

Síntese e Avaliação da Ação Algicida de Lyso-glicerofosfocolinas

Capitão-de-Corveta (EN) William Romão Batista

Mestre em Química Analítica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.
Militar pesquisador do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – Arraial do Cabo, RJ – Brasil.
E-mail: williamromao@ieapm.mar.mil.br

Vanessa de Almeida Martins

Mestre em Química Analítica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.
Cursando o Doutorado pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.
E-mail: vanessa.3103@yahoo.com.br

Maria Helena Campos Baeta Neves

Doutora em Oceanografia Biológica Algologia pela *Université Pierre et Marie Curie* – Paris – França.
Pesquisadora do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – Arraial do Cabo, RJ – Brasil.
E-mail: baetaneves@uol.com.br

Ricardo Coutinho

Doutor em Biologia pela *University Of South Carolina* – Columbia, SC – Estados Unidos.
Pesquisador do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – Arraial do Cabo, RJ – Brasil.
E-mail: rcoutinhosa@yahoo.com

Rosângela Sabbatini Capella Lopes

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.
Professora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.
E-mail: claudiosabbatini@uol.com.br

Cláudio Cerqueira Lopes

Doutor em Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.
Professor da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.
E-mail: claudiosabbatini@uol.com.br

ser uma boa opção biocida para o preparo de tintas anti-incrustantes de uso naval.

Palavras-chave

Síntese. Lyso-glicerofosfocolinas. Anti-incrustante. Biocida. Microalgas.

Synthesis and Evaluation of the Algacide Action of Lyso-glycerophosphocolines

Abstract

This paper presents a proposal for synthesis and use, as an antifouling marine biocide, of special lyso-glycerophosphocolines. Soy lecithin was used as raw material for synthesis. In the evaluation of biocide action, against microbial growth, – three micro algae species representing the main groups of marine organisms that form the biofilm were used: Tetraselmis striata; Dunaliella tertiolecta and Skeletonema costatum. The synthesis used produced a mixture of different lyso-glycerophosphocolines, which were identified by the use of mass spectrometry techniques. The antifouling action of the synthesis product was assessed by comparing-laboratory tests to the effects achieved – by using – sulphate copper, a kind of copper used in antifouling paints. The results – achieved show- that the use of lyso-glycerophosphocolines can be an interesting biocide option for -preparing -antifouling paints for – naval use.

Keywords

Synthesis. Lyso-glycerophosphocoline. Antifouling. Biocide. Micro algae.

Resumo

Este trabalho apresenta uma proposta de síntese e de uso, como biocida anti-incrustante marinho, de lyso-glicerofosfocolinas especiais. Lecitina de soja foi utilizada como matéria-prima de síntese. Na avaliação da ação biocida contra o crescimento microbiológico foram utilizadas três espécies de microalgas representativas dos principais grupos de organismos formadores do biofilme marinho: *Tetraselmis striata*; *Dunaliella tertiolecta* e *Skeletonema costatum*. A síntese empregada produziu uma mistura de diferentes lyso-glicerofosfocolinas, que foram identificadas pelo uso de técnicas de espectrometria de massas. A ação anti-incrustante do produto de síntese foi avaliada por comparação àquela conseguida com o uso de sulfato de cobre, uma das formas de cobre usado em tintas anti-incrustantes. Os resultados alcançados demonstram que o uso de lyso-glicerofosfocolinas pode

1. INTRODUÇÃO

Notório é o fato de a bioincrustação marinha ocasionar problemas logísticos e prejuízos econômicos, entre os quais podemos citar: entupimentos, comprometimentos estruturais e, na navegação, diminuição da velocidade, perda de manobrabilidade e aumento de consumo de combustível (YEBRA, 2004; EGUFA e TRUEBA, 2007; MARECHAL e HELLIO, 2009; RAVEENDRAN e MOL 2010; CASTRO *et al.* 2011; DAFFORN *et al.*, 2011). Ela é o resultado do processo natural de colonização e crescimento de micro e macro-

-organismos sobre superfícies submersas. O seu desenvolvimento envolve diferentes etapas e se inicia com a adsorção, àquela superfície, de moléculas orgânicas disponíveis na coluna d'água, tais como polissacarídeos e proteínas, o que permite uma subsequente adesão de micro-organismos como bactérias, cianobactérias, diatomáceas e protozoários, caracterizando-se este estágio pela formação do biofilme e é, este biofilme, o agente facilitador do assentamento e do desenvolvimento de macro-organismos, tais como moluscos, briozoários, poliquetas, balanídeos, crustáceos e algas (BHADURY e WRIGHT, 2004; YEBRA *et al.*, 2004; CALLOW e CALLOW, 2006).

Muitos estudos têm demonstrado que a adesão inicial de bactérias a uma superfície submersa é uma das prováveis chaves tanto para se entender o processo da bioincrustação quanto para se entender que a formação do biofilme é o mecanismo precursor da incrustação por organismos macroincrustantes (ARCE *et al.*, 2004; BHASKAR e BHOSLE, 2005; BRIAND, 2010; XIONG e LIU, 2010). Dentro desta abordagem, espécies de microalgas marinhas são consideradas como importantes organismos incrustantes, destacando-se as Clorofíceas, Heteroconta (principalmente Diatomáceas) e Rodofíceas, sendo também as cianobactérias frequentemente tidas como colonizadores primários.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de ensaios laboratoriais, a ação anti-incrustante, contra microalgas, de um produto de síntese laboratorial composto por uma mistura de lyso-glicerofosfocolinas (LPC) análogos à substância conhecida como *Fator Ativador de Plaquetas* (PAF).

Acredita-se que tais lyso-glicerofosfocolinas se difundido no biofilme, possa agir ocasionando o rompimento ou mau funcionamento da membrana citoplasmática das células dos organismos que iniciam e formam o biofilme, ocasionando assim a sua repulsão ou morte, implicando isto, consequentemente, na inibição ou mitigação do início do processo de bioincrustação.

2. METODOLOGIA DE PESQUISA

2.1. Hipóteses de ação

A ideia da utilização de LPC como agente anti-incrustante tem por princípio o efeito produzido em outros tipos de células testadas na área médica e farmacológica, tendo por hipótese o desencadeamento de uma reação antagônica ou processo degenerativo nas células dos organismos incrustantes em contato com tais substâncias PAF (VENABLE *et al.* 1993; BOTITSI *et al.*, 1998; KULIKOV e MUZYA, 1998; MARATHE *et al.*, 2001).

Para se entender os mecanismos envolvidos na liberação e na ação de um biocida contido em uma tinta ou outro substrato qualquer, supõem-se, aqui, que ocorram as seguintes etapas: 1ª) o LPC, utilizado como biocida, é liberado do substrato e atinge a parte inferior do biofilme; 2ª) o LPC começa a sua difusão pelo interior do biofilme, tendo como principal eluente a água do mar e como superfície de interação o biofilme (adsorção e dessorção); 3ª) o LPC atinge os invólucros mais externos dos micro-organismos que compõem o biofilme, sendo iniciada a sua absorção; 4ª) o LPC atinge a membrana plasmática e ocasiona a repulsão ou morte do micro-organismo e 5ª) o LPC que ultrapassa a camada do biofilme entra na camada hidrodinâmica e passa a sofrer a dispersão e a diluição pela água do mar (Figura 1).

Assim, um aspecto entendido como de fundamental importância refere-se às interações interfaciais desenvolvidas entre o LPC, a água do mar e os exopolissacarídeos exsudados (EPS) constituintes do biofilme. Entende-se aqui que o LPC não pode ser totalmente solúvel em água e nem ter alta afinidade pelo EPS. Sendo ele totalmente solúvel, tenderá a permanecer na fase aquosa e, devido ao maior coeficiente de difusibilidade neste meio, será completamente retirado do biofilme, perdendo-se no ambiente aquoso. Se tiver ele alta afinidade pelo EPS, a sua difusão tornar-se-á muito lenta e menos abrangente, comprometendo o seu contato com os microorganismos, fican-

do assim restrito à parte mais inferior do biofilme contíguo à camada de tinta e, como consequência, terá baixa eficiência (GOREISCH *et al.*, 2004; IWASAKI e ISHIHARA, 2005; YEBRA *et al.*, 2006; WATANABE e ISHIHARA, 2008).

Vale registrar que EPS – excetuando-se a água – é o principal componente do biofilme. Formado por uma complexa mistura de macromoléculas tais como polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, sendo sua composição variável com a espécie de micro-organismo e fatores ambientes envolvidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produtos químicos

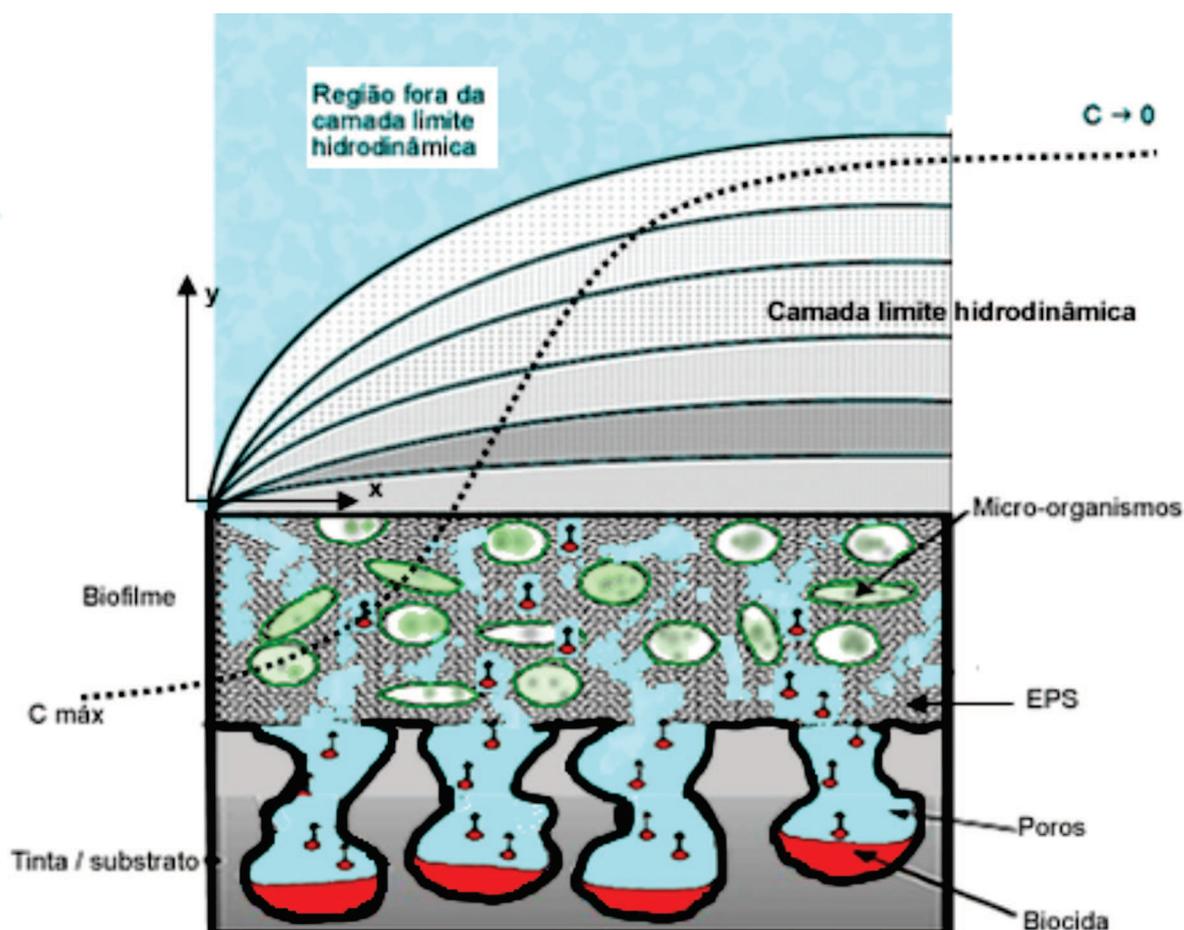
Ácido fórmico ACS (Sigma Aldrich); Sulfato de cobre PA (Vetec); metanol LC-MS (Tedia); diclorometano GC (Tedia); água grau-1 (Milli-Q); lecitina de soja (Akros) e Sódio metálico (Vetec).

3.2. Ensaios laboratoriais

A atividade biocida do produto de síntese foi comparada àquela obtida pelo uso do sulfato de

FIGURA 1

Ilustração da difusão hipotética do biocida (LPC). O biocida componente da tinta é carregado pela água do mar a partir de poros formados por desgaste (concentração máxima – $C_{\text{máx}}$) e se difunde pelo biofilme entrando em contato com os micro-organismos. Ao ultrapassar a camada do biofilme ele passa a ser diluído, pela ação da água do mar, na camada limite hidrodinâmica. Alcançando sua diluição total ($C \rightarrow 0$) na região mais exterior.



Fonte: adaptado de Yebra *et al.* 2006.

cobre (CuSO_4), uma das formas de cobre usadas como biocida em tintas anti-incrustantes, contra o crescimento de microalgas representativas dos maiores grupos de organismos formadores do biofilme. Foram utilizadas uma espécie de prasinofíceia (*Tetraselmis striata*), uma de clorofíceia (*Dunaliella tertiolecta*) e uma de diatomácea (*Skeletonema costatum*) fornecidas pelo Laboratório de Microalgas do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM).

Para os ensaios, realizados em triplicata, 5×10^5 cel.ml⁻¹ de cada espécie de microalgas em fase de crescimento exponencial foram colocados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura Conway e em seguida inoculadas com as soluções de CuSO_4 e do produto de síntese, as quais, ao final, ficaram com concentrações de $3,3 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivamente. Os tubos contendo as microalgas foram colocados em uma incubadora a 18 °C com ciclo de fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro, sendo avaliados diariamente quanto ao crescimento celular, durante cinco dias, por

meio da contagem direta das células em um Hematocítômetro de Neubauer.

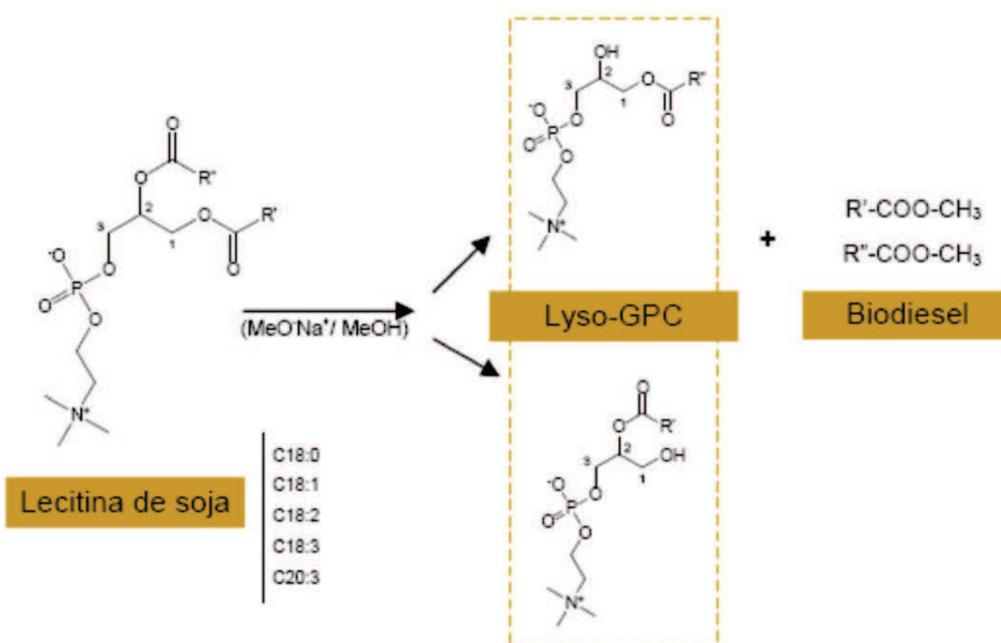
4. SÍNTESE DAS LYSO-GLICEROFOSFOCOLINAS

A síntese de glicerofosfolipídios não é uma tarefa trivial, pois requer uma incorporação regioselectiva de três diferentes substituintes nas três posições possíveis da molécula de glicerol, o que envolve sequências de proteção e desproteção de suas hidroxilas e sequências de alquilação ou acilação e fosforilação, podendo para este intento utilizar-se de procedimentos catalíticos e enzimáticos (TESTET *et al.*, 2002; ICHIHARA *et al.*, 2005; D'ARRIGO *et al.*, 2007).

Para este trabalho, foi desenvolvida, pelo Laboratório de Síntese e Avaliação de Produtos Estratégicos (LASAPE), uma síntese a partir das lecitinas de soja (Figura 2), visando o preparo de LPC do tipo 1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina, substâncias estas com estruturas químicas seme-

FIGURA 2

Síntese de Lyso-GPC a partir de lecitina de soja por metanólise.



lhantes aos compostos 1-O-hexadecil-2-O-acetil-sn-glicero-3-fosfolina (PAF) e 1-O-hexadecil-sn-glicero-3-fosfolina (Lyso-PAF).

A síntese foi realizada em um reator de vidro equipado com um condensador de refluxo com água fria, sendo as lecitinas tratadas com uma solução de metóxido de sódio em metanol preparada in situ durante um longo período de agitação mecânica e sob aquecimento. A batelada foi realizada usando-se 1000 mL de metanol, 3.0 gramas de sódio metálico e 40.0 gramas de lecitinas de soja. A mistura reacional foi deixada sob forte agitação durante 72 horas sob aquecimento de 45-60 °C, sendo o resíduo sólido filtrado por gravidade em papel de filtro. Após a remoção das substâncias voláteis foi obtido em 33,4 gramas de produto sólido.

As lecitinas de soja empregadas neste projeto foram caracterizadas estruturalmente por meio da espectrometria de massas usando um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) Shimadzu Prominence acoplada a um analisador de massas tipo iontrap da Bruker Esquire 6000 e apresentaram a composição mostrada no Quadro 1.

5. ANÁLISE QUÍMICA QUALITATIVA

O produto de síntese, previamente dissolvido em uma mistura de metanol, clorofórmio e água (2/1/1) e acidulado com ácido fórmico, foi injetado manualmente no cromatógrafo a líquido (injetor Rheodyne alça de 20 µl) sob as seguintes condições operacionais: coluna cromatográfica tipo C18 marca Thermo (5 µm), 250x2 mm; fase móvel isopropanol, água, metanol e acetato de etila com um gradiente começando com (40/15/40/05), mantido por 10 minutos a uma vazão de para 0.1 ml/min, passando a (25/05/50/20) aos 15 minutos a uma vazão de 0.3 ml/min sendo mantido até tempo final de 30 minutos. A linha de efluentes foi direcionada para um espectrômetro de massa do tipo iontrap equipado com um eletronebulizador ortogonal e trabalhando sob as seguintes condições operacionais: modo positivo, scan 400-950 m/z; agulha capilar a -4.0 KV; fluxo de gás nitrogênio 10 (l/min); temperatura de secagem de 300°C e nebulizador a 30 (psi); Hélio usado como gás de amortecimento do trap; alto vácuo de 1x10⁻⁵ (mbar); trap drive 59.1; lente 1 (-5V); lente 2 a (-60V); saída do capilar a 132,3 (V); skimmer 40 (V); octopolo 1 DC a 12 (V); octopolo 2 DC a 1,7 (V) e octopolo RF 194.5 (V).

QUADRO 1

Composição das lecitinas de soja usadas como matéria-prima.

R = Ácido Graxo	%	<p>lecitinas de soja</p>
Ácido gama homolinolênico (C20:3)	5,7 %	
Ácido Esteárico (C18:0)	18,6 %	
Ácido Oleico (C18:1)	12,8 %	
Ácido Linoleico (C18:2)	54,0 %	
Ácido Linolênico (C18:3)	8,9 %	

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por espectrometria de massa da corrente eluindo do HPLC produziu o cromatograma de íons totais apresentado na Figura 3.

Foi realizada uma avaliação dos íons componentes eluindo nos tempos 4.9; 10.1 (espectro não apresentado); 11.7 e 13.2 min, inerentes aos principais picos observados (Figuras 4 a 6).

Entende-se aqui que as condições experimentais usadas na análise proporcionaram uma boa distribuição e separação dos lipídios hidroxilados, nos 13 minutos iniciais, daqueles mais ramificados e/ou não reagidos, como é o caso de uma glicero-fosfolina m/z 736 observada nos, aproximadamente, 15 minutos.

Para cada espectro obtido, os íons mais intensos foram isolados e avaliados usando espectrometria do tipo MS^2 (espectros não apresentados) para confirmação do fragmento característico m/z 184, específico para fosfolinas, sendo tais íons precursores estudados e avaliados quanto as pos-

síveis estruturas químicas (PULFER e MURPHY, 2003; PETERSON e CUMMINGS, 2006; HSU e TURK, 2009; KHALIL *et al.*, 2010).

As fragmentações tipo MS^2 dos íons m/z 539; 523; 615; 597 e 599, mostrados nas Figuras 4 a 6, produziram, exceto para o íon precursor m/z 539, o íon característico m/z 184, confirmando se tratarem de glicerofosfolinas produzida na síntese.

Do acima exposto, considera-se aqui que os principais produtos obtidos pela síntese foram os íons m/z 523, m/z 599 e m/z 597 (figura 7), sendo a presença dos íons m/z 734 e 736, os quais são tidos como resíduo da matéria prima empregada, a lecitina de soja, uma indicação de que houve uma baixa conversão alcançada pela síntese.

Em relação à inibição do crescimento celular, verificou-se, conforme mostrado na Figura 8, que a solução contendo o produto de síntese apresentou uma inibição superior àquela produzida pela do $CuSO_4$, nos seguintes percentuais: 60,88% sobre o crescimento da Diatomácea *Skeletonema*

FIGURA 3
Cromatograma de íons (TIC) totais obtido do efluente do HPLC.

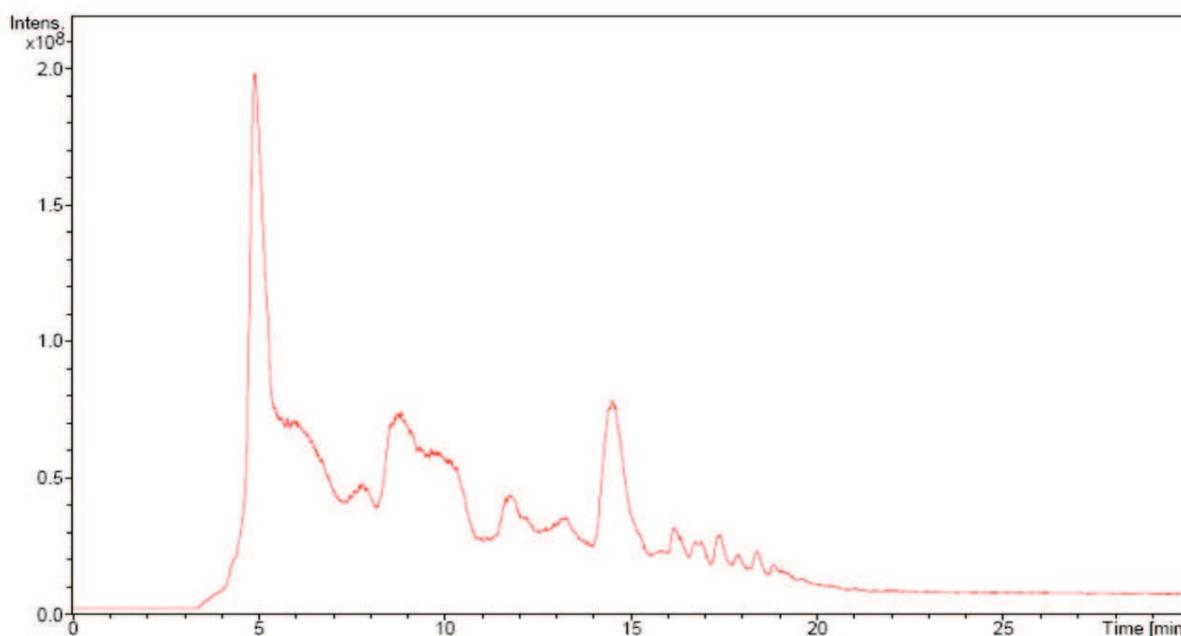


FIGURA 4

Espectro de massas dos íons eluindo aos 4.9 minutos de corrida.

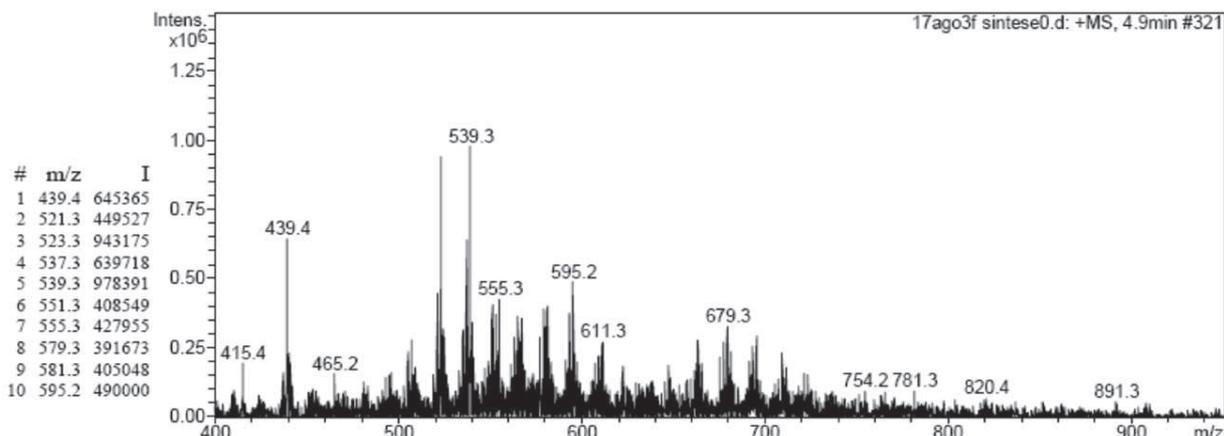


FIGURA 5

Espectro de massas dos íons obtidos do eluente do HPLC aos 11.7 minutos de corrida. Íon 597 m/z confirmado quanto ao fragmento característico.

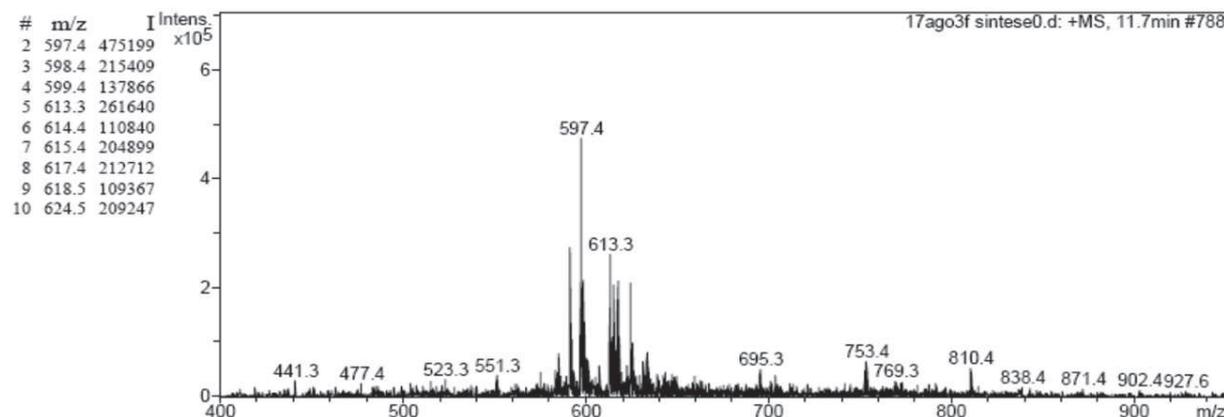


FIGURA 6

Espectro de massas dos íons obtidos do eluente do HPLC aos 13.2 minutos de corrida. Íon 599 m/z confirmado quanto ao fragmento característico.

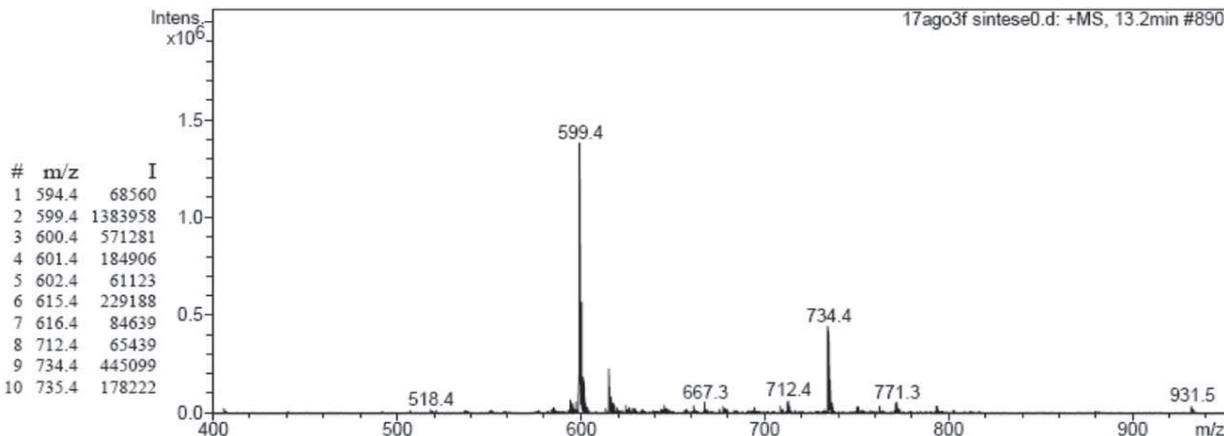


FIGURA 7

Proposta de fragmentação para íon precursor m/z 615, gerando os íons m/z 599, 597 e 581.

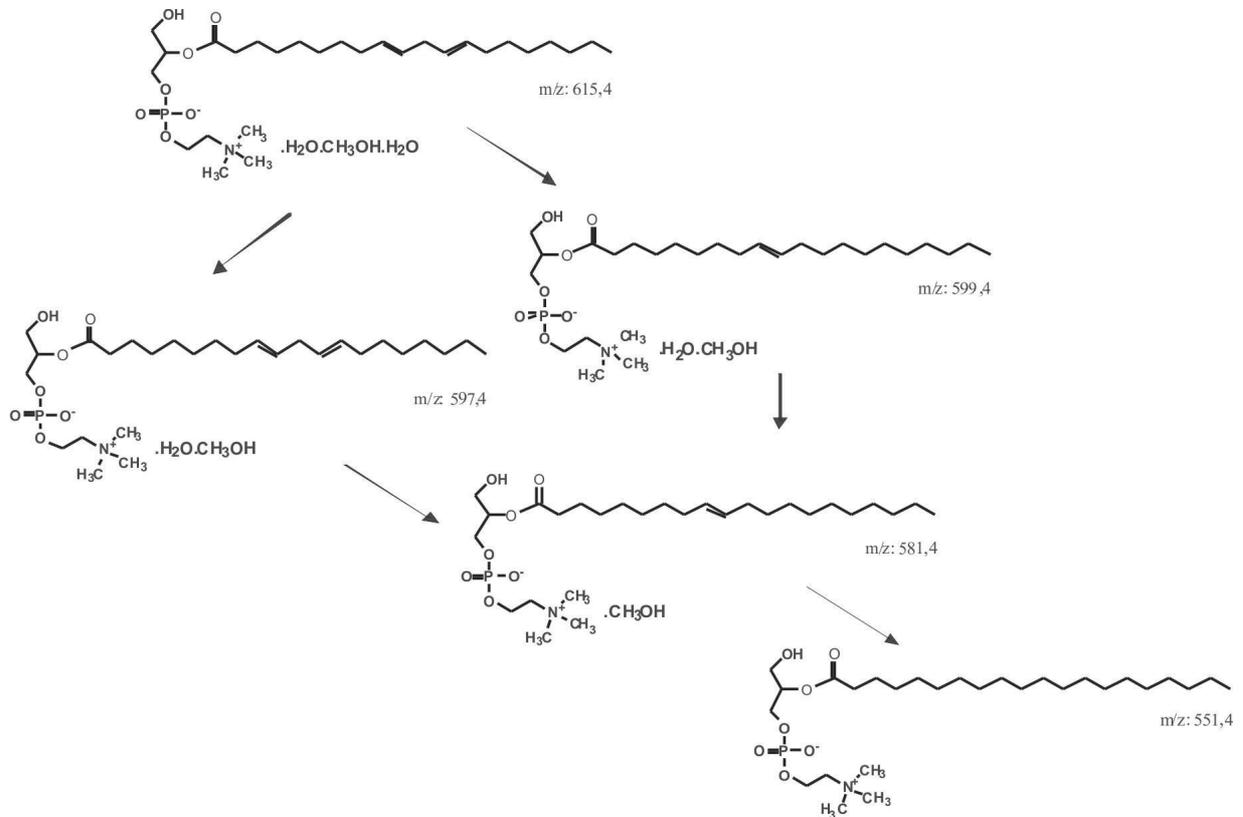
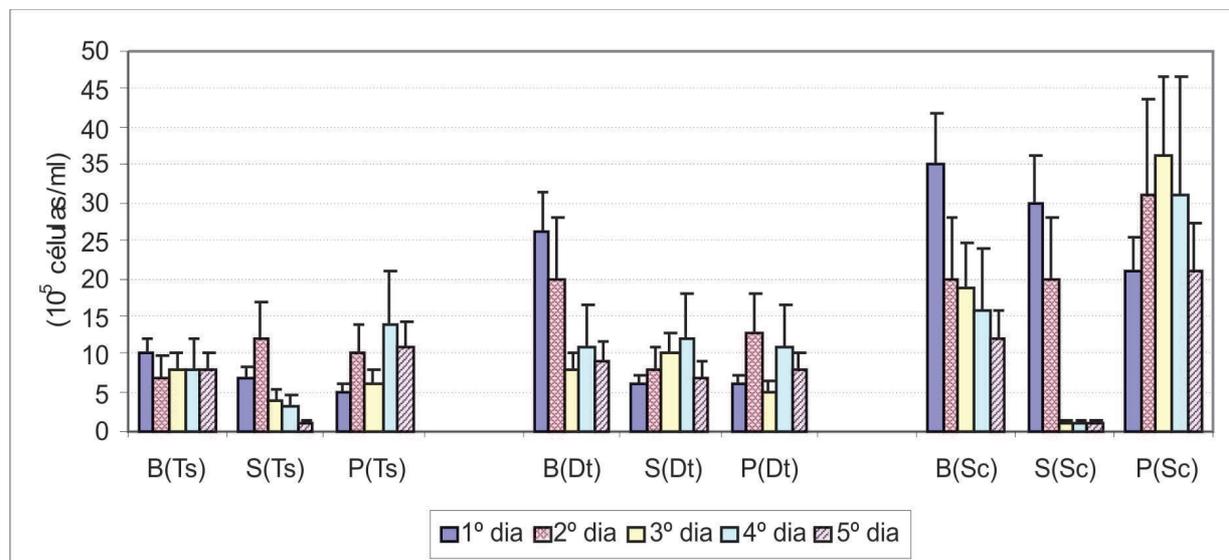


FIGURA 8

Efeitos inibidores das soluções, Padrão de controle CuSO_4 (P), Produto de síntese (S) e Branco de reagentes (B), sobre o crescimento celular das microalgas marinhas *Tetraselmis striata* (Ts); *Dunaliella tertiolecta* (Dt) e *Skeletonema costatum* (Sc). Contagem realizada diariamente, após inoculação das soluções, por um período total de cinco dias.



costatum; 32% sobre a Prasinofíceia *Tetraselmis striata* e 0,46% sobre a Clorofíceia *Dunaliella tertiolecta*, demonstrando assim, que o produto de síntese exibe bom nível de atividade algicida. Outro aspecto também observado refere-se à tolerância ao CuSO_4 , concordando com o obtido por Claire et al. (2002), pela *Skeletonema costatum*, o que ratifica que métodos usuais do controle da bioincrustação com o uso de tintas anti-incrustante contendo cobre, não é de todo efetivo sobre o biofilme formado por algas diatomáceas.

7. CONCLUSÃO

A utilização de lyso-glicerofosfolinas como agente anti-incrustante apresenta-se como uma promissora perspectiva considerando sua fácil síntese e bom desempenho algicida comparada ao CuSO_4 . Torna-se especialmente importante ressaltar a sua atividade anti-incrustante contra o crescimento de espécies de diatomáceas, grupo representativo dos principais micro-organismos formadores do biofilme. Entende-se aqui que o seu uso possa ser de fato relevante ao considerar-se uma possível substituição de aditivos biocidas hoje utilizados em tintas marítimas anti-incrustantes.

8. AGRADECIMENTOS

Registrem-se os nossos agradecimentos ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM –; à Marinha do Brasil (MB); ao Laboratório de Síntese e Análise de Produtos Estratégicos – LASAPE –; à Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ – e à Fundação de Estudos do Mar – FEMAR –.

REFERÊNCIAS:

1. ARCE, F. T.; AVCI, R.; BEECH, I. B.; COOKSEY KE, COOKSEY BW. *A live bioprobe for studying diatom-surface interactions*. Biophysical Journal, v. 87, p. 4284 – 4297. 2004.
2. BHADURY, P.; WRIGHT, P. C. *Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications*. Planta, v. 219, p. 561 – 578. 2004.
3. BHASKAR, P. V.; BHOSLE, N. B. *Microbial extracellular polymeric substance in marine biogeochemical process*. Current Science, v. 88, p. 45 – 53. 2005.
4. BOTTISI, E.; MAVRI-VAVAYANNI, M.; SIAFAKA-KAPADAI, A. *Metabolic fate of platelet-activating factor (PAF 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and lyso-PAF (1-O-alkyl-2-lysosn-glycero-3-phosphocholine) in FRTL5 cells*. Journal of Lipid Research, v. 39, p. 1295 – 1304. 1998.
5. BRIAND, J. F. *Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity*. Biofouling 25, p. 297 – 311. 2010.
6. CALLOW, M. E.; CALLOW, J. A. *Biofilms*. In Fusetani and Clare (org.) Progress in molecular and subcellular biology. Subseries Marine Molecular Biotechnology. Antifouling compounds. Springer Verlag Berlin 2006, p. 141-169. 2006.
7. CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. *Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático*. Química Nova, v.34, p. 1021-1031. 2011
8. DAFFORN, K.A.; LEWIS, J.A.; JOHNSTON, E.L. *Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation*. Marine Pollution Bulletin, v. 62, p. 453-465. 2011.
9. D'ARRIGO, P.; FASOLI, E.; FANTONI, G. P.; ROSSI, C.; SARACENO, C.; TESSARO, D.; SERVI, S. *A practical selective synthesis of mixed short/long chains glycerophosphocholines*. Chemistry and Physics of Lipids, v. 147, p. 113-118. 2007.
10. EGUFA, E.; TRUEBA, A. *Application of marine biotechnology in the production of natural biocides for testing on environmentally innocuous antifouling coatings*. Journal of Coating Technology Research, v. 4, p. 191-202. 2007.
11. GOREISH, H. H.; LEWIS, A. L.; ROSE, S.; LLOYD, A. W. *The effect of phosphorylcholine-coated materials on the inflammatory response and fibrous capsule formation: In vitro and in vivo observations*. Journal of Biomedical Material Research, v.68A, p. 1–9. 2004.

12. HELLIO, C.; BERGE, J. P.; BEAUPOIL, C.; LEGAL, Y.; BOURGOUGNON, N. *Screening of marine algal extracts for anti-settlement activities against microalgae and macroalgae*. *Biofouling*, v.18, p. 205 – 215. 2002.
13. HSU, F. F.; TURK, J. *Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: Mechanisms of fragmentation and structural characterization*. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 2673–2695. 2009.
14. ICHIHARA, K.; IWASAKI, H.; UEDA, K.; TAKIZAWA, R.; NAITO, H.; TOMOSUGI, M. *Synthesis of phosphatidylcholine: An improved method without using the cadmium chloride complex of sn-glycero-3-phosphocholine*. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.137, p. 94–99. 2005.
15. IWASAKI, Y.; ISHIHARA, K. *Phosphorylcholine-containing polymers for biomedical applications*. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 381, p. 534–546. 2005.
16. KHALIL, M. B.; HOU, W.; ZHOU, H.; ELISMA, F.; SWAYNE, L. A.; BLANCHARD, A. P.; Yao, Z.; BENNETT, S. A. L.; FIGEYS, D. *Lipidomics era: accomplishments and challenges*. *Mass Spectrometry Reviews*, v.29, p. 877– 929. 2010.
17. KULIKOV, V. I.; MUZYA, G. I. *Review: The bioregulatory role of platelet-activating factor in intracellular process and cell-cell interaction*. *Biochemistry Moscow*, v. 63 (1), p. 47 – 54. 1998.
18. MARECHAL, J. P.; HELLIO, C. *Challenges for the development of new non-toxic antifouling*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, p. 4623-4637. 2009.
19. MARATHE, G. K.; SILVA, A. R.; NETO, H. C. F. *Lyso-phosphatidylcholine and lyso-PAF display PAF-like activity derived from contaminating phospholipids*. *Journal of Lipid Research*, v. 42, p. 1430 – 1437. 2001.
20. PETERSON, B. L.; CUMMINGS, B.S. *A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples*. *Biomedical Chromatography*, v. 20, p. 227-243. 2006.
21. PULFER, M.; MURPHY, R. C. *Electrospray mass spectrometry of phospholipids*. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 22, p. 332-364. 2003.
22. RAVEENDRAN, T. V.; MOL, V. P. L. *Natural product antifoulants*. *Current Science*, v. 97, p. 508-520. 2009.
23. TESTET, E. ; AKERMOUN, M. ; SHIMOJI, M. ; CAS-SAGNE, C.; BESSOULE, J. J. *Nonenzymatic synthesis of glycerolipids catalyzed by imidazole*. *Journal of Lipid Research*, v. 43, p. 1150-1154. 2002.
24. VENABLE, M. E.; ZIMMERMAN, G. A.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M. *Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions*. *Journal of Lipid Research*, v. 34, p. 691-702. 1993.
25. XIONG, Y.; LIU, Y. *Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 86, p. 825-837. 2010.
26. WATANABE, J.; ISHIHARA, K. *Establishing ultimate biointerfaces covered with phosphorylcholine groups*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 65, p. 155–165. 2008.
27. YEBRA, D. M.; KIIL, S.; JOHANSEN, K. D. *Antifouling technology – past present and future steps towards efficient and environmental friendly antifouling coating*. *Progress in Organic Coatings*, v. 50, p. 75-104. 2004.
28. YEBRA, D. M.; KIIL, S.; WEINELL, C. E.; JOHANSEN, K. D. *Effects of marine microbial biofilms on the biocide release rate from antifouling paints — A model-based analysis*. *Progress in Organic Coatings*, v. 57, p. 56–66. 2006.