen forma de cono truncado; las partes blandas están rodeadas por placas calcáreas, generalmente en número de seis (rostro, carina, dos paredes carinales y dos paredes rostrales) apoyadas sobre una base que puede ser calcárea o membranosa. Las placas que forman la pared se superponen unas a otras y pueden conservarse unidas por tejido vivo, por extensiones de las paredes (alas y radios) que se encastran interiormente, o por fusión parcial de las mismas. La parte superior está cubierta por un opérculo, generalmente formado por dos tergos y dos escudos sumamente movibles, unidos a las paredes laterales por medio de una membrana resistente. El cierre hermético de los tergos y escudos permite aislar el cuerpo del animal del medio ambiente, por lo que pueden resistir períodos prolongados de desecación como los producidos durante las mareas bajas. La disposición y número de las placas, así como las características de la base y del opérculo, son importantes para la identificación de las especies. La cutícula que reviste el interior de la cavidad del manto y que cubre los apéndices, experimenta mudas periódicas como en otros artrópodos. Las placas calcáreas son secretadas por el manto subyacente y no se desprenden al producirse la ecdisis. El crecimiento de las placas depende de la adición continua de materiales a sus bordes y superficies interiores, aumentando así su espesor y diámetro. El cuerpo dentro del caparazón está flexionado hacia atrás y los apéndices están dirigidos hacia arriba; existen en forma típica seis pares de apéndices alimenticios torácicos (cirros) de los cuales deriva el nombre de Cirripedia con el que se los designa. Durante la alimentación, se abren los tergos y escudos apareados y los cirros se desenrollan y extienden a través de la abertura.

Los cirripedios son hermafroditas y de fertilización cruzada. Las larvas nauplii recién eclosionadas del huevo pasan por seis estadios metamórficos precedidos cada uno por una muda o ecdisis. Luego del sexto estadio naupliar se transforman en larvas cypris, que en principio son larvas nadadoras y luego se adhieren por medio de las ventosas de succión de las anténulas y por el cemento segregado por las mismas. El primer estadio naupliar se prolonga sólo por unos pocos minutos (15-30 minutos) y el tiempo para completar el desarrollo metamórfico varía de acuerdo a las especies (Pilsbry, 1916; Bassindale, 1936; Barnes y Barnes, 1965; Freiburger y Cologer, 1966; Lacombe, 1973). Las cypris están protegidas por dos valvas quitinosas transparentes que permiten observar la presencia de numerosas gotas lipídicas de reserva que van siendo degradadas para obtener energía, esto implica que no tienen necesidad de alimentarse y por lo tanto favorecen su resistencia a tóxicos (Saroyan, 1968, 1969).

El asentamiento inicial de los cirripedios es sólo una adhesión mecánica producida por la succión hidráulica de las estructuras en forma de copa ubicadas en el extremo de las anténulas de las cypris y se estima en alrededor de  $7,5 \text{ dyn/cm}^2$  (Saroyan *et al.*, 1968; Saroyan, 1969). Esta adhesión inicial soporta una corriente de agua de  $186,4 \text{ cm/seg}$  ( $\approx 3,6$  nudos); luego se refuerza por un cemento adhesivo que no es esencial para alcanzar la adhesión permanente (Saroyan, 1968; Saroyan *et al.*, 1968). Según Walker (1981) la adhesión temporaria de las anténulas, cuando las cypris están buscando el lugar de asentamiento, es de  $4 \text{ kg/cm}^2$ ; en tanto que la magnitud de la fuerza máxima de adhesión están en el orden de 2 a 3 atm ( $2-3 \cdot 10^{-5} \text{ N.m}^{-2}$ ) (Yule y Crisp, 1983). El cemento inicial es líquido, luego se polimeriza y endurece. Yule y Walker (1987) encontraron una secreción antenular de naturaleza proteica durante la actividad exploratoria de la larva, lo que induciría el asentamiento de otras larvas.

Una vez que la cypris se fija, comienza la metamorfosis hacia la forma adulta, se despoja de su cutícula quitinosa y secreta un caparazón de placas calcáreas, frágiles y transparentes al principio, que se ajustan unas con otras formando un cono truncado. Las glándulas del cemento se mantienen en el adulto, están bien desarrolladas y funcionan en forma periódica (Saroyan, 1968). Se encuentran ubicadas en ambos bordes del manto, están constituidas por una red de túbulos que van creciendo con el animal y llenan el espacio entre el sustrato y la base. La base se cementa firmemente al sustrato por la sustancia adhesiva; se estima que la resistencia a la tracción del adhesivo de un cirripedio es alrededor de  $1/10$  de la que proporcionan productos epoxídicos comerciales (Walker y Yule, 1984). La tenacidad de cirripedios adheridos a un metal se estima es de  $2-4 \text{ kg/cm}^2$  (Cardarelli *et al.*, 1968).

La caracterización química de la secreción del adhesivo de los cirripedios fue objeto de estudio de los últimos 30 años. Se ha planteado la hipótesis que el mecanismo de endurecimiento se debería al entrecruzamiento aromático (Harris, 1946; Pyefinch, 1948; Walker, 1971; Crisp, 1972; Lindner, 1980; Lindner *et al.*, 1988) y que el adhesivo de los cirripedios estaría compuesto por un enlace proteína-quinona-proteína. Por otra parte, Naldrett (1993) sugirió que las quinonas no estarían presentes en el cemento y éste sería una mezcla de proteínas altamente hidrofóbicas que se unirían a través de residuos de cisteína, otorgándole resistencia a la degradación química y bacteriana. Recientemente, se ha propuesto que el cemento de los cirripedios está constituido en un 90% por un complejo multiproteico compuesto por seis proteínas entre las que se encuentra una enzima (Kamino, 2006). Estas proteínas

son nuevas y no poseen homologías con otras conocidas a excepción de la enzima. El cemento se sintetiza en la glándula del cemento de la cypris, se libera por exocitosis (Ödling *et al.*, 2006) y se transporta por medio de un conducto al espacio estrecho existente entre la placa basal y el sustrato. El espesor de la capa cementícea es sólo de unos pocos micrones (Kamino, 2008) y sus propiedades de resistencia y durabilidad son consideradas únicas en los ambientes acuáticos (Abbott, 1990). Las investigaciones sobre el cemento no sólo se focalizan hacia el control del “fouling”, sino también hacia el desarrollo de cementos similares en dureza y resistencia al agua para uso odontológico o soldadura de huesos fracturados.

La especie más estudiada desde el punto de vista de las incrustaciones y más frecuente tanto en puerto de Mar del Plata, en Puerto Belgrano como en la mayoría de los puertos del mundo es *Balanus amphitrite*. Otras especies del género como *B. trigonus* y *B. glandula* son también frecuentes en nuestras costas (Thiyagarajan y Qian, 2008).

Los anfípodos tubícolas representan otro grupo relevante de crustáceos del “fouling”. El más común en puerto de Mar del Plata y en Puerto Belgrano pertenecen al género *Corophium* cuyos habitáculos son cortos, formados por limo y arena y que favorecen los fenómenos de epibiosis. Entre los artrópodos también están incluidos los copépodos (*Tisbe*, *Paraltheuta minuta*), anfípodos (*Caprella* spp.), cangrejos (*Cyrtograpsus*) e isópodos (*Sphaeroma*) que, si bien son vágiles, juegan un rol importante en las relaciones tróficas de la comunidad incrustante.

Las colonias de briozoos, sean arborescentes o rastreras, son integrantes habituales de la comunidad (Ryland, 1965; Bastida y Bastida, 1980). Una característica importante de la fijación de los briozoos es que muchas especies prefieren asentarse sobre superficies con baja energía libre, es decir altamente hidrofóbicas (Loeb, 1977; Mihm *et al.*, 1981; Rittschof y Costlow, 1987, 1989) y por sustratos colonizados por determinados films bacterianos (Dobretsov y Qian, 2006). Algunas especies son resistentes a los tóxicos de las pinturas antifouling y sus colonias incrustantes pueden formar núcleos para el asentamiento de otros organismos (Wisely, 1962; 1963). Son integrantes habituales de la comunidad del “fouling” del puerto de Mar del Plata (*Bugula stolonifera*, *Bowerbankia gracilis*, *Conopeum* sp.) y de Puerto Belgrano (*Bugula neritina*, *B. stolonifera*, *Conopeum* sp., *Cryptosula pallasiana*) (Bastida y Bastida, 1980).

Las ascidias son animales marinos sésiles, de hábitos filtradores, que pueden vivir en forma solitaria o colonial (Millar, 1969). Una de sus principales características

es la presencia de una túnica de naturaleza química semejante a la celulosa. Habitan desde aguas costeras hasta grandes profundidades, siempre adheridas a sustratos duros. Entre las especies más comunes presentes en los puertos se encuentra *Ciona intestinalis*, ascidia solitaria que conserva grandes cantidades de agua en su interior lo que redundaría en un marcado incremento en el peso de la incrustación (Stoner, 1990). Se ha comprobado que ciertos films bacterianos son inhibidores de la fijación de ascidias solitarias como *C. intestinalis* y *Pyura praeputialis*, lo que ofrece la posibilidad de investigar este aspecto como probable metodología para su control (Zapata *et al.*, 2007).

Por otra parte, las ascidias coloniales se caracterizan por presentar zooides embebidos en una túnica común o bien individuos unidos por estolones basales. Las colonias son muy frecuentes y altamente perjudiciales dado que “tapizan” los sustratos generando zonas anóxicas por debajo de la colonia que favorecen los fenómenos de corrosión. Tanto las ascidias solitarias como las coloniales se encuentran presentes en ambas áreas de estudio.

### **Otros grupos**

Otros grupos frecuentes en el “fouling” son los gusanos planos (Platyhelminthes) y los cilíndricos (Nematoda) de vida libre que llegan a la comunidad generalmente por razones tróficas o buscando refugio.

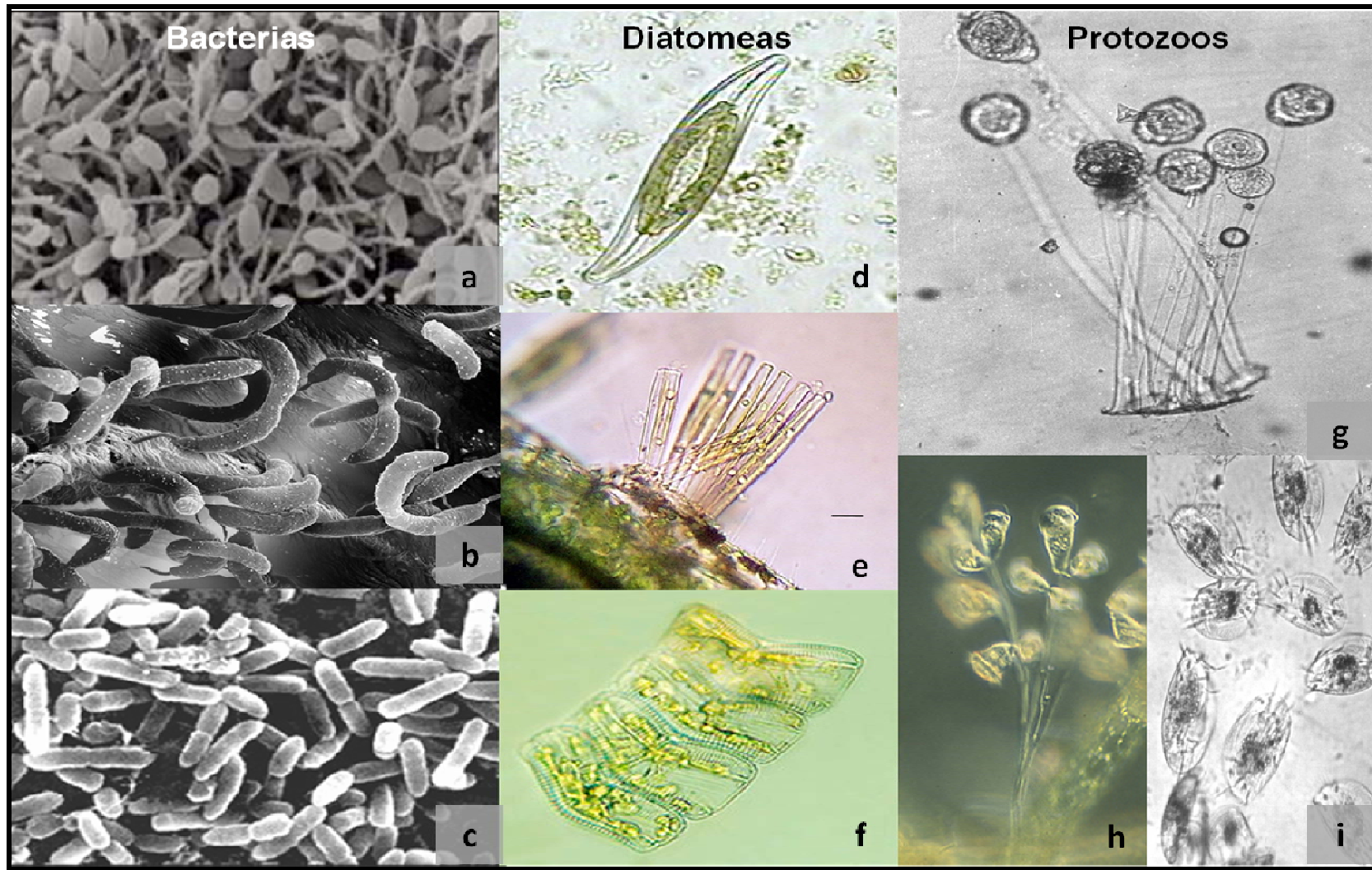


Figura 6. Microfouling del área del puerto de Mar del Plata. a- *Hyphomicrobium*, b- *Caulobacter*, c- *Pseudomonas*, d- *Pleurosigma*, e- *Synedra*, f- *Achnanthes*, g- *Vorticella*, h- *Zoothamnium*, i- *Euplotes*. (Figs. a, b y c tomadas de (<http://news.bbc.co.uk> , <http://www.bioblogia.com> y <http://www.cellalive.com>, respectivamente).



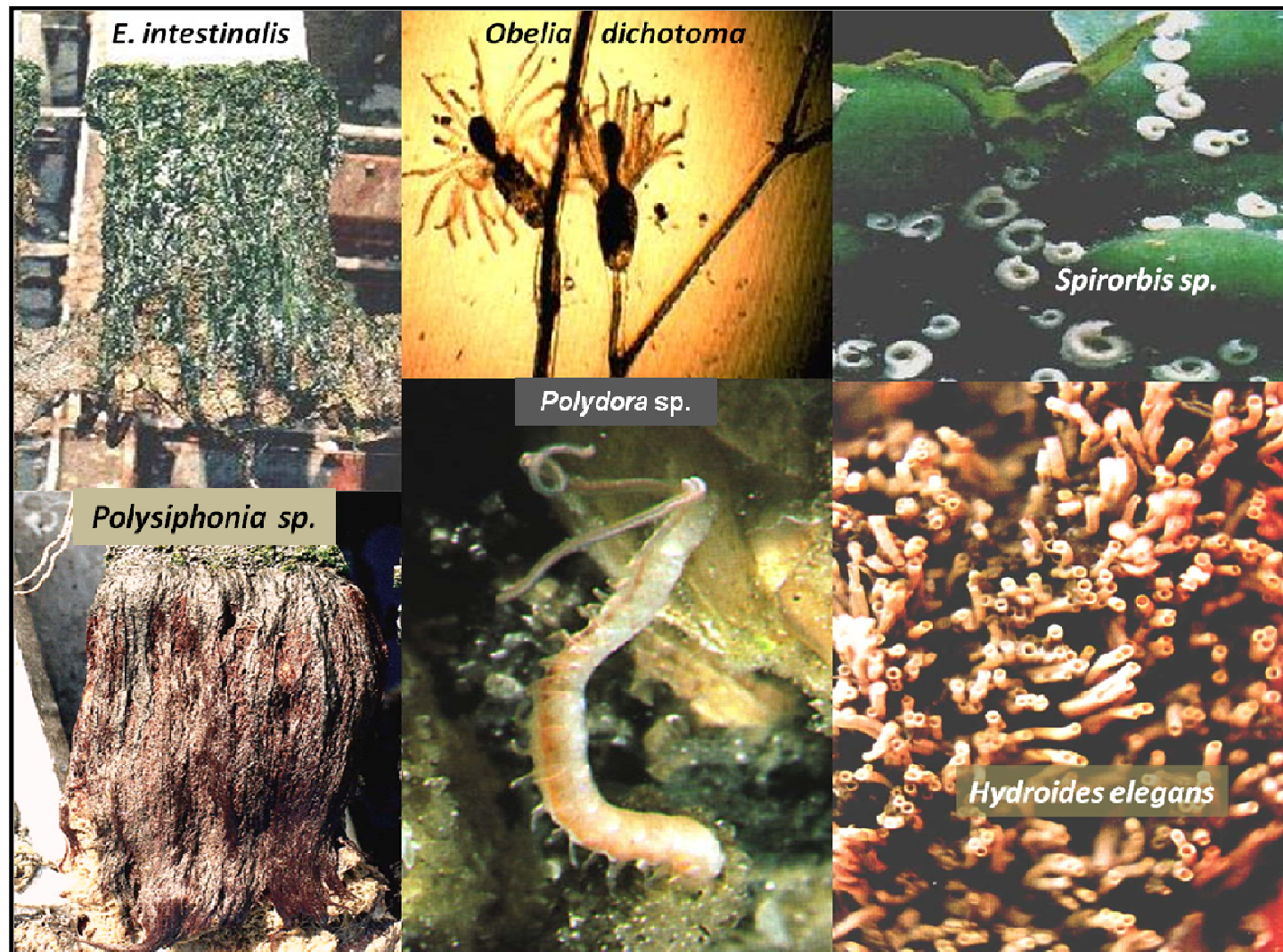


Figura 7. Especies del macrofouling del puerto de Mar del Plata.

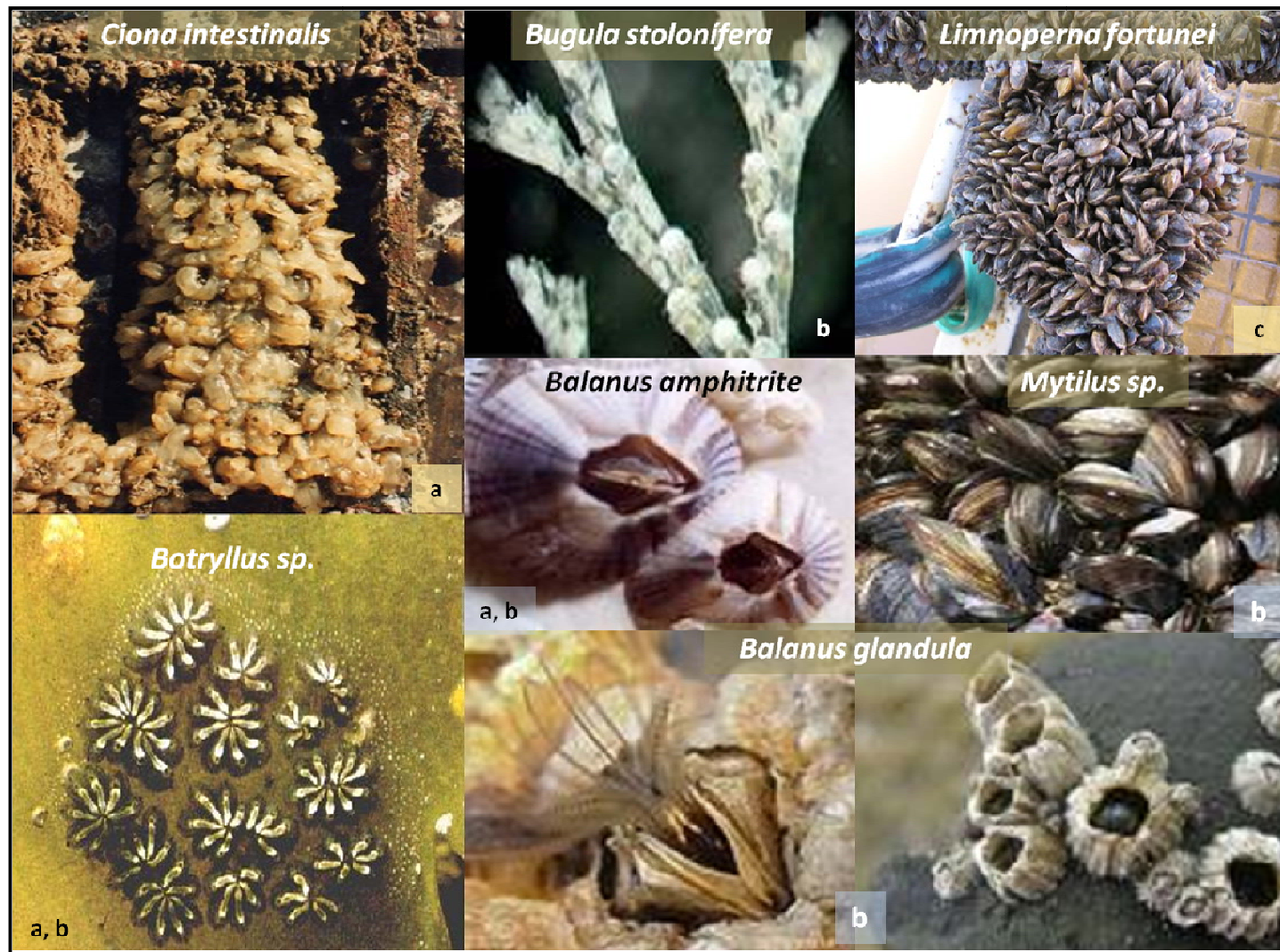


Figura 8. Especies del macrofouling. a) Puerto de Mar del Plata; b) Puerto Belgrano; c) Cuenca del Plata.  
 (*B. stolonifera* tomada de <http://research.calcademy.org> ; *B. glandula* tomada de [http:// www.dereilla.ca](http://www.dereilla.ca) ).



# Capítulo 2

## Materiales y métodos





## **Materiales y métodos**

Para realizar estudios sobre incrustaciones biológicas se necesitan ensayos de campo y de laboratorio, fundamentales para la obtención y evaluación de compuestos y para la incorporación a formulaciones antifouling.

### **Área de estudio**

El trabajo de campo se realizó en el puerto de Mar del Plata y Puerto Belgrano. Estas áreas fueron elegidas porque son los puertos de mayor actividad económica de la costa de la provincia de Buenos Aires y esta condición favorece el intenso tráfico de embarcaciones.

#### **1) Área portuaria de Mar del Plata**

El puerto de Mar del Plata es de ultramar y se encuentra situado al sur de Cabo Corrientes ( $38^{\circ} 08' S - 57^{\circ} 31' W$ ). Está dedicado fundamentalmente a la actividad pesquera y secundariamente al transporte de petróleo, de cereales y a la actividad turística.

Para la realización de este trabajo se obtuvieron muestras de plancton en las marinas del Club de Motonáutica (Fig. 9). Se utilizaron redes de plancton de 25 y 60  $\mu m$  y por arrastre horizontal se obtuvieron larvas de organismos incrustantes. Los adultos fueron obtenidos mediante un raspado con espátula, en el litoral rocoso y de los pilotes del Club de Motonáutica. Las muestras fueron colocadas en hielo y transportadas al Laboratorio.

Por otra parte se realizaron ensayos con pinturas antiincrustantes, para ello se utilizaron paneles de acrílico arenados y/o cerámicos de 8 cm x 16 cm que fueron suspendidos de las marinas del Club de Motonáutica. Se colocó una plomada a cada panel con el propósito de asegurar que la serie se mantenga en la misma posición durante toda la experiencia. Cabe señalar que se comprobó en ensayos realizados previamente que no existen diferencias significativas en la fijación ocurrida sobre ambos tipos de superficies (Capítoli, 1983).

Se sumergieron series de paneles inertes con el propósito de analizar el reclutamiento de especies. Los paneles se ubicaron entre 50 cm y 2 m de profundidad y fueron retirándose de a una serie por mes a lo largo del año. Se determinaron

abundancias relativas, porcentajes de cobertura y diversidad específica. Siempre se trabajó con réplicas y control.

Los muestreos se realizaron mensualmente entre los años 2001 y 2007.

## 2) Área portuaria de Puerto Belgrano

La Base Naval de Puerto Belgrano está situada en Punta Alta ( $38^{\circ}53' \text{ S}$  -  $62^{\circ}05' \text{ W}$ ) y funciona como un centro operativo de la Armada.

Para realizar ensayos de investigación antifouling en este ambiente se utilizó la balsa experimental del CIDEPINT (Figs. 10 y 11).

Se colocaron paneles en bastidores que fueron dispuestos en la balsa experimental en series de cuatro. Se sumergieron a distintas profundidades, en general desde la superficie hasta dos metros; los paneles de línea de flotación son los más superficiales y los paneles de carena, los tres más profundos. Con los datos obtenidos se determinan los ciclos de fijación y tendencias de reclutamiento. Se estimaron las abundancias relativas, porcentajes de cobertura y diversidad específica de los organismos asentados. Los muestreos en esta zona se realizaron cada tres meses, por cuestiones de índole económica entre los años 2001 y 2007.

## Cultivo de organismos incrustantes marinos en laboratorio

En el laboratorio del CIDEPINT se procedió a la selección de los estadios larvales de organismos obtenidos en las muestras de plancton. Se tomaron pequeños volúmenes de plancton y se aislaron las larvas por medio de pipetas Pasteur de 0,5 mm de diámetro, bajo microscopio binocular estereoscópico.

En todos los casos los recipientes se mantuvieron tapados para evitar la contaminación, depósito y evaporación.

La especies fueron determinadas y se aislaron nauplii V, VI y cypris de *Balanus amphitrite* (Cirripedia, Balanidae) y larvas de 15-16 setígeros (próximas a la etapa de fijación al sustrato) de *Polydora* sp. (Polychaeta, Spionidae).

Para realizar los ensayos de laboratorio, es necesario contar con un stock diario de larvas que permitan llevar a cabo las experiencias con un número adecuado de réplicas. Por otra parte es necesario disponer de agua de mar y alimento para los organismos; debido a que los ensayos se realizaron en La Plata, se trabajó con agua de mar artificial, se cultivaron algas y se criaron crustáceos (*Artemia salina*) para utilizarlos como alimento de larvas y adultos, respectivamente.

El agua de mar se preparó según la formulación de la Norma ASTM D1141/75, sin el agregado de metales pesados.

*Paso 1:* Preparación de la solución stock N°1:

MgCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	555,6 g
CaCl <sub>2</sub> (anhidro)	57,9 g
SrCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	2,1 g

Estas sales se disolvieron en agua destilada y se llevaron a 1000 mL

*Paso 2:* Preparación de la solución stock N° 2:

KCl	69,5 g
NaHCO <sub>3</sub>	20,1 g
KBr	10,0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,7 g
NaF	0,3 g

Estas sales se disolvieron en agua destilada y se llevaron a 1000 mL

*Paso 3:* Se disolvieron 245,34 g de NaCl y 40,94 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, en 8 a 9 litros de agua destilada. Se agregaron 200 mL de solución stock 1 y 100 mL de solución stock 2. Por último se diluyó la solución a 10 litros y se ajustó el pH al valor standard del agua de mar (~8,1-8,2).

En el laboratorio se dispusieron cuatro acuarios equipados con filtros plásticos y roca cuarcítica en el fondo, circulación del agua mediante filtros externos con lana de vidrio y carbón activado y oxigenación por medio de aireadores. Al agua se le adicionó azul de metileno (una gota por litro) como antiséptico y se incorporaron antibióticos de amplio espectro, cefalexina y rifampicina combinada con trimetoprima, para controlar la proliferación bacteriana, ya que actúan sobre una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Cabe señalar que fueron utilizados tal como se expenden con fines terapéuticos, es decir que no se les excluyeron los excipientes.

El agua se renovó cada 24 o 48 horas, extrayendo las larvas con una pipeta Pasteur y trasladándolas a agua de mar fresca. En algunas ocasiones este procedimiento se realizó por medio de placas filtrantes (N°2 y N°3), recipientes de

vidrio sinterizado con poros de tamaño pequeño. La frecuencia con que se renueva el agua de mar es un factor decisivo en la proliferación bacteriana, fúngica y de protozoos.

La temperatura de los acuarios se mantuvo constante  $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por medio de termostatos. Se ha enfatizado en este aspecto con el propósito de respetar los rangos de tolerancia de cada especie y lograr condiciones aptas para la cría, ya que la temperatura afecta el desarrollo de los organismos, en su metabolismo, en sus funciones vitales y en su crecimiento.

La salinidad del agua de mar mantuvo un valor constante, fue calculada por el método de Knudsen (Margalef, 1974) y alcanzó 33,097 ‰, valor considerado normal para las aguas costeras del sector de Mar del Plata (Boltovskoy, 1970; 1981). La conductividad se controló con un conductrímeter y el valor osciló alrededor de 55 mS. La clorinidad y clorosidad fueron estimadas en 18,32 g/kg y 18,60 g/L, respectivamente. El valor de pH se ajustó en 8,1-8,2 con un pH-metro.

Por otra parte se preparó alimento para las larvas; entre los más recomendables se encuentran los cultivos de diatomeas.

Se cultivó *Skeletonema costatum* en el laboratorio, para ello se aislaron diatomeas del plancton con pipeta Pasteur y se colocaron en Erlenmeyers de 1000 mL con agua de mar artificial. Se adicionaron 50 mL de medio nutritivo de Føyn-Erdschreiber (modificado) y se burbujeó aire mediante aireadores para acuario, este último procedimiento se realizó con el fin de mantener las diatomeas en suspensión, proveer dióxido de carbono y conservar la estabilidad del pH. El conteo de las diatomeas se llevó a cabo por medio de una cámara de Neubauer, estableciéndose así el momento adecuado para la realización de los repiques.

El medio nutritivo de Føyn-Erdschreiber (“extracto de tierra de jardín”), se obtuvo mezclando 50% en volumen de tierra negra con 50% de agua destilada. Esta mezcla fue colocada en autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$ , entre 15 y 20 minutos, se dejó reposar durante 2 o 3 días y se filtró a través de papel S&S 589 Black Ribbon. Posteriormente se volvió a colocar en autoclave y se le adicionaron sales: 0,2 g de  $\text{NaNO}_3$  y 0,03 g de  $\text{NaPO}_4\text{H}_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  por cada 50 mL de extracto de tierra.

Sin embargo, ante una densidad insuficiente o bien la ausencia de determinadas especies que por su tamaño y valor energético son las más adecuadas, fue necesario recurrir a otras fuentes de alimento con el fin de evitar que las larvas comenzaran a disminuir en número por inanición.

Por esta razón, se utilizó alimento balanceado en escamas para peces de venta comercial que contiene harina de pescado, hígado, albúmina, caseína, levadura, germen de trigo, algas marinas y distintos cereales y que, químicamente, representan 35% de proteínas, 3% de grasas y 8% de fibras; como complemento se le adicionaron vitaminas H y B<sub>12</sub>.

Este alimento balanceado fue molido finamente en un mortero, disuelto en agua de mar artificial, homogeneizado y posteriormente filtrado con papel.

Los cirripedios adultos se alimentaron con *Artemia salina*, las larvas fueron criadas en ampollas de decantación a partir de huevos de venta comercial puestos en agua de mar artificial y con aireación suficiente. Al cabo de 18 o 20 horas nacen las larvas que pueden ser obtenidas fácilmente mediante la apertura del robinete de la ampolla de decantación ya que los huevos, de menor densidad, quedan flotando en la superficie.

Una vez acondicionados los acuarios, los vasos de precipitado y controlados los factores abióticos se llevó a cabo la cría de larvas y de adultos de cirripedios y poliquetos.

Para la cría de larvas de cirripedios se separaron las nauplii de *Balanus* spp. de las muestras de plancton, que fueron identificadas por su caparazón triangular, las prolongaciones cefálicas o “cuernos” frontolaterales y el ojo nauplius, mancha característica dorsal y única. Las cypris, se identificaron por la forma hidrodinámica del caparazón, la presencia de dos valvas quitinosas y la posición posterior de los apéndices. Dado lo dificultoso que resulta la identificación de cada uno de los seis estadios naupliares previos al estadio cypris, se realizó una primera selección aislando larvas del estadio VI (que fueron fácilmente reconocibles por la presencia de tres manchas oculares) y por otro lado nauplii de estadios menos avanzados. Las claves provistas para identificación de larvas de cirripedios (estadios naupliares) están basadas en caracteres de difícil visualización (Bassindale, 1936).

Las larvas de Spionidae (Polychaeta), se determinaron rápidamente por la presencia de mechones de setas característicos y la metamerización. Se observó el número de segmentos y el desarrollo de los cuernos frontales (“frontal horns”) lo que permitió determinar la etapa próxima al asentamiento al sustrato, es decir estadio de 15-16 setígeros.

Las larvas nauplii de cirripedio, como las de los poliquetos son fototácticas positivas, esta característica permitió capturarlas con pipeta Pasteur colocando una luz puntual en el recipiente.

Tanto las larvas liberadas por los adultos como las extraídas directamente del plancton fueron controladas diariamente; se les adicionó alimento y se renovó parte del agua de mar, eliminándose las mudas y larvas muertas. Se mantuvieron en cámara de cultivo a temperatura constante (20°C) y fotoperíodo controlado. Cada larva dispuso de un volumen de al menos un mililitro, como se sugiere en la bibliografía (Desai y Anil, 2004).

Para la cría de adultos de *Balanus* spp., fueron colocados en acuarios con agua de mar artificial y se alimentaron cada dos días con 200 mL de cultivo de larvas de *Artemia salina* de densidad 7-8 nauplii/mL. Una vez por semana se renovó la mitad del agua; periódicamente se retiraron las masas ovígeras y larvas liberadas por los adultos que fueron separadas en cristalizadores. Se mantuvieron en cámara de cultivo a temperatura constante y fotoperíodo controlado. A partir de estos huevos maduros se obtuvieron estadios nauplii que sufrieron metamorfosis hasta llegar al estadio cypris (último estadio larval), donde se asienta a un sustrato, completa la metamorfosis y pasa al estadio juvenil.

La disponibilidad de individuos adultos en laboratorio permite ensayar con poblaciones de nauplii nacidas en el mismo momento y que sufren metamorfosis en forma prácticamente simultánea. Por ejemplo, uno de los ensayos clásicos de toxicidad se lleva a cabo con nauplii II que son obtenidas alrededor de 30 minutos después de la metamorfosis de las nauplii I eclosionadas a partir de masas ovígeras.

Para analizar el crecimiento de los juveniles fijados en el laboratorio se midió el diámetro de la base periódicamente utilizando un ocular micrométrico. La edad (en días) y el tamaño de la base (en mm) fueron utilizados para estimar el crecimiento diario, se aplicó el T- test para estimar diferencias entre dos tipos de agua utilizadas: agua de mar natural y agua de mar artificial, ambas sin adicionar aireación.

Para la cría de adultos de *Polydora* sp. se utilizaron acuarios con una circulación de agua constante, suficiente aireación y arena de grano fino (entre 88 y 149  $\mu$ m de diámetro), que fue provista para la construcción de los habitáculos. No se agregaron filtros ni roca cuarcítica.

## Metodología para los ensayos con distintos compuestos en laboratorio

Los ensayos de laboratorio se llevaron a cabo con larvas y/o adultos de organismos incrustantes marinos obtenidos en las áreas de muestreo, a los que se les practicaron los tests de toxicidad y de asentamiento. En todos los casos se trabajó con réplicas y controles.

El *Test de toxicidad* es uno de los índices más utilizados para ensayos de exposición a determinadas sustancias. El índice  $LC_{50}$  está referido a la concentración letal que afecta al 50% de la población analizada, en tanto que el  $Lt_{50}$  se refiere al tiempo letal de exposición a un compuesto necesario para afectar al 50% de la población. Se utilizan dependiendo del objetivo, tomando en consideración la variable “tiempo” o “concentración” como constante.

Es interesante destacar que estos índices consideran a los individuos afectados como muertos, de esta forma no reflejan los resultados hallados en esta serie de experiencias. Por ello, se ha propuesto un nuevo índice para evaluar el efecto de un compuesto sobre la actividad larval, es el índice  $It_{50}$  que indica el período de tiempo necesario para lograr la inactividad del 50% de la población analizada; el índice se aplica cuando los individuos afectados logran recuperarse en agua limpia luego de la exposición al compuesto en estudio, es decir cuando el efecto observado no es letal (o permanente) sino transitorio.

El test de toxicidad a tiempo constante, que es el aplicado en la mayoría de las experiencias de este trabajo, se realizó exponiendo un número conocido de larvas a distintas concentraciones del compuesto y en distintos períodos de tiempo, corrientemente en 24, 48 o 96 horas, posteriormente se contabilizan los individuos inactivos, que pueden estar muertos o narcotizados. Para considerar el efecto del compuesto sobre las larvas se tuvo en cuenta la respuesta fototáctica y la capacidad de permanecer en la columna de agua (Wu *et al.*, 1997).

Con el propósito de conocer e interpretar el comportamiento de las larvas durante el primer contacto con las soluciones del compuesto a analizar, se registró la toxicidad para los primeros 60 minutos de exposición, con observaciones con intervalos de 15 minutos. Este test no es comúnmente aplicado pero nos permite simular y analizar el comportamiento de una larva en el mar en contacto con una interface sustrato pintado con distintas concentraciones de tóxico y el agua de mar.

El *Test de asentamiento*, se realizó con larvas en estadios próximos a la etapa de fijación al sustrato expuestas a soluciones de concentración creciente del

compuesto a analizar. Las larvas se mantuvieron a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  y, pasado el tiempo establecido (24 o 48 horas), se contabilizó el número de individuos fijados y el número de individuos no fijados (ya sea inactivos o muertos) determinándose la concentración inhibitoria para el 50% o 100% de la población.

Para evaluar el efecto antifouling de los compuestos sobre las larvas se tuvieron en cuenta la movilidad, el mantenimiento de los apéndices extendidos y la respuesta cuando son rozadas con una pipeta (Hellio *et al.*, 2004).

La estimación de la fijación de organismos sobre paneles expuestos con o sin formulaciones de pinturas en el mar se evaluó por medio de una grilla donde se eligieron 25 puntos al azar (generados por un software) y se registró la abundancia para cada especie del macro y del microfouling, para este último caso se tomaron tres muestras de cada celda y se observaron bajo microscopio óptico. Se utilizó la tabla de abundancias relativas: R=0-25%, E=26-50%, F=51-75%, A=76-100%.

Esta es la metodología general utilizada en este trabajo, en el tratamiento de los distintos ensayos se explicitará cada una de las utilizadas ad-hoc, para el tratamiento de cada tema.





Figura 9. Área de muestreo en el puerto de Mar del Plata.

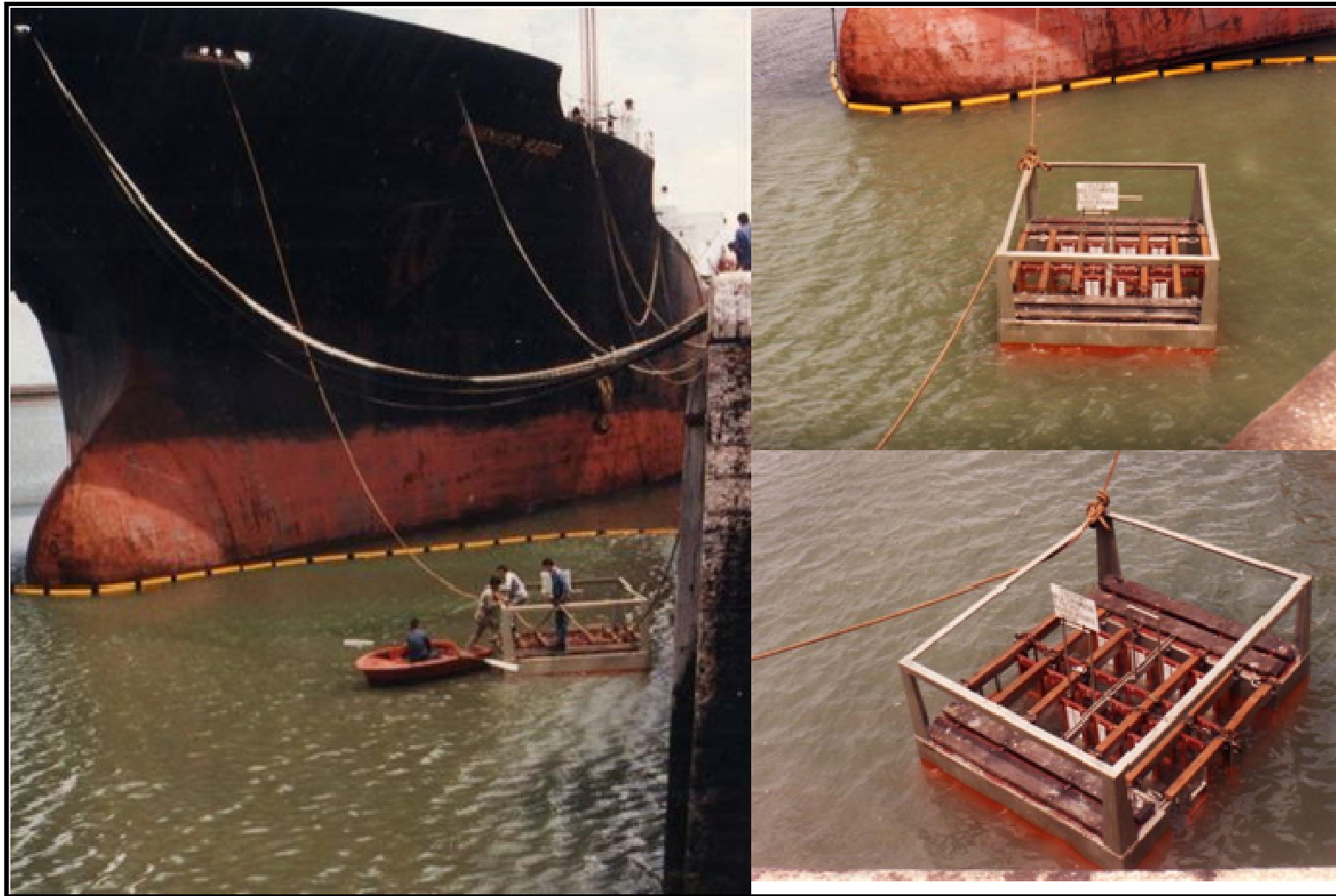


Figura 10. Vista de la balsa experimental del CIDEPINT en Puerto Belgrano.





Figura 11. Detalle de la balsa experimental del CIDEPINT en Puerto Belgrano.

# Capítulo 3

## Ensayos de cría de larvas en laboratorio



## **Ensayos de cría de larvas en laboratorio**

Para realizar ensayos con pigmentos y pinturas antiincrustantes es necesario cultivar organismos en laboratorio a fin de disponer de un stock diario de larvas y adultos. Se llevaron a cabo distintas experiencias relacionadas con la cría en laboratorio siguiendo la metodología propuesta anteriormente. Estos ensayos apuntan a estimar porcentajes de éxito en la metamorfosis y en el asentamiento larval ante diferentes condiciones.

### **Objetivos**

Los objetivos propuestos son la cría en el laboratorio de *Balanus amphitrite* a partir de larvas del plancton colectado en Mar del Plata y de adultos criados en laboratorio y posteriormente determinar las preferencias en el asentamiento, en relación con texturas y orientación del sustrato.

### **Cría en laboratorio de *Balanus amphitrite***

Las experiencias de cría en laboratorio se realizan con larvas del plancton colectado en Mar del Plata y con las obtenidas de los adultos colectados en los mismos muestreos y mantenidos en laboratorio.

Con las larvas del plancton, se completó el ciclo de vida pasando por los distintos estadios larvales hasta la fase juvenil y adulta. Se comprobó que la cantidad de larvas varía considerablemente a lo largo del año, observándose las mayores densidades en verano.

Se registró que la supervivencia entre el estadio nauplius II y el juvenil (organismo fijado) fue entre el 11 y 14%, lo que indica una alta mortalidad entre los distintos estadios larvales. Se observó que en el último estadio naupliar (nauplii VI) el porcentaje de supervivencia se incrementa alcanzando el estadio cypris alrededor del 30% de la población.

Las cypris pasan de la etapa nadadora a la de inspección del sustrato, el tiempo que emplea en la exploración y elección de la superficie para adherirse influye directamente en los porcentajes de éxito en la metamorfosis a juvenil, ya que en esa búsqueda consume las reservas energéticas y debe ubicar un sitio propicio rápidamente.

Las cypris obtenidas fueron colocadas en tres cápsulas de Petri a fin de ofrecer un sustrato adecuado para fijarse y facilitar su seguimiento bajo lupa. El porcentaje de fijación fue similar al obtenido con cypris **tomadas directamente del plancton** ya que el 47,77% completó la metamorfosis a juvenil. La supervivencia de las cypris en la etapa post-fijación osciló entre el 15 y 38% (Tabla 2).

Los adultos se mantuvieron en el laboratorio durante siete meses y todos lograron alcanzar la madurez sexual, se observaron cópulas, liberación de masas ovígeras y mudas cada 2-3 días.

Tabla 2. Porcentajes de fijación de cypris en el laboratorio, criadas a partir del estadio nauplii II del plancton de Mar del Plata.

	cypris nadadoras	cypris fijadas		adultos vivos 2 meses		adultos vivos 7 meses	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Cáps. 1</b>	60	34	56,66	19	55,88	13	38,23
<b>Cáps. 2</b>	48	20	41,66	9	45,00	7	14,58
<b>Cáps. 3</b>	49	27	57,10	6	22,22	5	18,51

Paralelamente, se completó en laboratorio el ciclo de vida desde nauplius hasta la etapa juvenil a partir de cirripedios adultos. Los porcentajes de supervivencia fueron similares a los obtenidos con las larvas del plancton y oscilaron entre 9 y 12% pero los adultos sólo se mantuvieron durante cuatro meses (Tabla 3, Fig. 12).

Tabla 3. Porcentajes de fijación de cypris criadas bajo condiciones de laboratorio desde el estadio nauplii I.

	cypris nadadoras	cypris fijadas		adultos vivos (4 meses)	
		Nº	%	Nº	%
<b>Cáps. 1</b>	40	15	37,5	10	66,66
<b>Cáps. 2</b>	26	12	46,15	9	75
<b>Cáps. 3</b>	25	8	32	6	75



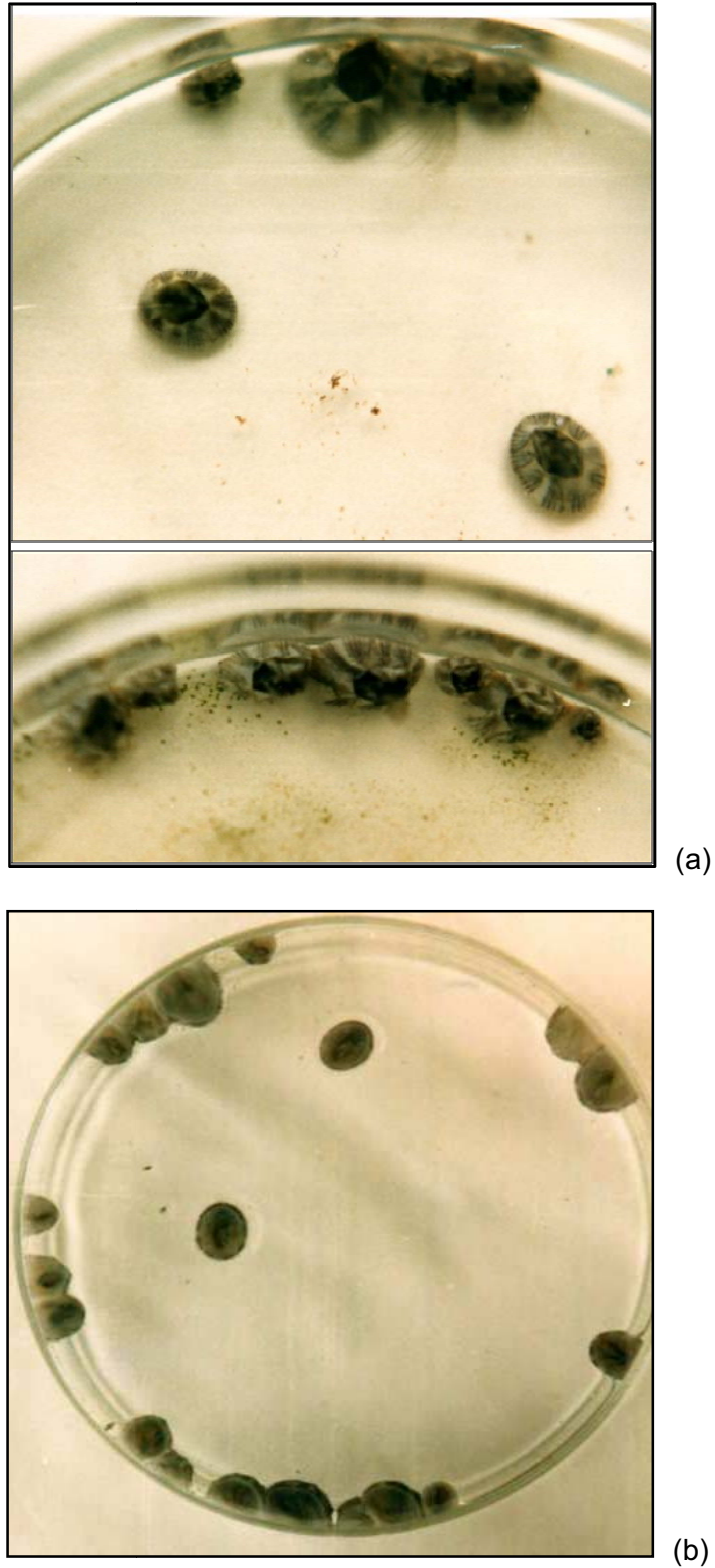


Figura 12. *Balanus amphitrite* asentados sobre cápsulas de Petri.  
(a) Vista superior, (b) vista inferior.

En el proceso de cría de *B. amphitrite* que es una especie hermafrodita de fecundación cruzada e interna, se controló diariamente la supervivencia de los adultos,

se removieron las heces y las mudas y se observó, por transparencia, la presencia de lamelas ovígeras maduras.

A los dos meses de asentamiento se registraron huevos maduros en el interior de un cirripedio y fueron liberados mediante movimientos lentos de los cirros, en grupos de aproximadamente 50 huevos por vez y también se liberaron acompañando la muda (Fig. 13). Cuando las lamelas ovígeras se desprenden en forma completa son arriñonadas u ovals y generalmente inmaduras, no poseen ojo naupliar, carecen de bordes nítidos entre los huevos y tienen una coloración marcadamente blanca. A las 24 horas de expulsión y mantenidas a 20°C, las lamelas se abren y algunos huevos se separan, el resto de la masa queda cementada pero comienzan a hacerse visibles los límites entre los huevos. A las 72 horas, los huevos se individualizan fácilmente, son transparentes en los bordes, opacos en la región central y aparece el ojo naupliar. A los 7 días, los huevos tienen una coloración rosada y eclosionan las nauplii. Esta secuencia se observa en aquellos casos en que la liberación se produce en forma de lamelas enteras e inmaduras; cuando la liberación se realiza en pequeñas masas, los huevos tienen un grado de madurez mayor y la eclosión de las nauplii ocurre en 24-48 horas a 20°C.



Figura 13. Mudas. En la parte superior se observa la muda de cirros y pene, en la parte inferior la masa de huevos inmaduros.



El tamaño de los huevos aumenta a medida que avanza la maduración y la eclosión. Las medidas promedio de huevos (n=1000) tomadas con ocular micrométrico se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Medidas de huevos de *Balanus amphitrite*.

	<b>largo</b>	<b>ancho</b>
<b>Huevos inmaduros (sin ojo nauplius visible)</b>	130-160 $\mu\text{m}$	75-110 $\mu\text{m}$
<b>Huevos maduros (con ojo nauplius visible)</b>	140-190 $\mu\text{m}$	90-120 $\mu\text{m}$

Los huevos liberados caen al fondo del recipiente de cultivo; estas masas son entonces removidas para evitar la ingestión por parte de los adultos y colocadas en cristalizadores en agua de mar en cámara de cultivo.

Las nauplii eclosionadas de los huevos nadan activamente y son fototácticas positivas. La recolección de las nauplii se realizó fácilmente con la colocación de una fuente luminosa en la interface aire/agua de mar, se aislaron con pipeta Pasteur y finalmente se colocaron en cámara de cultivo a 20°C. El ciclo de vida de *B. amphitrite* se presenta en la Fig. 14.

En la Tabla 5 se observa el tamaño de las nauplii del primer estadio y de las cypris obtenidas en laboratorio.

Tabla 5. Medidas promedio de nauplii I y cypris obtenidas de la cría en laboratorio (en  $\mu\text{m}$ ).

	<b>nauplii (n=1000)</b>		<b>cypris (n=100)</b>
	con espina caudal	sin espina caudal	
largo	182	172	470
ancho	130	86,4	230

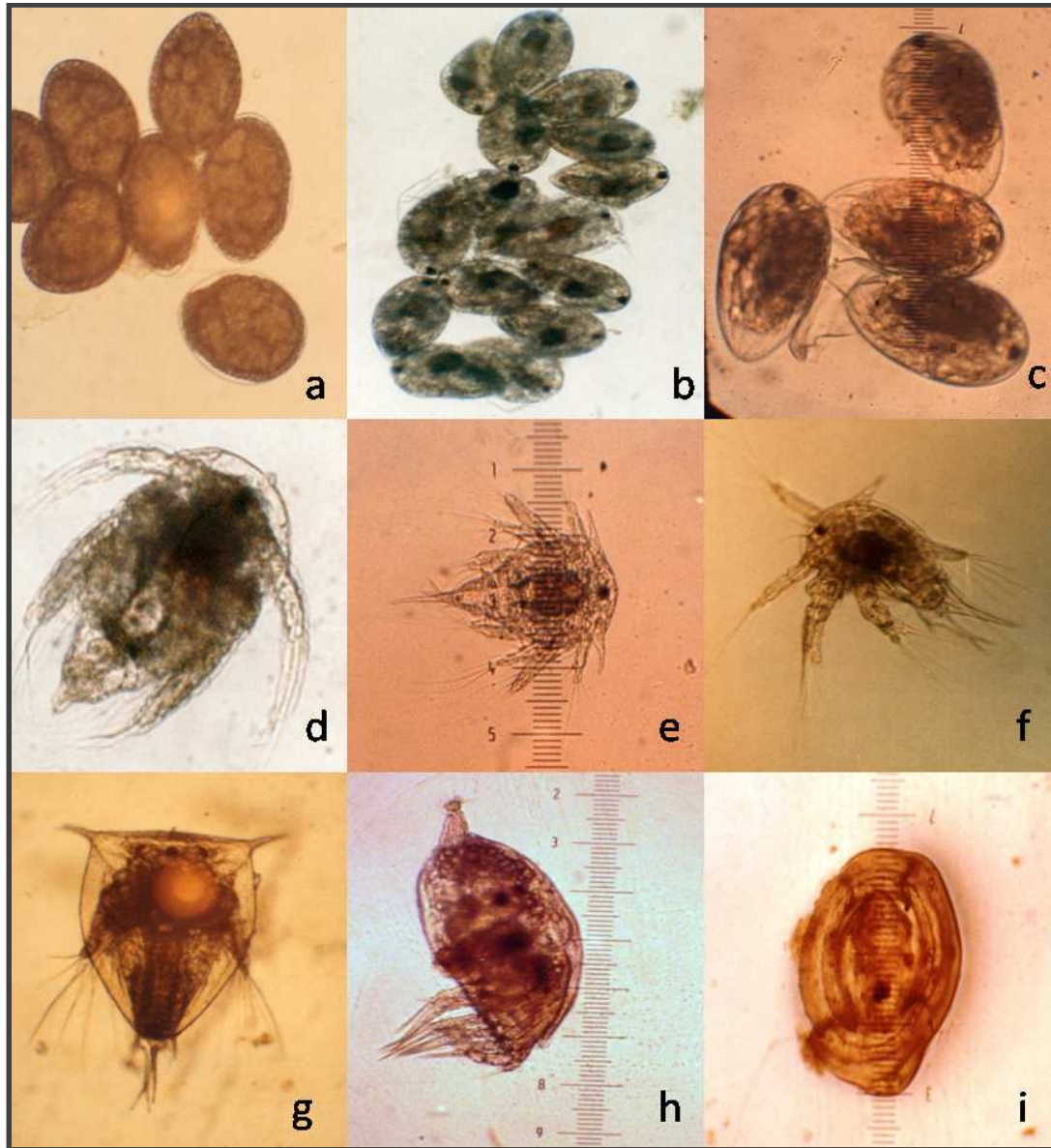


Figura 14. Ciclo de vida de *Balanus amphitrite*. a-huevos inmaduros (150x); b-huevos maduros (7x); c- detalle de huevos maduros (100x); d-nauplius I (200x); e-nauplius II (100X); f-nauplius IV (100x); g-nauplius VI (60x); h- cypris (100x); i- juvenil (100x).

### Crecimiento de adultos de *Balanus amphitrite*

Se registraron las medidas del diámetro de la base de 33 *B. amphitrite* fijados en laboratorio durante 55 días. A fin de ordenar los datos obtenidos se realizaron curvas con individuos agrupados según el diámetro inicial de su base (tiempo= 2 días). Se graficaron los diámetros comprendidos entre 0,5 mm y 3 mm tomados a intervalos de 0,5 mm. Los cirripedios crecieron libremente, sus bases se desarrollaron en forma circular, sin las distorsiones que se observan por efecto del apiñamiento ('crowding') característico de la especie cuando se encuentra asentada en lugares reducidos, esto permitió realizar las mediciones sin mayores dificultades. Al cabo de 55 días de cultivo se registró un individuo de 4,5 mm de diámetro de base resultando el más grande de los criados en laboratorio.

Se determinó la actividad de los cirros de los individuos, contabilizando el número de batidos por minuto en presencia de alimento (*Artemia salina*) y se estimó un promedio que resultó de 80 batidos/minuto, que es el número de movimientos considerados 'normal' para individuos recién fijados (Geierman, 2007). Los datos de crecimiento se presentan en la Tabla 6 y Fig. 15.

Tabla 6. Diámetro de la base (en mm) de *Balanus amphitrite*, velocidad de crecimiento inicial y final.

diámetro de la base (mm)	$\langle V_i \rangle$ (mm / d)	$\langle V_f \rangle$ (mm/d)
0,5	0,03	0,004
1,0	0,05	0,01
1,5	0,04	0,006
2,0	0,06	0,007
2,5	0,04	0
3,0	0,09	0,005

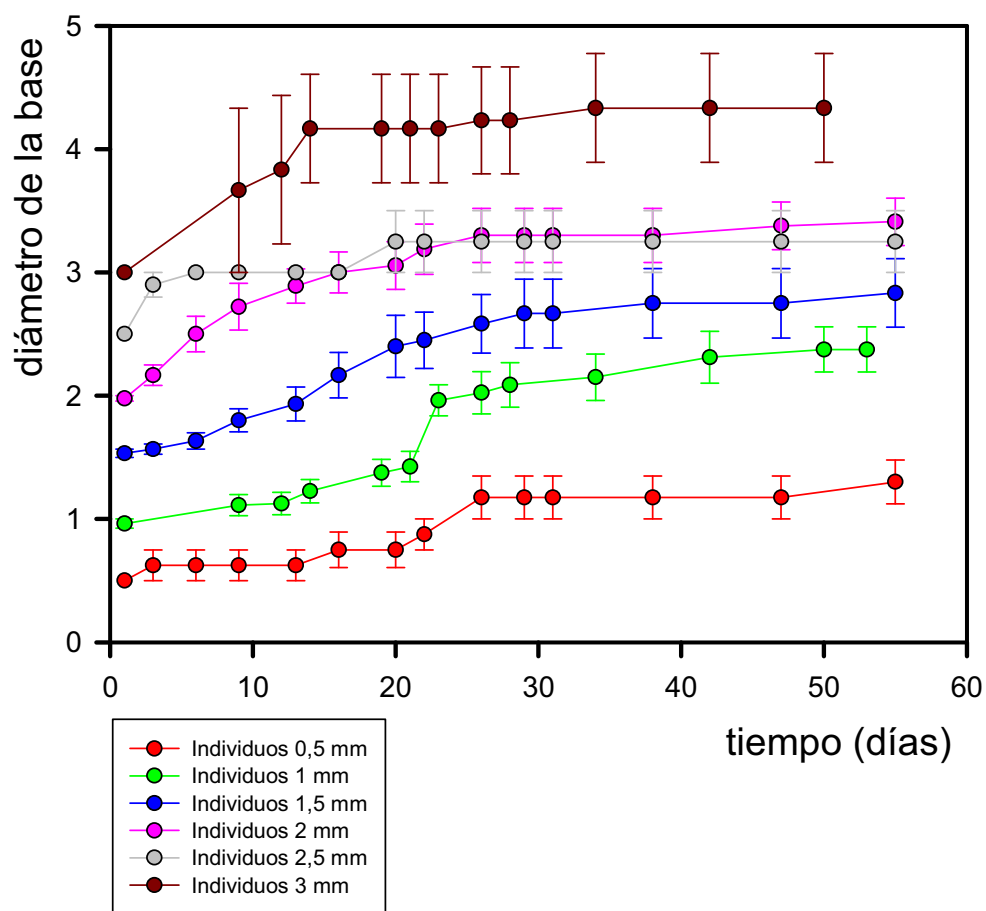


Figura 15. Diámetro de la base (en mm) de *Balanus amphitrite* criados en laboratorio en función del tiempo.

Para estimar las velocidades de crecimiento promedio inicial y final ( $V_i$  y  $V_f$ , respectivamente) se tomaron tres puntos: el primer punto de la curva ( $t=2$  días), el punto en el que cambia la pendiente de la curva formándose una meseta y el punto final ( $t=55$  días). Los resultados indican que, en general, aquellos individuos que en la primera medición del diámetro basal mostraron un tamaño mayor mantuvieron una velocidad de crecimiento promedio inicial también mayor; por otra parte, la velocidad de crecimiento en la meseta fue mucho más lenta, siendo para la mayoría de los casos un orden de magnitud menor.

Las diferencias encontradas en los diámetros de la base para distintos individuos en idénticos períodos de tiempo podrían estar relacionadas con una desigual disponibilidad de alimento como consecuencia de las condiciones estáticas de la masa de agua. Dado que la experiencia se realizó sin la incorporación de aireadores, el alimento no se distribuyó en forma uniforme, lo que resultó en velocidades de crecimiento desiguales.

### **Cría de *Polydora* sp.**

La cría de esta especie no ofreció dificultades, se obtuvieron los estadios larvales a partir de larvas trocóforas. Las larvas de tres setígeros poseen un largo aproximado entre 150 y 300  $\mu\text{m}$ , son de aspecto globoso o alargado con una porción anterior que se desarrollará en prostomio y una posterior que originará el pigidio en las formas adultas. En cuanto a la larva de siete segmentos, presenta un aspecto netamente alargado y mide alrededor de 300  $\mu\text{m}$ . La larva de 15-16 setígeros, que es el estadio próximo a la fijación al sustrato, posee un largo de 1200  $\mu\text{m}$  y es fácilmente distinguible por sus palpos bien desarrollados.

### *Construcción del tubo*

El inicio de la fase bentónica se asocia con la construcción de los tubos para lo cual *Polydora* sp. secreta mucus a través de glándulas ubicadas en el surco ciliar de sus palpos; el comienzo de la construcción del tubo se realiza cuando el poliqueto une los extremos de un hilo de mucus con material circundante adherido (areniscas, limo) formando el primer anillo. El proceso continúa con la adhesión de nuevas partículas con la ayuda de uno o ambos palpos dependiendo del tamaño del grano, el palpo ejerce presión y la secreción mucosa permite la adhesión del material. Los palpos se disponen formando un ángulo y de este modo la partícula comienza a deslizarse hacia la abertura oral donde es cementada al tubo en formación, una vez completado este mecanismo, los palpos nuevamente se estiran y alcanzan una nueva partícula. La vida adulta del poliqueto se desarrolla en el interior del tubo, generalmente resultan visibles, además de los palpos, los primeros dos o tres segmentos del soma (Figs. 16 y 17). Los tubos pueden poseer ramificaciones y alcanzar una longitud mucho mayor que la del propio organismo que, si es molestado (por ejemplo, cuando se lo toca con una pinza) puede abandonarlo pero, al cabo de poco tiempo, comienza la construcción de un habitáculo nuevo. Un mismo tubo puede ser ocupado por más de un individuo.

En las experiencias de laboratorio utilizando granos de arena de distinta granulometría se observó una preferencia por las partículas entre 88 y 149  $\mu\text{m}$  de diámetro, para construir los tubos. Sólo excepcionalmente los poliquetos pueden emerger del tubo, cuando las partículas seleccionadas son muy grandes y necesita ejercer una fuerza mayor para lograr deslizar el material. El mecanismo descrito para la adquisición de partículas es válido también para la captura del alimento.



Figura 16. Izq.: *Polydora* sp., vista general; derecha: saliendo del tubo (100X).



Figura 17. Detalle del extremo anterior de *Polydora* sp. se individualizan los palpos y se distinguen las setas modificadas del quinto setígero (característica del género) (150X).

## Bioensayos con cypris de *Balanus amphitrite* para estimar preferencias en el asentamiento

Con el propósito de estimar preferencias por las características superficiales en el momento de la adhesión de las larvas, se experimentó con sustratos de distinta naturaleza química (vidrio y plástico) y distintas texturas. Para testear la preferencia por la naturaleza química del sustrato, se dispusieron tres recipientes con iguales superficies disponibles (en cm<sup>2</sup>) de vidrio y de plástico, con superficies lisas. Para evaluar la preferencia por la posición del sustrato se dispusieron tres recipientes de vidrio y tres de plástico; se considera el fondo como sustrato horizontal, la pared como sustrato vertical y la intersección al ángulo formado entre el fondo y la pared vertical.

Para evaluar la preferencia por la iluminación y textura del plástico, se dispusieron tres recipientes con un plástico inclinado a 45° que presenta tres bandas de rugosidades distintas (liso, grueso y fino) desde la superficie al fondo. Los recipientes fueron colocados en cámara de cultivo con luz fluorescente proveniente de la parte superior, de manera que se logró, para cada superficie, una cara iluminada y otra oscura.

Por último para evaluar la preferencia por textura en el vidrio, se dispusieron tres recipientes de vidrio que ofrecen una mitad de la superficie disponible lisa y la otra mitad esmerilada (tratada con carborundum). La rugosidad de las superficies estudiadas se estimó por medio de un rugosímetro Hommel Tester P-3 n-z, con graficador (Tabla 7).

Tabla 7. Rugosidad de los sustratos estudiados.

sustrato		rugosidad R(μm)
plástico	fino	60
	grueso	200
	"liso"	4,54
vidrio	tratado con carborundum	14,9
	"liso"	0,09

En cada recipiente se incorporaron 40 cypris de *B. amphitrite* y las experiencias se realizaron por triplicado, durante siete días.

## Resultados de preferencias de asentamiento

Se determinó que la actividad exploratoria de las cypris incluye tres etapas: una exploración amplia a gran escala donde la larva “camina” apoyándose en sus anténulas con “pasos” largos recorriendo un trayecto casi recto, otra exploración cercana, con “pasos” cortos y cambios de dirección frecuentes en los que sondea micrositios y finalmente, la etapa de inspección que precede a la adhesión y metamorfosis.

Respecto de la naturaleza química del sustrato para la fijación de las larvas se observó una clara preferencia de las cypris por el vidrio, que fue corroborada por aplicación del T-test para comparación de medias (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de fijación obtenidos por recipiente sobre distintos sustratos y Test de “t”.

naturaleza del sustrato	% fijación		
	1	2	3
vidrio	86,66	67,65	71,78
plástico	13,33	32,35	28,24

T-tests; Grouping: nat sustr (Spreadsheet1)											
Group 1: 1											
Group 2: 2											
Variable	Mean 1	Mean 2	t-value	df	p	Valid N 1	Valid N 2	Std.Dev. 1	Std.Dev. 2	F-ratio Variances	p Variances
% fij	75,3633	24,6400	6,21021	4	0,00342	3	3	9,99876	10,0080	1,00184	0,99907

En cuanto a la preferencia por la posición del sustrato, es conocido que la orientación del sustrato es una condición importante en el momento de seleccionar el lugar de asentamiento. El análisis estadístico se realizó comprobando en principio la normalidad de la distribución de datos por medio de la prueba Shapiro-Wilks y luego aplicando el test de ANOVA. Los resultados indican que existen diferencias significativas en la fijación obtenida en cada sustrato según la orientación ofrecida; por medio del test de comparación de Tukey se observa que el lugar preferido es la intersección entre la pared vertical y horizontal independientemente de la naturaleza del sustrato (vidrio o plástico) (Tabla 9).



Tabla 9. Porcentajes de fijación por recipiente y por orientación del sustrato.

Exp.	vidrio			plástico		
	intersección	horizontal	vertical	intersección	horizontal	vertical
1	64,16	2	33,84	67,51	22,50	9,97
2	49,82	32,43	17,75	64,91	21,63	13,34
3	50,96	34,50	14,53	64,37	21,46	14,16

- Test de Shapiro-Wilks

Variable	Tests of Normality (tabla nat sustrato)		
	N	W	p
%fijac	18	0,898422	0,053936

- Test de ANOVA

Variable	Analysis of Variance (tabla nat sustrato) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
%fijac	6930,917	5	1386,183	1019,397	12	84,94977	16,31768	0,000055

- Test de Tukey

posición mat	Tukey HSD test; Variable: %fijac (tabla nat sustrato) Marked differences are significant at $p < ,05000$					
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	M=54,980	M=65,597	M=22,977	M=21,863	M=22,040	M=12,490
Int 1 {1}		0,720869	0,011160	0,008740	0,009084	0,001279
Int 2 {2}	0,720869		0,001249	0,001026	0,001058	0,000280
H 1 {3}	0,011160	0,001249		0,999988	0,999995	0,730346
H 2 {4}	0,008740	0,001026	0,999988		1,000000	0,807220
V 1 {5}	0,009084	0,001058	0,999995	1,000000		0,795629
V 2 {6}	0,001279	0,000280	0,730346	0,807220	0,795629	

En cuanto a la fijación de las cypris en distintas texturas de sustrato y a la luminosidad se observaron diferencias significativas.

La zona oscura y de textura lisa fue la que recibió mayor porcentaje de fijación. Por otra parte, sobre la cara iluminada se asentaron mayormente en el surcado grueso (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentajes de fijación por textura e iluminación del sustrato en los tres recipientes.

		porcentaje		
		1	2	3
Faz iluminada	textura			
	surcado grueso	17,65	20,2	15
	surcado fino	5,88	8,38	4,22
Faz oscura	zona lisa	5,88	4,02	6,38
	surcado grueso	19,65	15,12	17,65
	surcado fino	0	0	0
	zona lisa	50,94	52,28	56,75

- Test de ANOVA

Analysis of Variance (tabla nat sustrato) Marked effects are significant at p < ,05000								
Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
% fijación	2977,995	5	595,5990	161,8643	12	13,48869	44,15543	0,000000

- Test de Tukey

Tukey HSD test; Variable: % fijación (tabla nat sustrato) Marked differences are significant at p < ,05000						
ilum	tex	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
		M=19,287	M=8,1600	M=8,7600	M=22,140	M=1,0000
L	Gr	{1}	0,027735	0,038844	0,924725	0,000703
L	Fi	{2}	0,027735	0,999944	0,005698	0,234241
L	Li	{3}	0,038844	0,999944	0,007892	0,173956
O	Gr	{4}	0,924725	0,005698	0,007892	0,000282
O	Fi	{5}	0,000703	0,234241	0,173956	0,000282
O	Li	{6}	0,000268	0,000159	0,000159	0,000638

En cuanto a las superficies de asentamiento se observó una marcada preferencia por el sustrato liso, corroborado con el Test de "t" (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentajes de fijación sobre distintas texturas sobre vidrio.

vidrio	porcentaje		
	1	2	3
esmerilado	0	4,93	2,86
liso	100	95,07	97,14

- Test de "t"

	T-test for Independent Samples (tabla nat sustrato)										
	Note: Variables were treated as independent samples										
Group 1 vs. Group	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1	Std.Dev. Group 2	F-ratio Variances	p Variances
liso vs. esm	97,4033	2,59666	46,9047	4	0,00000	3	3	2,47552	2,47552	1,00000	1,00000

Se realizaron ensayos complementarios con *Polydora* sp. y se comprobó que se ha fijado indistintamente sobre superficies colocadas en los acuarios de cría (plástico o vidrio) así como sobre los distintos ángulos estudiados, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos ( $p > 0,05$ ). El ciclo de vida de la especie se completó entre 19 y 25 días a 20°C.

# Capítulo 4

La utilización tradicional del cobre  
en pinturas antiincrustantes.  
El óxido cuproso



## La utilización tradicional del cobre en pinturas antiincrustantes. El óxido cuproso.

### Introducción

El óxido cuproso es comúnmente empleado en pinturas antiincrustantes por su excelente performance; se disuelve en agua de mar dependiendo de varios factores como la salinidad, el pH, la concentración de cloruros y la temperatura (Rascio *et al.*, 1977).

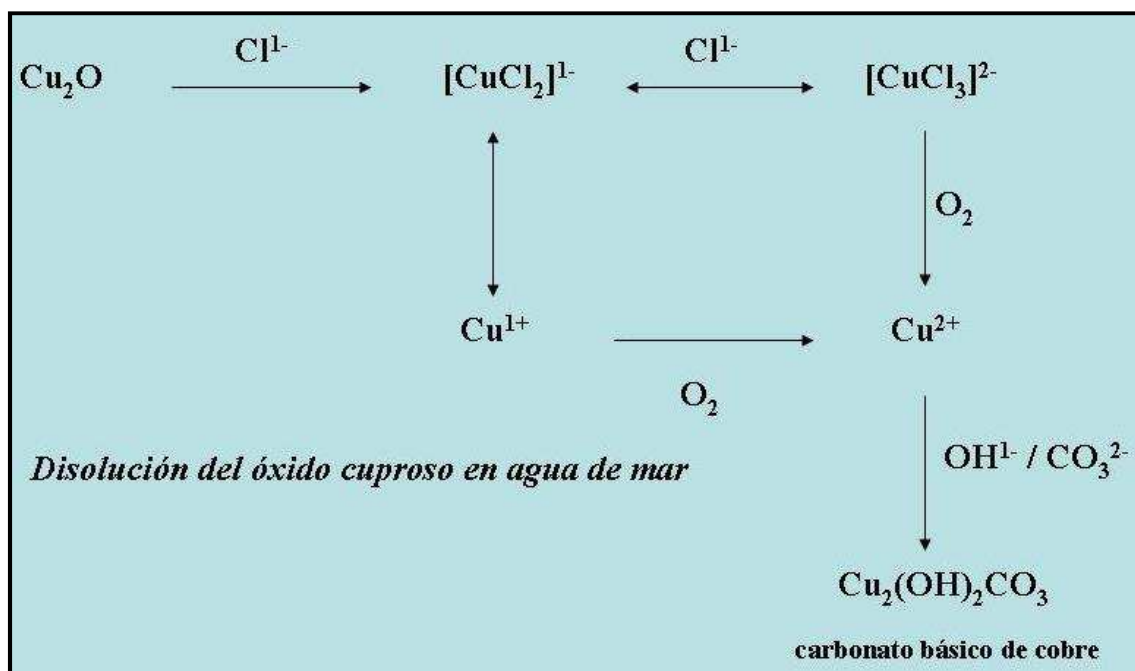


Figura 18. Esquema de la disolución del óxido cuproso en agua de mar.

El proceso de disolución del óxido cuproso en agua de mar (Fig. 18) implica una serie de reacciones que llevan a la formación sobre la superficie pintada de una capa delgada, altamente tóxica, que impide la fijación de organismos marinos (Ferry y Carritt, 1946; van Londen, 1963). La incorporación de óxido cuproso en las pinturas antifouling se realiza con la finalidad de disponer de una fuente constante de ión cúprico, muy soluble y responsable del efecto tóxico. Dado que en el medio marino la concentración de oxígeno es elevada, los complejos de cobre formados son rápidamente oxidados a  $\text{Cu}^{2+}$  asegurando la disponibilidad continua del biocida.

Para prevenir el asentamiento de cirripedios y diatomeas es necesario mínimamente una velocidad de lixiviación ("leaching rate") que se estima entre 10 y 20

$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{día}$  (Callow, 1999). Sin embargo, el ión cúprico no afecta del mismo modo a los distintos integrantes de la comunidad incrustante, las algas comunes como *Enteromorpha*, *Ectocarpus* y *Achnanthes* tienen una marcada tolerancia a distintas concentraciones (Voulvoulis *et al.*, 2002).

Generalmente los organismos requieren del cobre para realizar funciones vitales a nivel celular. En ambientes en los que la disponibilidad del cobre es pobre, los seres vivos han desarrollado mecanismos para secuestrarlo, por ejemplo produciendo metalotioneínas. Contrariamente, este mecanismo también puede ser utilizado para liberar excesos del metal y mantener los niveles entre los límites tolerables; cuando este equilibrio se rompe, el cobre es considerado tóxico (US EPA, 1985; Tapia *et al.*, 2004).

Por un lado, la existencia en el medio acuático de ligandos solubles que se unen al ión cúprico reduce significativamente su toxicidad dado que disminuye su disponibilidad en el agua (Voulvoulis *et al.*, 1999). Una reacción similar puede ocurrir por algunos quelantes del cobre que son sintetizados y excretados por los organismos reduciendo su concentración; también puede disminuirse el contenido de cobre por la formación espontánea de carbonato básico de cobre (Fig. 18).

La utilización de compuestos a base de cobre resulta altamente tóxica para el agua, los sedimentos y los organismos. Se han reportado cantidades máximas permitidas en países desarrollados, como por ejemplo en el Reino Unido donde se establece que el valor de cobre disuelto en agua de mar no debe exceder de  $5 \mu\text{g Cu/L}$  (Voulvoulis *et al.*, 1999). Sin embargo, en la práctica se han detectado concentraciones que sobrepasan ampliamente este valor con graves consecuencias ecológicas (Matthiessen *et al.*, 1999).

La presencia de cobre en pequeñas concentraciones resulta nociva para muchos peces y para estadios larvales de invertebrados (Chapman, 1978; Chapman y Stevens, 1978; Mance, 1987; Peterson *et al.*, 1991; Brooks y Mahnken, 2003). Otro efecto adverso observado en ambientes bentónicos con sedimentos contaminados es la deformación de los frústulos de diatomeas (Dickman, 1998; Gómez y Licursi, 2003; Falasco *et al.*, 2009 a,b). El cobre actúa en la cadena de transportes de electrones durante la fotosíntesis, pero se ha comprobado que en concentraciones elevadas provoca un efecto inhibitorio en la fotosíntesis algal (Reed y Moffat, 1983; Clijters y van Assche, 1985; Andrade *et al.*, 2004).

El cobre utilizado en las pinturas antifouling tiene efectos nocivos sobre los organismos de la comunidad incrustante pero además sobre los *non-target*; en este

sentido, se ha comprobado la reducción de la germinación de las algas *Fucus vesiculosus* (Andersson y Kautsky, 1996) y *Fucus spiralis* (Bond *et al.*, 1999), disminución del crecimiento del bivalvo *Tapes philippinarum* (Munari y Mistri, 2007) y daños en los filamentos branquiales de *Pagrus major* (Mochida *et al.*, 2006). Además, los óxidos de cobre inducen cambios en el crecimiento, contenido de clorofila, composición de carbohidratos y proteínas de las microalgas marinas *Tetraselmis suecica* y *Dunaliella tertiolecta* (Lim *et al.*, 2006).

Por otra parte se han registrado casos de bioacumulación en el intestino del erizo de mar *Strongylocentrotus droebrachiensis* (Chou *et al.*, 2003), en larvas pluteus de *Paracentrotus lividus* (Radenac *et al.*, 2001), en el hepatopráncreas de la langosta americana *Homarus americanus* (Chou *et al.*, 2000) y en bancos de ostras ubicados en las cercanías de marinas cuyo origen se debería al lixiviado de pinturas antifouling (Claisse y Alzieu, 1993).

Se han analizado muestras provenientes de fondos de zonas en las que se utilizan pinturas antifouling concluyéndose que existe una marcada dependencia entre las características físicas y químicas del sedimento y los contenidos de cobre, en varios casos se registró el doble de lo considerado standard (Miller, 1998). Se señalan valores en Florida de aporte anual de cobre de 1,7 tons/año por veleros, de 2,1 tons/año por lanchas con motor fuera de borda y de 1,4 tons/año por cruceros (Srinivasan y Swain, 2007).

La utilización de óxido cuproso en las formulaciones antiincrustantes es debida a la adecuada solubilidad en agua de mar, la efectividad y el bajo costo (Brooks y Waldock, 2009). El óxido cuproso no logra inhibir la fijación de todos los organismos, por eso debe ser reforzada por la adición de otros biocidas de origen orgánico (*booster biocides*) como, Irgarol, diclofluanid, clorotalonil, zinc piritiona y tolilfluanid, entre otros (Thomas, 2009).

Con el propósito de encontrar opciones “amigables con el medio ambiente” para la protección antifouling, se evaluó el efecto tóxico del cobre sobre los organismos, la performance de pinturas conteniendo óxido cuproso como tóxico principal y se propusieron formulaciones alternativas con disminución en el contenido de cobre.

## Materiales y métodos

Es conocida la rapidez de oxidación del óxido cuproso a la forma cúprica, por este motivo se analizó el efecto del cobre empleando sulfato cúprico, compuesto de fácil manipulación en laboratorio.

Se preparó una solución patrón de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) con una concentración de 600 mg Cu/L. A partir de esta solución se realizaron diluciones en agua de mar filtrada en relación 1/100. Las concentraciones obtenidas se detallan en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración de cada una de las soluciones.

solución	concentración (mg/L)
A	6
B	0,06
C	0,0006

Con el objeto de estimar los límites de tolerancia para la fijación larval se incorporó a cada una de las soluciones 15 cypris de *Balanus amphitrite* obtenidas por metamorfosis a partir de nauplii VI en laboratorio. Se trabajó por triplicado y con recipientes control dispuestos de forma similar utilizando agua de mar limpia.

Paralelamente se analizó la sensibilidad del estadio cypris a concentraciones crecientes de cobre en función del tiempo. Se acondicionó un recipiente con una lámina de cobre ( $\text{Cu}^0$ ) de  $5,25 \text{ cm}^2$  y 4988 mg de peso en un litro de agua de mar y se le agregaron 15 cypris obtenidas en laboratorio. Este ensayo se realizó para estimar el efecto *per se* del cobre elemental a partir de la lixiviación de la lámina de cobre.

El contenido de cobre en solución fue estimado cada tres días durante 24 días por espectrofotometría de absorción atómica empleándose un espectrofotómetro de absorción atómica Jarrell Ash, modelo 82-519, con lámpara de cátodo hueco Varian Techtron, corriente de lámpara de 5 mA y longitud de onda de medida en la línea 324,7 nm; la llama fue de aire/acetileno en mechero de flujo laminar de 10 cm y la sensibilidad de 0,01 mg/L. Se trabajó en comparación con un blanco de agua de mar y contra patrón de solución de 1 mgCu/L. Las concentraciones obtenidas están referidas a datos de cobre total dado que no se pudo diferenciar la especie cuproso de la especie cúprico.

También se realizaron ensayos con pinturas antifouling a base de óxido cuproso en el mar. Es conocida la efectividad de estas pinturas, sin embargo, la inclusión del biocida en distintos tipos de ligantes puede influir en el resultado final de



la película de pintura. Por esta razón se analizó la performance de tres pinturas de matriz soluble formuladas a base de óxido cuproso durante 12 meses en el puerto de Mar del Plata. Los ligantes estudiados fueron resina colofonia, Pliolite® y caucho clorado, que difieren entre sí en el grado de disolución en agua de mar. La composición de las pinturas se detalla en la Tabla 13.

Con el fin de conocer la acción del cobre sobre los organismos que han tenido contacto temporario con una solución concentrada de sulfato cúprico, se llevaron a cabo una serie de ensayos con distintos estadios larvales.

Se expusieron 15 nauplii II y 15 cypris durante una hora a una solución de 6 mgCu/L; completado este período las larvas fueron trasladadas a agua de mar artificial limpia conteniendo la diatomea *Skeletonema costatum* como fuente de alimento. Los parámetros medidos para evaluar el efecto tóxico fueron la respuesta fototáctica (positiva o negativa) y la actividad natatoria, las observaciones se realizaron durante dos horas cada 15 minutos. El recipiente testigo contó con el mismo número de larvas, agua de mar limpia e idéntica fuente alimenticia.

Tabla 13. Composición de las pinturas estudiadas (%V/V).

óxido cuproso	16,0
carbonato de calcio	2,9
resina colofonia/ Pliolite®/caucho clorado	27,0
ácido oleico	5,9
xileno	24,1
aguarrás mineral	24,1

## Resultados

La fijación registrada al cabo de 48 horas de exposición demostró que las cypris se asentaron en los recipientes con concentraciones entre 0,06 y 0,0006 mg/L (Tabla 14).

Tabla 14. Porcentajes de fijación obtenidos para cada concentración tóxica luego de 48 horas de exposición.

solución	concentración (mg Cu/L)	porcentaje de fijación
A	6	0
B	0,06	60
C	0,0006	86,6
control	0	86,6

La curva obtenida de la relación de porcentajes de fijación de las cypris en función de la concentración de cobre utilizada, resultó de forma convexa demostrando que a mayores concentraciones de sustancia tóxica la fijación es menor (Fig. 19). A partir de esta curva se estimó la concentración de sulfato cúprico necesaria para evitar la fijación del 50% de la población de cypris; calculado gráficamente por Sigma Plot, el valor resultó de 0,12 mgCu/L.

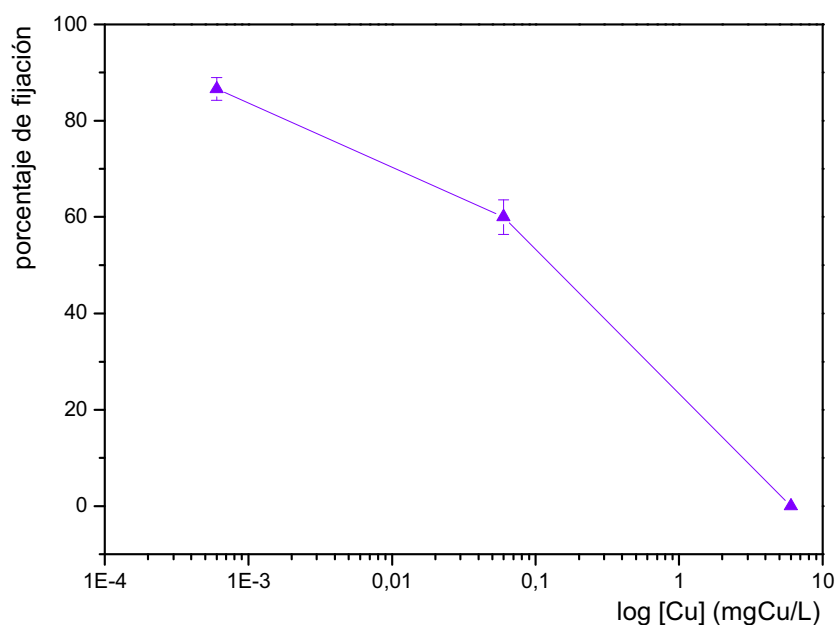


Figura 19. Porcentajes de fijación de cypris en función de la concentración de cobre.

El asentamiento de las cypris ocurre en algún punto del intervalo de concentraciones entre 6 y 0,06 mgCu/L, es importante conocer la concentración mínima en la que la fijación es aún exitosa. Para ello, se realizó una nueva serie de ensayos tomando como límites superior e inferior de experimentación estas dos concentraciones; asimismo se agregó una concentración más diluida para corroborar los resultados obtenidos anteriormente (Tabla 15; Fig. 20).

Tabla 15. Porcentajes de fijación obtenidos para cada concentración tóxica luego de 48 horas de exposición.

concentración (mg Cu/L)	porcentaje de fijación
6	0
3	0
1,5	0
0,75	0
0,37	0
0,185	0
0,0925	10
0,06	50
0,0006	86,6
0	86,6

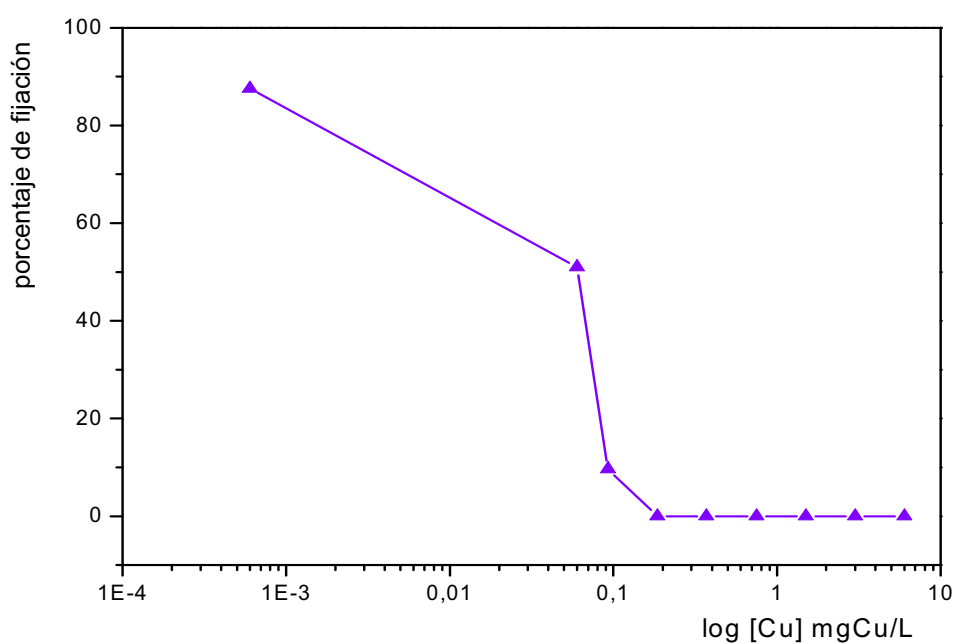


Figura 20. Porcentajes de fijación de cypris en función de la concentración de cobre.

Como se expresa más arriba el valor gráfico obtenido a partir de los primeros ensayos fue de 0,12 mgCu/L, en esta serie de experimentos se ajustó la medida de inhibición de la fijación para el 50% de la población ( $EC_{50}$ ) a la concentración 0,06 mgCu/L, es decir una concentración similar (dentro del orden de magnitud) a la obtenida anteriormente. Por otra parte, la concentración mínima de cobre en la que es factible la metamorfosis a juvenil en forma completa y exitosa se determinó entre 0,0925 y 0,185 mgCu/L, en soluciones más diluidas los porcentajes de fijación se incrementan rápidamente.

#### *Ensayos con lámina de cobre*

La exposición de las larvas a las distintas concentraciones de lixiviados de la lámina de cobre demostró un marcado efecto inhibitor ya que al cabo de 48 horas las cypris no lograron asentarse ni completar su metamorfosis a juvenil. Sin embargo, se observó un 80% de supervivencia en soluciones con 8 días de lixiviación (1,20 mg/L de cobre en solución) lo que indica claramente la resistencia que presentan las cypris a la presencia de cobre (Fig. 21).

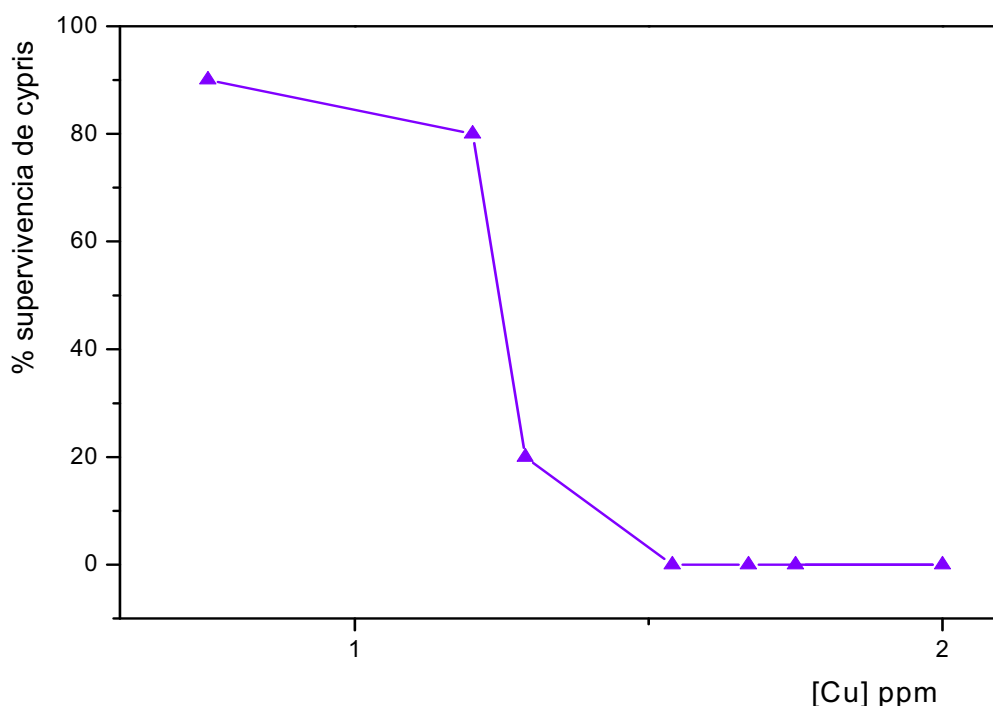


Figura 21. Porcentajes de supervivencia de cypris en función de la concentración de cobre en soluciones obtenidas por lixiviado de una lámina del metal.

El mecanismo por el cual las cypris logran “aislarse” del medio circundante es mediante el cierre hermético de las valvas y utilización de las reservas lipídicas como fuente energética; de este modo, pueden sobrevivir durante períodos prolongados sin necesidad de alimentación.

Los resultados obtenidos indicaron que transcurrido el tiempo de recuperación tanto las nauplii como las cypris recobraron la movilidad de los apéndices y la respuesta fototáctica. Sin embargo, las nauplii se vieron afectadas dado que, si bien se observaron mudas en el fondo del recipiente, no lograron completar la metamorfosis hasta el estadio cypris. Las cypris, en cambio, se mantuvieron vivas pero solamente el 20% logró la metamorfosis a juvenil.

La mayor sensibilidad del estadio nauplius respecto del estadio cypris, tanto para el tiocianato cuproso como para el óxido cuproso, es coincidente con las observaciones llevadas a cabo por Qiu *et al.* (2005) para esta misma especie utilizando sulfato cúprico como fuente de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Si bien este mecanismo de incremento en la tolerancia al cobre a medida que avanzan los estadios metamórficos es desconocido, las hipótesis que se proponen son, por una parte, el aumento de tamaño corporal de la larva que otorga una relación superficie/volumen menor y como consecuencia una reducción a la exposición al tóxico; por otro lado, un mejor desarrollo de los mecanismos fisiológicos que permiten un balance más eficiente entre la incorporación y excreción del tóxico.

En los ensayos con pinturas antifouling a base de óxido cuproso en el mar, se comprobó que las tres pinturas aplicadas a los paneles sumergidos en el puerto de Mar del Plata demostraron una buena performance antifouling aunque con ciertas diferencias entre los distintos ligantes estudiados. Luego de 12 meses de inmersión pudo comprobarse que la formulación a base de resina colofonia fue la más eficaz dado que evitó el asentamiento de micro y macroorganismos (Fig. 22). La observación bajo lupa y microscopio demostró que la formulación conteniendo caucho clorado no logró evitar el asentamiento del film primario ni de *B. amphitrite*, en tanto que la de Pliolite®, si bien no presentó macrofouling, fue colonizada por film primario con una gran variedad de diatomeas.

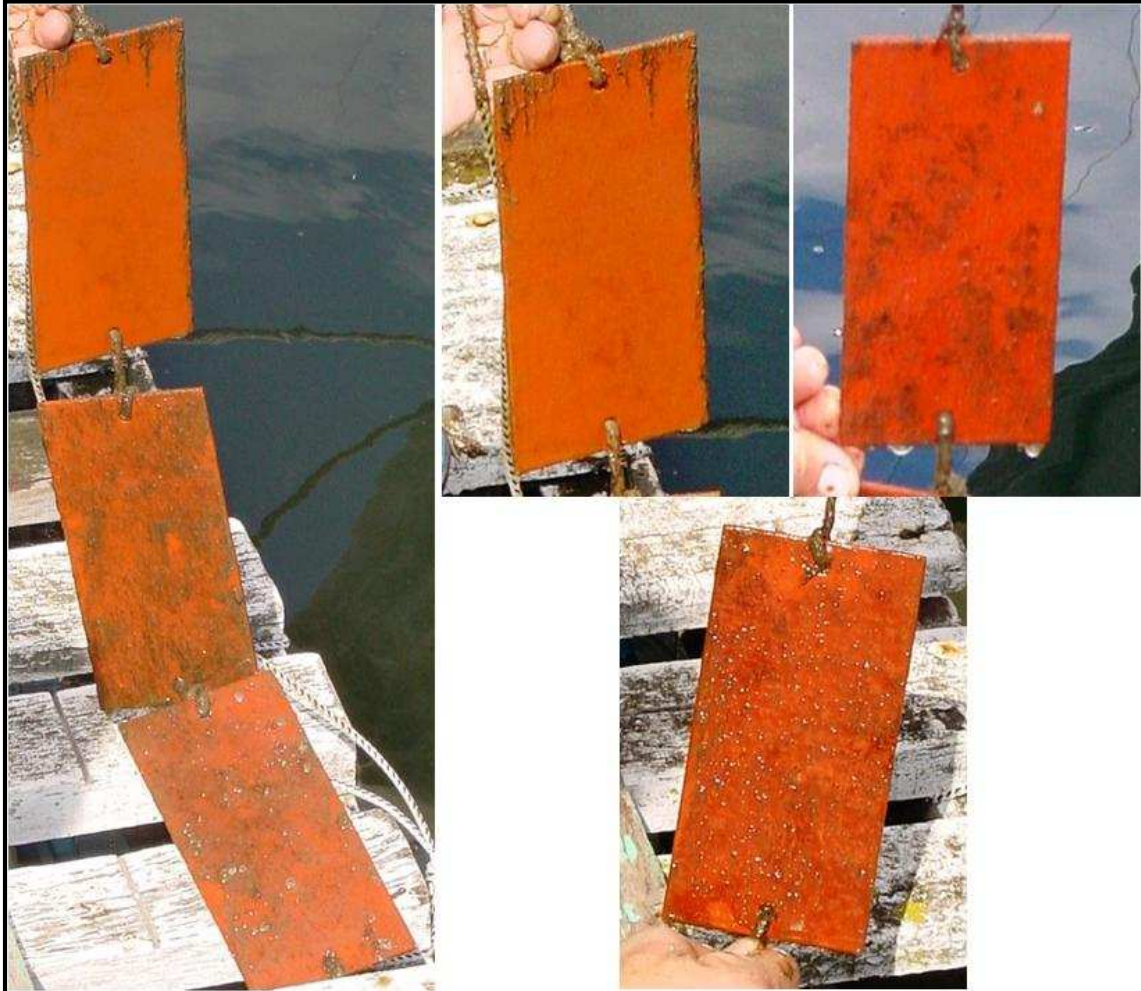


Figura 22. Pinturas a base de óxido cuproso con distintos ligantes, después de un año de inmersión. Aspecto general de los paneles pintados con resina colofonia, Pliolite® y caucho clorado (izquierda). Detalle de los paneles (derecha).

# Capítulo 5

Hacia una reducción en el contenido de cobre de las pinturas. El rol del tiocianato cuproso y su efecto antiincrustante



## **Hacia una reducción en el contenido de cobre de las pinturas. El rol del tiocianato cuproso y su efecto antiincrustante**

### **Introducción**

Como señaláramos anteriormente, las estructuras emplazadas en el mar han sido protegidas tradicionalmente con compuestos a base de cobre y estaño. Sin embargo, las regulaciones impuestas por la IMO acerca del empleo de compuestos organoestánicos en pinturas antifouling y la creciente concientización de evitar la incorporación de compuestos potencialmente contaminantes del agua y de los sedimentos, obliga a la búsqueda de formulaciones alternativas eficaces. Si bien la legislación actual no prohíbe la utilización del cobre y dado que su reemplazo en pinturas antiincrustantes demandará tiempo, es importante encontrar formulaciones con menor contenido del compuesto pero igualmente eficaces. La cantidad de cobre utilizada comúnmente en una pintura antifouling de las que se encuentran actualmente en el mercado varía ampliamente desde 20% a 76% (Brooks y Waldock, 2009).

Partiendo de la composición de las formulaciones clásicas a base de óxido cuproso, ensayadas en el puerto de Mar del Plata y que resultaron efectivas, se analizó la performance de pinturas con un bajo contenido de cobre.

Además de la conocida toxicidad del óxido cuproso para el medio ambiente, otro inconveniente que genera su utilización es la imposibilidad de modificar su color rojo característico. Entre los compuestos alternativos de color blanco o incoloros a base de cobre que puedan lograr una buena performance antifouling se encuentran el bromuro cuproso, el ioduro cuproso y el cianuro cuproso; sin embargo, todos ellos resultan inviables por distintas razones, el bromuro cuproso debido a su elevada solubilidad, el ioduro cuproso por su alto costo y el cianuro cuproso por su baja solubilidad y probada toxicidad (Smith y Martell, 1981).

Otro compuesto de color blanco es el tiocianato cuproso. Si bien el empleo de este compuesto en pinturas antiincrustantes no es novedoso, hasta el presente no se conocían con exactitud sus propiedades y ventajas respecto del óxido cuproso. El efecto tóxico del tiocianato cuproso ha sido comprobado sobre diatomeas (Callow, 1986; Robinson y Hall, 1990) pero no se han realizado estudios sobre su acción sobre otros organismos de la comunidad del “fouling”.

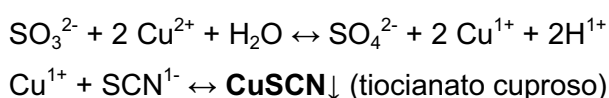
Los objetivos que se proponen para disminuir el contenido de cobre de las formulaciones son, por un lado, la utilización de tiocianato cuproso como pigmento



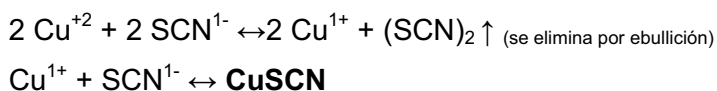
antiincrustante y el estudio de su performance y, por otro, la evaluación de pigmentos preparados con una estructura *core-shell*, estos últimos formados por un núcleo inerte inorgánico recubierto por una delgada capa de tiocianato cuproso.

## Materiales y métodos

El tiocianato cuproso empleado para la realización de los ensayos se preparó en el CIDEPINT según las técnicas descriptas por Vetere *et al.* (1997). Esta metodología propone la obtención del tiocianato cuproso por dos vías diferentes, la primera de ellas se basa en la reducción de una solución de sulfato cúprico con sulfito de sodio a temperatura ambiente con el agregado de tiocianato de sodio:



El segundo procedimiento consiste en la reducción de una solución de sulfato cúprico mediante una solución de tiocianato de sodio a 70°- 80°C según la siguiente reacción redox:



Si bien esta última técnica permite obtener tiocianato cuproso fácilmente, no fue elegida para evitar la liberación del gas tóxico tiocianógeno en el medio ambiente.

El tiocianato cuproso obtenido se lava convenientemente con agua destilada, se filtra y se seca a temperatura ambiente y finalmente se muele para luego ser utilizado.

En laboratorios del CIDEPINT se estudiaron distintas propiedades del pigmento obtenido tales como solubilidad, oxidabilidad, distribución del tamaño de partícula y absorción de aceite. En todos los casos se estudiaron paralelamente estas mismas propiedades para el óxido cuproso (Vetere *et al.*, 1997).

La solubilidad se determinó en dos medios distintos, por un lado, en agua de mar y por otro, en solución de NaCl 0,5 M; estos medios fueron utilizados a fin de estimar la influencia del anión OH<sup>-</sup> presente en el agua de mar. La determinación de los contenidos de cobre y de anión tiocianato se realizaron por técnicas de colorimetría (Snell y Snell, 1941).

Por otra parte, se realizó otra serie de experimentos a fin de evaluar el efecto del oxígeno atmosférico en la solubilidad de los pigmentos. Para ello se trabajó con agua de mar artificial con aireación constante y se determinó el contenido de cobre soluble del extracto por medio de técnicas de absorción atómica.

La oxidabilidad se determinó disolviendo cada pigmento en agua de mar y manteniéndolo en cámara de cultivo a 30°C durante 5 días. El contenido de Cu(II) formado diariamente por oxidación se determinó por procedimientos iodométricos siguiendo la técnica propuesta por Harris (1992).

El análisis de distribución del tamaño de partícula se realizó utilizando un analizador Sedigraph-5000 D Micrometrics.

Se realizó un ensayo para determinar la cantidad de aceite que puede ser absorbido por una cantidad de pigmento en el momento de preparación de la pintura; se realizó aplicando la norma ASTM D 1483.

Los ensayos en el laboratorio se llevaron a cabo exponiendo 30 nauplii II y 30 cypris de *Balanus amphitrite* criadas *in vitro* a 60 mL de solución saturada de óxido cuproso, tiocianato cuproso o tiocianato de potasio en agua de mar artificial. Los parámetros estudiados fueron supervivencia, respuesta fototáctica y asentamiento (para el caso de las cypris) estimándose valores de  $Lt_{50}$  y  $Lt_{100}$ .

Como ensayo complementario para conocer el efecto *per se* del anión tiocianato, se preparó también una solución de tiocianato de potasio  $8 \times 10^{-5}M$ . Esta concentración es similar a la obtenida cuando se disuelve tiocianato cuproso en agua de mar. Se trabajó en condiciones similares a las descritas para las experiencias con tiocianato cuproso.

#### *Composición de las pinturas y metodología para su elaboración*

Las pinturas antiincrustantes de tipo matriz soluble conteniendo tiocianato cuproso fueron preparadas en la Planta Piloto del CIDEPINT. El ligante de las pinturas fue elaborado con resina colofonia (ww rosin) y ácido oleico como plastificante en una relación de 2,4/1 en volumen. El pigmento incluyó 53,1% de tiocianato cuproso, 2,7% de óxido de zinc y 44,2% de carbonato de calcio (porcentajes en volumen sobre el contenido total de pigmento). Asimismo, se incorporó a la formulación un agente tixotrópico, castor oil, en un 2% en peso sobre los sólidos de la pintura a fin de lograr una viscosidad adecuada; la concentración de pigmento en volumen (PVC) fue de 45%. La carga de pigmento empleado en los ensayos con tiocianato cuproso fue

similar al utilizado en formulaciones a base de óxido cuproso elaboradas en el CIDEPINT (Giúdice *et al.*, 1984; del Amo *et al.*, 1990).

Para preparar las pinturas se utilizó un molino de bolas con jarras de 3,3 L y se siguieron las condiciones operativas propuestas por Giúdice *et al.* (1984). Primeramente se cargó el molino con el vehículo, luego se incorporó óxido de zinc y carbonato de calcio y se dispersó durante 24 horas. Se estudiaron dos tiempos de dispersión para el pigmento tóxico (tiocianato cuproso) de 24 horas y 3 horas a fin de establecer si existen diferencias en cuanto a la performance de la formulación. El proceso de dispersión de un pigmento consiste en la separación y distribución uniforme de sus partículas en el seno del vehículo e influye en el valor del CPVC (concentración crítica de pigmento en volumen).

Para ensayar las pinturas se emplearon paneles de acero SAE 1010 previamente arenados (grado A Sa 2 ½, 40 µm de rugosidad máxima) a los que se les aplicó una capa de pintura anticorrosiva y dos manos de las pinturas antifouling. Estos paneles fueron expuestos en la balsa experimental fondeada en Puerto Belgrano por un período de 24 meses. Por razones operativas esta misma formulación no pudo ser estudiada en el puerto de Mar del Plata; sin embargo, el comportamiento de otras dos formulaciones similares conteniendo tiocianato cuproso elaboradas posteriormente en el CIDEPINT se evaluó en el puerto de Mar del Plata por un período de seis meses. La composición de estas formulaciones se detalla en la Tabla 16.

Tabla 16. Composición de las pinturas ensayadas en el puerto de Mar del Plata, % en volumen.

componente	%
CuSCN	16,0
carbonato de calcio	2,9
resina colofonia	27,0
ácido oleico o barniz fenólico	5,9
xileno	24,1
aguarrás mineral	24,1

## Resultados

### - Síntesis del pigmento tiocianato cuproso

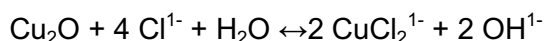
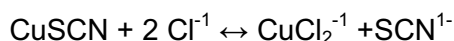
El pigmento obtenido es estable y de alta pureza y presenta como ventaja que no necesita del agregado de preservantes de la oxidación en las condiciones ambientales del laboratorio. El óxido cuproso, en cambio, necesita de la presencia de preservantes del oxígeno atmosférico tales como el estearato de zinc (Vetere y Romagnoli, 1984).

El contenido de tiocianato cuproso obtenido se determinó mediante técnicas iodométricas por oxidación de la muestra con ácido nítrico (Harris, 1946); se pudo comprobar que poseían un 99% de pureza.

### - Caracterización del pigmento tiocianato cuproso

#### • Solubilidad

Según Romagnoli (1987), la disolución del tiocianato cuproso y del óxido cuproso en un medio que contiene cloruros puede interpretarse por las siguientes reacciones:



Los datos de la solubilidad de los pigmentos estudiados determinados por colorimetría se especifican en la Tabla 17.

Tabla 17. Solubilidad de los pigmentos.

medio	pigmento	( $\text{CuCl}_2^{1-}$ )	( $\text{SCN}^{1-}$ )	( $\text{OH}^{1-}$ )
agua de mar (pH inicial 8,48)	CuSCN Cu <sub>2</sub> O	$5 \times 10^{-5}\text{M}$ $5 \times 10^{-5}\text{M}$	$8 \times 10^{-5}\text{M}$ -----	$3,2 \times 10^{-6}\text{M}$ $3,2 \times 10^{-6}\text{M}$
NaCl (pH inicial 7,00)	CuSCN Cu <sub>2</sub> O	$6,3 \times 10^{-5}\text{M}$ $1,3 \times 10^{-5}\text{M}$	$6,3 \times 10^{-5}\text{M}$ -----	$1,0 \times 10^{-7}\text{M}$ $1,3 \times 10^{-5}\text{M}$

Tanto el tiocianato cuproso como el óxido cuproso se disuelven en agua de mar formando principalmente  $\text{CuCl}_2^{1-}$  y presentan la misma solubilidad, esto se debe a la capacidad buffer del agua de mar; esto también se observa en la solución de cloruro de sodio aunque con una pequeña diferencia entre los valores hallados (Romagnoli, 1987).

Respecto a la capacidad de oxidarse en un medio con cloruros como es el agua de mar, la concentración de ión cúprico puede descender desde  $5 \times 10^{-5}$  M (cuando está referido al cobre soluble total en exceso de pigmento) hasta valores de  $1,6 \times 10^{-8}$  M ( $=1,01\mu\text{g/L}$ ), en cobre soluble total del extracto filtrado (datos obtenidos por absorción atómica), lo que implica que el contenido de cobre total disminuye 3125 veces. Por lo tanto, los ensayos biológicos se llevaron a cabo a una concentración de  $1,01\mu\text{g/L}$  que corresponde a la concentración lograda en agua de mar aireada teniendo en cuenta los equilibrios de la Fig. 18 (Vetere *et al.*, 1997).

- *Oxidabilidad*

Luego de 24 horas de exposición en agua de mar aireada, el óxido cuproso se oxida evidenciando una coloración azul pálido, esta misma coloración se observa para el tiocianato cuproso pero transcurridas 48 horas. Esto indica que este último compuesto se oxida menos fácilmente; cabe señalar que los valores de pH de las soluciones se mantuvieron cercanos a 8,4, es decir próximos a los normales para el agua de mar.

Los resultados experimentales demostraron que el tiocianato cuproso es al menos cinco veces menos oxidable que el óxido cuproso. En la Tabla 18 se detallan los valores de  $\text{Cu}^{2+}$  obtenidos por colorimetría (técnica iodométrica).

Tabla 18. Datos de oxidabilidad de los pigmentos en agua de mar artificial.

días	mg $\text{Cu}^{+2}$ producidos por oxidación	
	<b>CuSCN</b>	<b><math>\text{Cu}_2\text{O}</math></b>
1	1,17	9,10
2	1,42	13,20
3	2,41	18,70
4	2,95	19,70
5	3,90	22,00

- *Distribución de tamaño de partícula*

Las partículas de tiocianato cuproso fueron mayores que las de óxido cuproso con un tamaño medio de 6,4  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por otra parte, el diámetro medio de las partículas de óxido cuproso fue de 2,4  $\mu\text{m}$ . Las implicancias de los diferentes tamaños de partícula están relacionadas con la velocidad de disolución, a mayor diámetro de tamaño de partícula la velocidad de disolución es menor.

- *Absorción de aceite*

La medición de este parámetro resultó similar para ambos pigmentos, 26% para tiocianato cuproso y 24% para óxido cuproso, lo que presupone que no se registrarán diferencias en la preparación de la pintura.

- *Ensayos con organismos incrustantes en laboratorio*

La concentración de los extractos utilizados para realizar los bioensayos fue de 1,01  $\mu\text{g/L}$ , es decir la concentración lograda en la solución con aireación. Se empleó esta concentración porque es similar a la concentración máxima que se estima habrá en la interface de una película formulada con óxido cuproso o tiocianato cuproso en las condiciones normales de oxigenación en el mar, es decir con la concentración de oxígeno producida, entre otras causas, por agitación del agua o por fotosíntesis.

Los valores de tiempo letal 50 ( $Lt_{50}$ ) y tiempo letal 100 ( $Lt_{100}$ ) para la concentración de 1,01  $\mu\text{g/L}$  para nauplii y cypris se detallan en la Tabla 19 y la curva de porcentajes de mortalidad a lo largo del tiempo para las nauplii II en la Fig. 23. Dado que los valores hallados para las cypris corresponden a una escala de tiempo mayor, no fueron graficados.

Tabla 19.  $Lt_{50}$  y  $Lt_{100}$  a concentración constante 1,01  $\mu\text{g/L}$ , 20°C.

estadio	$Lt_{50}$		$Lt_{100}$	
	CuSCN	Cu <sub>2</sub> O	CuSCN	Cu <sub>2</sub> O
nauplius II	62 min	122 min	100 min	340 min
cypris	50 min	>6 horas	6 horas	>20 horas

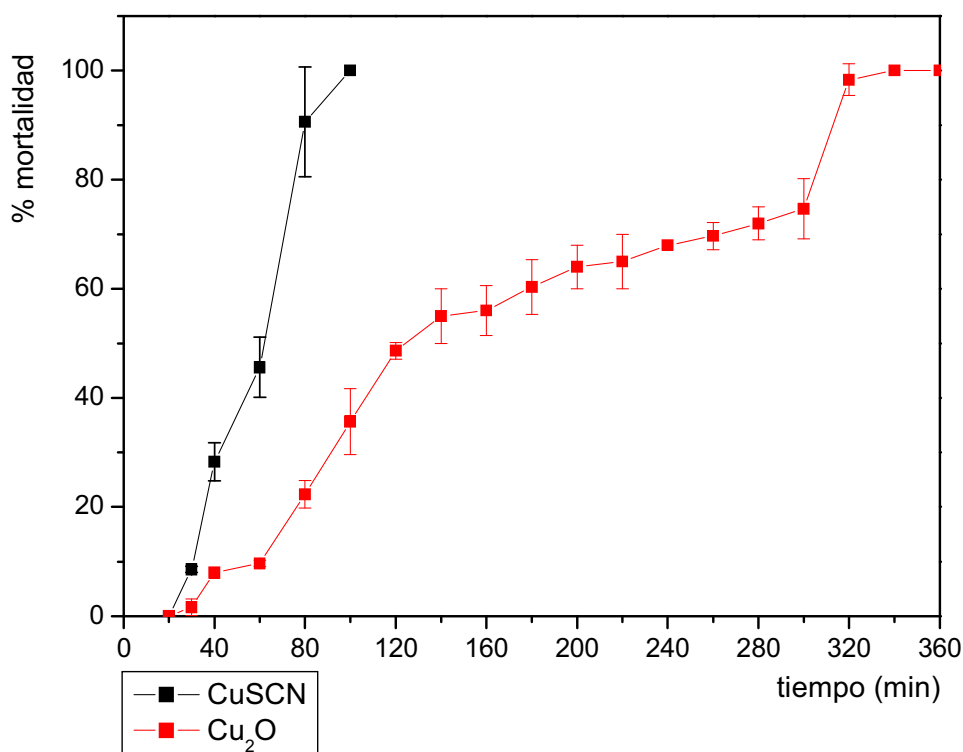


Figura 23. Curvas de porcentajes de mortalidad de nauplii II en función del tiempo para los compuestos estudiados. Las barras indican promedio  $\pm$  SE.

Los experimentos llevados a cabo en el laboratorio confirman la elevada toxicidad del cobre tanto para las nauplii como para la cypris observándose interrupción de los movimientos natatorios y la caída de las larvas al fondo del recipiente ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, no se realizaron ensayos de asentamiento de cypris con tiocianato cuproso dado que no se obtuvieron cantidades suficientes de larvas como para realizar la totalidad de las réplicas.

#### *Experiencias con tiocianato de potasio*

Luego de la exposición de las larvas nauplii y cypris a una solución de tiocianato de potasio con la misma concentración que en los ensayos previos con tiocianato cuproso ( $1,01 \mu\text{g/L}$ ), se pudo comprobar que el anión tiocianato no posee acción tóxica y el efecto tóxico es debido al catión  $\text{Cu}^{+2}$ . Esto se comprobó porque no se observaron diferencias significativas entre los recipientes con tiocianato de potasio respecto de los recipientes control, esto es, los porcentajes de supervivencia y comportamiento se mantuvieron en los parámetros normales.

- *Ensayos con pinturas antifouling en el mar*
  - *Exposición de las pinturas en Puerto Belgrano*

Los paneles con pinturas elaboradas a base de tiocianato cuproso se expusieron en Puerto Belgrano durante 24 meses. La fijación sobre los paneles fue muy escasa habiéndose registrado únicamente la presencia de microfouling con baja adhesión ( $p < 0,05$ ); este film estuvo dominado por diatomeas y protozoos ciliados.

Con respecto a los dos tiempos de dispersión de pigmento empleados (24 y 3 horas) pudo comprobarse que no influyeron significativamente en la performance de las pinturas dado que ambas resultaron satisfactorias. Este comportamiento pone de manifiesto una diferencia respecto de las pinturas a base de óxido cuproso en las que el tiempo de dispersión de los pigmentos influye en la bioactividad de la película (Partington y Dunn, 1962; Partington, 1964; de la Court y de Vries, 1973).

- *Exposición de las pinturas en el puerto de Mar del Plata*

Las pinturas ensayadas demostraron una buena performance independientemente del plastificante utilizado (ácido oleico o barniz fenólico). Luego de seis meses de exposición en el mar, que incluyó el período septiembre/marzo, no se observó la fijación de organismos calcáreos ni tunicados que, por el contrario, fueron dominantes en las muestras testigo ( $p < 0,05$ ) (Figura 24).

La pintura con tiocianato cuproso + ácido oleico demostró una marcada actividad antiincrustante contra los organismos del macrofouling, lo que queda demostrado comparando los paneles pintados vs. paneles testigo ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, la observación microscópica evidenció el desarrollo y fijación de diatomeas sobre la superficie de la pintura. A pesar de ello, se registraron diferencias en las abundancias relativas de algunos géneros como *Achnanthes*, *Grammatophora*, *Licmophora*, *Melosira*, *Navicula* y *Pleurosigma*, en tanto que para las dos especies presentes del género *Nitzschia* (*N. longissima* y *N. closterium*) como para *Skeletonema costatum* y ciliados la pintura no inhibió la fijación.

La evaluación del comportamiento de la pintura con tiocianato cuproso + barniz fenólico indicó que esta formulación posee un efecto variable según los grupos. Por un lado, inhibió completamente el asentamiento de *Bryopsis*, *Polysiphonia*, *Obelia*, *Hydroides*, *Bugula* y *Molgula*, grupos de gran relevancia desde el punto de vista de las incrustaciones, en tanto que sobre otros grupos el efecto se expresa solamente por disminución en la densidad de organismos asentados como puede observarse, por



ejemplo, en la fijación de algunas diatomeas (*Melosira* y *Navicula*), del alga verde *Enteromorpha intestinalis* y de la ascidia solitaria *Ciona intestinalis*.

La cantidad de cobre que se emplea en las formulaciones a base de óxido cuproso es **3,32** veces mayor por unidad de volumen que la utilizada en las de tiocianato cuproso. Dada la buena performance que demostraron las pinturas expuestas en el mar, se deduce que no es necesario equiparar la carga del pigmento ya que con menor contenido de cobre se obtiene una formulación igualmente efectiva.

Los bioensayos demostraron que a igual concentración de ión cúprico en la solución (ya sea proveniente del tiocianato cuproso como del óxido cuproso) las larvas son afectadas en su totalidad aunque a distinta velocidad. Dado que el anión tiocianato resultó inocuo para las larvas se deduce que el efecto del tiocianato cuproso es de acelerador de la reacción, es decir actúa más rápido.

Por razones estrictamente presupuestarias los tiempos de exposición de las pinturas no fueron los mismos (24 meses para Puerto Belgrano y 6 meses para Mar del Plata) y por lo tanto no son comparables. Sin embargo, dado que la formulación a base de tiocianato cuproso y ácido oleico demostró un mejor efecto antiincrustante, se utilizará como punto de partida para continuar avanzando hacia el objetivo propuesto de reducir la cantidad de cobre manteniendo la actividad antifouling.

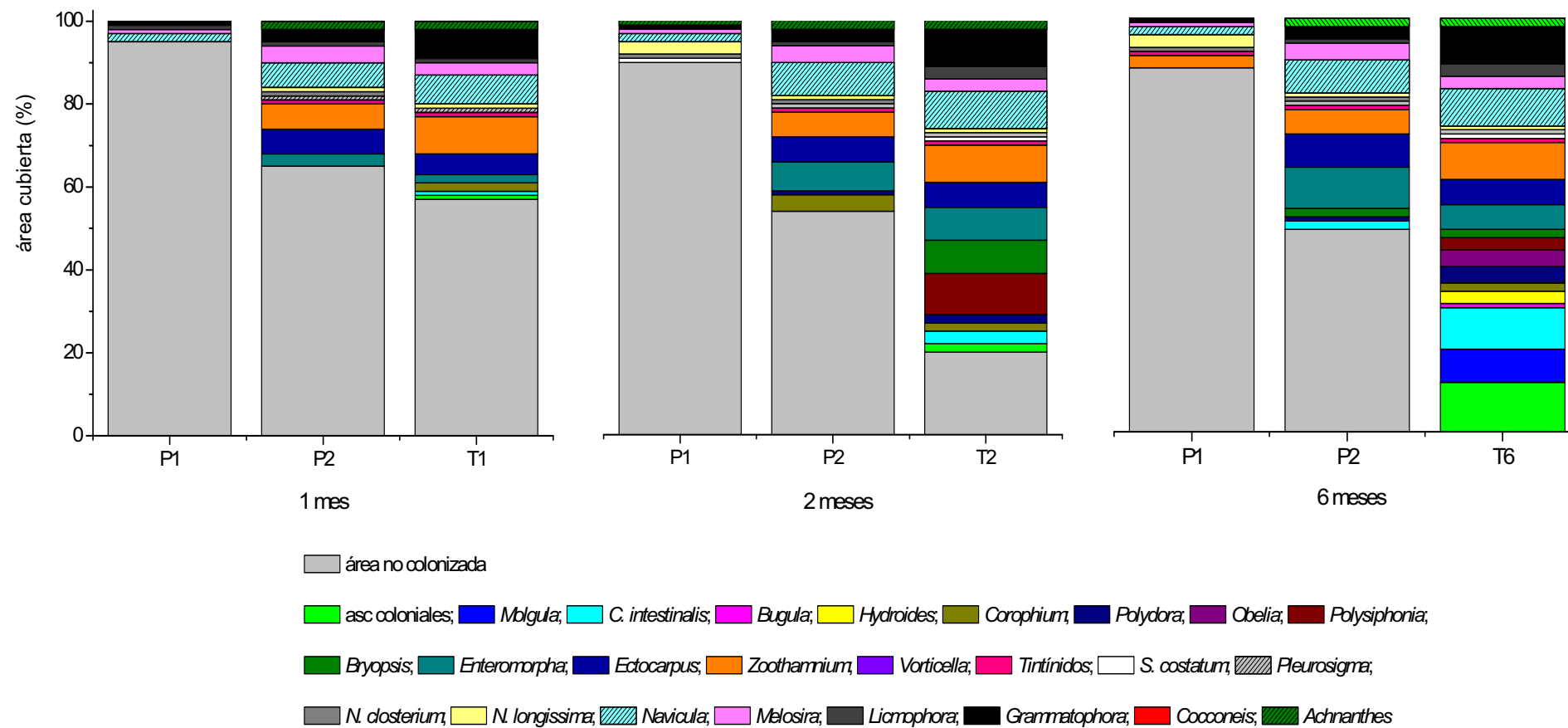


Figura 24. Fijación de macro y microfouling sobre paneles pintados y testigo en el puerto de Mar del Plata. P1: pintura con CuSCN + ácido oleico; P2: pintura con CuSCN + barniz fenólico; T: testigo (1, 2 y 6 meses de exposición).

# Capítulo 6

El tiocianato cuproso en la  
preparación de pigmentos  
tipo *core-shell*



## **El tiocianato cuproso en la preparación de pigmentos tipo *core-shell***

### **Introducción**

Después de comprobar que el tiocianato cuproso como compuesto antifouling resulta ventajoso porque es tan efectivo como el óxido cuproso pero con una disminución del contenido de cobre de 3,32 veces, proponemos reducir aún más el contenido de cobre en las pinturas, de modo tal de evitar al máximo el lixiviado en el mar.

Como se señalara, en una pintura antifouling convencional las partículas de óxido cuproso se encuentran incluidas en la matriz que, en contacto con el agua de mar, se solubiliza y deja en libertad al pigmento que se disuelve formando la capa tóxica. Sin embargo, debido a su baja solubilidad, gran parte del óxido cuproso no llega a disolverse completamente, sino que se desprende, cae a la columna de agua y al sedimento marino. Este mecanismo produce, por un lado, un desaprovechamiento de las partículas de pigmento y, al mismo tiempo, polución del agua y de los sedimentos. Dadas las características mencionadas se pretende optimizar la formulación reduciendo aún más el contenido de cobre y, para ello, se emplearán distintos tipos de pigmentos que presentan una estructura formada por un núcleo inerte central sobre el que se deposita una delgada capa de tiocianato cuproso (pigmentos *core-shell*).

La hipótesis de trabajo es que al combinar un núcleo no contaminante y de bajo costo con una capa del pigmento bioactivo permitirá aprovechar la efectividad del tiocianato cuproso, con una reducción significativa del contenido de cobre.

### **Materiales y métodos**

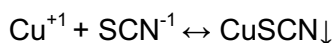
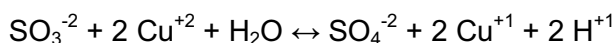
Los materiales para los núcleos fueron elegidos en función del bajo costo, disponibilidad en el mercado y comportamiento inerte. Se seleccionaron cuatro tipos de compuestos: carbonato de calcio, óxido de zinc, cuarzo micronizado y óxido férrico.

#### - Preparación de los pigmentos

La metodología utilizada para la preparación de los pigmentos involucró varias etapas, a saber:

- a) Incorporación del pigmento inerte (*core*) a una solución de sulfato cúprico manteniéndose en suspensión por agitación continua.
- b) Agregado de una solución de sulfito de sodio para reducir al ión cúprico a cuproso.
- c) Incorporación de una solución de tiocianato de potasio para lograr la precipitación del tiocianato cuproso sobre las partículas de pigmento inerte a temperatura ambiente.

Las reacciones que describen este procedimiento son las siguientes:



Si bien estas reacciones son las mismas descritas en el Capítulo 3, lo novedoso es que el tiocianato cuproso precipita sobre las partículas inertes en suspensión (*core*) al actuar como núcleo de cristalización.

El precipitado obtenido de pigmento *core-shell* fue lavado con agua destilada, filtrado y secado a temperatura ambiente. Este pigmento fue analizado por medio de una técnica iodométrica por oxidación de la muestra con ácido nítrico (Harris, 1992). De esta manera se pudo estimar el contenido de tiocianato cuproso presente en las partículas *core-shell* resultando en 90% en peso de carbonato de calcio / óxido de zinc/ cuarzo micronizado / óxido férrico rodeado por 10% en peso de tiocianato cuproso.

#### - Composición de las pinturas

Las pinturas formuladas con los pigmentos *core-shell* obtenidos con el procedimiento que se detalla más arriba fueron preparadas en el CIDEPINT. Se elaboraron cuatro pinturas de tipo matriz soluble (una por cada pigmento) a base de resina colofonia cuya composición se describe en las Tablas 20 y 21. A su vez, se prepararon dos pinturas más que se utilizaron como control, por un lado, una pintura conteniendo 100% de tiocianato cuproso y por otro una pintura sin pigmento tóxico.

Tabla 20. Composición de las pinturas (% en volumen).

<b>componente</b>	<b>%</b>
pigmento <i>core-shell</i>	16,0
carbonato de calcio	2,9
resina colofonia	27,0
ácido oleico	5,9
xileno	24,1
aguarrás mineral	24,1

Tabla 21. Composición del pigmento *core-shell* para cada pintura estudiada (% en peso).

<b>pintura</b>	<b>core</b>	<b>shell</b>
P 1	90% CO <sub>3</sub> Ca	10% CuSCN
P 2	90% ZnO	10% CuSCN
P 3	90% SiO <sub>2</sub>	10% CuSCN
P 4	90% Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10% CuSCN
P 5	---	100% CuSCN

Estas formulaciones se aplicaron sobre paneles de acrílico arenados de 8 cm x 16 cm hasta obtener un espesor final de película seca de 150± 5µm. Se expusieron en el puerto de Mar del Plata colgadas de las marinas del Club de Motonáutica a 50 cm por debajo de la superficie del agua durante 18 meses.

Para optimizar el funcionamiento de una pintura es importante considerar el probable efecto inhibidor de la fijación de otros componentes de la formulación tales como el solvente y la resina. En la formulación de estas pinturas fue necesario incorporar solventes orgánicos para lograr, por evaporación, la formación de película; una parte, aunque mínima, de estos solventes queda atrapada en el film y puede migrar hacia la superficie influyendo en la performance de la pintura y contribuyendo a la actividad antifouling, este efecto denominado “burst effect” fue descripto por Weisman *et al.* (1992); por ello, se estudió la influencia del solvente sobre la

supervivencia de las larvas. Asimismo, se realizaron bioensayos para evaluar el efecto de la resina empleada.

## Resultados

Las pinturas conteniendo pigmentos *core-shell* expuestas en el mar demostraron, en general, una muy buena performance. Luego de 18 meses de inmersión se registraron áreas libres de incrustación mayores al 75% de la superficie de los paneles sobre las cuatro formulaciones ensayadas. Resultaron más efectivas las que contenían pigmentos a base de carbonato de calcio y óxido férrico (P1 y P4) (Fig. 25). El comportamiento de estas pinturas es similar al de la pintura con 100% de tiocianato cuproso (P 5) cuyo funcionamiento resultó muy bueno como ya había sido demostrado en experiencias previas, fue escasamente colonizada por diatomeas, ciliados, *Enteromorpha intestinalis* y *Polydora* sp.

De las cuatro formulaciones ensayadas, la P3 fue la que tuvo una performance más baja, con un 25% del panel incrustado y con mayor diversidad específica. Es importante resaltar que a partir de los seis meses de inmersión, esta pintura mostró fallas de adhesión, se desprendió y dejó el panel sin protección permitiendo la colonización de macrofouling (*Bryopsis*, *Corophium*, *Enteromorpha intestinalis*, *Polydora* sp., *Ciona intestinalis*).

Es interesante destacar la ausencia del alga *E. intestinalis* sobre la pintura con óxido de zinc (P2) y sobre la de óxido férrico (P4). Si bien es ampliamente conocido que el óxido de zinc, no es un compuesto antifouling altamente efectivo, cuando se encuentra combinado con un biocida eficiente, en este caso, tiocianato cuproso, su bioactividad se incrementa. Este comportamiento es similar al descrito por French y Evans (1986) para combinaciones con organoestánicos y con óxido cuproso. Respecto de la influencia del óxido férrico no existen datos que sostengan el efecto antialgal del compuesto, ya sea solo o combinado con un tóxico.

La comparación entre los paneles testigo T1 / T2 (pintura sin pigmento tóxico y panel de acrílico sin pintura) y los paneles pintados con las pinturas a base de pigmentos *core-shell* demostró un marcado efecto antifouling. Los paneles T1 y T2 utilizados como testigo mostraron entre sí una fijación similar, estuvieron dominados por la ascidia solitaria *Ciona intestinalis* y los briozoos *Bugula neritina* y *B. stolonifera*. Se hallaron gran variedad de algas, entre ellas, *E. intestinalis*, *Ectocarpus* sp., *Griffithsia* sp. y *Polysiphonia* sp., por debajo de las cuales se encontraron colonias del cnidario *Obelia dichotoma*, tubos del poliqueto *Polydora* sp., *Balanus amphitrite*, el

briozoo *Bowerbankia* sp. y ascidias coloniales del género *Botryllus*. Se observó gran abundancia de diatomeas, principalmente de los géneros *Achnanthes*, *Grammatophora*, *Melosira*, *Navicula* y *Pinnularia*, y ciliados representados por *Vorticella* sp. y colonias de *Zoothamnium* sp.

En resumen, las pinturas *core-shell* P1, P2 y P4 resultaron más efectivas y su acción antifouling se observó claramente sobre el asentamiento de la mayoría de los organismos de la comunidad del “fouling”, con excepción de diatomeas, ciliados y el alga *E. intestinalis*; por el contrario, en la P3 se observó la colonización de varias especies y presentó fallas importantes en la película, que contribuyeron a la baja performance. Las abundancias relativas para las pinturas ensayadas se presentan en la Tabla 22.

Cabe señalar que no se observó ningún efecto de los solventes ni de la resina sobre la supervivencia larval por lo que se afirma que la acción antifouling fue debida a los pigmentos *core-shell*.



Tabla 22. Abundancias relativas de organismos del micro y macrofouling luego de 18 meses de inmersión.

P1: 90% Ca CO<sub>3</sub> +10% CuSCN

P2: 90% ZnO +10% CuSCN

P3: 90% SiO<sub>2</sub> +10% CuSCN

P4: 90% Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> +10% CuSCN

P5: 100% CuSCN.

T1: pintura sin CuSCN, T2: panel de acrílico sin pintura.

taxón	pintura					T 1	T 2
	1	2	3	4	5		
<i>Achnanthes</i>	R	R	R	R	R	R	R
<i>Grammatophora</i>	R	R	R		R	A	A
<i>Melosira</i>	R	R	R	R	R	A	A
<i>Navicula</i>	R	R	R	R	R	E	E
<i>Zoothamnium</i>		R	R		R	F	A
<i>Enteromorpha</i>		R	F		R	E	F
<i>Ectocarpus</i>			R			E	E
<i>Polysiphonia</i>			R			E	E
<i>Obelia</i>						A	A
<i>Polydora</i> sp.		R	F		R	F	A
<i>B. amphitrite</i>			R			E	F
<i>Bowerbankia</i>						A	A
<i>Bugula neritina</i>						E	E
<i>Bugula stolonifera</i>						E	R
<i>C. intestinalis</i>			E			A	A
<i>Botryllus</i>			E			R	E

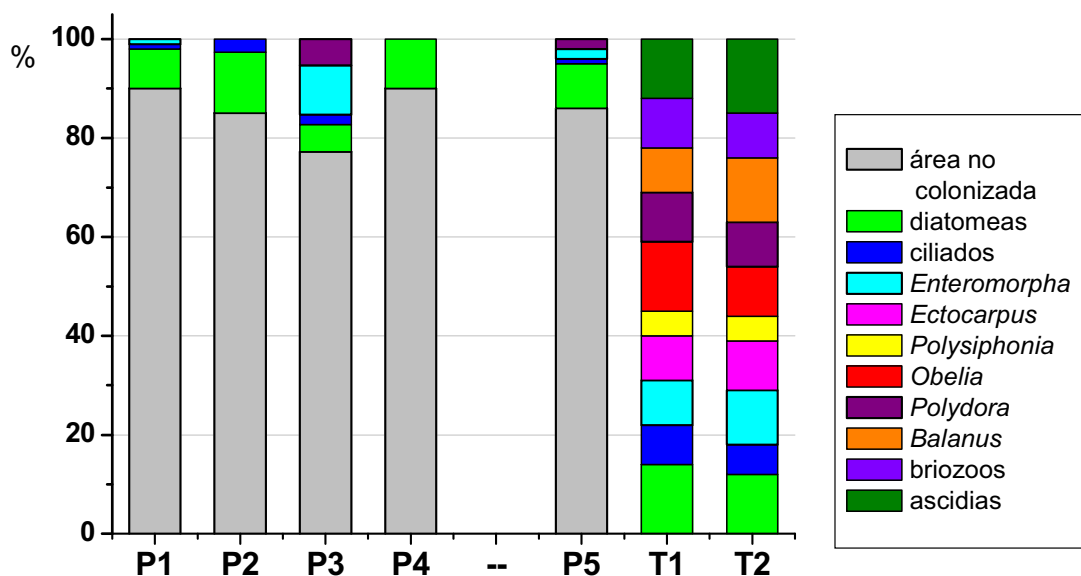


Figura 25. Porcentajes de cobertura (especies más conspicuas) vs. área no colonizada del panel. P1/P4: pinturas *core-shell*. P1:  $\text{CO}_3\text{Ca}/\text{CuSCN}$ ; P2:  $\text{ZnO}/\text{CuSCN}$ ; P3:  $\text{SiO}_2/\text{CuSCN}$ ; P4:  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{CuSCN}$ . P5: pintura con 100% de  $\text{CuSCN}$ ; T1: pintura sin pigmento tóxico; T2: panel de acrílico sin pintura.

El propósito en la elección del pigmento en pinturas antifouling es proveer la toxicidad necesaria para impedir la fijación de organismos bentónicos sésiles. Se eligió el tiocianato cuproso debido a que su bioactividad es similar a la del óxido cuproso, al igual que su solubilidad en agua de mar y el compuesto obtenido por su disolución ( $\text{CuCl}_2^{1-}$ ); por otra parte, es menos oxidable lo que aparentemente mejoraría su capacidad antiincrustante (Vetere *et al.*, 1997). Otra ventaja, desde un punto de vista estético, es que su coloración blanca permite al usuario pigmentarlo con el color de su elección.

Se concluye que, por un lado, el tiocianato cuproso es un compuesto antifouling efectivo y su performance es comparable con la del óxido cuproso. Respecto de la reducción en el contenido de cobre es importante destacar que el óxido cuproso presenta 3,32 veces más cobre por unidad de volumen que el tiocianato cuproso y, a su vez, los pigmentos *core-shell* estudiados formados por una delgada capa de tiocianato y un corazón de material inerte, contienen 10 veces menos cobre que el tiocianato cuproso, es decir representan una reducción de 35 veces el contenido de cobre respecto del óxido cuproso. Esta considerable reducción trae aparejados otros beneficios, como la disminución de costos de elaboración de la pintura y del aporte de contaminantes al medio marino; a su vez, una de las pinturas *core-shell* que resultó

más efectiva ( $\text{CaCO}_3/\text{CuSCN}$ ) es de coloración blanca lo que permitiría una pigmentación posterior.

En particular las pinturas con núcleos de carbonato de calcio, óxido de zinc y óxido férrico demostraron mayor poder inhibitorio de la fijación, con una marcada acción antifouling tanto sobre el macro como sobre el microfouling. Sin embargo, queda demostrado que las diatomeas son, indudablemente, organismos muy resistentes a la acción del cobre (lo mismo que algunos ciliados sésiles) y es necesario hallar nuevos inhibidores o bien mecanismos combinados para evitar su asentamiento y desarrollo sobre las superficies a proteger.

# Capítulo 7

Los taninos, compuestos de  
origen natural: propiedades  
antifouling



## Los taninos, compuestos de origen natural: propiedades antifouling

### Introducción

Con el propósito de testear la primera hipótesis en la que proponemos que el uso de compuestos de origen natural, producidos por especies vegetales nativas, o de origen sintético, como los benzoatos, con propiedades antibacterianas pueden evitar la formación del film primario y de esta forma, interrumpir la secuencia de fijación del “biofouling”, se realizaron una serie de ensayos con taninos.

En cada uno de los tratamientos se incluirá la parte experimental y los resultados obtenidos.

#### - *Los taninos, compuestos de origen natural: propiedades antifouling*

Las plantas acumulan una gran variedad de compuestos secundarios entre los que se encuentran los alcaloides, los terpenos y los fenólicos. Si bien estos compuestos no intervienen en el metabolismo primario de las plantas cumplen diversas actividades biológicas ya sea en relación con la toxicidad, con el metabolismo hormonal o bien como agentes protectores contra predadores o enfermedades (Hagerman, 2002).

El término “tanino” es una denominación muy antigua con el que el pueblo celta llamaba al roble y que, por extensión y en función de sus propiedades, pasó a denominar a la sustancia característica capaz de convertir las pieles crudas de animales en cueros. Los taninos son compuestos de origen natural comunes en las plantas superiores y en las algas pardas; la mayoría de las plantas contienen taninos y se pueden localizar en cortezas (abeto, pino, castaña, mimosa, encina, roble, quina), en maderas (quebracho colorado, castaño, encina), en hojas (té, mate, vid, nogal, zumaque), en raíces (granado, hammamelis, ratnia, helecho macho), en frutos (banana, café, níspero, manzana, frutilla, uva) y en formaciones patológicas (agallas de Alepo). También se encuentran presentes en una amplia variedad de alimentos, como por ejemplo legumbres (fabas, porotos), cereales (cebada, sorgo) y en bebidas (té, café, cacao, cerveza, vino tinto, sidra) (Bennick, 2002).

Habitualmente los taninos son definidos como sustancias polifenólicas de alto peso molecular (>500), muy astringentes, solubles en agua, con propiedades para precipitar proteínas y como antioxidantes biológicos (Cowan, 1999; Hagerman, 2002);

sus principales aplicaciones se encuentran en la industria del cuero, en ciencias relacionadas con el medio ambiente (Ho, 1992; Chung *et al.* 1998a; Hagerman, 2002) y en medicina por sus propiedades anticarcinogénicas y antioxidantes celulares (Hagerman *et al.*, 1998; De Bruyne *et al.*, 1999; Oszmianski *et al.*, 2007; Pastene *et al.*, 2010). Otras aplicaciones conocidas de los taninos están relacionadas con la inhibición de la corrosión (Knowles y White, 1958; Matamala *et al.*, 2000; Martínez y Stern, 2001) y la intervención como formadores de quelatos con iones metálicos (Cruz *et al.*, 2000).

Los taninos son moléculas altamente complejas y de difícil dilucidación, por lo tanto no constituyen un grupo homogéneo y químicamente se clasifican en tres grupos (Hagerman, 2002):

- *Florotaninos*

Los florotaninos (1,3,5-trihidroxibenceno) son polifenoles, polímeros del floroglucinol, presentes en algas pardas (Phaeophyta) que se caracterizan por ser fuertes agentes quelantes de metales pesados en solución. Se encuentran empaquetados en pequeñas vacuolas denominadas fisodos ('physodes') en el interior celular, que intervienen en el desarrollo de la pared celular y actúan como un mecanismo interno de detoxificación. Generalmente, son utilizados en la producción de alimentos, cosmética y en la industria farmacéutica como antialérgicos (Sugiura *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009).

Las superficies algales ofrecen un sustrato adecuado para el asentamiento de epibiontes y, sin embargo, raramente se encuentran colonizadas. Es bien conocido que las macroalgas marinas y sus bacterias asociadas son ricas en compuestos con propiedades repelentes o que impiden el asentamiento y metamorfosis de las larvas (Phillips y Towers, 1982; Schmitt *et al.*, 1995; Clare, 1996; Lau y Qian, 1997; Steinberg *et al.*, 1998; de Nys y Steinberg, 1999). En este sentido, los florotaninos presentes en algas pardas son de los compuestos que más se han estudiado desde el punto de vista de su acción antifouling ya que inhiben el crecimiento de una gran variedad de bacterias, algas e invertebrados habiéndose generado un gran caudal de publicaciones sobre el tema (McLachlan y Craigie, 1964; Sieburth y Conover, 1965; Conover y Sieburth, 1966; Fletcher, 1975; Jennings y Steinberg, 1977; Pawlik, 1992; Chung *et al.* 1998b; Wikström y Pavia, 2004). En particular, se ha demostrado que florotaninos de *Sargassum tenerrimum* inhibieron el asentamiento del poliqueto *Hydroides elegans* a concentraciones menores a 1 µg/mL (Lau y Qian, 1997).

Durante las últimas décadas se ha focalizado el estudio de los florotaninos en su rol en la cadena trófica, ya que se ha comprobado que cumplen funciones de

defensa química contra herbívoros dado que su producción y concentración está en relación directa con el incremento de este factor, por ejemplo, la exudación de florotaninos en el agua circundante aumenta con la presencia de gasterópodos evitando así su acción de “ramoneo”, también su producción se relaciona con la intensidad de la radiación UV (Ragan y Glombitza, 1986; Clausen *et al.*, 1992; Targett y Arnold, 2001; Amsler y Fairhead, 2006; Koivikko *et al.*, 2005; Koivikko, 2008).

- *Taninos hidrolizables*

Son polímeros formados por ácidos fenólicos, particularmente por ácido gálico y ácido elágico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), poseen en el centro de la molécula un carbohidrato (generalmente la D-glucosa) y se hidrolizan con facilidad. Están presentes en algunas algas verdes, en dicotiledóneas y en angiospermas (Waterman y Mole, 1994; Gross, 1999). Tienen propiedades antivirales, antibacterianas y pueden actuar contra algunos microorganismos eucariotas (Buzzini *et al.*, 2008).

- *Taninos condensados*

Conocidos también como proantocianidinas, están formados por unidades de flavonoides (entre 2 y 50) enlazadas por uniones C-C y se los encuentra en todas las plantas, incluidas las Gimnospermas (Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Santos-Buelga y Williamson 2003). Son utilizados como agentes antifúngicos, antilevaduras y antibacterianos (Zucker, 1983; Scalbert, 1991; Digrak *et al.* 1999; Min *et al.*, 2008) aunque los mecanismos de acción no se conocen con exactitud (Schofield *et al.*, 2001).

Se comprobó que pueden actuar sobre distintas especies de helmintos, en particular sobre nematodos parásitos, posibilitando una alternativa en el control de infestaciones parasitarias en los trópicos y subtrópicos (Athanasiadou *et al.*, 2001; Iqbal *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003).

Comúnmente se los utiliza como preservantes de maderas y repelentes de insectos adicionándoles cobre (Laks *et al.*, 1988; Yamaguchi *et al.*, 2002). Los taninos condensados, como los florotaninos, presentan variaciones estructurales en sus moléculas y se ha demostrado que existe una relación directa con la capacidad de evitar el “ramoneo” por parte de herbívoros (Clausen *et al.*, 1990; Mole *et al.*, 1993).

La propiedad antimicrobiana es la característica más relevante de los taninos frente a la problemática de las incrustaciones biológicas (Banso y Adeyemo, 2007); se han reportado, entre otras, propiedades bacteriostáticas o bactericidas contra *Staphylococcus aureus* (Chung *et al.*, 1993).

A pesar de las propiedades antimicrobianas de los taninos, existen en la naturaleza numerosos microorganismos capaces de degradarlos, por ejemplo las bacterias del rumen de los rumiantes que poseen la enzima tanasa (Deschamps, 1989; Saxena *et al.*, 1995; Bhat *et al.*, 1998) y los hongos *Ceriporiopsis subvermispora* y *Cyathus stercoreus* (Gamble *et al.*, 1996). Por otra parte, numerosas especies de hongos se desarrollan sobre la superficie de maderas ricas en taninos como las de quebracho y robles europeos. Particularmente *Aspergillus niger* y *Penicillium glaucum* se desarrollan en superficies con líquidos utilizados en curtiembres (Rajakumar y Nandy, 1983; Scalbert, 1991).

## **Materiales y métodos**

Es importante conocer el modo de acción de cada uno de los taninos como antiincrustante, tanto para la fijación del micro como del macrofouling. Se realizarán experiencias con taninos de quebracho, mimosa y castaño. En esta primera fase del estudio se plantea la necesidad de seleccionar los que resulten más convenientes por su efectividad y factibilidad de obtención.

Los taninos utilizados para los ensayos fueron los de quebracho, mimosa y castaño que son los más comunes de venta comercial.

### **- Ensayos de laboratorio**

Para realizar los ensayos de laboratorio los taninos de quebracho, castaño y mimosa fueron incorporados a pinturas de tipo matriz soluble cuya composición se detalla en la Tabla 23.

Dado que los taninos son compuestos altamente solubles fueron incorporados a la formulación de pintura precipitados como “tanatos” lográndose, de este modo, una menor solubilidad y un control de la lixiviación.

Se aplicaron tres capas de pintura sobre los portaobjetos de vidrio obteniéndose una película seca de  $150 \pm 5$   $\mu\text{m}$  de espesor. Posteriormente fueron colocados en vasos de precipitado conteniendo 1000 mL de agua de mar artificial (ASTM D1141/75) con el propósito de obtener los lixiviados correspondientes a 24, 48 y 72 horas.

La concentración de tanino en cada solución fue estimada por medio de técnicas colorimétricas.

Tabla 23. Composición de las pinturas tipo matriz soluble ensayadas (% en volumen).



tanato	16,0
carbonato de calcio	2,9
resina colofonia	27,0
ácido oleico	5,9
xileno	24,1
aguarrás mineral	24,1

- *Técnica colorimétrica*

La espectroscopía UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas y para determinar la concentración de una sustancia que contenga estos grupos, es decir en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados. El fundamento de este procedimiento consiste en que cuando un haz de radiación UV-visible atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz ( $I_0$ ) es atenuada hasta un valor  $I$ . Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra se denomina transmitancia ( $T$ ) ( $T = I/I_0$ ). Por cuestiones de practicidad, se utilizó el valor de la absorbancia ( $A$ ) en lugar del de transmitancia ( $A = -\log T$ ) por relacionarse linealmente con la concentración de la especie absorbente según se postula en la Ley de Beer-Lambert. La absorción de las radiaciones UV-visible depende de la estructura de las moléculas y es característica para cada sustancia química.

Para la implementación de esta técnica en el laboratorio, se utilizó un espectrofotómetro UV-visible marca Metrolab, modelo RC 250 UV.

El tanino procedente de la lixiviación de las pinturas fue cuantitativamente precipitado con una solución al 5% de sulfato de aluminio en medio amoniacal. Este precipitado fue filtrado y redissuelto en ácido nítrico al 20% con el propósito de facilitar una coloración que permita ser medida por espectrofotometría.

- *Ensayos de toxicidad*

Para los ensayos de toxicidad de taninos de quebracho, castaño y mimosa se utilizaron 30 nauplii II de *Balanus amphitrite* extraídas del plancton obtenido en los muestreos en el puerto de Mar del Plata.

Las larvas fueron colocadas en cristalizadores conteniendo 50 mL de lixiviados de las pinturas en varias concentraciones (obtenidas en distintos tiempos de exposición) y se observó la movilidad de los apéndices y la respuesta fototáctica de las larvas expuestas a las soluciones cada 15 minutos.

Estos ensayos se realizaron en agua de mar artificial, la temperatura ambiente osciló entre 18 y 20°C, los valores de pH de las soluciones variaron entre 7,9 y 8,2 y con abundante aireación. Simultáneamente se colocaron recipientes testigo con idéntica cantidad de agua de mar sin el agregado de ninguna sustancia.

Con el propósito de diferenciar la acción antiincrustante de los taninos de los otros componentes de la pintura, se realizaron otros ensayos en forma simultánea. Para estimar el efecto de la resina y el solvente empleados en la formulación sobre la supervivencia de las larvas, se dispusieron recipientes con las mismas condiciones pero con portaobjetos pintados únicamente con resina colofonia disuelta en aguarrás.

- *Test de recuperación ('refreshing')*

Posteriormente se analizó si el efecto de los tanatos sobre las larvas expuestas era temporario o permanente. Las larvas fueron trasladadas a recipientes con agua de mar artificial fresca para su recuperación y se las alimentó con una solución al 2% de alimento para invertebrados (Tetramin®) en agua de mar artificial. Los ensayos de laboratorio se realizaron por triplicado.

- *Ensayos en campo*

Los ensayos se llevaron a cabo en el Club de Motonáutica de Mar del Plata. Se aplicó la misma pintura que en el laboratorio (Tabla 23) sobre paneles de acrílico, arenados, de 8 cm x 16 cm, hasta que se obtuvo un espesor de película seca de  $150 \pm 5 \mu\text{m}$ .

Como testigos se colocaron paneles de acrílico arenados limpios y series de paneles pintados con la misma formulación pero sin el agregado del pigmento antiincrustante.

Los paneles fueron sostenidos desde las marinas del Club y sumergidos a 50 cm por debajo de la superficie del agua.

Tanto los ensayos de laboratorio como los de campo se realizaron por triplicado.

## Resultados

En los ensayos de laboratorio, se obtuvieron por espectrofotometría las concentraciones de los lixiviados de la resina colofonia y de los tres tanatos analizados (Tabla 24).

La reacción de las nauplii en contacto con las distintas soluciones fue coincidente para los tres tipos de tanatos. Se observó una reducción en los movimientos de los apéndices natatorios hasta su completa inmovilización y la pérdida de respuesta fototáctica. Estos cambios de comportamiento fueron más rápidos y evidentes a medida que se incrementó la concentración de tanato.

Tabla 24. Concentraciones de tanato y resina en función del tiempo. Los datos se expresan en ppm.

	<b>solución 24 horas</b>	<b>solución 48 horas</b>	<b>solución 72 horas</b>
resina colofonia (ww)	20,0	33,7	40,0
tanato de quebracho	3,5	5,9	7,0
tanato de castaño	3,2	5,3	6,3
tanato de mimosa	4,7	8,0	9,5

Los resultados obtenidos del efecto de cada uno de los tanatos sobre la supervivencia de las nauplii se presentan en las Figs. 26-28, en tanto que el efecto de la resina sobre las larvas se detalla en la Fig. 29.

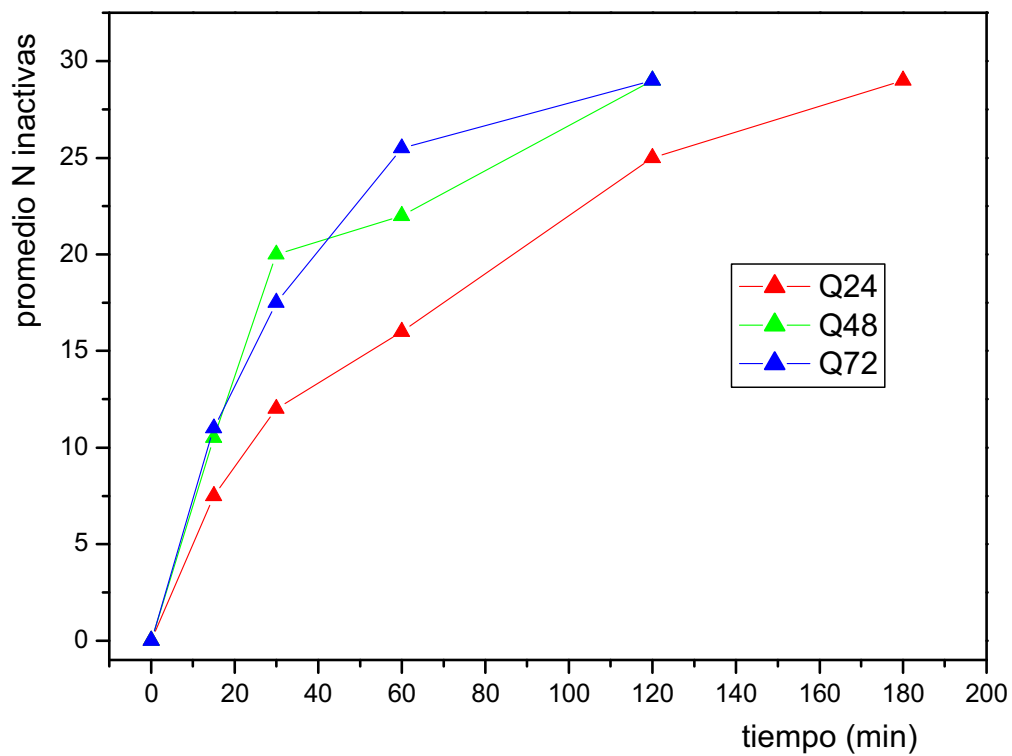


Figura 26. Promedio de nauplii inactivas en función del tiempo en lixiviados de 24, 48 y 72 horas de tanato de quebracho (Q24, Q48 y Q72, respectivamente).

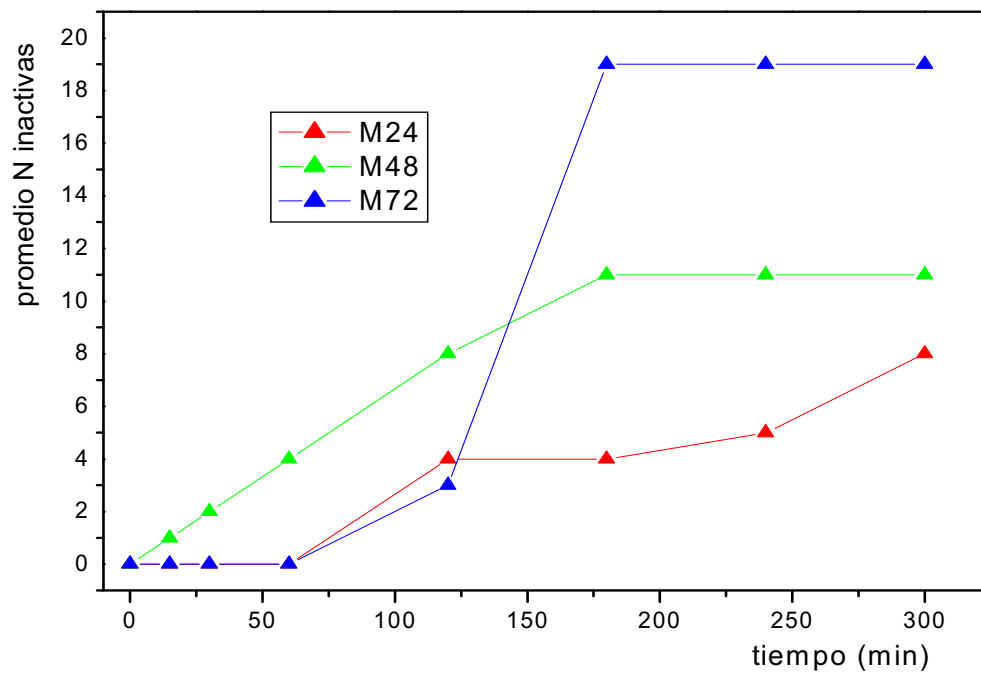


Figura 27. Promedio de nauplii inactivas en función del tiempo en lixiviados de 24, 48 y 72 horas de tanato de mimosa (M24, M48 y M72, respectivamente).

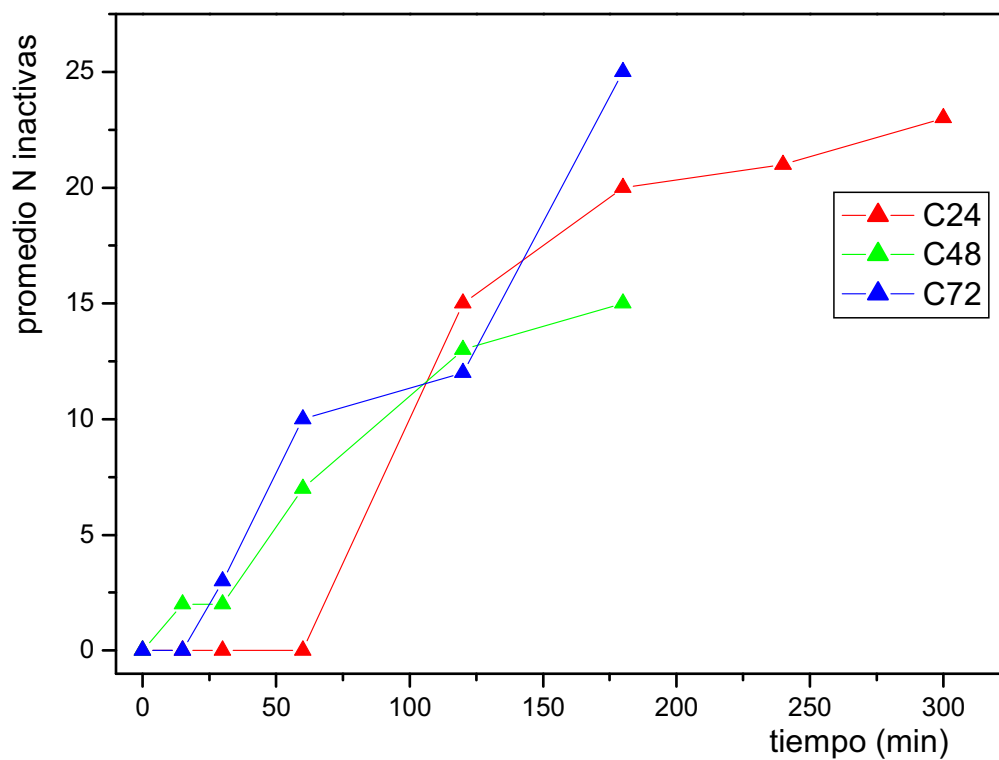


Figura 28. Promedio de nauplii inactivas en función del tiempo en lixiviados de 24, 48 y 72 horas de tanato de castaño (C24, C48 y C72, respectivamente).

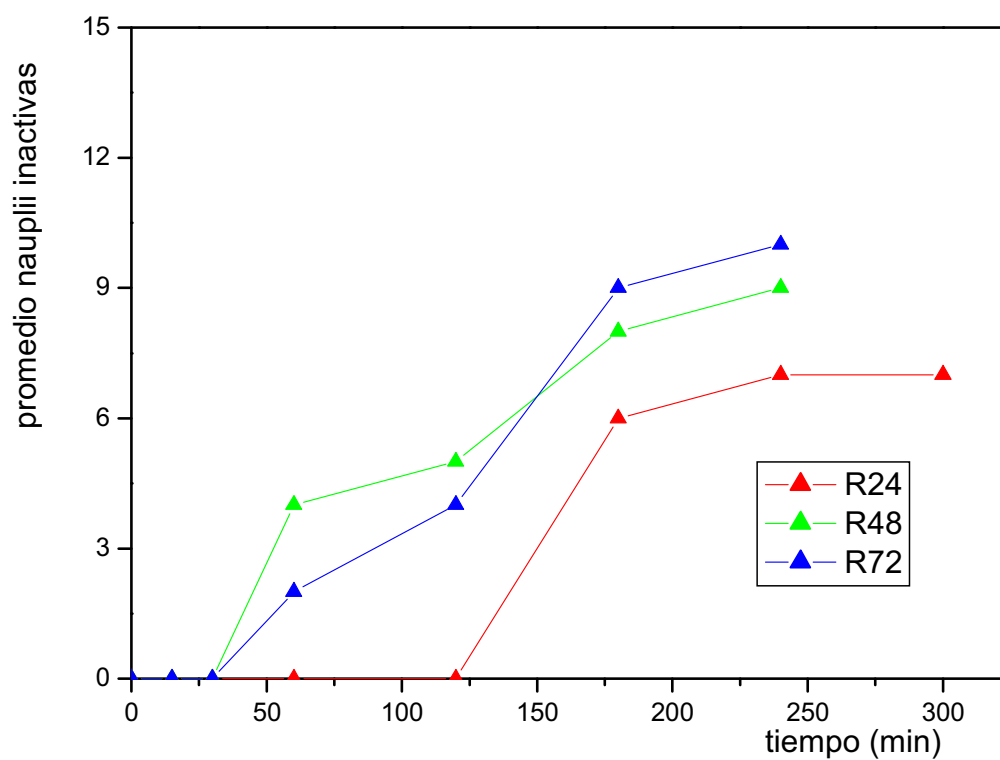


Figura 29. Promedio de nauplii inactivas en función del tiempo en lixiviados de resina para 24, 48 y 72 horas (R24, R48 y R72, respectivamente).

Los tres tanatos analizados demostraron que afectan la supervivencia de las larvas.

El tanato de quebracho mostró un marcado efecto inhibitor de la actividad larval, observado a los 15 minutos de exposición. Por otra parte se registraron diferencias respecto al efecto de la concentración de tanato en solución, ya que las soluciones Q48 y Q72 actuaron más rápidamente que la Q24. El tiempo estimado para inhibir el 50% de la población fue de 22,5 minutos.

La solución M72 del tanato de mimosa, logró el 50% de inmovilización larval en 175 minutos, en tanto que las soluciones menos concentradas (M24 y M48) no alcanzaron este valor aún después de 24 horas de exposición.

El tanato de castaño también mostró un rápido efecto inhibitor, si bien las tres soluciones afectaron al 50% de la población larval en aproximadamente 120 minutos, la C24 resultó la más efectiva.

Por otra parte, las nauplii expuestas a la resina colofonia no mostraron diferencias significativas en su comportamiento respecto del control ya que el efecto inhibitor de la actividad natatoria afectando al 50% de la población excedió el tiempo máximo destinado para las observaciones.

Se comprobó que en los controles de agua de mar como en los de resina + solvente, las larvas se mantuvieron activas, con respuesta fototáctica positiva y completaron sus ciclos de vida.

Comparando los valores obtenidos de  $It_{50}$  de nauplii de *B. amphitrite* en función de las distintas concentraciones de los tres tanatos analizados se detectó que todos poseen rápida acción. Sin embargo, el tanato de quebracho y el de castaño actúan a bajas concentraciones, mientras que el de mimosa actúa eficientemente a concentraciones más altas (Fig. 30).

Los tests de recuperación indicaron que el efecto observado de inmovilidad larval fue temporario o narcótico, ya que cuando las nauplii tomaron contacto con el agua de mar fresca, comenzaron a nadar activamente y directamente hacia la fuente de luz.



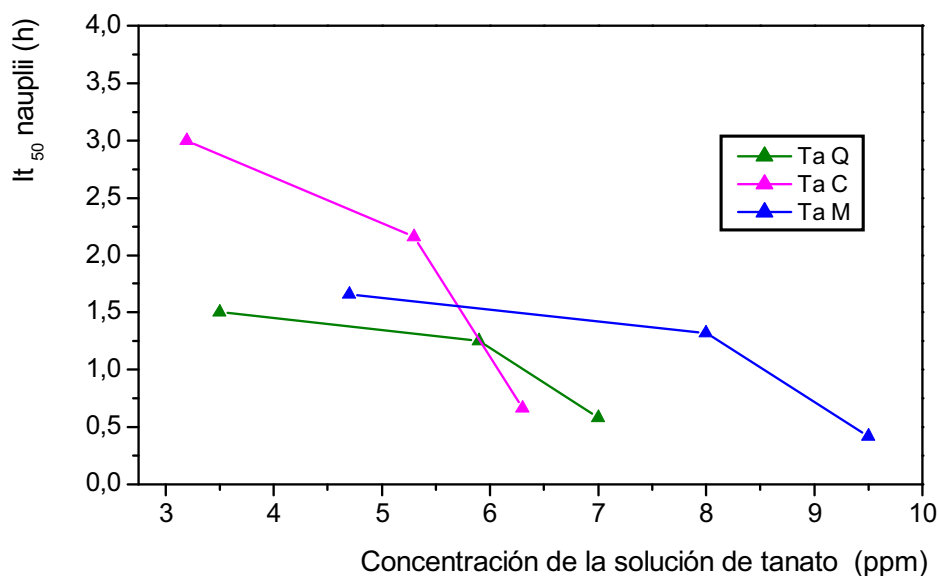


Figura 30. Valores de  $It_{50}$  para nauplii de *B. amphitrite* en función de distintas concentraciones de tanato de quebracho (Ta Q), tanato de mimosa (Ta M) y tanato de castaño (Ta C).

Las pinturas formuladas con tanatos analizadas en el laboratorio, fueron también efectivas en la inhibición del “biofouling” del puerto de Mar del Plata. Esto se comprobó después de que los paneles de prueba estuvieran en exposición durante cuatro meses (diciembre/abril) en el mar. El efecto más notorio se observó sobre la fijación de *B. amphitrite* donde se registraron diferencias significativas respecto de los paneles control de pintura sin pigmento antiincrustante y de los de acrílico limpio.

Los resultados fueron coincidentes con los observados en condiciones de laboratorio, es decir los tanatos afectaron la fijación de *B. amphitrite*, el mejor efecto antiincrustante se observó en la performance lograda para las pinturas que incluyeron tanatos de quebracho y castaño.

Se registró una disminución en el asentamiento del poliqueto *Polydora* sp. y de las algas *Enteromorpha intestinalis* y *Ectocarpus* sp. en los paneles tratados respecto de los controles.

Es interesante destacar que en los paneles tratados no se observó inhibición completa y tampoco pudo evitarse el asentamiento de algunas especies de diatomeas.

Además se comprobó que la película de pintura de los paneles también afectó el mecanismo de cementación de los organismos al sustrato, induciendo a una adhesión deficiente que se comprobó en el momento que los paneles fueron retirados del agua ya que los organismos adheridos se desprendieron con facilidad.

En los paneles testigo la fijación fue muy abundante, se registraron *B. amphitrite*, con diámetro de base entre 8 y 10 mm, que cubrieron aproximadamente el 50% del panel, numerosos tubos arenosos de *Polydora* sp. y algas (*E. intestinalis* y *Ectocarpus*).

# Capítulo 8

Hacia una reducción en el  
contenido de cobre de las pinturas.  
Taninos combinados con cobre



## **Hacia una reducción en el contenido de cobre de las pinturas. Taninos combinados con cobre**

### **Introducción**

La obtención de una pintura antiincrustante no tóxica y biodegradable demandará tiempo, ya que requiere la puesta a punto de la formulación, la evaluación de riesgo ecotoxicológico, la producción a escala industrial y la inclusión en el mercado. Por esta razón, en tanto no se desarrolle una pintura que cumpla con todos estos requisitos resulta conveniente encontrar formulaciones alternativas, de transición, que apunten a la reducción del contenido de las sustancias tóxicas, manteniendo una buena performance, sin dañar el medio ambiente.

Se realizaron una serie de ensayos, en laboratorio y en el mar, incorporando a las pinturas un pigmento antiincrustante basado en tanino de quebracho al que se le adicionó pequeñas cantidades de cobre.

Se eligió el tanino de quebracho por su probado poder antiincrustante, por su bajo costo y accesibilidad en el mercado. Si bien el efecto antiincrustante fue probado, no impidió el asentamiento de algunas especies, por eso se le agrega a la formulación pequeñas cantidades de cobre para ser optimizada y lograr una acción conjunta sobre los organismos.

### **Materiales y métodos**

Para la síntesis del pigmento antifouling se utilizó tanino de quebracho. El procedimiento consistió en la disolución de 10 g de tanino en 500 mL de agua caliente; esta solución juntamente con otra de 40 mL de sulfato cúprico 1M fue goteada simultáneamente en un vaso de precipitado conteniendo 500 mL de solución de hidróxido de sodio 0,04 M, con agitación constante y a una temperatura de 60°C, a fin de precipitar el tanato de cobre. Por último, se ajustó el pH a un valor de 5,5 agregando una solución al 40% (v/v) de hidróxido de potasio. Una vez precipitado el pigmento, la solución se filtró a través de un embudo Büchner, se lavó con agua destilada y se secó a temperatura ambiente. Para obtener un tamaño de partícula adecuado se realizó una molienda del tanato cúprico en un molino de bolas de porcelana.

*- Caracterización del pigmento*

La composición del tanato cúprico obtenido se determinó mediante el empleo de técnicas analíticas. Asimismo se estudiaron características físicas y químicas del pigmento tales como densidad, pH y solubilidad en agua de mar a temperatura ambiente.

La concentración de tanato soluble fue estimada por medio de técnicas colorimétricas. El tanato disuelto se precipitó con 5%  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  en un medio buffer de  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$  (2 M: 2 M) y luego fue disuelto en una solución de ácido nítrico (4:1 en volumen). El catión aluminio fue complejado con ácido cítrico en medio amoniacal. La concentración de tanato se determinó por comparación con soluciones patrón de tanato preparadas en condiciones similares. Finalmente la concentración de cobre en agua de mar fue determinada por espectrofotometría de absorción atómica.

A partir de esta solución se realizaron diluciones entre 1 y 100% a fin de determinar los límites de tolerancia de las larvas al pigmento en estudio.

*- Elaboración de las pinturas y ensayos de toxicidad*

Las pinturas de tipo matriz soluble conteniendo tanato cúprico como pigmento antiincrustante fueron formuladas a base de resina colofonia como ligante, ácido oleico como plastificante y estearato de aluminio como agente reológico (este último para dar más fluidez a la formulación).

Las pinturas fueron preparadas en la Planta Piloto del CIDEPINT para lo cual se utilizó un molino de bolas con jarras de 3,3 litros de capacidad que fueron cargadas primeramente con el ligante, luego con el tanato cúprico, carbonato de calcio y estearato de aluminio (2% en peso) (Tabla 25). El PVC (concentración de pigmento en volumen) fue de 37% y el proceso de dispersión se llevó a cabo durante 24 horas.

Tabla 25. Composición de las pinturas.

componentes	% en volumen
tanato cúprico	16,0
carbonato de calcio	2,9
resina colofonia	27,0
ácido oleico	5,9
xileno	24,1
aguarrás mineral	24,1

Las pinturas antifouling preparadas fueron aplicadas sobre portaobjetos de vidrio (75 x 25 mm) que se colocaron en vasos de precipitado de 1000 mL conteniendo agua de mar artificial; los lixiviados obtenidos luego de 24, 48 y 72 horas fueron utilizados para exponer larvas a fin de determinar el efecto de concentraciones crecientes del pigmento en estudio.

#### - Ensayos de asentamiento en laboratorio

Se pintaron las bases de cristalizadores de 50 mm de diámetro con tres capas de pintura antiincrustante con períodos de secado de 24 horas entre cada mano. Luego del secado, cada cristalizador se lavó tres veces con agua de mar artificial con el propósito de remover cualquier tipo de residuo de la superficie de la pintura. Posteriormente, se incorporó 50 mL de agua de mar artificial en cada recipiente y de esta forma se iniciaron los ensayos biológicos.

Los tests de asentamiento se llevaron a cabo en forma separada, por un lado con 10 cypris de *Balanus amphitrite* y en otros cristalizadores con 10 larvas de 15-16 setígeros de *Polydora* sp. y arena de granulometría fina. Las observaciones se realizaron bajo estereomicroscopio cada 5 minutos durante la primera hora de exposición y al cabo de 24 horas.

#### - Obtención de larvas

Las larvas fueron obtenidas del plancton del puerto de Mar del Plata. Las muestras se trasladaron a La Plata en recipientes térmicos con hielo y se separaron las larvas de *B. amphitrite* y *Polydora* sp.

En cada ensayo se utilizaron 30 larvas (nauplii II/ cypris de *B. amphitrite* o larvas de 15-16 setígeros de *Polydora* sp.) que se adicionaron con una pipeta Pasteur a 50 mL de las soluciones en estudio.

Los parámetros que se registraron para las larvas fueron movilidad de los apéndices, respuesta táctica a la luz (fototactismo) y, para los ensayos de asentamiento, el porcentaje de larvas fijadas. Asimismo, se registró la recuperación en agua de mar artificial luego de la exposición a las distintas soluciones.

#### - Ensayos en el mar

En los ensayos en el mar se utilizaron paneles de acrílico de 8 x 16 cm, arenados y desengrasados con tolueno, a los que se les aplicó la pintura antiincrustante a base de tanato cúprico con pincel. El grado de rugosidad medio (Rm) obtenido luego del arenado fue de 21  $\mu\text{m}$ , se obtuvo por barrido de la superficie de los

paneles en sentido transversal y longitudinal con un Rugosímetro Hommel Tester, P-3 n-z, con graficador.

Se aplicaron tres manos de pintura antiincrustante a base de tanato cúprico con períodos de secado de 24 horas entre cada una, hasta obtener un espesor final de película seca de  $150 \pm 5 \mu\text{m}$ .

Una vez secos, se dispusieron un total de doce tiras de tres paneles cada una colgadas de las marinas del Club de Motonáutica en el puerto de Mar del Plata, a una profundidad de 50 cm por debajo de la superficie del agua. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Por otra parte, se utilizaron dos pinturas como control, una de ellas es una pintura tradicional a base óxido cuproso y otra la misma pintura ensayada sin el agregado de pigmento antiincrustante.

Una tercera serie de paneles control, arenados y desengrasados, fue colgada de las marinas como patrón para registrar el desarrollo de la comunidad.

Los paneles expuestos durante los períodos establecidos se retiraron y observaron bajo lupa binocular en el laboratorio. La estimación de la fijación se evaluó por medio de una grilla donde se eligieron 25 puntos al azar (generados por un software) y se registró la abundancia para cada especie del macro y del microfouling, para este último caso se tomaron tres muestras y se observaron bajo microscopio óptico. Se utilizó la tabla de abundancias relativas: R=0-25%, E=26-50%, F=51-75%, A=76-100%.

## **Resultados**

Es bien conocido que las moléculas de taninos son muy complejas y de alto peso molecular. El tanino de quebracho utilizado en estos estudios está compuesto por varios productos entre los cuales el más relevante se presenta en la Fig. 31.

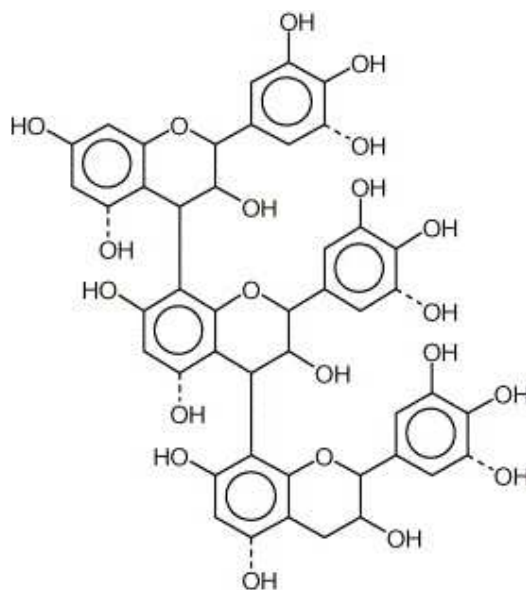


Figura 31. Estructura propuesta para el tanino de quebracho.

El análisis químico para obtener la composición del pigmento tanato cúprico y sus impurezas se detalla en la Tabla 26, los datos se expresan en porcentajes en peso debido a que el compuesto precipitado no mantiene relaciones estequiométricas. Por otra parte, las propiedades físicas y químicas del pigmento se especifican en la Tabla 27. Es importante destacar que el valor de pH de 6,48 obtenido resulta adecuado tanto para la disolución de la matriz de colofonia como para el desarrollo larval.

Tabla 26. Composición del tanato cúprico.

componentes	% en peso
tanato	69,9
cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ )	13,2
potasio ( $\text{K}^+$ )	2,4
sodio ( $\text{Na}^+$ )	0,3
pérdida a 100°C	14,2

Tabla 27. Propiedades físicas y químicas del tanato cúprico.

pH	densidad ( $\text{g/cm}^3$ )	solubilidad (en AMA) tanato (ppm)	solubilidad (AMA) cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ , mM)
6,48	1,13	0,2	0,82



- Ensayos de toxicidad

Los resultados de los ensayos biológicos demuestran que el tanato cúprico fue efectivo en la inhibición de los movimientos natatorios y respuesta fototáctica de nauplii de *B. amphitrite* y larvas de *Polydora* sp., esta respuesta fue más rápida a medida que fue incrementándose la concentración del compuesto en agua de mar (Fig. 32). A concentraciones mayores de 10% v/v de la solución saturada del producto la respuesta larval fue prácticamente inmediata, por debajo de este valor el efecto de inmovilización fue más rápido en las nauplii de *B. amphitrite* que en las larvas de *Polydora* sp. En los lixiviados de pinturas la tendencia fue similar, es decir, las larvas fueron gradualmente reduciendo la actividad natatoria y perdieron la respuesta fototáctica. Coincidiendo con los resultados hallados en solución la sensibilidad fue mayor en nauplii de *B. amphitrite* en relación con *Polydora* sp. (Fig. 33).

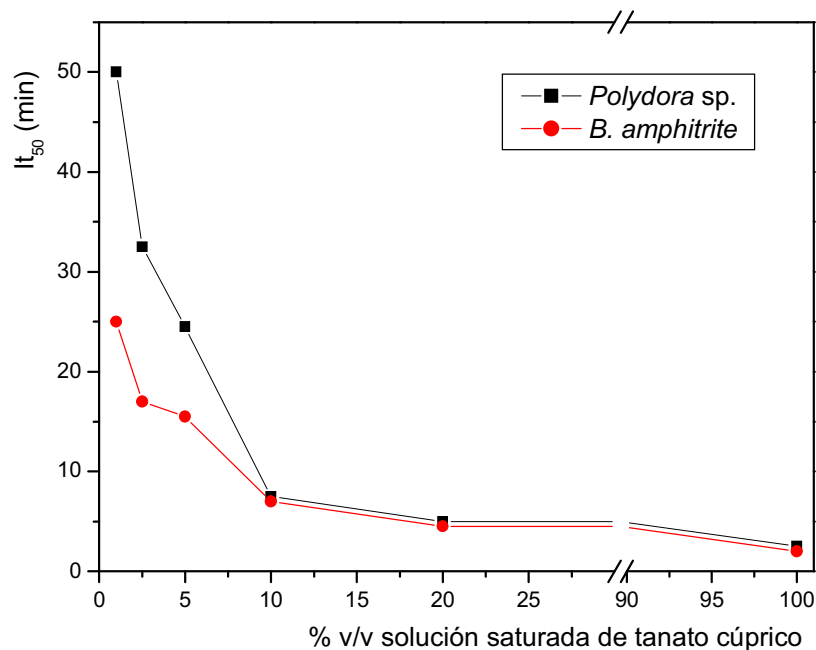


Figura 32. Tiempo de inactividad ( $It_{50}$ ) en función de la concentración de tanato cúprico en solución.

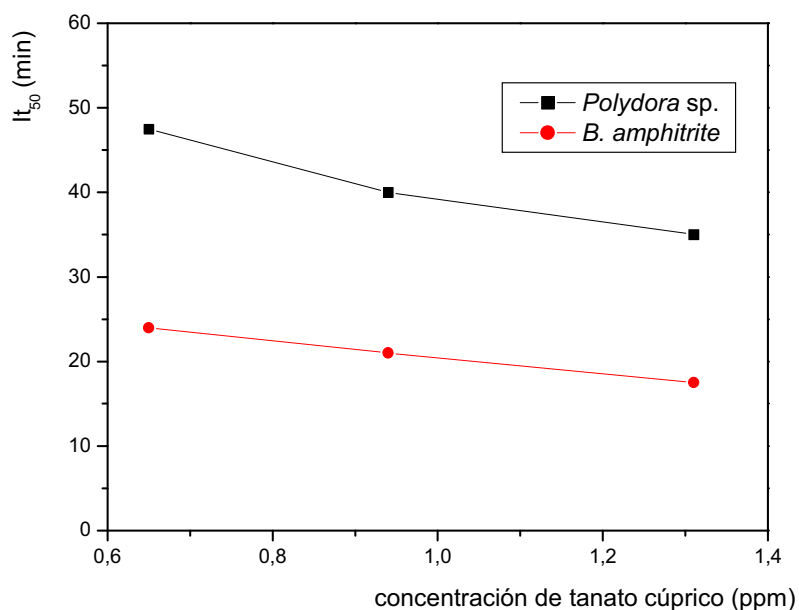


Figura 33. Tiempo de inactividad ( $It_{50}$ ) para *B. amphitrite* y *Polydora* sp. en función de la concentración de tanato cúprico lixiviado de las pinturas.

#### - Ensayos de asentamiento

Las observaciones bajo estereomicroscopio durante los primeros 60 minutos de exposición evidenciaron que las cypris exploran la superficie pintada, examinan el sustrato con sus anténulas y finalmente se alejan de ella.

Luego de 24 horas de exposición a los lixiviados de las pinturas las cypris no se asentaron, permanecieron inmóviles en el fondo y con sus valvas completamente cerradas. Esta respuesta se pudo comprobar para el 100% de las larvas.

En lo que respecta a la reacción de las larvas de *Polydora* sp., durante los primeros 60 minutos respondieron con movimientos de “contorsión” del soma y de sus palpos; al cabo de 24 horas de exposición se registró la formación de pocos tubos arenosos pero con muy baja adherencia y no lograron completar su cementación al sustrato. En esta especie el habitáculo actúa también como un aislante ya que evita el contacto directo del organismo con la superficie pintada.

#### - Test de recuperación

Las larvas utilizadas para los ensayos se trasladaron a agua de mar artificial limpia a fin de estimar porcentajes de recuperación. Los resultados indicaron que la totalidad de los organismos expuestos pudieron recuperarse y completar sus ciclos de vida. Los resultados indican claramente que el tanato cúprico también, al igual que los

tanatos ensayados previamente, posee un efecto inmovilizador temporario sobre los organismos.

*- Ensayos en el mar*

Los paneles con pinturas conteniendo tanato cúprico se expusieron durante 12 meses en el puerto de Mar del Plata. Se realizaron muestreos cada 30 días y los registros evidenciaron la ausencia de organismos del macrofouling. Sin embargo, pudo detectarse la presencia de biofilm formado básicamente por diatomeas aunque con una muy baja adhesión al sustrato.

Los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias significativas entre los paneles pintados y el control de pintura sin pigmento y respecto de los acrílicos limpios ( $p < 0,05$ ). En estos dos últimos se registró una gran densidad y diversidad de organismos incrustados y un 100% de fijación (Figs. 34-35).

Las abundancias relativas por especie a lo largo del tiempo estimadas para los paneles pintados con tanato cúprico, la pintura sin pigmento y el acrílico se detallan en la Tabla 28.

Respecto de los paneles pintados con pintura antiincrustante tradicional a base de óxido cuproso pudo comprobarse una buena performance del producto ya que no se registró la presencia de macro ni de microfouling (Fig. 36).

Las pinturas ensayadas a base de tanato cúprico demostraron una marcada actividad antiincrustante. Estos resultados son altamente satisfactorios dado que el contenido de cobre empleado en esta formulación es del orden de 40 veces menor en relación al que se utiliza habitualmente en las pinturas tradicionales de óxido cuproso.



Figura 34. Paneles expuestos en el Puerto de Mar del Plata durante 12 meses; panel superior: pintura de tanato cúprico; panel inferior: control de acrílico.



Figura 35. Detalle de ambos paneles. Izquierda: pintura de tanato cúprico; derecha: control de acrílico.



Figura 36. Paneles pintados con pintura antiincrustante tradicional a base de óxido cuproso (tres paneles superiores) y acrílico limpio (panel inferior). (12 meses de inmersión).

Tabla 28. Abundancias relativas en paneles pintados en comparación a paneles testigos en función del tiempo (la fijación estimada corresponde solamente a los anversos).

	tanato cúprico (2 m)	testigo pintado (sin TaCu-2 m)	testigo acrílico (2 m)	tanato cúprico (4 m)	testigo pintado (sin Ta Cu, 4 m)	testigo acrílico (4 m)	tanato cúprico (6 m)	testigo pintado (sin Ta Cu, 6 m)	testigo acrílico (6 m)
<i>Achnanthes</i>	R		R		R	F		R	E
<i>Amphora</i>	R	E	E		E	E		E	E
<i>Grammatophora</i>		E	E	R	R	E	R	E	E
<i>Licmophora</i>	R		E	R	E	E		R	E
<i>Navicula sp.</i>	R	R	F	R	E	F	R	F	F
<i>N.grevillei</i>		E	E	R	E	E		E	F
<i>Nitzschia</i>		E	F		F	F		F	E
<i>N. longissima</i>		E	F	R	R	F	R	E	F
<i>N.closterium</i>		R	E	R	R	F	R	R	E
<i>Melosira</i>	F	E	E	R	E	E	R	F	F
<i>Pinnularia</i>				R	R	R		R	R
<i>Pleurosigma</i>	E	R	E	R	R	E	R	R	E
<i>Zoothamnium</i>				R	F	E		E	E
Tintínidos indet.	R	R	E						R
<i>Enteromorpha</i>					F	F		F	R
<i>Bryopsis</i>	R	R	A						R
<i>Ectocarpus</i>		R	R		F	F		F	E
<i>Polysiphonia</i>					R	R		F	R
<i>Griffithsia</i>					R	R		R	R
<i>Obelia</i>		F	F						R
<i>Polydora sp.</i>					A	F		F	R
<i>Corophium</i>		R	E						R
<i>B. amphitrite</i>		R	R					E	E
<i>Bugula neritina</i>		E	E		E	E		E	E
<i>C. intestinalis</i>					A	A		A	A
<i>Botryllus sp.</i>					A	F		A	A
<i>Bowerbankia</i>		R	R		R	R		R	R



# Capítulo 9

Hacia la eliminación del cobre en  
las pinturas antifouling.  
Experiencias con tanato de aluminio



## **Hacia la eliminación del cobre en las pinturas antifouling. Experiencias con tanato de aluminio**

### **Introducción**

Con los datos de asentamiento obtenidos y la efectividad demostrada por los taninos, se consideró la posibilidad de prescindir completamente del cobre en la elaboración de las pinturas antiincrustantes. Sin embargo, la alta solubilidad del tanino de quebracho resulta inapropiada para incluirlo en una formulación, ya que un grado de lixiviación elevado redunda en una corta vida útil de la pintura y por lo tanto la rápida colonización de organismos.

Se propone, como objetivo particular, evaluar en el laboratorio y en el mar el poder antiincrustante del tanato de aluminio y compararlo con el tanino de quebracho, para ello se preparó en el laboratorio tanato de aluminio, que es un precipitado de menor solubilidad, para ser utilizado en los ensayos.

### **Materiales y métodos**

Se preparó una solución de tanino de quebracho de 1 g/L en agua de mar artificial. La obtención del tanato de aluminio se realizó en el laboratorio a partir de una solución de tanino de quebracho combinada con otra de nitrato de aluminio. El procedimiento se llevó a cabo por goteo simultáneo de ambas soluciones en un vaso de precipitado, con continua agitación a 60°C; el pH de la suspensión del pigmento se ajustó a 4,5-4,7 para evitar la precipitación de óxido de aluminio. Luego del filtrado a través de un embudo Büchner, el pigmento precipitado obtenido fue lavado tres veces con agua destilada y secado al aire a temperatura ambiente. La composición y propiedades físicoquímicas del pigmento, tales como pH y solubilidad del extracto acuoso fueron determinadas por medio de técnicas analíticas (Tabla 29). Los datos se expresan en porcentajes en peso debido a la naturaleza no-estequiométrica del compuesto obtenido; a pesar de ello, la composición es altamente reproducible si se respetan las condiciones de la técnica implementada para su obtención.

Se realizaron diluciones a partir de una solución saturada de tanato de aluminio en agua de mar artificial. Se prepararon cinco diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.



- *Preparación de geles*

Para realizar ensayos de efectividad en el mar se prepararon geles utilizando Phytigel™ (Sigma Chemicals) como soporte inerte de los productos a ensayar. La preparación se llevó a cabo según Henrikson y Pawlik (1995), para ello se disolvieron 3,26 g de gel en 100 mL de agua destilada y se mezcló durante 5 segundos, la mezcla fue calentada en un horno de microondas hasta ebullición y luego se la dejó enfriar lentamente hasta alcanzar los 45°C. En este momento se agregaron 5 mL de suspensión de 100 g/L de tanato de aluminio agitando vigorosamente; una vez homogeneizada la mezcla se volcó en una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro, se dejó enfriar, coagular y finalmente se desmoldó. Con un modo de preparación similar al descrito anteriormente, se elaboraron discos de geles con el agregado de 0,5 g/L de solución de tanino de quebracho.

Por otra parte, una tercera serie de geles fueron preparados sin el agregado de compuestos a fin de obtener discos de geles de control.

Tabla 29. Caracterización del pigmento.

	tanato	aluminio (Al <sup>+3</sup> )
composición (% en peso)	94,5	5,5
composición del extracto acuoso en AMA (ppm)	0,5	4,0
pH del extracto acuoso en AMA	7,28	

- *Recolección de muestras en el puerto de Mar del Plata*

Las experiencias de laboratorio se llevaron cabo con nauplii de *Balanus amphitrite* y larvas de *Polydora* sp. Se colectaron ejemplares adultos del cirripedio de los pilotes del Club de Motonáutica por medio de una espátula, cuidando no dañar sus bases y se realizó un muestreo de plancton.

Los adultos de *B. amphitrite* se acondicionaron en acuarios con suficiente aireación, temperatura ambiente (20±1°C), luz natural y se los alimentó diariamente con nauplii recién eclosionadas del crustáceo *Artemia salina*. Para las experiencias se utilizaron 30 nauplii II de natación activa hacia una fuente de luz. Se las extrajo con pipeta Pasteur y se las expuso a las soluciones en ensayo. Por otra parte, 30 larvas de

*Polydora* sp. de 15-16 setígeros o próximas a este estadio fueron aisladas bajo lupa binocular y acondicionadas con aireación y cultivo de diatomeas como alimento.

#### - *Ensayos en campo*

Los discos de gel con tanino de quebracho o tanato de aluminio fueron colgados desde las marinas del Club de Motonáutica a una profundidad de 50 cm por debajo de la superficie del agua durante un período de 28 días. Dado que el tanino de quebracho es altamente soluble se realizó una inspección adicional a los 15 días de inmersión. Para evaluar la fijación transcurrida en este período se utilizó una grilla de puntos al azar (Foster *et al.*, 1991). Se trabajó con cuadruplicados.

Se aplicó el índice ANOVA de un factor y contrastes LSD y las diferencias fueron consideradas como significativas para  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

Los resultados de la exposición de larvas a las distintas diluciones de tanino de quebracho y tanato de aluminio indican que las soluciones fueron efectivas en la inhibición de la actividad larval de *B. amphitrite* y de *Polydora* sp. *a* siendo la respuesta más rápida a concentraciones mayores.

El efecto observado fue similar para todas las diluciones, esto es, la pérdida del fototactismo y la interrupción de los movimientos de natación.

En el caso de los ensayos con tanino de quebracho los valores de pH para las diluciones estudiadas se mantuvieron entre 7,8 y 8,2, es decir similares a los valores del agua de mar natural y en el rango adecuado para el desarrollo larval.

La respuesta de las cypris a la presencia del tanino de quebracho fue muy rápida, con excepción de la solución de 6,25% v/v (dilución 1:16) que no tuvo efecto.

Las nauplii y las larvas de *Polydora* sp. fueron más resistentes, pero de todas formas fueron afectadas por el compuesto. En la Fig. 37 se observan las curvas de tiempo de inactividad larval en función de las concentraciones de tanino de quebracho.

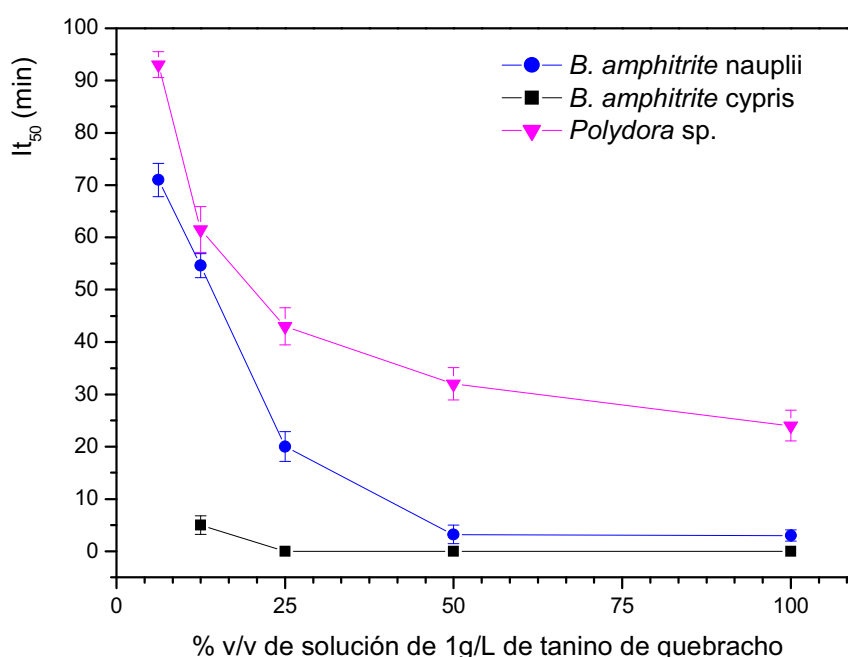


Figura 37. Curvas de tiempo de inactividad para el 50% de las larvas nauplii y cypris de *B. amphitrite* y larvas e 15-16 setígeros de *Polydora* sp. en función de la concentración de tanino de quebracho.

Respecto de las soluciones de tanato de aluminio, también este compuesto demostró actividad inhibitoria sobre las larvas. El efecto observado en cuanto al fototactismo y movilidad de apéndices fue similar al de las soluciones de tanino de quebracho y, coincidentemente, las larvas fueron afectadas por todas las diluciones estudiadas con excepción de la dilución 1:16, es decir 6,25% v/v; no hubo diferencias significativas entre esta última y el control.

Se observaron diferencias en cuanto al pH, en las diluciones estudiadas se registraron valores levemente menores que en el caso del tanino de quebracho y fueron cercanos a 7,28. Sin embargo, este valor no afectó la supervivencia larval dado que, en ensayos complementarios pudo constatarase que las larvas se ven afectadas con valores inferiores a 7 o superiores a 8,5.

En la Fig. 38 se observan las curvas de tiempo de inactividad larval en función de las concentraciones de tanato de aluminio.

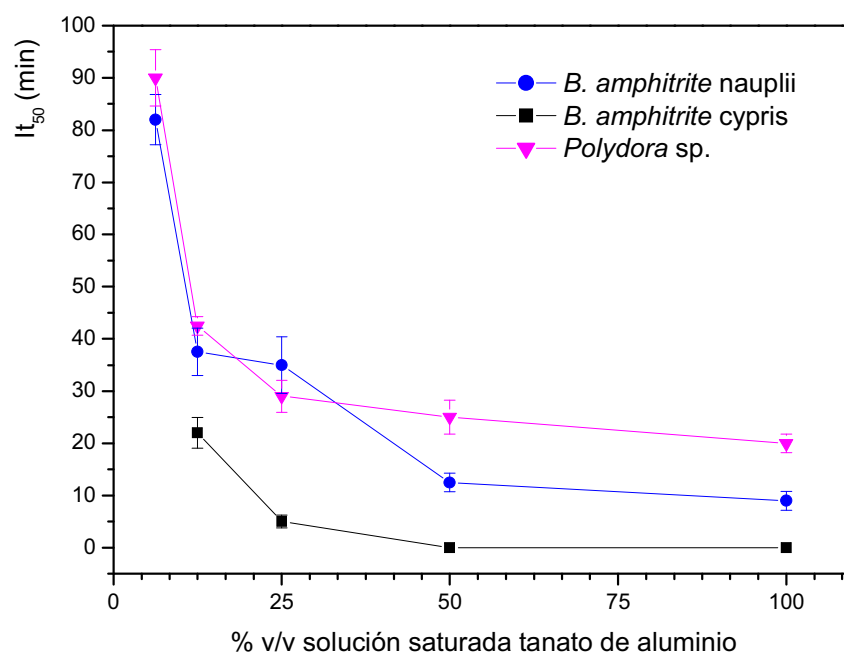


Figura 38. Curvas de tiempo de inactividad para el 50% de las larvas nauplii y cypris de *B. amphitrite* y larvas de 15-16 setígeros de *Polydora* sp. en función de la concentración de una solución saturada de tanato de aluminio.

#### - Ensayos en el mar

Dado que la solubilización del tanino de quebracho es más rápida que la del tanato de aluminio, las inspecciones se realizaron a los 15 y 28 días a fin de obtener un control más exhaustivo del comportamiento de cada compuesto.

Se pudo confirmar que tanto los geles conteniendo solución de tanino de quebracho como los de tanato de aluminio demostraron poder antiincrustante en el mar.

Por cuestiones metodológicas, a los 15 días de exposición los geles no fueron retirados del agua sino que se realizó una inspección visual a fin de estimar cualitativamente la presencia de organismos asentados. Durante esta inspección se comprobó que las superficies de ambos tipos de geles se mantuvieron libres de fijación; en el caso del tanino de quebracho la coloración marrón rojiza característica presupone que el pigmento todavía está contenido en la matriz del gel y por lo tanto aún no está completamente lixiviado.

En la inspección llevada a cabo a los 28 días se observaron diferencias en la fijación de especies tanto del micro como del macrofouling.

En los geles conteniendo tanino de quebracho se comprobó la presencia de abundante fijación, similar en cantidad y densidad a la de los geles testigo. Esto

indicaría que el compuesto se agotó por completo lo que quedó comprobado, una vez en el laboratorio, por su aspecto incoloro.

Se observaron diferencias significativas entre la fijación registrada sobre los geles conteniendo tanato de aluminio respecto de los geles control (Figs. 39-40; Tablas 30-31). Estas diferencias son debidas a las bajas densidades de asentamiento y se verificaron estadísticamente para las diatomeas de los géneros *Amphora*, *Grammatophora*, *Melosira*, *Navicula* y *Pleurosigma* (Fig. 41) y entre los macrofoulers para el asentamiento de *Enteromorpha intestinalis*, *Polydora* sp., *Hydroides elegans* y *Ciona intestinalis* ( $p < 0.05$ ) (Fig. 42). Sin embargo, pudo observarse la presencia de algunas cypris recientemente asentadas ('pinheads') lo que presupone que no fue suficiente la concentración lograda en la interface gel con tanato de aluminio/ agua de mar para evitar el asentamiento.

Después de 28 días de exposición en el puerto de Mar del Plata, el efecto antifouling del tanato de aluminio puede observarse claramente en las fotografías de la Fig. 43.

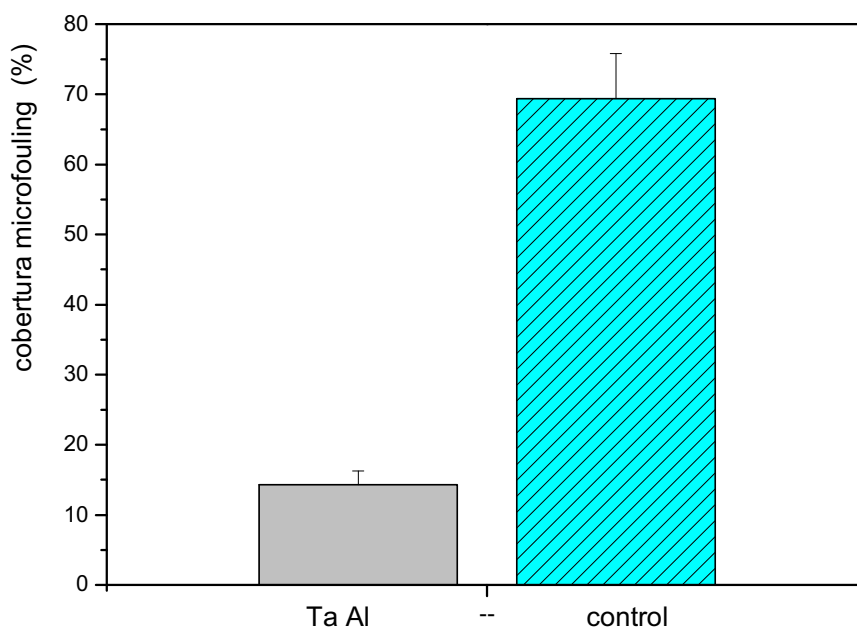


Figura 39. Porcentajes de cobertura total de microfouling sobre geles conteniendo tanato de aluminio (Ta Al) respecto de geles control.

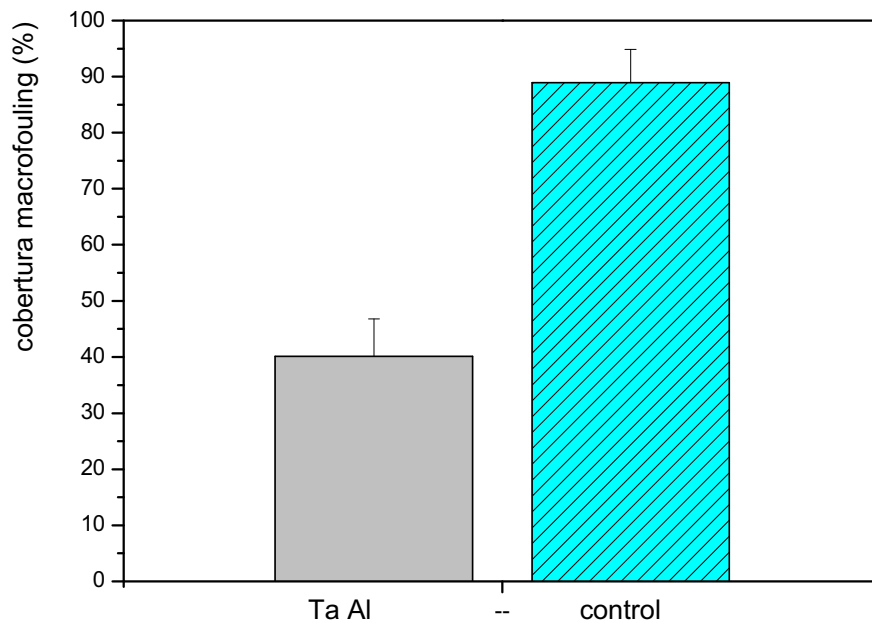


Figura 40. Porcentajes de cobertura total de macrofouling sobre geles conteniendo tanato de aluminio (Ta Al) respecto de geles control.

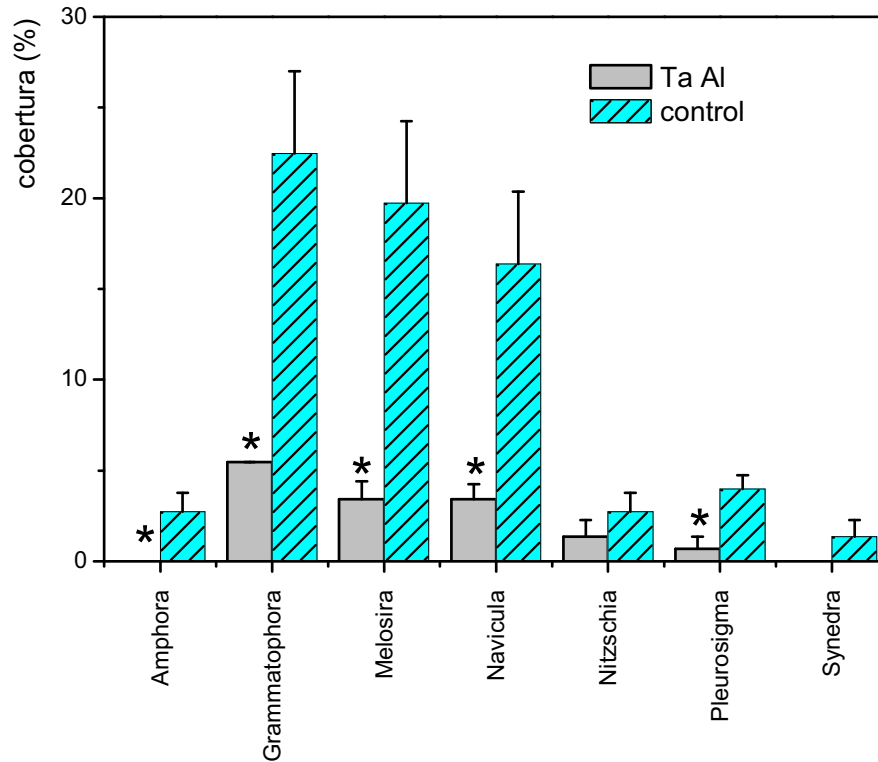


Figura 41. Porcentaje de cobertura de organismos del microfouling por género. Las barras indican media  $\pm$ SE. (\*) indica diferencias significativas respecto de los controles.

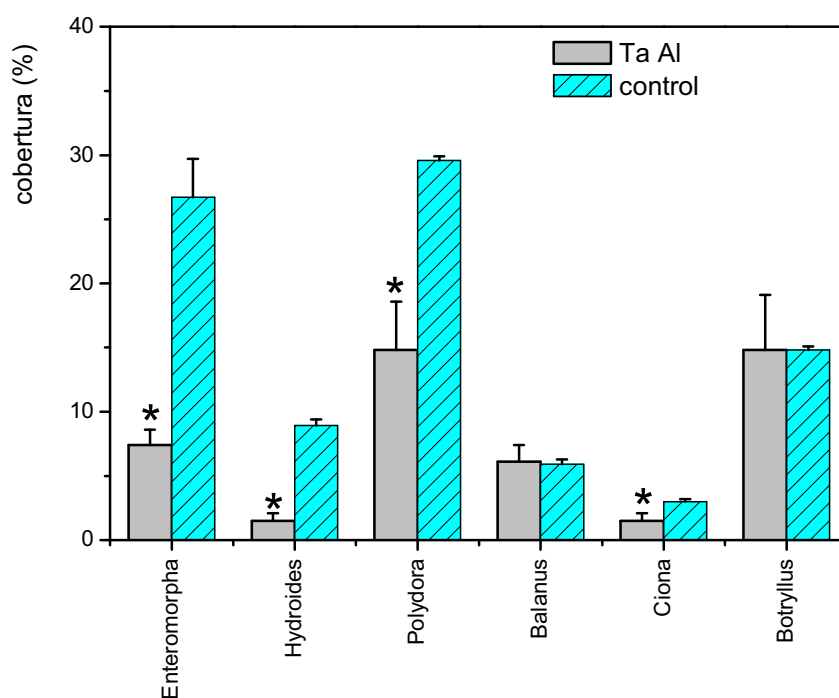


Figura 42. Porcentaje de cobertura de organismos del macrofouling por género. Las barras indican media  $\pm$ SE. (\*) indica diferencias significativas respecto de los controles.

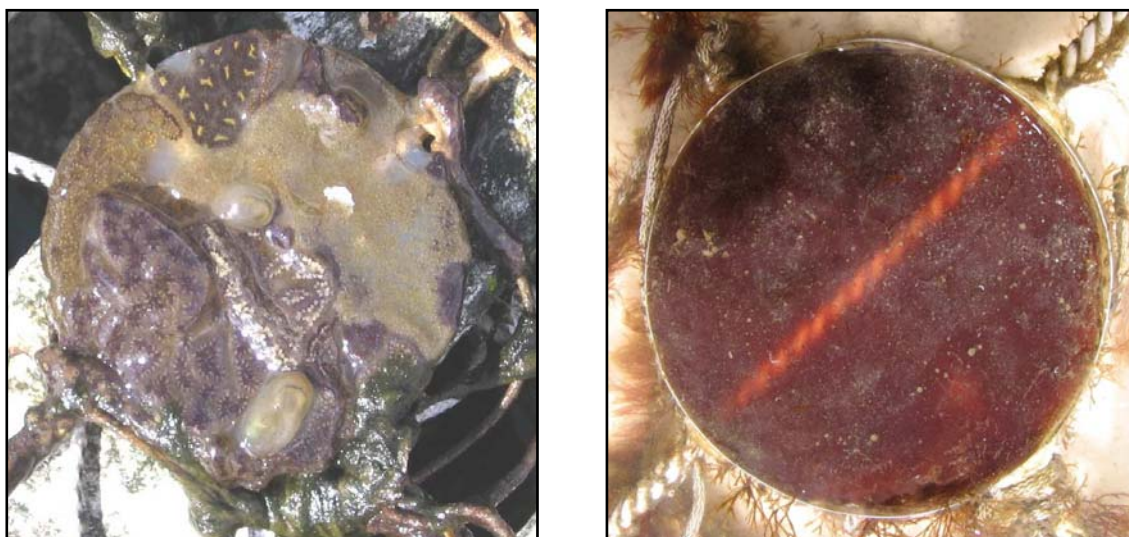


Figura 43. Geles expuestos en el puerto de Mar del Plata durante 28 días. Izquierda: gel control, derecha: gel con tanato de aluminio.

Tabla 30. ANOVA para la fijación de macrofouling y LSD post-hoc test de comparación de medias.  
En rojo se detallan las diferencias significativas.



Variable	Analysis of Variance (Ta Al datos MACRO replicas) Marked effects are significant at p < ,05000							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
COBERTUR	37803,25	7	5400,464	7927,875	8	990,9844	5,449596	0,014619

BASIC STATS Variable	Marked effects are significant at p < ,05000							
	1 SS Effect	2 df Effect	3 MS Effect	4 SS Error	5 df Error	6 MS Error	7 F	8 p
ENTERO	6601,563	1	6601,563	2570,875	14	183,6339	35,94958	0,000033
HYDRO	976,563	1	976,563	156,750	14	11,1964	87,22089	0,000000
POLY	3906,250	1	3906,250	3687,875	14	263,4196	14,82900	0,001765
BALANUS	0,563	1	0,563	437,875	14	31,2768	0,01798	0,895227
CIONA	39,063	1	39,063	94,875	14	6,7768	5,76416	0,030818
BOTRY	0,000	1	0,000	4576,375	14	326,8839	0,00000	1,000000

BASIC STATS MUESTRA TRATAMIE	Marked differences are significant at p < ,05000							
	1 {1} M=187,50	2 {2} M=117,75	3 {3} M=193,50	4 {4} M=86,250	5 {5} M=181,50	6 {6} M=123,75	7 {7} M=187,50	8 {8} M=61,250
G_1:1 test		0,05757	0,85359	0,01231	0,85359	0,07744	1,00000	0,00389
G_1:1 TaAl	0,05757		0,04275	0,34630	0,07744	0,85359	0,05757	0,11043
G_2:2 test	0,85359	0,04275		0,00926	0,71298	0,05757	0,85359	0,00299
G_2:2 TaAl	0,01231	0,34630	0,00926		0,01642	0,26770	0,01231	0,45002
G_3:3 test	0,85359	0,07744	0,71298	0,01642		0,10392	0,85359	0,00509
G_3:3 TaAl	0,07744	0,85359	0,05757	0,26770	0,10392		0,07744	0,08236
G_4:4 test	1,00000	0,05757	0,85359	0,01231	0,85359	0,07744		0,00389
G_4:4 TaAl	0,00389	0,11043	0,00299	0,45002	0,00509	0,08236	0,00389	



Tabla 31. ANOVA para la fijación de microfouling y LSD post-hoc test de comparación de medias.  
En rojo se detallan las diferencias significativas.



BASIC STATS Variable	Marked effects are significant at p < ,05000							
	1 SS Effect	2 df Effect	3 MS Effect	4 SS Error	5 df Error	6 MS Error	7 F	8 p
COBERTUR	63535,50	1	63535,50	13246,21	14	946,1579	67,15106	0,000001

BASIC STATS Variable	Marked effects are significant at p < ,05000							
	1 SS Effect	2 df Effect	3 MS Effect	4 SS Error	5 df Error	6 MS Error	7 F	8 p
AMPHORA	156,250	1	156,250	312,500	14	22,3214	7,00000	0,019188
GRAMMATO	6064,516	1	6064,516	6024,594	14	430,3281	14,09277	0,002136
MELOSIRA	5587,563	1	5587,563	6248,813	14	446,3438	12,51852	0,003277
NAVICULA	3525,391	1	3525,391	4902,344	14	350,1674	10,06773	0,006775
NITZSCHI	39,063	1	39,063	546,875	14	39,0625	1,00000	0,334282
PLEUROS	226,879	1	226,879	311,461	14	22,2472	10,19808	0,006505
SYNEDRA	39,063	1	39,063	234,375	14	16,7411	2,33333	0,148904

BASIC STATS MUESTRA TRATAMIE	Marked differences are significant at p < ,05000							
	1 {1} M=150,00	2 {2} M=25,000	3 {3} M=114,63	4 {4} M=25,000	5 {5} M=150,00	6 {6} M=50,000	7 {7} M=220,75	8 {8} M=31,250
G_1:1 test		0,00000	0,00230	0,00000	1,00000	0,00000	0,00002	0,00000
G_1:1 Ta Al	0,00000		0,00000	1,00000	0,00000	0,01452	0,00000	0,45974
G_2:2 test	0,00230	0,00000		0,00000	0,00230	0,00004	0,00000	0,00001
G_2:2 Ta Al	0,00000	1,00000	0,00000		0,00000	0,01452	0,00000	0,45974
G_3:3 test	1,00000	0,00000	0,00230	0,00000		0,00000	0,00002	0,00000
G_3:3 Ta Al	0,00000	0,01452	0,00004	0,01452	0,00000		0,00000	0,04818
G_4:4 test	0,00002	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000		0,00000
G_4:4 Ta Al	0,00000	0,45974	0,00001	0,45974	0,00000	0,04818	0,00000	

# Capítulo 10

Efecto del benzoato de sodio y  
benzoato de hierro como agentes  
antiincrustantes



## Efecto del benzoato de sodio y benzoato de hierro como agentes antiincrustantes

### Introducción

Los benzoatos, sales del ácido benzoico, son compuestos con propiedades antimicrobianas, empleados comúnmente como preservantes de alimentos frescos o enlatados, refrescos, jugos de fruta envasados, encurtidos y salsas (Srouf, 1998), así como en cubiertas comestibles (Baldwin *et al.*, 1995; Zhao y Doyle, 2006). Además, tienen aplicaciones en el campo de la medicina como inhibidores del desarrollo de bacterias intestinales que causan diversos tipos de infecciones (Karabay *et al.*, 2006).

Entre las propiedades que comparten el ácido benzoico y el benzoato de sodio se destacan la inhibición de la corrosión del hierro y otros metales, aún en medios muy agresivos como los que contienen cloruros (Eurof Davies y Slaiman, 1971; Slaiman y Eurof Davies, 1971; Eurof Davies y Slaiman, 1973; Rudd y Scully, 1980; Mostafa *et al.*, 1981; Culleré y Lluveras, 1983; Abd El Haleem y Abdel Fattah, 1986; Muralidharan *et al.*, 1988; Ergun y Turan, 1991; Otieno-Alego *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1992; Bondietti *et al.*, 1993; Raspini, 1993; Yamaguchi *et al.*, 1994; Mohamed *et al.*, 1997; Argawal y Landolt, 1998; Azambuja *et al.*, 1999; Yadav *et al.*, 1999; Kanitsugu, 2001; Kahraman, 2002; Zor, 2002; Kahraman *et al.*, 2002, 2003). Asimismo, se ha demostrado que el anión benzoato presenta propiedades anticorrosivas cuando se lo combina con gluconatos (Lahodny-Šarc y Kapor, 1998) o bajo la forma de benzoato de calcio en medio neutro (Blustein *et al.*, 2005). El mecanismo de acción anticorrosiva es debido a la adsorción del anión benzoato sobre sitios activos de la superficie generando una cubierta protectora (Kern y Landolt, 2001; Blustein y Zinola, 2004; Lahodny-Šarc y Kapor, 2005). Teniendo en cuenta estas propiedades, el ácido benzoico como sus sales solubles fueron empleados en diversos campos de la tecnología ya sea como aditivos inhibidores en formulaciones de pinturas anticorrosivas (Pollano y Lurier, 1987; Jackson, 1990; Simpson, 1993; Hodges *et al.*, 1997; Galliano y Landolt, 2002; Kalendová, 2002), antiincrustantes (Stupak *et al.*, 2003), formando parte de la composición del concreto (Monticelli *et al.*, 2000; Gaidis, 2004) o bien en la industria de los plásticos dado que se comprobó que mejoran la resistencia y transparencia, por ejemplo, del polipropileno (BFGoodrich Kalama Inc., 1999). En laboratorios del CIDEPINT se desarrollaron pigmentos anticorrosivos a base de benzoatos (de zinc, de aluminio y de hierro) con resultados satisfactorios (Blustein *et al.*, 2006; Blustein *et al.*, 2007a, b).

A partir de la década del '70 se han reportado propiedades relacionadas con la inhibición de films microbianos utilizando repelentes orgánicos no tóxicos tales como el ácido benzoico, el ácido tánico y la acrilamida (Chet *et al.*, 1975; Mitchell *et al.*, 1975; Chet y Mitchell, 1976). Entre las funciones descritas para el ácido benzoico a nivel celular se destacan la inhibición de las enzimas que controlan el metabolismo del ácido acético y la intervención en la fosforilación oxidativa en bacterias y hongos; a su vez, forma parte de distintas etapas del ciclo del ácido cítrico y actúa sobre la pared celular (Lueck, 1980).

Se ha comprobado que muchos microorganismos utilizan y degradan al ácido benzoico bajo condiciones aerobias o anaerobias, entre ellos se encuentran muchas especies de hongos como *Rhodotorula glutinis* y *Penicillium frequentans* y bacterias como *Alcaligenes denitrificans*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Desulfomicrobium escambiense* (Fuchs *et al.*, 1993; Elder y Kelly, 1994; Kocwa-Haluch y Lemek, 1995; Míguez *et al.*, 1995; Hofrichter y Fritsche, 1996; Harwood y Gibson, 1997; Sharak Genthner *et al.*, 1997). Es importante destacar que el ácido benzoico no se acumula en los sedimentos ni en organismos (Freitag *et al.*, 1985).

En el caso del benzoato de sodio, se constató experimentalmente que se degrada bajo condiciones aerobias en medios estandarizados (King y Painter, 1983; Salanitro *et al.*, 1988; Richterich y Steber, 1989) y también en medios conteniendo agua de mar (Courtes *et al.*, 1995). Si bien no se han reportado datos de bio o geoacumulación se supone que siguen los patrones conocidos para el ácido benzoico (IPCS, 2000).

Dado que las propiedades antimicrobianas del benzoato de sodio son ampliamente conocidas, se analizará el efecto de este compuesto como inhibidor del asentamiento del "fouling". También se determinará el poder antiincrustante del benzoato de hierro, otra sal del ácido benzoico de menor solubilidad, cuya hidrólisis en agua de mar genera acidez en el medio circundante. Los ensayos con benzoato de sodio están dirigidos a analizar el efecto del anión benzoato sobre los organismos ya que el catión sodio es inocuo.

Se evaluará también la posibilidad de incluir al benzoato de sodio y al benzoato de hierro en formulaciones de pinturas antiincrustantes.

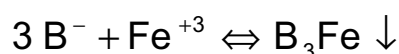
## Materiales y métodos

Se prepararon las diluciones a partir de una solución de benzoato de sodio 0,1 M en agua de mar. Se obtuvieron series de soluciones con las siguientes concentraciones: 0,075 M, 0,05 M, 0,025 M y 0,01 M cuyos valores de pH oscilaron entre 7,9 y 8,2, es decir, los valores corrientes para el agua de mar.

Se prepararon suspensiones con benzoato de hierro, en el laboratorio de Pinturas Higiénicas del CIDEPINT, siguiendo la metodología propuesta por Blustein (2005).

Es bien conocido que las sales férricas presentan una marcada tendencia a hidrolizarse y, en el caso particular del benzoato de hierro, la reacción de hidrólisis es rápida y genera un descenso de los valores de pH. Las ecuaciones que describen estas reacciones son las siguientes:

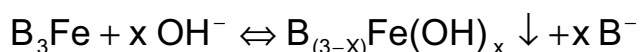
- 1) Ecuación de formación del benzoato de hierro



(B<sup>-</sup> simboliza al anión benzoato, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COO<sup>-</sup>)

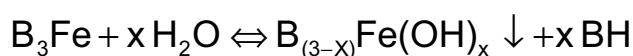
- 2) Ecuación general de hidrólisis del benzoato de hierro según el pH del medio

- *en medio alcalino*



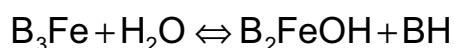
- *en medio ácido*

$$x < 3$$



La relación entre  $x$  y el pH del medio se obtiene a partir de curvas experimentales de titulación ácido-base en las que puede observarse que a medida que se incrementa el valor del pH también se incrementa el valor de  $x$ , es decir se incrementa el grado de hidrólisis.

El pH medido con un electrodo de vidrio para la suspensión acuosa de benzoato de hierro fue de 4,2. A partir de este dato se deduce que el grado de hidrólisis es cercano a 1; consecuentemente, la descomposición hidrolítica del  $B_3Fe$  puede expresarse como sigue:



La estequiometría del benzoato férrico básico que se formó por la reacción de hidrólisis implica la liberación de un mol de ácido benzoico (HB) y la estabilización del pH en valores cercanos a 4. Esta condición se sostiene en función de la característica de “ácido débil” del ácido benzoico que genera un sistema buffer determinado según la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

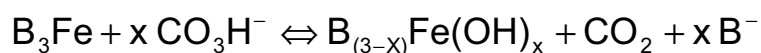
$$\text{pH} = -\log K_a + \log \frac{[\text{B}^-]}{[\text{BH}]}$$

donde  $K_a = 6.3 \times 10^{-5}$  es la constante ácida del ácido benzoico.

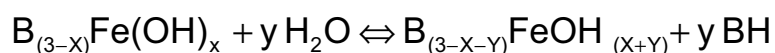
Esta ecuación señala que el valor del pH será de 4,2 cuando las formas ácidas y básicas sean iguales.

$$\text{pH} = 4.2 + \log \frac{[\text{B}^-]}{[\text{BH}]}$$

Cuando se suspende benzoato de hierro en agua de mar tiene lugar la hidrólisis alcalina inducida por el anión bicarbonato:



Luego, el benzoato de hierro reacciona con agua y forma ácido benzoico adicional.



A partir de esta ecuación se deduce que, mientras se encuentre disponible suficiente cantidad de benzoato férrico en la suspensión, la hidrólisis podría continuar y el pH del medio alcanzará valores menores de 4.

En virtud de los productos que se forman a partir de las reacciones, se estudiaron en forma separada los efectos del anión benzoato y del pH. Por un lado, se estimó el efecto de soluciones con distintos valores de pH (entre 3 y 9) sobre la supervivencia de *Balanus amphitrite* y por otro, el efecto del benzoato férrico disuelto en agua de mar y lixiviado a partir de una pintura antiincrustante.

La obtención de soluciones buffer con determinados valores de pH se logró utilizando ácido acético, ácido fosfórico, óxido de magnesio y benzoato de hierro

disueltos en agua de mar artificial. En todos los casos, las soluciones se prepararon antes de cada ensayo y se ajustó el valor del pH.

En estudios previos se ha señalado que el benzoato de aluminio presenta un comportamiento similar al benzoato de hierro dado que su hidrólisis genera un descenso en el pH (Blustein, 2005). Por esta razón también se elaboraron pinturas conteniendo este pigmento y se evaluaron sus propiedades antiincrustantes en el mar.

*- Composición de las pinturas y metodología de experimentación*

Es bien conocida la elevada solubilidad del benzoato de sodio y, por lo tanto, su incorporación a una formulación antiincrustante se lleva a cabo solamente con el fin de conocer en forma preliminar el comportamiento del anión en el medio natural. Teniendo en cuenta esta característica se utilizó también benzoato de hierro cuya solubilidad es menor.

Las pinturas antifouling elaboradas en la Planta Piloto del CIDEPINT fueron del tipo matriz soluble y su composición se detalla en las Tablas 32 y 33.

Se aplicaron sobre portaobjetos arenados hasta obtener un espesor final de película seca de  $150\pm 5\mu\text{m}$  y cada una de ellas se sumergió en un litro de agua de mar artificial durante períodos comprendidos entre uno a siete días.

Diariamente se retiró una muestra del lixiviado de las pinturas de modo tal de obtener soluciones con concentraciones crecientes de benzoato y, en el caso particular del benzoato de hierro, con distintos valores de pH.

Como ensayo complementario se estudió el efecto de la resina colofonia empleada en la formulación de las pinturas, para ello se expusieron 30 nauplii a soluciones de la resina en agua de mar.

Tabla 32. Composición de la pintura antifouling con benzoato de sodio (% V/V).

benzoato de sodio	16,0
carbonato de calcio	2,9
resina colofonia	27,0
barniz fenólico	5,9
xileno	24,1
aguarrás mineral	24,1

Tabla 33. Composición de la pintura antifouling con benzoato de hierro (% V/V).

benzoato de hierro	16,0
carbonato de calcio	2,9
resina colofonia	27,0
barniz fenólico	5,9
xileno	24,1
aguarrás mineral	24,1

- *Obtención de organismos*

Las larvas procedieron de muestreos de plancton realizados en el puerto de Mar del Plata. Paralelamente se colectaron ejemplares adultos de *B. amphitrite* con el propósito de obtener suficientes masas de huevos y llevar a cabo la cría en laboratorio. Las larvas fueron alimentadas con cultivos de la diatomea *Skeletonema costatum* y los adultos con nauplii recién eclosionadas de *Artemia salina*.

Para cada uno de los bioensayos se separaron 30 nauplii VI de *B. amphitrite* bajo lupa binocular y se las expuso a 50 mL de cada solución. Las nauplii elegidas para los ensayos fueron aquellas que nadaban activamente hacia una fuente puntual de luz. Por otra parte, se llevaron a cabo ensayos de asentamiento utilizando larvas cypris obtenidas en laboratorio.

En todos los casos se utilizó agua de mar artificial, aireación suficiente, luz natural y la temperatura se mantuvo entre 18°- 20°C.

Para estimar el efecto tóxico de los compuestos en estudio sobre las nauplii se evaluó la respuesta fototáctica y la movilidad de los apéndices natatorios. En el caso de las cypris fueron consideradas inactivas si ocurre la interrupción de la natación, presentan los apéndices extendidos o bien si se mantienen inmóviles cuando son tocadas con una pipeta. En una serie de experiencias complementarias se estudió el efecto del benzoato de sodio sobre individuos adultos de *B. amphitrite* tomándose como parámetro la actividad cirral (número de batidos de los cirros por unidad de tiempo).

Los experimentos se realizaron por triplicado y se compararon con controles.



#### *- Test de recuperación en laboratorio*

Una vez transcurrido el período de exposición a las soluciones con benzoato, las larvas y adultos fueron trasladados a agua de mar artificial fresca (sin el agregado de compuestos) a fin de evaluar si el efecto observado resultó temporario o permanente, es decir determinar si posee un efecto narcótico o tóxico.

#### *- Ensayos en el mar*

Se colocaron paneles de acrílico arenados de 8 cm x 16 cm en el puerto de Mar del Plata pintados con los recubrimientos antifouling de matriz soluble conteniendo benzoato de sodio o benzoato de hierro. Las series de paneles se colocaron verticalmente, a 50 cm por debajo de la superficie del agua, sostenidos de las marinas del Club de Motonáutica; otra serie de paneles de acrílico pintados con una pintura tradicional a base de óxido cuproso y otros paneles limpios (sin pintura) fueron colocados en el mismo momento como paneles testigo.

A fin de obtener mayor información sobre el comportamiento de pigmentos cuya hidrólisis generan un descenso del pH, se prepararon también pinturas a base de benzoato de aluminio.

### **Resultados**

#### *- Benzoato de sodio*

- *Efecto del benzoato de sodio sobre nauplii*

Cuando las nauplii de *B. amphitrite* activamente nadadoras tomaron contacto con las distintas concentraciones de benzoato de sodio demostraron una rápida inmovilización de los apéndices natatorios y pérdida de la respuesta fototáctica. Este cambio drástico en el comportamiento permitió realizar un conteo de las larvas afectadas dado que cayeron al fondo de los cristalizadores. Esta respuesta larval fue más rápida y evidente a concentraciones mayores de benzoato de sodio, en la Fig. 44 se detalla la respuesta registrada para los primeros 60 minutos de exposición, las diferencias significativas se observan a partir de la concentración 0,025 M.

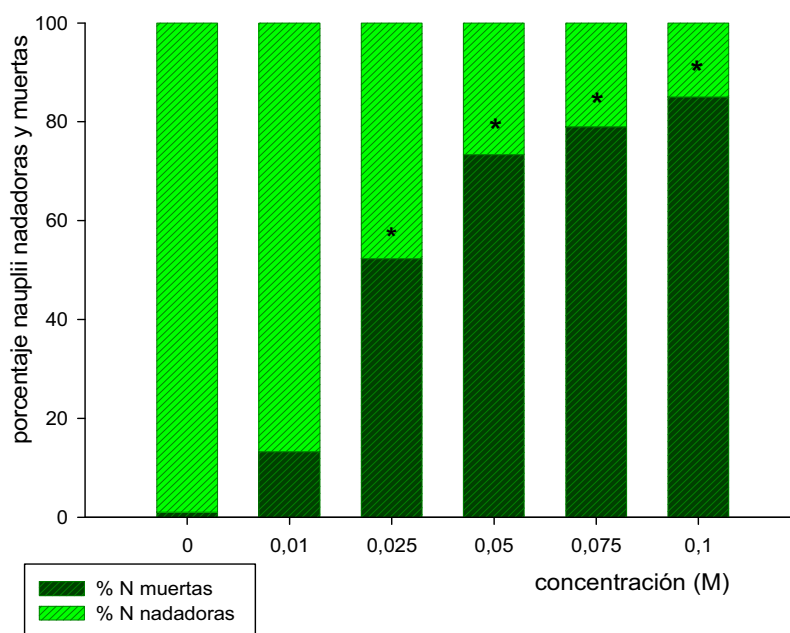


Figura 44. Efecto del benzoato de sodio sobre la supervivencia de nauplii de *B. amphitrite* durante los primeros 60 minutos de exposición. (\*) indica diferencias significativas entre tratamiento y control.

Cuando se grafican los valores de tiempo de inactividad para el 50% de las larvas en función de la concentración del compuesto para 240 minutos de exposición se observa una respuesta similar a la registrada durante los primeros 60 minutos de exposición, esto es, respuesta de inactividad más rápida dependiendo de la concentración de benzoato (Fig. 45). Es importante resaltar que las concentraciones de benzoato de sodio estudiadas, entre 0,01 y 0,1 M, mantuvieron los valores de pH en el rango de 7,9-8,2, es decir dentro de los valores normales para el agua de mar natural. Por otra parte, se estableció como tiempo de experimentación 240 minutos debido a que los ensayos de toxicidad de 24 horas no permitieron establecer las diferencias entre concentraciones.

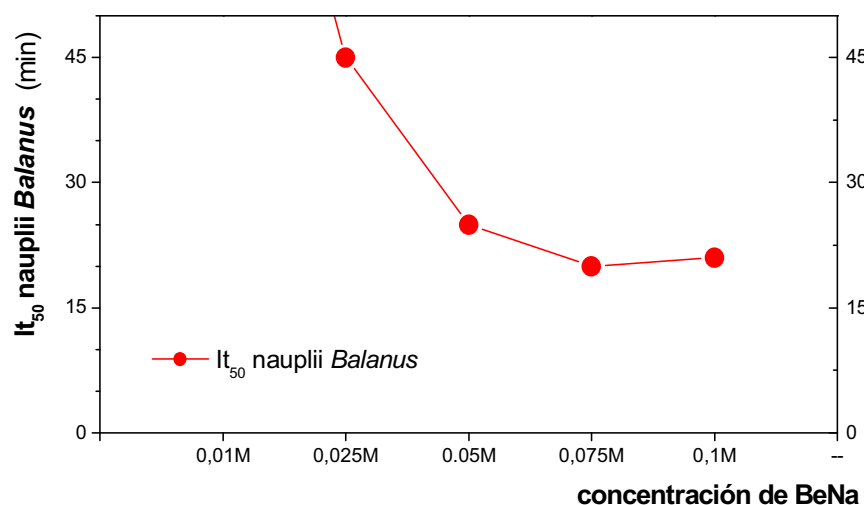


Figura 45. Curva de inactividad naupliar (*B. amphitrite*) en función de la concentración de benzoato de sodio.

Dado que en los controles el comportamiento larval fue normal (natación y fototactismo positivo), los resultados hallados indican que el efecto inhibitorio observado es indudablemente debido al anión benzoato. Las diferencias significativas según el test de ANOVA son observables a partir de la concentración 0,025 M (ANOVA test,  $p < 0,05$ , Tabla 34) y el valor de  $It_{50}$  se obtiene en 45 minutos.

Tabla 34. ANOVA para distintas concentraciones de benzoato de sodio.



STATISTICA  
Spreadsheet

BASIC STATS Variable	Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	1 SS Effect	2 df Effec	3 MS Effect	4 SS Error	5 df Error	6 MS Error	7 F	8 p
CONC_0_1	20207,5	4	5051,875	17037,50	15	1135,833	4,44773	0,014370
CON0_075	30978,8	4	7744,700	4685,75	15	312,383	24,79230	0,000002
CON_O_05	19154,5	4	4788,625	10477,50	15	698,500	6,85558	0,002403
C_0_025	10108,3	4	2527,075	10659,50	15	710,633	3,55609	0,031268
C_0_01	842,7	4	210,675	2133,50	15	142,233	1,48119	0,257267
CONTROL	3,2	4	0,800	17,67	15	1,178	0,67879	0,617214

- *Efecto del benzoato de sodio sobre cypris - Test de asentamiento*

Para realizar ensayos de asentamiento se utilizaron 15 cypris de *B. amphitrite*. Las larvas fueron expuestas a concentraciones crecientes de benzoato de sodio (0,01 M, 0,05 M, 0,075 M y 0,1 M) durante 24 horas.

Los resultados de los experimentos señalan que la respuesta de las cypris es inmediata, esto es, al contacto con la solución de benzoato de sodio cierran en forma hermética las valvas e interrumpen la natación. En un solo caso, en la solución de concentración 0,05 M, se registró la adhesión temporaria de dos cypris durante los primeros 60 minutos, estas larvas se desprendieron luego de tres horas y cayeron al fondo del recipiente. Por lo tanto, a las dosis ensayadas la respuesta es coincidente para todas las concentraciones, es decir, bajo las condiciones de laboratorio entre 0,01 y 0,1 M no se registra asentamiento de cypris.

- *Efecto del benzoato de sodio sobre adultos*

En el caso de los adultos de *B. amphitrite* se pudo comprobar que el efecto es similar al observado para las nauplii en lo referente a la interrupción de la actividad normal. La estimación se realizó contabilizando el número de batidos de los cirros por cada 30 segundos, para ello se tomaron tres grupos de cuatro individuos cada uno, acondicionados con agua de mar artificial, alimento vivo (nauplii de *A. salina*) y en los que se corroboró la presencia de mudas en forma regular; el número de batidos en estas condiciones fue de 32 por cada 30 segundos (en promedio).

Una vez expuestos a soluciones de benzoato de sodio entre 0,01 M y 0,1 M (pH 8,36), se pudo constatar la completa inmovilización de los cirros y cierre hermético de los terga y scuta (placas operculares) para las concentraciones estudiadas.

- *Test de recuperación para organismos de distintos estadios de B. amphitrite expuestos a soluciones de benzoato de sodio*

Una vez trasladadas a agua de mar limpia las nauplii de *B. amphitrite* se recuperaron inmediatamente retomando su actividad natatoria normal, la respuesta fototáctica y pudieron completar su desarrollo. Un efecto similar se comprobó respecto de la recuperación de cypris y adultos que también restituyeron rápidamente la actividad normal cuando fueron trasladados a agua de mar limpia. Esto indica claramente que el efecto del benzoato es narcótico o temporario.

- *Ensayos en el mar*

Luego de 30 días de exposición en el mar, las pinturas de matriz soluble conteniendo benzoato de sodio demostraron efectividad en la inhibición de la fijación de la mayoría de las especies del macrofouling (*B. amphitrite*, el alga verde *Enteromorpha intestinalis* y tunicados) observándose solamente algunos tubos de *Polydora* sp. y *Corophium*. En el panel control (pintura sin benzoato) se pudo observar más del 50% de la superficie colonizada por pequeños cirripedios (*pinheads*) de un milímetro de diámetro y *E. intestinalis* bien desarrolladas (Tabla 35). En el film de pintura con benzoato de sodio se observaron ampollas y baja adherencia al sustrato, lo que indicaría baja calidad de la película.

Tabla 35. Abundancias relativas de micro y macrofouling en paneles pintados con una pintura antifouling a base de benzoato de sodio.

	pintura con benzoato de sodio 30 días		testigo 1 panel con pintura, sin tóxico, 30 días		testigo 2 panel limpio, sin pintura, 30 días	
	anverso	reverso	anverso	reverso	anverso	reverso
<i>Achnanthes</i>	R	--	--	--	A	F
<i>Coscinodiscus</i>	--	--	R	--	--	--
<i>Grammatophora</i>	--	--	R	--	A	A
<i>Licmophora</i>	R	--	--	--	F	A
<i>Melosira</i>	R	--	R	--	A	A
<i>Navicula</i>	E	--	R	--	F	F
<i>N. closterium</i>	--	--	--	--	F	R
<i>Pleurosigma</i>	--	--	--	--	F	E
<i>Vorticella</i>	--	--	--	--	F	E
<i>E. intestinalis</i>	--	--	F	F	A	F
<i>Polydora</i> sp.	--	R	--	--	F	F
<i>B. amphitrite</i>	--	--	E	--	--	F
<i>Corophium</i>	R	R	R	R	F	F
<i>C. intestinalis</i>	--	--	--	--	--	R
Ascidias col. indet.	--	--	--	--	--	A
<b>porcentaje de cobertura total</b>	5%	10%	50%	50%	100%	90%

- Benzoato de hierro

- Efecto del pH de la solución sobre la supervivencia larval

Las experiencias de laboratorio fueron similares a las del benzoato de sodio, se llevaron a cabo en 240 minutos de exposición. Esta estimación tuvo su fundamento en ensayos preliminares que pusieron en evidencia que el test clásico de toxicidad para 24 horas no brindaba suficiente información sobre el efecto del pH en la supervivencia larval. Se analizó la respuesta de los organismos sobre todo durante las primeras cuatro horas de exposición a las soluciones.

En los ensayos se comprobó que la actividad y supervivencia larvales dependen del valor del pH de la solución (Fig. 46).

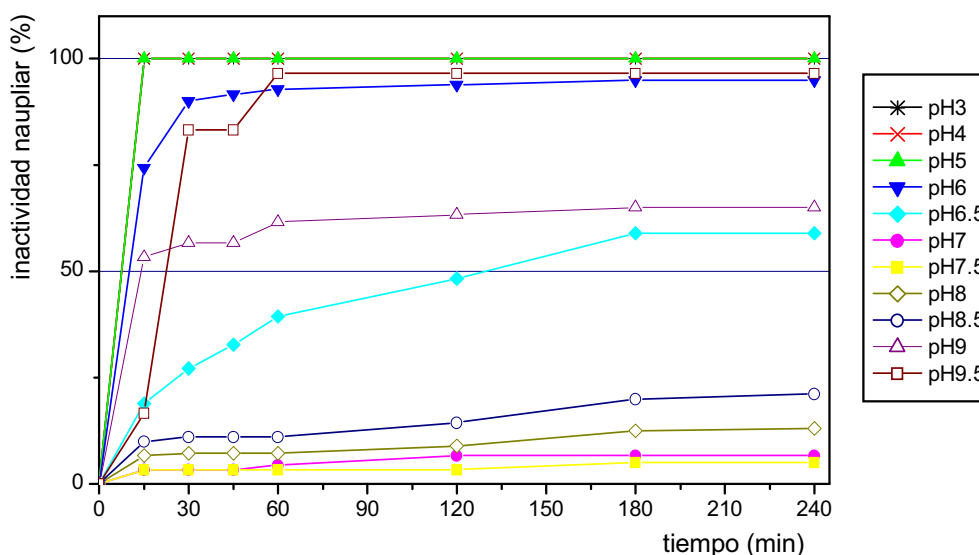


Figura 46. Curvas de porcentaje de inactividad naupliar para soluciones con distintos valores de pH en función del tiempo de exposición.

Durante los primeros 15 minutos de exposición se alcanzó el  $Lt_{50}$  para valores de pH de 3, 4, 5, 6, 9 y 9,5. Las larvas respondieron con inmovilización inmediata de los apéndices natatorios y pérdida del fototactismo. Se observó, una vez concluido el test de recuperación, que la exposición a estos valores de pH resulta letal para las larvas.

En el rango comprendido entre pH 7 y pH 8,5 las nauplii se desarrollan y mudan normalmente, en tanto que para pH 6,5 se alcanza el  $Lt_{50}$  en 120 minutos de

exposición. El test de recuperación confirmó que las larvas expuestas a un pH de 6,5 pueden recuperarse y continuar con su desarrollo.

En las curvas comparativas de actividad larval en presencia del extracto acuoso, lixiviados de pinturas y soluciones se pudieron detectar distintas respuestas en función del valor del pH obtenido (Fig. 47).

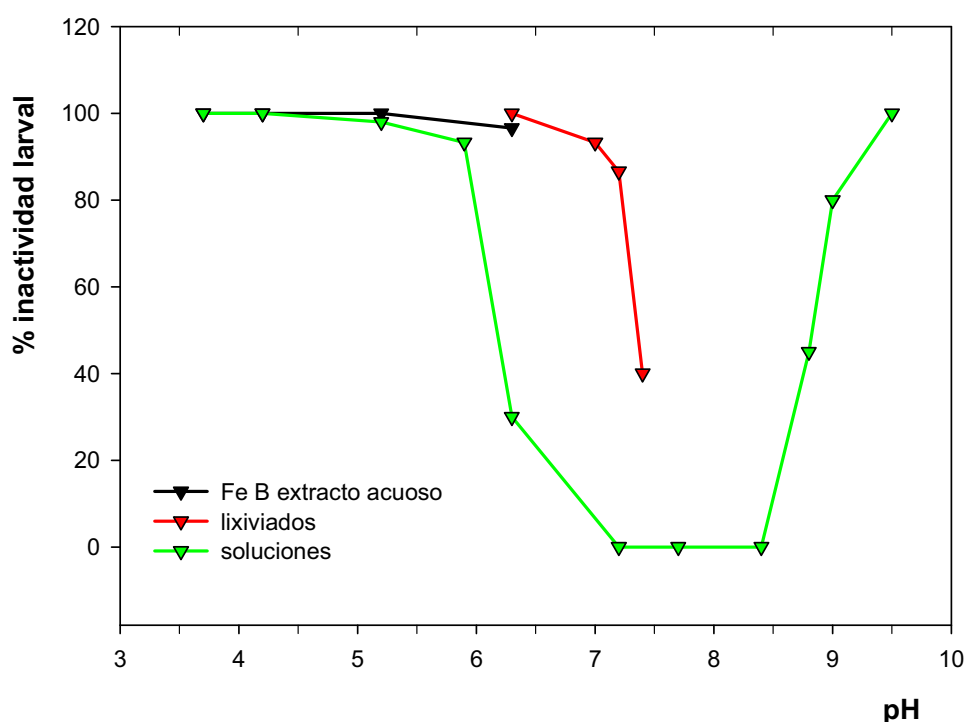


Figura 47. Curvas de porcentajes de inactividad naupliar en función del pH del extracto acuoso de benzoato de hierro (Fe B), de lixiviados de las pinturas y de las soluciones.

En el extracto acuoso los bajos valores de pH (menores de 6,5) generados por la hidrólisis del benzoato afectaron en gran medida la actividad de las larvas. En los lixiviados de las pinturas la actividad crece marcadamente cuando la solución alcanza valores de pH en el entorno de 7. La tercera curva, correspondiente a las soluciones, pone en evidencia la importancia del valor del pH de la solución en la actividad larval, presenta forma de “U” característica con baja actividad larval para pHs extremos (ácidos o alcalinos) y actividad normal para valores de pH cercanos al del agua de mar.

Dado que los valores de pH obtenidos para los lixiviados de las pinturas oscilaron entre 6 y 7,5 y las larvas en contacto con estas soluciones detuvieron sus movimientos natatorios inmediatamente cayendo al fondo del recipiente, se deduce que el efecto de los lixiviados de las pinturas con benzoato férrico es debido a la



combinación del descenso del pH con el efecto narcótico del anión benzoato. Esto se confirma cuando se compara la acción inhibitoria de las soluciones vs. lixiviados de las pinturas, esto es, el efecto de los lixiviados (combinación del descenso del pH + acción narcótica del benzoato) es mayor que el efecto de las soluciones separadamente. Por otra parte, a pesar que la concentración de benzoato en los valores de pH cercanos al agua de mar normal es baja, esta concentración resulta suficiente para afectar la actividad de las larvas de *B. amphitrite*.

En ensayos complementarios en los que se expusieron nauplii a distintas concentraciones de resina colofonia en agua de mar se confirmó que el producto no es tóxico y no afecta el normal comportamiento de las larvas.

- *Ensayos en el mar*

Las pinturas se evaluaron durante seis meses en el puerto de Mar del Plata realizándose las inspecciones bimestralmente.

Una característica importante para destacar es que la fijación registrada sobre los paneles pintados mostró una débil unión con el sustrato lo que provocó el fácil desprendimiento de los organismos cuando los paneles fueron extraídos del agua. Por otra parte, la película de pintura en sí mostró un incipiente agrietamiento y cuarteado que indica la necesidad de ajustar aspectos de su formulación.

Los resultados de campo demuestran que las pinturas conteniendo benzoato férrico fueron efectivas en la inhibición de especies relevantes del macrofouling y afectaron la fijación de muchas especies de algas. En particular, la pintura inhibió la fijación de organismos con exoesqueletos calcáreos (cirripedios y serpulidos) y disminuyó el asentamiento del poliqueto tubícola *Polydora* sp. Sin embargo, pudo comprobarse la presencia en bajas densidades de ascidias solitarias y coloniales lo que indica que, si bien el asentamiento fue afectado, el efecto antifouling sobre esta especie no es completo. Asimismo, la pintura evitó la fijación del hidrozoo *Obelia dichotoma* que comenzó el ciclo de asentamiento en la fase final de la experiencia (Fig. 48; Tabla 36).

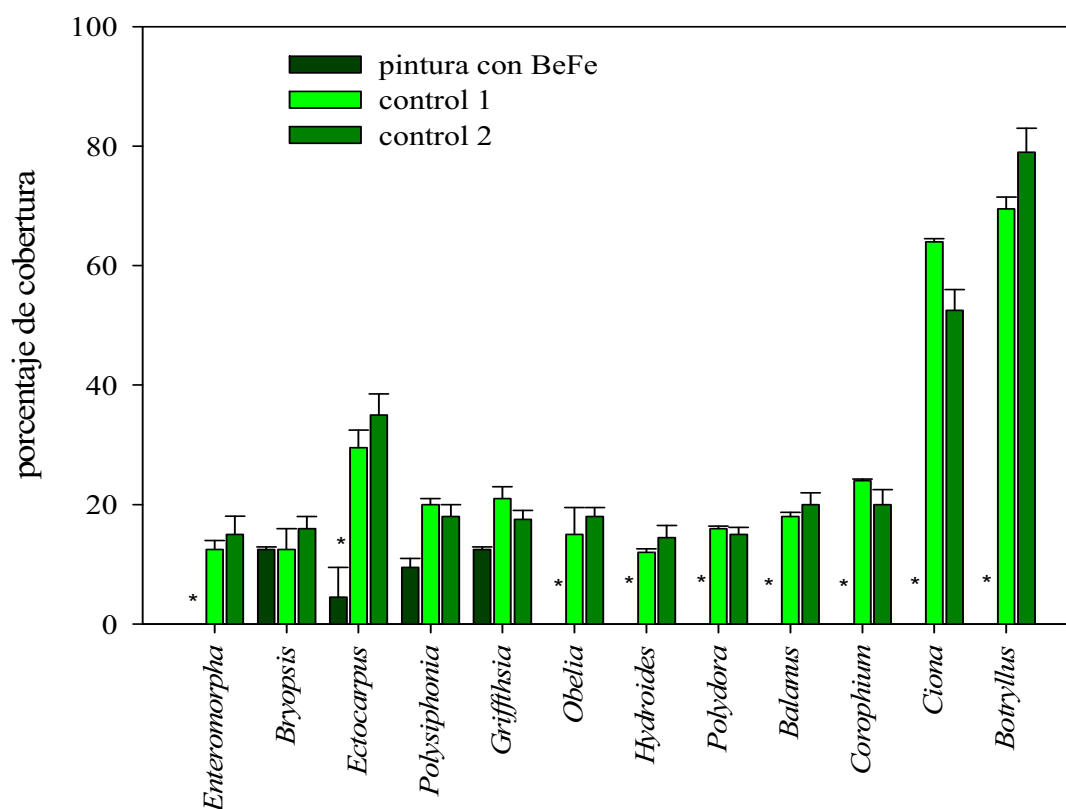


Figura 48. Porcentajes de cobertura de géneros del puerto de Mar del Plata sobre paneles, 6 meses de inmersión. *Control 1*: paneles de acrílico, *control 2*: paneles con pintura sin benzoato de hierro. (\*) indica diferencias significativas entre la fijación registrada vs. control.

Respecto de las macroalgas se comprobó una disminución en la fijación de *Ectocarpus*, *Enteromorpha*, *Polysiphonia* y *Griffithsia*, que se registraron fundamentalmente en el anverso de los paneles (cara más iluminada). En relación con las diatomeas, la acción inhibitoria del benzoato férrico se observó sobre *Achnanthes* y no se registraron diferencias en los géneros restantes (Fig. 48; Tabla 36). La película de pintura no presentó mayores alteraciones a lo largo del tiempo aunque necesariamente deben realizarse ajustes en la formulación a fin de mejorar la calidad (Tabla 37).

Tabla 36. Abundancias relativas de micro y macrofouling en paneles pintados con una pintura antifouling a base de benzoato férrico (FeB) (2, 4 y 6 meses).

	pintura con FeB		testigo		pintura con FeB		testigo		pintura con FeB		testigo	
	2 meses				4 meses				6 meses			
	anverso	reverso	anverso	reverso	anverso	reverso	anverso	reverso	anverso	reverso	anverso	reverso
<i>Achnanthes</i>	R	R	E	E	--	--	R	R	--	--	R	R
<i>Amphora</i>	R	--	E	E	--	--	R	R	--	--	--	--
<i>Grammatophora</i>	--	--	E	E	R	R	A	F	F	F	--	--
<i>Licmophora</i>	R	--	E	E	R	R	R	R	E	E	--	R
<i>Melosira</i>	F	F	E	E	R	R	A	A	F	F	E	E
<i>Navicula</i>	R	R	F	F	A	F	A	A	R	R	E	E
<i>N. grevillei</i>	--	E	E	F	R	--	R	R	R	R	F	F
<i>Nitzschia</i>	--	--	F	F	A	F	A	A	R	R	R	R
<i>N. closterium</i>	--	--	--	--	R	R	R	R	--	--	R	R
<i>N. longissima</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	R	R	R	R
<i>Pleurosigma</i>	--	--	--	--	R	R	R	R	E	E	E	E
<i>Vorticella</i>	--	--	--	--	R	--	R	R	--	--	R	--
<i>Zoothamnium</i>	E	--	E	E	R	--	R	R	R	--	E	E
<i>Ectocarpus</i>	R	--	A	A	R	--	R	R	--	--	R	R
<i>E. intestinalis</i>	E	--	E	R	R	R	F	F	R	--	R	E
<i>Griffthsia</i>	--	--	F	R	--	--	R	R	R	--	R	--
<i>Bryopsis</i>	R	--	R	R	R	R	R	R	R	--	R	E
<i>Polysiphonia</i>	E	--	R	R	R	R	F	F	--	--	R	R
<i>O. dichotoma</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	R	R
<i>Polydora</i> sp.	R	--	F	R	R	R	F	F	--	--	F	R
<i>Hydroides elegans</i>	--	--	E	R	--	--	E	R	--	--	E	R
<i>Balanus amphitrite</i>	--	--	R	E	--	--	F	R	R	R	R	R
<i>Corophium</i>	--	--	--	--	R	--	R	R	R	R	F	E
<i>Ciona intestinalis</i>	--	R	R	F	R	R	F	F	--	R	F	F
<i>Ascidias</i> col. indet.	--	--	--	--	--	R	F	F				
porcentaje de cobertura total	5%	5%	90%	100%	30%	40%	100%	100%	10%	10%	100%	100%

Los paneles pintados con una pintura comercial a base de óxido cuproso prácticamente no presentaron colonización por macro ni microorganismos al menos durante 6 meses de exposición y mantuvieron el film con buena calidad (Tablas 37-38).

Tabla 37. Evaluación de calidad de las películas de pintura.

	<b>pintura con Fe B</b>
<b>2 meses</b>	muy bueno
<b>4 meses</b>	bueno (poco agrietado)
<b>6 meses</b>	bueno (poco agrietado)

	<b>pintura tradicional a base de óxido cuproso</b>
<b>1 mes</b>	muy buena adherencia al sustrato
<b>6 meses</b>	muy buena adherencia al sustrato

Tabla 38. Abundancias relativas de micro y macrofouling en paneles pintados con una pintura antifouling a base de óxido cuproso (1 y 6 meses).

	<b>pintura a base de óxido cuproso</b>		<b>testigo, panel limpio sin pintura</b>		<b>pintura a base de óxido cuproso</b>		<b>testigo, panel limpio sin pintura</b>	
	<b>1 mes</b>		<b>1 mes</b>		<b>6 meses</b>		<b>6 meses</b>	
	<b>anverso</b>	<b>reverso</b>	<b>anverso</b>	<b>reverso</b>	<b>anverso</b>	<b>reverso</b>	<b>anverso</b>	<b>reverso</b>
<i>Achnanthes</i>	F	F	A	F	F	F	A	A
<i>Navicula</i>	A	A	F	F	A	A	F	A
<i>E. intestinalis</i>	E	--	A	F	A	--	A	A
<i>Polydora</i> sp.	R	R	F	F	R	R	F	F
<i>Corophium</i>	R	R	F	F	R	R	F	F
<b>porcentaje de cobertura total</b>	1%	5%	100%	90%	5%	10%	100%	90%

Respecto de la pintura a base de benzoato de aluminio expuesta en Mar del Plata pudo observarse un alto porcentaje de colonización siendo este comportamiento atribuible a la baja calidad del film obtenido (Tabla 39).

Tabla 39. Abundancias relativas de micro y macrofouling en paneles pintados con una pintura antifouling a base de benzoato de aluminio.

	pintura con benzoato de aluminio		testigo panel limpio sin pintura	
	30 días		30 días	
	anverso	reverso	anverso	reverso
<i>Achnanthes</i>	--	--	A	F
<i>Grammatophora</i>	A	--	A	A
<i>Licmophora</i>	R	--	F	A
<i>Melosira</i>	R	--	A	A
<i>Navicula</i>	A	--	F	F
<i>N. closterium</i>	--	--	F	R
<i>Pleurosigma</i>	R	--	F	E
<i>Pinnularia</i>	R	--	--	--
<i>Vorticella</i>	--	--	F	E
<i>E. intestinalis</i>	E	--	A	F
<i>Polydora</i> sp.	--	R	F	F
<i>B. amphitrite</i>	--	E	--	F
<i>Corophium</i>	R	R	F	F
<i>C. intestinalis</i>	--	--	--	R
Ascidias col. indet.	--	--	--	A
<b>porcentaje de cobertura total</b>	30%	30%	100%	90%

#### *El uso de productos de origen natural o sintético y el efecto antiincrustante*

Las posibilidades que ofrece la naturaleza en cuanto a productos con potenciales propiedades antiincrustantes son numerosas, de hecho se considera que entre 1 y 2 millones de especies marinas permanecen aún inexploradas. Sin embargo, el objetivo que se debe perseguir es hallar compuestos cuya extracción no altere los ecosistemas, sean accesibles y su producción se pueda realizar a gran escala. Por el contrario, los compuestos naturales hasta ahora identificados se encuentran en muy bajas cantidades.

En este sentido, el empleo de taninos resultó muy alentador no sólo por el efecto antiincrustante observado sino también por su fácil obtención en el mercado. Las propiedades antiincrustantes de los taninos se manifestaron en laboratorio y en el mar, pero el efecto inhibidor de la fijación se incrementó con el agregado de cantidades mínimas de cobre. Es necesario en el futuro optimizar una formulación con tanato de aluminio (ya probado en geles) a fin de lograr una concentración en la interfase que evite también la fijación de cirripedios.

La utilización de los productos sintéticos estudiados presenta también la ventaja de alta eficiencia y fácil acceso en el mercado; estos resultados amplían las posibilidades de búsqueda hacia otras sustancias con propiedades antimicrobianas que cumplan, a su vez, con los requisitos indicados.

La inclusión de productos naturales o sintéticos con propiedades antiincrustantes en pinturas es compleja ya que requiere no sólo de ensayos en laboratorio sobre organismos vivos sino también la evaluación del comportamiento del film en sí mismo previo a la inmersión en el mar. El desafío es, sin duda, lograr que la película perdure en el tiempo y los pigmentos se mantengan estables.

Es importante destacar que en virtud de las técnicas analíticas actualmente empleadas, como resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, se logran elucidar estructuras moleculares y, de este modo, sintetizar el/los compuestos bioactivos en laboratorio evitando su extracción directamente de la naturaleza.

# Capítulo 11

## Discusión



## Discusión

El “biofouling” sobre las estructuras sumergidas se ha convertido en un problema complejo y de difícil resolución; para abordarlo es necesario aplicar uno o más métodos y tener en cuenta la factibilidad y los costos.

La implementación de estos métodos requiere necesariamente de una etapa previa de experimentación en laboratorio. Se cultivan organismos, se estudia la respuesta larval y se evalúa la posibilidad de éxito de la técnica. La solución del problema de las incrustaciones biológicas puede encararse desde varios aspectos: la modificación de la textura superficial, la incorporación de productos al sustrato o la aplicación de pinturas.

### *- Cría en laboratorio y experimentación con organismos incrustantes*

Es importante destacar que actualmente, a nivel mundial, muy pocos laboratorios realizan cultivos de organismos incrustantes marinos. Las experiencias clásicas para tratamiento antifouling, el test de toxicidad y de asentamiento, entre otros, se realizan con larvas estandarizadas de los laboratorios que las producen. Cultivarlas es una tarea laboriosa y complicada ya que es necesario reproducir las condiciones naturales en el laboratorio y cualquier cambio que se produzca puede redundar en altas tasas de mortalidad.

Se determinó que existe una elevada mortalidad en el pasaje a cada estadio metamórfico en la cría de *Balanus amphitrite*, sin embargo se alcanzó el estadio cypris, se obtuvieron porcentajes de asentamiento elevados y se completó el ciclo de vida de la especie. Los porcentajes de supervivencia desde los primeros estadios naupliares hasta la fijación de juveniles oscilaron entre 9 y 14%, tanto para larvas obtenidas del plancton como para las obtenidas en el laboratorio. Los adultos se mantuvieron activos durante seis meses bajo condiciones del laboratorio.

Se logró una disponibilidad larval diaria suficiente para la realización de los bioensayos, por lo que se concluye que las condiciones aplicadas fueron adecuadas.

Se comprobó que los individuos alcanzaron la madurez sexual dos meses después de su fijación. Se observaron cópulas periódicas y presencia de lamelas ovígeras. Cuando las masas de huevos liberadas fueron voluminosas (alrededor de 50 huevos), el tiempo de eclosión de las nauplii fue de alrededor de siete días, mientras



que con masas pequeñas, los huevos estaban en una etapa avanzada de maduración y la eclosión se produjo en 24-48 horas.

El estadio nauplius I se obtuvo con facilidad a partir de huevos, rápidamente pasa al estadio naupliar II, condición que permitió disponer de un número considerable de larvas para realizar bioensayos. Aproximadamente el 50% de las cypris obtenidas lograron completar la metamorfosis y fijación a juvenil.

La velocidad inicial de crecimiento de los juveniles osciló entre 0,03 y 0,09 mm/día como promedio, valor semejante al obtenido para esta misma especie en el medio natural (Desai, 2002). El mayor diámetro basal alcanzado fue de 4,5 mm, 55 días después de la fijación, con una actividad cirral promedio de 80 batidos por minuto.

Los ensayos sobre preferencias por la elección y orientación del sustrato en el momento del asentamiento señalan que las cypris de *B. amphitrite* optan por superficies de vidrio respecto de las de plástico; a su vez los ángulos de intersección (cerca de 90°) son elegidos respecto de las paredes o bases de los recipientes. El vidrio con textura lisa fue el sustrato que recibió mayor colonización lo que indica su utilización en las próximas experiencias. La fijación, aunque escasa, registrada sobre el plástico fue también sobre la textura lisa y, preferentemente, sobre la cara oscura del panel.

Los valores de fijación obtenidos para *B. amphitrite* en las experiencias presentadas oscilaron entre 9 y 14% y, comparativamente, son más bajos que los obtenidos en otros trabajos, sin embargo resultan satisfactorios si se tiene en cuenta que las muestras fueron obtenidas a 400 km del laboratorio. Se reportaron porcentajes de fijación en laboratorio del 16,3% para *B. eburneus* y 12,7% para *B. amphitrite* var. *denticulata* (Costlow y Bookhout, 1957; 1958), en tanto que se obtuvieron 20% y 40% para *B. amphitrite hawaiiensis* y *B. a. amphitrite*, respectivamente (Hirano, 1963; Lacombe, 1973). Sin embargo, los individuos asentados pudieron mantenerse durante un período de tres meses (Lacombe, 1973), en tanto que en nuestra experiencia se logró supervivencia por siete meses.

En el medio marino las principales causas de mortalidad larval son debidas a la escasez de alimentos, a la predación y al transporte hacia fuera de la costa (Thorson, 1950; Olson y Olson, 1989; Thiyagarajan *et al.*, 2002). La disponibilidad de alimento es un factor de importancia para lograr una metamorfosis exitosa; una condición nutricional pobre puede redundar en una disminución en la frecuencia de liberación de

huevos (Crisp y Spencer, 1958; Tighe-Ford *et al.*, 1970; Crisp, 1984) o inclusive en el cese de la actividad de cría (Barnes y Barnes, 1967; 1975).

Es bien conocido que las nauplii del primer estadio no se alimentan, esto se debe a la presencia de gotas lipídicas en la parte anterior del epitelio faríngeo y glóbulos de glucoproteínas, remanentes de vitelo, que aportan la energía necesaria para llevar a cabo el proceso metamórfico (Walley, 1969).

La temperatura y la condición nutricional son los factores externos que regulan la cría y la muda de los cirripedios (El-Komi y Kajihara, 1991). Anil y Kurian (1996) sostienen que los porcentajes de mortalidad naupliar de *B. amphitrite*, a 20°C, son menores que los obtenidos a temperaturas de alrededor de 30°C. Sin embargo, las opiniones acerca de la influencia de la temperatura de cría son contradictorias, algunos autores consideran que a 20°C la producción total de larvas sería cinco veces menor (Desai, *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2006), en tanto que otros concluyen que esa sería la temperatura óptima para la cría en laboratorio (El-Komi y Kajihara, 1991), coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo.

El mayor aporte de carbono fue el obtenido por los cultivos de la diatomea *S. costatum* utilizada como alimento en una densidad que osciló entre 200.000 y 400.000 céls/mL. Sin embargo, en otros ensayos se concluyó que una concentración de 100.000 céls/mL, brinda resultados satisfactorios y que la concentración de 200.000 céls/mL no resulta adecuada para la cría (Hirano, 1962; Anil y Kurian, 1996).

Según observaciones realizadas para *B. eburneus* la concentración de alimento de 100.000 ó 200.000 céls/mL es irrelevante cuando la temperatura de cría es de 30°C alcanzando el estadio cypris en el mismo tiempo promedio. Sin embargo, los porcentajes de supervivencia son significativamente diferentes para ambas concentraciones cuando la temperatura es de 20°C (Scheltema y Williams, 1982).

Dado que la cypris no se alimenta, se ha comprobado que el tiempo de permanencia en la fase pelágica depende del nivel inicial de lípidos acumulados y que la disponibilidad de estas reservas está relacionada con el tiempo que la cypris permanece apta para asentarse (Lucas *et al.*, 1979). Esto explica la mortalidad registrada en las experiencias de laboratorio en el pasaje de cypris a juvenil fijado.

La secuencia de maduración de los huevos en cuanto al cambio de coloración y presencia del ojo naupliar observada en laboratorio es similar a la descrita para varias especies del género (*B. eburneus*, *B. improvisus*, *B. trigonus* y *B. balanoides*) (Freiberger y Cologer, 1966). Respecto del tamaño de los huevos, los valores de largo

y ancho obtenidos para *B. amphitrite* son ligeramente menores que los descriptos por otros autores (El-Komi y Kajihara, 1991). Sin embargo, el tamaño promedio de las cypris obtenidas en laboratorio fue coincidente con el conocido para la especie (Karande, 1974) al igual que la actividad cirral de los juveniles recién fijados (Geierman, 2007). En cuanto a la velocidad de crecimiento de cirripedios existen datos referidos al medio natural pero no se conocen datos bajo condiciones de laboratorio (Lewis, 1992; Sanford y Menge, 2001; Desai, 2002; Skinner *et al.*, 2007).

La cría de *Polydora* sp. en laboratorio resultó más sencilla que la de *B. amphitrite*. El tiempo empleado para completar el ciclo de vida de *Polydora* sp. fue de 19-25 días a 20°C, coincidiendo con Orth (1971). Si bien esta especie no es de las más agresivas de la comunidad del “fouling”, ya que simplemente contribuye a incrementar el espesor de la incrustación y ofrece un sustrato secundario para la instalación de otros organismos, otras especies, como *P. ciliata*, han sido señaladas como uno de los problemas de cultivo más comunes asociado con la mortalidad de ostras en granjas mexicanas (Cáceres-Martínez *et al.*, 1998; Chávez-Zazueta, 2003; Gallo-García *et al.*, 2004; García-Ulloa *et al.*, 2008).

#### - *Textura superficial*

El sitio que la larva elige para asentarse es de suma importancia en lo que concierne al control de las incrustaciones. Existen controversias respecto de los factores que influyen en la elección del lugar adecuado, dado que diversas condiciones físicas y biológicas pueden influir positiva o negativamente cuando la larva toma contacto con la superficie. La presencia de conespecíficos (Wethey, 1984) y films bacterianos (Maki *et al.*, 1988) son generalmente factores que influyen positivamente, mientras que la presencia de predadores es una condición negativa (Crisp, 1974).

La naturaleza química del sustrato es otro factor que ha sido ampliamente estudiado (Crisp, 1974; Wethey, 1986; Hills y Thomason, 1998). Se determinó que las cypris jóvenes prefieren las superficies de vidrio a las de poliestireno y que las diferencias en los porcentajes de fijación se mantienen, aún en presencia de un factor de asentamiento, como un compuesto inductor de la fijación (Rittschof *et al.*, 1984; O'Connor y Richardson, 1994). Los resultados de los ensayos realizados coinciden en que los sustratos de vidrio son preferidos por las cypris respecto de los de plástico. Por otra parte, se determinó que *Polydora* sp. no es selectiva en la elección del sustrato, contrariamente a lo que sucede en otras especies perforantes del género en las que

se comprobó la extensión de la vida pelágica hasta el hallazgo de determinadas conchillas de gasterópodos o bivalvos (Radashevsky y Cárdenas, 2004).

Los análisis acerca del rol de la textura superficial en el asentamiento de las cypris se fueron enfocando hacia las microtexturas, del orden de milímetros o micrómetros. En este sentido, se determinó que las cypris responden activa o pasivamente a la textura de la superficie, asentándose sobre sustratos rugosos, de aproximadamente 1 mm, debido a que permiten una adhesión antenular más fuerte (Le Tourneux y Bourget, 1988); otros autores ampliaron este rango a rugosidades comprendidas entre 0,1 y 5 mm, que es coincidente también con el rango de rugosidades donde se registra la máxima densidad de tubos construidos por *Polydora* (Huxley *et al.*, 1984; Crisp y Bourget, 1985, Anger *et al.*, 1986; Hills y Thomason, 1998; Köhler *et al.*, 1999; Wahl y Hoppe, 2002).

En los primeros trabajos publicados durante la segunda mitad del siglo XX, se demostró que las cypris de *Semibalanus balanoides* preferían hendiduras y oquedades (Crisp y Barnes, 1954; Barnes, 1956; Crisp, 1961; Wetthey, 1984, 1986) ya que estas superficies otorgan refugio con máxima adhesión, evitando el esfuerzo por cizalla ("shear stress") (Walters y Wetthey, 1996) y previniendo la desecación (Raimondi, 1990). Por otra parte, se halló una mayor densidad de asentamiento sobre granos finos y medianos de roca (entre 0,05 y 2 mm) señalando que las cypris prefieren huecos con dimensiones similares a las de su tamaño corporal (Hills y Thomason, 1998). Se comprobó que las microtexturas (microsurcos o micropirámides) y los microrefugios con tamaños menores a los de la larva son significativamente menos colonizados por distintas especies de cirripedios (Lemire y Bourget, 1996; Hills *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 1999; Lapointe y Bourget, 1999; Berntsson *et al.*, 2000; Petronis *et al.*, 2000; Koehl, 2007; Scardino *et al.*, 2008). Esta elección fue también comprobada en el asentamiento de células de *Amphora*, esporas de *Ulva* y larvas de *Hydroides* y *Bugula*. Sin embargo, también concluyen que la eficiencia antifouling de las superficies microtexturadas decrece con el aumento en la densidad del reclutamiento, dado que habría una menor disponibilidad del sustrato forzando a las cypris a asentarse en cualquier sitio libre sin tener en cuenta la rugosidad; otra explicación posible sería que las cypris se vuelven menos selectivas a medida que "envejecen" y buscan un lugar cercano a sus conespecíficos.

En trabajos desarrollados durante la última década se ha afirmado que el asentamiento de cypris de *B. improvisus* ocurre preferentemente sobre superficies "lisas" (rugosidad media  $R_a = 0,20 \mu\text{m}$ ) dado que perfiles de altura entre 30 y 45  $\mu\text{m}$

redujeron un 92% la fijación (Berntsson *et al.*, 2000; Dahlstrom *et al.*, 2004). En las experiencias llevadas a cabo en el laboratorio se comprobó que la superficie elegida por las cypris de *B. amphitrite* fue la de vidrio “liso” con una rugosidad media  $R_a = 0,09 \mu\text{m}$ , es decir similar en magnitud a la elegida por *B. improvisus* y de dimensión mucho menor que su propio tamaño corporal ( $470 \mu\text{m}$  de largo x  $230 \mu\text{m}$  de ancho).

Es importante destacar que el éxito de la fijación y metamorfosis depende también de la posibilidad de formar uniones fuertes, logradas por los bioadhesivos secretados que fluyen por los intersticios de la superficie antes de endurecer (Howell y Behrends, 2006). En otras especies del “biofouling”, como *Ascidia interrupta*, las larvas son capaces de reconocer distintas rugosidades del sustrato duro por medio de mecanorreceptores que actúan en el momento de la fijación previamente a la secreción del cemento (Rae Flores y Faulkes, 2008).

Si bien las preferencias por distintas texturas varían a nivel específico, existen determinados patrones que son comunes a la mayoría de los organismos bentónicos. Las nuevas tendencias en protección antiincrustante en lo que respecta a la rugosidad se encuentran, en gran parte, inspiradas en la naturaleza. Se ha pretendido imitar superficies superhidrofóbicas, es decir donde el ángulo de contacto entre la gota de líquido y la superficie sea mayor de  $150^\circ$  provocando que prácticamente no exista contacto entre ambas y se minimice la adhesión. Las superficies superhidrofóbicas se encuentran en la naturaleza por ej. en mariposas y libélulas (Genzer y Efimenko, 2006) y en las hojas de loto (*Nelumbo nucifera*) cuya repelencia al agua le permite despojarse de partículas contaminantes y mantener la superficie limpia, es el denominado “Lotus effect” (Neinhuis y Barthlott, 1997; Marmur, 2006; Callies y Quéré, 2005), mecanismo natural autolimpiante resultado de la combinación de una superficie hidrofóbica y una apropiada rugosidad; otros ejemplos de este mecanismo se encuentran en la piel de la ballena piloto (Baum *et al.*, 2002) y los caparzones de algunos cangrejos y bivalvos provocando que los organismos se adhieran débilmente y se desprendan con facilidad (Becker y Wahl, 1996; Brown *et al.*, 2002; Bers y Wahl, 2004; Scardino y de Nys, 2004; Krug, 2006; Guenther y de Nys, 2006).

Tomando en cuenta estos análisis, los principios en la prevención del “biofouling” podrían encararse, por una parte, a través del desarrollo de superficies que “prefieran” el contacto con el agua más que con la materia orgánica, es decir generando superficies superhidrofílicas; esta propiedad combinada con una completa penetración del agua dentro de las irregularidades del sustrato, cuya escala a su vez debe ser menor que el tamaño de las esporas o larvas (humectabilidad homogénea),

impediría el asentamiento en su interior. Una segunda opción de prevención sería la generación de una superficie superhidrofóbica bajo el agua; en este caso, si la superficie fuese lo suficientemente delgada y se combina con una rugosidad adecuada que soporte una película de aire entre ellas, reduciría la probabilidad de asentamiento del “biofouling” (Marmur, 2006).

Es importante destacar que en el mercado se ofrecen pinturas que generan superficies “superlisas” siendo, de este modo, las que apuestan a metodologías que no incluyen la liberación de biocidas al mar. Por otra parte, se han obtenido resultados satisfactorios con la implementación de un elastómero (Sharklet™) inspirado en la microtextura de la piel del tiburón que posee propiedades antimicrobianas y evita también el asentamiento de cypris y esporas de algas (Carman *et al.*, 2006; Kesel, 2007; Schumacher *et al.*, 2007). Lamentablemente, aún no está disponible en el mercado.

La utilización de texturas como método antifouling tiene como ventaja la compatibilidad con la aplicación de otras tecnologías y es “amigable con el medio ambiente”. Sin embargo, tiene la desventaja de su corta duración y la dependencia del tamaño de la larva, condiciones que no le permiten ser de aplicación universal.

#### *- Incorporación de productos al sustrato*

Otra opción para combatir el “biofouling” es la inclusión de productos con propiedades antiincrustantes (preferentemente no tóxicos) en los materiales del sustrato, por ejemplo en hormigones o cementos. Si bien esta opción es ventajosa en cuanto a costos y al mantenimiento, la desventaja que ofrece es que sólo funciona para determinados materiales que aseguran una lixiviación controlada a lo largo de tiempo.

La modificación de la textura de la superficie y la incorporación de compuestos en la constitución del sustrato, son líneas de investigación que están en desarrollo.

#### *- Aplicación de pinturas*

El panorama actual de la protección contra las incrustaciones atraviesa una etapa clave. La IMO prohibió la utilización de pinturas autopulimentables a base de TBT a partir de 2008 y paralelamente existe una creciente oposición en el uso del cobre. Esta última postura se tomó debido a que se han encontrado concentraciones

de cobre del triple de las permitidas en áreas portuarias (Dafforn *et al.*, 2011) que afectan la fauna marina en distintos aspectos, tales como disminución en la tasa de filtración en bivalvos (Rivera-Duarte *et al.*, 2005), inhibición en el asentamiento de corales (Reichelt-Brushett y Harrison, 2000) y anomalías celulares (Rijstenbil *et al.*, 1994), entre otras.

Esta situación ha llevado a la necesidad de hallar compuestos nuevos, no contaminantes y sin efecto sobre organismos non-target.

La búsqueda de compuestos con propiedades antifouling está orientada hacia el análisis de la actividad de compuestos de origen natural y a los obtenidos por síntesis.

La observación de los fenómenos que ocurren en la naturaleza sirve de “fuente de inspiración” para la búsqueda de sustancias con actividad antifouling. Puede observarse que determinados organismos del bentos poseen abundante fijación de epibiontes en tanto que sobre otros el asentamiento es escaso o nulo. Estos mecanismos, que han evolucionado en forma natural, incluyen métodos químicos, físicos, etológicos o combinaciones de ellos para prevenir la fijación del “fouling” (Wahl, 1989; Pawlik, 1992; Bers y Wahl, 2004). Con esta finalidad se han llevado a cabo exhaustivas investigaciones desde comienzos de la década del '90 con el objeto de identificar el o los productos responsables de la actividad antifouling para luego incorporarlos a pinturas antiincrustantes. Se han podido aislar una gran cantidad de compuestos cuya acción puede ser adecuada para el control de las incrustaciones como por ejemplo, compuestos con pH bajo, repelentes, anestésicos, inhibidores del asentamiento o de la metamorfosis, entre otros. (Pawlik, 1992; Rittschof, 2000; de Nys y Steinberg, 2002; Hellio *et al.*, 2001; Hellio *et al.*, 2002; Fusetani, 2004).

La obtención de compuestos activos naturales a gran escala es el factor limitante para su utilización en productos comerciales. En las últimas décadas, las investigaciones de distintos laboratorios fueron aportando un número considerable de nuevos productos, principalmente de origen marino, con propiedades antifouling pero que, en la mayoría de los casos, resultan de muy difícil adquisición. Teóricamente, estos productos podrían extraerse de organismos cultivados en granjas de maricultura o por síntesis en laboratorio. Sin embargo, en la práctica estas opciones resultan poco viables porque son recursos no sustentables y la metodología es costosa (Mendola, 2003; Dobretsov *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2009; Ralston y Swain, 2009). A su vez, los principios activos se encuentran en muy bajas concentraciones (en función de la baja toxicidad que deben tener respecto del propio organismo) y, en la mayoría de los

casos, resulta difícil lograr una concentración equivalente de compuesto al que posee el organismo vivo. Dado que las moléculas originales son complejas y se obtienen en bajas cantidades se reemplazan por análogos, es decir moléculas con semejanza estructural y que pueden poseer alguna sustitución conservando determinadas propiedades (Clare, 1996).

Como consecuencia, la utilización de nuevos productos debe orientarse hacia otros compuestos de fácil obtención a gran escala, tanto naturales como sintéticos y de bajo costo.

En la década del '80 se iniciaron los ensayos con productos extraídos de plantas terrestres y, recientemente, esta búsqueda ha recobrado nuevo interés (Omae, 2003). Estos compuestos que demostraron acción antiincrustante sobre larvas de cirripedios pertenecen a distintos grupos químicos, entre ellos péptidos cíclicos, alcaloides (Angarano *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2009), flavonoides e isoflavonoides y los polifenoles presentados en este trabajo.

El empleo de taninos, polifenoles de origen natural, representa un hallazgo importante para la protección de las embarcaciones. Su conocida acción antimicrobiana ha sido atribuida a distintos mecanismos (Engels *et al.*, 2009), por un lado, a la capacidad para interactuar con proteínas e inhibir la actividad enzimática (Cannell *et al.*, 1988; Konishi *et al.*, 1993), por otro al efecto sobre la bicapa lipídica de la membrana celular bacteriana (Funatogawa *et al.*, 2004) y a la formación de complejos con iones metálicos (Scalbert, 1991; Chung *et al.*, 1998a; Scalbert *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos en este trabajo agregan a los taninos una nueva propiedad: la inhibición del asentamiento de macrofoulers.

Entre los taninos analizados, el de quebracho fue con el que se obtuvieron resultados más satisfactorios; presenta ventajas basadas en su rápida acción narcótica, aún en bajas concentraciones, su fácil obtención, manipulación y bajo costo. Sin embargo, debido a su elevada solubilidad disminuiría en gran medida la vida útil de la película de pintura por lo que se recomienda, como opción válida, la precipitación del tanino de quebracho con cobre o con aluminio manteniendo el poder antiincrustante.

La utilización de tanato cúprico representa una disminución de 40 veces del contenido de cobre de una pintura antifouling tradicional, lo que alienta la posibilidad de utilizar el pigmento como alternativa al óxido cuproso.



El tanato de aluminio, compuesto no tóxico, incorporado a geles, demostró un comportamiento antiincrustante muy efectivo en el mar. La inclusión en la formulación de pinturas es uno de los proyectos a concretar, finalizado este trabajo.

Otra estrategia para evitar la epibiosis, es la generación de valores bajos de pH, como se observa en especies de tunicados (Stoecker, 1980); coincidentemente las zonas exentas de fijación son aquellas con mayor cantidad de vacuolas acídicas (Hirose *et al.*, 2001). Esta relación entre el grado de acidez y el efecto antiincrustante fue comprobada experimentalmente empleando benzoato de hierro; el efecto narcótico del anión benzoato y/o del ácido benzoico soluble combinado con el descenso en el valor del pH generado por hidrólisis afectó la colonización de especies calcáreas como *B. amphitrite* e *Hydroides elegans*. Si bien la utilización de benzoato de sodio resultó muy efectiva, se concluye que su elevada solubilidad (al igual que los taninos) no permite incluirlo en una pintura antiincrustante. Otros autores incorporaron benzoato de sodio como pequeños agregados a recubrimientos a base de silicona con fines antimicrobianos (Al-Juhni, 2006; Al-Juhni y Zhang Newby, 2006).

Es importante destacar que estos compuestos se incorporan naturalmente a los ciclos biogeoquímicos; se ha comprobado que muchos microorganismos utilizan y degradan al ácido benzoico bajo condiciones aerobias o anaerobias, entre ellos *bacterias* como *Alcaligenes denitrificans*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Desulfomicrobium escambiense* y muchas especies de hongos como *Rhodotorula glutinis* y *Penicillium frequentans* (Fuchs *et al.*, 1993; Elder y Kelly, 1994; Kocwa-Haluch y Lemek, 1995; Míguez *et al.*, 1995; Hofrichter y Fritsche, 1996; Harwood y Gibson, 1997; Sharak Genthner *et al.*, 1997). Por otra parte, el ácido benzoico no se acumula en los sedimentos ni en organismos (Freitag *et al.*, 1985). Además, el benzoato de sodio se degrada bajo condiciones aerobias en medios estandarizados (King y Painter, 1983; Salanitro *et al.*, 1988; Richterich y Steber, 1989) y también en medios conteniendo agua de mar (Courtes *et al.*, 1995). Si bien no se han reportado datos de bio o geoacumulación se supone que siguen los patrones conocidos para el ácido benzoico (IPCS, 2000).

Las pinturas que se encuentran actualmente disponibles en el mercado resaltan en sus especificaciones la ausencia de TBT y el cumplimiento de la legislación vigente por la IMO. Sin embargo, no expresan claramente cuál es el principio activo que le otorga poder antifouling. En los pocos casos en los que se detalla la formulación, la novedad apunta hacia los avances obtenidos en tecnología de los ligantes, en tanto que el biocida continúa siendo el óxido cuproso. Otras pinturas

comerciales combinan el cobre con co-biocidas que, en muchos casos, son herbicidas o pesticidas conocidos y que resultan igualmente tóxicos (Almeida *et al.*, 2007).

La incorporación de un nuevo compuesto en la industria de las pinturas marinas demanda grandes inversiones en lo que respecta a su previo patentamiento y producción. Por estas razones el camino hacia el empleo de compuestos no-tóxicos, biodegradables, naturales o bien sintetizados en laboratorio implica una transición que insume tiempo y esfuerzo pero que debe conducir, necesariamente, a un cambio para evitar la constante contaminación del mar (Rittschof, 2000, 2009; Hellio *et al.*, 2002).

El uso de pigmentos con bajo contenido de cobre se presenta como una opción válida de alta eficiencia, bajos costos tanto de materiales como de elaboración y menor efecto contaminante. En este sentido las pinturas con tiocianato cuproso, las de pigmentos *core-shell* y el tanato cúprico estudiadas en este trabajo representan una alternativa promisoría con demostrada efectividad en el mar.

Sin embargo, en todos los ensayos se comprobó la fijación de diatomeas, lo que demuestra una alta resistencia a la acción tóxica y señala la necesidad de continuar perfeccionando las formulaciones con el propósito de evitar la formación de la biopelícula. Coincidentemente con Reed y Moffat (1983), se comprobó que las macro y microalgas ofrecieron resistencia a productos con cobre.

En los países de Latinoamérica no existe una legislación que regule la elaboración, aplicación y utilización de pinturas marinas. No obstante, las empresas locales productoras de pinturas sostienen que se adecuan a las normativas vigentes en Europa y Estados Unidos.

Sin embargo, los datos recogidos a partir de entrevistas con los propietarios de embarcaciones del Club de Motonáutica, sitio donde se realizaron la mayoría de los muestreos, confirmaron que no existe en el mercado una pintura con más de seis meses de vida útil y que, en algunos casos, siguen utilizando pinturas altamente tóxicas, prohibidas en los países desarrollados desde hace más de 30 años.

#### *- Nuevas tendencias*

Las tendencias actuales en la protección antifouling contemplan la posibilidad de usar bacterias vivas en recubrimientos inteligentes (*smart coatings*), esto es, incorporarlas a la formulación por medio de técnicas de microencapsulamiento y con un mecanismo de acción “a demanda”, las bacterias actuarían sólo cuando perciben el

estímulo de una espora o larva que intenta acercarse al sustrato (Holmstrom y Kjelleberg, 1994; Holmstrom *et al.*, 2000; Chambers *et al.*, 2006; Dobretsov *et al.*, 2006; Yee *et al.*, 2007). Otra opción incluye la utilización de enzimas cuya acción apunta a la inhibición de dos mecanismos involucrados en la fijación, por un lado el efecto directo sobre la disolución del cemento y por otro el efecto biocida sobre el exoesqueleto del cirripedio y lisis de las células bacterianas (Evans y Clarkson, 1993; Abarzua y Jakubowski, 1995; Baum *et al.*, 2003; Meyer y Seegers, 2004; Olsen *et al.*, 2007).

Se ha propuesto la utilización de compuestos de origen animal, como por ejemplo, el mucus glicoproteico de equinodermos, cuyo fundamento para la implementación está basado en que los macrofoulers dispondrían de una película de composición semejante al film primario, formarían uniones con él y se evitaría que arriben al sustrato subyacente (Bavington *et al.*, 2004); también la aplicación de mucus protector de peces con propiedades de lisis celular (Shephard, 1994; Videler *et al.*, 1999; Ebran *et al.*, 2000). Estas últimas propuestas, aunque novedosas, son de muy difícil obtención y aplicación.

Recientemente, la Marina de los Estados Unidos, dio a conocer una metodología novedosa y sumamente costosa, llamada 'grooming', que consiste en la utilización de un robot submarino para el cepillado periódico del casco de los barcos anclados en puerto ('HullBUG', Hull Bioinspired Underwater Grooming).

Las decisiones relativas al uso y regulación de las pinturas antifouling en el medio marino son complejas y requieren la integración de información sobre los costos económicos y ecológicos. La incorporación al mercado de pinturas conteniendo productos naturales, derivados sintéticos o con bajo contenido de cobre como se propone en este trabajo de Tesis, demandará tiempo ya que deban completarse con estudios de impacto ambiental y con un exhaustivo balance entre costos y beneficios. Sin embargo, la situación actual a nivel mundial sobre el control de las incrustaciones, debe orientarse hacia soluciones de este tipo, no solo porque representan una opción que evita en gran medida la contaminación de los mares sino también porque resultan de fácil adquisición y económicamente accesibles.

En las últimas décadas la tecnología antifouling progresó significativamente en el uso de pigmentos inhibidores o biocidas, su incorporación a recubrimientos y el mecanismo de liberación controlada en el mar. El desafío para el futuro debe apuntar indudablemente hacia la obtención de pinturas eficientes, de larga vida útil y "amigables con el medio ambiente".

# Capítulo 12

## Conclusiones



## Conclusiones

### - Cría de *Balanus amphitrite* y *Polydora* sp.

- Se determinó que la cría en laboratorio de *Polydora* sp. es más sencilla que la de *B. amphitrite*.
- Se comprobó una elevada mortalidad en el pasaje a cada estadio metamórfico de *B. amphitrite*, pero aún así es factible completar el ciclo de vida de la especie bajo condiciones de laboratorio.
- Los porcentajes de supervivencia durante la fase larval desde el estadio nauplius I hasta la tapa de fijación de las cypris oscilan entre 9 y 14%. La supervivencia de las cypris en la etapa post-fijación osciló entre el 15 y 38%.
- Los adultos alcanzaron la madurez sexual dos meses después de la fijación y se mantuvieron activos durante siete meses. La velocidad de crecimiento promedio osciló entre 0,03 y 0,09 mm/día.
- Paralelamente, se completó en laboratorio el ciclo de vida desde nauplius hasta la etapa juvenil a partir de cirripedios adultos. Los porcentajes de supervivencia fueron similares a los obtenidos con las larvas del plancton y oscilaron entre 9 y 12%, pero los adultos sólo se mantuvieron durante cuatro meses.
- Las cypris de *B. amphitrite* prefirieron superficies de vidrio liso (rugosidad media  $R_a = 0,09 \mu\text{m}$ ) y la mayoría se asentó sobre ángulos cercanos a  $90^\circ$ .
- El ciclo de vida de *Polydora* sp. se completó entre 19 y 25 días y no se registró preferencia de asentamiento por ninguno de los sustratos ofrecidos.
- Los cultivos de la diatomea *Skeletonema costatum* en una densidad de 100.000 céls/mL resultaron los más adecuados como alimento para las larvas.

- Efecto del óxido cuproso y del tiocianato cuproso

- Se determinó que una solución de concentración de 0,06 mgCu/L de sulfato cúprico evita la fijación del 50% de las cypris de *B. amphitrite* (EC<sub>50</sub>).
- Se determinó que la concentración mínima de cobre en la que es factible la metamorfosis hasta llegar al juvenil fijado ('pinhead'), osciló entre 0,0925 y 0,185 mgCu/L.
- Las cypris demostraron una gran resistencia a soluciones concentradas de cobre (1,20 ppm de cobre en solución) comprobándose actividad durante 8 días.
- El test de recuperación de las larvas sometidas a la exposición de soluciones de cobre, evidenció que nauplii y cypris recobraron la movilidad de los apéndices y la respuesta fototáctica. Sin embargo, el proceso metamórfico fue claramente afectado no pudiendo completar el desarrollo.
- Las larvas son afectadas cuando están expuestas a las mismas concentraciones de ión cúprico en solución proveniente del óxido cuproso o del tiocianato cuproso. Sin embargo, dado que el anión tiocianato resultó inocuo para las larvas se deduce que el tiocianato cuproso actúa como acelerador de la reacción.
- Respecto de la performance de pinturas antifouling tradicionales a base de cobre y formuladas con distintos ligantes, se comprobó que la más efectiva fue la que contenía resina colofonia.
- Las pinturas formuladas a base de tiocianato cuproso, tienen un menor contenido de cobre (3,32 veces menor por unidad de volumen), que la utilizada en las de óxido cuproso. Se concluye que no es necesario equiparar la carga del pigmento ya que con menor contenido de cobre se obtiene una formulación con la misma efectividad.
- Las pinturas con pigmentos *core-shell* expuestas en el mar demostraron una muy buena performance, siendo las más efectivas las que contenían un núcleo (*core*) de pigmentos a base de carbonato de calcio y óxido férrico recubiertos por una capa de tiocianato cuproso (*shell*).
- Los pigmentos *core-shell* reducen 35 veces el contenido de cobre respecto del óxido cuproso y han demostrado una alta efectividad. Esto permite la disminución tanto de costos en la elaboración de las pinturas como del aporte de contaminantes al medio marino.

- *Ensayos empleando taninos, taninos combinados con cobre y con aluminio*

- Se determinó que los tanatos de quebracho y de castaño tienen un fuerte efecto antiincrustante, inclusive a bajas concentraciones. El tanato de mimosa, si bien posee el mismo efecto, actúa a concentraciones más altas.
- El efecto de los tanatos estudiados en solución sobre las larvas es temporario o narcótico.
- Los tanatos incorporados a películas de pintura afectaron la colonización de *B. amphitrite* e interfirieron en el proceso de cementación al sustrato de numerosos organismos de la comunidad del “biofouling”.
- El tanato cúprico en solución mostró un efecto inhibitor y temporario sobre las larvas nadadoras, evitó el asentamiento de cypris de *B. amphitrite* y provocó una débil cementación de los tubos de *Polydora* sp.
- Las pinturas antiincrustantes a base de tanato cúprico expuestas en el mar, resultaron muy efectivas. El contenido de cobre empleado en esta formulación es del orden de 40 veces menor en relación al que se utiliza habitualmente en las pinturas tradicionales de óxido cuproso.
- Respecto del tanato de aluminio incorporado a geles se comprobó efecto antiincrustante sobre especies del micro y macrofouling, pero no logró inhibir la fijación de cirripedios. Esta situación plantea la necesidad de ajustar la concentración del tanato de aluminio respecto de las larvas de cirripedios.

- *Ensayos con benzoato de sodio y benzoato de hierro*

- El benzoato de sodio en solución produjo efecto narcótico o temporario sobre nauplii, cypris y adultos de *B. amphitrite*. El benzoato de sodio incorporado a una pintura, también demostró poder antiincrustante en el mar.
- El efecto de descenso del pH, producido por la hidrólisis del benzoato de hierro en combinación con el efecto narcótico del anión benzoato, evidenciaron un alto poder antiincrustante tanto en laboratorio como en el mar.

## Conclusión final

Las hipótesis planteadas fueron:

- La utilización de compuestos de origen natural, producidos por especies vegetales nativas, o de origen sintético, como los benzoatos, con propiedades antibacterianas, evitan la formación del film primario y de esta forma, interrumpen la secuencia de fijación del “biofouling”.
- Ambos compuestos en combinación con pequeñas cantidades de cobre constituyen pigmentos novedosos para ser incorporados a una pintura de matriz soluble y lograr una formulación de alta performance y baja toxicidad.

Señalamos que se han hallado pigmentos que tienen la posibilidad de incluirse en pinturas antiincrustantes y que reúnen las condiciones óptimas en cuanto a la efectividad, el bajo costo y el mínimo efecto contaminante.

En cuanto a la reducción del contenido de cobre, las pinturas con mejor performance fueron las elaboradas en base a pigmentos tipo *core-shell* o con tanato cúprico.

Por otra parte, las formulaciones con benzoato de hierro y con taninos resultaron las más promisorias como pinturas no-tóxicas.

Los resultados obtenidos indican que estas formulaciones pueden transferirse al sector productivo para la industrialización y que, por otra parte, contribuirán a la preservación de los ecosistemas acuáticos.



# Capítulo 13

## Bibliografía



## Bibliografía

- Abarzua, S. and Jakubowski, S. (1995). Biotechnological investigation for the prevention of biofouling: I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 123, 301-312.
- Abbott, A. (1990). Bioadhesives: potential for exploitation. *Sci. Progress*, 74, 131-146.
- Abbott, A.; Abel, P.; Arnold D. and Milne, A. (2000). *Sci. Total Environ.*, 258, 5-19.
- Abd El Haleem, S. and Abdel Fattah, A. (1986). The role of some organic anions in promoting or inhibiting the corrosion of zinc. *Surf. Coat. Technol.*, 29, 41.
- Al-Juhni, A. and Zhang Newby, B. (2006). Incorporation of benzoic acid and sodium benzoate into silicone coatings and subsequent leaching of the compound from the incorporated coatings. *Progress in Organic Coatings*, 56, 135-145.
- Al-Juhni, A. (2006). Incorporation of less toxic antifouling compounds into silicone coatings to study their release behaviors. Ph. D. Thesis, 206 pp.
- Almeida, E.; Diamantino, T. and de Sousa, O. (2007). Marine paints: the particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 59, 2-20.
- Amaral, A. and Nonato, E. (1981). Anelídeos poliquetos da costa brasileira. Características e chave para famílias. Glossário. CNPq, Série Manuais de Identificação da Fauna Brasileira, Vol. 1/2, 47 pp.
- Amsler, C. and Fairhead, V. (2006). Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Adv. Bot. Res.*, 43, 1-91.
- Andersson, A. and Kautsky, L. (1996). Copper effects on reproductive stages of Baltic Sea *Fucus vesiculosus*. *Mar. Biol.*, 125, 171-176.
- Anderson, C.; Atlar, M.; Callow, M.; Candries, M.; Milne, A. and Towsin, R. (2003). The development of foul-release coatings for seagoing vessels. *J. Marine Des. Oper.* B, 4, 11-23.
- Andrade, L.; Farina, M. and Amado Filho, G. (2004). Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, 117-125.
- Angarano, M.; McMahon, R.; Hawkins, D. and Schetz, J. (2007). Exploration of structure-antifouling relationships of capsaicin-like compounds that inhibit zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) macrofouling. *Biofouling*, 23, 295-305.

- Anger, K; Anger, V. and Hagmeier, E. (1986). Laboratory studies on larval growth of *Polydora ligni*, *Polydora ciliata*, and *Pygospio elegans* (Polychaeta, Spionidae). *Helgoländer Meeresunters*, 40, 377-395.
- Anil, A. and Kurian, J. (1996). Influence of food concentration, temperature and salinity on the larval development of *Balanus amphitrite*. *Mar. Biol.*, 127 (1), 115-124.
- Anon. (1952). Woods Hole Oceanographic Institution. Marine fouling and its prevention. United States Naval Institute, Annapolis, Maryland, 368 pp.
- Anon. (1967). Catalogue des principales salissures marines. Serpules tubicoles. Vol. III, OCDE, 79 pp.
- Argawal, P. and Landolt, D. (1998). Effect of anions on the efficiency of aromatic carboxylic acid corrosion inhibitors in near neutral media: Experimental investigation and theoretical modeling, *Corrosion Science*, 40/5, 673.
- Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I.; Jackson, F. and Coop, R. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Veterinary parasitology*, 99 (3), 205-219.
- Athey, E. and Porowska R. (1995). Dispersants in aqueous anti-corrosion systems. *European Coat. J.*, (1-2), 20.
- Avelin, M. Sr; Vitalina, M. Sr; Rittschof, D. and Nagabhushanam, R. (1993). Bacterial-barnacle interaction: potential of using juncellins and antibiotics to alter structures of bacterial communities. *J. Chem. Ecol.*, 19, 2155 - 2167.
- Azambuja, D.; Holzle, L.; Muller, I. and Piatnicki, C. (1999). Electrochemical behaviour of iron in neutral solutions of acetate and benzoate anions. *Corrosion Science*, 41, 2083.
- Baier, R. (1986). Biosurface chemistry for fun and profit. *Chemtec*, 16, 178-185.
- Baier, R.; Shafrin, E. and Zisman, W. (1968). Adhesion: Mechanisms that assist or impede it. *Science*, 162, 1360.
- Baier, R. (1972). *Proc. 3rd. International Congr. Marine Corrosion and Fouling*. National Bureau of Standard, Gaithersburg, 633-639.
- Baldwin, E.; Nisperos-Carriedo, M. and Baker, R. (1995). Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 35 (6), 509-524.

- Balfour, J. (1992). Fine particle titanium dioxide- its properties and uses. *J. Oil & Chemists' Assoc.*, 1, 21.
- Banso, A. and Adeyemo, S. (2007). Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. *African Journal of Biotechnology*, 6(15), 1785-1787.
- Barnes, H. (1956). Surface roughness and the settlement of *Balanus balanoides* (L.). *Arch. Soc. Zool. Bot. Fenn. Vanamo*, 10, 164-168.
- Barnes, H. (1970). Adhesion in biological systems (Manly, R., ed.) Academic Press, 89-111.
- Barnes, H. and Barnes, M. (1965). Egg size, nauplius size, and their variation with local, geographical, and specific factors in some common cirripedes. *J. Anim. Ecol.*, 34, 391-402.
- Barnes, H. and Barnes, M. (1967). The effect of starvation and feeding on the time of production of egg masses in the boreo-artic cirripede *Balanus balanoides*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1, 1-6.
- Barnes, H. and Barnes, M. (1975). The general biology of *Verruca stroemia* (Muller). V. Effect of feeding, temperature and light regime on breeding and moulting cycles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 19, 227-232.
- Bassindale, R. (1936). The development stages of three English barnacles *Balanus balanoides* (Linn.), *Chtamalus stellatus* (Poli), and *Verruca stroemia* (O. F. Müller). *Proc. Zool. Soc. London*, 106, 57-74.
- Bastida, R. (1968). Preliminary notes of the marine fouling at the port of Mar del Plata (Argentina). *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Athens, Greece, 557-562.
- Bastida, R. (1969). Las incrustaciones biológicas en el puerto de Mar del Plata, período 1966/67 (segunda parte). Estudio sobre paneles acumulativos. *LEMIT-Anales*, 4, 1-60.
- Bastida, R. (1971). Las incrustaciones biológicas de las costas argentinas. La fijación anual en el puerto de Mar del Plata durante tres años consecutivos. *Corrosión y Protección*, 2 (1), 21-37.
- Bastida, R.; Mandri, M. e Ieno, E. (1995). Los organismos incrustantes del puerto de Mar del Plata (Argentina). *Polydora ligni*; aspectos biológicos y ecológicos. *CIDEPINT-Anales*, 253-266.

- Bastida, R.; Spivak, E.; L'Hoste, S. y Adabbo, H. (1974). Las incrustaciones biológicas de Puerto Belgrano. I. Estudio de la fijación sobre paneles mensuales, período 1971/72. *LEMIT-Anales*, 3, 97-165.
- Bastida, R. and L'Hoste, S. (1976). Trophic relations of the fouling communities at the port of Mar del Plata. *LEMIT-Anales*, 159-203.
- Bastida, R. y Adabbo, H. (1977). Fijación de "fouling" en el puerto de Mar del Plata, período 1969/70. *Corrosión y Protección*, 8 (5), 1-14.
- Bastida, R. y Bastida, V. L. de (1978). Las incrustaciones biológicas de Puerto Belgrano. III. Estudio de los procesos de epibiosis registrados sobre paneles acumulativos. *CIDEPINT-Anales*, 54-97.
- Bastida, V. y Bastida, R. (1980). Los briozoos de las comunidades incrustantes de puertos argentinos. *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Biología Marina, Barcelona, España, 371-390.
- Bastida, R.; Mandri, M. T. de; Bastida, V. L. de and Stupak, M. (1980). Ecological aspects of the marine fouling at the Port of Mar del Plata, Argentina, during the period 1973/74. *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Biología Marina, Barcelona, España, 299-320.
- Baum, C.; Meyer, W.; Stelzer, R.; Fleischer, L. and Siebers, D. (2002). Average nanorough skin surface of the pilot whale (*Globicephala menas*, Delphinidae): considerations on the self-cleaning abilities based on nanoroughness. *Mar. Biol.*, 140, 653-657.
- Baum, C.; Simon, F.; Meyer, W.; Fleischer, L.; Siebers, D.; Kacza, J. and Seeger, J. (2003). Surface properties of the pilot whale *Globicephala menas*. *Biofouling*, 19, suppl., 181-186.
- Bavington, C.; Lever, R.; Mulloy, B; Grundy, M.; Page, C.; Richardson, N. and McKenzie, J. (2004). Anti-adhesive glycoproteins in echinoderm mucus secretions. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 139, 607-617.
- BFGoodrich Kalama Inc. (1999). Benzoic acid. Product information bulletin. Kalama, WA.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 13, 184 -196.

- Becker, K. and Wahl, M. (1996). Behavior patterns as natural antifouling mechanisms of tropical marine crabs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 203, 245-258.
- Bellas, J. (2005). Toxicity assessment of the antifouling compound zinc pyrithione using early developmental stages of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Biofouling*, 21, 289-296.
- Bers, V. and Wahl, M. (2004). The influence of natural surface microtopographies on fouling. *Biofouling*, 20 (1), 43-51.
- Berntsson, K.; Jonsson, P. and Lejhall, M. (2000). Analysis of behavioural rejection of micro-textured surface and implications for recruitment by the barnacle *Balanus improvisus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 251, 59-83.
- Bhat, T.; Singh, B. and Sharma, O. (1998). Microbial degradation of tannins. A current perspective. *Biodegradation*, 9 (5), 343-357.
- Blake, J. (1969). Systematics and ecology of shell-boring polychaetes from new England. *Amer. Zool.*, 9, 813-820.
- Blustein, G. and Zinola, C. (2004). Inhibition of steel corrosion by calcium benzoate adsorption in nitrate solutions; theoretical and experimental approach. *J. of Colloid and Interface Science*, 278, 393.
- Blustein, G.; Rodríguez, J.; Zinola, C. and Romagnoli, R. (2005). Adsorption and inhibition of steel corrosion by calcium benzoate in nitrate solutions. *Corrosion Science*, 47, 369.
- Blustein, G. (2005). Benzoatos metálicos como pigmentos anticorrosivos, síntesis y caracterización. Capítulo 3. *En: Desarrollo de inhibidores a base de benzoatos metálicos para la protección anticorrosiva del acero*. Tesis aprobada en la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Blustein, G.; Romagnoli, R.; Jaén J.; Di Sarli A. and del Amo, B. (2006). Zinc basic benzoate as eco-friendly steel corrosion inhibitor pigment for anticorrosive epoxy-coatings. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 290, 7-18.
- Blustein, G. ; Di Sarli, A. ; Jaén, J. ; Romagnoli, R. and del Amo, B. (2007a). Study of iron benzoate as a novel steel corrosion inhibitor pigment for protective paint films. *Corrosion Science*, 49, 4202-4231.

- Blustein, G.; Romagnoli, R.; Jaén, J.; Di Sarli, A. and del Amo, B. (2007b) Aluminum basic benzoate-based coatings: evaluation of anticorrosion properties by electrochemical impedance spectroscopy and accelerated tests. *Corrosion – NACE*, 63, 899-915.
- Boltovskoy, E. (1970). Masas de agua (característica, distribución, movimientos) en la superficie del Atlántico sudoeste, según indicadores biológicos. Foraminíferos. Argentina, Servicio de Hidrografía Naval, H. 643, p. 1-99.
- Boltovskoy, D. (1981). Características biológicas del Atlántico Sudoccidental. *In*: Boltovskoy, D. (ed.), Atlas del Zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino, Publicación Especial del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata.
- Bond, P.; Brown, M.; Moate, R.; Gledhill, M.; Hill, S. and Nimmo, M. (1999). Arrested development in *Fucus spiralis* (Phaeophyceae) germlings exposed to copper. *European Journal of Phycology*, 34, 513-521.
- Bondietti, G.; Sinniger, J. and Stumm, W. (1993). The reactivity of Fe (III) (hydr)oxides: Effects of ligands in inhibiting the dissolution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect*, 79, 157-167.
- Booth, G. and Tiller, A. (1960). *Trans. Faraday Soc.*, 56, 1689-1696.
- Brancato, M. (1999). Oceans'99 mts/ieee, 2 (2), 676.
- Branscomb, E. and Rittschof, D. (1984). An investigation of low frequency sound waves as a means of inhibiting barnacle settlement. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 79 (2), 149-154.
- Brooks, K. and Mahnken, C. (2003). Interactions of Atlantic salmon in the Pacific Northwest environment. III. Accumulation of zinc and copper. *Fish. Res.*, 62, 295-305.
- Brooks, S. and Waldock, M. (2009). The use of copper as a biocide in marine antifouling paints. *In*: Advances in marine antifouling coatings and technologies (C. Hellio and D. Yebra, eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Brown, B.; Creed, R. and Dobson, W. (2002). Branchiobdellid annelids and their crayfish hosts: are they engaged in a cleaning symbiosis?. *Oecologia*, 132, 250-255.

- Bryan, P.; Qian, P.; Kreider, J. and Chia, F. (1997). Induction of larval settlement and metamorphosis by pharmacological and conspecific associated compounds in the serpulid polychaete *Hydroides elegans*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 146 (1-3), 81-90.
- Buzzini, P.; Artapitsas, P.; Goretti, M.; Branda, E.; Turchetti, B.; Pinelli, P.; Ieri, F. and Romani, A. (2008). Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. *Mini Rev. Med. Chem.*, 8 (12), 1179-1187.
- Cáceres-Martínez, J.; Montes de Oca-Macías, P. and Vásquez-Yeomans, T. (1998). *Polydora* sp. Infestation and health of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW Mexico. *J. Shellfish Res.*, 17 (1), 259-264.
- Caillet-Bois, T. (1944). Historia Naval Argentina. Escuela Naval Militar, Río Santiago, 552 pp.
- Callies, M. and Quéré, D. (2005). On water repellency. *Soft Matter* 1, 55-61.
- Callow, M. (1986). Fouling algae from 'in service' ships. *Botanica Marina*, 24, 351-357.
- Callow, M. (1999). The status and future of biocides in marine biofouling prevention. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M. (eds.). Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 3, Biofilms, Bioadhesion, Corrosion and Biofouling, Enfield, N., Science Publishers, 109-126.
- Callow, J.; Crawford, S.; Higgins, M.; Mulvaney, P. and Wetherbee, R. (2000). The application of atomic force microscopy to topographical studies and force measurements on the secreted adhesive of the green alga *Enteromorpha*. *Planta*, 211 (5), 641-647.
- Callow, M.; Jennings, A.; Seegert, C.; Gibson, A.; Wilson, L.; Feinberg, A.; Baney, R. and Callow, J. (2002). Microtopographic cues for settlement of zoospores of the green fouling alga *Enteromorpha*. *Biofouling*, 18 (3), 237-245.
- Campbell, J. (1982). The mechanisms of adhesion of *Enteromorpha clathrata*. Technical memo. Pennsylvania State Univ., University Park Applied Research Lab. Technical memo, 141 pp.
- Candries, M. (2000). Paint systems for the marine industry. Report University of Newcastle-Upon-Tyne, 27 pp.
- Cannell, R.; Farmer, P. and Walker, J. (1988). Purification and characterization of pentagalloylglucose, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor/antibiotic from the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *Biochem. J.*, 255, 937-941.



- Capítoli, R. (1983). Sequência temporal de colonização e desenvolvimento da comunidade incrustante na região mixohalina da lagos dos Patos; RS, Brasil. Tesis, Universidade do Rio Grande, 99 pp.
- Caprari, J. y Lecot, C. (2001). El control de bivalvos invasores *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) en la Central Hidroeléctrica Yacyretá mediante pinturas. Actas Seminario Internacional sobre Gestión Ambiental e Hidroelectricidad, Salto Grande.
- Cardarelli, N.; King, I. and Walker, K. (1968). Marine biological adhesives. *Chem. Soc. of Washington Symp.*
- Carman, M.; Estes, T.; Feinburg, A.; Schumacher, J.; Wilkerson, W.; Wilson, L.; Callow, M.; Callow, J. and Brennan, A. (2006). Engineered antifouling microtopographies - correlating wettability with cell attachment. *Biofouling*, 22, 11-21.
- Chamberlain, A. (1976). Algal settlement and secretion of adhesives materials. 3<sup>rd</sup> Int. Biodegradation Symposium (Sharpley, J., Kaplan, A., eds.), 417-432.
- Chambers, L.; Stokes, K.; Walsh, F. and Wood, R. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surf. Coat. Technol.*, 201, 3642-3652.
- Chapman, G. (1978). Toxicities of cadmium, copper, and zinc to four juvenile stages of Chinook salmon and steelhead. *Trans. American Fish Soc.*, 107, 841-847.
- Chapman, G. and Stevens, D. (1978). Acutely lethal levels of cadmium, copper, and zinc to adult male coho salmon and steelhead. *Trans. American Fish Soc.*, 107, 837-840.
- Chávez-Zazueta, R. (2003). Crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, en la parte influencia marina de la Laguna de Barra de Navidad, Jalisco, México. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Guadalajara, Jalisco, 71 pp.
- Chatfield, H. (ed.). (1962). The science of surface coatings.
- Chet, I.; Asketh, P. and Mitchell, R. (1975). Repulsion of bacteria from marine surfaces. *Applied Microbiology*, 30 (6), 1043-1045.
- Chet, I. and Mitchell, R. (1976). Control of marine fouling by chemical repellents. *Proc. 3rd Int. Biodeterioration Symp.*, Appl. Sci., London, 515-521.

- Chou, C.; Paon, L.; Moffat, J. and Zwicker, B. (2000). Copper contamination and cadmium, silver, and zinc concentrations in the digestive glands of American lobster (*Homarus americanus*) from the inner Bay of Fundy, Atlantic Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 70, 948-956.
- Chou, C.; Haya, K.; Paon, L. and Moffat, J. (2003). Metals in the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) as an indicator for the near-field effects of chemical wastes from salmon aquaculture sites in New Brunswick, Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 70, 948-956.
- Christie, A.; Evans, L. and Callow, M. (1975). A new look at marine fouling. Part 2. *Shipping World and Shipbuilder*, 1043-1045.
- Chung, K., Stevens, S. Jr, Lin, W. and Wei, C. (1993). Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 29-32.
- Chung, K.; Wong, T.; Wei, Ch.; Huang, Y. and Lin, Y. (1998a). Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38, 421 - 464.
- Chung, K.; Lu, Z. and Chou, M. (1998b). Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 1053-1060.
- Claissie, D and Alzieu, C. (1993). Copper contamination as a result of antifouling paint regulations?. *Mar. Pollut. Bull.*, 26, 395-397.
- Clare, A. (1996). Marine natural product antifoulants: status and potential. *Biofouling*, 9, 211-229.
- Clare, A.; Rittschof, D; Gerhart, D. and Maki, J. (1992). Molecular approaches to nontoxic antifouling. *Invert. Reprod. Dev.*, 22, 67-76.
- Clare, A.; Freet, R.; Mc. Clary, M.Jr. (1994). On the antennular secretion of the cyprid of *Balanus amphitrite*, and its role as a settlement pheromone. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 74, 243-250.
- Clausen T.; Provenza, F.; Burrit, E.; Reichardt, P. and Bryant, J. (1990). Ecological implications of condensed tannin structure: a case study. *J. Chem. Ecol.*, 16, 2381-2391.
- Clausen, T.; Reichardt, P.; Bryant, J. and Provenza, F. (1992). Condensed tannins in plant defense: a perspective on classical theories. *In: Plant polyphenols: synthesis,*

- properties, significance (Hemingway, R. and Lacks, P., eds.). Plenum Press, New York.
- Clijsters, H. and van Assche, F. (1985). Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth. Res.* 7, 31-40.
- Connell, J. (1985). The consequences of variation initial settlement vs. post-settlement mortality in rocky intertidal communities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 93, 11-45.
- Conover, J. and Sieburth, J. (1966). Effect of tannin excreted from Phaeophyta on planktonic animal survival in tide pools. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 5, 99-100.
- Cook, P. and Henschel, J. (1984). *Proc. 6<sup>th</sup> Intern. Congr. Marine Corrosion and Fouling*, Marine Biology, Athens, Greece, 211-220.
- Corpe, W. (1972). Microfouling: the role of primary film forming marine bacteria. *Proc. 3<sup>rd</sup> International Congr. Marine Corrosion and Fouling*, National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD, 598-609.
- Costlow, J. and Bookhout, C. (1957). Larval development of *Balanus eburneus* in the laboratory. *The Biological Bulletin*, 112 (3), 313-324.
- Costlow, J. and Bookhout, C. (1958). Larval development of *Balanus amphitrite* var. *denticulata* Broch reared in the laboratory. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, 114 (3), 284-295.
- Courtes, R.; Bahlaoui, A.; Rambaud, A.; Deschamps, F.; Sunde, E. and Dutrieux, E. (1995). Ready biodegradability test in seawater: a new methodological approach. *Ecotoxicology and environmental safety*, 31, 142-148.
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. I *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.
- Cowley, A. and Gallon, M. (1988). Who needs wetting agents? *J. Oil & Chemists' Assoc.*, 10, 310-314.
- Cragolino, G. and Tuovinen, O. (1984). The role of sulfate-reducing and sulfur-oxidising bacteria in the localized corrosion of iron-based alloys. A review. *Intern. Biodet.*, 20, 9-27.
- Crisp, D. (1961). Territorial behaviour in barnacle settlement. *J. Exp. Biol.*, 429-449.
- Crisp, D. (1972) Mechanisms of adhesion of fouling organisms. *Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, National Bureau of Standards, Gaithersburg, Maryland, USA, 691-709.

- Crisp, D. (1974). Factors influencing the settlement of marine invertebrate larvae. *In*: Grant, P.; Mackie, A. (eds.). Chemoreception in marine organisms. Academic Press, New York, 177-265.
- Crisp, D. (1984). Overview of research on marine invertebrate larvae, 1940-1980. Marine biodeterioration: An interdisciplinary study, J. Costlow and R. Tipper (eds.) (Annapolis, MD: Naval Institute Press).
- Crisp, D. and Barnes, H. (1954). The orientation and distribution of barnacles at settlement with particular reference to surface contour. *J. Anim. Ecol.*, 23, 142-162.
- Crisp, D. and Spencer, C. (1958). The control of the hatching process in barnacles. *Proc. Roy. Soc. (Ser. B)* 148, 278-299.
- Crisp, D. and Ryland, J. (1960). The influence of filming and surface texture on the settlement of marine organisms. *Nature*, 185, 119.
- Crisp, D. and Bourget, E. (1985). Growth in barnacles. *In*: Blaxter, J.; Russell, F. and Yonge, M. (eds.). Advances in marine biology, 22, 200-244. Academic Press, New York.
- Cruz, B.; Díaz-Cruz, J.; Ariño, C., Tauler, R. and Esteban, M. (2000). Multivariate curve resolution of polarigraphic data applied to the study of the copper-binding ability of tannic acid. *Analytica Chimica Acta*, 424, 203-209.
- Culleré, J. and Lluveras, M. (1983). Mecanismo de la acción inhibidora del benzoato sódico. *Rev. Iberoam. de Corrosión y Protección*, 225.
- Da Gama. A.; Pereira, R.; Carvalho, A.; Coutinho, R. Yoneshigue- Valentin, Y. (2002). The effect of seaweed secondary metabloites on biofouling. *Biofouling*, 18, 13-20.
- Dafforn, K.; Lewis, J. and Johnston, E. (2011). Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Mar. Pollut. Bull.*, 62, 453-465.
- Dahlstrom, M.; Jonsson, P. and Elwing, H. (2004). Surface wettability as a determinant in the settlement of the barnacle *Balanus improvisus* (Darwin). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 305, 223-232.
- Darwin, Ch. (1851). A monograph on the sub-class Cirripedia, with figures of all the species. The Lepadidae; or, Pedunculated Cirripedes. Ray Society, London, 410 pp.

- Darwin, Ch. (1854). A monograph on the sub-class Cirripedia, with figures of all the species. The Balanidae, (or Sessile Cirripedes); The Verrucidae, etc. Ray Society, London, 712 pp.
- Darrigran, G. and Pastorino, G. (1995). The recent introduction of Asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. *Veliger*, 38, 183-187.
- Davis, A. and Wright, A. (1989). Interspecific differences in fouling of two congeneric ascidians (*Eudistoma olivaceum* and *E. capsulatum*). Is surface acidity an effective defense?. *Mar. Biol.*, 102, 491-497.
- Dayton, P. (1971). Competition, disturbance, and community organization: the provision and subsequent utilization of space in a rocky intertidal community. *Ecol. Monogr.*, 41, 351-389.
- Desai, D. (2002). Studies on some ecological aspects of *Balanus amphitrite* (Cirripedia, Thoracica). National Institute of Oceanography. Council of Scientific & Industrial Research. Dona Paula, Goa. India. Ph Thesis.
- De Bruyne, T.; Pieters, L.; Deelstra H. and Vlietinck A. (1999). Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. System. Ecol.*, 27, 445 - 459.
- de la Court, F. and de Vries, H. (1973). The leaching mechanism of cuprous oxide from antifouling paints. *J. Oil & Chemists' Assoc.*, 56 (8), 388-395.
- de Nys, R.; Steinberg, P., Willemson, P.; Dworjanyn, S.; Gabelish, C. and King, R. (1995). Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling*, 8, 259-271.
- de Nys, R. and Steinberg, P. (1999). Role of secondary metabolites from algae and seagrasses in biofouling control. In: Fingerman, M., Nagabhushanan, R., Thompson, M. (eds.). Recent advances in marine biotechnology. Science Publishers Incorporated, NH, USA, 223-244.
- de Nys, R. and Steinberg, P. (2002). Linking marine biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 244-248.
- de Nys, R.; Givskov, M.; Kumar, N; Kjelleberg, S. and Steinberg, P. (2006). Furanones. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 42, 55-86.
- del Amo, B.; Giúdice, C. and Villoria, G. (1990). Evaluating antifouling paints. *European Coatings Journal*, (1-2), 8-14.

- Desai, D. and Anil, A. (2004). The impact of food type, temperature and starvation on larval development of *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 306, 113-137.
- Desai, D. and Anil, A. (2005). Recruitment of the barnacle *Balanus amphitrite* Darwin in a tropical estuary: implications of environmental perturbation, reproduction and larval ecology. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 89, 909-920.
- Deschamps, A. (1989). Microbial degradation of tannins and related compounds. *In*: Lewis, N. and Paice, M. (eds.). Plant cell wall polymers biogenesis and biodegradation. Washington DC: American Chemical Society, pp. 559-566.
- Destefani, L. (1967). Famosos veleros argentinos. Centro Naval, Instituto de Publicaciones Navales, 213 pp.
- DeVore, D.; Engebretson, G.; Schachtele, C. and Sauk, J. (1984). Isolation and characterization of adhesive proteins secreted by the sea mussel, *Mytilus edulis*. *Proc. 6<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Marine Biology, Athens, Greece, 245-258.
- Dexter, S. (1979). Influence of substratum critical surface tension on bacterial adhesion-in situ studies. *J. Colloid Interface Sci.*, 70, 346-354.
- Dick, R. (1970). Antifouling coatings. Man versus marine fouling. *Paint and Varnish Production*, 35-40.
- Dickman, M. (1998). Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environment International*, 24 (7), 749-759.
- Digrak, M.; Ilcim, A.; Alma, M and Sen, S. (1999). Antimicrobial activities of the extracts of various plants (valex, mimosa bark, gallnut powders, *Salvia* sp. and *Phlomis* sp.). *Tr. J. of Biology*, 23, 241-248.
- Dobretsov, S. and Qian, P. (2004). The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephtya* sp. in the inhibition of larval settlement. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 299, 35-50.
- Dobretsov, S.; Dahms, H.; Tsoi, M. and Qian, P. (2005). Chemical control of epibiosis by Hong Kong sponges: the effect of sponge extracts on micro- and macrofouling communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 297, 119-129.
- Dobretsov, S. and Qian, P. (2006). Facilitation and inhibition of larval attachment of the bryozoan *Bugula neritina* in association with mono-species and multi-species biofilms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 333, 263-274.

- Dobretsov, S.; Dahms, H. and Qian, P. (2006). Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling*, 22, 43-54.
- Eashwar, M.; Chandrasekaran, P. and Subramanian, G. (1988). Marine microbial films and the corrosion of steel. *Electrochem.*, 4, 115-119.
- Ebran, N.; Julien, S.; Orange, N.; Auperin, B. and Molle, G. (2000). Isolation and characterisation of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore forming properties and their antibacterial activities. *Biochim. Biophys. Acta*, 1467, 271-280.
- Edyvean, R. and Terry, L. (1983). Polarization studies of 50D steel in cultures of marine algae. *Int. Biodeter. Bull.*, 19, 1-11.
- Edyvean, R.; Terry, L. and Picken, G. (1985). Marine fouling and its effects on offshore structures in the North Sea. A review. *International Biodeterioration*, 21 (4), 277-284.
- Elder, D. and Kelly, D. (1994). The bacterial degradation of benzoic acid and benzenoid compounds under anaerobic conditions: Unifying trends and new perspectives. *FEMS microbiology reviews*, 13, 441-468.
- El-Komi M. and Kajihara, T. (1991). Breeding and moulting of barnacles under rearing conditions. *Mar. Biol.*, 108, 83-89.
- Ellis, W. (1986). Solvents. *Federation Series on Coatings Technology*.
- Engels, C.; Knödler, M.; Zhao, Y.; Carle, R.; Gänzle, M. and Schieber, A. (2009). Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 7712-7718.
- Ergun, M. and Turan, Y. (1991). Pitting potential and protection potential of carbon steel for chloride ion and the effectiveness of different inhibiting anions. *Corrosion Science*, 32, 1137-1142.
- Eurof Davies, D. and Slaiman, Q. (1971). Mechanism of the corrosion inhibition of Fe by sodium benzoate - I. The influence of concentration and pH in air-saturated solutions of sodium benzoate. *Corrosion Science*, 11, 671-682.
- Eurof Davies D. and Slaiman, Q. (1973). Mechanism of the corrosion inhibition of iron by sodium benzoate - III. The role of oxygen, *Corrosion Science*, 13, 891-905.

- Evans, L. and Christie, A. (1970). Studies on the ship-fouling alga *Enteromorpha*. I. Aspects of the fine-structure and biochemistry of swimming and newly settled zoospores. *Ann. Bot.*, 34 (135), 451-456.
- Evans, L., Hoagland, K. (eds.) (1986). Algal biofouling. Studies in Environmental Science 28, Elsevier, VII-IX.
- Evans, L. and Clarkson, N. (1993). Antifouling strategies in the marine environment. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 119S-124S.
- Falasco, E.; Bona, F.; Ginepro, M., Hlúbiková, D.; Hoffmann, L. and Ector, L. (2009a). Morphological abnormalities of diatom silica walls in relation to heavy metal contamination and artificial growth conditions. *Water SA*, 35 (5), 595-606.
- Falasco, E.; Bona, F.; Badino, G.; Hoffmann, L. and Ector, L. (2009b). Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia*, 623, 1-35.
- Fauchald, K. (1977). The polychaete worms. Definitions and keys to the orders, families and genera. Natural History Museum County, Science Series 28, 188 pp.
- Fauvel, P. (1977). Faune de France. 16. Polychètes sédentaires. Addenda aux Errantes, Archiannélides, Myzostomaires. Office Central de Faunistique, Kraus Reprint, Nendeln/Liechtenstein, 494 pp.
- Feng, D.; Ke, C.; Lu, C. and Li, S. (2009). Herbal plants as a promising source of natural antifoulants: evidence from barnacle settlement inhibition. *Biofouling*, 25, 181-190.
- Ferry, J. and Carritt, D. (1946). Action of antifouling paints. Solubility and rate of solution of cuprous oxide in seawater. *Industrial and Engeneering Chemistry*, 38, 612-617.
- Fletcher, R. (1975). Heteroantagonism observed in mixed algal cultures. *Nature*, 253, 534-535.
- Fletcher, M. (1980). Microbial adhesion to surfaces. (Berkley, R.; Lynch, J.; Melling, J.; Rutter, P. and Vincent, B., eds.). Ellis Horwood, Chichester, UK, 196-210.
- Fletcher, R.; Baier, R. and Fornalik, M. (1984). The influence of surface energy on spore development in some common marine fouling algae. *Proc. 6<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Marine Biology, Athens, Greece, 129-144.
- Floerl, O.; Pool, T. and Inglis, G. (2004). Positive interactions between nonindigenous species facilitate transport by human vectors. *Ecol. Appl.*, 14, 1724-1736.



- Floerl, O.; Inglis, G. and Marsh, H. (2005). Selectivity in vector management: an investigation of the effectiveness of measures used to prevent transport of non-indigenous species. *Biol. Invasions*, 7, 459-475.
- Forbes, L.; Seward, M. and Crisp, D. (1971). Orientation to light and the shading response in barnacles. *4<sup>th</sup> European Marine Biol. Symposium*. (Crisp, D., ed.), Cambridge, 539-558.
- Forward, R.; Cronin, T. and Stearns, E. (1984). Control of diel vertical migration: photoresponses of a larval crustaceans. *Limnol Oceanogr.*, 29, 146-29154.
- Foster, M. (1975). Regulation of algal community development in a *Macrocystis pyrifera* forest. *Mar. Biol.*, 32, 331-342.
- Foster, M.; Harrold, C. and Hardin, D. (1991). Point vs. photo quadrat estimates of the cover of sessile marine organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 146, 193-203.
- Freeman, J. (1977). Department of energy offshore technology, paper, OTP 1.
- Freiberger, A. and Cologer, C. (1966). Rearing acorn barnacle cyprids in the laboratory for marine fouling studies. *Naval Engineers Journal*, 881-890.
- Freitag, D.; Ballhorn, L.; Geyer, H. and Korte, F. (1985). Environmental hazard of organic chemicals. An experimental method of the assessment of the behaviour of organic chemicals in the ecosphere by means of simple laboratory test with <sup>14</sup>C labeled chemicals. *Chemosphere*, 14, 1589-1616.
- French, M. S. and Evans, L. V. (1986). Fouling on paints containing copper and zinc. *Algal Biofouling* (Evans, L. and Hoagland, K., eds.), Elsevier, Amsterdam, cap. 6, 79-99.
- Fuchs, G.; el Said, M.; Altenschmidt, U.; Koch, J.; Lack, A. Brackmann, R. ; Lochmeyer, C. and Oswald, B. (1993). Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds. *In: Ratlidge, C. (ed.). Biochemistry of microbial degradation*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 513-553.
- Funatogawa, K.; Hayashi, S.; Shimomura, H.; Yoshida, T.; Hatano, T.; Ito, H. and Hirai, Y. (2004). Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol*, 48, 251-261.
- Fusetani, N. (2004). Biofouling and antifouling. *Nat. Prod. Res.*, 21, 94-104.
- Gaidis, J. (2004). Chemistry of corrosion inhibitors. *Cement & Concrete Composites*, 26, 181-189.

- Galliano, F. and Landolt, D. (2002). Evaluation of corrosion protection properties of additives for waterborne epoxy coatings on steel. *Progress in Organic Coatings*, 44, 217-225.
- Gallo-García, M.; García-Ulloa-Gómez, M. y Godínez-Siordia, D. (2004). Evaluación de dos tratamientos en la intensidad de gusanos poliquetos asociados a las valvas del ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873). *Ciencias Marinas*, 30 (3), 455-464.
- Gamble, G.; Akin, D.; Makkar, H. and Becker, K. (1996). Biological degradation of tannins in *Sericea lespedeza* by the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus* analyzed by solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3600-3604.
- García-Ulloa, M.; Gallo-García, M.; Ponce-Palafox, J. y Arredondo-Figueroa, J. (2008). Efecto de la cal en el control de gusanos barrenadores (Polychaeta: Spionidae) en un cultivo experimental de ostión, variando el tiempo de inmersión y la frecuencia de aplicación. [www.ujat.mx/publicaciones/uciencia](http://www.ujat.mx/publicaciones/uciencia), 24 (2), 125-134.
- Gerhart, D.; Rittschof, D. and Mayo, S. (1988). Chemical ecology and the search for marine antifoulants: studies of a predator-prey symbiosis. *J. Chem. Ecol.* 14, 1905-1917.
- Geierman, C. (2007). Barnacle feeding: comparing cirral anatomy, feeding, behavior, Reynolds numbers, and cirral fan leakiness across three size classes of three species of common acorn barnacles. M. Sc. Thesis.
- Genzer, J. and Efimenko, K. (2006). Recent developments in superhydrophobic surface their relevance to marine fouling: a review. *Biofouling*, 22, 339-360.
- Gerchakov, S. and Sallman, B. (1979). Sea water corrosion handbook (Schumacher, M., ed.) NDC, New Jersey, USA, 366-371.
- Giúdice, C.; Benítez, J. and Rascio, V. (1982). Influence of the use of chlorinated rubber on the anticorrosive properties of paints for ships' hulls. *J. Oil & Chemists' Assoc.*, 65(4), 148-165.
- Giúdice, C.; Benítez, J. y Rascio, V. (1984). Prevención del 'fouling' en carenas de embarcaciones con pinturas antiincrustantes a base de colofonia y caucho clorado. *Rev. Iberoam. de Corrosión y Protección*, 15 (1), 16-20.
- Giúdice, C.; del Amo, B. and Rascio, V. (1984). Influence of binder dissolution rate on the bioactivity of antifouling paints. *Journal of Coatings Technology*, 56 (719), 63-69.

- Gómez, N. and Licursi, M. (2003). Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina. *Nova Hedwigia*, 77, 389-398.
- Goto, R.; Kado, R.; Muramoto, K. and Kamiya, H. (1993). Furospongolide, an antifouling substance from the marine sponge *Phyllospongia papyracea* against the barnacle *Balanus amphitrite amphitrite*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 193-196.
- Goupil, D.; DePalma, V. and Baier, R. (1980). Physical/chemical characteristics of the macromolecular condition film in biological fouling. *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Biología Marina, Barcelona, España, 401-410.
- Grosberg, R. (1982). Intertidal zonation of barnacles: the influence of planktonic zonation of larvae on vertical distribution of adults. *Ecology*, 63, 849-899.
- Gross, G. (1999). Biosynthesis of hydrolyzable tannins. *In: Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 3, Pinto, B. (ed.). Elsevier: Amsterdam; 799-826.
- Guenther, J. and de Nys, R. (2006). Differential community development of fouling species on the pearl oysters *Pinctada fucata*, *Pteria penguin* and *Pteria chinensis* (Bivalvia, Pteriidae). *Biofouling*, 22 (3), 151-159.
- Hache, A.; Barriety, L. and Debyser, J. (1959). Effect of photosynthesis upon the corrosion of the steel in sea water. *Corr. et Anti Corr.*, 7, 56-61.
- Hagerman, A.; Riedl, K.; Jones, G.; Sovic, K.; Ritchard, N.; Hartzfeld, P. and Riechel T. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1887-1892.
- Hagerman, A. (2002) Tannin chemistry. <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>
- Hannerz, L. (1956). Larval development of the polychaete families Spionidae Sars, Disomidae Mesnil, and Poecilochaetidae n. family in the Gullmar Fjord (Sweden). *Zool. Bidrag. Upps.*, 31, 1-204.
- Harder, T. (2009). Marine epibiosis: concepts, ecological consequences and host defence. *En: Marine and industrial biofouling*. Springer series on biofilms, Vol. 4, II, 219-231.
- Hare, C. (1990 a). Aesthetics: opacity and gloss. *J. Paint Coat. and Lining*, 7 (5), 75.
- Hare, C. (1990 b). Anatomy of paints: Extender pigments. *J. Paint Coat. and Lining*, 7 (6), 43.

- Hare, C. (1991a). Introduction to viscosity and the evaporation of solvent systems. *J. Paint Coat. and Lining*, 8 (2), 117.
- Hare, C. (1991b). Solvent family I: hydrocarbons. *J. Paint Coat. and Lining*, 8 (4), 45.
- Hare, C. (1991c). Solvent family II: oxygenated solvents. *J. Paint Coat. and Lining*, 8 (5), 47.
- Hare, C. (1991d). Water as solvent. *J. Paint Coat. and Lining*, 8 (7), 65.
- Harris, J. (1946). Report on antifouling research, 1942-1944. *J. Iron Steel Inst.*, 154, 297-333.
- Harris, D. (1992). Análisis químico cuantitativo. Grupo Editorial Iberoamérica, México, 740.
- Harwood, C. and Gibson, J. (1997). Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes?. *Journal of Bacteriology*, 179, 301-309.
- Hellio, C.; De La Broise, D. Dufossé., L.; Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Mar. Env. Res.*, 52, 231-247.
- Hellio, C.; Berge, J.; Beaupoil, C.; Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. (2002). Screening of marine algal extracts for anti-settlement activities against microalgae and macroalgae. *Biofouling*, 18, 205-215.
- Hellio, C.; Marechal, J.; Veron, B.; Bremer, G.; Clare, A. and Le Gal, Y. (2004). Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany Coast (France). *Mar. Biotechnol.*, 6, 67-82.
- Hellio, C.; Tsoukatou, M.; Maréchal, J.; Aldred, N.; Beaupoil, C.; Clare, A.; Vagias, C. and Roussis, V. (2005). Inhibitory effects of Mediterranean sponge extracts and metabolites on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar. Biotechnol.*, 7, 297-305.
- Henrikson, A. and Pawlik, J. (1995). A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 194, 157-165.
- Hills, J. and Thomason, J. (1998). The effect of scales of surface roughness on the settlement of barnacle (*Semibalanus balanoides*) cyprids. *Biofouling*, 12, 57-69.
- Hills, J.; Thomason, J. and Muhl, J. (1999). Settlement of barnacle larvae is governed by euclidean and not fractal surface characteristics. *Funct. Ecol.*, 13, 868-875.

- Hirano, R. (1962). Mass rearing of barnacle larvae. *Bull. Mar. Biol. St. Asamushi Tohoku Univ.*, 11 (2), 77-80.
- Hirano, R. (1963). Mass rearing of barnacle larvae. *Bull. Mar. Biol. St. Asamushi, Tohoku Univ.*, 11(3), 77-807.
- Hirose, E.; Yamashiro, H. and Mori, Y. (2001). Properties of tunic acid in the ascidian *Phallusia nigra* (Ascidacea, Phlebobranchia). *Zool. Sci.*, 18, 309-314.
- Ho, Ch. (1992). Phenolic compounds in food: an overview. *In: Huang, M; Ho, Ch. and Lee, C. (eds.). Phenolic compounds in food and their effects on health. II. ACS Symposium. Washington: American Chemical Society. pp. 2-7.*
- Hodges, S.; Uphues, W. and Tran, M. (1997). Non-toxic corrosion inhibitive synergistic system. *Surf. Coat. Intern.*, 4, 178.
- Hofrichter, M. and Fritsche, W. (1996). Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe durch den Schimmelpilz *Penicillium frequentans* Bi 7/2. *Gas-und Wasserfach; Wasser-Abwasser*, 137, 199-204.
- Holmstrom, C. and Kjelleberg, S. (1994). The effect of external biological factors on settlement of marine invertebrates and new antifouling technologies. *Biofouling*, 8, 147-160.
- Holmström, C.; Steinberg, P.; Chrisov, V.; Christie, G. and Kjelleberg, S. (2000). Bacteria immobilised in gels: improved methodologies for antifouling and biocontrol applications. *Biofouling*, 15, 109-117.
- Howell, D. and Behrends B. (2006). A methodology for evaluating biocide release rate, surface roughness and leach layer formation in a TBT-free, self-polishing antifouling coating. *Biofouling*, 22 (5), 303-315.
- Houghton, D.; Pearman, I. and Tierney, D. (1972). The effect of water velocity on the settlement of swimmers of *Enteromorpha* spp. *Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, National Bureau of Standards, Gaithersburg, Maryland, USA, 682-690.
- Hunter, K. (1980). Microelectrophoretic properties of natural surface-active organic matter in coastal seawater. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 807-822.
- Huxley, R.; Holland, D.; Crisp, D. and Smith, R. (1984). Influence of soil shale on intertidal organisms: effect of oil shale surface roughness on settlement of the barnacle *Balanus balanoides*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 82 (2-3), 231-237.

- Iqbal, Z.; Mufti K. and Khan, M. (2002). Antihelmintic effects of condensed tannins. *Int. J. Agric. Biol.*, 4 (3), 438-440.
- Iverson, W. (1968). Biodeterioration of materials. Microbial and allied aspects. (Walters, A. and Elphick, J., eds.), Elsevier Publishing Co. Ltd., 28-43.
- Iverson, W. (1972). Advances in corrosion science and technology. (Fontana, M. and Staehle, R., eds.), 2, New York, Plenum Press, 1-42.
- Iverson, W. and Brickman, F. (1978). Water pollution microbiology, (Mitchell, R., ed.), John Wiley & Sons, 2, 201-232.
- Iverson, W. (1985). Reunión de Trabajo Argentino-Estadounidense sobre Biodeterioro de Materiales (CONICET-NSF), (Aquatec, Química, S.A., ed. San Pablo, Brasil), INIFTA, Argentina, 33-42.
- International Programme on Chemical Safety, IPCS, 2000.
- Jackson, M. (1990). Guidelines to formulation of water-borne epoxy primers: An evaluation of anticorrosive pigment. *Journal of Protective Coating and Linings*, 54-64.
- Jenings, J. and Steinberg, P. (1977). Phlorotannins vs. other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia*, 109, 461-473.
- Jones, G. (2009). The battle against marine biofouling: a historical review. *In: Advances in marine antifouling coatings and technologies* (C. Hellio and D. Yebra, eds.), Woodhead publishing Limited, Cambridge, England.
- Kahraman, R. (2002). Inhibition of atmospheric corrosion of mild steel by sodium benzoate treatment. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 11, 46.
- Kahraman R.; Al-Mathami A.; Saricimen H.; Abbas N. and Arman S. (2002). A study of corrosion control of carbon steel using inhibitors in a simulated environment, *Anticorrosion Methods and Materials*, 49, 346.
- Kahraman R.; Saricimen H.; Al-Zahrani, M. and Al-Dulaijan S. (2003). Effect of inhibitor treatment on corrosion of steel in a salt solution, *Journal of Materials Engineering and Performance*, 12, 524-528.
- Kalendová, A. (2002) Methods for testing and evaluating the flash corrosion, *Progress in Organic Coatings*, 44, 201-209.
- Kamino, K. (2006). Barnacle underwater attachment. *In: Smith, A. and Callow, J. (eds.). Biological adhesives.* Springer-Verlag, Berlin: 145-166.

- Kamino, K. (2008). Underwater adhesive of marine organisms as the vital link between biological science and material science. *Mar. Biotechnol.*, 10, 111-121.
- Kanitsugu, A. (2001). Effects of organic inhibitors on corrosion of zinc in aerated 0.5 M NaCl solution, *Corrosion Science*, 43, 1985-2000.
- Karabay, O.; Kocoglu, E.; Ince, N.; Sahan, T. and Ozdemir, D. (2006). In vitro activity of sodium benzoate against clinically relevant *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolates. *J. Microbiol.*, 44, 129-131.
- Karande, A. (1974). *Balanus variegatus* Darwin: the laboratory reared barnacle compared with *Balanus amphitrite amphitrite* Darwin (Cirripedia). *Crustaceana*, 26 (3), 229-232.
- Kawamata, M.; Kon-ya, K. and Miki, W. (2006). 5,6-Dichloro-1-methylgramine, a non-toxic antifoulant derived from a marine natural product. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 42, 125-139.
- Keifer, P.; Reinhart, K. and Hooper, I. (1986). Renilla-foulings, antifouling diterpenes from the sea pansy *Renilla reniformis* (Octocorallia). *J. Org. Chem.*, 51, 4450-4454.
- Kern, P. and Landolt, D. (2001). Adsorption of organic corrosion inhibitors on iron in the active and passive state. A replacement reaction between inhibitor and water studied with the rotating quartz crystal microbalance. *Electrochimica Acta*, 47, 589-598.
- Kesel, A. (2007). Learning from nature: Non-toxic biofouling control by shark skin effect. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146 (4), S130.
- King, E. and Painter, H. (1983). Ring-test programme 1981-82. Assessment of biodegradability of chemical in water by manometric respirometry. Luxemburg, Commission of the European Communities (EUR 8631) EN 31 S).
- Kinne, O. (ed.) (1978). Marine ecology. A comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters. Vol I. Environmental factors. Part 1, John Wiley & Sons, 681 pp.
- Knight-Jones, E. (1953). Gregariousness in barnacles in relation to the fouling of ships and anti-fouling research. *Nature*, 171, 1109-1110.

- Knowles, E. and White, T. (1958). The protection of metals with tannins. *J. Oil & Chemists' Assoc.*, 41, 10-23.
- Kirchman, D.; Graham, S.; Reish, D. and Mitchell, R. (1982). Bacteria induce settlement and metamorphosis of *Janua (Dexospira) brasiliensis* Grube (Polychaeta: Spirorbidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 56, 153-163.
- Kocwa-Haluch, R. and Lemek, M. (1995). Easy and inexpensive diffusion tests for detecting the assimilation of aromatic compounds by yeast-like fungi. Part II. Assimilation of aromatic acids. *Chemosphere*, 31 (11/12), 4333-4339.
- Koehl, M. (2007). Mini review: Hydrodynamics of larval settlement into fouling community. *Biofouling*, 5/6, 357-368.
- Köhler, J.; Hansen, P. and Wahl, M. (1999) Colonization patterns at the substratum-water interface: how does surface microtopography influence recruitment patterns of sessile organisms. *Biofouling*, 14 (3), 237-248.
- Koivikko, R. (2008). Brown algal phlorotannins improving and applying chemical methods. PhD Thesis, Annales Universitatis Turkuensis AI 381, 61 pp.
- Koivikko, R.; Loponen, J. and Honkanen, T. (2005). Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*, 31 (1), 195-212.
- Koleske, J. (1995). Paint and coating testing manual: fourteenth edition of the Gardner-Sward handbook. ASTM International, 925 pp.
- Konishi, K.; Adachi, H.; Ishigaki, N.; Kanamura, Y.; Adachi, I.; Tanaka, T.; Nishioka, I.; Nonaka, G. and Horikoshi, I. (1993). Inhibitory effects of tannins on NADH dehydrogenases of various organisms. *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 716-718.
- Konstantinou, I. and Albanis, T. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment. *Environment International*, 30, 235-248.
- Krug, P. (2006). Defense of benthic invertebrates against surface colonization by larvae: a chemical arms race. *In: Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Fusetani, N. and Clare, A. (eds.) (Berlin: Springer).
- Lacombe, D. (1973). Criação de balanídeos em laboratório. *Trab. V Congr. Latinoam. Zool.*, 1, 168-174.



- Lahodny-Šarc, O. and Kapor, F. (1998). Corrosion inhibition of carbon steel by blends of gluconate/benzoate at temperatures up to 60°C, *Materials Science Forum*, 289-292.
- Lahodny-Šarc, O. and Kapor, F. (2005). Influence of flowing on the inhibition of carbon steel by a multicomponent non-toxic inhibitor. EUROCORR 2005, European Corrosion Congress, Lisbon, Portugal.
- Laks, P.; McKaig, P. and Hemingway, R. (1988). Flavonoid biocides: Wood preservatives based on condensed tannins. *Holzforschung*, 42 (5), 299-306.
- Lapointe, L. and Bourget, E. (1999). Influence of substratum heterogeneity scales and complexity on a temperate epibenthic marine community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 189, 159-170.
- LaQue, F. and Clapp, W. (1945). *Sea water Trans. Electrochemical Soc.*, 87, 165-184.
- LaQue, F. (1972). *Proc. 3rd Intern. Congr. Marine Corrosion and Fouling*, National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD, 2-13.
- LaQue, F. (1975). Marine corrosion. Causes and prevention. (Foley, R.; Hackerman, N.; King, C.; LaQue, F. and Foroulis, Z., eds.), John Wiley & Sons, New York, 22-44.
- Lau, S. and Qian, P. (1997). Phlorotannins and related compounds as larval settlement inhibitors of the tube-building polychaete *Hydroides elegans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 159, 219-227.
- Lau, S. and Qian, P. (2000). Inhibitory effect of phenolic compounds and marine bacteria on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite amphitrite* Darwin. *Biofouling*, 16 (1), 47-58.
- Lemire, M and Bourget, E. (1996). Substratum heterogeneity and complexity influence micro-habitat selection of *Balanus* sp. and *Tubularia crocea* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 135, 77-87.
- Le Tourneux, F. and Bourget, E. (1988). Importance of physical and biological settlement cues used at different spatial scales by the larvae of *Semibalanus balanoides*. *Mar. Biol.*, 97, 57-66.
- Lee, H.; Scherer, N. and Meersersmith, P. (2006). Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *PNAS*, 103, 12999-13003.

- Lewis, J. (1992). Recruitment, growth and mortality of a coral-inhabiting barnacle *Megabalanus stultus* (Darwin) upon the hydrocoral *Millepora complanata* Lamarck. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 162 (1), 51-64.
- Li, Y.; Qian, Z.; Ryu, B.; Lee, S.; Kim, M. and Kim, S. (2009). Chemical components and its antioxidant properties in vitro: an edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 17 (5), 1963-1973.
- Lim, C.; Yoo, Y.; Sidhartan, M.; Ma, C.; Bang, J.; Kim, J.; Lee, K.; Park, N. and Shin, H. (2006). Effect of copper (I) oxide growth and biochemical compositions of two marine microalgae. *Journal of Environmental Biology*, 27, 461-466.
- Lin, N.; Preston, T.; Binh, D. and Ly, N. (2003). Effects of tree foliages compared with grasses on growth and intestinal nematode infestation in confined goats. *Livestock Research for Rural Development*, 15 (6).
- Lindner, E. (1980). Experiments in synthesis of barnacle adhesive. *Proc. 5th Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Biología Marina, Barcelona, España, 189-212.
- Lindner, E.; Dooley, C. and Doeff, M. (1988). Adhesion of barnacles and development of non-toxic antifoulants. Preprint 7<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul., Biología Marina, Valencia, España, 1-16.
- Loeb, G. (1977). The settlement of fouling organisms on hydrophobic surfaces. U.S. Naval Res. Lab. Mem. Rep. 3665, 1-9.
- Loeb, G. and Neihof, R. (1975). Applied Chemistry at Protein Interfaces. (Baier, R., ed.). *Adv.in Chem. Series*, 145, Amer Chem. Soc., Washington, 1-25.
- Lucas, M.; Walker, G.; Holland, D. and Crisp, D. (1979). An energy budget for the free-swimming and metamorphosing larvae of *Balanus balanoides* (Crustacea: Cirripedia). *Mar. Biol.*, 55, 221-229.
- Lueck, E. (1980). Benzoic acid. *In: Antimicrobial food additives. Characteristics. Uses. Effects.* Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, New York, 210-217.
- Mance, G. (1987). Pollution threat of heavy metals in aquatic environment. Elsevier Applied Science, New York, 372.
- Martín, J. and Cuevas, J. (2006). First Record of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Southern Patagonia, Argentina. *Biological invasions*, 8(6), 1399-1402.

- Martín, J. y Bastida, R. (2008). El alga invasora *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar en la Ría Deseado (Patagonia austral, Argentina): ciclo del esporofito y factores ambientales determinantes de su distribución. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(2), 335-344.
- Martínez, I.; Ferrer, M.; Hernando, A.; Fernández-Alba, R.; Marce, F. and Barceló, D. (2001). Occurrence of antifouling biocides in the Spanish Mediterranean marine environment. *Environ. Technol.*, 2, 543-553.
- Martínez, S. and Stern, I. (2001). Inhibitory mechanism of low-carbon steel corrosion by mimosa tannin in sulphuric acid solutions. *Journal of Applied Electrochemistry*, 31 (9), 973-978.
- Matamala, G.; Smeltzer, W. and Droguett, G. (2000). Comparison of steel anticorrosive protection formulated with natural tannins extracted from acacia and from pine bark. *Corros. Sci.*, 48 (2), 1351-1362.
- Maki, J.; Rittschof, D.; Costlow, J. and Mitchell, R. (1988). Inhibition of attachment of larval barnacles, *Balanus amphitrite*, by bacterial surface films. *Mar. Biol.*, 97, 199-206.
- Margalef, R. (1974). Ecología. *Omega*. Barcelona.
- Marks, R. (1994). Tres hombres a bordo del Beagle. J. Vergara (ed.), Buenos Aires, 217 pp.
- Marmur, A. (2006). Super-hydrophobicity fundamentals: implications to biofouling prevention. *Biofouling*, 22 (2), 107-115.
- Marshall, K.; Stout, R. and Mitchell, R. (1971). Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.*, 68, 337-348.
- Marshall, K. (1978). Water Pollution Microbiology. (Mitchell, R., ed.), John Wiley & Sons, 2, 51-70.
- Martenson, L. (2005). Marine biofouling, a sticky problem or gluing in seawater. *Bioscience explained*, 2 (2), 9 pp.
- Matthiessen, P.; Reed, J. and Johnson, M. (1999). Sources and potential effects of copper and zinc concentrations in the estuarine waters of Essex and Suffolk. United Kingdom. *Mar. Pollut. Bull.*, 38, 908-920.
- Mendola, D. (2003). Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics. *Biomolec. Eng.*, 20, 441-458.

- Meyer, A. and Seegers, U. (2004). A preliminary approach to epidermal antimicrobial defense in the Delphinidae. *Mar. Biol.*, 144, 841-844.
- McLachlan, J. and Craigie, J. (1964). Algal inhibition by yellow ultra-violet-absorbing substances from *Fucus vesiculosus*. *Can. J. Bot.*, 42, 287-292.
- Míguez, C.; Greer, C.; Ingram, J. and McLeod, R. (1995). Uptake of benzoic acid and chloro-substituted benzoic acids by *Alcaligenes denitrificans* BRI 3010 and BRI 6011. *Applied and environmental microbiology*, 61, 4152-4159.
- Mihm, J.; Banta, W. and Loeb, G. (1981). Effects of adsorbed organic and primary fouling films on bryozoan settlement. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 54, 167-179.
- Millar, R. (1969). Ascidians of European waters. Catalogue of main marine fouling organisms, Vol. IV, OECD, 34 pp.
- Miller, B. (1998). An assessment of sediment copper and zinc concentrations in marine caged fish farms in SEPA West region. *Report from Scottish Environmental Protection Authority*, 77.
- Min, B.; Pinchak, W.; Merkel, R.; Walker, S.; Tomita, G. and Anderson, R.C. (2008). Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. *Scientific Research and Essays*, 3 (2), 66-73.
- Minchin, D. and Gollasch, S. (2003). Fouling and ships' hulls: how changing circumstances and spawning events may result in the spread of toxic species. *Biofouling*, 19, 111-122.
- Mitchell, R.; Chet, I. and Asketh, P. (1975). Negative chemotaxis: a new approach to marine fouling control. *NTIS, Technical Report*, 1, 1-27.
- Miron, G.; Bourget, E.; Archambault, P. (1996). Scale of observation and distribution of adult conspecifics: their influence in assessing passive and active settlement mechanisms in the barnacle *Balanus crenatus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 201, 137-158.
- Mochida, K.; Ito, K., Harino, H.; Kakuno, A. and Fuji, A. (2006). Acute toxicity of pyrethrin antifouling biocides and joint toxicity with copper to red sea bream (*Pagrus major*) and toy shrimp (*Heptacarpus futilirostris*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 3058-3064.

- Mohamed, A.; Abd El-Maksoud, S. and Fonda, A. (1997). p-Substituted benzoic acid derivatives as corrosion inhibitors for aluminum in  $H_3PO_4$ , *Portugaliae Electrochimica Acta*, 15, 27.
- Mole, S.; Roglers, J. and Butler, L. (1993). Growth reduction by dietary tannins: different effects due to different tannins. *Biochem. Syst. Ecol.*, 21, 667-677.
- Molino, P. and Wetherbee, R. (2008). The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling*, 24, 365-379.
- Monticelli, C.; Frignani, A. and Trabanelli, G. (2000). A study on corrosion inhibitors for concrete application, *Cement and Concrete Researcher*, 30, 635-642.
- Mostafa, S.; Mourand, M. and Seliman, S. (1981). Electrochemical studies on the corrosion of cooper in organic electrolyte solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 130, 221-228.
- Müller, W. (1997). Sponges (Porifera). Progress in Molecular Subcellular Biology.
- Mullineaux, L. and Butman, C. (1991). Initial contact, exploration and attachment of barnacle (*Balanus amphitrite*) cyprids settling in flow. *Mar. Biol.*, 110, 93-104.
- Munari, C. and Mistri, M. (2007). Effect of copper on the scope for growth of clams (*Tapes philippinarum*) from a farming area in the Northern Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.*, 64, 347-357.
- Muraoka, J. (1968). Effects of marine organisms. *Machine Design*, 184-187.
- Muralidharan, V.; Sethuraman, R. and Krishnamoorthy, S. (1988). Benzoic acid as corrosion inhibitors for pure iron in sulphuric acid. *Bull. Electrochem.*, 4, 705-710.
- Murpphy, P.; Michel, P.; Guelorget, O. and Latour, M. (1980). Piezoelectric polymer hull vibrators for fouling prevention. *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Biología Marina, Barcelona, España, 293- 298.
- Naldrett, M. (1993). The importance of sulphur cross-links and hydrophobic interactions in the polymerization of barnacle cement. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 73, 689-702.
- Nanishi, K.; Murase, M.; Yonehara, Y.; Kishihara, M. and Hiramata, T. (1988). Surface properties of non-toxic antifouling paint film. Preprint 7<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul., Valencia, España, sección II, 10 pp.
- Neinhuis, C and Barthlott, W. (1997). Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Annals of Botany*, 79, 667-677.

- Nogata Y. and Kitano Y. (2006). Isocyanate compounds as non-toxic antifoulants. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 42, 87-104.
- Obuekwe, C.; Westlake, D.; Plambeck, J. and Cook, F. (1981). *Corrosion*, 37, 461-467.
- O'Connor, N. and Richardson, D. (1994). Comparative attachment of barnacle cyprids (*Balanus amphitrite* Darwin, 1854; *B. improvisus* Darwin, 1854; and *B. eburneus* Gould, 1841) to polystyrene and glass substrata. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 183, 213-225.
- ODEMA (1974). Catalogue of main marine fouling organisms. 5, pp.
- Ödling, K.; Albertsson, C.; Russell J. and Mårtensson, L. (2006). An *in vivo* study of exocytosis of cement proteins from barnacle *Balanus improvisus* (D.) cyprid larva. *Journal of Experimental Biology*, 209, 956-964.
- Olsen, S.; Pedersen, L.; Laursen, M.; Kiil, S. and Dam-Johansen, K. (2007). Enzyme-based antifouling coatings: a review. *Biofouling*, 23, 369-383.
- Olson, R. (1985). The consequences of short-distance larval dispersal in a sessile. *Marine Invertebrate Ecology*, 66, 30-39.
- Olson, R. and Olson, M. (1989). Food limitation of planktotrophic marine invertebrate larvae: does it control recruitment success?. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 20, 225-247.
- Omae, I. (2003). General aspects of tin-free antifouling paints. *Chem. Rev.*, 103, 3431-3448.
- Orth, R. (1971). Observations on the planktonic larvae of *Polydora ligni* Webster (Polychaeta: Spionidae) in the York River, Virginia. *Chesapeake Science*, 3, 121-124.
- Oszmianski, J.; Wojdylo, A.; Lamer-Zarawska, E. and Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chem.* 100, 579- 583.
- Otieno-Alego, V.; Hope, G.; Flitt, H.; Cash, G. and Schweinsberg, D. (1992). The effect of potential scan on the parameters used to synthesize anodic polarization curves. *Corrosion Science*, 33, 1719-1734.
- Pankhania, I. (1988). Hydrogen metabolism in sulphate-reducing bacteria and role in anaerobic corrosion. *Biofouling*, 1 (1), 27-47.
- Partington, A. and Dunn, P. (1962). The use of pigment-extenders in antifouling compositions. *Paint Technology*, 26 (6), 39-45.

- Partington, A. (1964). Antifouling compositions. The mechanisms of their action, and release of poisons in relation to paint formulation. *Paint Technology*, 28 (3).
- Pastene, E.; Speisky, H.; García, A.; Moreno, J.; Troncoso, M. and Figueroa, G. (2010). In vitro and in vivo effects of apple peel polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7172-7179.
- Pawlik, J. (1992). Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 30, 548-551.
- Pereira, W.; Wade, T.; Hostettler, F. and Parchaso, F. (1999). Accumulation of butyltins in sediments and lipid tissues of the Asian clam, *Potamocorbula amurensis*, near mare island naval shipyard, San Francisco bay. *Mar. Pollut. Bull.*, 38, 1005-1010.
- Pérez, M. y Stupak, M. (1992). Pinturas antiincrustantes tipo matriz soluble; influencia de la relación tóxico principal/tóxico de refuerzo sobre larvas de *Balanus amphitrite* y *Polydora ligni*. *CIDEPINT-Anales*, 195-211.
- Peterson, L.; D'Auria, J.; McKeown, B.; Moore, K. and Shum, M. (1991). Copper levels in the muscle and liver tissue of farmed Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture*, 99, 105-115.
- Petronis, S.; Berntsson, K.; Gold, J. and Gatenholm, P. (2000). Design and microstructuring of PDMS surfaces for improved marine biofouling resistance. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 11, 1051-1072.
- Pezzani, S.; Pérez, M. and Stupak, M. (1996). Macrofouling community at Mar del Plata harbor during a one-year period (1991-1992). *Corrosion Reviews*, Special Issue on Industrial Paints for Corrosion Control, 14 (1-2), 73-86.
- Phillipi, A.; O'Connor, N.; Lewis, A. and Kim, Y. (2001). Surface flocking as a possible anti-biofoulant. *Aquaculture*, 195, 225-238.
- Phillips, D. and Towers, G. (1982). Chemical ecology of red bromophenols. I. Temporal, interpopulational and within-thallus measurements of lanosol levels in *Rhodomela larix* (Turner) C. Agardh. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 58, 285-293.
- Pipe, A. (1979). The fouling of fixed structures. Marine fouling, OYEZ International Business Communications, London, 7 pp.
- Pischky, H. (1971). To the history of antifouling protection and the development of antifouling paint until now. Antifouling-Symposium, CIBA-GEIGY Marienberg GMBH, 1-7.

- Pollano, G. and Lurier, A. (1987). Factors affecting salt spray resistance of an aqueous coating on metal. *Paint & Coatings Industry*, 15.
- Possingham, H. and Roughgarden, J. (1990). Spatial population dynamics of a marine organism with a complex life cycle. *Ecology*, 71, 973-985.
- Pyefinch, K. (1948). Notes on the biology of cirripedes. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 27, 464-503.
- Pilsbry, H. (1916). The sessile barnacles (Cirripedia) contained in the collections of the U. S. National Museum; including a monograph of the American species. Bull. 93, United States National Museum, 442 pp.
- Qian, P.; Xu, Y. and Fusetani, N. (2009). Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling*, 26, 2, 223- 234.
- Qiu, J.; Thiagarajan, V.; Cheung, S. and Qian, P. (2005). Toxic effects of larval development of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar. Pollut. Bull.*, 51 (8-12), 688-693.
- Radashevsky, V. and Cárdenas, C. (2004). Morphology and biology of *Polydora rickettsi* (Polychaeta, Spionidae) from Chile. *New Zealand J. Mar. Freshwt. Res.*, 38, 243-254.
- Radenac, G.; Fichet, D. and Miramand, D. (2001). Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. *Marine Environmental Research*, 51, 151-166.
- Rae Flores, A. and Faulkes, Z. (2008). Texture preferences of ascidian tadpole larvae during settlement. *Marine and freshwater behavior and physiology*, 41 (3), 155-159.
- Ragan, M. and Glombitza, K. (1986), Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.*, 4, 129-241.
- Raimondi, P. (1988a). Settlement cues and determination of the vertical limit of an intertidal barnacle. *Ecology*, 6, 400-407.
- Raimondi, P. (1988b). Rock type affects settlement, recruitment, and zonation of the barnacle *Chthamalus anisopoma* Plisbry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 123, 253-268.
- Raimondi, P. (1990). Patterns, mechanisms, consequences of variability in settlement and recruitment of an intertidal barnacle. *Ecol. Monogr.*, 60, 283-310.
- Rajakumar, G. and Nandy, S. (1983). Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 525 - 527.



- Ralston, E. and Swain, G. (2009). Bioinspiration-the solution for biofouling control?. *Bioinsp. Biomim.*, 4,1-9.
- Rao, D.; Webb, J.; Holstrom, C.; Case, R.; Low, A.; Steinberg, P. and Kjelleberg, S. (2007). Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 7844-7852.
- Rascio, V. (1981). Pinturas antiincrustantes. Manual ECOMAR de corrosión y protección, SENID, 93-101.
- Rascio, V. (1985). Antifouling protection by paints. Proc. Argentine-USA Workshop on Biodeterioration (CONICET-NSF). Published by AQUATEC Química S.A., Sao Paulo, Brasil, 259-278.
- Rascio, V.; Bruzzoni, W.; Bastida, R. y Rozados, E. (1977). Protección de superficies metálicas. Serie III - Manuales Científicos, N° 1, LEMIT, 454 pp.
- Rascio, V.; Giúdice, C.; Benítez, J. y Presta, M. (1980). Comportamiento de pinturas antiincrustantes en servicio y balsa experimental. *Rev. Iberoam. de Corrosión y Protección*, 11 (2), 23-52.
- Rascio, V.; Giúdice, C. and del Amo, B. (1988a). Research and development on soluble matrix antifouling paints to be use on ships, offshore platforms and power stations. A review. *Corros. Rev.*, VIII (1-2), 89-153.
- Rascio, V.; Giúdice, C. and del Amo, B. (1988b). Research and development of soluble matrix antifouling paints for ships, offshore platforms, and power stations. A review. *Corros. Rev.*, 8 (1-2), 87-153.
- Rascio, V.; Giúdice, C. and del Amo, B. (1990). High build soluble matrix antifouling paints tested on raft and on ship bottom. *Progress in Organic Coatings*, 18 (4), 389-398.
- Raspini, I. (1993). Influence of sodium salts of organic acid as additives on localized corrosion of aluminum and its alloys. *Corrosion (NACE)*, 49, 821-829.
- Raveendran, T.; Limna Mol, V. and Parameswara, P. (2011). Natural product antifoulants from the octocorals of Indian waters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 265- 268.
- Read, G. (1975). Systematics and biology of polydorid species (Polychaeta: Spionidae) from Wellington harbor. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 5, 395-419.

- Reed, R. and Moffat, L. (1983). Copper toxicity and copper tolerance in *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 69, 85-103.
- Reinhardt, R.; Heilen, W.; Walhon, E.; Silber, S. and Adams, J. (1998). Defoamer selection in water-borne coatings. *J. Coat. Technol.*, 70 (885), 157.
- Reichelt-Brushett, A. and Harrison, P. (2000). The effect of copper on the settlement success of larvae from the scleractinian coral *Acropora tenuis*. *Mar. Poll. Bull.*, 41, 385-391.
- Reitsema, T. (2008). Antifouling Biocides in Perth Coastal Waters: A Snapshot at selected areas of vessel activity. Water science technical series. Report n° WST 1, 48 pp.
- Reise, K.; Gollasch, S. and Wolff, W. (1999). *Helgoländer Meeresunters*, 5, 219-234.
- Richterich, K. and Steber, J. (1989). Prevention of nitrification-caused erroneous biodegradability data in the closed bottle test. *Chemosphere*, 19 (10-11), 1643-1654.
- Rijstenbil, J.; Derksen, J.; Gerringa, L.; Poortvliet, T.; Sandee, A.; Berg, M.; Drie, J. and Wijnholds, J. (1994). Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Mar. Biol.*, 119, 583-590.
- Rittschof, D. (2000). Natural products antifoulants: one perspective on the challenges related to coating development. *Biofouling*, 15, 119-127.
- Rittschof, D. (2009). Trends in marine biofouling research. *In: Advances in marine antifouling coatings and technologies* (C. Hellio and D. Yebra, eds.), Woodhead publishing Limited, Cambridge, England.
- Rittschof, D.; Branscomb, E. and Costlow, D. (1984). Settlement and behavior in relation to flow and surface in larval barnacles, *Balanus amphitrite* Darwin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 82 (2-3), 131-146.
- Rittschof, D. and Costlow, J. (1987). Macrofouling and its management by nontoxic means. *Adv. Aquat. Biol. Fish.*, 1-11.
- Rittschof, D. and Costlow, J. (1988). Bryozoan and barnacle settlement in relation to initial surface wettability: a comparison of laboratory and field studies. *Proc. 22<sup>nd</sup> European Mar. Biol. Symp.*
- Rittschof, D. and Costlow, J. (1989). Bryozoan and barnacle settlement in relation to initial surface wettability: a comparison of laboratory and field studies. *Sci. Mar.*, 53, 411-416.

- Rivera-Duarte, I.; Rosen, G.; Lapota, D.; Chadwick, D.; Kear-Padilla, L. and Zirino, A. (2005). Copper toxicity to larval stages of three marine invertebrates and copper complexation capacity in San Diego Bay, California. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 1542-1546.
- Roberts, D.; Rittschof, D.; Holm, E. and Schmidt, A. (1991). Factors influencing initial larval settlement: temporal, spatial and surface molecular components. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 150, 203-222.
- Robinson, M. and Hall, B. (1990). Reversal of copper toxicity in *Amphora coffeaeformis*: role of externally bound copper. *Biofouling*, 2, 179-189.
- Rogers, T. (1968). Marine Corrosion (Schreir, L., ed.), London, 206-230.
- Romagnoli, R. (1987). Estudio electroanalítico del sistema cobre-perclorato cúprico-cloruro de sodio-agua. Determinación de las constantes estequiométricas de equilibrio de los clorocomplejos de cobre. Tesis, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Rudd, W. and Scully, J. (1980). The function of the repassivation process in the inhibition of pitting corrosion on aluminum. *Corrosion Science*, 20, 611-612.
- Ruimu, L.; Dekai, L.; Xuebao, H. and Jiancheng, Z. (1984). *Proc. 6th Intern. Congr. Marine Corrosion and Fouling*, Athens, Greece, 443-451.
- Ruiz, G.; Fofonoff, P.; Carlyon, J.; Wonham, M. and Hines, A. (2000). Invasion of coastal marine communities in North America: apparent patterns, processes, and biases. *Annu. Rev. Ecol. Sist.*, 31, 12-19.
- Ryland, J. (1965). Catalogue of main marine fouling organisms, 2, Polyzoa. Organization for Economic Co-operation and Development, París, 82 pp.
- Safriel, U. and Erez, N. (1991). Effect of limpets on the fouling of ships in the Mediterranean. *Mar. Biol.*, 95, 531-537.
- Safriel, U.; Erez, N. and Keasar, T. (1994). How do limpets maintain barnacle-free submerged artificial surfaces?. *Bull. Mar. Sci.*, 54 (1), 17-23.
- Salanitro, J.; Langston, G.; Dorn, P. and Kravetz, L. (1988). Activated sludge treatment of ethoxylate surfactants at high industrial use concentrations. *Water science and technology*, 20 (11-12), 125-130.
- Sanford, E. and Menge, B. (2001). Spatial and temporal variation in barnacle growth in a coastal upwelling system. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 209, 143-157.

- Santhakumaran, L. (1990). The problems of marine fouling. A partial overview. Proc. of the Specialists' Meetings on Marine Biodeterioration with reference to Power Plant Cooling Systems, IGCAR, Kalpakkam, (Nair, K. and Venugopalan, V., eds.), 19-34.
- Santos-Buelga, C. and Scalbert, A. (2000). Review: Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake, and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1094-1117.
- Santos-Buelga, C. and Williamson, G. (2003). Methods in polyphenol analysis. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK.
- Sarà, M. (1974). Marine sponges. Catalogue of main marine fouling organisms, Vol. V, CREO, 42 pp.
- Sardiña, P.; Cataldo, D. and Boltovskoy, D. (2008). The effects of the invasive mussel, *Limnoperna fortunei*, on associated fauna in South American freshwaters: importance of physical structure and food supply. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie*, 173 (2), 135-144.
- Sarma, N.; Rao, K. and Viswanadham, B. (1991). Settling responses and progression in community development of selected macrofouling organisms to a recently isolated sponge metabolite, herbacin, at Visakhapatnam Harbor, Bay of Bengal. In: Thompson, M.; Sarojini R. and Nagabhushanam R. (eds.). Bioactive compounds from marine organisms with emphasis on the Indian Ocean. Rotterdam: AA Balkema. pp 341-350.
- Saroyan, J. (1968). Countdown for antifouling paints. *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Athens, Greece, 469-494.
- Saroyan, J. (1969). Coatings and encapsulants-preserves in the sea. *Ocean Engineering*, 1, 435-446.
- Saroyan, J.; Lindner, E. and Dooley, C. (1968). Attachment mechanism of barnacles. *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Athens, Greece, 495-512.
- Saxena, R.; Sharmila, P. and Singh, V. (1995). Microbial degradation of tannins. In: Singh VP, editor. Biotransformation: microbial degradation of health-risk compounds. *Prog. Indust. Microbiol.* 32. Amsterdam: Elsevier Science Publisher BV. pp 259 - 270.
- Scheer, B. (1945). The development of marine fouling communities. *Biol. Bull.*, 89, 103-112.

- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 12, 3875-3883.
- Scalbert, A.; Mila, I.; Expert, D.; Marmolle, F.; Albrecht, A.; Hurrell, R.; Huneau, J. and Tomé, D. (1999). Polyphenols, metal ion complexation and biological consequences. *In: Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*, 1st ed.; Gross, G.; Hemingway, R. and Yoshida, T. (eds.); Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, Vol. 66, p. 545.
- Scardino, A. and de Nys, R. (2004). Fouling deterrence on the bivalve shell *Mytilus galloprovincialis*: a physical phenomenon? *Biofouling*, 20, 249-257.
- Scardino, A.; Guenther, J. and de Nys, R. (2008). Attachment point theory revisited: the fouling response to microtextured matrix. *Biofouling*, 24 (1), 45-53.
- Scheltema, R. (1986). On dispersal and planktonic larvae of invertebrates: an eclectic overview and summary of problems, *Bull. Mar. Sci.*, 39, 290-332.
- Scheltema, R. and Williams, I. (1982). Significance of temperature to larval survival and length of development in *Balanus eburneus* (Crustacea: Cirripedia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 9, 43-49.
- Schmitt, T.; Hay, M. and Lindquist, N. (1995). Antifouling and herbivory deterrent roles in seaweed secondary metabolites: constraints on chemically-mediated coevolution. *Ecology*, 76, 107-123.
- Schofield, P.; Mbugua, M. and Pell, A. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 21-40.
- Schumacher, J.; Aldred, N.; Callow, M.; Finlay, J.; Callow, J.; Clare, A. and Brennan, A. (2007). Species-specific engineered topographies: correlations between the settlement of algal zoospores and barnacle cyprids. *Biofouling*, 23, 307-317.
- Sghibartz, C. (1984). Antifouling paints - Today and tomorrow. *Proc. 6<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Marine Biology, Athens, Greece, 399-413.
- Sharak Genthner, B.; Townsend, G. and Blattman, B. (1997). Reduction of 3-chlorobenzoate, 3-bromobenzoate to corresponding alcohols by *Desulfomicrobium escambiense*, isolated from 3-chlorobenzoate-dechlorinating coculture. *Applied and environmental microbiology*, 63, 4698-4703.
- Shephard, K. (1994). Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 4, 401-429.

- Shkedy, Y.; Safriel, U. and Keasar, T. (1995). Life-history of *Balanus amphitrite* and *Chthamalus stellatus* recruited to settlement panels in the Mediterranean coast of Israel. *Israel Journal of Zoology*, 41, 147-161.
- Sieburth, J. and Conover, J. (1965). *Sargassum* tannin, an antibiotic which retards fouling. *Nature*, 208 (5005), 52-53.
- Simpson, C. (1993). US Navy develops, non-toxic, self-priming coatings for aluminium and steel. *Paint & Coatings Industry*, 32.
- Skinner, L.; Neves Siviero, F. and Coutinho, R. (2007). Comparative growth of the intertidal barnacle *Tetraclita stalctifera* (Thoracica: Tetraclitidae) in sites influenced by upwelling and tropical conditions at the Cabo Frio region, Brazil. *Int. J. Trop. Biol.*, 55 (1), 71-78.
- Slaiman, Q. and Eurof Davies, D. (1971). Mechanism of the corrosion inhibition of Fe by sodium benzoate –II. The inhibitive properties of sodium benzoate in de-aerated and air-saturated solution, *Corrosion Science*, 11, 683-692.
- Smith, R. and Martell, A. (1981). Critical stability constants. Vol. IV, Inorganic complexes, (2<sup>nd</sup> Printing), Plenum Press, NY.
- Snell, F. and Snell, C. (1941). Colorimetric methods for analysis, Vol. I, Inorganic, New York, 143 pp.
- Southward, A. and Crisp, D. (1963). Barnacles of European waters. Catalogue of main marine fouling organisms, Vol. I, OECD, 46 pp.
- Srinivasan, M. and Swain, G. (2007). Managing the use of copper-based antifouling paints. *Environmental Management*, 39 (3), 423-441.
- Srour, R. (1998). Benzoic acid and derivatives. In: Srour R, ed. Aromatic intermediates and derivatives. Paris, pp. A.IV.1- A.IV.17.
- Steinberg, P.; de Nys, R. and Kjelleberg, S. (1998). Chemical inhibition of epibiota by Australian seaweeds. *Biofouling*, 12, 227-247.
- Stoeker, D. (1980). Relationships between chemical defense and ecology in benthic ascidians. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 3, 257-265.
- Stoner, D. (1990). Recruitment of a tropical colonial ascidian: Relative importance of pre-settlement vs. post-settlement processes. *Ecology*, 71, 1682-1690.
- Stout, R. (1998). Solvents: health, safety and environmental issues. *J. Coat. Technol.* 70 (885), 161.

- Strathmann, R. (1985). Feeding and nonfeeding larval development and life-history evolution in marine invertebrates, *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 16, 339-361.
- Stupak, M. (1982). Acción de pinturas tipo matriz soluble sobre los componentes vegetales y animales del fouling. *CIDEPINT-Anales*, 261-309.
- Stupak, M. (1985). Studies of fouling of Argentine coasts. Proc. Argentine-USA Workshop on Biodeterioration (CONICET-NSF). Published by AQUATEC Química S.A., Sao Paulo, Brasil, 239-258.
- Stupak, M.; Bastida, R. y Arias, P. (1980). Las incrustaciones biológicas del puerto de Mar del Plata (Argentina). Período 1976/77. *CIDEPINT-Anales*, 173-231.
- Stupak, M.; Pérez, M. y Di Sarli, A. (1990). Relación entre la fijación de micro y macro 'fouling' y los procesos de corrosión de estructuras metálicas. *Rev. Iberoam. Corr. Prot.*, 21 (6), 219-225.
- Stupak, M.; García, M. and Pérez, M. (2003). Non-toxic alternative compounds for marine antifouling paints. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, 49-52.
- Sugiura, Y.; Matsuda, K.; Yamada, Y.; Nishikawa, M.; Shioya, K.; Katsusaki, H.; Imai, K. and Amano, H. (2006). Isolation of new anti-allergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*. *Biosci. Biochem. Biotechnol.*, 70 (11), 2807-2811.
- Takahashi, K.; Bardwell, J.; Mac Dougall, B. and Graham, M. (1992). Mechanism of anodic dissolution and passivation of iron-II. Comparison of the behavior in neutral benzoate and acetate buffer solutions, *Electrochimica Acta*, 37, 477-487..
- Tan, C.; Nowak, B. and Hodson, S. (2002). Biofouling as a reservoir of *Neoparamoeba pemaquidensis* (Page, 1970), the causative agent of amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 210, 49-58.
- Tapia, L.; González Agüero, M.; Cisternas, M.; Suazo, M.; Cambiazo, V., Uauy, R. and González, M. (2004). Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochem. J.*, 378, 617-624.
- Targett, N. and Arnold, T. (2001). Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *J. Phycol.*, 34, 195-205.

- Terry, L. and Picken, G. (1986). Algal fouling in the North Sea. *En: 'Algal biofouling'* (Evans, L. and Hoagland, K. D., eds.). Studies in Environmental Science 28, Elsevier, 179-192.
- Terry, L. and Edyvean R. (1986). Algal biofouling. (Evans, L. and Hoagland, K., eds.), Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, Tokio, 211-229.
- Thirionet, I.; Daloze, D.; Braekman, J. and Willemsen, P. (1998). 5-Bromoverongamine, a novel antifouling tyrosine alkaloid from the sponge *Pseudoceratina* sp. *Nat. Prod. Lett.*, 12, 209-214.
- Thiyagarajan, V.; Nair, K.; Subramoniam, T. and Venugopalan, V. (2002). Larval settlement behavior of the barnacle *Balanus reticulatus* in the laboratory. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 82, 579-582.
- Thiyagarajan, V. and Qian, P. (2008). Proteomic analysis of larvae during development, attachment, and metamorphosis in the fouling barnacle, *Balanus amphitrite*. *Proteonomics*, 8, 3164-3172.
- Thomas, K. (2009). The use of broad-spectrum organic biocides in marine antifouling paints. *In: Advances in marine antifouling coatings and technologies* (Hellio, C. and Yebra, D., eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Thorhaug, A. and Marcus, J. (1980). Macrofouling problems associated with Ocean Thermal Energy Conversion (OTEC) units. *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Congr. Mar. Corr. Foul.*, Biología Marina, Barcelona, España, 225-230.
- Thorson, G. (1950). Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews*, 25 (2), 1-45.
- Tighe-Ford, D.; Power, M. and Vaile, D. (1970). Laboratory rearing of barnacle larvae for antifouling research. *Helgoländer wiss. Meeresunters*, 20, 393-405.
- Todd, J.; Zimmerman, R.; Crews, P. and Alberte, R. (1993). The antifouling activity of natural and synthetic phenolic acid sulphate esters. *Phytochemistry*, 34, 401-404.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (1985). Ambient water quality criteria for copper. Office of Water Regulations and Standards, Criteria and standards Division. Washington, DC, EPA 440/5-84-031.
- van Londen, A. (1963). A study of ship bottom paints in particular pertaining to the behavior and action of antifouling paints. TNO Report, 54C (C6, C7, 5b).



- Verkholantsev, V. (1999). Coating additive. Part III. Emulsification process and emulsifiers. *European Coat. J.* (3), 92.
- Vetere, V. and Romagnoli, R. (1984). Processes of elaboration of cuprous oxide. Study of variables in the chemical reduction of cupric sulfate and electrochemical oxidation of metallic copper. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. & Dev.*, 23, 656-658.
- Vetere, V.; Pérez, M.; Romagnoli, R.; Stupak, M. and del Amo, B. (1997). Solubility and toxic effect of the cuprous thiocyanate antifouling pigment on barnacle larvae. *Journal of Coatings Technology*, 69 (866), 39-45.
- Videler, H.; Geertjes, G. and Videler, J. (1999). Biochemical characteristics and antibiotic properties of the mucous envelope of the queen parrotfish. *J. Fish Biol.*, 54, 1124-1127.
- Voulvoulis, N.; Scrimshaw, M. and Lester, J. (1999). Alternative antifouling biocides. *Appl. Organomet. Chem.* 13, 135-143.
- Voulvoulis, N.; Scrimshaw, M. and Lester, J. (2000). Occurrence of four biocides utilised in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. *Mar. Poll. Bull.*, 40, 938-946.
- Voulvoulis, N.; Scrimshaw, M. and Lester, J. (2002). Comparative environmental assessment of biocides used in antifouling paints. *Chemosphere*, 47, 789-795.
- Vrolijk, N.; Targett, N.; Baier, R. and Meyer, A. (1990). Surface characterization of two gorgonian coral species: implications for a natural antifouling defense. *Biofouling*, 2, 39-54.
- Wahl, M. (1989). Marine epibiosis: I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 58, 175-189.
- Wahl, M.; Kroger, K. and Lenz, M. (1998). Non-toxic protection against epibiosis. *Biofouling*, 12, 205-226.
- Wahl, M. and Hoppe, K. (2002) Interactions between substratum, rugosity, colonisation density and periwinkle grazing efficiency. *Mar. Biol. Prog. Ser.*, 225, 239-249.
- Walker, G. (1971). A study of the cement apparatus of the cypris larva of the barnacle *Balanus balanoides*. *Mar. Biol.*, 9, 205-212.
- Walker, G. (1981). The adhesion of barnacles. *J. Adhesion*, 12, 51-58.
- Walker, G. and Yule, A. (1984). Temporary adhesion of the barnacle cyprid: the existence of an antennular adhesive secretion. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 64, 679-686.

- Walley, L. (1969). Studies on the larval structure and metamorphosis of *Balanus balanoides* (L.). *Phil. Trans. R. Soc. (Ser. B)* 256, 237-280.
- Walters, L. and Wethey, D. (1996). Settlement and early post-settlement survival of sessile marine invertebrates on topographically complex surfaces: the importance of refuge dimension and adult morphology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 137, 161-171.
- Wangersky, P. (1976). The surface film as a physical environment. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 7, 161-176.
- Wares, J.; Gaines, S. and Cunningham, C. (2001). A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution*, 55, 295-306.
- Waterman, P. and Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications: Oxford, Great Britain.
- Weisman, G.; Sundberg, D.; Cimini, R.; Brown, M.; Beno, B. and Eighmy, T. (1992). Controlled release antifouling coatings. I. Approaches for controlled release of 2,4-dinitrophenolate and benzoate into seawater. *Biofouling*, 6, 123-146.
- Wendt, D. (1996). Effect of larval swimming duration on success of metamorphosis and size of the ancestrular lophophore in *Bugula neritina* (Bryozoa). *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, 191, 224-233.
- Wendt, D. (1998). Effect of larval swimming duration on growth and reproduction of *Bugula neritina* (Bryozoa) under field conditions. *Biol. Bull.*, 195, 126-135.
- Wethey, D. (1984). Spatial pattern in barnacle settlement: day to day changes during the settlement season. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 64, 687-698.
- Wethey, D. (1986). Ranking of settlement cues by barnacle larvae: influence of surface contour. *Bull. Mar. Sci.*, 39, 393-400.
- Wikström, S. and Pavia, H. (2004). Chemical settlement inhibition versus post-settlement mortality as an explanation for differential fouling of two congeneric seaweeds. *Oecologia*, 138, 223-230.
- Wieckzorek, S. and Todd, C. (1998). Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues. *Biofouling*, 12, 81-118.
- Williams, G. (1964). The effects of extracts of *Fucus serratus* in promoting the settlement of larvae of *Spirorbis borealis* (Polychaeta). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 44, 397-414.

- Willemsen, P. (2006). Biofouling in European aquaculture: is there an easy solution? <http://www.crabproject.com/index.php/uk/57/publications>
- Wisely, B. (1962). Effect of an antifouling paint on a Bryozoan larva. *Nature* London, 193, 543-544.
- Wisely, B. (1963). Effects of antifouling paints on settling larvae of the bryozoa *Bugula neritina* L. *Aust. J. Mar. Freshwt. Res.*, 14, 44-59.
- Wood, E. (1950). The bacteriology of shark spoilage. *Aust. J. Mar. Freshwt. Res.*, 1, 85-90.
- Woolmington, A. and Davenport, J. (1983). pH and PO<sub>2</sub> levels beneath marine macrofouling organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 66, 113-124.
- Wu, R.; Lam, P. and Zhou, B. (1997). A settlement inhibition assay with cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Chemosphere*, 38, 1867-1874.
- Yadav, P.; Singh, A. and Wadhwani, R. (1999). Role of hydroxyl group in the inhibitive action of benzoic acid toward corrosion of aluminum in nitric acid, *Corrosion (NACE)*, 55, 937-942.
- Yamaguchi, M.; Nishihara, H. and Aramaki, K. (1994). The inhibition of passive film breakdown on iron in a borate buffer solution containing chloride ions by anion inhibitors, *Corrosion Science*, 36, 241-258.
- Yamaguchi, H.; Yoshino, K. and Kido, A. (2002). Termite resistance and wood-penetrability of chemically modified tannin and tannin-copper complexes as wood preservatives. *J. Wood Sci.*, 48 (4), 331-337.
- Yebra, D.M.; Kiil, S. and Dam-Johansen, K. 2003. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50, 75-104.
- Yee, L.; Holmstrom, C.; Fuary, E.; Lewin, N.; Kjelleberg, S. and Steinberg, P. (2007). Inhibition of fouling by marine bacteria immobilized in K-carrageenan beads. *Biofouling*, 23, 287-294.
- Young, C. (1995). Behavior and locomotion during the dispersal phase of larval life. In: McEdward L, (ed.). *Ecology of marine invertebrate larvae*. Boca Raton, FL. CRC Press, 249-278.
- Young L. and Mitchell, R. (1973). The role of microorganisms in marine fouling. *Int. Biodetn. Bull.*, 94, 105-109.

- Yule, A. and Crisp D. (1983). A study of feeding behaviour in *Temora longicornis* Muller (Crustacea: Copepoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 71, 271-282.
- Yule, A. and Walker, G. (1985). Settlement of *Balanus balanoides*: the effect of cyprid antennular secretion. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 65, 707-712.
- Yule, A. and Walker, G. (1987). Adhesion in barnacles. In: Southward, A., (ed.). Barnacle biology, A.A. Balkema, Rotterdam.
- Zhao, T. and Doyle, M. (2006). Reduction of *Campylobacter jejuni* on chicken wings by chemical treatments. *J. Food Prot.*, 69, 762-767.
- Zapata, M.; Silva, F.; Luza, Y.; Wilkens, M. and Riquelme, C. (2007). The inhibitory effect of biofilms produced by wild bacterial isolates to the larval settlement of the fouling ascidia *Ciona intestinalis* and *Pyura praeputialis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 150-159.
- Zor, S. (2002). The effects of benzoic acid in chloride solutions on the corrosion of iron and aluminum. *Turk. J. Chem.*, 26, 403-408.
- Zucker, W. (1983). Tannins: Does structure determine function? An ecological perspective. *Am. Nat.*, 121, 335-365.