UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA

WILLIAM ROMÃO BATISTA

UTILIZAÇÃO DE GLICEROFOSFOLIPÍDIOS SINTÉTICOS ANÁLOGOS DO PAF COMO AGENTES ANTI-INCRUSTANTES NA COMPOSIÇÃO DE TINTAS MARÍTIMAS: PROPOSTA, SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE PERFORMANCE.

RIO DE JANEIRO
2012

William Romão Batista

UTILIZAÇÃO DE GLICEROFOSFOLIPÍDIOS SINTÉTICOS ANÁLOGOS DO PAF COMO AGENTES ANTI-INCRUSTANTES NA COMPOSIÇÃO DE TINTAS MARÍTIMAS: PROPOSTA, SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE PERFORMANCE.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadores: Prof. Dr. Cláudio Cerqueira Lopes
Prof[a]. Dr[a]. Rosângela Sabbatini Capella Lopes

Rio de Janeiro
2012

Batista, William Romão.

Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance. / William Romão Batista. Rio de janeiro: UFRJ/ IQ, 2012.

214 p.

Orientadores: Cláudio Cerqueira Lopes / Rosângela Sabbatini Capella Lopes

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2012.

1. Glicerofosfolipídios; 2. biocida; 3. anti-incrustante; 3.bioincrustação – Teses. I. Lopes, Cláudio Cerqueira Lopes/ Lopes, Rosângela Sabbatini Capella. II. UFRJ, IQ. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

William Romão Batista

UTILIZAÇÃO DE GLICEROFOSFOLIPÍDIOS SINTÉTICOS ANÁLOGOS DO PAF COMO AGENTES ANTI-INCRUSTANTES NA COMPOSIÇÃO DE TINTAS MARÍTIMAS: PROPOSTA, SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE PERFORMANCE.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovada em, 20 de Abril de 2012.

Cláudio Cerqueira Lopes, Dr. Instituto de Química – UFRJ.

Rosângela Sabbatini Capella Lopes, Drª. Instituto de Química – UFRJ.

Jarí Nóbrega Cardoso, Ph.D. Instituto de Química – UFRJ.

João Francisco Cajaiba da Silva, Dr. Instituto de Química – UFRJ.

Luiz Anastácio Alves, Dr. FIOCRUZ – RJ.

Ricardo Coutinho, Ph.D. IEAPM – MB.

À minha esposa IVAMAR, pelo amor, apoio e confiança... que me mantém e me faz feliz. Pela pessoa que é e pela sorte de tê-la comigo...

À minha filha AMANDA, pelo sorriso revigorante... que se transformou em compreensão e que agora, mais do que nunca, valorizo como a maior das riquezas...

Aos meus pais, LOURDES e ANTÔNIO, pelo eterno carinho... aos quais agradeço de coração pelas orações que sempre fizeram e continuam a fazer por mim...

À minha irmã, RITA, pela fraterna amizade... pela sinceridade e pureza de coração...

Aos AMIGOS, pelo prazer da presença... que agora penso em poder retribuir...

AGRADECIMENTOS

Aos nobres Professores Cláudio Cerqueira Lopes e Rosangela Sabattini Capella Lopes, do Instituto de Química – UFRJ, pelo apoio e orientação dispensada durante todo o transcorrer deste trabalho.

À Dra. Maria Helena Campos Baeta Neves e ao Dr. Ricardo Coutinho, do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM, pelo fundamental apoio na realização, avaliação e quantificação dos experimentos biológicos.

Aos integrantes do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM, em especial a Dagles Vianna dos Reis (Grupo de Oceanografia Química e Geoquímica) e José Eduardo Arruda Gonçalves, Carlos Gustavo Werner Ferreira e Luciana Vicente Messano (Grupo de Biotecnologia Marinha) pelo apoio disponibilizado durante o desenvolvimento dos procedimentos químicos, coleta de organismos e experimentos biológicos relacionados ao teste de campo usando tintas a base de cobre.

Aos discentes integrantes do Laboratório de Síntese e Avaliação de Produtos Estratégicos – LASAPE, em especial Maicon Guerra de Miranda, Vanessa de Almeida Martins e Eloilde Barbosa dos Santos que contribuíram para o desenvolvimento e realização da síntese dos produtos testados.

À International Tintas pela preparação dos revestimentos e corpos de provas, usando tintas a base de cobre, utilizados nos testes de campo e por disponibilizar os resultados obtidos nos testes realizados com tintas isentas de cobre.

À Marinha do Brasil, ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM, e ao Instituto de Química – UFRJ, pela permissão e pelo apoio infraestrutural para realizar tão longa empreitada

RESUMO

BATISTA, William Romão. **Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance**. Rio de Janeiro, 2012**.** Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O presente trabalho traz como proposição inovadora utilizar como agente biocida anti-incrustante uma subclasse específica de glicerofosfolipídios, sintetizados a partir da lecitina de soja comercial. Para sustentação da proposta, se definiu como principais objetivos efetuar a caracterização química dos glicerofosfolipídios sintéticos e avaliar suas performances anti-incrustante ao usá-los como agente biocida. As sínteses empregadas, uma metanólise e uma alquilação, produziram uma mistura de diferentes glicerofosfolipídios, os quais foram caracterizados pelo uso de técnicas de espectrometria de massas sequencial com analisador tipo iontrap, tendo sido constatado a produção dos glicerofosfolipídios de interesse. Na avaliação das performances anti-incrustante, os glicerofosfolipídios sintetizados, juntamente com os outros naturais, foram testados contra o assentamento de micro e macro-organismos marinhos por meio de ensaios laboratoriais e testes de campo. Nos ensaios laboratoriais, realizados em comparação a ação alcançada pelo sulfato de cobre ($CuSO_4$) (controle), os produtos da síntese demonstraram provocar uma significativa redução dos processos de crescimento de bactérias (80% inibição relativa à conseguida pelo $CuSO_4$, usando concentrações de 100 µg/L), e de microalgas marinhas (até 63% inibição acima daquela conseguida pelo $CuSO^4$, usando concentrações de 300 µg/L). Os testes de campo, realizados em comparação a diferentes tintas anti-incrustantes, já comercializadas e sob pesquisa, demonstraram que os produtos de síntese, em substituição aos biocidas organo-metálicos (booster), apresentaram uma melhor eficiência na redução dos organismos incrustantes e uma muito boa atividade com significativa redução da cobertura dos macro-organismos incrustantes quando comparados com os controles negativos (sem biocida). Os resultados alcançados demonstram que o uso destes glicerofosfolipídios especiais pode tornar-se uma ótima opção biocida - com apelo natural, matéria-prima de baixo custo e isenção de metais pesados - no preparo de tintas anti-incrustantes para uso naval.

Palavras-chave: anti-incrustante; biocida; glicerofosfolipídios; síntese.

A B S T R A C T

BATISTA, William Romão. **Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance**. Rio de Janeiro, 2012**.** Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

This work presents, as an innovative proposition, the use of the specific subclass of glycerophospholipid, synthesized from commercial soybean lecithin, as biocide antifouling agent. To support this proposal the main objectives of the work were to characterize chemically the synthetics glycerophospholipid and evaluate their antifouling performance using it as biocides agents. The synthesis used, an alkylating and a methanolysis, produced a mixture of different glycerophospholipid, which were characterized using techniques of sequential mass spectrometry with iontrap analyzer, where the production of glycerophospholipids of interest were confirmed. In evaluating the antifouling performance, the synthesized glycerophospholipids along with natural glycerophospholipids, were tested against the settlement of micro and macro marine organisms using laboratory essay and field tests. In the laboratories essays, compared to the action reached by copper sulfate ($CuSO_4$) (control), the synthesis products showed a significant reduction of bacteria growth processes (80% inhibition of the $CuSO_4$ inhibition, using concentrations of 100 µg/L), and marine microalgae (up to 63% over of the $CuSO_4$ inhibition, using concentrations of 300 µg/L). The field tests, compared to the action of the commercial and in research antifouling paint, showed that synthesis products, replacing the organo-metallic biocides (booster), have a better efficiency in the reduction of fouling organisms and showed a very good activity with a significant reduction of macro-fouling organisms coverage when compared to negative controls (without biocide). The results showed that use of these special glycerophospholipids can become a great biocide option - natural appeal, raw material with low-cost and metals free - in the preparation of antifouling paints for naval use.

Keywords: antifouling; biocide; glycerophospholipids; synthesis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

CIT	Cromatograma de íons totais
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
ESI	Ionização por Eletronebulização
EM	Espectrometria de massa
EM^n	Espectrometria de massa sequencial
GPC	Glicerofosfocolina
GPE	Glicerofosfoetanolamina
GPG	Glicerofosfoglicerol
GPI	Glicerofosfoinositol
GPS	Glicerosfosfoserina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
IEAPM	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
IMO	International Maritime Organization
IUPAC	União Internacional para Química Pura e Aplicada
LASAPE	Laboratório de Síntese e Análise de Produtos Estratégicos
LPC	Lyso-glicerofosfocolinas
PA	Ácido Glicerofosfórico
PAF	Fator ativador de plaquetas
PLA	Fosfolipase classe A
PLB	Fosfolipase classe B
PLC	Fosfolipase classe C
PLD	Fosfolipase classe D
SM	Esfingomielina
TBT	Tri-butil estanho
THF	Tetrahidrofurano
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WHOI	Woods Hole Oceanographic Institute

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO 12
2 – REVISÃO LITERÁRIA 16
2.1 – Bioincrustação marinha e sua prevenção 16
2.2 – Micro-organismos. Estruturas de proteção 20
2.2.1 – Invólucro celular 21
2.2.2 – Membrana plasmática 24
2.2.2.1 – Interações químicas interfaciais em membranas celulares 25
2.3 – Lipídios 31
2.3.1 – Classificação de lipídios 31
2.3.2 – Principais classes de lipídios: 34
a) Compostos graxos acilados 34
b) Glicerolipídios 35
c) Glicerofosfolipídios 35
d) Esfingolipídios 36
e) Esteróis 37
f) Prenóis 37
g) Sacarolipídios 38
h) Policetídios 38
2.4 – Glicerofosfolipídios PAF-análogos como compostos anti-incrustante..... 38
2.5 – Síntese de glicerofosfolipídios 44
2.5.1 – PAF e análogos. Síntese enzimática 45
2.5.2 – Síntese laboratorial 46
2.6 – Caracterização de lipídios 47
2.6.1 – Extração 48
2.6.2 – Separações cromatográficas 50
2.6.2.1 – Cromatografia líquida (CLAE) 52
2.6.3 – Espectrometria de massa em lipídios 53
2.6.3.1 – Espectrometria de massa (EM) 53

2.6.3.2 – Espectrometria de massa sequencial (EM^n) 56
2.6.3.3 – O analisador de massas tipo iontrap 57
2.6.3.4 – EM em lipídios. Transpondo a barreira da volatilidade 59
2.6.4 – Análise de glicerofosfolipídios 62
2.6.4.1 – Lipidomics 62
2.6.4.2 – Separando glicerofosfolipídios..... 64
2.6.4.3 – Identificando glicerofosfolipídios..... 65
2.6.5 – Ionização e fragmentação de glicerofosfolipídios..... 66
2.6.5.1 – GP neutros: 67
a) Glicerofosfocolinas (GPC) 67
b) Lyso-glicerofosfocolinas (LPC) 69
c) Esfingomielinas (SM) 72
2.6.5.2 – GP aniônicos e fracamente aniônicos 72

3 – DESENVOLVIMENTO 74
3.1 – Validação da Proposição..... 74
3.2 – Materiais empregados 75
3.2.1 – Reagentes, solventes e outros produtos 75
3.2.2 – Equipamentos 75
3.3 – Métodos empregados 76
3.3.1 – Síntese química dos glicerofosfolipídios PAF-análogos 76
3.3.1.1 – Reação de metanólise. 1ª Síntese 76
3.3.1.2 – Reação de alquilação. 2ª Síntese 78
3.3.2 – Extração de glicerofosfolipídios de esponjas marinhas 79
3.3.2.1 – Espécies ensaiadas e pré-condicionamento 79
3.3.2.2 – Processos de extração e de fracionamento dos extratos 80
3.3.3 – Avaliação de performance 83
3.3.3.1 – Ensaios laboratoriais com bactérias marinhas 83
3.3.3.2 – Ensaios laboratoriais com microalgas marinhas 85
3.3.3.3 – Testes de campo 86
3.3.3.3.a – Tintas a base de cobre 86
3.3.3.3.b – Tintas isentas de cobre 90

3.3.4 – Análise química. Avaliações preliminares das composições 91
3.3.4.1 – Escolha da fase móvel para uso na CLAE 91
3.3.4.2 – Varredura dos íons moleculares de interesse 92
3.3.4.3 – Avaliação dos íons produtos 93

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 95
4.1 – Caracterização Química. Espectrometria de massas 95
4.1.1 – Matéria-prima para síntese. Lecitina de soja 96
4.1.2 – Produtos de síntese 110
4.1.2.1 – Reação de metanólise. 1ª Síntese 110
4.1.2.2 – Reação de alquilação. 2ª Síntese 122
4.2 – Avaliação dos extratos das esponjas marinhas 130
4.2.1 – Esponja marinha *Amphimedon viridis* 130
4.2.2 - Esponja marinha *Geodia corticostylifera* 133
4.2.3 – Esponja marinha *Darwinella sp.* 135
4.2.4 – Esponja marinha *Arenosclera brasiliensis* 137
4.2.5 – Esponja marinha *Aplysina fulva* 140
4.3 – Ensaios com bactérias marinhas 143
4.4 – Ensaios com microalgas marinhas 145
4.5 – Testes de campo 150
4.5.1 – Produto da 1ª Síntese. Utilizando tinta base contendo cobre..... 150
4.5.2 – Produto da 2ª Síntese. Utilizando tinta base isenta de cobre..... 156

5 – CONCLUSÃO 163

6 – RECOMENDAÇÕES 164

REFERÊNCIAS 165

APÊNDICE A – Principais aditivos biocidas usados em tintas anti-incrutantes 190

APÊNDICE B – Produto da 2ª Síntese. Análise espectroscópica por ressonância de hidrogênio RMN-H 192

APÊNDICE C – Produto da 2ª Síntese. Análise espectrofotométrica por infravermelho (IV) 193

APÊNDICE D – Análise estatística dos dados 194

ANEXO A – Encomendas de navios no mundo. Extrato do Shipbuilding Statistics (2011) 202

ANEXO B – Possíveis estruturas e fragmentos de glicerofosfocolinas 203

ANEXO C – Tabela valores críticos para distribuição **F** 212

ANEXO D – Tabela dos valores máximos para distribuição de Dunnet 213

ANEXO E – Tabela dos valores críticos para distribuição **q** 214

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

1 INTRODUÇÃO

O mercado mundial de tintas marítimas anti-incrustantes[1], utilizadas em revestimentos de cascos de navios (Figura 1), necessita urgentemente de um substituto para o tributil estanho (TBT)[2], principal e mais eficiente agente biocida já utilizado neste segmento industrial. Apesar de mundialmente reconhecido como uma substância eficaz e de ter sido utilizado por longo tempo pela indústria naval, o TBT foi banido, em 2008, por leis ambientais internacionais, por ser um causador, cientificamente comprovado, de vários danos ao meio ambiente marinho (CHAMP, 2000; IMO, 2008; GIPPERTH, 2009; SONAK *et al*., 2009; QIAN *et al.*, 2010).

FIGURA 1. Navio com detalhes da pintura anti-incrustante
(Fonte: Coatings World Magazine)*****

[1] Tintas biocidas especialmente empregadas para revestir a área externa inferior do casco das embarcações (obras-vivas). Servem para prevenir que micro e macro-organismos aquáticos se fixem nesta área do casco prejudicando a performance da embarcação e contribuam para deterioração estrutural.

[2] Abreviatura para palavra inglesa Tributiltin (TBT) amplamente reconhecida no meio industrial naval.

***** Disponível em: <http://www.coatingsworld.com/contents/view_products/2010-10-08/new-products-enhance-international-paints-antifoul>. Acesso em: 27nov. 2011.

Como perspectiva da demanda deste segmento industrial – o qual tem uma estimativa de mercado de cinco bilhões de dólares para o ano de 2012 e que, apesar da recessão econômica global, continua a crescer – tem-se a estatística concernente à frota mundial de navios mercantes com arqueação bruta acima de 100 *GT* (*Gross Tonnage*)[3], aproximadamente 400m^3 de volume interno total (*Vi*), realizada com base ao fechamento do ano de 2010, registrando um total de 102 mil unidades operativas e cerca de 28 mil novas encomendas nos últimos três anos (ANEXO A)[4] (WRIGHT, 2009; PIANOFORTE, 2011).

Cabe ressaltar, nesta estatística, a exclusão do incontável grupo de pequenas embarcações mercantes e recreativas, além daquelas denominadas de guerra, e ademais, que todas estas embarcações, sem exceção, necessitarão de uma repintura de manutenção a intervalos variando de 2 a 5 anos.

Para atender este imenso segmento industrial – atualmente cerceado pela proibição de uso do TBT e pela escassez de opções alternativas inovadoras com características de amplo espectro de atividade, possível industrialização, baixo custo e conformidade às leis ambientais – as indústrias de tintas marítimas tiveram, forçosamente, que retornar a ancestral utilização de tintas tendo óxidos de cobre (~ 10 U$/kg) como biocida principal, as quais, porém, têm sido modernamente aditivadas com compostos orgânicos ou organometálicos de cobre, zinco ou manganês (ver Apêndice A) - também conhecidos por biocidas aditivos, biocidas coadjuvantes ou *Boosters* - muito dos quais também, além de caros, altamente tóxicos (KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004; READMAN, 2006; ONDUKA *et al*., 2010; THOMAS e BROOKS, 2010; BANERJEE *et al*., 2011; CASTRO *et al*., 2011).

---

[3] *Gross tonnage* (GT). Unidade de medida relacionada ao volume interno estrutural (*Vi*) do navio. GT = *Vi*. (0,2+0,02 log *Vi*).

[4] Disponível em:<http://www.sajn.or.jp/e/statistics/Shipbuilding_Statistics_Sep2011e.pdf> Acesso em: 18set. 2011.

Motivado por esta necessidade e perspectiva de mercado, o presente trabalho traz como proposição inovadora utilizar como agente biocida anti-incrustante uma subclasse específica de glicerofosfolipídios, análogos a substância denominada Fator Ativador de Plaquetas (PAF)[5], sintetizado a partir de matéria-prima de baixo custo, a lecitina de soja comercial (~ 1 U$/kg), tendo por fundamento comparativo ações agonistas que o PAF promove em células animais e por base de inferência o desencadeamento de reações deletérias ou de disfunções nas células dos organismos incrustantes quando em contato com esta substância (MAKIDE *et al.*, 2009; YOST *et al.*, 2010).

Esta proposição visa à aplicação destes glicerofosfolipídios pelo setor técnico de revestimentos e tintas subaquáticas, em escala industrial, na proteção contra os efeitos danosos da bioincrustação causados em estruturas submersas e flutuantes, como por exemplo, cascos de embarcações, bóias, plataformas de petróleo e dutos. Podendo tal produto ser adicionado ao material de revestimento por dispersão direta, por formação de ligações químicas, incorporadas por microencapsulação ou por combinação destes meios.

Para sustentação da proposta, se definiu como principais objetivos efetuar a caracterização química qualitativa dos glicerofosfolipídios sintéticos, produzidos a partir de lecitinas de soja, comparativamente àqueles naturais, extraídos de esponjas marinhas, e avaliar suas performances anti-incrustantes ao usá-los como agente biocida. Para isto, os glicerofosfolipídios foram primeiramente avaliados: *i*) usando espectrometria de massas sequencial, quanto às características químicas estruturais e *ii*) usando ensaios laboratoriais, quanto a sua eficácia anti-incrustante contra o assentamento de micro-organismos marinhos (bactérias e microalgas) precursores e presentes na formação do biofilme, etapa fundamental ao processo de bioincrustação marinha. Adicionalmente, usando testes de campo, os produtos

[5] Platelet Activating Factor (PAF)

obtidos por síntese laboratorial foram avaliados quanto às suas ações anti-incrustantes contra macro-organismos marinhos formadores de bioincrustações consolidadas. Nessas avaliações, os produtos analisados foram incorporados em matrizes de tinta líquida, sendo utilizadas para recobrir placas metálicas, as quais foram subseqüentemente mantidas submersas na baía da Guanabara – Rio de Janeiro - Brasil. As placas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, variando de dias a meses, sendo então avaliadas em relação às espécies de macro-organismos marinhos incrustados e percentuais de cobertura.

Na seqüência, em Revisão Literária, são apresentadas as revisões sobre bioincrustação marinha, seu desenvolvimento, sua prevenção e interações químicas interfaciais de micro-organismos que a iniciam; e ainda, sobre definições, classificação e análise química de lipídios, e sobre síntese e caracterização química de glicerofosfolipídios.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bioincrustação marinha e sua prevenção

Notório e remoto é o fato de a bioincrustação marinha ocasionar muitos problemas logísticos e prejuízos econômicos, havendo registros, sobre a sua prevenção, datados de vários séculos a.C. (WHOI, 1952). Problemas devido à sua presença são abrangentes, indo de um simples entupimento de canalizações, passando pelo comprometimento estrutural de plataformas, pilares e tubulações, chegando à ação prejudicial da performance de embarcações e equipamentos submersos (YEBRA, 2004; EGUIA e TRUEBA, 2007; MARECHAL e HELLIO, 2009; DAFFORN *et al*., 2011).

Do ponto de vista militar, o crescimento das incrustações nos cascos das embarcações é tido como um sério problema, pois diminuem a velocidade final da embarcação e sua manobrabilidade, obstruem as janelas de resfriamento dos motores, aumentam o gasto de combustível e obrigam a docagens ou imobilizações mais freqüentes, contribuindo para falha de qualquer ação militar (CAO *et al.*, 2010; SCHULTZ *et al.*, 2011).

A bioincrustação marinha é, na verdade, o resultado do processo natural de colonização e crescimento de micro e macro-organismos marinhos 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 subseqüente adesão de micro-organismos como bactérias, cianobactérias, diatomáceas e protozoários, caracterizando-se este estágio pela formação do biofilme, sendo este biofilme o agente facilitador do assentamento e o desenvolvimento de macro-organismos, tais como moluscos, briozoários, poliquetas, balanídeos, crustáceos e algas (BHADURY e

WRIGHT, 2004; FUSETANI, 2004; YEBRA *et al.*, 2004; CALLOW e CALLOW, 2002; 2006; MARECHAL e HELLIO, 2009).

Tecnicamente a bioincrustação se desenvolve em um processo com quatro estágios, não rigorosamente seqüenciais, porém, interdependentes. O primeiro estágio se inicia logo nos primeiros minutos de contato da superfície com a água, quando ocorre o acúmulo de moléculas orgânicas, tais como polissacarídeos e proteínas. Isto permite, nas próximas horas (24-96 h), o desenvolvimento do início da colonização por bactérias e diatomáceas[6], as quais juntamente com cianobactérias[7], protozoários[8] e rotíferas[9] (Figura 2), secretam diferentes polissacarídeos, chamados de exopolissacarídeos, os quais em uma mistura complexa com ácidos nucléicos, proteínas, minerais, nutrientes, resíduos celulares e os próprios micro-organismos, formam o segundo estágio que se denomina por biofilme (ARCE *et al.*, 2004; BHASKAR e BHOSLE, 2005; CALLOW e CALLOW, 2006).

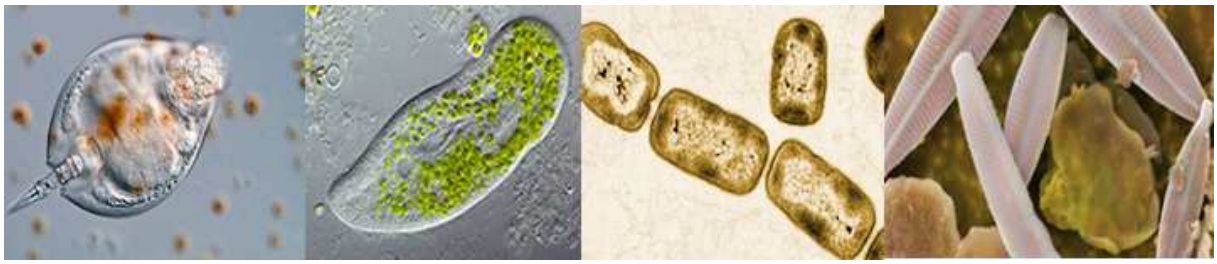


FIGURA 2. Imagens de micro-organismos encontrados em biofilmes marinhos. Rotífera; Protozoário; Bactérias; Diatomáceas. (esq. → dir.) sem escala. (Adaptado da Fonte: www.sciencephoto.com).

[6] Tipo de alga microscópica e unicelular cuja parede celular é impregnada com sílica, apresentando diversas formas e padrões geométricos.

[7] Bactérias fotossintéticas que contêm clorofila-*a*. Anteriormente conhecida como alga verde-azulada.

[8] Micro-organismos eucariontes unicelulares, não apresentando parede celular; por exemplo, amebas, flagelados e ciliados.

[9] Filo abrangendo micro-organismos multicelulares, constituintes do plâncton, que possuem órgãos ciliados para alimentação e locomoção.

A presença do biofilme permite que os micro-organismos tenham maior proteção contra predadores, toxinas e mudanças ambientais, além de permitir uma boa disponibilidade de nutrientes, apreendidos do meio ambiente marinho, que ficam dispersos no próprio biofilme. Esta denominação, biofilme, não deve ser entendida no sentido estrito da palavra, pois na verdade ele não se apresenta como uma camada contínua ou homogênea, ou como uma película (filme), estando a sua estrutura, heterogênea no espaço e no tempo, mudando devido a processos externos e internos (COSTERTON, *et al.* 1994; DONLAN, 2002). Na verdade, a sua estrutura apresenta, mais freqüentemente, comunidades de micro-organismos agrumados denominados *clusters*, possuindo canalículos que permitem a passagem da água trazendo nutrientes, oxigênio e conseqüentemente outros possíveis compostos, tais como biocidas (DAVEY e O'TOOLE, 2000; SUTHERLAND, 2001; DONLAN, 2002; DUNNE, 2002).

A formação de um *cluster* se inicia com o contato e adesão de micro-organismos a uma superfície condicionada, formando uma pequena colônia que cresce devido à multiplicação destes micro-organismos e ao acúmulo de exopolissacarídeos exsudados, podendo adquirir formatos variando de montículos a estruturas parecidas com cogumelos, alcançando um estado de maturação onde se inicia um ativo processo de dispersão que permite a formação de novas colônias (LOOSDRECHT, *et al.* 1990; STOODLEY, *et al.* 2004).

Os exopolissacarídeos são os principais compostos do biofilme desidratado, contabilizando entre 50% e 90% do carbono orgânico total nele presente, porém quando totalmente hidratado, a água pode chegar a 97% de seu peso. Podem variar na suas propriedades físicas e químicas, mas geralmente são constituídos por polissacarídeos heteropoliméricos com massa molecular da ordem de kiloDaltons, os quais, devido ao tipo de monossacarídeos base de sua formação *p. ex.* ácidos glucurônico, galacturônico, manurônico, etc., são geralmente aniônicos, casualmente neutros e raramente positivamente carregados,

possuindo regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. Apesar de formarem sozinhos vários tipos de estruturas dentro do biofilme, estes polissacarídeos podem interagir com outros tipos de moléculas, tais como proteínas e lipídios, formando o que se conhece por Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS) (ALLISON, 1998; SUTHERLAND, 2001; DeBEER e KÜHL, 2001; DONLAN, 2002; PARSEK e FUQUA, 2004; BHASKAR e BHOSLE, 2005; DeBEER e STOODLEY, 2006).

O terceiro estágio é a colonização secundária feita por esporos de macroalgas, larvas de cracas, fungos, outras bactérias e protozoários, que transformam o biofilme, no decorrer da primeira semana, em uma composição mais complexa.

O quarto estágio envolve o assentamento e, principalmente, o crescimento de organismos marinhos tais como moluscos, briozoários, antozoários, poliquetas, tunicados e crustáceos (BORENSTEIN, 1994; FLEMMING *et al*., 1996).

O tipo, a extensão e a severidade da bioincrustação dependem de fatores como o tipo de substrato, salinidade da água, luz ambiente, temperatura, poluição e nutrientes disponíveis. Deste modo, a bioincrustação tende a ser um fenômeno sazonal relacionado à posição geográfica. Em zonas polares, com temperaturas abaixo dos 5ºC, a ação da bioincrustação é baixa; em zonas temperadas (5 a 20ºC), o risco torna-se médio; já em zonas tropicais e subtropicais, onde as temperaturas são maiores que 20ºC, o risco associado com bioincrustação é alto, principalmente devido à condição apropriada para multiplicação dos organismos incrustantes, para os quais se estima existir mais de 4000 espécies com potencial para colonizar superfícies submersas (PROPELLER, 2004).

Deste modo, entende-se que navios que trafegam ou permaneçam em áreas tropical ou subtropical estão sujeitos aos mais severos ataques por bioincrustação, particularmente em

águas mais rasas ou costeiras, onde há uma maior disponibilidade de luz, calor e nutrientes, *p. ex.* baía da Guanabara-RJ.

Fruto de uma sequência milenar de tentativas e progressivas transformações, a prevenção a bioincrustação marinha, contemporaneamente, passou a ser controlada de modo eficaz, principalmente, pelo uso de biocidas aplicados em tintas de revestimento, tendo sido o TBT o mais eficiente biocida já utilizado; contudo, devido ao seu banimento definitivo a partir de setembro de 2008, as indústrias de tintas marítimas retornaram, especificamente, ao uso de óxidos de cobre e outros compostos metálicos como biocidas anti-incrustantes, os quais, no entanto, já começam a ser reavaliados quanto ao seu uso por diversos países, tendo como primeira impetração a busca da diminuição da taxa de liberação de cobre ao meio ambiente (WHOI, 1952; YEBRA *et al.*, 2004; DAFFORN *et al.*, 2011).

Uma outra abordagem anti-incrustante muito valorizada, porém ainda com pouco sucesso industrial, tem sido o uso de produtos com "apelo natural", os quais têm sido intensamente prospectados no meio ambiente marinho e avaliados quanto sua ação biocida anti-incrustante (BLUNT *et al.*, 2009; RAVEENDRAN e MOL 2009; FUSETANI, 2011, STOWE *et al.*, 2011). Esta abordagem, embasamento deste trabalho, tem como principal característica a isenção de compostos metálicos na composição anti-incrustante e a mitigação de efeitos colaterais danosos ao meio ambiente.

2.2 Micro-organismos. Estruturas de proteção

Micro-organismos é a designação generalizante de organismos que fisicamente não são visualizáveis a olho nu. Dentro desta designação reúnem-se organismos uni e multicelulares dos seis diferentes reinos - Animalia; Bacteria; Chromista; Fungi; Plantae; e Protozoa - tendo

como exemplos: amebas, bactérias, cianobactérias, ciliados, flagelados, fungos e microalgas (ATLAS, 1996; CAVALIER-SMITH, 1998, 2004).

A unidade organizacional fundamental de todos os seres vivos, incluindo os micro-organismos, é a célula, sendo ela a base para o seu metabolismo e reprodução. Independentemente de sua organização, procariótica[10] ou eucariótica[11], a célula de qualquer ser vivo possui uma camada protetora - a membrana citoplasmática -, que a autocontém, separando-a de seu ambiente externo e regulando a passagem de materiais para dentro e fora de suas fronteiras. Em alguns micro-organismos, também há uma proteção adicional proporcionada pelo invólucro celular - camada mais externa a membrana citoplasmática - que auxilia na proteção física e pode ser formado por uma ou mais estruturas e camadas (ATLAS, 1996).

2.2.1 Invólucro celular

O invólucro celular, em geral formado pela parede celular e pela membrana externa, pode ser considerado a camada fronteiriça de alguns tipos de micro-organismos. Ele recobre a membrana citoplasmática e atua como uma barreira primária aos perigos externos, tais como a ação de enzimas, choques osmóticos, danos físicos, mudanças de pH e substâncias tóxicas, *p. ex.* biocidas (ATLAS, 1996; NIKAIDO, 2003).

Entende-se aqui que a sua composição é a responsável pela diminuição, retardo ou bloqueio do processo de absorção, e deste modo, conhecer suas características e modos de interação com os compostos biocidas é de fundamental importância.

[10] Células sem núcleo e com ausência de organização interna celular compartimentada (organelas).

[11] Células que apresentam grande diversidade de organelas e um núcleo contendo o seu DNA.

Micro-organismos precursores do biofilme, tais como bactérias, cianobactérias e diatomáceas, possuem, de um modo geral, e conforme apresentado no QUADRO 1, diferentes composições para seus invólucros celulares, sendo os peptidoglicanos, as proteínas e os polissacarídeos seus principais constituintes (BEVERIDGE e GRAHAM, 1991; ATLAS, 1996; BEVERIDGE, 1999; HOICZYK e HANSEL, 2000; RUSSELL, 2003; EPAND e EPAND, 2009; SILHAVY *et al*., 2010).

QUADRO 1. Composições dos invólucros celulares de bactérias, diatomáceas e cianobactérias

Tipo de micro-organismo	Tipo de invólucro	Composição (espessura)	Exemplos
Bactéria Gram-positiva	Parede celular	Peptidoglicanos (20 a 80 nm), Polissacarídeos e Proteínas.	Estafilococos
Bactéria Gram-negativa	Parede celular com Membrana externa .	Peptidoglicanos (~2 nm), Lipoproteínas e Proteínas. Lipo-polissacarídeos (2 a 8nm), Fosfolipídios, Proteínas e Lipoproteínas.	*Pseudomonas* *Lepthotrix*
Microalga (diatomáceas)	Parede celular	Sílica, polissacarídeos e proteínas	*Navicula* *Nitzschia*
Cianobactéria	Parede celular	Peptidoglicanos (10 a 700 nm) e polissacarídeos	*Oscillatoria*

(Adaptado da Fonte: ATLAS, 1996).

Os peptidoglicanos (Figura 3), também conhecidos como mureína ou mucopeptídeos, são encontrados somente em bactérias, sendo constituídos por polissacarídeos (glicanos), baseados em unidades alternadas de N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurônico,

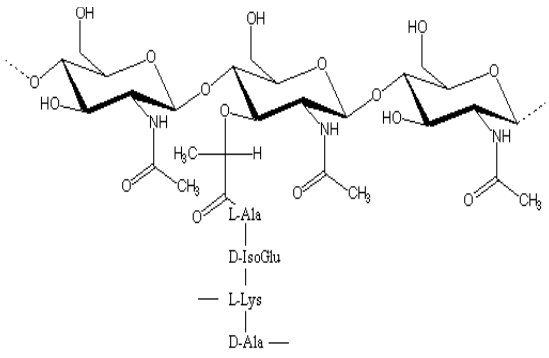


FIGURA 3. Fragmento de um peptidoglicano.

interligados por peptídeos (aminoácidos conectados por ligações peptídicas), em geral com quatro ou cinco aminoácidos (ATLAS, 1996).

Comparativamente, as membranas externas são mais porosas do que a própria parede celular, sendo tal característica devido a grande quantidade de proteínas transmembranas e lipoproteínas existentes em sua estrutura (Figura 4), as quais perfazem cerca de 50% da sua massa total. Além de membrana externa e/ou parede celular, algumas bactérias, devido a fatores externos extremos, *p. ex.* temperatura, pressão, nutrientes, salinidade e umidade, podem ainda apresentar outras superfícies, tais como cápsulas, mucos, camada tipo "S" ou jaquetas, sendo tais camadas geralmente constituídas de polipeptídios, polissacarídeos e glicoproteínas (ATLAS, 1996).

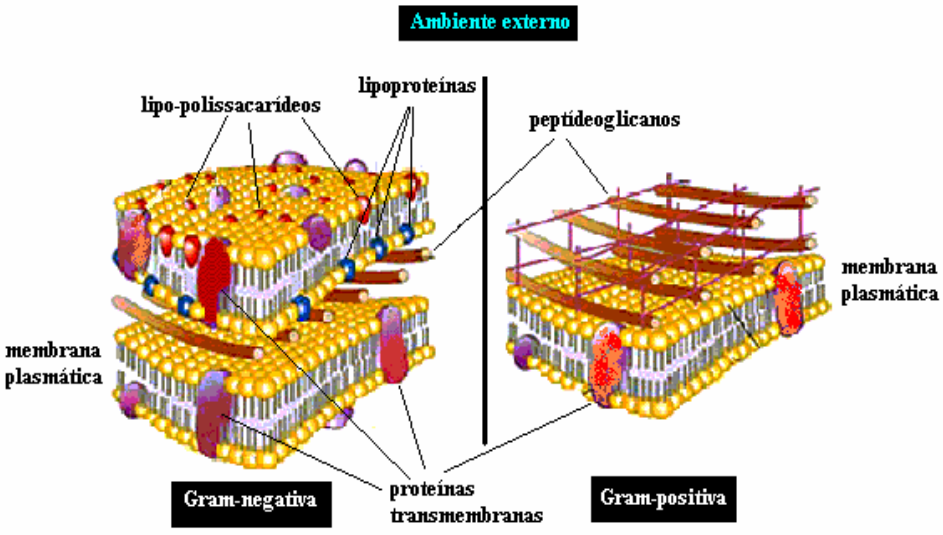


FIGURA 4. Ilustração dos invólucros celulares de bactérias gram-negativas (didermes) e gram-positivas (monodermes). Adaptado da Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21665/figure/A209>. Acesso em : dez.2005.

2.2.2 Membrana plasmática

A membrana plasmática é uma estrutura existente em todos os tipos de células, sendo sua integridade de vital importância para a existência do organismo. Estas membranas são estruturas fluidas e organizadas, compostas por uma bicamada de fosfolipídios (Figura 5), que além de ajudar a proteger a célula do ambiente externo em que se encontra, promovem uma barreira impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis, tendo em conjunção variadas proteínas que atuam como sensores e receptores, permitindo a célula mudar seu comportamento em resposta aos sinais externos, e como barreira seletiva de moléculas, nutrientes, íons e dejetos. Sem o seu correto funcionamento, a célula não pode manter a sua integridade e coordenar seu sistema químico (ALBERTS *et al.*, 2002; HAUCKE e Di PAOLO, 2007; LODISH *et al.*, 2007).

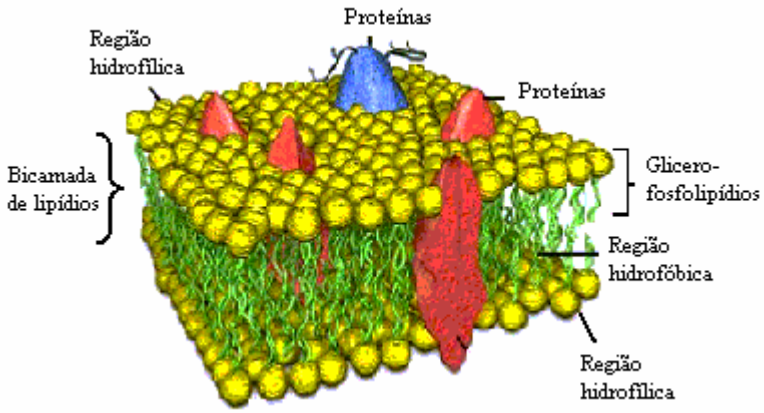


FIGURA 5. Ilustração do segmento de uma Membrana Plasmática. Adaptado da Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21473/figure/A200/>. Acesso em: dez2005.

Deste modo, podemos inferir que um composto difundido no biofilme, que possa interagir com as membranas celulares ocasionando o rompimento ou mau funcionamento

destas estruturas, faça com que os organismos que iniciam e formam o biofilme, tais como bactérias, microalgas, protozoários, rotíferas, ovos e larvas, sejam repelidos ou mortos, implicando na conseqüente inibição do início do processo de incrustação.

2.2.2.1 Interações químicas interfaciais em membranas celulares

Um composto interagindo na interface de membranas celulares pode, teoricamente: *i*) romper a adesão da bicamada de fosfolipídios, permitindo que nela se forme uma passagem, ocasionando um distúrbio da concentração intracelular (efeito de rompimento); *ii*) efetuar a passagem pela membrana sem destruí-la (difusão), porém alcançando e comprometendo componentes internos; ou, *iii*) atuar diretamente nas proteínas transmembranas ocasionando estresse ou reação anormal, ou interferir em sua sinalização celular (COOPERMAN, 2004; EXTON, 2004; SCHULTZ, 2004; SARKAR *et al.*, 2009; COSKUN e SIMONS, 2011).

O efeito de rompimento é geralmente executado por meio de uma ação surfactante, onde o composto, agindo semelhante a um detergente, pode, a partir de uma determinada concentração, invadir a barreira da bicamada de fosfolipídios e, apesar de não efetuar a sua completa dissolução, ocasionar seu rompimento e a conseqüente destruição da célula (ALMGREN, 2000; MAIRE *et al*., 2000; GARAVITO e MILLER, 2001; CHAMBERLAIN, 2004; SEDDON *et al.*, 2004; BROWN, 2006; HEERKLOTZ, 2008).

O efeito de passagem pela membrana plasmática pode ocorrer por difusão simples, por difusão facilitada e transporte ativo. Na difusão simples ou facilitada, a passagem pode se dar pela bicamada de lipídios (Figura 6) ou através de proteínas transmembranas, não requerendo gasto de energia pela célula, ocorrendo devido ao gradiente de concentração, onde o composto se difunde para um potencial de menor concentração. No transporte ativo, a passagem só pode

ser realizada através de proteínas transmembranas, requerendo um gasto de energia pela célula e em geral, moléculas pequenas, mais hidrofóbicas e não-polares são mais rapidamente difundidas através da bicamada de lipídios, de modo que moléculas como CO_2, N_2 e O_2 são prontamente dissolvidas e difundidas (ALBERTS *et al.*, 2002; SCHULTZ, 2004; LOODISH *et al.*, 2007).

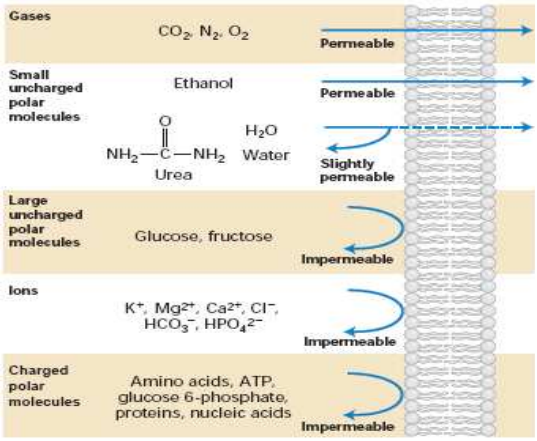


FIGURA 6. Ilustração da permeabilidade relativa de diversas substancias através da bicamada de fosfolipídio. (Fonte: LOODISH *et al*., 2007).

De um modo geral, interações entre um composto (biocida) e o micro-organismo são reunidas em cinco diferentes padrões (QUADRO 2) (DENIER e MAILLARD, 2002; RUSSELL, 2003).

A sinalização celular envolve intricados mecanismos químicos que governam e coordenam as atividades e funções de cada diferente célula. A habilidade que a célula possui em perceber (recepção) e corretamente responder (transdução) - *quorum sensing*[12] - aos sinais do seu ambiente é essencial para a comunicação entre células e para existência de qualquer

[12] Mecanismo de comunicação célula-célula, pelo qual micro-organismos secretam moléculas sinalizadoras que induzem atividades metabólicas e comportamentais de outros indivíduos de sua espécie na sua comunidade microbiana.

tipo de organismo (DUNNY e LEONARD, 1997; WATERS e BASSLER, 2005; WEINSTEIN, 2008).

QUADRO 2. Padrões de interação (composto / organismo)

Padrão	Modo de interação
Tipo H *Alta afinidade*	O composto é rápida e completamente adsorvido na célula.
Tipo C *Constante de partição*	O composto penetra mais rapidamente na célula do que o solvente que o carreia.
Tipo L *Normal ou Langmuir*	O preenchimento dos sítios de adsorção da célula se faz consecutivamente, tornando-se cada vez mais difícil o composto encontrar sítios vazios para ser adsorvido.
Tipo S	O composto encontra forte competição das moléculas do solvente ou de outras moléculas adsorvidas pela célula. A adsorção inicial é fraca e aumenta gradativamente.
Tipo Z	Quando há uma modificação do padrão de adsorção seguido por um aumento da entrada de soluto, que é interpretado como uma quebra na estrutura do substrato adsorvente com a geração de novos sítios adsorventes.

(Adaptado das Fontes: DENIER e MAILLARD, 2002; RUSSEL, 2003).

Resumidamente, tanto em organismos procariontes como em eucariontes, a sinalização celular pode ocorrer por dois modos de interação: *i*) contato físico direto entre células (comunicação justácrina), onde proteínas ligadas à membrana plasmática de uma célula interagem diretamente com receptores em uma célula adjacente; ou, *ii*) remotamente (comunicação endócrina), onde uma substância química específica é quem faz a interação com os receptores celulares (ALBERTS *et al.*, 2002; WELLS, 2003; KAISER, 2006; LODISH *et al.*, 2007).

A ativação celular pode ser feita exteriormente à célula, onde proteínas transmembranas estão envolvidas diretamente, ou pode ser feito no interior da célula, quando as moléculas do composto devem entrar na célula para efetivar a ativação, conforme comentado anteriormente.

As proteínas transmembranas, também chamadas proteínas integrais politópicas, são proteínas que transpassam, pelo menos uma vez, a bicamada de fosfolipídios formadora da membrana e têm, além da função de controlar o transporte de substâncias, a função de funcionar como receptores de moléculas específicas (hormônios, neurotransmissores, fatores, etc), possibilitando a sua passagem ou deflagrando algum processo de sinalização e comunicação celular. Elas existem em três classes básicas[13]: (*i*) alfa politópica e (*ii*) alfa

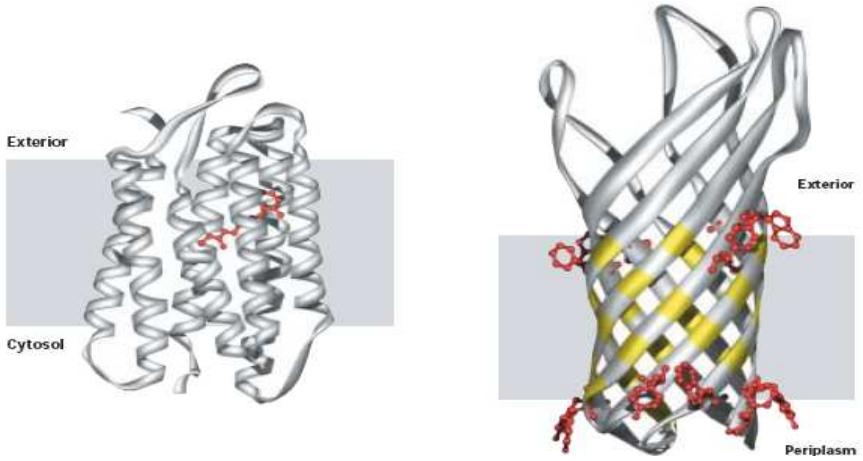


Figura 7. Modelos de estruturas de proteínas transmembranas: (esquerda) alfa helicoidal politópica 7 passagens (bacteriorhodopsina) que funciona como fotorreceptor em algumas bactérias; (direita) subunidade de uma Porin encontrada na membrana externa da bactéria *E. coli.*
(Adaptado da Fonte: LODISH *et al.*, 2007)

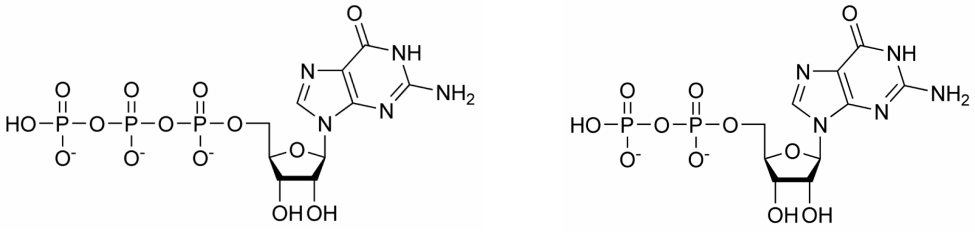
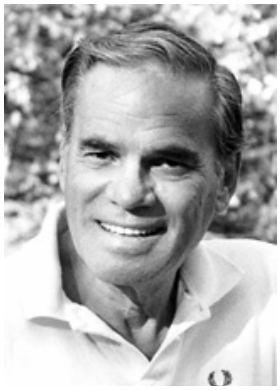


Figura 8. Guanosina-5-trifosfato (esq.) e Guanosina-5-difosfato (dir.). Guanosina é um nucleosídeo que compreende uma guanina ligada a um anel de ribose (ribofuranose) via uma ligação N-glicosídica.

[13] Orientations of proteins in membranes (OPM database). Disponível em: opm.phar.umich.edu/types.php. Acessado em: 03dez. 2011.

bitópica, formas helicoidais, presentes em células de organismos procariontes e eucariontes, tendo como exemplos as G-proteínas sete-transmembranas (7TM) também chamadas (G-PCR)[14] (Figura 7), e a (*iii*) beta-barril (canal de íons) encontradas nas membranas externas de procariontes, em mitocôndrias de eucariontes e cloroplastos, tendo como exemplo as Porins (Figura 7) (LODISH *et al.*, 2007).

As G-Proteínas (G-PRC) pertencem ao grupo de enzimas que hidrolisam a guanosina trifosfato (GTP) à guanosina difosfato (GDP) (Figura 8), chamadas de GTPases, tendo sido descobertas pelos grupos dos doutores Martin Rodbell[15] (☼1925;†1998) e Alfred Goodman Gilman[16] (☼1941) em trabalhos sobre estimulação das células por adrenalina (STRYER e BOURNE, 1986



Martin Rodbell

Rodbell e Gilman descobriram que as G-proteínas funcionavam como intermediários nas sinalizações transmembranas, pois verificaram que a adrenalina quando se ligava a um receptor, este não estimulava as enzimas diretamente; em vez disso, o receptor estimulava uma G-proteína, que então estimulava uma enzima específica (GILMAN, 1987; RODBELL, 1994). Por esta descoberta, receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia em 1994 .

Alfred G. Gilman

A resposta de uma célula a um sinal específico externo é ditada pelos receptores que ela possui, pela transdução do sinal que é ativado e pelo processo intracelular afetado, sendo que cada receptor geralmente liga-se a uma única molécula, ou a um grupo específico de moléculas, podendo ser agrupados em receptores que abrem canais iônicos; que apresentam

[14] G-protein coupled receptors (G-PCR)
[15] Retrato disponível em: www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1994/rodbell.html
[16] Retrato disponível em: www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1994/gilman.html

atividade enzimática; citoplasmáticos; e que se acoplam a proteínas, por exemplo, G-PCR (ALBERTS *et al*., 2002; LODISH *et al*., 2007).

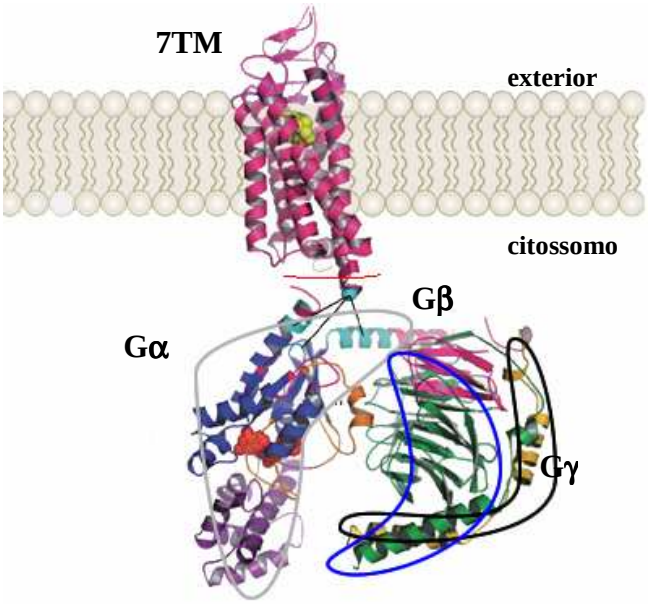


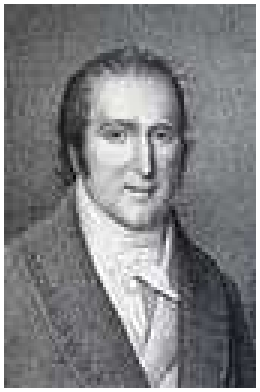
Figura 9. Ilustração do receptor tipo G-PCR. Os contornos curvilíneos destacam os polipeptídios Gα , Gβ e Gγ, ligados a proteína sete transmembrana (7TM). (Adaptado da Fonte: OLDMAM e HAMM, 2008).

Os receptores tipo G-PCR (Figura 9) fazem parte de uma superfamília de receptores formada por cinco grandes famílias (rodopsinas; secretinas; de adesão; glutamatos; e de aroma/sabor), que têm suas estruturas consistindo de três diferentes polipeptídios - unidades tipo α (39-52 kDa); tipo β (35-36 kDa); e tipo γ (8 kDa) - que se acoplam a diferentes tipos de proteínas 7TM (domínio), podendo ser ativados por diferentes ligantes, tais como: aminas, íons, nucleosídeos, lipídios, peptídeos, proteínas, etc., transmitindo sinais químicos para uma ampla gama de diferentes tipos de células (RODBELL, 1997; SPRANG, 2003, 2011; LEFKOWITZ, 2004; OLDHAM e HAMM, 2008; MILLAR e NEWTON, 2010; BROCK, 2011).

2.3 Lipídios

2.3.1 Classificação dos lipídios

Lipídio é a denominação para uma classe de biomoléculas que formam um grupo heterogêneo de substâncias reconhecidamente importantes na regulação e controle das funções celulares de todos os seres vivos. São essenciais na manutenção da integridade e organização das células, atuam também nos processos de sinalização celular e trânsito de moléculas, além de ser seus maiores reservatórios de energia (GUNSTONE *et al*., 2007; O'KEEFE, 2008). Eles têm sido classificados quimicamente desde o século XVIII e são classicamente relacionados a substâncias insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, aos quais citam-se como exemplos as gorduras, óleos, graxas, glicerolipídios, esfingolipídios, terpenos e esteróis, etc., o que tem gerado, ao longo dos anos, controvérsias e diferentes interpretações (BERG *et al.*, 2002; IVANOVA *et al.*, 2004; AKHO e MIN, 2008).

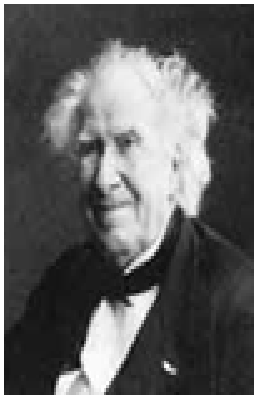


A.F. de Fourcroy

Uma das primeiras classificações sobre lipídios foi apresentada, na segunda metade do século XVIII, pelo médico e químico francês Antoine-François de Fourcroy[17] (☼1755; †1809), o qual publicou um tratado, em quatro volumes, intitulado "*Elemens d'historie naturelle et de chimie*", onde discorre, entre outros temas, sobre óleos vegetais, classificando-os em óleos puros, óleos secativos e óleos sólidos, e sobre as propriedades químicas de gorduras animais (FOURCROY, 1782).

[17] Retrato disponível em: http://www.sciencephoto.com/media/224977/enlarge. Acesso em: 07 out. 2011.

Michel Eugène Chevreul[18] (☼1786; †1889) foi o pesquisador que efetivamente realizou investigações sobre a estrutura e propriedades dos lipídios e propôs a primeira classificação científica, com base na acidez, volatilidade e saponificação, em seu trabalho publicado no ano de 1823, em Paris – França, intitulado "*Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale*" (CHEVREUL, 1823).



M.E. Chevreul

W.R. Bloor

Em 1925, Walter Ray Bloor[19] (☼1877;†1966) propõe uma classificação que impõe aos lipídios as seguintes características: *i*) insolubilidade em água e solubilidade em solventes como éter, clorofórmio e benzeno; *ii*) relacionamento com os ácidos graxos na forma de éster; e *iii*) utilização por seres vivos. Sendo ainda divididos em lipídios simples (ácidos graxos, gorduras e graxas), lipídios complexos (glicolipídios, fosfolipídios, aminolipídios e sulfolipídios) e lipídios derivados, relacionando substâncias obtidas dos dois últimos grupos por hidrólise (BLOOR, 1925).

Em 1963, a comissão de editores de jornais de bioquímica da União Internacional de Bioquímica (IUB), juntamente com a comissão de nomenclatura de temas biológicos da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) estabeleceram um comitê internacional para tratar sobre a nomenclatura específica de lipídios. As discussões foram conduzidas durante os anos seguintes, resultando em encontros nos anos de 1965 e 1966, quando então foi proposto, já em 1967, um documento de divulgação sobre regras tentativas

[18] Retrato disponível em: http://herve.delboy.perso.sfr.fr/liber_artephius.html. Acesso em: 07 out. 2011.
[19] Retrato disponível em: http://hdl.handle.net/1802/1602. Acesso em: 07 out. 2011.

sobre a nomenclatura de lipídios contendo glicerol, esfingolipídios, ácidos neuramínicos[20] e outros compostos (IUPAC, 1967).

Em 1978, o comitê IUPAC-IUB propôs uma nova série de recomendações, baseadas em trabalhos realizados pelos grupos de lipídios e de glicolipídios, tendo como principal característica a utilização do sistema da numeração baseada na estereoespecificidade (sn) com base nas projeções de Fisher (IUPAC, 1978).

Christie (1989, p.5) tem proposto a seguinte definição para lipídios: “Lipídios são ácidos graxos, seus derivados e substâncias relacionadas biossintética ou funcionalmente a estes compostos.” (tradução nossa), classificando-os em lipídios simples - os quais rendem por hidrólise não mais do que dois tipos de produtos, por exemplo, triglicerídeos e colesterol - e em lipídios complexos, aqueles que rendem mais de três produtos, tais como fosfolipídios e glicolipídios.

Em 2005, um consórcio internacional de instituições de pesquisa, liderado pela Universidade da Califórnia em San Diego, apresentou um esquema que organiza os lipídios com base em suas estruturas químicas, contemplando desde lipídios naturalmente encontrados em organismos vivos até os sintetizados em laboratórios, distribuindo-os em oito classes distintas: compostos graxos acilados; glicerolipídios; glicerofosfolipídios; esfingolipídios; esteróis; prenóis; sacarolipídios, e policetídeos (FAHY *et al*., 2005). Esta abordagem, apesar de ainda não consolidada, pretende facilitar a comunicação internacional quanto à aplicação de classificação, nomenclatura e representação química dos lipídios dentro da nova comunidade de pesquisa, que vem rapidamente se desenvolvendo, chamada de *Lipidomics*, que tem por aplicação a caracterização das espécies moleculares de lipídios constituintes de

[20] Família de monossacarídeos carboxilados com nove átomos de carbono que aparece na porção terminal de glicoconjugados. Estas moléculas estão envolvidas em vários processos biológicos, tais como, processos de reconhecimento celular e adesão plaquetária.

matrizes biológicas (FAHY *et al*., 2005, 2007, 2009, 2011). Esta nova classificação emprega alguns padrões de nomenclatura, os quais resumidamente se citam: *i*) designação do número de estereoespecificidade (sn) para descrever glicerolipídios e glicerofosfolipídios; *ii*) designações básicas para os esteróis, por exemplo, colestano, androstano e esterano; *iii*) o uso da nomenclatura IUPAC para os ácidos graxos e acil radicais, e *iv*) o uso das designações E/Z e R/S, para definir, respectivamente, a geometria em duplas ligações, ao invés de trans/cis, e a estereoquímica, ao invés de α/ β.

2.3.2 Principais classes de lipídios:

a) Compostos graxos acilados. Classe formada por ácidos graxos e compostos conjugados que abrange desde os mais simples ácidos monocarboxílicos até aqueles mais complexos apresentando diferentes grupos funcionais substituintes, heteroátomos, duplas ligações e cadeias cíclicas. Entre as principais subclasses encontram-se ácidos, álcool, éster, aldeídos, amidas, nitrilas e éteres graxos, eicosanóides, octadecanóides e docosanóides (FAHY *et al.*, 2005; WENK, 2005).

Os principais ácidos graxos normalmente encontrados em compostos naturais são compostos alifáticos monocarboxilados possuindo cadeias variando de 4 a 22 átomos de carbono e somente cerca de 20 tipos ocorrem naturalmente, sendo o palmítico, o oléico e o linoléico os mais abundantes (SCRIMGEOUR e HARWOOD, 2007; O'KEEFE, 2008). Apesar de se ter o conhecimento que em células de animais e vegetais superiores os ácidos graxos são produzidos a partir de combinações da acetil-coenzima A, implicando em moléculas contendo números pares de átomos de carbono; existem também ácidos graxos

ímpares que são encontrados principalmente em bactérias, fungos, algas e esponjas marinhas (GURR *et al.*, 2002; REZANKA e SIGLER, 2009).

b) Glicerolipídios. Esta classe é formada principalmente pelos gliceróis substituídos com acil, alquil e 1-alquenil radicais. Entre os mais simples glicerolipídios encontra-se os acilgliceróis, que são ésteres de ácidos graxos ligados a uma estrutura de glicerol, podendo ser tri, di ou mono-substituído (FAHY *et al.*, 2005).

Monoacilgliceróis são intermediários da lipólise de tri e diacilgliceróis e são encontrados em baixíssimas quantidades em extratos celulares. Diacilgliceróis são importantes intermediários na biossíntese de triacilgliceróis e de glicerofosfolipídios que têm importantes funções na sinalização e ativação de mecanismos celulares específicos. Os triacilgliceróis são os mais importantes deste grupo e são encontrados profusamente em plantas e animais. Têm um amplo emprego industrial, seu uso vai desde a produção de alimentos até combustíveis automotivos conhecidos como biodiesel (MUSKETT e ANDERSON, 2004; KHALIL e LEITE, 2005; GUNSTONE et al., 2007). São os mais importantes reservatórios de energia para os seres vivos, sendo, em ambientes marinhos, estocados por organismos presentes na coluna d'água e disponibilizados aos pequenos pelágicos ou então transferidos, por gravidade, aos organismos bentônicos (PARRISH *et al.*, 2000).

c) Glicerofosfolipídios. Estes lipídios também possuem como estrutura principal um glicerol, a qual são ligados acil, alquil e 1-alquenil radicais, tendo como principal diferencial a presença de um grupo radical fosfato, sendo nomeados como derivados do ácido fosfatídico (IUPAC, 1978). Esta classe está bioquimicamente relacionada aos componentes essenciais da

membrana citoplasmática das células de organismos procariontes e eucariontes, tendo papéis importantes em processos biológicos, tais como apoptose e sinalização celular (HENNEBERRY *et al.*, 2002; SUZUMURA, 2005; VANCE, 2008).

Entre as principais subclasses (Figura 10), encontram-se: *i)* glicerofosfocolinas; *ii)* glicerofosfoetanolaminas; *iii)* glicerofosfoserinas; *iv)* glicerofosfoglicerois; *v)* glicerofosfatos, *e vi)* glicerofosfoinositois (FAHY *et al.*, 2005).

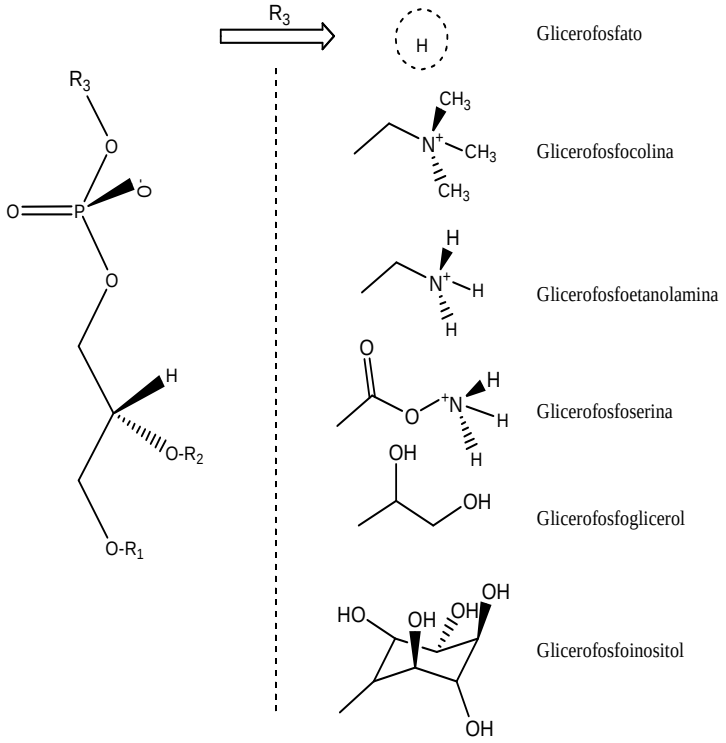


FIGURA 10. Subclasses de Glicerofosfolipídios. A substituição do Radical R3 pelos radicais apresentados forma a subclasse de glicerofosfolipídio correspondente, designado pela nomenclatura a direita**.**

d) Esfingolipídios. São caracterizados por possuírem como estrutura principal um grupo amino na posição sn-2 e uma hidroxila na posição sn-1. Nesta classe estão incluídos os cerebrosídeos, as ceramidas, as esfingomielinas (Figura 11), os gangliosídeos e os sulfatídeos,

sendo uma das mais diversas e mais complexas classes de lipídios, tendo importante papel na estrutura e também em diversas funções celulares (MERRILL Jr., 2008)

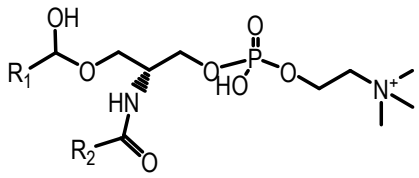


FIGURA 11. Estrutura básica de uma esfingomielina.

e) Esteróis. Esta classe de lipídio caracteriza-se por ter uma estrutura contendo quatro anéis fundidos e constituem um importante componente das membranas celulares. Podem ser encontrados, em geral, nas formas livre, acilada, alquilada, sulfatada ou ligada a glicosídeos, sendo encontrados tanto em plantas (fitoesteróis) como em animais (zoosteróis), incluindo como subclasses: o colesterol e seus derivados; esteróides; secosteróides (vitaminas D); ácidos biliares, e hopanóides (FAHY *et al.*, 2005). O colesterol é o mais abundante esterol de tecidos animais sendo encontrado como álcool, podendo este grupo ser esterificado por acido graxo (éster esteróis), estar ligado a álcool graxo (alquil éter esteróis) ou estar conjugado com ácido sulfúrico (sulfato esteróis) ou a glucídios (glucosil esteróis) (AKHO e MIN, 2008).

f) Prenóis. São sintetizados via rota do ácido mevalônico (ácido 3,5-dihidroxi-3-metil-pentanóico) a partir de moléculas precursoras com cinco átomos de carbonos (Figura 12). Os terpenos, ou isoprenóis, representam o grupo mais conhecido. São geralmente descritos como terpenos modificados, onde grupos metila são substituídos por átomos de oxigênio.

Uma classificação dos terpenos tem sido utilizada com base no número de unidade de isoprenos presentes na cadeia principal (QUADRO 3).

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

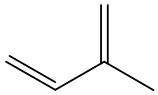


FIGURA 12. Unidade Isopreno

QUADRO 3. Nomenclatura de terpenos

Designação	unidades de isoprenos	átomos de carbono
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Sesteterpenos	5	25
Triterpenos	6	30
Carotenóides	8	40

g) Sacarolipídios. São descritos como compostos que possuem ácidos graxos ligados diretamente a uma cadeia de açúcar, formando uma estrutura similar as dos glicerolipídios, porém com a substituição do glicerol. O mais conhecido dos sacarolipídios são as glucosaminas aciladas, precursores do Lipídio-A presentes em bactérias gram-negativas.

h) Policetídeos. Compreendem um grande número de metabolitos secundários e produtos naturais de animais, plantas, bactérias, fungos, e organismos marinhos. Estes compostos possuem uma cadeia composta por uma seqüência alternada de carbonilas e metilas (-CH2-CO-) produzidos por polimerização enzimática. Muitos policetídeos são moléculas cíclicas modificadas por metilação, oxidação, hidroxilação ou outros processos. Alguns agentes antimicrobianos, antiparasitários e anticâncer são policetídeos ou seus derivados, tais como as eritromicinas e tetraciclinas (STAUNTON e WIESSMAN, 2001).

2.4 Glicerofosfolipídios PAF-análogos como compostos anti-incrustantes

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

Glicerofosfolipídios têm sido usados como elemento coadjuvante para reduzir a adesão de proteínas e de bactérias nos materiais empregados em certas áreas tecnológicas, tais como: equipamentos de processamento de alimentos, bebidas e fármacos; materiais médicos, por exemplo, próteses, lentes oftálmicas e cateteres; equipamentos filtrantes; etc., sendo suposto que tais propriedades antiaderentes estejam relacionadas às peculiaridades da natureza zwitteriônica e anfifílica de sua molécula (SARIRI e TOOSI, 2003; GOREISCH *et al.*, 2004; IWASAKI e ISHIHARA, 2005; XU *et al.*, 2008; WATANABE e ISHIHARA, 2008:).

O glicerofosfolipídio conhecido como Fator Ativador de Plaquetas (PAF) é um potente mediador biológico produzido por vários tipos de células, o qual desencadeia várias reações fisiológicas (PRESCOTT *et al.*, 1990; VENABLE *et al.*, 1993; OWEN *et al.*, 2007). Este composto foi elucidado, a mesma época, e pelos grupos dos professores Jacques Benveniste, do Instituto de Química das Substâncias Naturais – França; Donald Hanahan, do Departamento de Bioquímica da Universidade do Texas, e Fred Snyder, da Divisão de Ciências Médicas do Instituto de Estudos Nuclear de Oak Ridge - Tennessee, os quais realizavam investigações independentes sobre anafilaxia em coelhos e ação anti-hipertensiva em ratos (DEMOPOULOS *et al.*, 1979; BLANK *et al.*, 1979; HANAHAN, 1986). Após sua estrutura ter sido desvendada, um novo campo de pesquisa foi aberto, tendo como principal objetivo a área médica (VENABLE *et al.*,1993).

PAF e Lyso-PAF referem-se, respectivamente, aos éteres-lipídios 1-O-alquil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina e ao 1-O-alquil-2-OH-sn-glicero-3-fosfocolina, sem vínculo com o comprimento ou grau de insaturação do grupo alquila, podendo os compostos estruturalmente relacionados serem rotulados como PAF e Lyso-PAF análogos (TOKUMURA *et al.*, 1989; TOKUMURA, 1995). O termo PAF apesar de incorretamente usado, pois descreve somente

um dos vários efeitos que provoca, permaneceu vinculado ao composto sendo amplamente utilizado.

O PAF demonstra uma conservação filogenética existindo em várias posições na escala evolucionária, estando presente ou sendo gerado em uma grande variedade de organismos, tais como: bactérias, protozoários, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados, incluindo mamíferos, sendo sua composição, em amostras biológicas, constituída principalmente por uma mistura contendo grupos alquídicos com 16 e 18 carbonos na posição sn-1 (DENIZOT *et al.* 1989; BUSSOLINO *et al.* 1991; SUGIURA *et al.* 1995; CALLIGEROU *et al.*, 1996; KULIKOV e MUZYA, 1998; McINTYRE *et al.*, 1999; ANTONOPOULOU *et al.*, 2002).

As ligações tipo éter, presentes nos carbonos 1 e 2, tornam estes glicerofosfolipídio resistentes as fosfolipases, permitindo desta forma que se acumulem na membrana e em outras partes da célula, atrapalhando o seu desenvolvimento ou até mesmo levando-a a apoptose (ZHOU *et al.*, 1996; VAN DER LUIT *et al.*, 2002).

Outros alquil-glicerofosfolipídios e algumas alquil-fosfocolinas têm também apresentado ação citotóxica, *in vivo* e *in vitro*, principalmente contra protozoários, onde os estudos sobre tais compostos supõem mecanismos envolvendo danos à membrana plasmática e a sinalização celular, com o comprometimento de vários metabolismos celulares (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2001; SEIFERT *et al.*, 2001; CROFT *et al.*, 2003; VERMA e DEY, 2004; PARIS *et al.*, 2004).

Outros análogos do PAF, com variação no radical da posição sn-1 ou sn-2, também foram testados, e substituições do radical alquídico em sn-1, por um grupo acila ou arila e do radical acetil em sn-2, por propionil ou butiril, demonstrou redução na atividade biológica destes análogos (WISSNER *et al.*, 1984; TOKAMURA *et al.*, 1989; PRESCOTT *et al.*, 1990; VENABLE *et al.*, 1993). Do mesmo modo, um maior número de grupos metilênicos, maior

cadeia linear, entre o átomo de fósforo e o átomo de nitrogênio, ou a ausência do oxigênio ligado em sn-1 ou sn-2, também ocasionam uma diminuição na atividade de tais análogos (WISSNER *et al.*, 1986; KULIKOV e MUZYA, 1998).

A idéia da utilização de tais PAF-análogos como agente anti-incrustantes, tem como princípio o que acontece em outros tipos de células amplamente utilizadas na área médica e farmacológica (VENABLE *et al.*, 1993; BOTITSI *et al.*, 1998; KULIKOV e MUZYA, 1998), baseando-se no possível desencadeamento de uma reação antagônica ou processo inflamatório nas células dos organismos incrustantes em contato com tais produtos.

Os PAF análogos têm algumas propriedades especiais vinculadas a sua estrutura molecular, sendo anfifílicos, pois possuem um sítio hidrofílico e outro hidrofóbico, e zwitteriônicos, ou seja, apresentam cargas negativa e positiva (radical bipolar) em sua estrutura, além de também apresentar baixos pesos moleculares (PM) ~ 500 Daltons. Estas propriedades são importantes, quando as confrontamos com a difusão pelo EPS e com os possíveis caminhos de absorção pelos micro-organismos. Devido ao seu sítio hidrofóbico, uma longa cadeia alquídica saturada presa em um dos extremos da molécula, este composto pode facilmente permear através das bicamadas de lipídios componentes do invólucro celular e membrana plasmática dos organismos (JONES e OSBORN, 1977a,b). Por ser uma molécula anfifílica e ter baixo PM, têm um bom potencial para se difundir no biofilme e, devido a esta característica, passar através das proteínas transmembranas presentes no invólucro celular e nas membranas plasmáticas, pois algumas destas proteínas, chamadas de Porins, têm baixa especificidade e em geral permitem a difusão de moléculas hidrofílicas com PM menores que 600 daltons (NIKAIDO e VAARA, 1985; KOEBNIK *et al.*, 2000).

Outro fator importante é que estes compostos PAF-análogos, sem radical tipo acila na posição sn-2, podem atuar como molécula sinalizadora, quando em contato ou absorvido

pelos micro-organismos, sem sofrer a terminação de sua ação agonista por enzimas do tipo fosfolipase, permitindo que ele seja acumulado no invólucro, parede ou interior das células, deflagrando um processo antagônico de resposta celular, que inibirá o desenvolvimento ou destruirá o micro-organismo (MARATHE *et al.*, 2001; CROFT e ENGEL, 2006; FRUHWIRTH *et al.*, 2007; WELCH *et al.*, 2009).

Especulando-se a atuação do glicerofosfolipídio como uma substância biocida, pode-se presumir que ocorram os seguintes passos:

1º) O glicerofosfolipídio, utilizado como biocida na tinta anti-incrustante, é liberado e atinge a parte inferior do biofilme;

2º) O glicerofosfolipídio começa sua difusão pelo interior do biofilme, tendo como principal solvente a água do mar e, como superfície de interação o EPS por meio de fenômenos físicos de adsorção e dessorção;

3º) O glicerofosfolipídio atinge os invólucros mais externos dos micro-organismos componentes do biofilme, sendo iniciada, deste modo, a sua absorção; e

4º) O glicerofosfolipídio atinge a membrana plasmática e ocasiona a repulsão ou morte do micro-organismo.

O primeiro passo, acima mencionado, é influenciado pelo tipo de preparação da tinta anti-incrustante e está especificamente relacionado ao modo empregado para liberação do glicerofosfolipídio da tinta anti-incrustante. Neste trabalho foi utilizada a dispersão direta na matriz, a partir da qual o glicerofosfolipídio é liberado lentamente, sendo esta a base dos mais tradicionais esquemas de pintura anti-incrustante.

No segundo passo, as interações do glicerofosfolipídio com a água do mar e com o EPS são de fundamental importância, pois o biocida não pode ser totalmente solúvel em água e nem ter alta afinidade pelo EPS. Se totalmente solúvel, ele tenderá a permanecer na fase aquosa e, devido ao maior coeficiente de difusibilidade neste meio, será completamente retirado do biofilme. Se o biocida tiver alta afinidade pelo EPS, a sua difusão torna-se muito lenta e menos abrangente, comprometendo o seu contato com os micro-organismos.

Deste modo, avaliando os compostos que interagem, (i) a água do mar, (ii) o EPS, formado principalmente por polissacarídeos, proteínas e lipídios, e (iii) o biocida, que é um glicerofosfolipídio, pode-se presumir que este último, devido a sua característica zwitteriônica (radical bipolar), terá uma mediana interação com o EPS e com a água, podendo, deste modo, mais facilmente se difundir pelo biofilme.

Nos terceiro e quarto passos, ao alcançar os invólucros e membranas celulares dos micro-organismos, o glicerofosfolipídio poderá atuar dos seguintes modos: (i) devido à característica hidrofóbica de seu radical alquídico, poderá facilmente ser adsorvido por camadas de peptídioglicanos, polissacarídeos, lipo-polissacarídeos ou fosfolipídios e agindo como um surfactante causará danos à membrana plasmática da célula atingida, e (ii) devido a sua característica de PAF-análogo, poderá desencadear uma reação antagônica, *p. ex.* inflamação, inibição de síntese celular ou apoptose, ocasionando a repulsão ou morte do micro-organismo (GOREISCH *et al.*, 2004; IWASAKI e ISHIHARA, 2005; YEBRA *et al.*, 2006; WATANABE e ISHIHARA, 2008).

A figura 13 ilustra a difusão hipotética de um biocida através do biofilme. O biocida presente na tinta base, inicialmente em sua concentração máxima (C máx), é carreado pela água do mar a partir de microporos formados na tinta e se difunde pelo biofilme entrando em contato com os micro-organismos. Ao ultrapassar o biofilme ele passa a ser diluído pela ação

da água do mar na camada limite hidrodinâmica alcançando sua diluição total (C → 0). (YEBRA *et al.*, 2006).

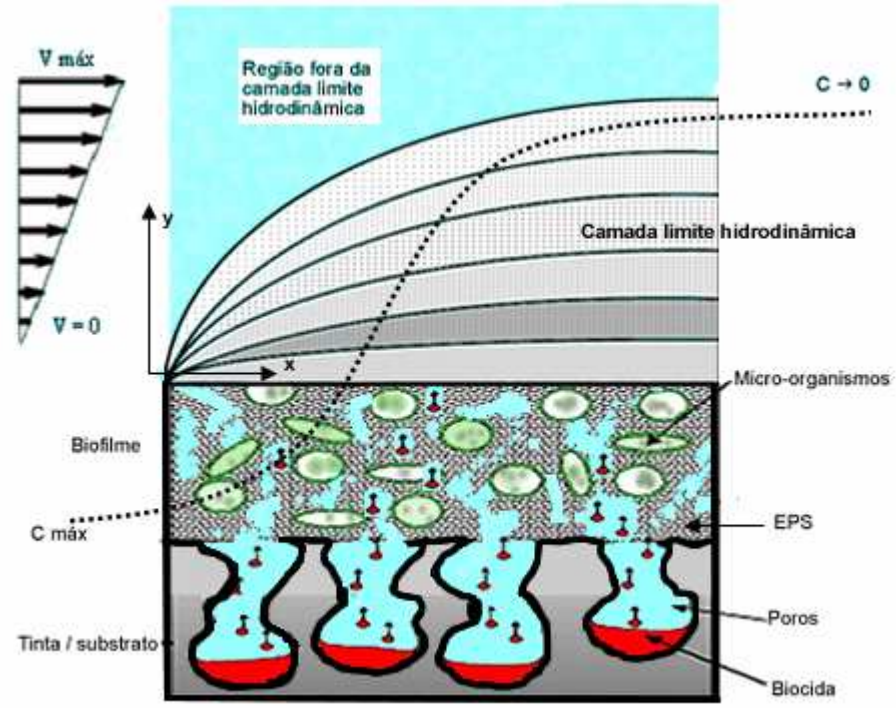


FIGURA 13. Ilustração da difusão hipotética do biocida (LPC). O biocida componente da tinta é carreado pela água do mar a partir de poros formados por desgaste (concentração máxima – C máx) e se difunde pelo biofilme entrando em contato com os micro-organismos. Ao ultrapassar a camada do biofilme ele passa a ser diluído, pela ação da água do mar, na camada limite hidrodinâmica. Alcançando sua diluição total (C → 0) na região mais exterior. (Adaptado da Fonte: YEBRA *et al.*, 2006).

2.5 Síntese de glicerofosfolipídios

A síntese total de glicerofosfolipídios não é uma tarefa trivial, pois requer a incorporação regiosseletiva de três diferentes substituintes nas três posições possíveis da molécula de glicerol, o que envolve seqüências de proteção e desproteção de suas hidroxilas e seqüências de alquilação ou acilação e fosforilação, podendo para este intento normalmente

utilizar-se de procedimentos catalíticos e enzimáticos (ROSENTHAL, 1966; ROSENTHAL e CHODSKY, 1971; WITZKY e BITTMAN, 1985, 1986; TESTET *et al.,* 2002; ICHIHARA *et al.,* 2005; D'ARRIGO *et al.,* 2007; D'ARRIGO e SERVI, 2010).

2.5.1 PAF e análogos. Síntese enzimática

Em células de mamíferos, o PAF é gerado de modo enzimático por dois caminhos distintos, conhecidos por (*i*) *remodeling* e (*ii*) *de novo* (PRESCOTT *et al.* 1990; VENABLE *et al.,* 1993). O primeiro envolve a hidrólise de PAF análogos de grandes cadeias acila na posição sn-2, e posterior reacetilação do lyso-PAF formado, enquanto o segundo caminho envolve a acetilação de compostos do tipo 1-O-alquil-sn-glicero-3-fosfato, que então são posteriormente convertidos a PAF.

Neste ponto devemos entender que a biossíntese do PAF tem como principal função torná-lo disponível para desencadear os processos celulares, de modo que em algum momento, devido ao comprometimento de um estresse ou morte da célula, sua ação deve ser terminada. Esta terminação só é possível com a degeneração do PAF e, para isto, uma enzima específica conhecida como PAF acetil-hidrolase, catalisa a deacetilação do PAF reduzindo-o a Lyso-PAF (Figura 14), um agonista muito menos efetivo (STREMLER *et al.*, 1989; DENNIS, 1994; STAFFORINI *et al.,* 1997). A enzima PAF acetil-hidrolase pertence a uma superfamília de enzimas chamadas de fosfolipases, que é dividida em quatro classes distintas: PLA (PLA1 e PLA2), PLB, PLC e PLD, de acordo com a ligação que especificamente ela hidrolisa no fosfolipídio (Figura 15).

As enzimas fosfolipase PLA_1 e PLA_2 hidrolisam o fosfolipídio, clivando as acilas das posições sn1 e sn2 respectivamente, gerando ácidos graxos e lyso-fosfolipídios. A fosfolipase

PLB atua clivando ambas as acilas, das posições sn1 e sn2. A fosfolipase PLC hidrolisa a ligação entre o glicerol e o fosfato, gerando diacilgliceróis, e a fosfolipase PLD cliva no grupo polar, formando o ácido fosfatídico (DENNIS, 1994; BALSINDE *et al*., 2002; BROWN *et al*., 2003; AKHO e MIN, 2008). Dentre destas classes, a enzima PLA_2 é a mais numerosa, com 14 grupos e 20 subgrupos, sendo encontradas em diversos organismos, por exemplo, mamíferos, cobras e abelhas (venenos), esponjas marinhas, bactérias e plantas (DEKKER, 2000; NEVALEIN *et al.* 2004; MANSFELD, 2009).

Dois fatos interessantes são: (*i*) esta enzima, a PLA_2, participa da síntese do PAF por *"remodeling"* e, nesta síntese, sua ação libera eicosanóides, que também são mediadores de processos inflamatórios celulares, e (*ii*) sua ação na terminação do poder agonista do PAF, transformando-o em lyso-PAF, é altamente regiosseletiva, ou seja, só pode ser exercido em uma ligação acila na posição sn-2, de modo que se esta ligação porventura não existir em um PAF-análogo, a hidrólise não ocorrerá e, conseqüentemente, o PAF-análogo será acumulado na célula ocasionando um estresse ou sua morte.

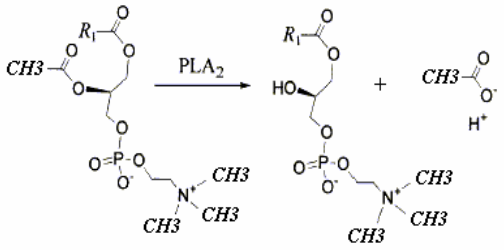


FIGURA 14. Deacetilação do PAF

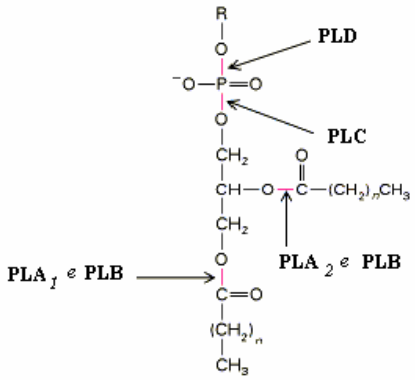


FIGURA 15. Ligações hidrolisadas por fosfolipases

2.5.2 Síntese laboratorial

Uma rota de síntese de glicerofosfocolinas foi reportada usando como partida o D-α,β-O-isopropilideno glicerol tendo como intermediário o tetraidropiranil glicerol que serviu de base para posterior introdução de acil radicais e fosforilação (ROSSETO *et al.,* 2006). Outra rota, apresentada por Fedotenko *et al*. (2010), propõe o uso de fosforamidas como grupo de proteção para síntese de fosfolipídios análogos a esfingomielina.

Sínteses laboratoriais de PAF-análogos também têm sido satisfatoriamente desenvolvidas a partir da oxidação de glicerofosfolipídios utilizando-se de enzimas, hidroperóxidos orgânicos ou íons metálicos (BITTMAN *et al*., 1987; VIRTO *et al.,* 1999; TOKUMURA *et al.,* 2000). Como exemplo, enzimas lipoxigenases presentes em uma grande gama de vegetais, principalmente nos grãos de soja, podem ser ativadas pelo simples processo de maceração do vegetal, catalisando a oxigenação do ácido linoléico. Embora essas enzimas sejam mais efetivas com os ácidos graxos, elas também podem oxidar triglicerídeos e fosfolipídios (VICK e ZIMMERMAN, 1981; PÉREZ-GILABERT *et al*., 1998; KNOTHE *et al.*, 2007).

A síntese química de glicerofosfocolinas também pode envolver, de um modo mais direto, o uso de ácido fosfatídico como intermediário, empregando carbo-diimidas, tricloro-acetonitrilas e cloretos de sulfonila como agentes de condensação (GUNSTONE, 2007).

Contudo, cabe salientar que as rotas de síntese supracitadas têm sido empregadas em ensaios laboratoriais, trabalhando-se na faixa de micro e miligramas, não estando tais sínteses relacionadas a produções em escala comercial, ou seja, grandes quantidades (multitoneladas).

2.6 Caracterização de lipídios

Os trabalhos precursores relacionados com a caracterização de lipídios tinham por base o isolamento e a identificação individual de ácidos graxos, fosfolipídios e triglicerídeos. Para

isto, eram utilizados procedimentos que envolviam somente métodos químicos e físicos, tais como formação de sais, bromação, cristalização e destilação. Porém, devido a grande diversidade dos lipídios, as maiores dificuldades encontradas a época eram o isolamento a partir da matriz e a separação dos componentes individuais. Conseqüentemente, maiores avanços em tal segmento de pesquisa tiveram que esperar pelo desenvolvimento de métodos analíticos mais apropriados (KUKSIS, 2005).

Para caracterizar lipídios presentes em uma amostra, tornou-se importante efetuar analises elucidativas com relação às classes, subclasses e espécies moleculares. Para este fim, técnicas de separação como cromatografia em camada delgada (CCD)[21], cromatografia gasosa (CG)[22] e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)[23], começaram, a partir do início dos anos 60, a ser amplamente empregadas (HAMILTON e COMAI, 1984; LEPAGE e ROY, 1986; MUTHIN e RADLOFF, 1998; BURDGE *et al.*, 2000; GUAM *et al.*, 2001; RUIZ et al., 2004; FAGAN *et al.*, 2004; KUKSIS, 2005).

Cabe ressaltar que estas técnicas requeriam maiores quantidades de amostra e, dependendo do tipo de matriz da amostra, procedimentos preliminares, tais como extrações líquido-líquido ou líquido-sólido, deviam ser utilizados visando obter melhores resultados nas análises. (CHRISTIE, 1992,1993; RUIZ-GUTIERREZ e PEREZ-CAMINO, 2000; HOUJOU *et al.*, 2005; PETERSON e CUMMINGS, 2006; CARRASCO-PANCORBO *et al.*, 2009).

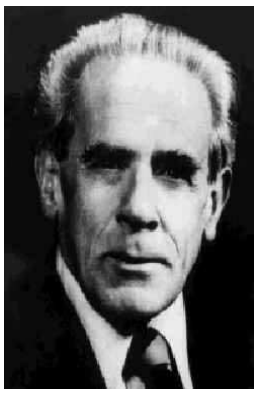
2.6.1 Extração

O procedimento usual para se efetuar a análise de lipídios envolve a sua extração da matriz que os contém. Cabe ressaltar que as técnicas de extração também removem da matriz

[21] Tradução para, *Thin layer chromatography* (TLC)
[22] Tradução para, *Gas chromatography* (GC)
[23] Tradução para, *High performance liquid chromatography* (HPLC)

alguns componentes indesejáveis, tais como, proteínas, açúcares, sais ou outras substâncias que podem interferir nos processos analíticos.

Um dos procedimentos mais amplamente utilizado para a extração de lipídios está baseado nos métodos descritos, em 1951 e 1957, por Jordi Folch[24] (☼1911; †1979) e colaboradores. Este procedimento, em sua particularidade, permite que todas as substâncias lipóides, por ex.: tri, di, e monoacilgliceróis, esteróis, ácidos graxos e fosfolipídios, presentes em matrizes animais e vegetais, sejam extraídas eficazmente.



J. Folch

A técnica consiste basicamente na trituração e homogeneização da amostra em uma mistura 2:1(v/v) dos solventes clorofórmio e metanol, em uma proporção de 20ml para cada grama de tecido submetido à extração, sendo efetuada uma posterior lavagem com uma solução salina aquosa para remoção das substâncias não lipóides. Após a lavagem, quando o sistema alcança o equilíbrio, tem-se uma fase transparente de água e metanol, e uma fase inferior de clorofórmio, mais pesado, existindo, entre elas, uma interface com resíduo material, o qual, após a remoção da fase aquosa, deve ser dissolvido com a adição de metanol, até a obtenção de uma fase única contendo todos os lipídios dissolvidos (FOLCH *et al.*, 1951,1957).

Cabe ressaltar, que métodos contemporâneos incitam a substituição do clorofórmio, originalmente utilizado, por diclorometano, o qual além de ter se mostrado um satisfatório substituto tem ainda como vantagem sua reconhecida menor toxicidade (CHRISTIE, 1993; HALL e MURPHY, 1998; DROUILLARD *et al.*, 2004).

Também, devido ao questionamento sobre a possível perda de lipídios mais polares, extraídos pela fase aquosa que é descartada, alguns trabalhos têm recomendado a recuperação

[24] Retrato disponível em: http://www.cyberlipid.org/phlip/folch3.htm. Acesso em: 07 out. 2011.

com o auxilio de acidificação e re-extração com 1-butanol saturado em água (BJERVE *et al*., 1974; SHAIKH, 1994; SIESS *et al*., 1999; SUBBANAGOUNDER *et al*., 2000; BODENNEC *et al*., 2003).

E. G. Bligh

Em 1959, Emerson Graham Bligh[25] and William John Dyer introduziram um método onde a extração e a partição de materiais biológicos, contendo até 1% de lipídios, são simultâneas. Sendo as proteínas precipitadas e isoladas entre as duas fases formadas em um sistema de clorofórmio, metanol e água. Este método é particularmente aplicável a células em suspensão, porém deve ser apontado que este método demonstrou dar uma menor estimativa do real conteúdo de lipídios em amostra contendo mais de 2% de lipídios em sua composição, sendo que este erro aumenta com o aumento real do conteúdo de lipídios na amostra (IVERSON *et al*., 2001).

Na verdade, dezenas de métodos com a utilização de modernos equipamentos, tais como o uso de micro-ondas, extrator tipo soxhlet, extração a fluído supercrítico e extração com auxílio de ultra-som, vêm sendo testados visando acelerar o processo de extração. Porém, constata-se que apesar de acelerarem o processo, não apresentam um aumento significativo da eficiência de extração em comparação ao método de Folch (UNDELAND *et al.*1998; RUIZ-GUTIERREZ e PEREZ-CAMINO, 2000; AMETAJ *et al.*, 2003).

2.6.2 Separações cromatográficas

Após o processo de extração, onde se isolam os componentes lipóides da matriz ensaiada, técnicas cromatográficas, tais como a CCD, CG ou CLAE, devem ser empregadas

[25] Retrato disponível em: http://digitalcollections.library.ubc.ca/u?/fisherman,827. Acesso em: 07 out. 2011. Obs. Datas de nascimento e morte não encontradas.

para se conhecer as classes, subclasses e espécies moleculares dos lipídios que constituem o extrato. Estas técnicas cromatográficas permitem, de um modo geral, efetuar a separação dos analitos componentes da amostra, sendo, em sua essência, uma técnica precursora essencial para análises qualitativas. Contudo, deve-se ter em mente que o cromatograma somente fornece uma informação qualitativa, a saber, a posição ou tempo de retenção dos componentes da amostra ensaiada após um certo período de eluição, o que o faz uma ferramenta útil somente para reconhecer a presença ou ausência de componentes de misturas não muito complexas, e deste modo, a verificação da identidade dos analitos irá requerer uma confirmação espectroscópica ou química dos componentes isolados (SKOOG *et al*., 2002).

A CCD é um método planar de cromatografia que consiste em uma fase sólida estacionária, usualmente sílica gel ou alumina depositada sobre uma placa vítrea, plástica ou metálica, submetida a uma seqüência de solventes escolhidos com relação as suas diferentes polaridades (fase móvel), que se desloca através da fase estacionária por ação de capilaridade. A adsorção dos analitos entre os sítios ativos da fase sólida e os solventes da fase móvel produz um contínuo fracionamento da amostra ensaiada. Ela é uma antiga, e ainda empregada, técnica para separação e identificação de várias classes de lipídios, porém apresenta uma relativa não-especificidade na confirmação dos analitos, pois geralmente se faz uso de avaliações visuais com o emprego de reagentes de coloração, p. ex.: iodo, nihidrina e solução de Dragendorff. Contudo, devido principalmente a sua rapidez de ensaio e ao seu baixo custo, tornou-se uma técnica muito prática para o estabelecimento de condições exploratórias e para separação de lipídios em relação a sua classe, apesar de apresentar como principais fatores contraproducentes baixas reprodutibilidade e resolução, além do fato da excessiva manipulação da amostra implicar em possível oxidação de componentes poli-insaturados (KIM e SALEM, 1990; SKOOG *et al*., 2002; PETERSON e CUMMINGS, 2006;

ROBERTS *et al*., 2008). Apesar de suas limitações, procedimentos usando CCD têm sido empregados freqüentemente para separação de lipídios. Um sistema com suporte em sílica gel empregando uma fase móvel de hexano, dietil-éter, ácido fórmico (80:20:2) v/v, produz um padrão de separação onde o colesterol éster migra na frente, seguidos por triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol, diglicerídeos, monoglicerídeos e fosfolipídios (CHRISTIE, 1989).

A CG é um método de separação que utiliza uma fase estacionária sólida ou líquida (coluna cromatográfica) e uma fase móvel no estado gasoso (gás de arraste), em geral gás hélio ou hidrogênio. A amostra sendo analisada, a qual deve ser volatilizada para que então possa ser carreado pelo gás de arraste, o que torna tal método específico para separação de substâncias voláteis, é separada em seus componentes durante o seu trânsito dentro da coluna, os quais são registrados por detectores específicos. Devido a sua natureza, em geral não-volátil, os lipídios não são, em sua plenitude de compostos, possíveis de análise direta por CG, requerendo para isto procedimentos preliminares de hidrólise ou derivatização. Tais impedimentos levaram tal técnica a um quase restrito emprego em análises de ácidos graxos e esteróis (GRAY e YARDLEY, 1975 OLSSON e SALEM, 1997; CHRISTIE, 1998).

2.6.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é um método de separação que utiliza uma fase estacionária sólida (coluna cromatográfica) e uma fase móvel no estado líquido, em geral solventes puros ou misturas de solventes com diferentes polaridades. O sistema consiste basicamente de um dispositivo de bombeamento de solventes, um injetor, uma coluna cromatográfica, um detector e um registrador. Ela oferece uma combinação de velocidade, reprodutibilidade e sensibilidade,

sendo usada em operações de pesquisa e produção, podendo ser utilizada em amostras não derivatizadas, sendo uma grande ferramenta para separação de amostras complexas com um mínimo de preparação (McMASTER, 2007). O uso da técnica de CLAE, onde são usadas temperaturas mais brandas, permite o trabalho com substâncias não voláteis e um menor manuseio das amostras, não necessitando dos procedimentos de hidrólise e derivatização, alcançando uma razoável separação dos lipídios dentro de suas classes (WOJTUSIK *et al.*, 1989; EMRARI, 2004; PETERSON e CUMMINGS, 2006).

Nos anos 70 vários trabalhos foram divulgados relacionando o emprego da CLAE para separação e identificação de lipídios, vindo a fazer esta técnica despontar como a principal a ser empregada para tais substâncias, geralmente utilizando-se, à época, de detectores de ultravioleta e fluorescência (AITZETMULLER, 1975; JUNGALWALA *et al.*, 1977; ULLMAN e McCLUER, 1977; FAGER *et al.*, 1977; PATTON *et al.*, 1982).

Os diversos sistemas de eluição empregados podem variar do simples e isocrático, ou seja, uma solução e uma concentração, ao complexo e gradiente, vários solventes e várias concentrações. Contudo, quando se deseja realizar uma análise completa cobrindo desde os lipídios não-polares àqueles mais polares, existem limitações em realizar tais separações em uma corrida simples e isocrática, principalmente em relação à otimização dos parâmetros tempo de retenção e fator de retenção, sendo geralmente necessário aplicar, para tal intento, eluição gradiente com sistema complexo de fase móvel (HOVING, 1995; ABIDI, 1998; ROW e LEE, 2000; SNYDER, 2000; PETERSON e CUMMINGS, 2006).

2.6.3 Espectrometria de massas em lipídios

2.6.3.1 Espectrometria de massas (EM)

J. J. Thomson

No final do século XIX, o físico Joseph John Thomson[26] (☼1856; †1940), prêmio Nobel de 1906, com base em seus trabalhos sobre a análise da natureza da deflexão de raios catódicos sob campos elétricos e magnéticos, abriu as portas para o novo campo de pesquisa química, iniciando um inimaginável futuro para a química analítica, que atualmente chamamos de espectrometria de massas (THOMSON, 1897).

Apesar do enorme potencial de emprego na área química, a projeção do estudo em tal equipamento de pesquisa continuou sendo explorada, até a década de 40, quase que exclusivamente, por físicos, tornando-se a principal ferramenta usada na descoberta de novos isótopos, tendo sido de grande aplicação no desenvolvimento dos trabalhos do Projeto Manhattam desenvolvido pelo Estados Unidos da América (DASS, 2007).

Ainda nos anos 40, os químicos finalmente reconheceram o potencial da espectrometria de massas como ferramenta analítica, aplicando-a no monitoramento da produção de refinarias de petróleo, que culminou, em 1943, com a produção do primeiro espectrômetro de massa comercial. Naquela época, a questão mais impeditiva ao rápido avanço da espectrometria de massas estava centrada em como fazer a introdução da amostra, convertendo-a em sua fase gasosa sob uma atmosfera de baixa pressão (vácuo) sem que ocorresse a perda ou sua desnaturação. Porém, no decorrer dos anos 50, o desenvolvimento de uma sonda que fazia a inserção direta da amostra na câmara de vácuo trouxe um grande avanço à técnica. Ainda neste período, excelentes espectrômetros, usados para determinação de espectros de massa de moléculas orgânicas complexas, já estavam disponíveis comercialmente, os quais, apesar de possuírem o mesmo tipo de fonte iônica, por impacto de

[26] Retrato disponível em: http://www.britannica.com/EBchecked/topic/593074/Sir-JJ-Thomson. Acesso em: 10 out. 2011.

elétrons, podiam dispor de um dos três tipos distintos de analisadores de massas: *i*) simples foco com deflexão magnética; *ii*) duplo foco com deflexão magnética; e *iii*) tempo de vôo (BIEMANN, 1963).

Em 1953, Wolfgang Paul[27] (☼1913; †1993) introduziu um novo conceito de analisadores de massa. Sua patente original, DE 944.900 - US 2.939.952, relata a invenção de um aparato aplicável à separação de partículas carregadas de diferentes cargas especificas, informando que tal equipamento poderia ser empregado, entre outras finalidades, como uma ferramenta para espectroscopia de massas e isolamento de isótopos (PAUL e STEINWEDEL, 1953). Este invento consistia basicamente de um conjunto com três (iontrap) ou quatro (quadrupolo) eletrodos sólidos, apresentando formas cilíndricas ou hiperbólicas, eletricamente conectados em um arranjo específico, permitindo criar um campo elétrico simétrico em seu eixo longitudinal (Figura 16).

Wolfgang Paul

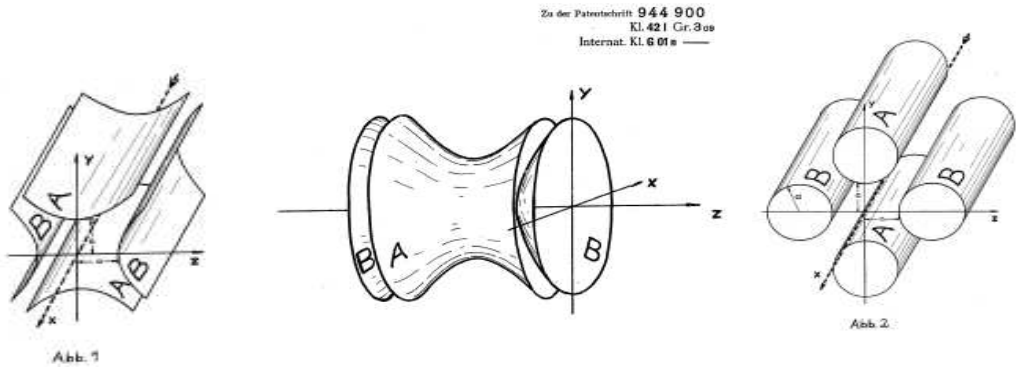


FIGURA 16. Ilustração dos modelos de quadrupolos criados por Wolfgang Paul.
(Adaptado da Fonte: PAUL e STEINWEDEL, 1953).

[27] Retrato disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1989/paul-autobio.html Acesso em: 10 out. 2011.

Os íons passando na direção deste eixo são então aprisionados (iontrap) ou separados (quadrupolo) de acordo com sua estabilidade no campo elétrico gerado, de modo que os íons mais estáveis, que conseguem atravessar, são coletados por um detector. Devido ao reconhecimento de sua inventividade, Wolfgang Paul fora agraciado com o Prêmio Nobel de física em 1989. Desde então, a espectrometria de massas vem, ano após ano, se tornando uma técnica versátil e largamente usada na identificação dos elementos presentes em uma amostra e na determinação de suas concentrações, envolvendo etapas de introdução da amostra, ionização, separação de íons e contagem dos íons formados.

2.6.3.2 Espectrometria de massas sequencial (EM^n)

A espectrometria de massas sequencial é um procedimento analítico no qual se realiza, no mínimo, dois estágios de análise de massa. Para este tipo de análise, os dois mais utilizados tipos de analisadores de massa são o espectrômetro de massa triplo quadrupolo e o de trapeamento de íons (iontrap).

A aplicação da espectrometria de massas convencional (EM) apesar de adequada para, de modo exploratório, identificar o lipídio com base em seu peso molecular, não permite que se obtenha informações suficientes para que se revele a sua estrutura. Mesmo se conhecendo a classe, a multiplicidade de possíveis substâncias que atendem ao peso molecular final, obtido a partir da relação massa/carga, invalida uma resposta unívoca (PETERSON e CUMMINGS, 2006).

Para uma fidedigna caracterização de uma substância, a informação estrutural torna-se objetivamente necessária e, deste modo, a técnica conhecida por espectrometria de massas sequencial, ou em tandem, se tornar um procedimento analítico imperativo. Esta técnica

permite que os íons criados possam ser manipulados, gerando novos fragmentos que possibilitam direcionar a identificação da substância a uma resposta singular.

2.6.3.3 O analisador de massas tipo iontrap

O iontrap é um aparelho que funciona basicamente como uma câmara de confinamento onde os íons gasosos podem ser armazenados por um período de tempo e, também, como um analisador de massas. Ele, originalmente, consiste de três eletrodos com superfícies hiperbólicas, dois eletrodos de fechamento e um eletrodo central anelar, arranjados especificamente formando uma câmara que é mantida sob vácuo, onde os íons são aprisionados e trabalhados pela aplicação de voltagens apropriadas aos eletrodos, fazendo com que os íons sejam mantidos ou evacuados do trap (Figura 17). Furos de passagem no centro dos eletrodos de fechamento permitem a entrada e saída dos íons. Uma alta voltagem na forma de radiofreqüência é aplicada ao eletrodo central, enquanto os eletrodos de fechamento são mantidos aterrados. A diferença de potencial oscilante estabelecida entre os eletrodos forma um campo quadrupolar tridimensional e dependendo do nível da radiofreqüência, aplicada ao campo, torna-se possível trapear íons de um faixa de massa específica (MARCH e TODD 2005; DASS, 2007).

Além da geometria original apresentada acima, outros modelos geométricos de iontrap têm sido propostos e utilizados, como por exemplo, cilíndrico, linear e retilinear, apesar de tecnicamente todos servirem à realização dos mesmos tipos de experimentos, modificações na forma geométrica podem melhorar significativamente a performance quando aplicados a realização de certos procedimentos analíticos (MARCH, 2000; HAO e MARCH, 2001; OUYANG et al., 2004; MARCH, 2009; KOIZUMI et al., 2009).

O iontrap tem como principal característica permitir a realização de experimentos do tipo EM^n, usualmente EM^2, EM^3 ou EM^4, sendo que alguns equipamentos podem trabalhar até maiores sequências. Tal peculiaridade permite ao iontrap uma maior aplicabilidade com relação à elucidação estrutural de substâncias desconhecidas, tornando-se uma ótima ferramenta à análise de lipídios.

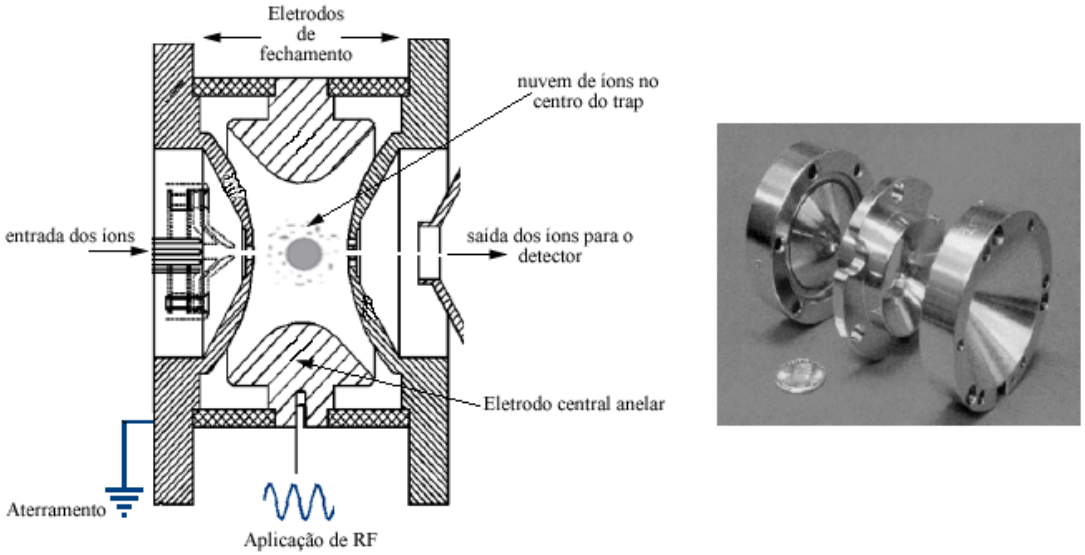


FIGURA 17. Ilustração e imagem de um analisador tipo iontrap.
(Adaptado da Fonte: MARCH e TODD, 2005).

Experimentos tipo EM^n são conseguidos por meio de uma seqüência de operações que se inicia pela função SCAN, onde pode ser selecionado o íon de interesse ejetando-se todos os outros íons presentes no trap. Então, aplica-se uma voltagem suplementar ao trap que excita o íon e o faz colidir com o gás hélio presente no trap resultando em íons produtos que são finalmente detectados.

Apesar do analisador de massas tipo iontrap também trabalhar sob vácuo, se pode dizer que a pressão de trabalho é alta quando comparada aos outros tipos de analisadores de massa, pois a atmosfera de gás hélio, usada como artifício físico para se evitar a colisão entre os íons

e diminuir sua energia cinética dentro do trap, permite que a pressão de trabalho possa ser da ordem de 10^{-5} a 10^{-7} psi, ao invés de 10^{-9} a 10^{-13} psi necessária em outros tipos de analisadores (MARCH e TODD 2005; DASS, 2007).

2.6.3.4 **EM em lipídios. Transpondo a barreira da volatilidade**

O efetivo emprego da espectrometria de massas na análise de lipídios esbarrava na dificuldade de se introduzir a amostra no analisador de massa de modo que ela pudesse ser efetivamente analisada. Em relação à técnica de cromatografia gasosa, o principal problema era a baixa volatilidade, tornando impossível uma obtenção de íons para poderem ser analisados sem que a amostra fosse desnaturada ou destruída e, tratando-se de cromatografia líquida, o problema era se obter uma efetiva transformação dos compostos, presentes como solutos na solução, em íons na fase gasosa, para aí então poder introduzi-los em um analisador de massa sob vácuo.

Inicialmente, pode se dizer que a espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa permitiu um avanço na análise de algumas classes de lipídios, possibilitando, principalmente, a identificação individual de ácidos graxos derivatizados. Contudo, a inexpressiva volatilidade dos lipídios mais complexos não pôde ainda ser superada por tal técnica, necessitando-se ainda de laboriosos procedimentos de preparação da amostra e derivatização. Subseqüentemente, com a técnica de ionização química utilizando gás reagente amônia ou isobutano e com o emprego de sondas especificas de introdução de amostra, se pode dar um avanço à análise de lipídios, possibilitando a identificação de certos componentes menos voláteis e mais polares (POLONSKY *et al.*, 1980; CRAWFORD e PLATTNER, 1984; THOMAS *et al.*, 1986).

Na técnica de ionização química, a substância sendo analisada, depois de introduzida, apresenta-se como uma pequena fração da fase gasosa. Assim, o feixe de elétrons passando pela mistura de gás reagente e amostra, devido a sua maior interação com o gás presente em maior concentração, produz íons que por sua vez colidem com a amostra, efetuando a transferência de cargas para o analito de interesse, que em geral gera o íon molecular com pouco excesso de energia interna que rende poucos fragmentos, possibilitando um espectro bem limpo, quase que somente com a presença deste íon molecular (HERBERT e JOHNSTONE, 2003; DASS, 2007).

Após o desenvolvimento da técnica de ionização por bombardeamento por átomos rápidos (FAB) a ampliação das análises de lipídios, por espectrometria de massas, começou a avançar, podendo agora superar a questão da volatilidade sem a utilização de demorados processos de derivatização (HAROLDSEN *et al.*, 1987; BENFENATTI *et al.* 1989; SATSANGI *et al.*, 1989). O FAB é uma fonte de dessorção, aplicável em amostras não-voláteis ou termicamente instáveis, que permite a produção de íons positivos e negativos empregando átomos de xenônio ou argônio com alta energia que se chocam com a amostra em seu estado condensado, a qual se encontra dispersa em uma matriz de solução de glicerol (SKOOG *et al.*, 2002). O processo de ionização desta técnica pode ser considerado brando, geralmente realizado a temperatura de 25-35ºC e sem a necessidade de energia adicional para vaporização da amostra, o que permite a ionização, sem degradação, de moléculas termicamente lábeis (HERBERT e JOHNSTONE, 2003; DASS, 2007).

Malcolm Dole

Em 1968, Malcolm Dole[28] (☼1903; †1990) e colaboradores apresentaram um trabalho que mostrava um modo de ionização de

[28] Retrato disponível em: http://masspec.scripps.edu/mshistory/greatnames/dole.php. Acesso em: 10 out. 2011.

moléculas não voláteis, as quais denominaram de macro-íons, que poderiam ser produzidas em um estado gasoso e serem concentradas em um jato supersônico por meio da aplicação de técnica de electrospray. Tais macro-íons ainda poderiam ser posteriormente detectados em uma câmara de Faraday após os íons de menores pesos moleculares serem repelidos com a aplicação de voltagens especificamente definidas (DOLE *et al.*, 1968).

J.B. Fenn

Apesar da grandiosa descoberta de Dole, somente em 1984, após passados 15 anos, John Bennet Fenn[29] (☼1917; †2010) e colaboradores puderam demonstrar a aplicabilidade do electrospray como uma fonte de íons eficaz na ionização branda de biomoléculas. Segmento de pesquisa que lhe conferiu o prêmio Nobel de Química em 2002.

O processo de ionização por electrospray ou eletronebulização consiste em se bombear uma solução contendo o analito de interesse através de uma agulha capilar, produzindo-se um spray, o qual é submetido a uma diferença de potencial elétrico de milhares de volts, que faz com que as finas gotículas eletricamente carregadas sejam transladadas para o interior do analisador de massas (YAMASHITA e FENN, 1984 a,b; WHITEHOUSE *et al.*,1985).

Uma visão apurada de tal sistema é apresentada no resumo da patente depositada por John Fenn, Michael Labowsky, e Masamichi Yamashita em 1983:

> Uma fonte iônica por electrospray, para um espectrômetro de massa, capaz de gerar íons a partir de uma amostra dissolvida em uma solução, compreende um tubo capilar através do qual a solução é bombeada para uma câmara primária, mantida a pressão atmosférica, onde um gás inerte escoa em contra-corrente ao fluxo da solução, e a um pequeno orifício na parede oposta da câmara. Uma alta diferença de potencial elétrico é aplicada entre o capilar e a parede oposta da câmara de modo que a solução é nebulizada eletricamente dentro da câmara e íons característicos da amostra são então formados. Estes íons são dessolvatados sob controlada extensão pela ação do gás inerte, o qual pode ser aquecido para melhorar a eficiência do processo e aumentar taxa máxima permissível do fluxo da solução. Os íons, então formados, passam através do pequeno orifício para uma segunda câmara, mantida sob pressão reduzida e, então, para o espectrômetro de massa. Alternativamente, um

[29] Retrato disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/index.html. Acesso em: 10 out. 2011.

> estágio de redução de pressão pode ser incluído, de modo que os íons passem para uma terceira câmara mantida a uma pressão ainda menor, na qual o espectrômetro está localizado, por meio de um arranjo de cones de amostragem (nozzles) e escumadeiras (skimmers). A fonte de íons é particularmente efetiva para a produção de íons não fragmentados e não solvatados a partir de amostras termicamente instáveis ou não voláteis, e pode ser usada como uma interface no acoplamento de um cromatógrafo líquido e um espectrômetro de massa. (LABOWSKY *et al*., 1985, tradução nossa).

Esta técnica mostrou-se de grande importância devido principalmente ao fato de prover um sistema que acopla diretamente um cromatógrafo a líquido com um espectrômetro de massa por um mecanismo que, além de remover o solvente carreador, mantém uma eficiente transmissão dos íons positivos e negativos formados. Podendo-se dizer que, a partir de tal invento, revelou-se um novo horizonte na análise de lipídios.

Nos anos subseqüentes, possibilitado pelo advento destas técnicas de elucidação empregando espectrometria de massas e procedimentos de ionização eficientes, especificamente o electrospray, obteve-se um grande avanço na análise de lipídios, permitindo se analisar desde mais triviais ácidos graxos até os mais complexos lipídios existentes (MURPHY *et al.*, 2001).

2.6.4 Análise de glicerofosfolipídios

2.6.4.1 Lipidomics

Como já mencionado anteriormente (item 2.3.1), *Lipidomics* é um campo emergente de pesquisa que tem por finalidade a caracterização das espécies moleculares de lipídios constituintes de matrizes biológicas. O crescimento deste segmento de pesquisa é resultado do avanço tecnológico relacionado à espectrometria de massas, tendo como principal responsável o acoplamento desta técnica com a ionização por electrospray e a cromatografia líquida de

alta eficiência, o que possibilitou, deste modo, ampliar exponencialmente o número de classes de lipídios analisados (MILNE *et al.*, 2006; WATSON, 2006; ZEHETHOFER e PINTO, 2008; WOLF e QUINN, 2008; ROBERTS *et al*., 2008; NAVAS-IGLESIAS *et al.*, 2009; KHALIL *et al.*, 2010).

Mais recentemente, o advento de instrumentos capazes de realizar espectrometria de massas sequencial possibilitou, adicionalmente, o detalhamento da estrutura da molécula permitindo a caracterização e determinação individualizada de lipídios em misturas complexas, vindo a suplantar as laboriosas tarefas de preparo de amostras e acelerar os processos analíticos. Dentro desta perspectiva vários protocolos que não necessitam de qualquer prévia separação cromatográfica de lipídios presentes em misturas complexas vêm sendo divulgados e, em sua maioria, consistem em diluir os extratos brutos em solventes e realizar a infusão direta no analisador de massa (CUI e THOMAS, 2009; YANG *et al*., 2009; HU *et al*., 2009; SIMAS *et al*., 2010).

Em geral, os métodos de infusão direta, sem qualquer separação cromatográfica prévia, podem ser divididos em dois grupos: *Shotgun lipidomics e Target lipidomics*. A primeira técnica usa a separação pelo próprio analisador de massas, sendo os lipídios separados devido as suas cargas inerentes, usando-se modos positivo ou negativo de varredura (scan), permitindo fazer um mapeamento das frações dos lipídios constituintes da mistura complexa. A segunda técnica baseia-se na seleção de categorias específicas de lipídios, usando experimentos de íons precursor e perda de fragmento neutro a partir de seus grupos funcionais característicos. Apesar destas técnicas, de infusão direta de extratos brutos, estarem encontrando diversas aplicações práticas, ensaios cromatográficos ainda são muito empregados na separação prévia de misturas complexas de lipídios, principalmente pelo fato da supressão iônica de alguns lipídios não poder ser totalmente eliminada, o que se deve a

presença de moléculas ionizáveis de diversas classes, presentes nos extratos brutos, que atuam como contra-íons e diminuem a ionização das moléculas de interesse. Devido a esta possível limitação, dependendo dos lipídios de interesse, normalmente são utilizados métodos cromatográficos preliminares, acoplados ou não, aos experimentos de espectrometria de massas (HAN e GROSS, 2005; SOMMER *et al*., 2006; SHUI *et al*., 2007; XING *et al*., 2007; RETRA *et al*., 2008; CHRISTIE, 2009; HU *et al*., 2009).

2.6.4.2 Separando glicerofosfolipídios

Glicerofosfolipídios vêm sendo separados por CLAE usando dois tipos de colunas cromatográficas, a de fase normal ou a de fase reversa (AITZETMULLER, 1975; JUNGALWALA *et al.*, 1975,1976,1977; HAMILTON e COMAI, 1984; ; KALUZNY *et al.*, 1985; CHRISTIE, 1992; HOVING, 1995; MYHER e KUKSIS, 1995).

CLAE em fase normal é usualmente empregada para prover a separação dos lipídios com base em suas polaridades, sendo a sílica a fase estacionária normalmente utilizada nas colunas cromatográficas. Utilizando-se eluentes apropriados, os lipídios podem ser separados em espécies não-polares, por exemplo: colesterol, colesterol ésteres, tri-, di- e mono-acilgliceróis e ácidos graxos; e polares, por exemplo: fosfolipídios, esfingolipídios e glicolipídios. Tal separação tem sua ação ocorrendo por mecanismos de adsorção, de modo que a diferença de polaridades dos lipídios presentes na amostra é o maior fator contribuindo para o sucesso da separação (ELLINGSON e ZIMMERMAN, 1987; ABIDI e MOUNTS, 1995; LESNEFSKY *et al.*, 2000; YOON e KIM, 2002; ZHANG *et al.*, 2005).

CLAE em fase reversa utiliza colunas contendo uma fase estacionária não-polar, geralmente um hidrocarboneto de cadeia C18 (n-octildecil) ou C8 (n-octil) quimicamente

ligado à sílica, que serve como suporte de fixação. O nome fase reversa é usado para descrever que a fase estacionária é menos polar do que a fase móvel utilizada nas eluições. A amostra é separada com base no mecanismo de partição e irá eluir dependendo da lipofilicidade de cada componente (CIMPAN, 2004; KONSTA, L. *et al*., 2010). A fase móvel em geral consiste de água, ou soluções aquosas, em conjunto com vários solventes miscíveis em água, por exemplo: metanol, etanol, iso-propanol, acetonitrila, tetrahidrofurano, dioxano, etc. (PATTON *et al.*, 1982 ; JACKSON *et al.*, 1984; ROBINS e PATTON, 1986 ; KIM e SALEM, 1990;BROUWERS *et al.*, 1998 ; LIN *et al.*, 1998).

Apesar da separação de glicerofosfolipídios presentes em matrizes biológicas ser relativamente morosa e não trivial, métodos analíticos usando CLAE acoplado a espectrometria de massas têm permitido uma específica determinação e uma fiel avaliação das diferentes espécies moleculares presentes. Entre estes métodos, a técnica de cromatografia líquida usando ionização por electrospray acoplada a espectrometria de massas sequencial (CLAE-IES-EMn), principalmente devido a sua alta sensibilidade e fácil procedimento de introdução da amostra, tem se tornado uma escolha para a avaliação de lipídios em geral e vem se desenvolvendo para análise de diferentes classes, subclasses e espécies individuais presentes nos mais variados extratos biológicos, permitindo ampliar a exploração de estruturas e processos de fragmentação (BYRDWELL, 2001; PULFER e MURPHY, 2003; GRIFFITHS, 2003; MILNE *et al.*, 2006; PETERSON e CUMMINGS, 2006; HSU e TURK, 2009; XIA e JAMAL, 2009; GUAM, 2009; NAKANISHI *et al.*, 2009, 2010).

2.6.4.3 Identificando glicerofosfolipídios

Após os glicerofosfolipídios serem separados por CLAE, eles devem ser identificados por espectrometria de massas com base em suas razões massa-carga. Neste ponto, a técnica usando IES-EMn, permite, sem fragmentações espúrias e indesejáveis, a identificação presuntiva inicial dos glicerofosfolipídios baseado em seus pesos moleculares. A partir deste ponto, se podem iniciar as avaliações subseqüentes visando obter informações estruturais da molécula e, desta forma, montando uma espécie de quebra-cabeças, identificar inequivocamente os glicerofosfolipídios em questão.

Apesar da aparente simplicidade da idéia acima colocada, a diversidade de radicais acil, alquil e dos grupos funcionais, que podem compor um glicerofosfolipídio, requer que seja realizada uma apurada investigação dos fragmentos obtidos, de modo a encontrar pistas que possam indicar, principalmente, a classe e as radicalizações dos glicerofosfolipídios sob análise. Nesta investigação podemos usar, a nosso favor, para obter os fragmentos característicos necessários às comparações, padrões de referência, bibliotecas de lipídios, programas e softwares, estando disponível na rede mundial de computadores alguns bancos de dados, tais como: Lipidmaps (www.lipidmaps.org); LipidBank (www.lipidbank.jp); Lipidomic Expertise Platform - LEP (www.lipidomics-expertise.de), que facilitam tal tarefa, confirmando íons e fragmentos característicos de inúmeros glicerofosfolipídios (HAIMI, *et al.*, 2006; HÜBNER, *et al.*, 2008; SONG, *et al.*, 2009; FAHY *et al.*, 2011).

2.6.4 Ionização e fragmentação de glicerofosfolipídios

Em geral, glicerofosfolipídios são prontamente ionizáveis quando submetidos à ionização por electrospray. Entretanto, a formação das espécies moleculares é governada pelo grupo funcional polar que distingue as várias espécies e pela propensão elétrica (QUADRO 4)

da molécula em perder ou ganhar uma carga quando submetida a um campo elétrico (HAN e GROSS, 2005; HSU e TURK, 2009).

QUADRO 4. Classificação de glicerofosfolipídios com base em suas tendências elétricas.

Grupo	Tendência elétrica	Principais Classes
Aniônicos	Possuem carga negativa em pH neutro	GPI, GPS, GPA, GPG
Fracamente aniônicos	Possuem carga negativa em pH alcalino	GPE, LPE
Neutros	Neutros em pH alcalino	GPC, LPC, SM

2.6.5.1 Glicerofosfolipídios neutros

a) Glicerofosfocolinas (GPC). É a espécie mais abundante de fosfolipídio neutro encontrada em células eucariontes, caracterizando-se pela presença de um átomo de nitrogênio quaternário com uma carga positiva que é neutralizada por uma carga negativa do grupo fosfato, sendo sempre ionizado prontamente, independentemente do pH da solução, formando abundantes adutos positivos (HSU *et al.*, 1998; PULFER e MURPHY, 2003; HAN e GROSS, 2005).

O nitrogênio quaternário é o responsável pela formação abundante de íons $[M+H]^+$, pois a protonação ocorre diretamente no ânion fosfato e, do mesmo modo, formações de adutos com metais alcalinos podem ser verificadas, principalmente com o sódio $[M+Na]^+$ e lítio $[M+Li]^+$ ou $[M-H+2Li]^+$ (HSU *et al.*, 1998; HSU e TURK, 2003; 2007; 2008; 2009).

A espectrometria de massas sequencial EM^2 do íon $[M+H]^+$ produz o fragmento m/z 184 característico (Figura 18), porém em relação à elucidação estrutural, a espectrometria sequencial de íons adutos protonados $[M+H]^+$ não permite uma fácil identificação dos grupos acil radicais existentes (HAN e GROSS, 1995; HSU *et al.*, 1998; MURPHY *et al.*, 2001;

PULFER e MURPHY, 2003; HSU e TURK, 2009).

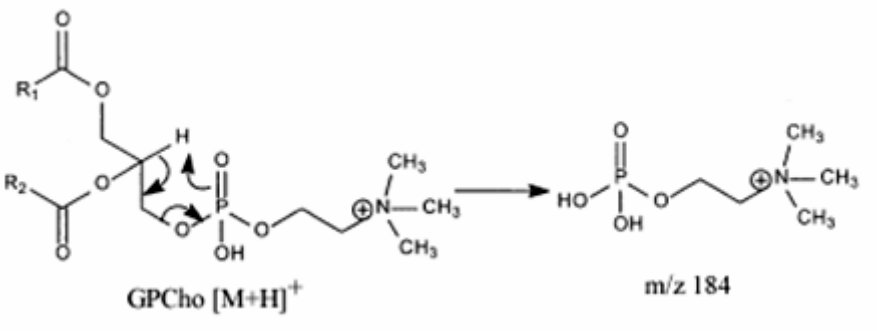


FIGURA 18. Fragmentação proposta para formação do íon m/z 184.
(Adaptado da Fonte: HSU e TURK, 2009).

Um procedimento sequencial tipo EM^2 utilizando adutos formados com ácido tri-fluoro-acético (TFA) e sais de potássio torna possível identificar grupos acil radicais presentes nas posições sn-1 e sn-2 com base na abundância dos fragmentos resultantes. Sendo o fragmento $[M+K+TFA–R_1COOH]^+$, que preserva o acil radical da posição sn-2, o mais abundante (Figura 19) (HO e HUANG, 2002; PULFER e MURPHY, 2003).

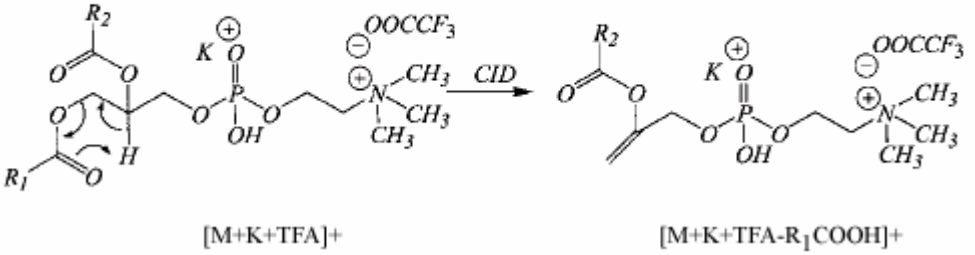


FIGURA 19. Mecanismo proposto de formação e fragmentação de adutos de K^+ e TFA.
(Fonte: PULFER e MURPHY, 2003)

A formação de adutos com Lítio $[M+Li]^+$ ou $[M–H+2Li]^+$, usando uma solução de LiOH, rendem boa abundância em modo positivo e permitem, por espectrometria sequencial

EM^2 (Figura 20), identificar os acil-radicais substituintes (HSU *et al.*, 1998).

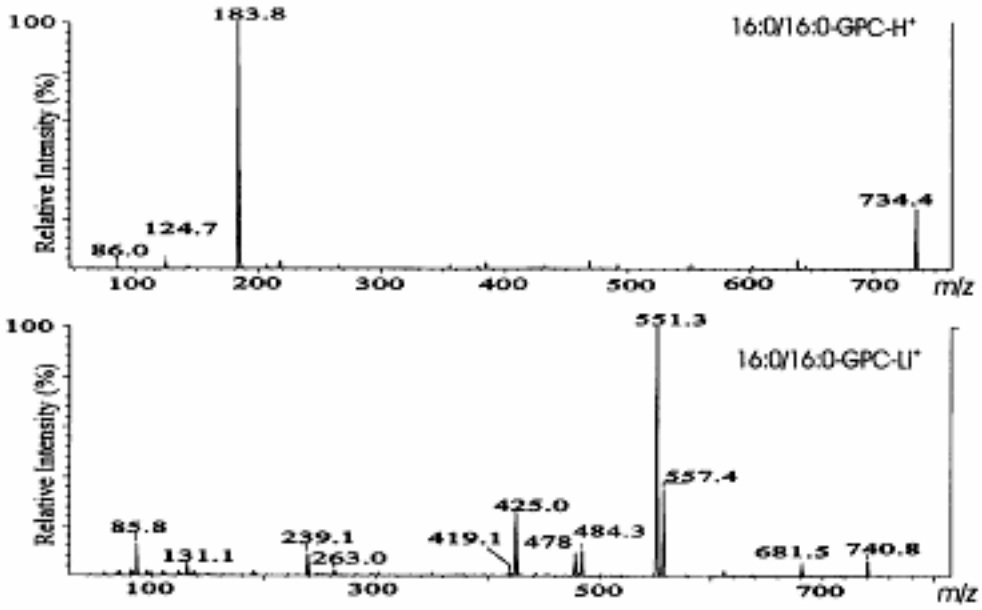


FIGURA 20. Espectros mostrando fragmentos observados para EM^2 de adutos $[M+H]^+$(superior) e $[M+Li]^+$ (inferior). Neste último pode ser observada a marcação do íon acílio m/z 239 derivado do palmitato.
(Fonte: HSU *et al.*, 1998).

Apesar da presença do nitrogênio quaternário, a ionização em modo negativo também pode ser alcançada pela formação de adutos com ânions formiato $[M+HCOO]^-$, acetato $[M+CH3COO]^-$ e cloreto $[M+Cl]^-$, rendendo após subseqüente fragmentação o íon $[M–15]^-$ resultante de uma de-metilação do grupo colina (KERWIN, *et al.*, 1994; MURPHY *et al.*, 2001; PULFER e MURPHY, 2003; HSU e TURK, 2009)

b) Lyso-glicerofosfocolinas (LPC). São importantes intermediários na síntese e metabolismo das glicerofosfocolinas, possuem uma hidroxila na posição sn-1 ou sn-2. Quando a hidroxila está na posição sn-2, a posição sn-1 é normalmente ocupada por um radical acil (éster) ou alquil éter (plasmanil) ou vinil éter (plasmalógeno ou plasmenil).

Estando a hidroxila na posição sn-1, a posição sn-2 é normalmente ocupada por um radical acil. LPC são responsáveis por alterar a função da membrana plasmática impedindo a formação das estruturas de bicamadas, mesmo quando presentes em pequenas quantidades.

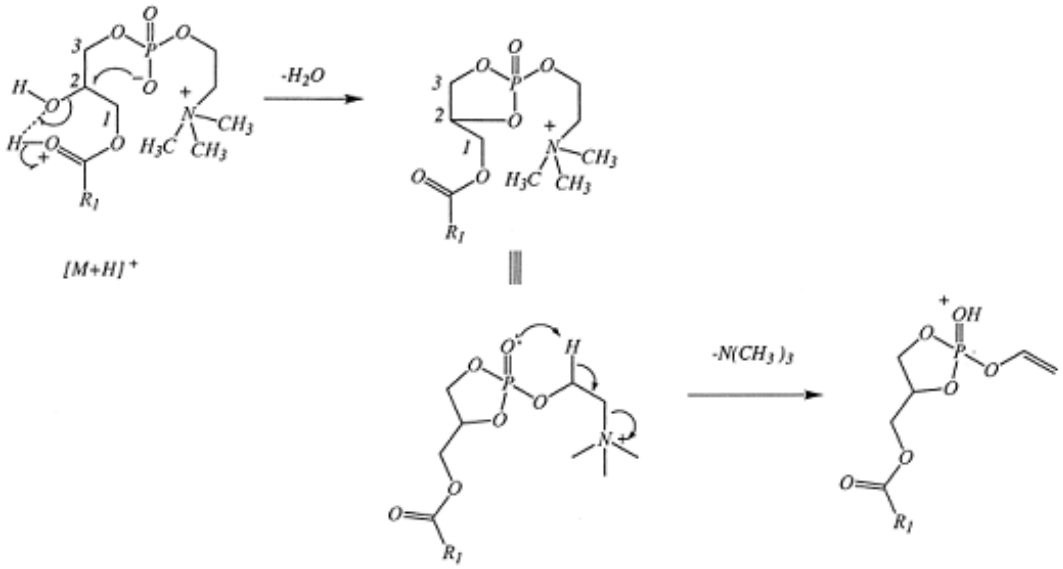


FIGURA 21. Proposta de mecanismo para a perda de água de LPC acil radicais**.**
(Adaptado da Fonte: KHASELEV e MURPHY, 2000)

A ionização do LPC por electrospray também forma adutos tipo $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, em modo positivo, e $[M-15]^-$ e $[M-OAc]^-$, em modo negativo. A espectrometria de massas sequencial fornece relevantes íons produtos com informações estruturais relevantes quando aplicada a adutos $[M+H]^+$, onde se verifica a perda de água $[M+H-H2O]^+$ (Figura 21), e aos adutos com Sódio $[M+Na]^+$, permitindo identificar a relação entre os íons produtos m/z 104, mais intenso para os sn-1 acil radicais, e m/z 147, mais intenso para os sn-2 substituintes (Figura 22). A hidroxila na posição sn-1 facilita a perda da trimetilamina, gerando um íon $[M+Na-59]^+$ que prontamente se decompõe para formar o íon m/z 147 (Figura 23). (HAN e GROSS, 1996; KHASELEV e MURPHY, 2000; MURPHY *et al.*, 2001).

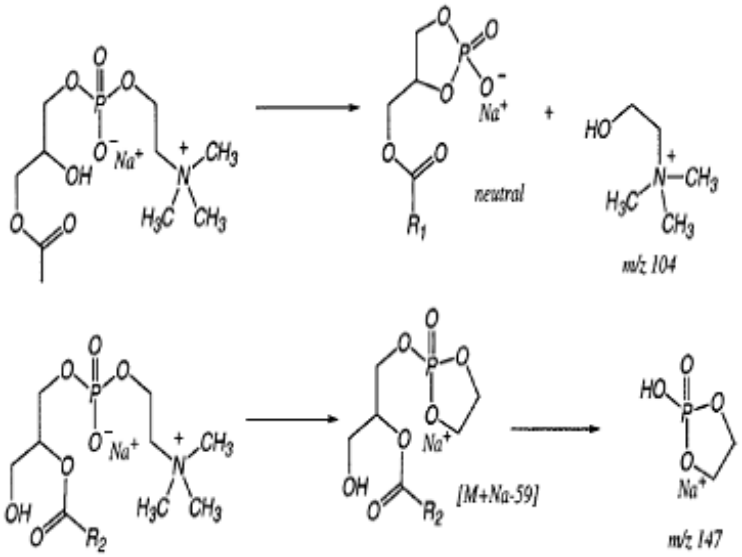


FIGURA 22. Proposta de formação de adutos de sódio. Fragmentos preferenciais m/z 104 e m/z 147 para LPC sn-1 e sn-2 acil radicais respectivamente.
(Adaptado da Fonte: MURPHY et al., 2001)

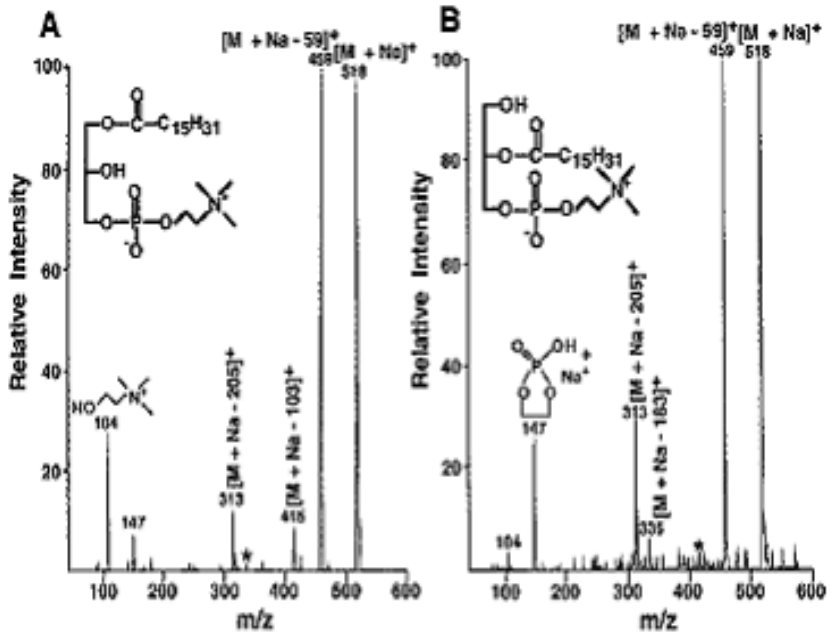


FIGURA 23. Espectro de massas de LPC regioisômeros.
A) sn-1 acil radical e B) sn-2 acil radical.
(Adaptado da Fonte: HAN e GROSS, 1996)

c) Esfingomielinas (SM). Diferentemente dos glicerofosfolipídios que possuem dois ácidos graxos unidos a uma molécula de glicerol, os esfingofosfolipídios contêm uma ceramida, que é uma molécula formada pela união de dois ácidos graxos com uma serina. A união de uma serina com um dos ácidos graxos forma o aminoálcool chamado esfingosina ou esfingol. A serina se forma da agregação de um ácido graxo com a esfingosina. O esfingofosfolipídio existente nas células é a esfingomielina, originada da união da ceramida com a fosfocolina. Devido ao radical fosfocolina rende também um fragmento característico m/z 184.

2.6.5.2 Glicerofosfolipídios aniônicos e fracamente aniônicos

Glicerofosfolipídios aniônicos, tais como glicerofosfoinositol (GPI), glicerofosfoserina (GPS), glicerofosfoglicerol (GPG), ácido glicerofosfórico (GPA), contém uma ou mais cargas negativas em meio com pH neutro, gerando intensos íons moleculares em modo negativo.

Em modo negativo, GPI pode se identificado pela formação de um íon diagnóstico (m/z 241), correspondendo ao fragmento fosfoinositol; o GPS pode se identificado pela formação do íon $(M-87)^-$, devido à perda de um fragmento neutro; o GPG e o GPA podem ser diagnosticados pela formação do íon m/z 153, correspondente ao fragmento glicerofosfato.

Já os glicerofosfolipídios fracamente aniônicos, glicerofosfoetanolamina (GPE) e lyso-glicerofosfoetanolamina (LPE), somente possuem uma carga negativa quando induzidos a formar a sua base conjugada em pH alcalino. Embora gerem íons negativos em pH neutro, sua ionização, nesta condição, é substancialmente menor se comparada aos dos glicerofosfolipídios aniônicos. Contudo, sua ionização em modo positivo $(M+H)^+$ permite

gerar o fragmento $(M+H-141)^+$, devido à perda do fragmento neutro fosfoetanolamina (PULFER E MURPHY, 2003).

A adição de LiOH em metanol gera a deprotonação da amina quartenária em GPE e LPE, aumentando significativamente a intensidade dos íons moleculares formados e conseqüentemente uma boa visualização do fragmento característico $(M+Li-43)^+$ resultante da perda do fragmento neutro CH2CH2NH (azeridina), ocorrendo também a formação dos fragmentos (M+Li-123)+ e (M+Li-141), correspondendo a perda de parte ou de todo o grupo polar (HO *et al*., 2003).

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Validação da proposição

Conforme descrito na Introdução deste trabalho, tem-se como proposta utilizar glicerofosfolipídios sintéticos como agentes biocidas na composição de tintas anti-incrustantes produzidas pelo setor industrial de revestimentos e tintas subaquáticas.

Para validação da presente proposição, glicerofosfolipídios sintéticos, obtidos por síntese química a partir de lecitinas de soja, e glicerofosfolipídios naturais, extraídos de esponjas marinhas, foram avaliados quanto a sua eficácia anti-incrustante por meio de ensaios laboratoriais e de campo.

Nos ensaios laboratoriais, realizados no Laboratório de Biofilme do IEAPM – Marinha do Brasil, foi avaliada a ação biocida dos glicerofosfolipídios sobre o desenvolvimento de micro-organismos marinhos (microalgas e bactérias) precursores e presentes na formação do biofilme marinho.

Nos testes de campo, placas metálicas revestidas com diferentes esquemas de pintura (corpos de prova), preparados pela empresa International Tintas – Akzo Nobel, foram mantidas submersas na Baía da Guanabara – RJ, sendo retiradas em diferentes intervalos de tempo, variando de dias a meses, e então avaliadas em relação às diferentes espécies de macro-organismos marinhos aderidos e seus percentuais de cobertura. Esclarece-se que, devido às diferenças entre as quantidades disponíveis e necessárias para os testes de campo, não foi possível trabalhar com os extratos das esponjas marinhas, sendo empregado somente glicerofosfolipídios sintetizados, os quais foram incorporados em matrizes de tinta base e,

então, avaliados quanto a ação anti-incrustante comparativamente a outros esquemas de pintura.

3.2 Materiais empregados

3.2.1 Reagentes, solventes, padrões e outros produtos

Alumina neutra (Merck); Acetato de etila LC (Tedia); Ácido acético P.A (Fluka.); Ácido fórmico ACS (Sigma Aldrich); Água Milli-Q; Clorofórmio Absolv (Tedia); Diclorometano GC (Tedia); Gás Hélio 5.0 (White Martins); Isopropanol Absolv (Tedia); Lecitinas de soja (Akros Organics); Metanol LC-MS (Tedia); Meio de Cultura Conway; Sílica (Merck); Sódio metálico (Vetec); Sulfato de cobre P.A (Vetec); β-acetyl-γ-O-hexadecyl-L-α-phosphotidylcholine (Sigma Aldrich - P4904); 1-O-palmityl-sn-glycero-3-phosphocholine (Sigma Aldrich - L5016); 1-2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Sigma Aldrich - P0763); 1-2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Sigma Aldrich - P2663); 1-2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Sigma Aldrich - P1348).

3.2.2 Equipamentos

Agitador eletro-mecânico tipo haste e hélice; Agitador magnético; Agitador tipo vortex; Banho refrigerante; Bomba de vácuo; Bomba de infusão micro-vazão (Kd Scientific); Câmaras de Neubauer para microscopia; Cromatógrafo a líquido LC 20AD UFLC Prominence (Shimadzu); Espectrômetro de massa tipo Iontrap ESQUIRE 6000 (Bruker Daltonics) equipado com nebulizador tipo electrospray; Estufa de secagem; Estufa incubadora

tipo foto-período; Lâmpada de ultra violeta 100W; Microcentrífuga Biofuge Fresco (Heraus); Microplacas em poliestireno com 96 poços; Microscópio de epifluorescência BX51 (Olympus); Reator de vidro; Roto-evaporador.

3.3 Métodos empregados

3.3.1 Síntese química dos Glicerofosfolipídios PAF-análogos.

Cabe ressaltar que, neste trabalho, maiores quantidades de glicerofosfolipídios análogos do PAF foram necessárias para preparação das tintas testadas; quantidades estas que não seriam viáveis obter por extração dos organismos marinhos. Deste modo, para dispor de maiores quantidades, foi desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Síntese e Análise de Produtos Estratégicos – LASAPE, Instituto de Química (UFRJ), uma rota de síntese a partir da metanólise de lecitinas de soja, visando à obtenção de lyso-GPC do tipo 1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolina e/ou 1-O-acil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, as quais, em uma segunda etapa, foram submetidas a reação de alquilação, sendo então obtidas substâncias com estruturas químicas semelhantes aos compostos Lyso-PAF-análogos (BATISTA *et al.*, 2010 a,b; 2011).

3.3.1.1 Reação de metanólise (1ª síntese)

A 1ª síntese envolveu o tratamento da lecitina de soja com uma solução de metóxido de sódio em metanol (reação representada pelo esquema mostrado na figura 24), sendo realizada sob agitação mecânica, sem aquecimento, em um reator de vidro de 2000mL (cinco

juntas 24x40mm) equipado com um condensador de refluxo com água fria e um agitador mecânico tipo haste e hélice. Foram utilizados 1000mL de metanol, 3g de sódio metálico e 40g de lecitina de soja. A mistura reacional foi deixada sob forte agitação durante 72 horas a temperatura ambiente (~ 25ºC). Para retirada do produto final de reação, transferiu-se a mistura reacional para um béquer e efetuou-se uma filtração por gravidade em papel de filtro, sendo obtido um produto sólido e um resíduo oleoso.

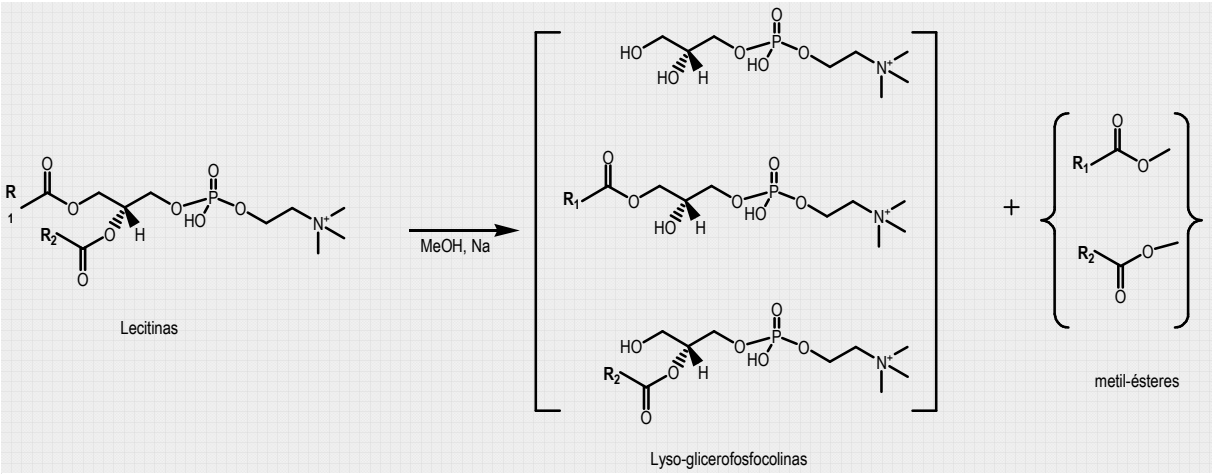


FIGURA 24. Esquema representando possíveis produtos da reação de metanólise a partir da lecitina de soja. Produto principal [lyso-glicerofosfocolinas]. Produto secundário {metil-ésteres}.

FIGURA 25. Aspecto físico do produto principal obtido na 1ª síntese. (Reação de metanólise).

O sólido filtrado foi submetido à remoção de substâncias voláteis utilizando um dessecador de vidro sob vácuo. O produto sólido final continha 33,4g tendo um aspecto

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

levemente amarelado, consistência macia e odor levemente rançoso (Figura 25), o resíduo oleoso resultante, após completa evaporação do metanol, forneceu 6g de material.

3.3.1.2 Reação de alquilação (2ª síntese)

A 2ª síntese foi realizada em um balão sob agitação magnética, onde foram adicionados uma fração do sólido produto da reação de metanólise (1ª síntese), 1,2-dicloroetano, 1-bromo-hexadecano e solução aquosa de hidróxido de sódio.

FIGURA 26. Aspecto físico de uma amostra do produto principal obtido na 2ª síntese (Reação de alquilação).

A reação foi mantida sob forte agitação por 2 horas. Após este tempo, efetuou-se a remoção do dicloroetano, usando um evaporador rotatório, e se adicionou uma mistura de metanol e hidróxido de amônio em excesso à reação. Manteve-se a reação sob agitação por mais 2 horas, e, em seguida, evaporou-se o metanol, obtendo-se um produto pastoso de cor

amarela com leve tonalidade marron (Figura 26). Em seguida, extraiu-se a reação com diclorometano e lavou-se com água destilada. Adicionou-se à fase orgânica obtida sulfato de sódio anidro, o solvente orgânico foi evaporado, sendo obtido os produtos alquilados com rendimento de 60% . O esquema da figura 27 ilustra a reação de alquilação usando o 1-bromo-hexadecano.

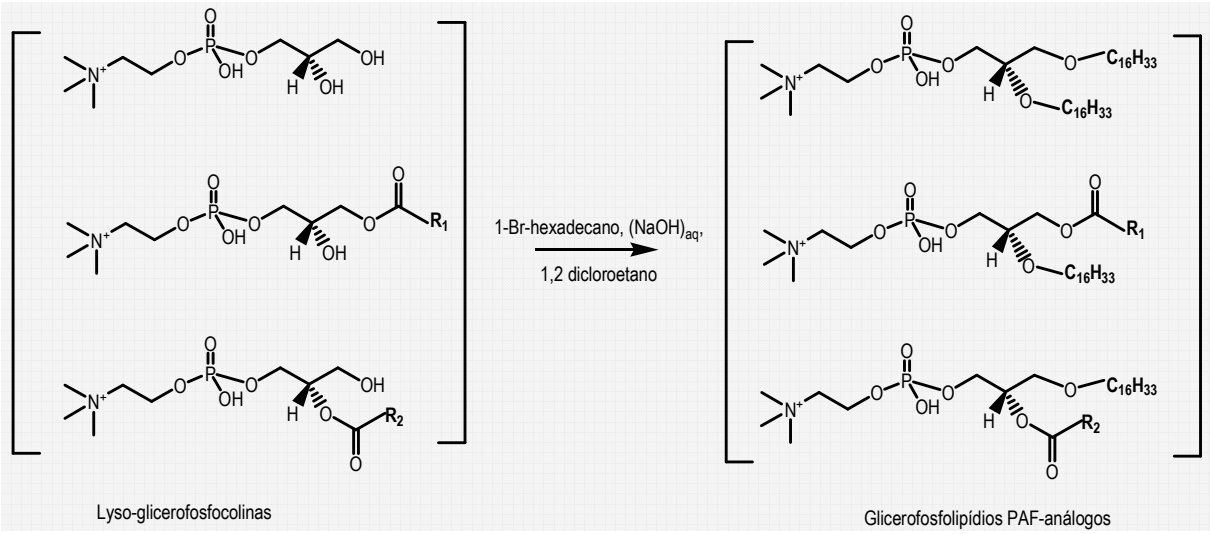


FIGURA 27. Esquema representando possíveis produtos do tipo PAF-análogos obtidos por reação de alquilação a partir de lyso-glicerofosfocolinas

3.3.2 Extração de glicerofosfolipídios de esponjas marinhas

3.3.2.1 Espécies ensaiadas e pré-condicionamento

Cinco espécies de esponjas marinhas (Figura 28): *Amphimedon viridis*; *Aplysina fulva*; *Arenosclera brasiliensis*; *Darwinella sp.* e *Geodia corticostylifera*, foram coletadas manualmente na região de Arraial do Cabo (23ºS 42ºW), sendo identificadas pela Divisão de

Bioincrustação do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) – Marinha do Brasil.

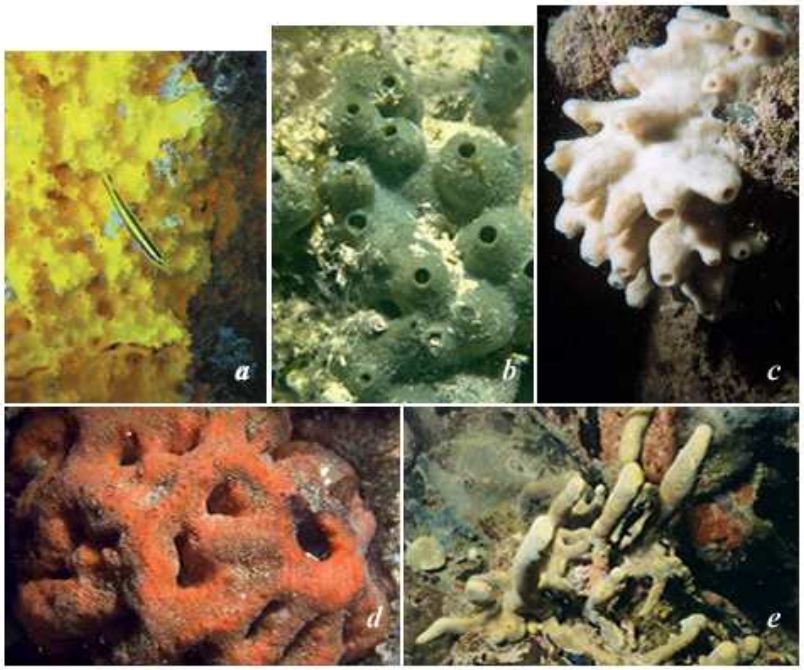


FIGURA 28. Espécies de esponjas marinhas usadas para extração de glicerofosfolipídios. a) ***Darwinella sp.***; b) ***Amphimedon v.***; c) ***Aresnosclera b.***; d) ***Geodia c.***; e - ***Aplysina f.***
(Adaptado da Fonte: www.poriferabrasil.mn.ufrj.br)

Para o processo de extração com solventes, cada espécie de esponja foi separada em dois grupos. O primeiro grupo de cada espécie não sofreu nenhum pré-condicionamento e teve iniciado imediatamente o seu processo de extração, servindo e sendo designado como grupo de referência. O segundo grupo foi submetido a um processo de indução ao estresse, sendo transferido para recipientes contendo água do mar filtrada e mantido sob aeração forçada, permanecendo sob inanição por cerca de 36 horas, sendo designado por grupo estressado.

3.3.2.2 Processos de extração e de fracionamento dos extratos

Os organismos foram submetidos à extração tendo como parâmetro o método de Folchs (FOLCHS *et al.* 1951, 1957), o qual permite que todas as substâncias lipóides, *i.e* tri, di, e monoacilgliceróis, esteróis, ácidos graxos e fosfolipídios sejam extraídas, sendo efetuado a substituição do clorofórmio, originalmente utilizado, por diclorometano (CHRISTIE, 1993; HALL e MURPHY, 1998; DROUILLARD *et al.*, 2004).

No processo de extração, os organismos foram levemente triturados (liquidificador) e transferidos para béqueres, sendo adicionados de uma solução de diclorometano-metanol (2:1) v/v, na proporção de 5ml de solução para cada grama de material úmido, e então, posto sob agitação mecânica por 2 horas para extrair os lipídios aderidos aos tecidos (FOLCHS *et al.*, 1957; DREYFUS *et al.*, 1997; AMETAJ *et al.*, 2003). Terminado a agitação, todo o material foi transferido para um funil de Buchner e filtrado sob vácuo (Figura 29).

FIGURA 29. Procedimentos de agitação mecânica e filtração sob vácuo.

Uma parte do resíduo sólido foi seca em estufa, 105ºC por 24 horas, e pesada para futuras comparações sobre teores de umidade (TABELA 1).

Os filtratos foram concentrados em roto-evaporador sob vácuo, T<50ºC, sendo os extratos brutos transferidos para vials e armazenados sob refrigeração T<-20ºC.

TABELA 1. Teor de umidade encontrado nas diferentes esponjas ensaiadas.

Esponja	peso úmido (g)	peso seco (g)	Umidade (%)
Amphimedon v. (referência)	1,649	0,190	88,47
Amphimedon v. (estressada)	2,625	0,400	84,76
Aplysina f. (referência)	3,263	0,444	86,39
Aplysina f. (estressada**)**	6,355	0,678	89,33
Arenosclera b. (referência)	4,597	0,740	83,90
Arenosclera b. (estressada)	0,958	0,135	85,90
Darwinella sp. (referência)	3,546	0,378	89,34
Darwinella sp. (estressada)	2,013	0,244	87,87
Geodia c. (referência)	2,139	0,532	75,12
Geodia c. (estressada)	3,949	0,878	77,76

Visando o isolamento da fração polar, a qual contém os glicerofosfolipídios de interesse, cada um dos extratos foi fracionado usando uma coluna cromatográfica de vidro (250ml) com diâmetro de 1 cm, preparada com 10 gramas de alumina em hexano (parte inferior do leito) recobertas, após empacotamento, com 1 grama de sílica (parte superior do leito) para reter compostos extremamente polares e indesejáveis.

Para realização do fracionamento, 1ml de cada extrato bruto (Figura 30) foi transferido para um tubo de ensaio tipo Eppendorf com capacidade para 2ml, adicionado de 1ml de uma solução de metanol, clorofórmio e água (2:1:1 v/v), homogeneizado em agitador tipo vortex e centrifugado a 13000rpm por 10 minutos.

Uma alíquota de 1ml do extrato centrifugado foi então transferido para a coluna cromatográfica para início do seguinte processo de fracionamento com solventes:

a) Primeira fração (F1). Eluída com 100ml de uma solução de hexano e diclorometano (4:1) v/v, visando a eluição de possíveis ácidos graxos livres e lipídios neutros;

b) Segunda fração (F2). Eluída com 100ml de uma solução de diclorometano e acetona na proporção de 1:2 (v/v), visando a eluição de lipídios neutros (pigmentos, triglicerídeos, esteróis) e glicolipídios presentes;

c) Terceira fração (F3). Eluída com 100ml de uma solução de acetona e metanol, na proporção de 2:7 (v/v), visando eluir os glicerofosfolipídios de interesse.

FIGURA 30. Extratos brutos das esponjas marinhas. Pares (referência e estressada). na seqüência a partir da esquerda: *Geodia Corticostylifera; Darwinella sp; Arenosclera brasiliensis e Aplysina fulva*. Extratos da esponja *Amphimedon viridis* não apresentado.

As frações eluídas foram coletadas em frascos de 250ml e imediatamente concentradas em roto-evaporador sob vácuo (T < 50ºC) até um volume de aproximadamente 2ml, sendo posteriormente transferidas para vials e guardadas sob refrigeração (T < -20ºC) para posterior análise química.

3.3.3 Avaliação de performance

3.3.3.1 Ensaios laboratoriais com bactérias marinhas

Foi efetuado um teste para avaliar a ação bactericida contra cinco espécies de bactérias marinhas: *Shewanella putrefaciens*; *Vibrio estuarians*; *Pseudoalteromonas elyakovii*; *Polibacter irgensi* e *Pseudomonas fluorescens*. Para isto os produtos das sínteses obtidos das reações de metanólise e de alquilação, os extratos referência e estressado das esponjas marinhas *Geodia corticostylifera* e *Arenosclera brasiliensis*, e uma solução de sulfato de cobre (controle) foram avaliados comparativamente quanto à inibição imposta ao crescimento bacteriano.

Nesta avaliação foram preparadas soluções em metanol dos extratos, dos produtos de síntese e do controle em concentrações de 0,05; 0,5; 5; 10; 50 e 100 (mg/L), e dos meios de cultura de cada espécie de bactéria (0,5% peptona em água do mar) contendo aproximadamente $2x10^8$cel/ml. Para cada concentração foram utilizados 3 microplacas em poliestireno com 96 poços (12 x 8), fundo arredondado, perfazendo 6x6 poços para cada produto ensaiado, sendo utilizado um total geral de 90 microplacas (3 microplacas x 6 concentrações x 5 espécies de bactérias) (QUADRO 5).

QUADRO 5. Esquema da disposição das soluções nas microplacas
(2x6 replicatas e 8 produtos testados por microplaca)

SUBSTÂNCIAS \ POÇOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Controle	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Branco	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Produto da 1ª Síntese	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Produto da 2ª Síntese	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Esponja *Arenosclera* referencia	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Esponja *Arenosclera* estressada	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Esponja *Geodia* referencia	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Esponja *Geodia* estressada	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖

Para cada poço, foram transferidos univocamente 50µl de cada solução. Posteriormente as microplacas foram tratadas sob luz ultravioleta direta (100 watts) visando

sua esterilização e a evaporação total do metanol (Figura 31). Após a esterilização, as microplacas foram inoculadas, individualmente, com os meios de cultura de cada espécie de bactéria (50 µl para cada poço).

Após a inoculação, as microplacas foram colocadas em uma câmara incubadora a uma temperatura de 30ºC, na ausência de luz. Após 48 horas, as microplacas foram retiradas e avaliadas quanto à inibição do crescimento bacteriano, sendo o produto ensaiado considerado ativo quando verificado uma inibição de crescimento mínimo em 4 poços em cada 6 replicatas (AMSTERDAM, 1996; HELLIO *et al.*, 2002).

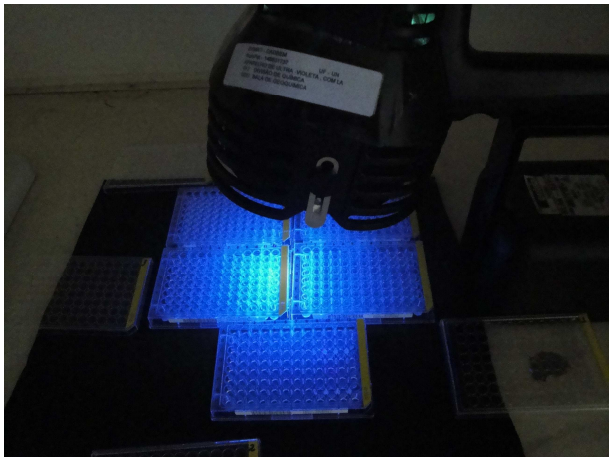


FIGURA 31. Esterilização das microplacas e evaporação do solvente sob luz UV.

3.3.3.2 Ensaios laboratoriais com microalgas marinhas

Estes ensaios visam testar a atividade biocida do produto da 2ª síntese contra o crescimento de três espécies de microalgas representativas dos maiores grupos de organismos presentes na formação de biofilmes marinhos; uma espécie de Prasinofícea[30], a *Tetraselmis*

[30] Microalga verde flagelada, podendo existir isoladamente ou na forma de colônias.

striata; uma espécie de Clorofícea[31], a *Dunaliella tertiolecta* e uma espécie de Diatomácea[32], a *Skeletonema costatum*. A atividade biocida do produto de síntese foi comparada com aquela apresentada pelo sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_20$), aqui usado devido a sua melhor solubilidade em água em comparação ao óxido cuproso normalmente usado em tintas anti-incrustantes.

O experimento foi realizado com 6 replicatas, onde 15ml de meio de cultura Conway (LOURENÇO, 2006, p.204) foram colocados em tubos de ensaio e inoculados com $5x10^5$cel/ml das espécies de microalgas supracitadas. Os frascos contendo as microalgas foram colocados em uma incubadora a 18ºC com ciclo de 12h luz /12h escuro sendo avaliadas quanto ao seu desenvolvimento.

Tubos sem qualquer produto de síntese ou composto biocida, contendo somente os solventes usados no preparo das amostras – metanol, diclorometano e água, na proporção 2:1:1(v/v) – foram usados como controle negativo. O produto de síntese foi testado em uma concentração de 300 µg/mL.

A série de tubos contendo $CuSO_4$ (10µg/mL) foi utilizada como padrão algicida (controle positivo). O crescimento celular foi estimado diariamente, durante cinco dias, por contagem direta das células empregando-se uma Câmara de Neubauer[33].

3.3.3.3Testes de campo

3.3.3.3.a Tintas a base de cobre

[31] Classe de algas verdes distintas em sua morfologia estrutural contendo de um à centenas de flagelos.
[32] Organismos unicelulares tendo como característica uma carapaça ou parede silicosa chamada frústula.
[33] Tipo específico de lâminas usadas em microscopia, contendo ranhuras, onde, após a colocação da lamínula, permitem o seu preenchimento com um volume pré-determinado de líquido, possibilitando quantificar e avaliar a concentração das células em suspensão.

Na realização dos testes de campo usando o produto da 1ª síntese (Reação de metanólise) como agente anti-incrustante, foi utilizado um procedimento comparativo entre quatro diferentes revestimentos a base de cobre, com três réplicas cada, aplicados em placas de aço carbono (corpos-de-prova) medindo (15x30)cm^2 (Figura 32).

FIGURA 32. Exemplos de corpos-de-prova utilizados nos testes de campo com o produto da 1ª síntese Face sem tinta (esquerda) e com tinta anti-incrustante (direita).

Corpos de prova preparados pela empresa International Tintas – Akzo Nobel.

Os corpos-de-prova foram mantidos submersos diretamente na baía da Guanabara-RJ, usando-se balsas flutuantes, sendo avaliados semanalmente, por um período consecutivo de 3 meses, quanto à presença de organismos macro-incrustantes e por 8 meses quanto à estabilidade do processo de sucessão da bioincrustação.

Todos os corpos-de-prova foram aprontados pela empresa International Tintas – Akzo Nobel, empregando a tinta base normalmente utilizada na produção de uma tinta anti-incrustante, a base de óxido cuproso e aditivos biocidas (boosters), de sua linha comercial, tendo sido preparados os seguintes revestimentos:

a) **Revestimento 1** - Tinta base tendo o produto de síntese como biocida principal, não havendo a presença de óxido cuproso ou nenhum outro biocida;

b) **Revestimento 2** – Controle positivo. Tinta anti-incrustante comercial (International Tintas – Akzo Nobel) com óxido cuproso (biocida principal) e aditivos biocidas (boosters);

c) **Revestimento 3** - Tinta base contendo óxido cuproso como biocida principal e o produto de síntese utilizado como biocida acessório substituindo os aditivos biocidas (boosters), e

d) **Revestimento 4 - Controle negativo**- Tinta base sem nenhum biocida.

O registro dos macro-organismos, realizado na Divisão de Biotecnologia Marinha do IEAPM, foi feito no menor nível taxonômico possível, tanto para as macroalgas quanto para os invertebrados (QUADRO 6).

QUADRO 6: Sinopse taxonômica, tipos morfo-funcionais e grupos das espécies registradas

Reino	Divisão/Filo	Classe	Ordem	Familia	Tipo / Grupo
Plantae	*Chlorophyta*	*Chlorophyceae*	*Ulvales*	*Ulvaceae*	*Foliácea*
	Phaeophyta	*Phaeophyceae*	*Ectocarpales*	*Ectocarpaceae*	Filamentosa parda
	Rhodophyta	-	*Ceramiales*	*Ceramiaceae*	Filamentosa Vermelhas
Animalia	*Cnidaria*	*Hydrozoa*	*Hydroida*	*Campanulariidae*	*Obelia dichotoma (Linnaeus, 1758)*
	Anthozoa		*Actiniaria*	*Actiniidae*	Anêmonas
	Annelida	*Polychaeta*	*Canalipalpata*	*Serpulidae*	*Serpulídeos*
	Arthropoda	*Cirripedia*	*Thoracica*	*Balanidae*	*Balanídeos*
	Ectoprocta	*Gymnolemata*	*Cheilostomata*	*Bugulidae*	*Bugula neritina*
	Chordata	*Ascidiacea*	*Stolidobranchia*	*Styelidae*	*Styela plicata*

A análise da cobertura da comunidade incrustante, realizado no Laboratório de Bioincrustação do IEAPM, foi efetuada durante três meses por meio de fotografia digital, dos dois lados de cada corpo-de-prova. As fotografias foram analisadas no programa Coral Point Count, sendo subdivididas em uma grade de 100 pontos (2x1)cm^2 (KOHLER e GILL, 2006). Após a seleção da imagem fez-se a contagem e o registro dos macro-organismos incrustantes referente aos pontos de interseção marcados (Figura 33).

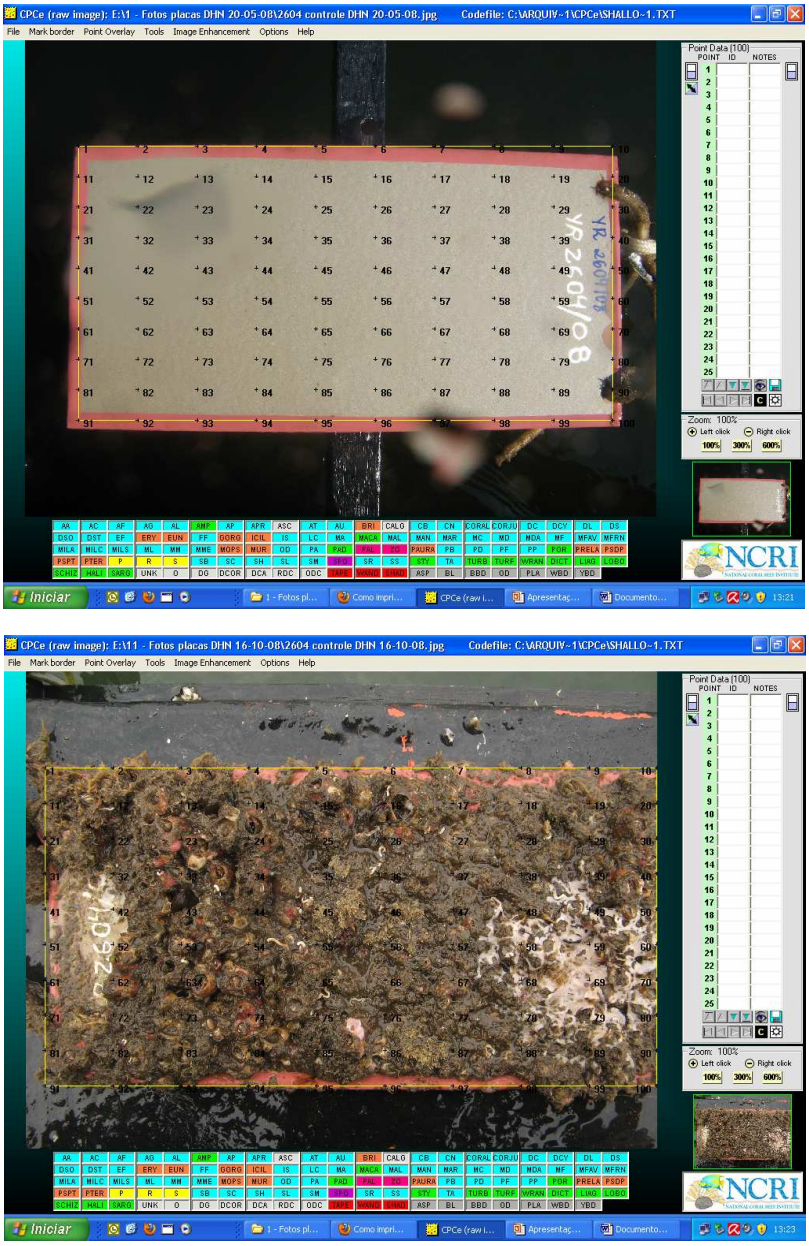


FIGURA 33. Programa Coral Point Count. Imagem superior mostrando aplicação de uma grade de 100 pontos. Imagem inferior mostrando uma placa sendo avaliada.

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

3.3.3.3.b Tintas isentas de cobre

Os testes de campo usando o produto da 2ª síntese, foram realizados pela empresa International Tintas – Akzo Nobel, sendo utilizado um procedimento comparativo entre quatro diferentes revestimentos anti-incrustante e um controle, com duas réplicas cada, aplicados em placas de aço carbono (corpos-de-prova) medindo (15cm x 30cm). Os corpos-de-prova foram mantidos submersos diretamente na baía de Guanabara-RJ, usando-se balsas flutuantes, sendo avaliados, quanto à presença de limo e cracas, depois de passado um período de três semanas e, complementarmente, após oito semanas de imersão.

Todos os corpos-de-prova foram aprontados pela empresa International Tintas – Akzo Nobel, empregando uma tinta base isenta de cobre e aditivos biocidas (boosters), de sua linha comercial, tendo sido preparados os seguintes revestimentos:

a) **Revestimento A** – Tinta anti-incrustante comercial *Mícron premium*[34] (isenta de cobre) tendo o produto da 2ª síntese (5% p/p) mais o biocida *Econea*[35] de linha comercial (2% p/p) como biocidas coadjuvantes;

b) **Revestimento B** – Tinta anti-incrustante comercial *Mícron Premium* tendo somente o produto da 2ª síntese (5% p/p) como biocida coadjuvante;

c) **Revestimento C** - Tinta anti-incrustante comercial *Mícron Premium* tendo somente o biocida *Econea* (2% p/p) como biocida coadjuvante;

d) **Revestimento D** - Tinta anti-incrustante comercial *Mícron Premium* tendo o produto da 2ª síntese (10% p/p) mais o biocida *Econea* de linha comercial (2% p/p) como biocidas coadjuvantes; e

[34] www.akzonobel.com/br/marcas_e_produtos/product_finder_detail.aspx?id=7590. Acesso em: jan2012.
[35] www.janssenpmp.com/bgdisplay.jhtml?itemname=econea_about. Acesso em: jan2012.

e) Controle sem anti-incrustante – Tinta marítima anticorrosiva *Intertuf Vinyl*[36]

3.3.4 Análise química. Avaliações preliminares das composições

3.3.4.1 Escolha da fase móvel para uso na CLAE.

As condições operacionais do sistema de cromatografia líquida foram configuradas após a realização de testes preliminares para escolha da fase móvel. Estes testes tiveram como diretiva inicial o emprego de composições de solventes normalmente usados para corridas com lipídios, óleos, fosfolipídios, etc., tendo sido escolhido para formarem a composição da fase móvel, devido a suas características de miscibilidade e força de eluição, os solventes: Tetrahidrofurano (THF); Metanol; e Água, que teve como modificador o ácido trifluoroacético (TFA) 0,5% (v/v), usado para diminuição de possíveis efeitos de supressão iônica (SADEK, 2002; MEYER, 2004).

Após a realização de algumas avaliações exploratórias, optou-se pela configuração utilizada na corrida VII, assinalada no triângulo de seletividade (Figura 34), com uma composição percentual inicial (15/30/55), trabalhando em modo gradiente com uma vazão inicial de 0.2 mL/min, mantida por 3 minutos, alcançando uma composição final de (00/12/88) aos 15 minutos e uma vazão de 0,1mL/min aos 20 minutos, sendo mantido tais parâmetros até um tempo final de corrida de 30 minutos. Após o fim da corrida, verificou-se a necessidade de 10 minutos para a estabilização da linha base do sistema.

[36] www.akzonobel.com/br/marcas_e_produtos/product_finder_detail.aspx?id=7574. Acesso em: jan2012

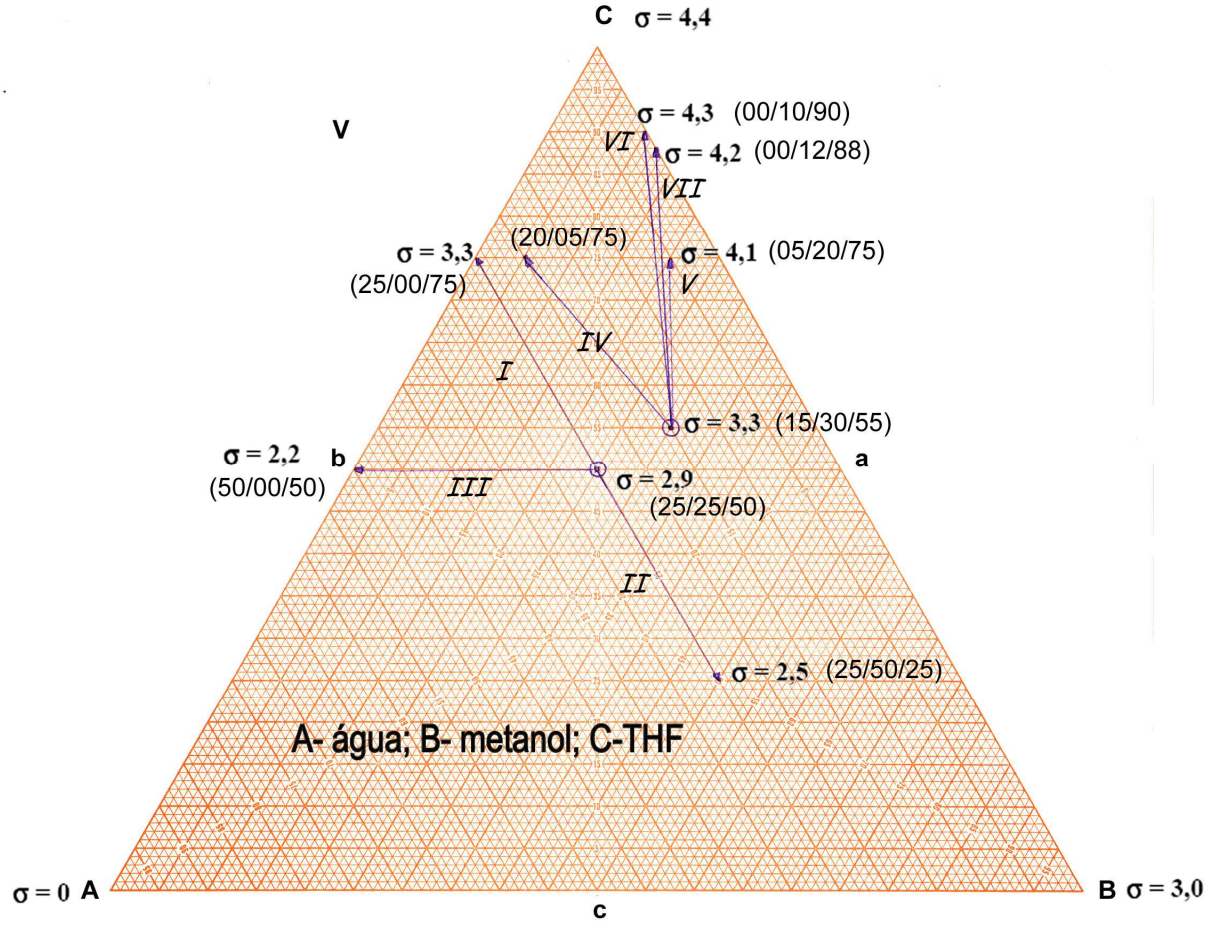


FIGURA 34. Triangulo de seletividade apresentando as principais corridas exploratórias usando mistura de solventes (água / metanol / THF) a diferentes composições percentuais e Força de eluição (σ). Corrida VII foi escolhida por apresentar uma melhor relação entre a separação das amostras ensaiadas versus tempo total corrida.

3.3.4.2 Varredura dos íons moleculares de interesse

Visando identificar seus principais componentes e seus tempos de retenção, as amostras sob análise – padrões de glicerofosfolipídios; matéria-prima (lecitina de soja); produtos de síntese e cada uma das frações dos extratos das esponjas marinhas – foram previamente dissolvidas e diluídas em misturas de água, metanol e tetrahidrofurano (THF) e aciduladas com ácido fórmico, sendo injetadas manualmente no cromatógrafo a líquido (injetor Rheodyne alça de 20 μl), o qual foi configurado sob as seguintes condições

operacionais: coluna cromatográfica tipo C18 marca Thermo (5µm), 250x2 mm; fase móvel: (Água [TFA 0.5% v/v] / MeOH / THF), modo gradiente conforme descrito no item 3.3.4.1.

A linha de efluentes foi direcionada para um espectrômetro de massas do tipo iontrap (Figura 35), equipado com um eletronebulizador ortogonal, trabalhando sob as seguintes condições operacionais: modo positivo, varredura m/z (150-950); agulha capilar a -4.0KV; fluxo de gás nitrogênio 10 l/min; temperatura de secagem 300ºC; nebulizador 30psi; gás Hélio usado como gás de amortecimento do trap; alto vácuo de $1x10^{-5}$mbar; trap drive 59.1; lente 1 a -5V; lente 2 a -60V; saída do capilar a 132,3V; skimmer 40V; octopolo 1 DC a 12V; octopolo 2 DC a 1,7V e octopolo RF a 194.5V.

Visando uma indicação preliminar, os íons moleculares inicialmente obtidos em modo positivo $(M+H)^+$ foram comparados aos padrões disponibilizados no banco de dados de glicerofosfolipídios da organização LIPIDMAPS[37] (ver ANEXO B), o que foi considerado essencial para realização dos processos de seleção de possíveis estruturas, interpretação dos espectros e proposição de mecanismos de fragmentação.

3.3.4.3 Avaliação dos íons produtos

Na identificação dos principais íons produtos produzidos a partir dos íons moleculares escolhidos na varredura inicial, alíquotas de cada amostra foram previamente dissolvidas e tratadas independentemente com ácido fórmico, sendo injetadas no iontrap, com auxílio de uma bomba de micro-vazão, por infusão direta a uma vazão de 6µl/min. Para estas avaliações o espectrômetro de massas foi operado em modo positivo, obtendo-se íons moleculares tipo $(M+H)^+$, que foram submetidos ao isolamento e a fragmentações seqüenciais tipo EM^2 e EM^3.

[37] Disponível em: www.lipidmaps.org.

Para cada espectro obtido, os íons mais intensos foram isolados e avaliados para confirmação, quando possível, do fragmento característico m/z 184 específico para fosfocolinas.

Cabe neste ponto esclarecer que, devido à limitação do equipamento de espectrometria de massas usado neste trabalho - do tipo iontrap - o registro de íons produtos com razões de massa/carga menores que 1/3 daquela registrada para o seu íon precursor nem sempre se torna possível, o que, via de regra, aconteceu para o íon m/z 184 oriundo das glicerofosfocolinas, o qual nem sempre foi possível ser observado com altas intensidades, principalmente para íons moleculares com altas razões massa/carga.

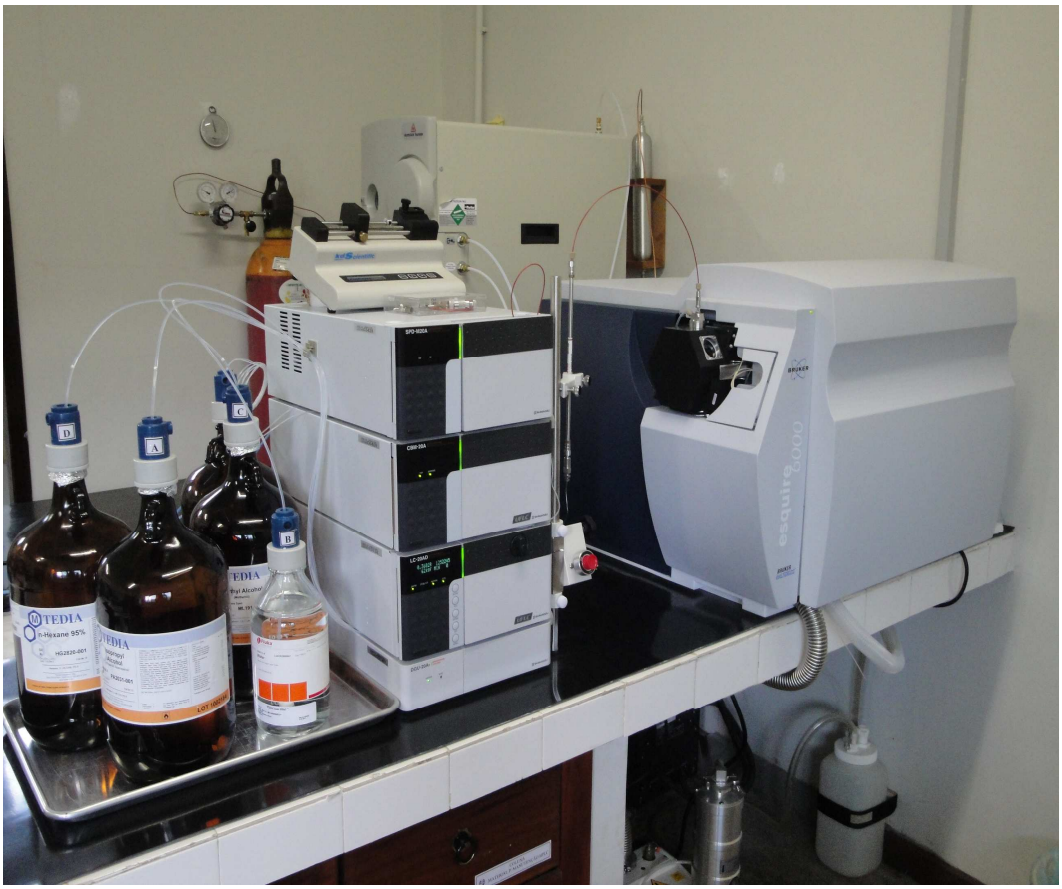


FIGURA 35. Sistema CLAE-IES-EM^n (tipo iontrap) empregado nas análises de espectrometria de massas.

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização química. Matéria-prima e produtos

A lecitina de soja, empregada como matéria-prima, e os produtos obtidos por síntese foram analisados por meio de espectrometria de massas sequencial (analisador tipo iontrap) e tiveram suas estruturas e composições propostas conforme apresentado a seguir.

Após a realização da separação cromatográfica preliminar por CLAE-ESI-MS, realizada conforme descrito no item 3.3.4, onde se obtiveram cromatogramas de íons totais (CIT), com os quais se pode avaliar a separação dos principais componentes com base em suas lipofilicidades, efetuaram-se diversas corridas empregando-se injeção por infusão direta, onde os íons moleculares, pré-escolhidos com base nas intensidades observadas dentro de intervalos de tempo de retenção e de agrupamento, foram isolados e fragmentados usando espectrometria de massas sequencial do tipo EM^2 e EM^3, sendo estes íons moleculares e seus íons produtos analisados a luz de dados disponibilizados pelo LIPIDMAPS e por trabalhos sobre o assunto (PULFER e MURPHY, 2003; PETERSON e CUMMINGS, 2006; HSU e TURK, 2009; KHALIL *et al.*, 2010).

Cabe ressaltar que a utilização do espectrômetro de massas do tipo iontrap se mostrou especialmente útil na análise das substancias aqui estudadas (glicerofosfolipídios). Apesar da conhecida limitação deste tipo de equipamento em relação ao corte de leitura dos íons produtos com razões massa/carga menores que 1/3 daquelas registradas para os seus íons precursores, tal óbice não impediu uma excelente aquisição dos íons e suas fragmentações seqüenciais, realizadas aqui até 3ª ordem, o que foi considerado essencial para uma boa elucidação estrutural dos compostos eluídos do cromatógrafo a líquido.

4.1.1 Matéria-prima para síntese. Lecitina de soja

Esclarece-se que a escolha da lecitina como matéria-prima para a síntese se deveu a três principais fatores: disponibilidade comercial; custos intrínsecos para uma futura produção em escala industrial (multitoneladas) e estrutura química de partida. No Brasil, tendo em vista a intensiva produção de soja e de refino de seu óleo, e por ser a lecitina de soja um sub-produto deste refino, a sua disponibilidade pode ser considerada abundante e com improvável escassez. Referente aos custos, a lecitina comercial é atualmente negociada a 1/10 do preço dos óxidos de cobre normalmente usados em tintas anti-incrustantes; adicionalmente, a estrutura química da lecitina permite uma rota de síntese, visando a obtenção de PAF-análogos, relativamente fácil e mais direta, necessitando de somente duas etapas, uma metanólise e uma alquilação, as quais por sua vez também empregam materiais de baixo custo, como metanol, hidróxidos e haletos de alquila.

O CIT obtido para lecitina de soja (Figura 36) indica haver dois grandes agrupamentos de íons moleculares eluindo entre os tempos de retenção 7,5 – 9,5 min e 10 –13 min. Este

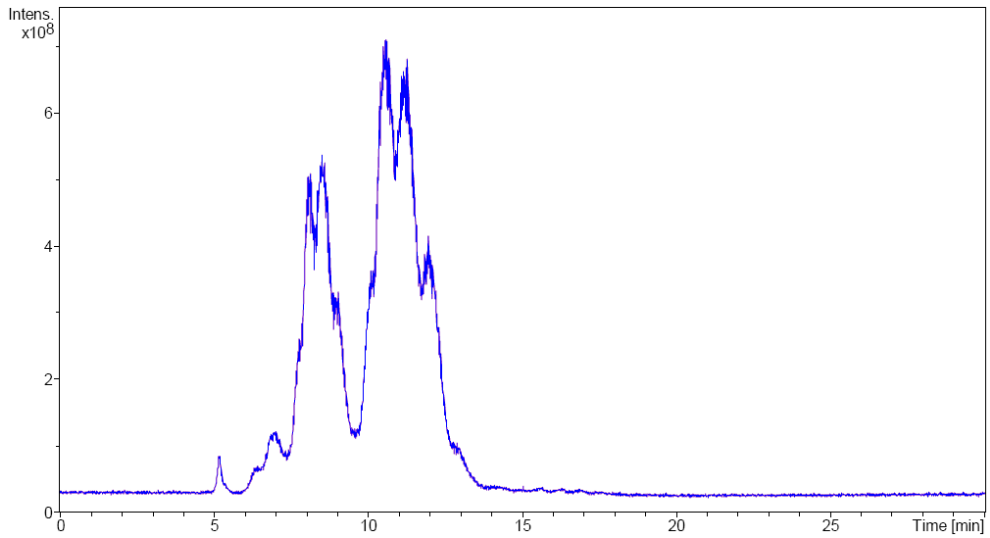


FIGURA 36. Cromatograma de íons totais (CIT) da Lecitina de soja usada para síntese

cromatograma, quando comparado aquele obtido para os padrões de glicerofosfolipídios e PAF- análogos (Figura 37), indica haver componentes com lipofilicidades próximas, porém não necessariamente iguais, as dos glicerofosfolipídios GPC(16:0/16:0) e GPC(14:0/14:0), e ainda diferentes daquelas observadas para os glicerofosfolipídios PAF e Lyso-PAF.

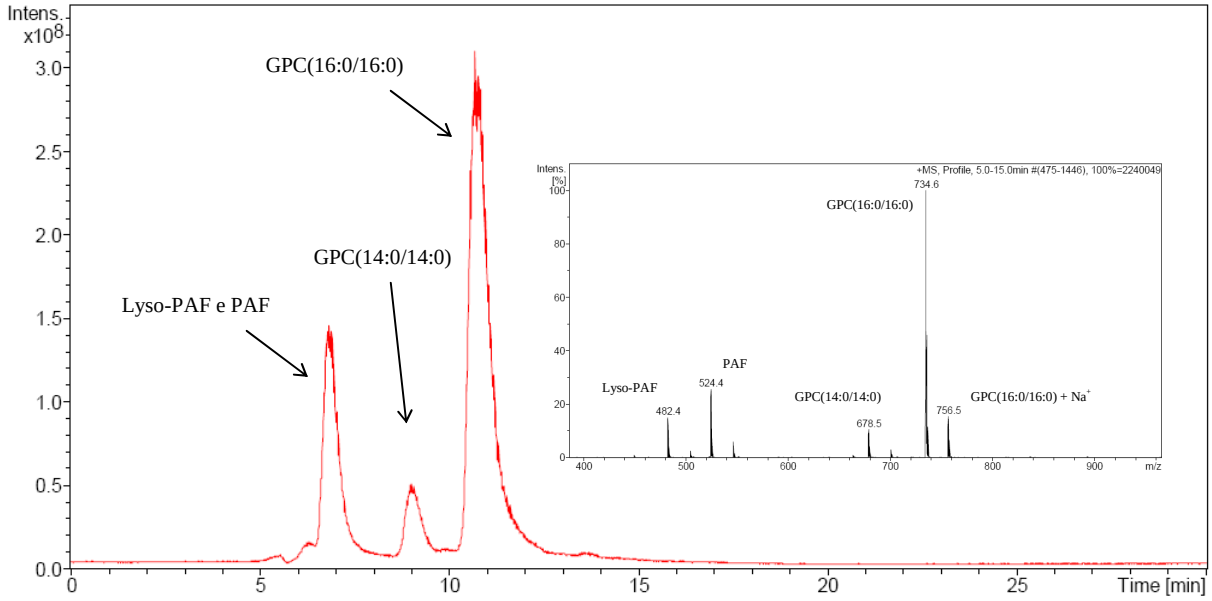
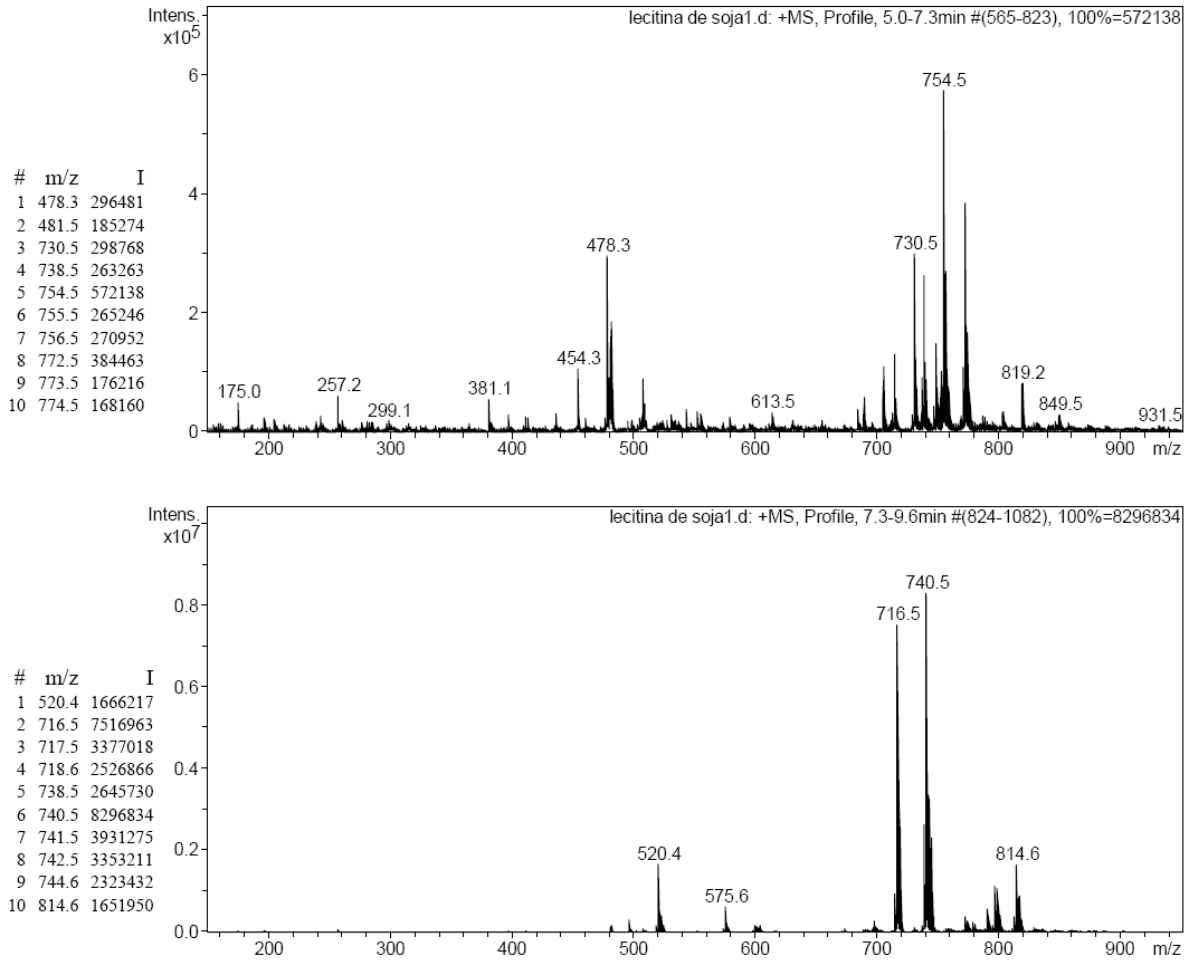


FIGURA 37. Cromatograma de íons totais (CIT) dos padrões: β-acetyl-γ-O-hexadecyl-L-α-phosphotidylcholine (PAF); 1-O-Palmityl-sn-glycero-3-phosphocholine (Lyso-PAF); 1-2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine GPC(16:0/16:0) e 1-2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine GPC(14:0/14:0). No detalhe: Espectro de massas apresentando íons moleculares dos padrões utilizados.

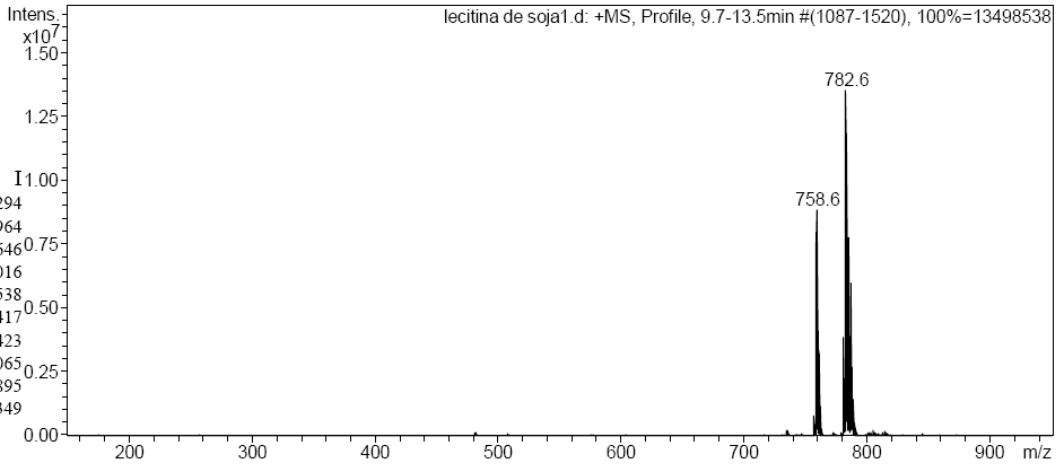
Visando uma identificação mais pormenorizada, foram efetuados os somatórios dos íons eluindo nos intervalos de tempo de retenção entre o quinto e décimo minuto (Figura 38) e entre o décimo e décimo-terceiro minuto (Figura 39), e, complementarmente, foram efetuados os somatórios dos íons e a ampliação dos principais agrupamentos (Figura 40) eluindo durante o intervalo de tempo onde se observou variação da linha base, ou seja, do quinto ao décimo-quinto minuto.



#	m/z	I
1	478.3	296481
2	481.5	185274
3	730.5	298768
4	738.5	263263
5	754.5	572138
6	755.5	265246
7	756.5	270952
8	772.5	384463
9	773.5	176216
10	774.5	168160

#	m/z	I
1	520.4	1666217
2	716.5	7516963
3	717.5	3377018
4	718.6	2526866
5	738.5	2645730
6	740.5	8296834
7	741.5	3931275
8	742.5	3353211
9	744.6	2323432
10	814.6	1651950

FIGURA 38. Espectros de massas da Lecitina de soja apresentando os somatórios dos íons eluindo nos intervalos de retenção de (5,0 a 7.3) e (7.3 a 9.6) min.



#	m/z	I
1	758.6	8855294
2	759.6	4120964
3	760.6	3313646
4	780.6	3866016
5	782.6	13498538
6	783.6	6411417
7	784.6	7773423
8	785.6	3238065
9	786.6	5990895
10	787.6	2690349

FIGURA 39. Espectro de massas da Lecitina de soja apresentando os somatórios dos íons eluindo no intervalo de retenção de (9.7 a 13.5) min.

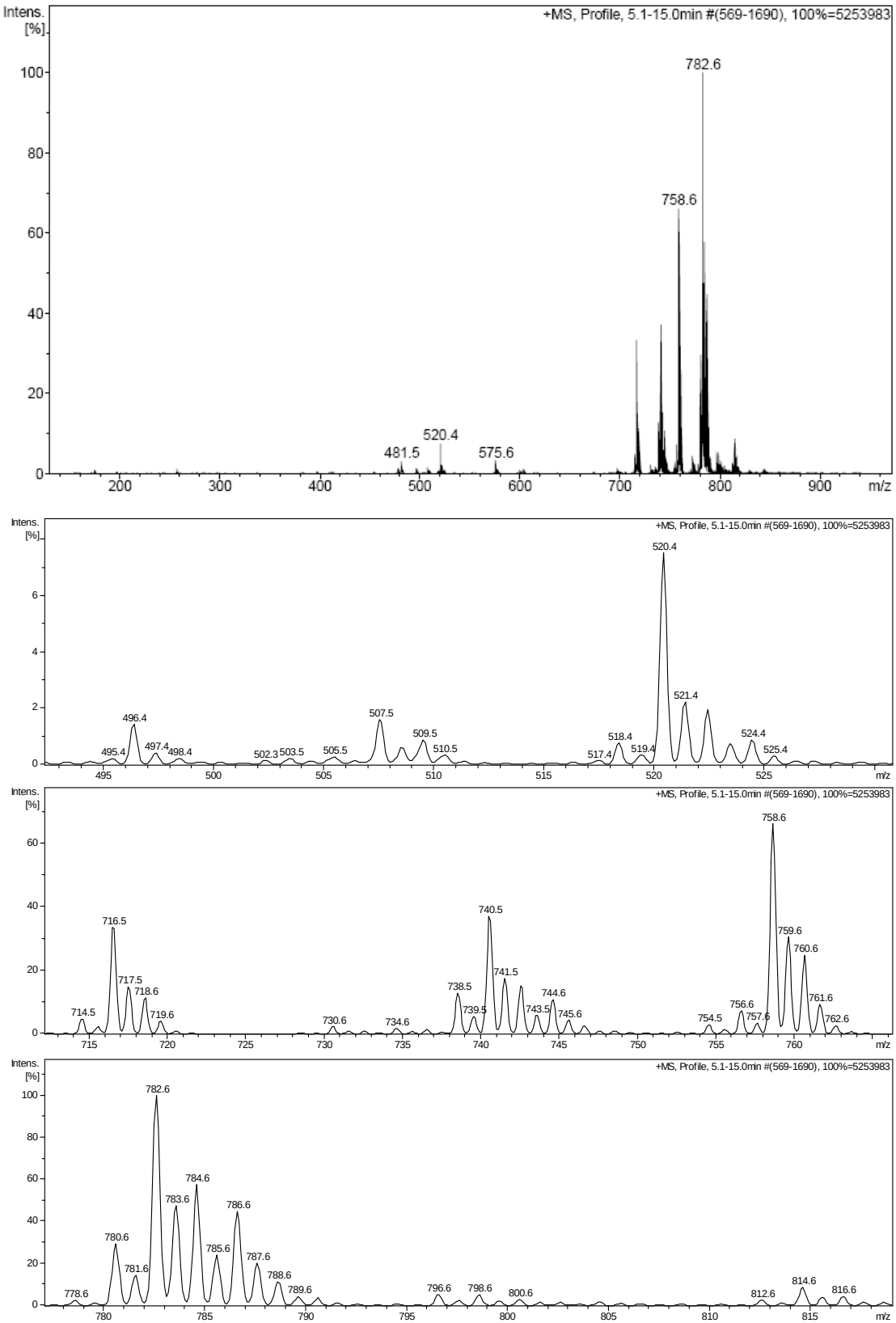


FIGURA 40. Espectro de massas Lecitina de soja. Somatório dos íons eluindo entre 5 e 15 minutos (superior) e ampliação dos principais agrupamentos de íons moleculares.

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

Da análise preliminar, foram escolhidos para avaliação os íons moleculares m/z 814,6; 782,6; 780,6; 758,6; 716,5 e 520,4 os quais produziram por EM^2 e EM^3 os íons produtos apresentados nas figuras 41a a 45a.

Para esta avaliação, as amostras foram tratadas com ácido fórmico, visando à inibição da formação de adutos indesejáveis pela protonação do grupo fosfato, e introduzidas diretamente no espectrômetro de massas por infusão direta.

Após a verificação dos principais íons produtos, foram propostas as possíveis estruturas moleculares, para seus principais íons produtos e os mecanismos de fragmentação (Figuras 41b a 45b).

Para o íon molecular m/z 814,6 a espectrometria sequencial EM^2 forneceu como principais íons produtos m/z 755,5 e m/z 796,6. A EM^3 para estes últimos forneceu, adicionalmente, os íons m/z 737,4; 631,4 e 613,4 (Figura 41a). Com base nestes resultados foi proposto o esquema de fragmentação apresentado na figura 41b, onde se relaciona aquele íon molecular a presença do glicerofosfolipídio GPC (16:0/22:2).

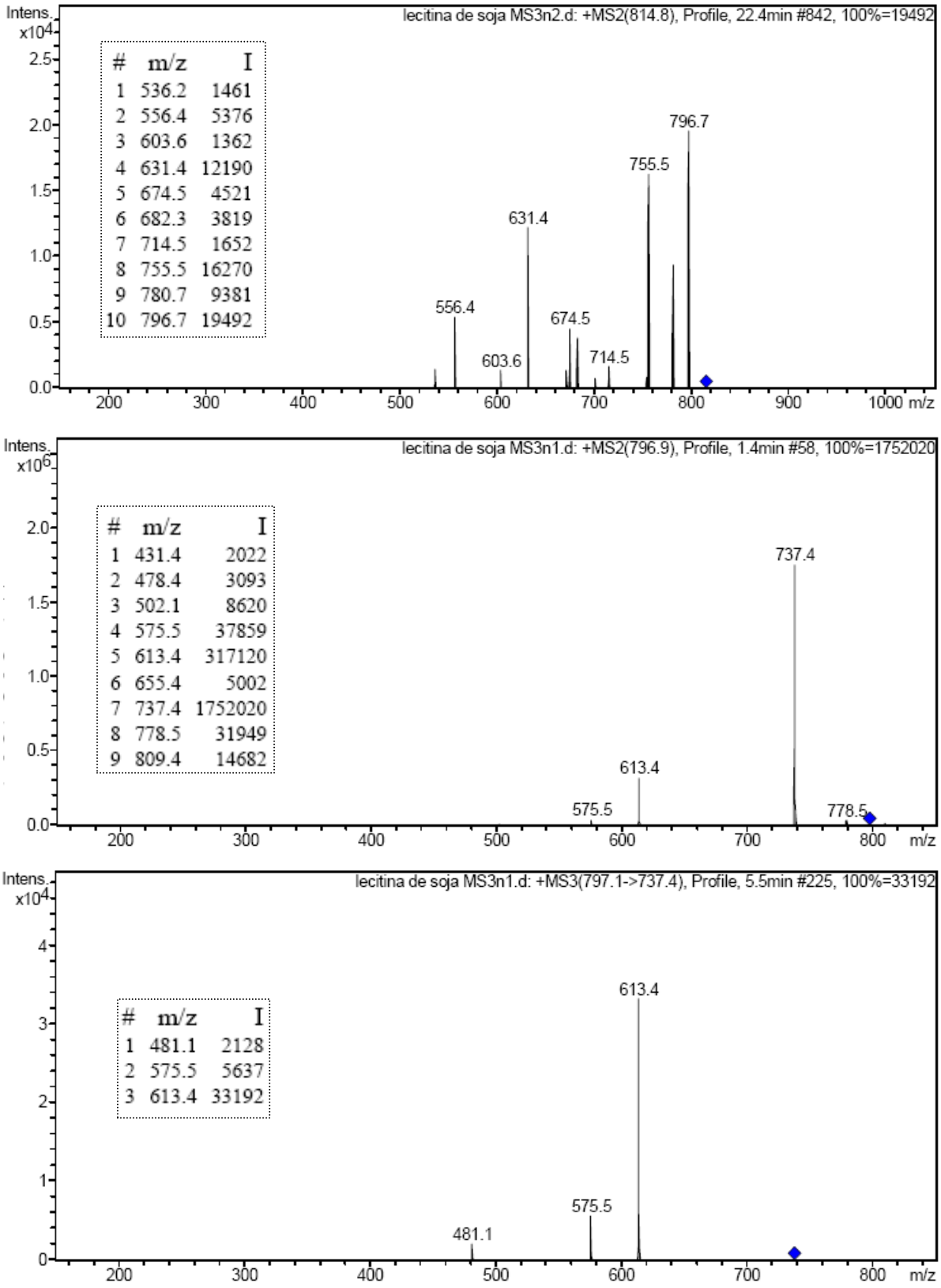


FIGURA 41a. EM^2 dos íons moleculares m/z 814,5 (superior) e m/z 796,6 (centro) da Lecitina de soja. EM^3 (inferior) apresenta íons produtos obtidos para m/z 796,6.

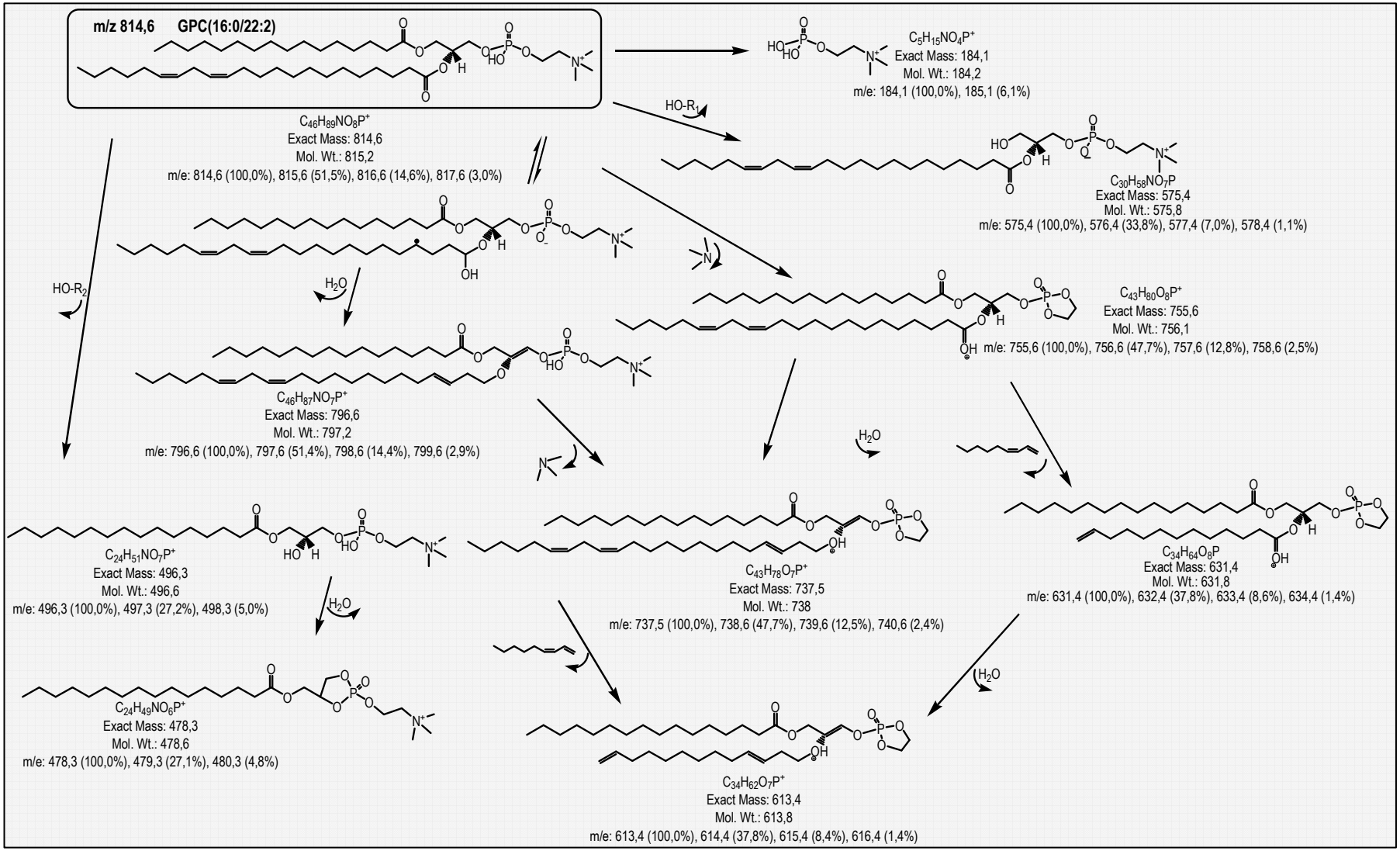


FIGURA 41b. Proposta de esquema de fragmentação para íon molecular **m/z 814,6** da Lecitina de soja.

Para o íon molecular m/z 782,6 a espectrometria sequencial EM^2 forneceu como principal íon produto o m/z 520,4; do qual se obteve por EM^3 o íon m/z 502,3 (Figura 42a),.

O íon molecular m/z 780,6 forneceu como íons produtos os íons m/z 597,5 e m/z 721,4e. A EM^3 para este último forneceu, exclusivamente, o íon m/z 597,5 (Figura 43a), o que indica claramente existir uma sequência de fragmentação 780,6 → 721,5 → 597,5.

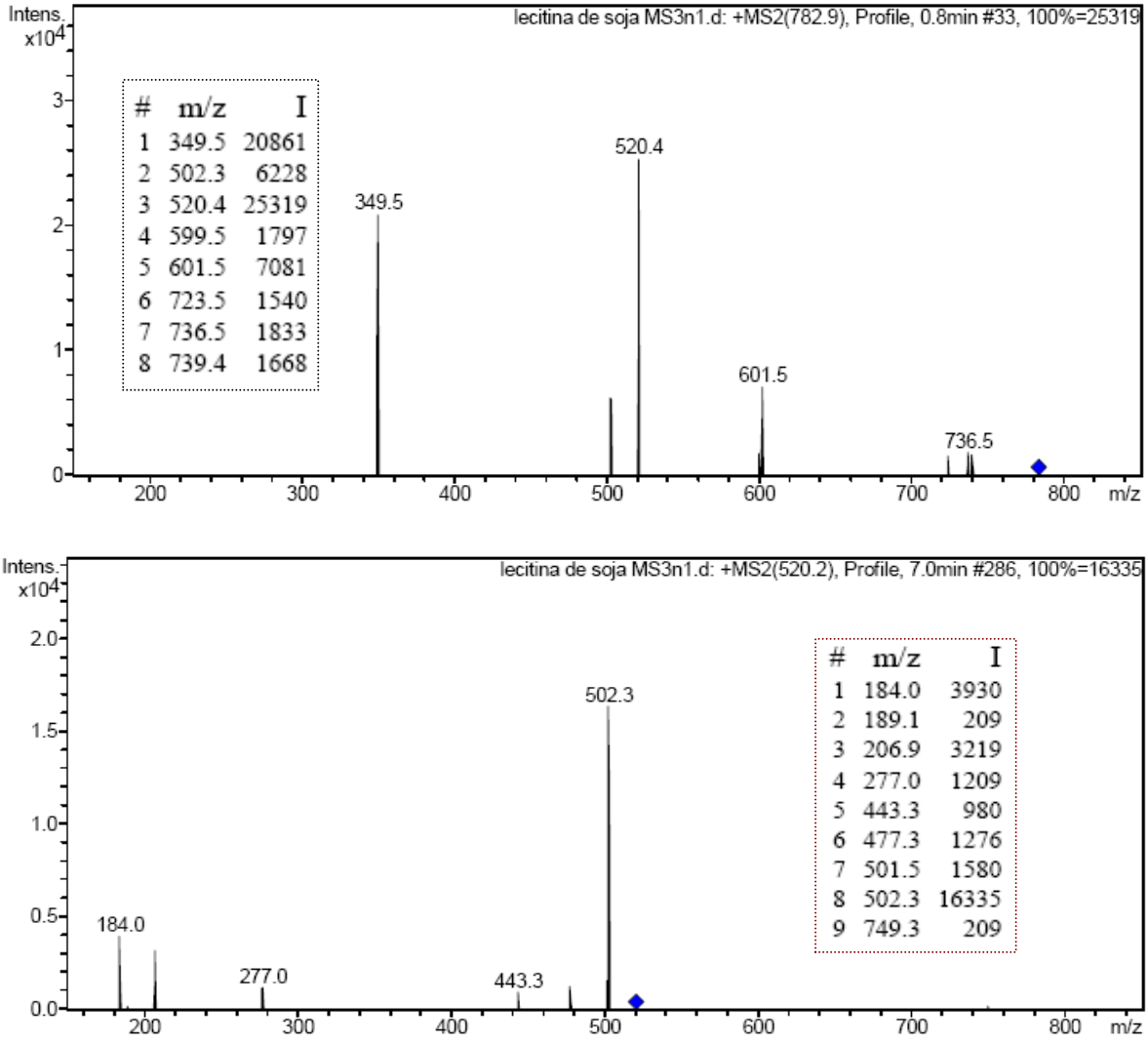


FIGURA 42a. EM^2 dos íons moleculares m/z 782,9 (superior) e m/z 520,4 (inferior) da Lecitina de soja.

Com base nestes resultados foi proposto o esquema de fragmentação apresentado na figura 42b/43b, onde são relacionados, respectivamente, os íons m/z 782,6 e m/z 780,6 aos glicerofosfolipídios GPC (18:2/18:2) e GPC(18:3/18:2).

Neste ponto cabe relembrar a detecção do íon molecular m/z 520,4, eluindo entre o sétimo e o décimo minutos, primeiro grande agrupamento (ver figura 36), o qual credita-se possivelmente à de-acetilação natural das estruturas conforme apresentadas para os íons moleculares m/z 780,6 e m/z 782,6, as quais geram lyso-glicerofosfocolinas LPC (18:2).

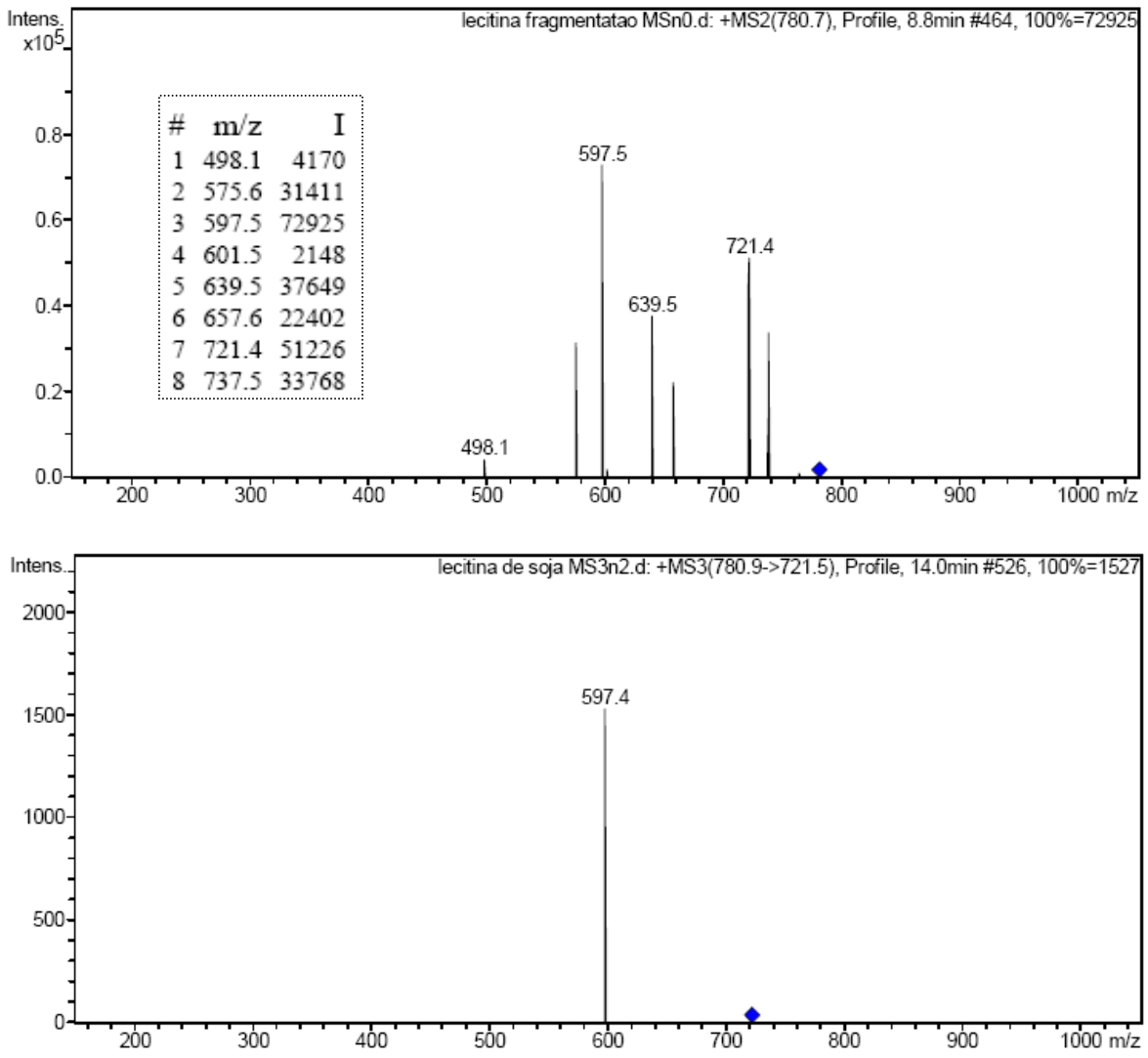


FIGURA 43a. EM^2 do íon molecular m/z 780,9 (superior) e EM^3 (inferior) de seu íon produto m/z 721,5 da Lecitina de soja.

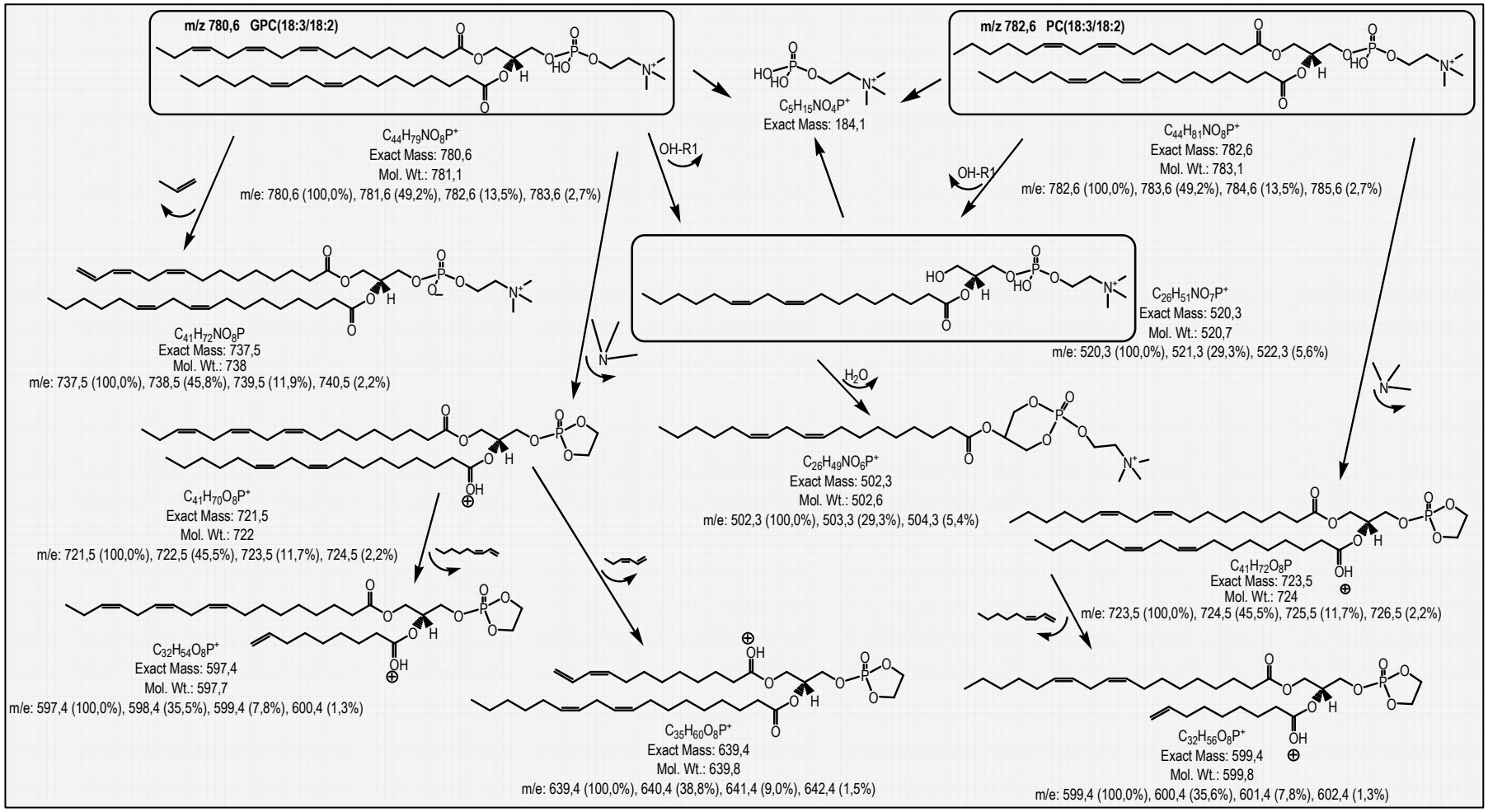


FIGURA 42b/43b. Proposta de esquema de fragmentação para íons moleculares **m/z 782,6 , 780,6 e 520,4** da Lecitina de soja.

Para o íon molecular m/z 758,6 a espectrometria sequencial EM^2 forneceu como principais íons produtos o íons m/z 502,3; 722,8 e 478,2, do qual, deste último, se obteve por EM^3 o íon m/z 419,3 (Figura 44a), indicando existir uma sequência de fragmentação 758,6 → 478,2 → 419,3. Com base nesta sequência de fragmentação e nos outros íons produtos apresentados foi proposto o esquema de fragmentação apresentado na figura 44b, onde o íon m/z 758,6 é relacionado ao glicerofosfolipídio GPC (18:2/16:0).

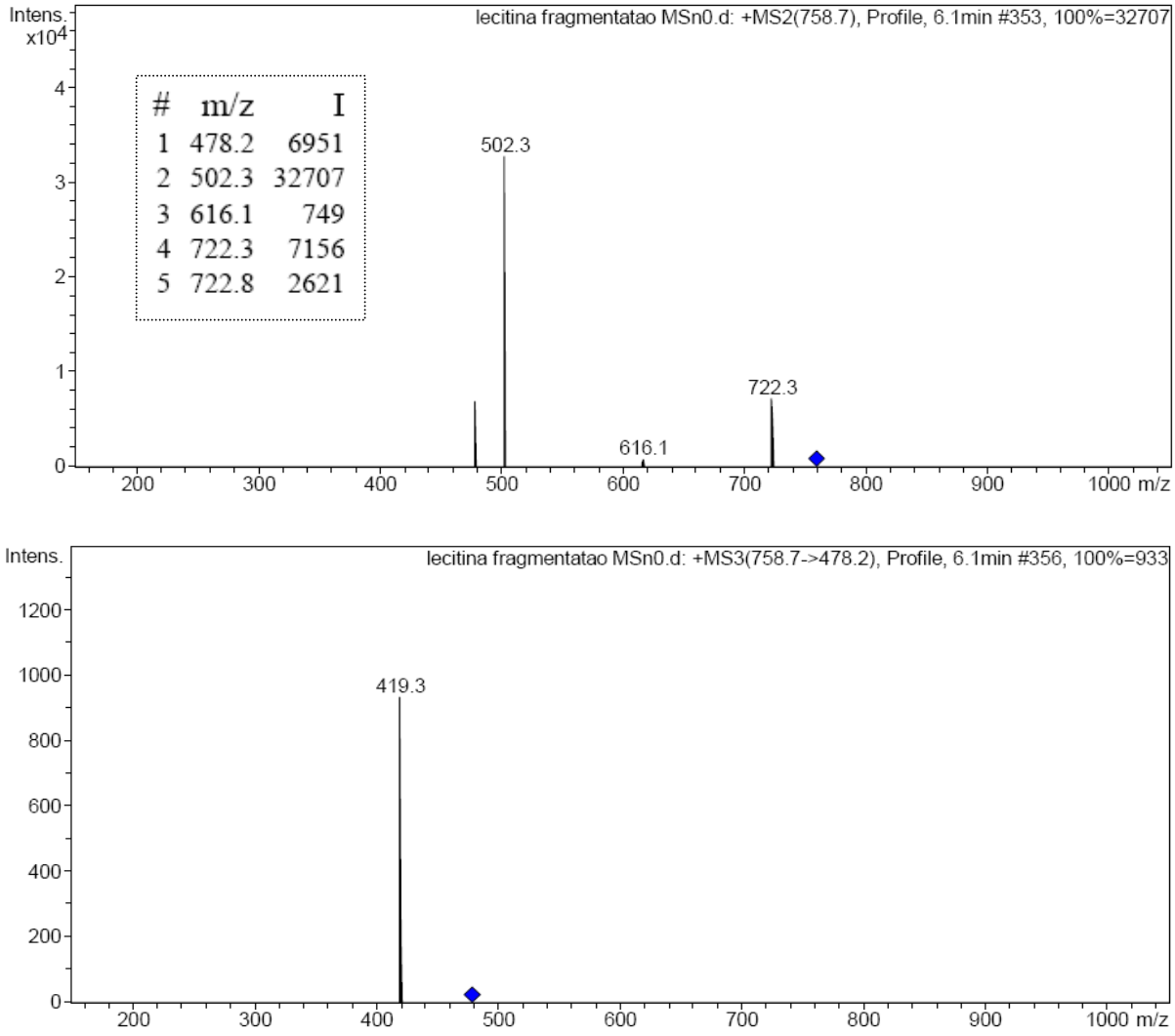


FIGURA 44a. EM^2 do íon molecular m/z 758,6 da Lecitina de soja. (superior) e EM^3 de seu íon produto m/z 478,2 (inferior).

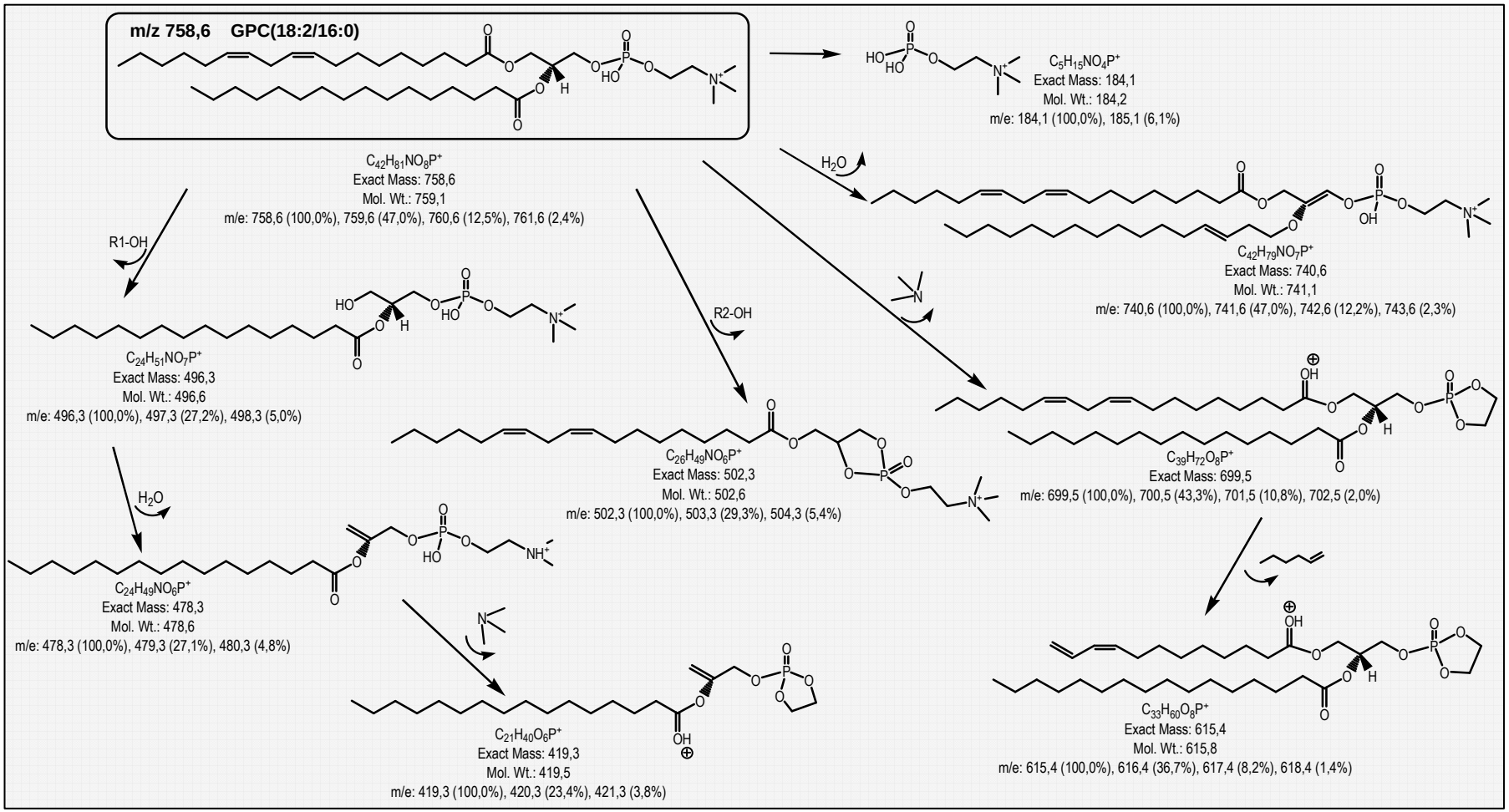


FIGURA 44b. Proposta de esquema de fragmentação para íon molecular **m/z 758,6** da Lecitina de soja.

Para o íon molecular m/z 716,4 a espectrometria sequencial EM^2 forneceu como principais íons produtos o íons m/z 657,4 e 575,6, do qual, deste último, se obteve por EM^3 os íons m/z 501,5; 245,1; 391,5 e 297,2. (Figura 45a).

Com base nestes resultados, apesar de não se ter conseguido descortinar os íons produtos m/z 501,5 e m/z 245,1, foi proposto o esquema de fragmentação apresentado na figura 45b, onde é relacionado o íon m/z 716,5 ao glicerofosfolipídio PAF-análogo GPC (18:2/O-14:0).

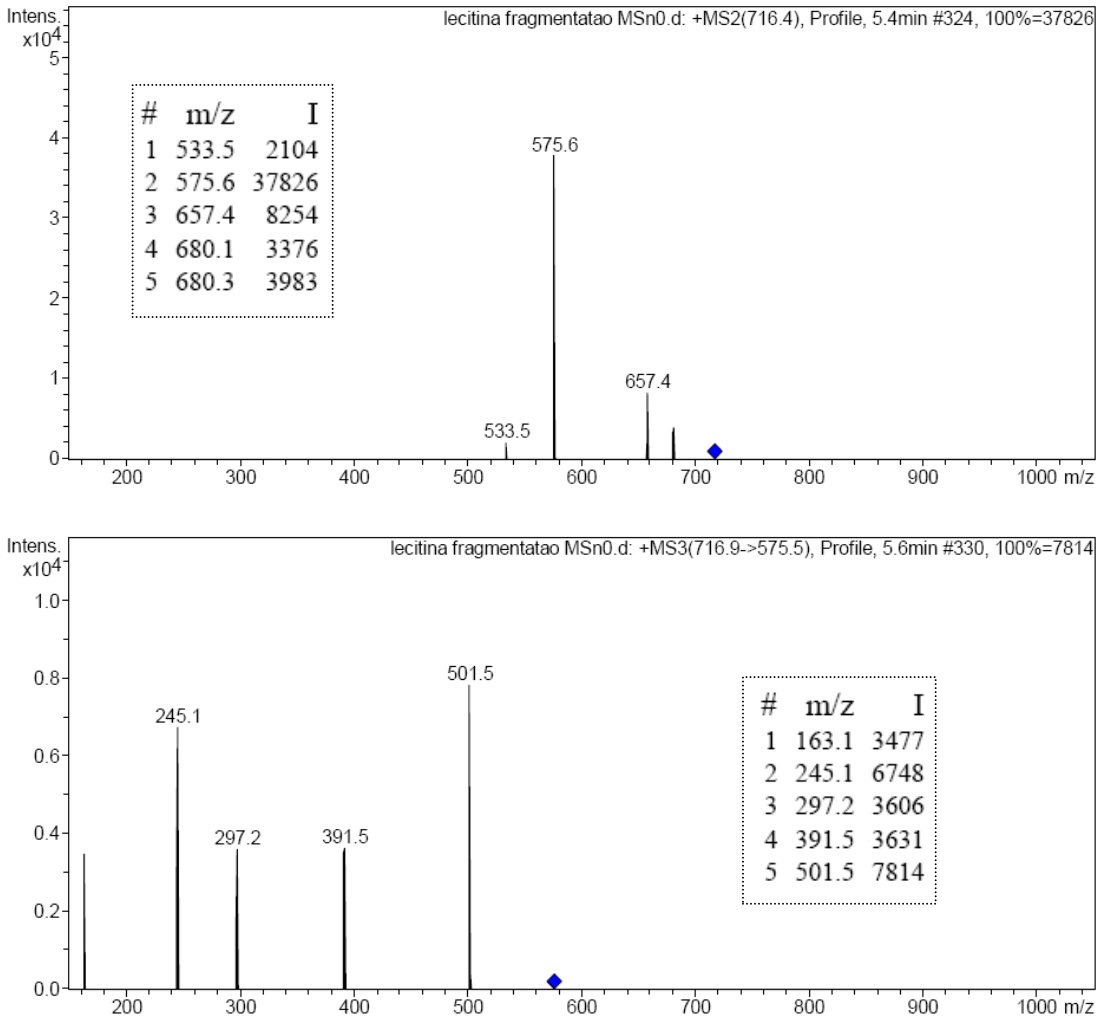


FIGURA 45a. EM^2 do íon molecular m/z 716,4 da Lecitina de soja. (superior) e EM^3 de seu íon produto m/z 575,5 (inferior).

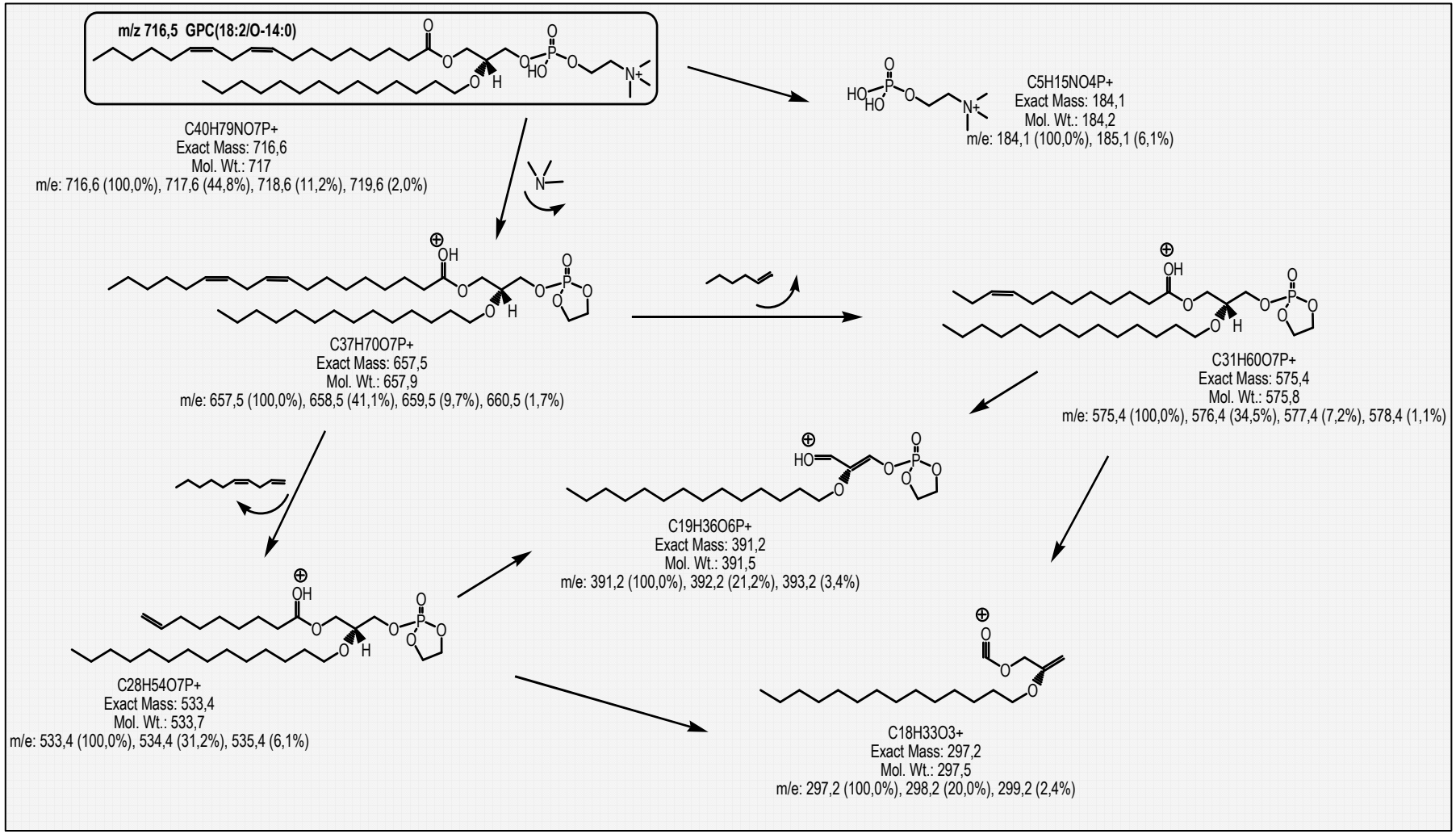


FIGURA 45b**.** Proposta de esquema de fragmentação para íon molecular **m/z 716,6** da Lecitina de soja.

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

Em resumo, a espectrometria de massas da matéria-prima usada (lecitina de soja) indicou principalmente a presença dos íons moleculares m/z 814,6; 780,6; 782,6; e 758,6 que foram relacionados respectivamente aos glicerofosfolipídios GPC(16:0/22:2), GPC (18:3/18:2), GPC (18:2/18:2) e GPC (18:2/16:0); composição que coaduna com trabalhos e composições de lecitinas normalmente descritas na literatura (GUSTONE *et al*., 2007; AKHO e MIN, 2008). Contudo, inesperadamente, também foi identificado, apesar de estar proporcionalmente em menor concentração, o glicerofosfolipídio PAF-análogo GPC(18:2/O-14:0) relacionado ao íon molecular m/z 716,5 (estrutura proposta na figura 45b).

4.1.2 Produtos de síntese

4.1.2.1 Reação de metanólise. 1ª Síntese

A análise realizada por espectrometria de massas da corrente eluindo do cromatógrafo a líquido produziu o CIT (Figura 46) - aqui apresentado em comparação ao CIT obtido para os padrões de GPC e PAF (ver item 4.1.1) - a partir do qual foi realizada a avaliação dos íons moleculares registrados durante o intervalo de tempo em que se observou variação na linha base, ou seja, do quinto ao décimo-primeiro minuto.

A Figura 47 apresenta o espectro de massas dos íons eluindo entre o quinto e o décimo-primeiro minuto. Nele se pode observar que o componente mais intenso é o íon m/z 696,5, o que pode indicar uma deficiência na conversão da reação realizada, pois os compostos hidroxilados esperados desta reação (ver item 3.3.1.1), tenderiam a ter razões massa carga menores, variando entre m/z 350 a 550.

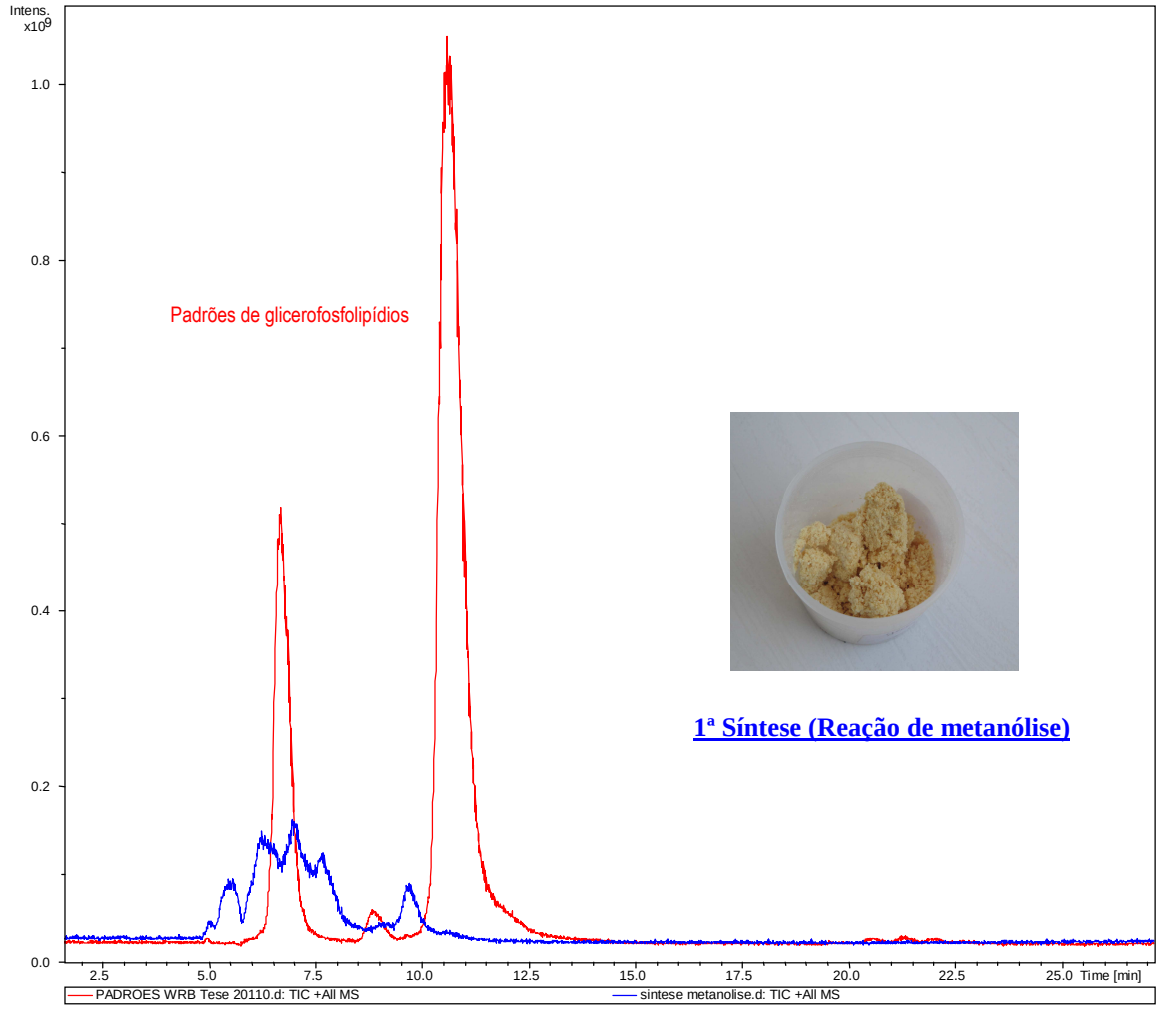
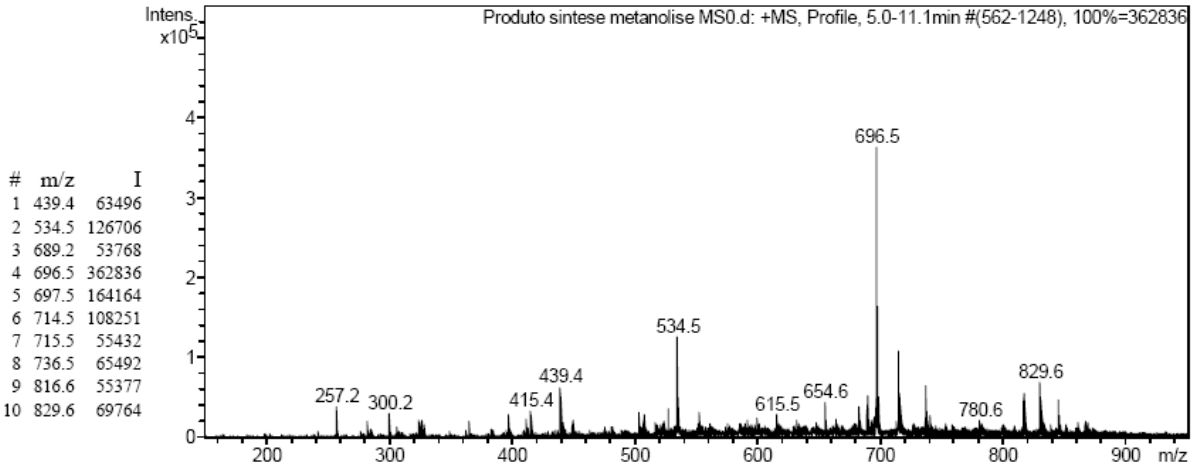


FIGURA 46. Cromatograma de íons totais (CIT) do produto da reação de metanólise - 1ª Síntese (em azul), obtido do efluente do cromatógrafo a líquido, comparado aos CIT dos Padrões de glicerofosfolipídios GPC (16:0/16:0); GPC (14:0/14:0); PAF e Lyso-PAF (em vermelho),.



#	m/z	I
1	439.4	63496
2	534.5	126706
3	689.2	53768
4	696.5	362836
5	697.5	164164
6	714.5	108251
7	715.5	55432
8	736.5	65492
9	816.6	55377
10	829.6	69764

FIGURA 47. Espectro de massas da 1ª Síntese apresentando íons eluindo entre 5 e 11 minutos.

A Figura 48 apresenta os espectros relacionados aos picos eluídos nos tempos de retenção de 6.3 e 6.8 minutos, os quais apresentaram lipofilicidades mais próximas dos compostos PAF e Lyso-PAF, podendo, deste modo, aqueles compostos apresentarem estruturas condizentes com compostos PAF-análogos.

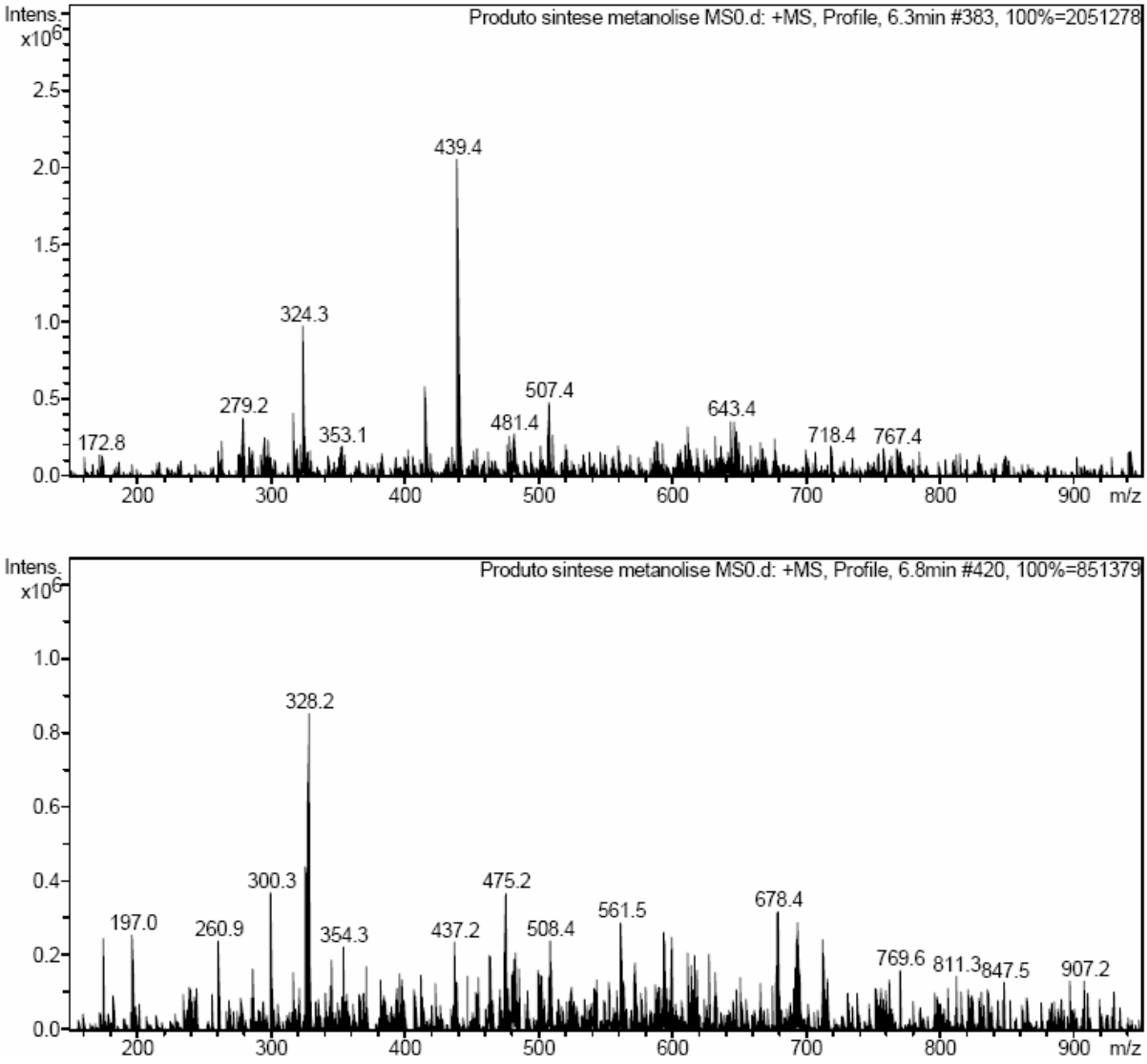


FIGURA 48. Espectros de massas da 1ª síntese. Picos eluídos nos tempos de retenção de 6.3 e 6.8 minutos.

Entre o quinto e o sétimo minutos foram observados e avaliados os íons moleculares, ordenados por tempo de retenção: m/z 439,5 e 328,4. As Figuras 49a e 50a apresentam os espectros de massas do tipo EM^2 para estes íons moleculares e as Figuras 49b e 50b apresentam as respectivas propostas para os íons produtos e seus caminhos de fragmentação.

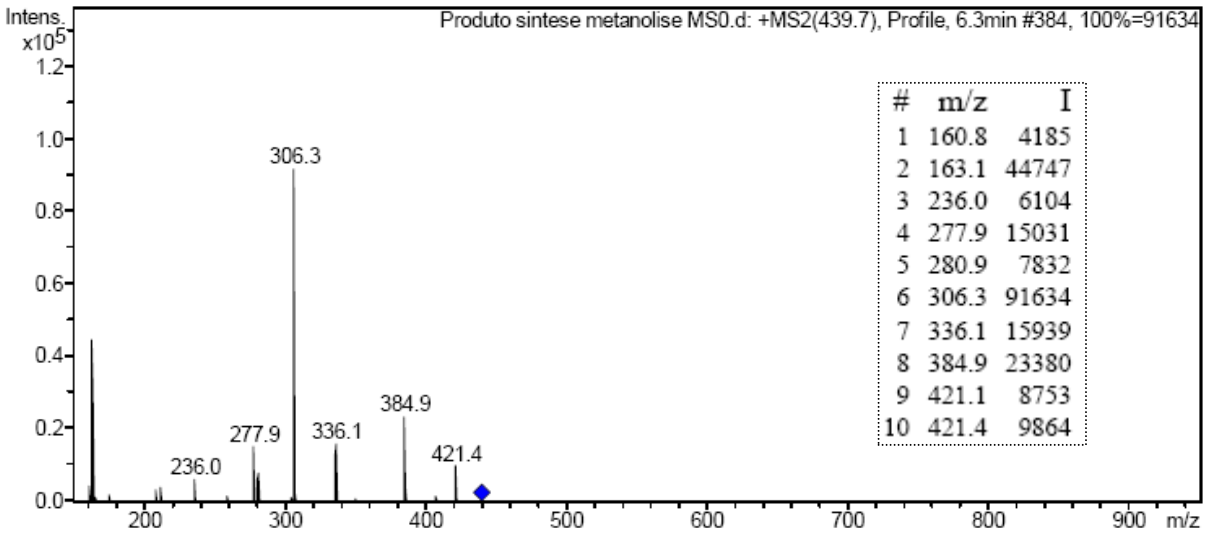


FIGURA 49a. EM^2 do íon molecular m/z 439,7 do produto da 1ª Síntese.

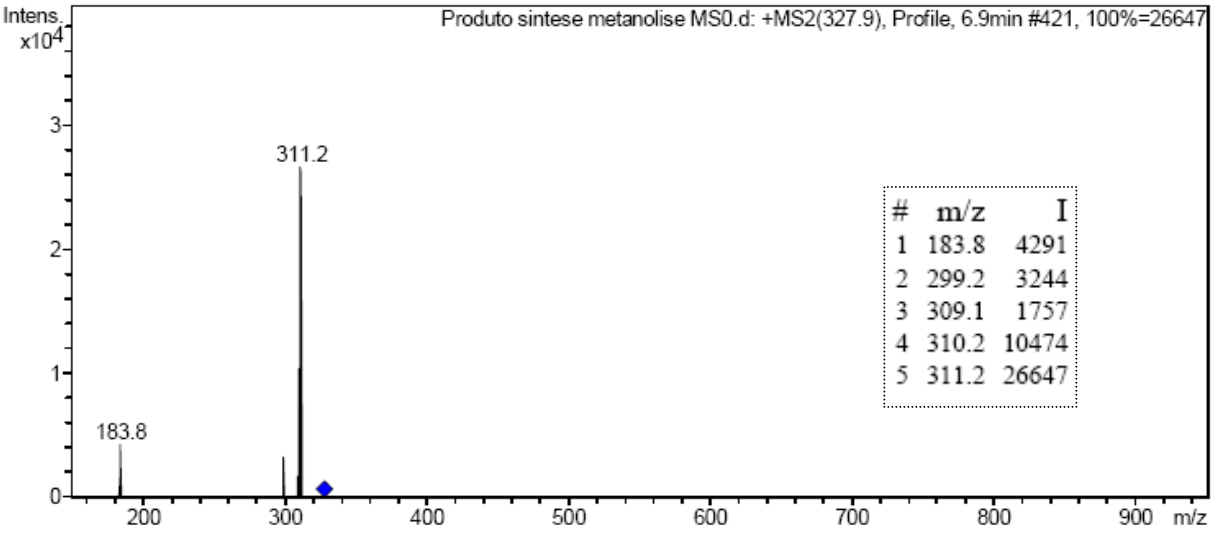


FIGURA 50a. EM^2 do íon molecular m/z 328,5. Produto da 1ª Síntese.

Cabe ainda observar, que as amostras sob análise, devido ao sistema de solventes usado na fase móvel, ficaram submetidas a possível protonação, e, deste modo, em referência ao que dita a Regra do Nitrogênio, os íons do tipo $(M+H)^+$ dispondo de razões massa/carga com valores ímpares ficaram sobre suspeita de possivelmente não apresentarem nitrogênio em sua estrutura. Deste modo, inicialmente, o íon molecular m/z 439,4 foi considerado como não apresentando nitrogênio em sua molécula e, acrescido o fato de seu baixo tempo de retenção, ele foi vislumbrado e tratado como sendo um possível glicerofosfato ácido (GPA), tendo sido sua estrutura proposta como sendo Lyso-GPA (18:0) (ver figura 49b).

Para o íon molecular m/z 328,5 foi facilmente observado o íon produto m/z 184, indicando tratar-se de um GPC. Após avaliação de sua seqüência de fragmentação foi considerado tratar-se do Lyso-GPC (4:0) (ver figura 50b), o qual se acredita ser produto de reações paralelas da metanólise.

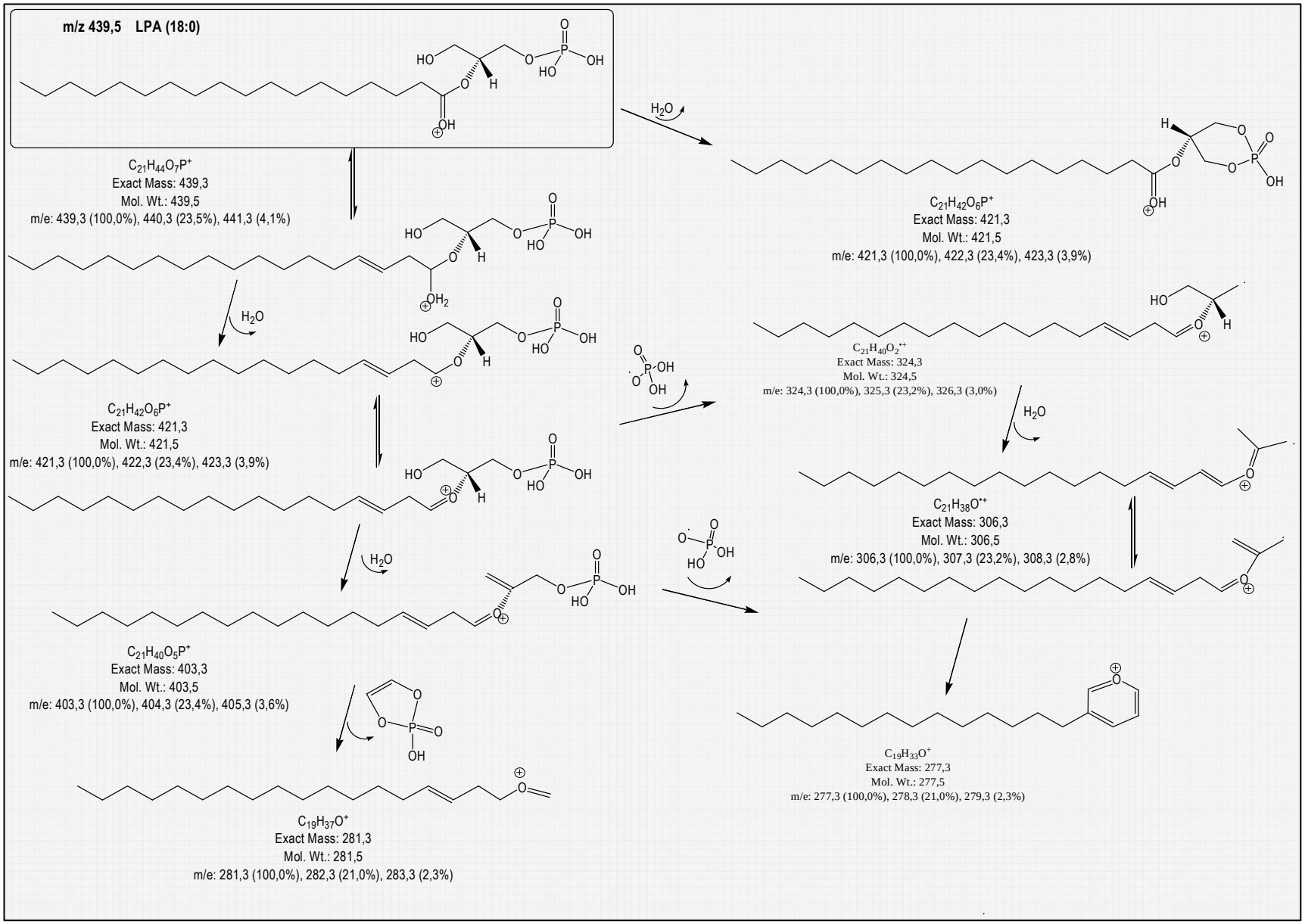


FIGURA 49b**.** Proposta de esquema de fragmentação para íon molecular **m/z 439,4** do produto da 1ª Síntese.

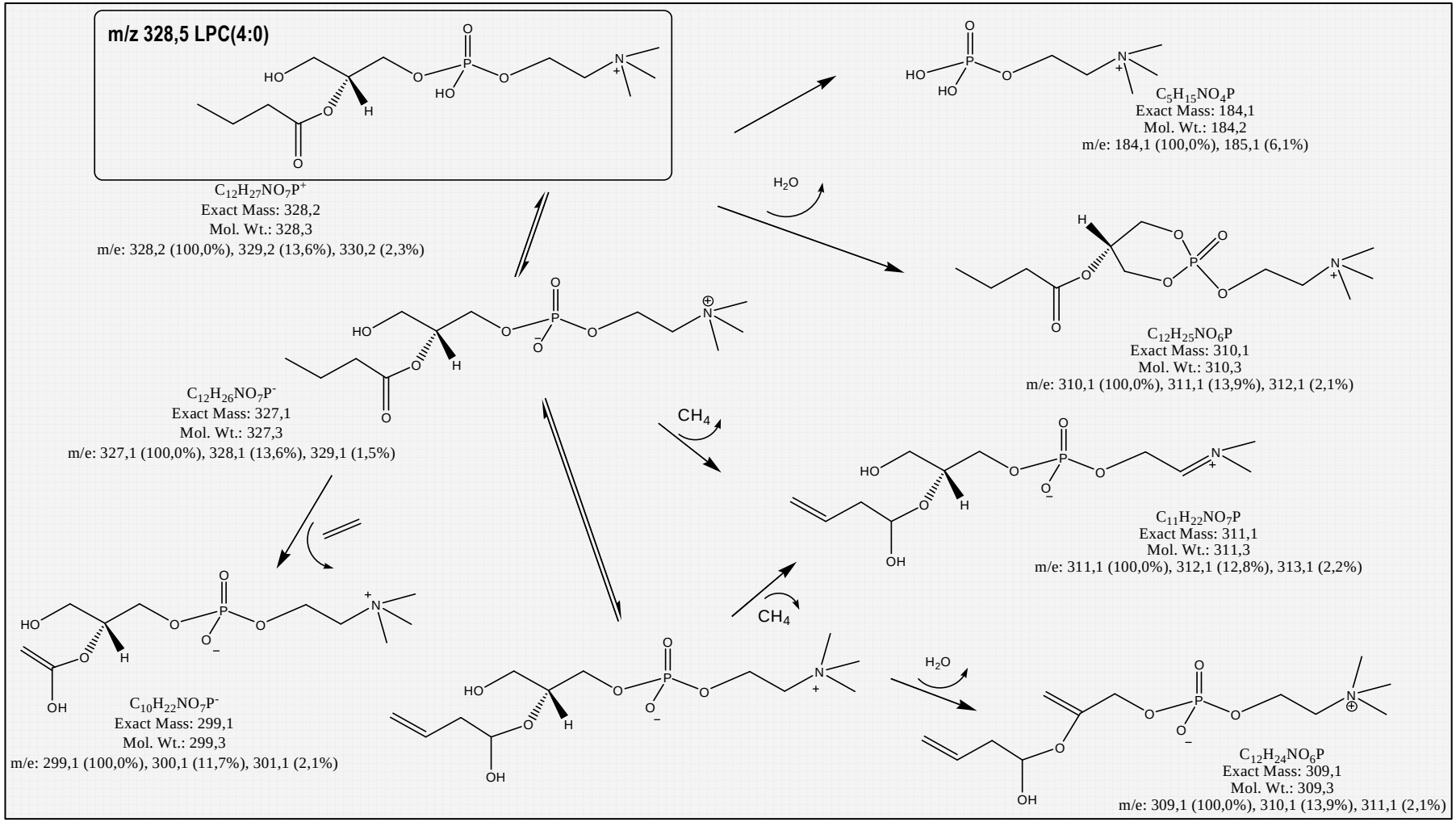


FIGURA 50b**.** Proposta de esquema de fragmentação para íon molecular **m/z 328,4** do produto da 1ª Síntese.

No intervalo de eluição entre 7.0 e 8.5 minutos, o somatório dos íons moleculares (Figura 51) forneceu como principais componentes os íons m/z 696,5 e 714,5.

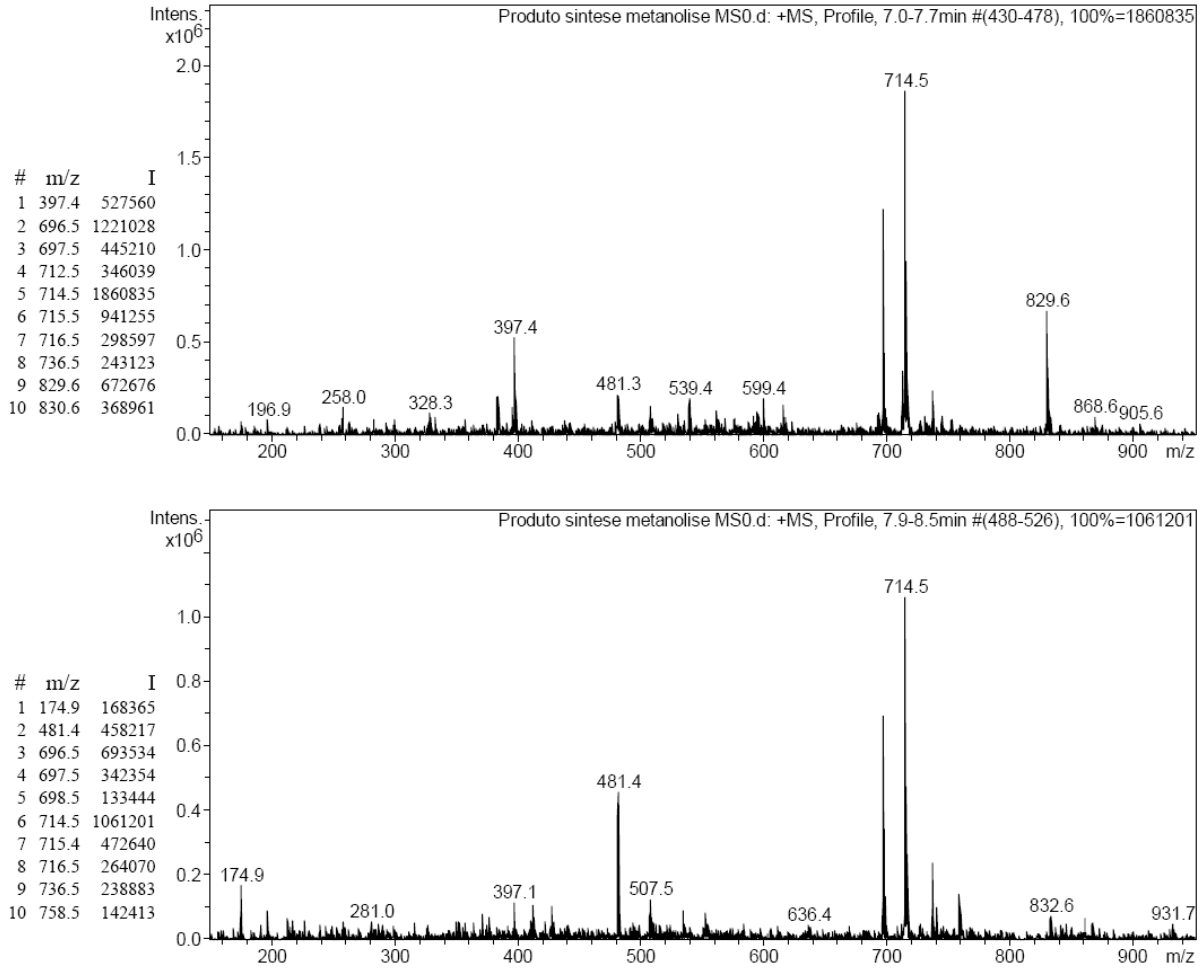


Figura 51. Espectros de massas relacionados aos principais íons da 1ª Síntese eluídos no intervalo de tempos de retenção de 7.0 a 7,7 e 7,8 a 8.5 minutos.

Para os íons moleculares m/z 714,5 e 696,5, após a avaliação de seus íons produtos (Figuras 52a e 53a) e da proposição da seqüência de fragmentação, considerou-se que os mesmos estão relacionados entre si e tratam-se dos compostos apresentados na (Figura 52b/53b).

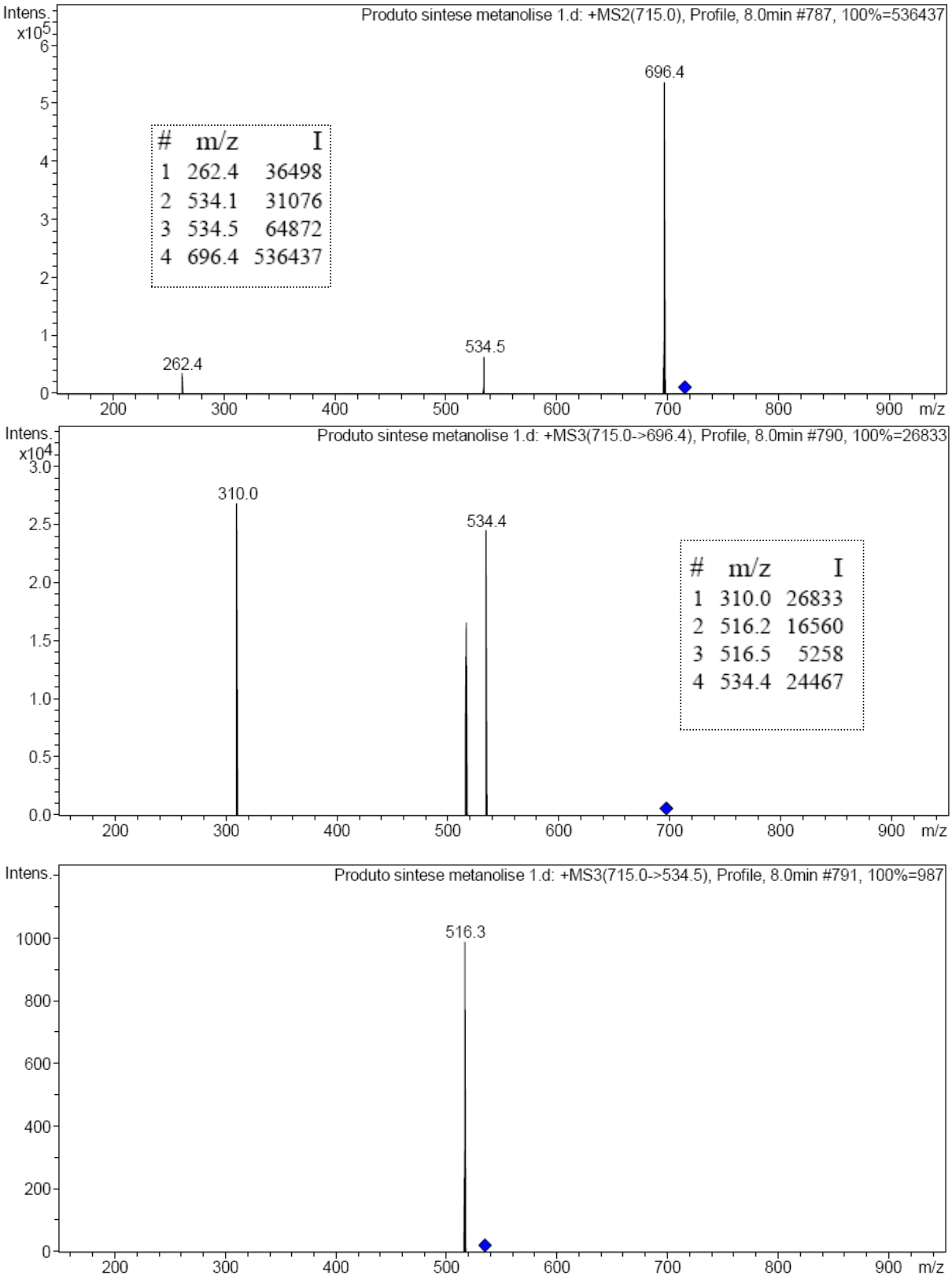


Figura 52a. EM^2 do íon molecular m/z 714,5 e EM^3 de seus íons produto m/z 696,4 e m/z 534,4 obtidos para o produto da 1ª Síntese.

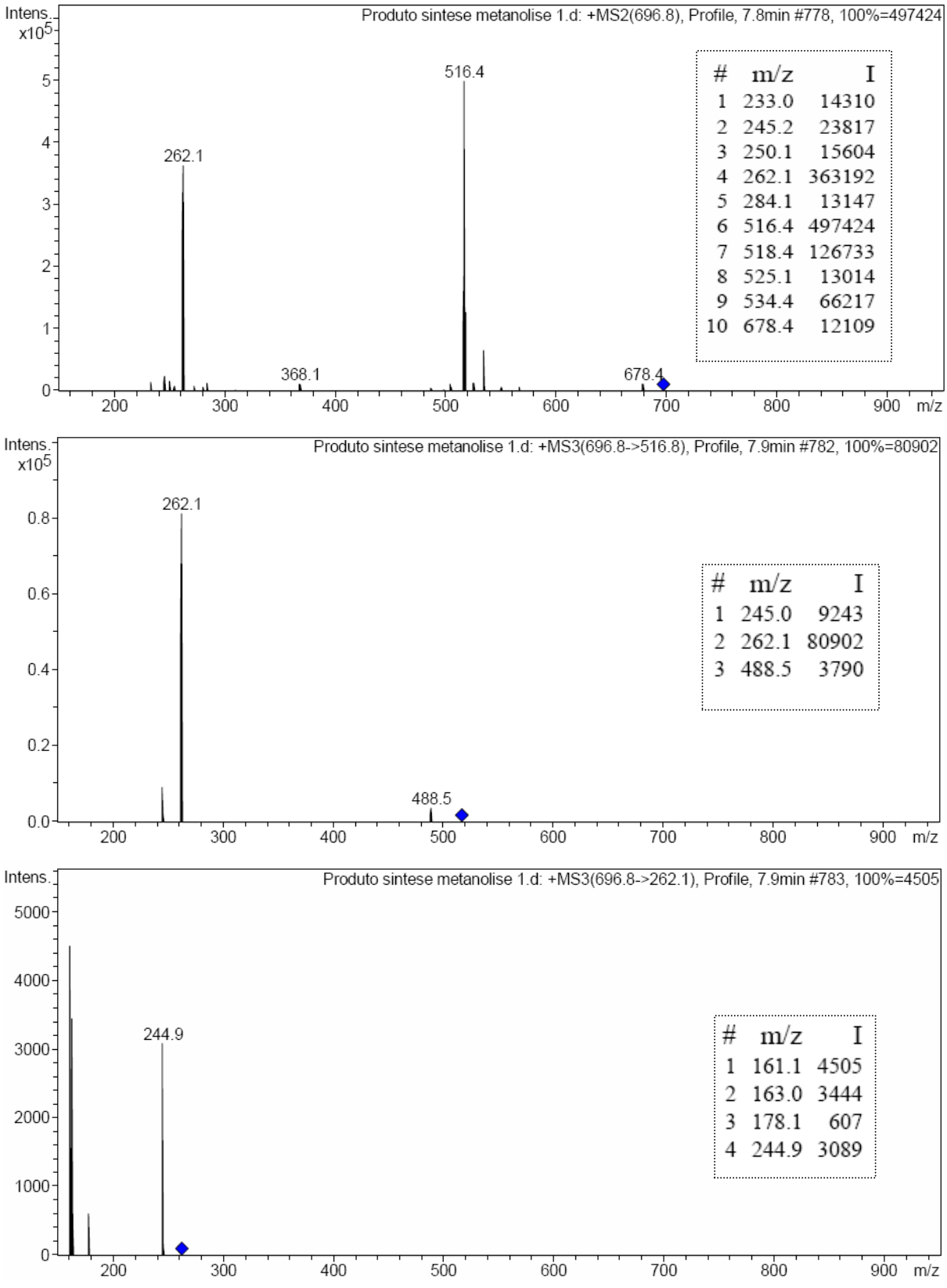


Figura 53a. EM^2 do íon molecular m/z 696,5 e EM^3 de seus íons produto m/z 516,4 e m/z 262.1 obtidos para o produto da 1ª Síntese.

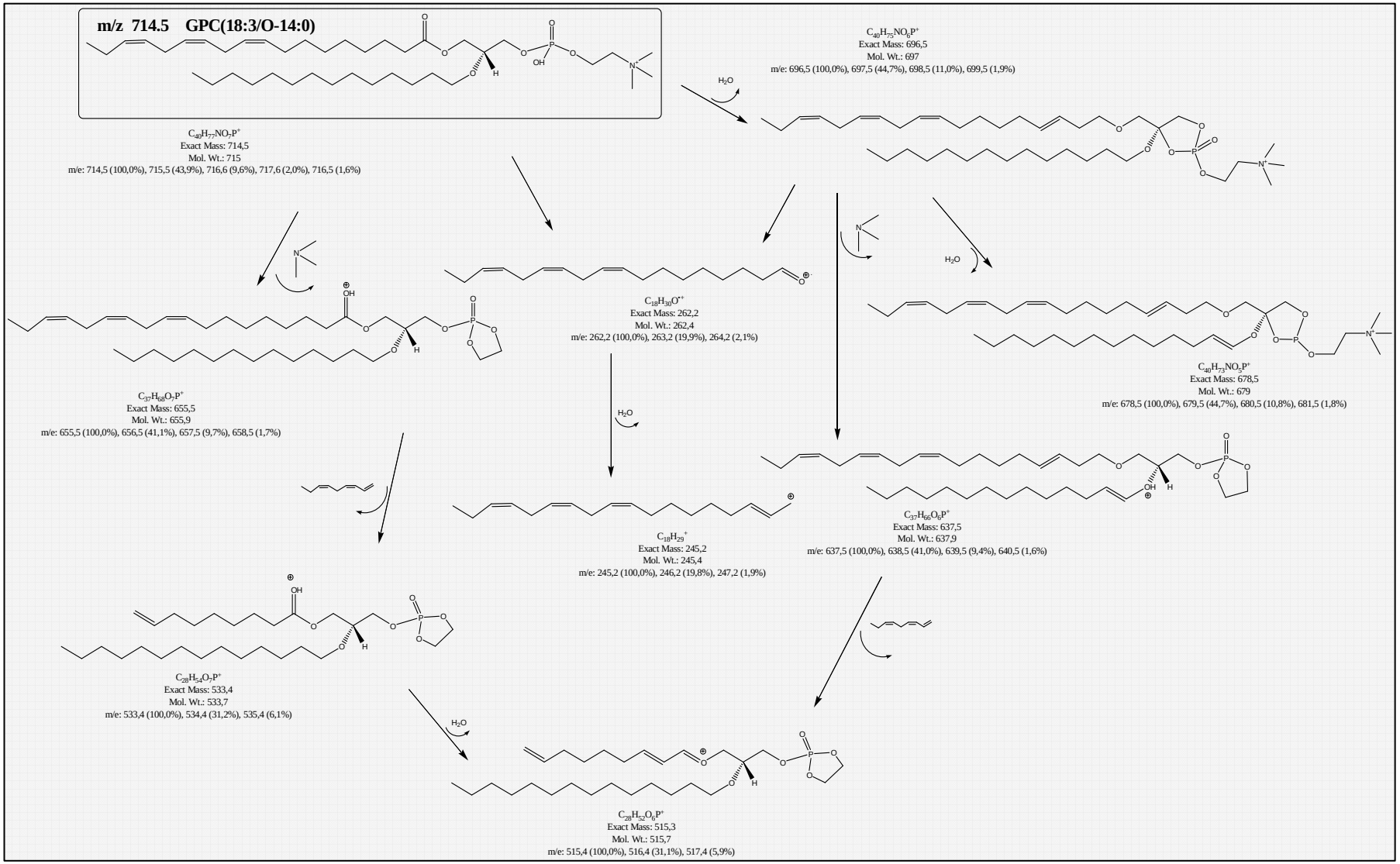


FIGURA 52b/53b**.** Proposta de esquema de fragmentação para íon molecular **m/z 714,5** do produto da 1ª síntese. Reação de metanólise.

Entende-se aqui que as condições experimentais usadas na análise proporcionaram uma aceitável distribuição e separação dos lipídios tratados, sete minutos iniciais, daqueles mais ramificados e/ou não reagidos, como é o caso das glicerofosfocolina m/z 780,6; 816,6 e 844,7 observadas na faixa dos 10 minutos (Figura 54).

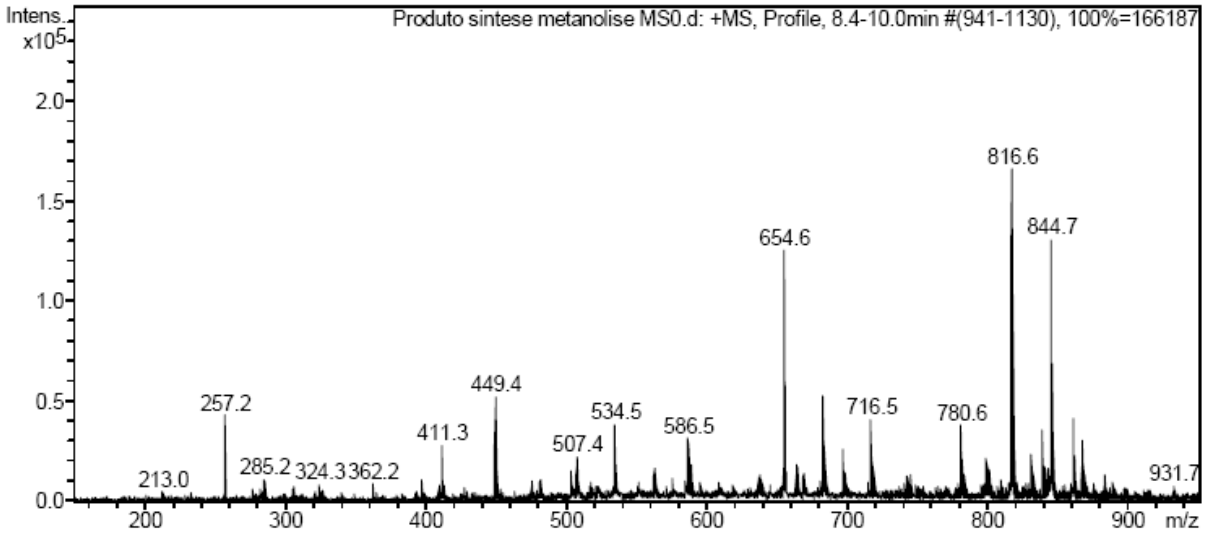


Figura 54. Espectro de massas relacionado aos principais íons do produto da 1ª Síntese eluídos no intervalo de tempos de retenção de 8.4 a 10 minutos.

A espectrometria de massas permitiu avaliar que a reação de metanólise alcançou uma boa conversão da matéria-prima lecitina de soja, essencialmente glicerofosfolipídios diacilados, em produtos com menores lipofilicidades, produzindo uma mistura de compostos PAF-análogos e de ácidos lyso-fosfatídicos, tendo sido obtido como principais íons moleculares os íons m/z 328,5; 439,5 e 714,5 , os quais foram, respectivamente, relacionados estruturalmente ao compostos 1-OH-2-butil-sn-glicero-3-fosfocolina; ácido 1-OH-2-octadecil-sn-glicerofosfórico e ao composto PAF-análogo GPC(18:3/O-14:0), este último possivelmente um artefato com uma ligação dupla adicional, possivelmente não gerado pela reação de metanólise, do composto GPC(18:2/O-14:0) previamente identificado na matéria-prima.

4.1.2.2 Reação de alquilação. 2ª Síntese

A análise realizada por espectrometria de massas da corrente eluindo do cromatógrafo a líquido produziu o CIT (Figura 55) - apresentado em comparação ao CIT obtido para os padrões de GPC e PAF (ver item 4.1.1) - a partir do qual foi realizada a avaliação dos íons moleculares registrados durante o intervalo de tempo em que se observou variação na linha base, ou seja, do quinto ao vigésimo minuto.

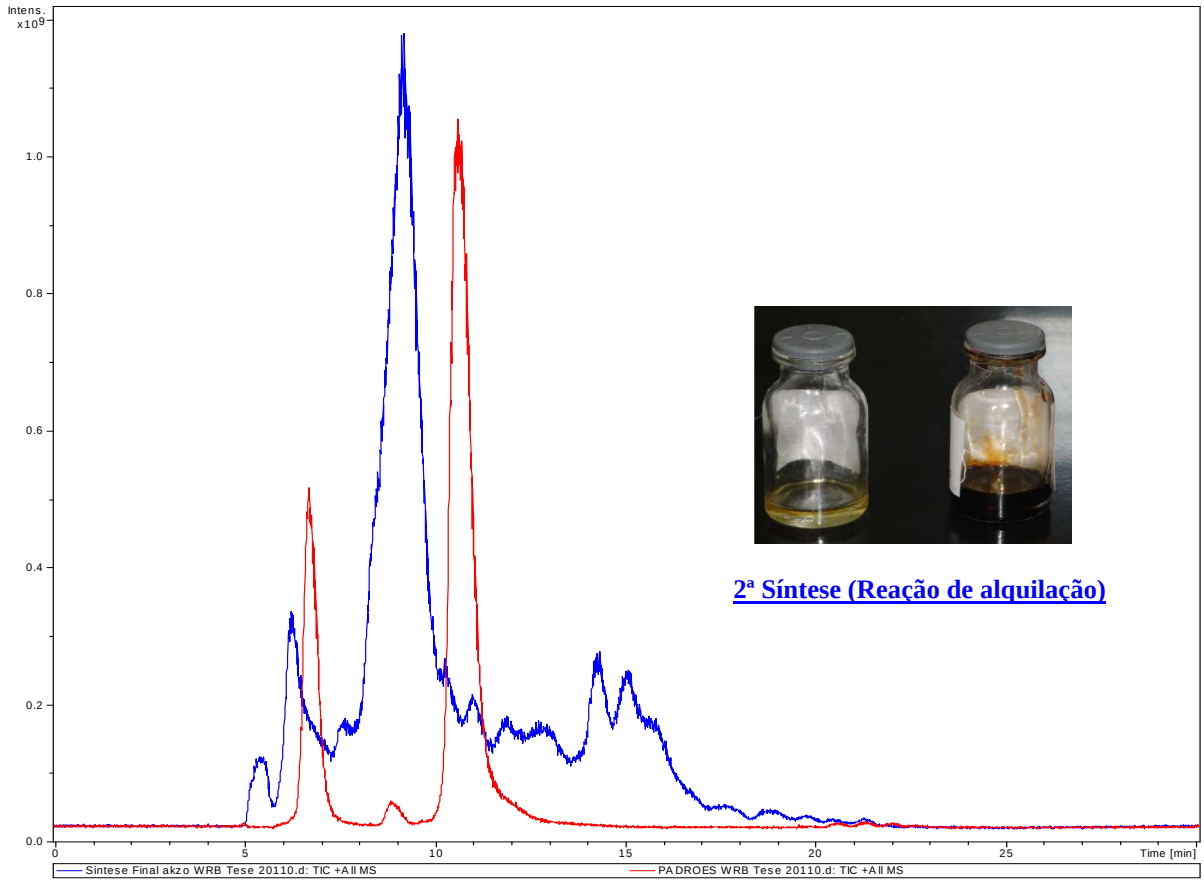


FIGURA 55. Cromatograma de íons totais (CIT) do produto da reação de alquilação - 2ª Síntese (em azul), obtido do efluente do cromatógrafo a líquido, comparado aos CIT dos Padrões de glicerofosfolipídios GPC (16:0/16:0); GPC (14:0/14:0); PAF e Lyso-PAF (em vermelho).

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

A Figura 56 apresenta o espectro de massas dos íons eluindo entre o quinto e o vigésimo minuto. Nele se pode observar que os principais componentes possuem razão massa carga variando entre m/z 480 e 620, tendo como íons moleculares mais intensos, os íons m/z 510,6 e 592,6.

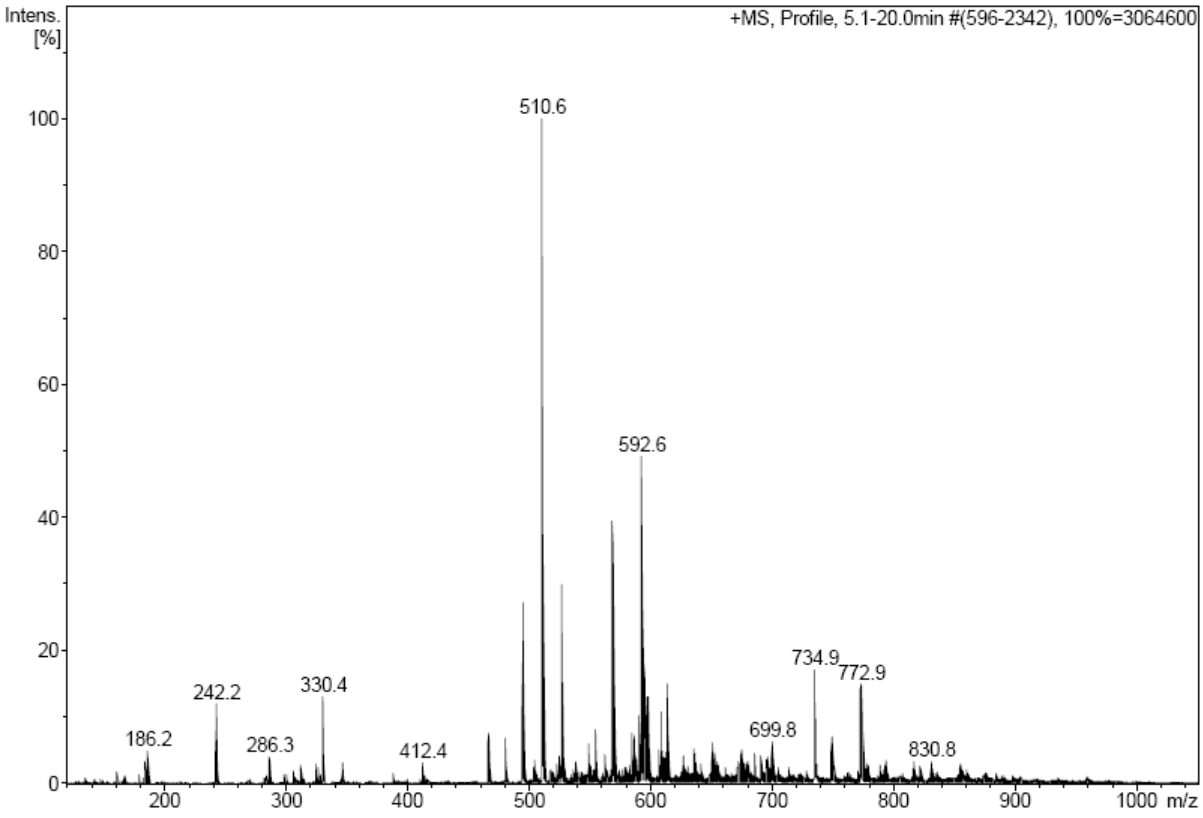


FIGURA 56. Espectro de massas dos íons da 2ª Síntese. Somatório dos tempos de 5 a 20 minutos.

A Figura 57 apresenta, em aspecto geral, os espectros de massas relacionados aos picos eluídos nos tempos de retenção entre 5 e 11 minutos, os quais apresentam lipofilicidade de mesma ordem dos padrões de GPC utilizados. A Figura 58 apresenta, também em aspecto geral, os espectros de massas relacionados aos picos com lipofilicidade superior aos GPC padrões, sendo possível observar após 15 minutos, acredita-se devido à alta concentração da amostra injetada no CLAE, íons moleculares com relação massa carga correspondentes

aquelas normalmente relacionados a glicerolipídios do tipo diacilglicerol e triacilglicerol, neste caso, originários da matéria-prima usada.

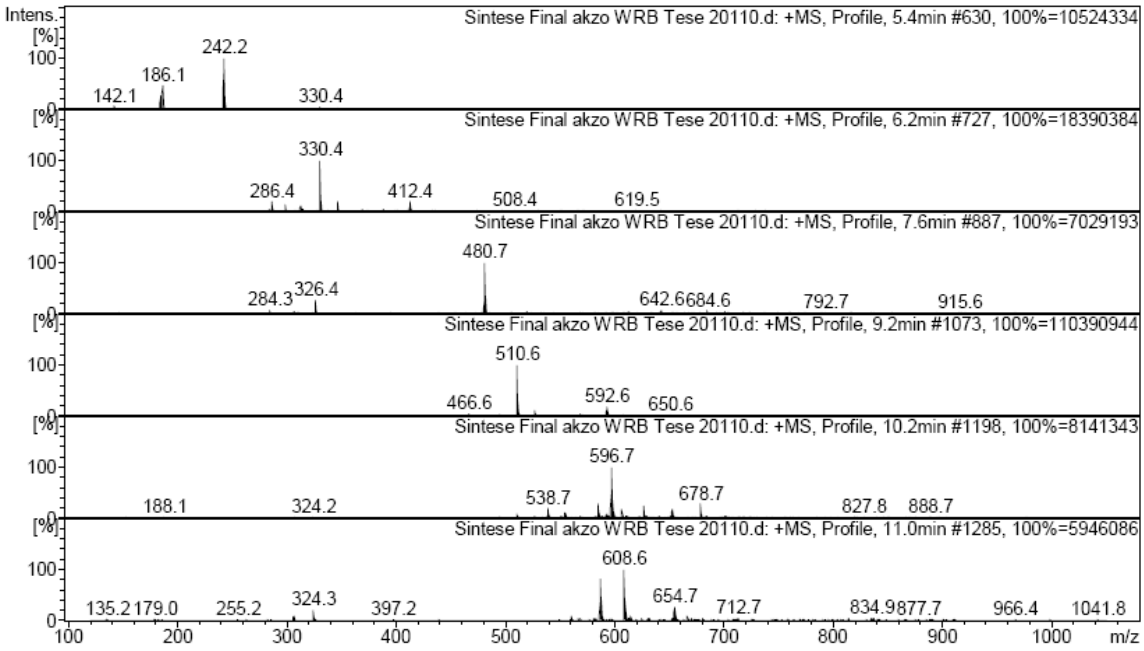


FIGURA 57. Espectros de massas relacionados aos picos eluídos nos tempos de retenção entre 5 e 11 minutos. Aspecto geral.

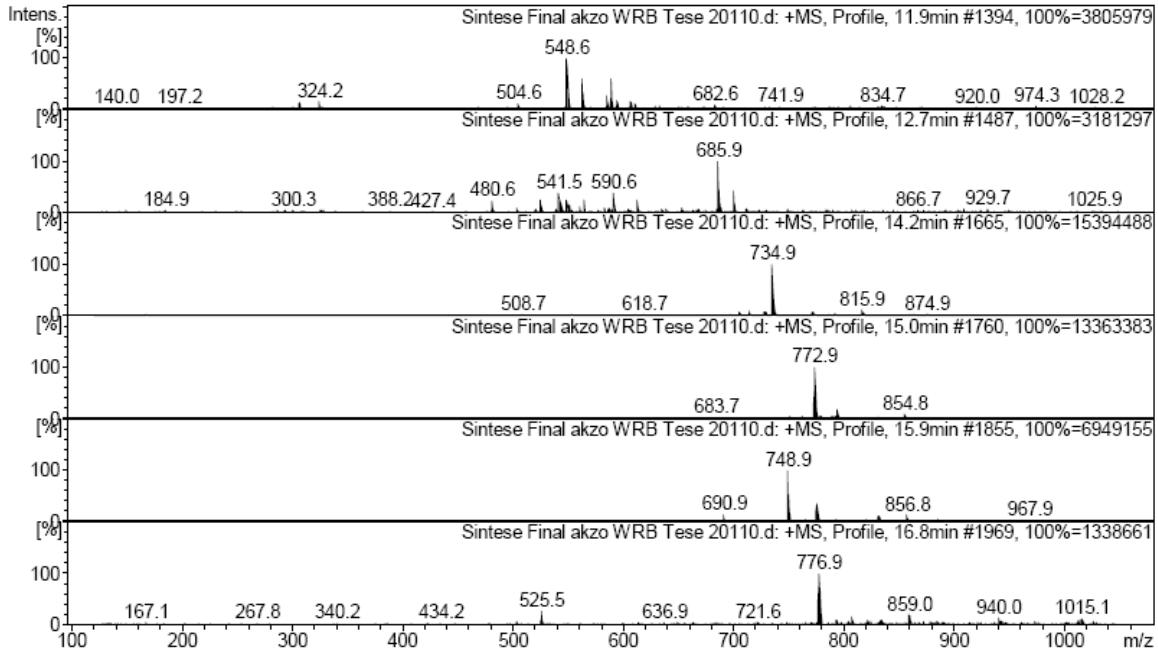


FIGURA 58. Espectros de massas relacionados aos picos eluídos nos tempos de retenção maiores que 11 minutos. Aspecto geral.

Dos principais íons moleculares observados, foram escolhidos e analisados os seguintes íons mais intensos obtidos na faixa do nono minuto (Figura 59): m/z 510,6 e 592,6, considerados os principais componentes do produto obtido pela reação de alquilação.

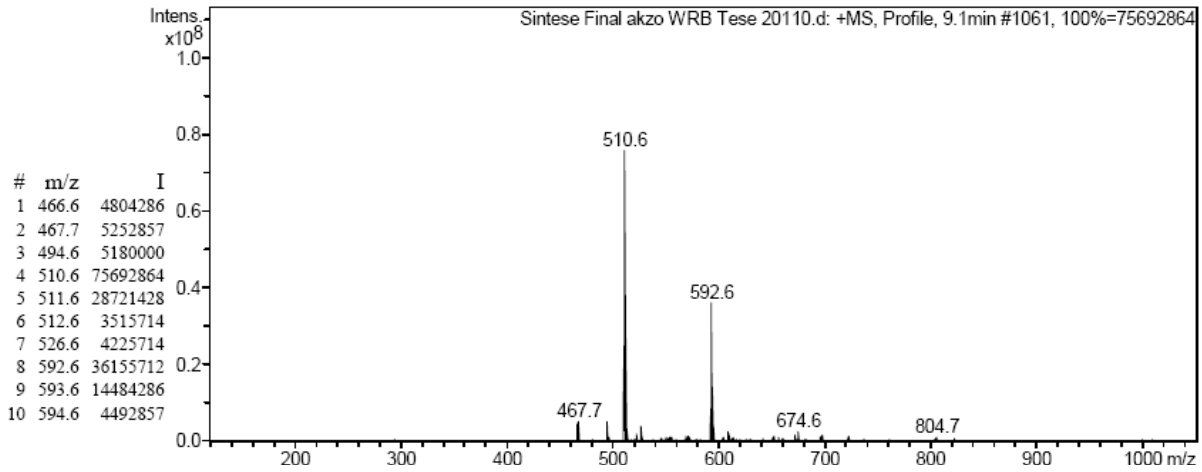


FIGURA 59. Espectro de massas da 2ª Síntese referente ao pico eluído em 9.1 minutos

Para realização das fragmentações, uma amostra da 2ª síntese foi tratada com ácido fórmico e introduzida por infusão direta no espectrômetro de massas, sendo obtido os espectros, em modo positivo, dos íons produtos EM^2 e EM^3 (Figuras 60a e 61a) para os íons moleculares m/z 510,6 e 592,6. Os principais íons produtos obtidos por EM^2 e EM^3, as propostas para os íons moleculares m/z 510,6 e 592,6 e seus respectivos caminhos de fragmentação são apresentadas nas figuras 60b e 61b.

Cabe observar que o resultado obtido para o íon m/z 510,6 ensejou dúvidas quanta a presença do radical formil, o qual não era esperado para os produtos de síntese. As análises complementares por espectroscopia de ressonância de hidrogênio (RMN-H) (apêndice B) e por espectrofotometria de infravermelho (IV) (apêndice C) não confirmaram a presença de bandas característica para aldeídos, ou seja, deslocamento químico entre 9-10 e banda de forte intensidade na freqüência de 1725 cm^{-1}, indicando, deste modo, que o produto referente ao íon

molecular m/z 510,6 trata-se, na verdade, da substância 1-hexadecil-2-OH-sn-glicero-3-fosfocolina que sofreu uma substituição nucleofílica no carbono (sn-2) pela ação do radical formato disponibilizado pelo tratamento prévio da amostra com ácido fórmico.

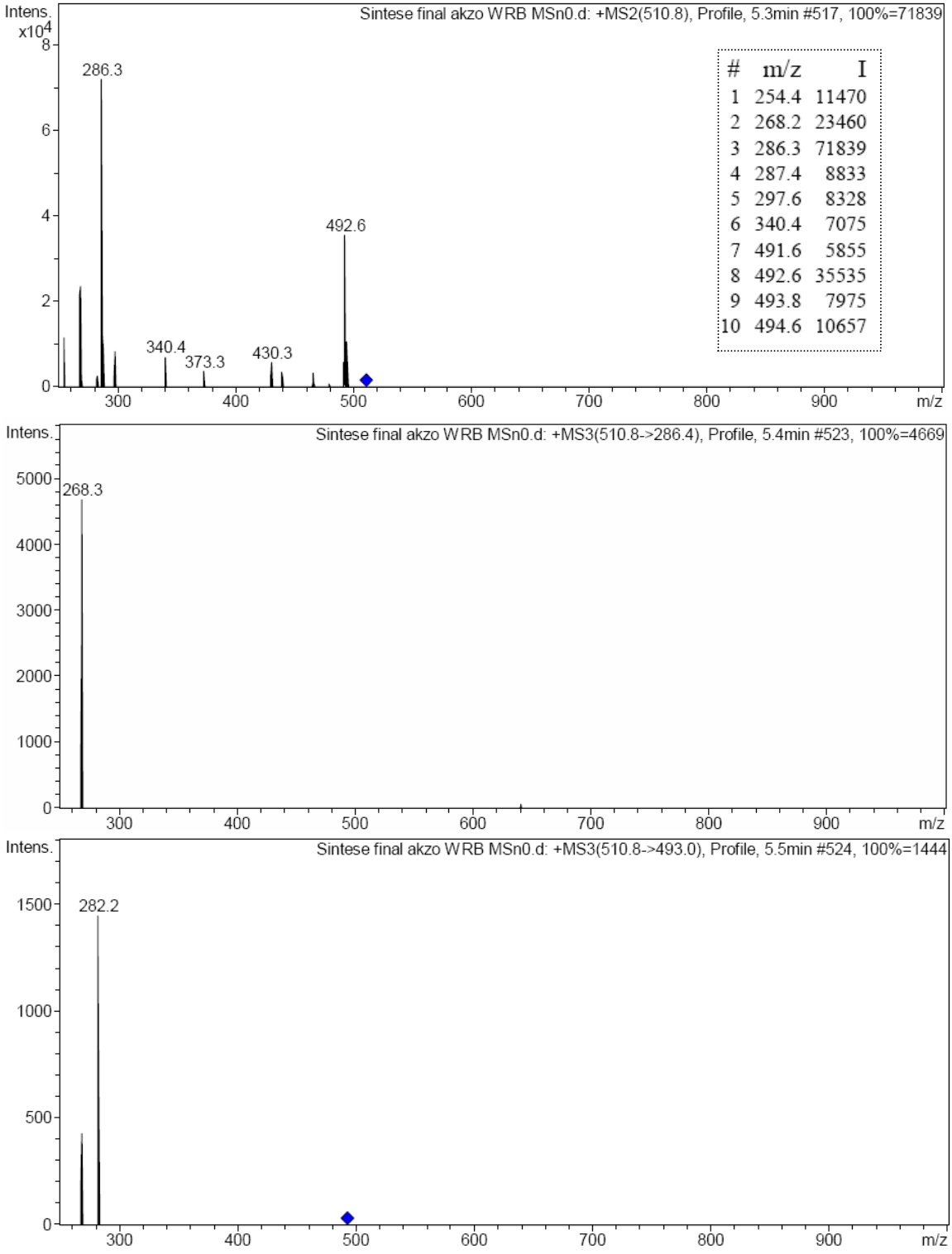


FIGURA 60a. EM^2 do íon molecular m/z 510,6 e EM^3 de seus íons produtos m/z 492,6 e m/z 286,4 obtidos para o produto da 2ª Síntese, Reação de alquilação.

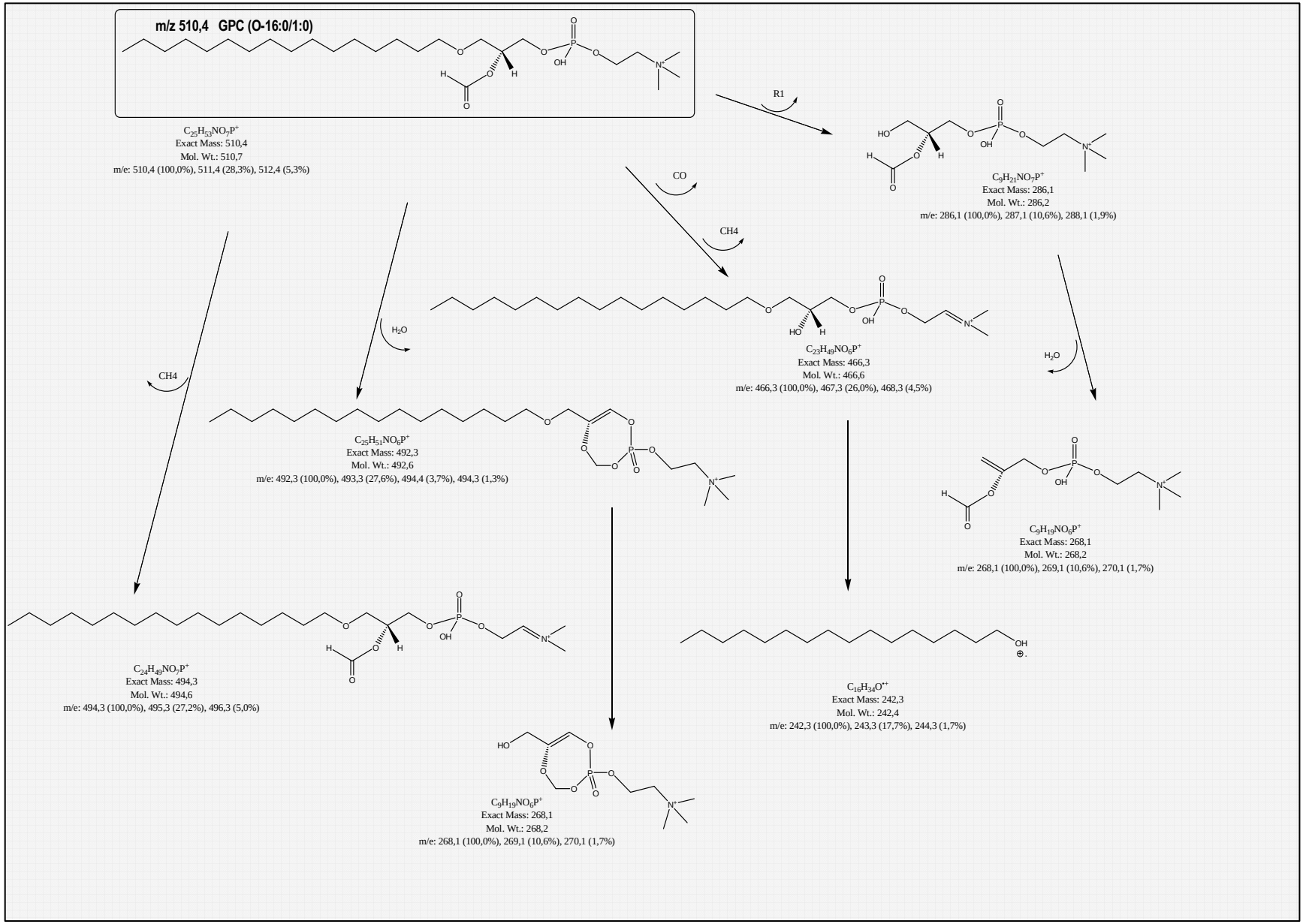
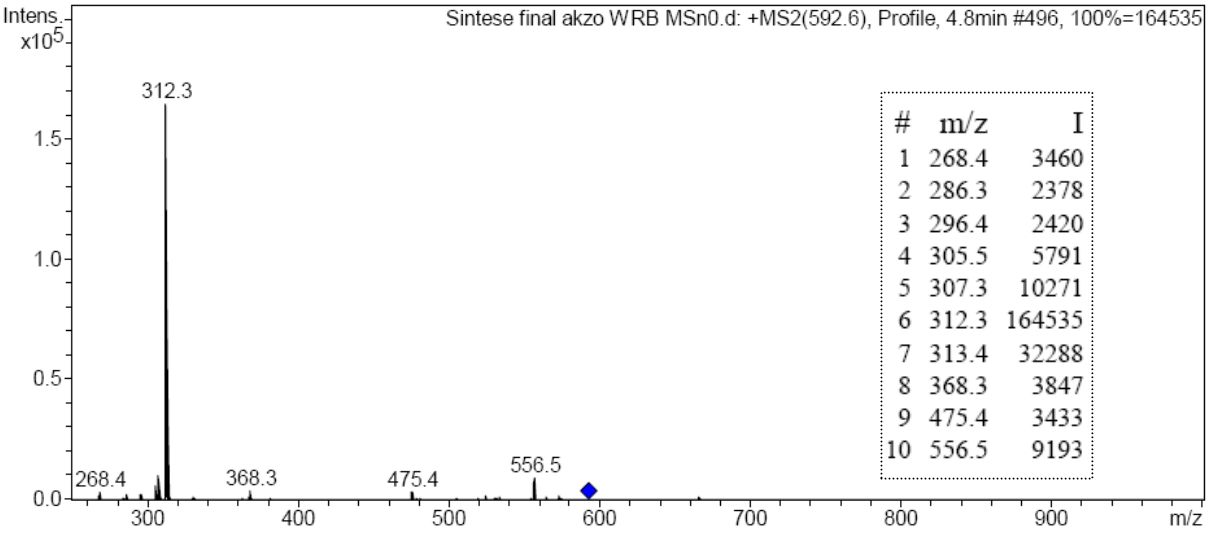
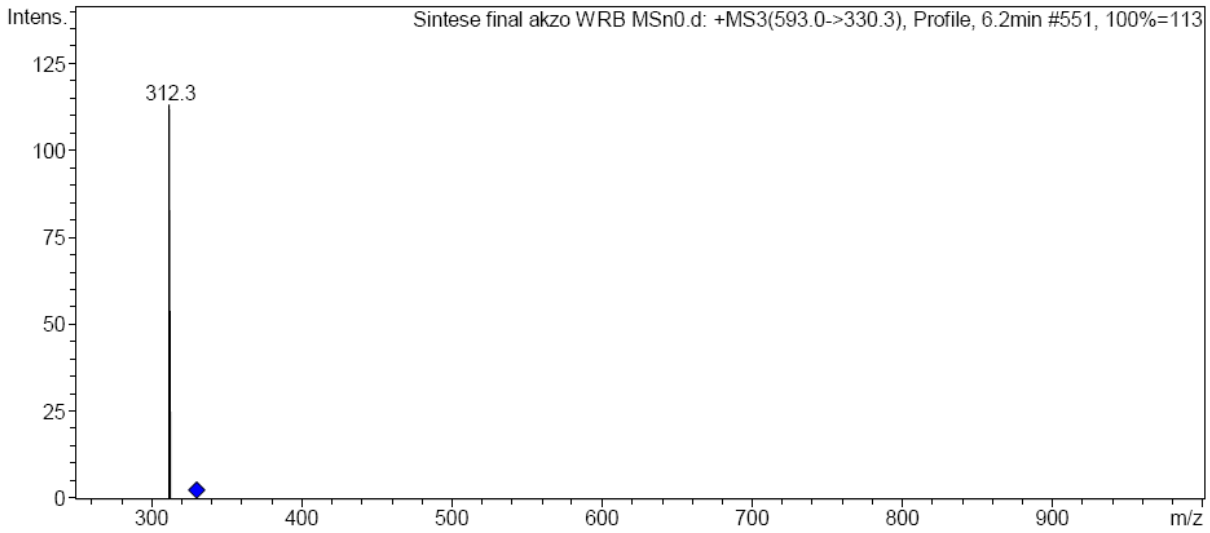


FIGURA 60b**.** Proposta de esquema de fragmentação para íon molecular **m/z 510,4** do produto da alquilação.





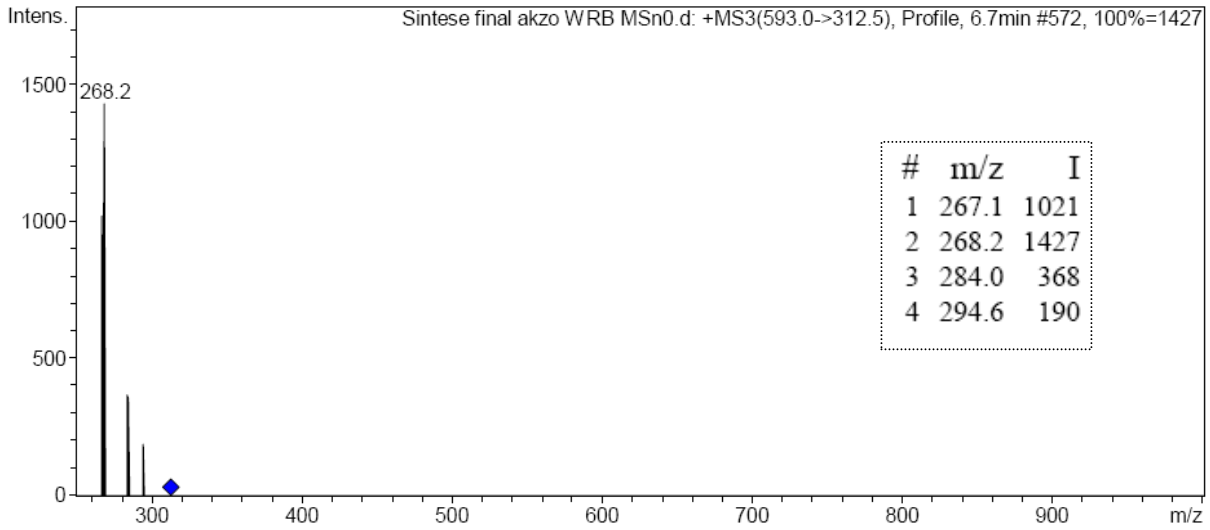


FIGURA 61a. EM^2 do íon molecular m/z 592,6 e EM^3 de seus íons produtos m/z 330,3 e m/z 312,3 obtidos para o produto da 2ª Síntese. Reação de alquilação.

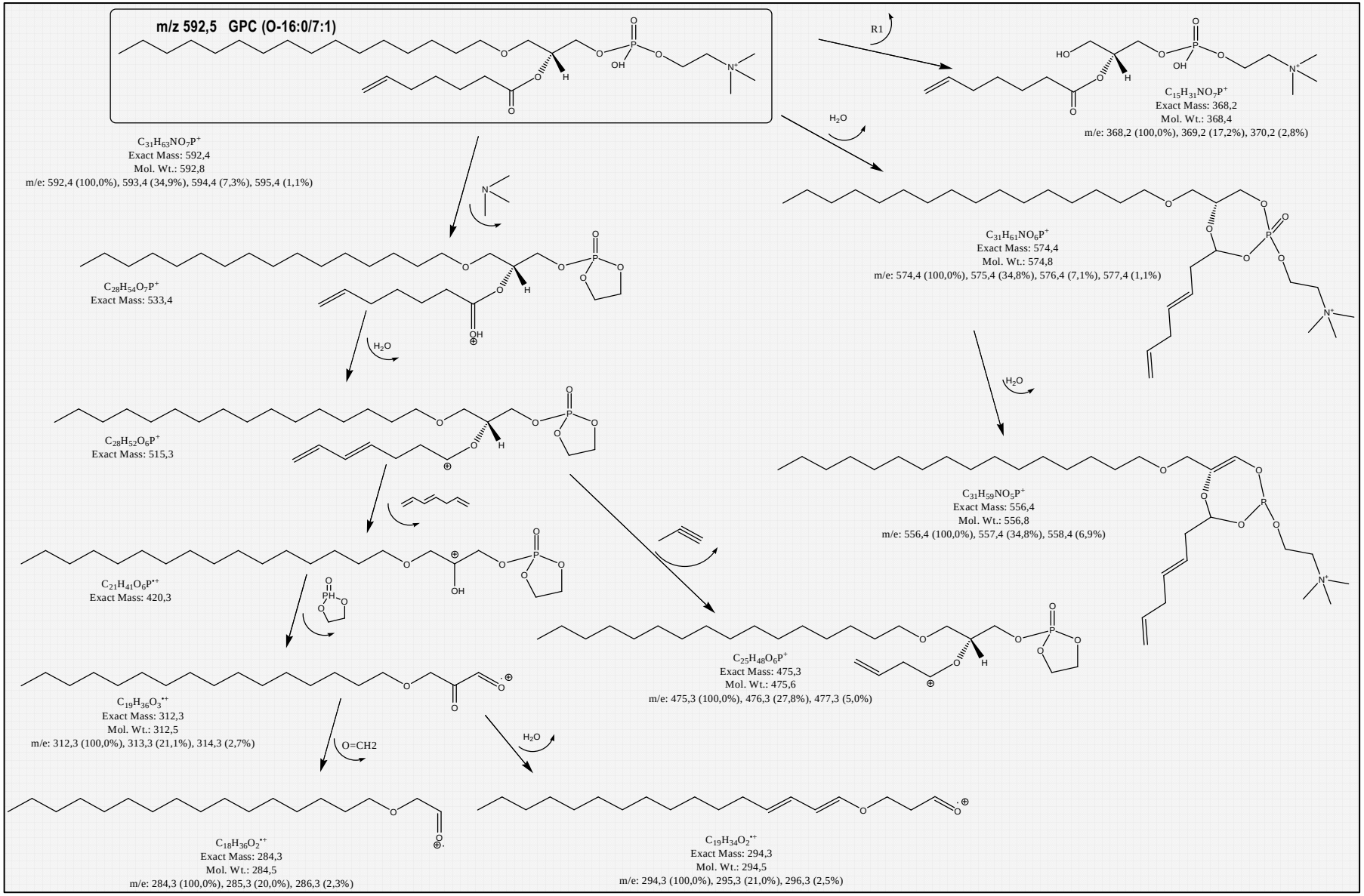


FIGURA 61b**.** Proposta de esquema de fragmentação para íon molecular **m/z 592,5** do produto da alquilação.

4.2 Avaliação dos extratos das esponjas

Esponjas marinhas são reconhecidas como um dos mais primitivos organismos multicelulares do sub-reino *Parazoa*[38], existindo a mais de 940 milhões de anos (NIKOH, *et al*. 1997; DEMBITSKY *et al.*, 2003; BELARBI *et al*. 2003; ERPENBECK e WORHEIDE, 2007). Embora os extratos orgânicos de esponjas marinhas possuam uma alta proporção de lipídios que podem contribuir na bioatividade do organismo, poucos trabalhos registrando o isolamento e a elucidação estrutural de compostos do tipo PAF-análogos têm sido divulgados (IVANISEVIC *et al.*, 2011).

Neste trabalho, as frações F1, F2 e F3 dos extratos (referência e estressado) obtidos das cinco espécies de esponjas marinhas (ver item 3.3.2) foram analisados por espectrometria de massas para verificação da presença de possíveis PAF-análogos em suas composições, sendo avaliado mais especificamente os íons moleculares eluídos na mesma faixa de tempo de retenção registrado para os padrões de PAF (m/z 524) e Lyso-PAF (m/z 482).

4.2.1 Esponja marinha *Amphimedon viridis*

A figura 62 apresenta a comparação entre os CIT relativos às três frações (F1, F2 e F3) obtidas do extrato de referência, nela se pode observar que o procedimento empregado no fracionamento (item 3.3.2.2) alcançou uma boa separação dos componentes polares e apolares do extrato bruto. Nela se podem observar a presença de triacilgliceróis eluindo após 20

[38] Sub-reino que compreende os organismos multicelulares, usualmente existindo como colônias sésseis, tendo células menos especializadas e compreende o único Filo *Porífera*, estando organizado em três classes distintas: a *Hexactinellida* (esponjas vítreas), a *Demospongiae*, o mais diverso de todos, reunindo 90% de toda espécie, e a *Calcarea* (esponja calcárias). http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br

minutos de corrida CIT em azul (fração F1) e a forte presença dos glicerofosfolipídios eluindo entre o quinto e o décimo-quinto minutos CIT em verde (fração F3).

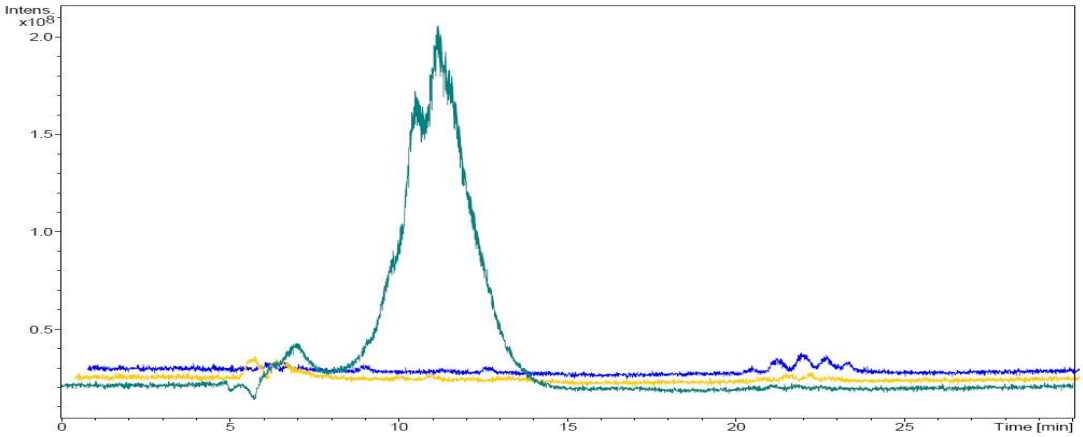


FIGURA 62. CIT das frações F1 (azul), F2 (amarelo) e F3 verde da **Esponja marinha *Amphimedon viridis* (Referência)**. Comparação dos CIT indica uma boa separação alcançada para o fracionamento utilizado. Faixa de retenção entre 20 e 25 minutos indica presença de triacilgliceróis.

Os CIT obtidos para as frações F3 – fração mais polar - (Figura 63) apresentaram uma leve elevação da linha base na faixa de tempo de retenção correspondente aos compostos PAF e Lyso-PAF, acredita-se devido à esperada baixa concentração natural de tais componentes nos extratos brutos; no entanto, como mostra os espectros de massas relacionados aos íons moleculares obtidos entre o sexto e oitavo minuto, houve a detecção dos íons m/z 524,4 e 482,4 para ambos os extratos, confirmando a presença de tais compostos neste organismo. Apesar do pequeno aumento verificado, não se julga possível validar que a submissão ao estresse fez o organismo aumentar a produção de tais compostos para esta espécie. Como principal componente das frações polares obteve-se o íon molecular m/z 510,4, o qual, conforme detalhado em 4.1.2.2, (ver figura 60b) trata-se do composto 1-O-hexadecil-2-formato-sn-glicero-3-fosfocolina.

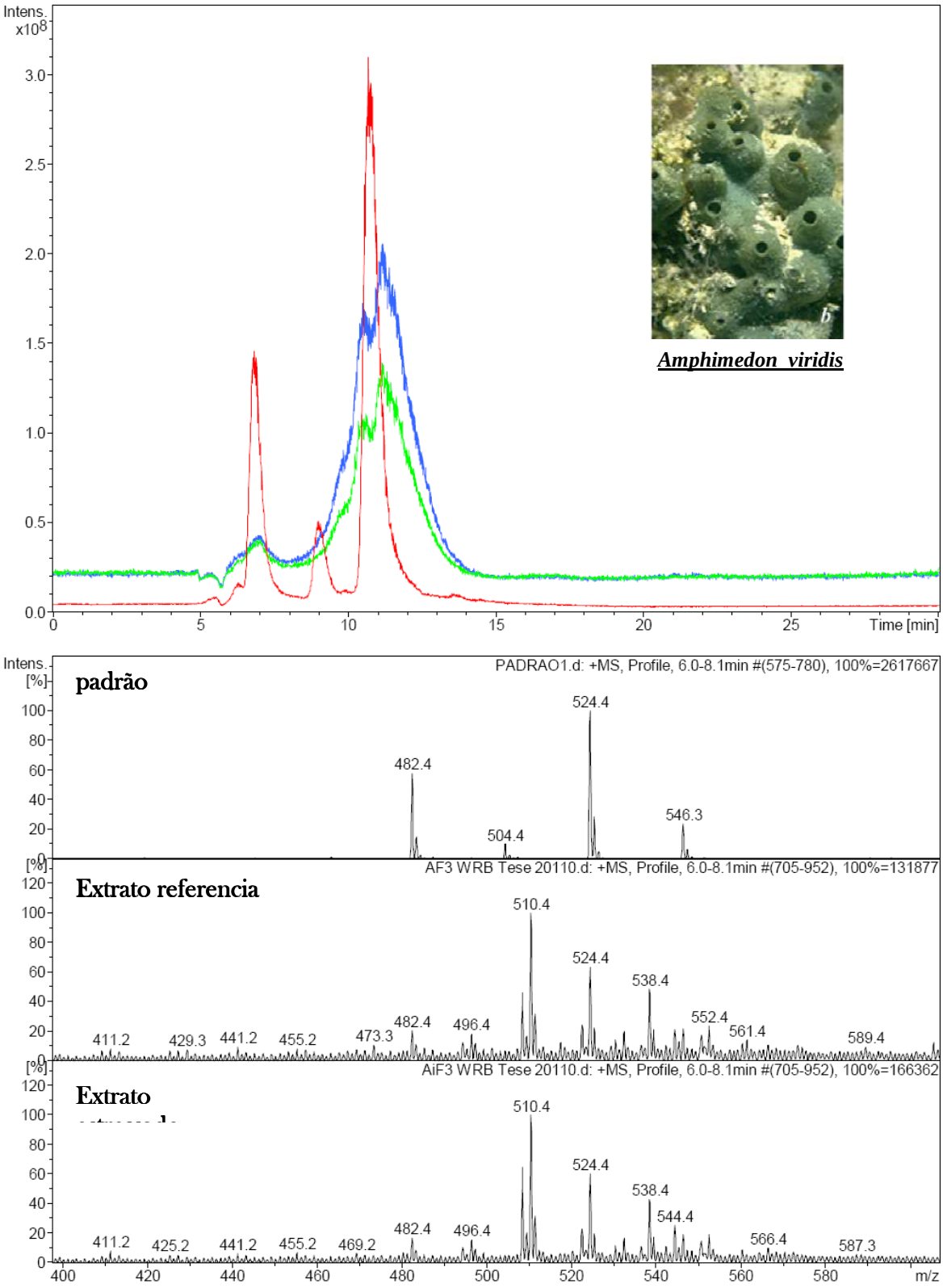


FIGURA 63. CIT (superior) e EM (inferior) faixa de m/z 400 a 600, obtidos para **Esponja marinha *Amphimedon viridis***. Frações polares dos extratos referência (AF3) (em azul) e estressado (AiF3) (em verde) obtidos do efluente do cromatógrafo a líquido comparado aos CIT (em vermelho) e EM dos Padrões de glicerofosfolipídios, GPC (16:0/16:0); GPC (14:0/14:0); PAF e Lyso-PAF.

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

4.2.2 Esponja marinha *Geodia corticostylifera*

Além da confirmação da presença dos íons m/z 524,4; 482,4 e 510,4, foi verificado ser o íon molecular m/z 496,4 o principal componente da fração F3 em ambos os extratos (referência e estressado) desta espécie, o qual produziu como principal íon produto o íon m/z 270,3. A figura 64 apresenta o esquema de fragmentação e a proposição da estrutura para o íon molecular m/z 496,4 como sendo aquela semelhante ao composto 1-hexadecil-2-O-metil-glicerofosfocolina.

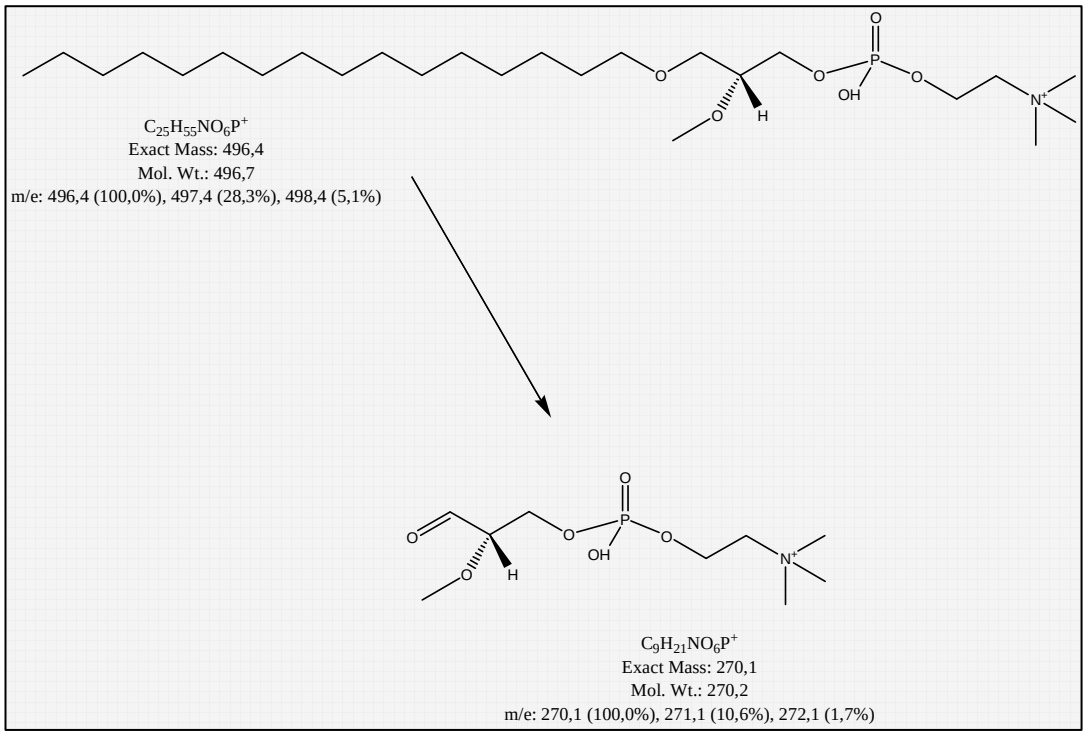


FIGURA 64**.** Proposta de fragmentação e de estrutura para íon molecular m/z 496,4.

Os CIT obtidos para as frações F3 (Figura 65) apresentaram acentuada elevação da linha base na faixa de tempo de retenção correspondente aos compostos PAF e Lyso-PAF.

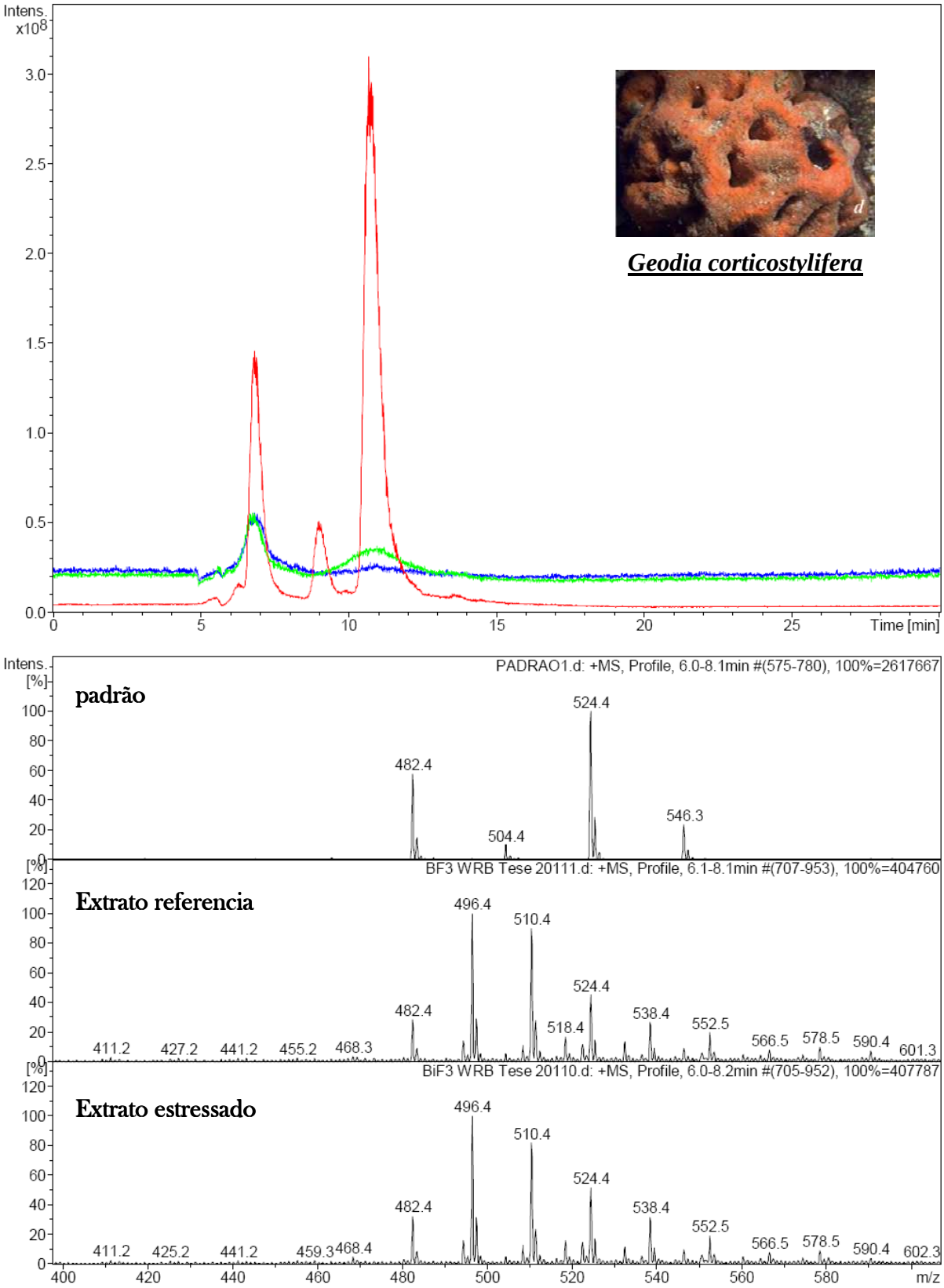


FIGURA 64. CIT (superior) e EM (inferior) faixa de m/z 400 a 600, obtidos para **Esponja marinha *Geodia c.*** Frações polares dos extratos referência (AF3) (em azul) e estressado (AiF3) (em verde), comparado aos CIT (em vermelho) e EM dos Padrões de glicerofosfolipídios GPC (16:0/16:0); GPC (14:0/14:0); PAF e Lyso-PAF.

4.2.3 Esponja marinha *Darwinella sp.*

Os CIT obtidos para as frações F3 (Figura 66) apresentam uma elevação da linha base na faixa de tempo de retenção ligeiramente anterior àquela correspondente aos compostos PAF e Lyso-PAF. Houve a confirmação da presença dos íons m/z 482,4 e do m/z 496,4 e, adicionalmente, dos íons moleculares m/z 520,4 e 548,4 , os quais apresentaram uma elevação percentual para o organismo estressado, indicando a indução de sua produção pelo estresse físico infligido ao organismo.

A ligeira antecipação do tempo de retenção e a verificação da existência do íon m/z 520,4 em substituição ao íon m/z 524,4 indica uma menor lipofilicidade daquele primeiro, ou seja, que ele apresenta uma maior insaturação em sua estrutura, e permite inferir que tal diferença trata-se apenas da presença de duas duplas ligações.

Do mesmo modo, devido ao fato do íon m/z 548,4 apresentar uma ligeiramente maior faixa de tempo de retenção em comparação ao PAF(m/z 524,4), tal componente foi entendido como se tratando da substância 1-octadecil(*9Z;12Z*)-2-O-acetil-glicerofosfocolina.

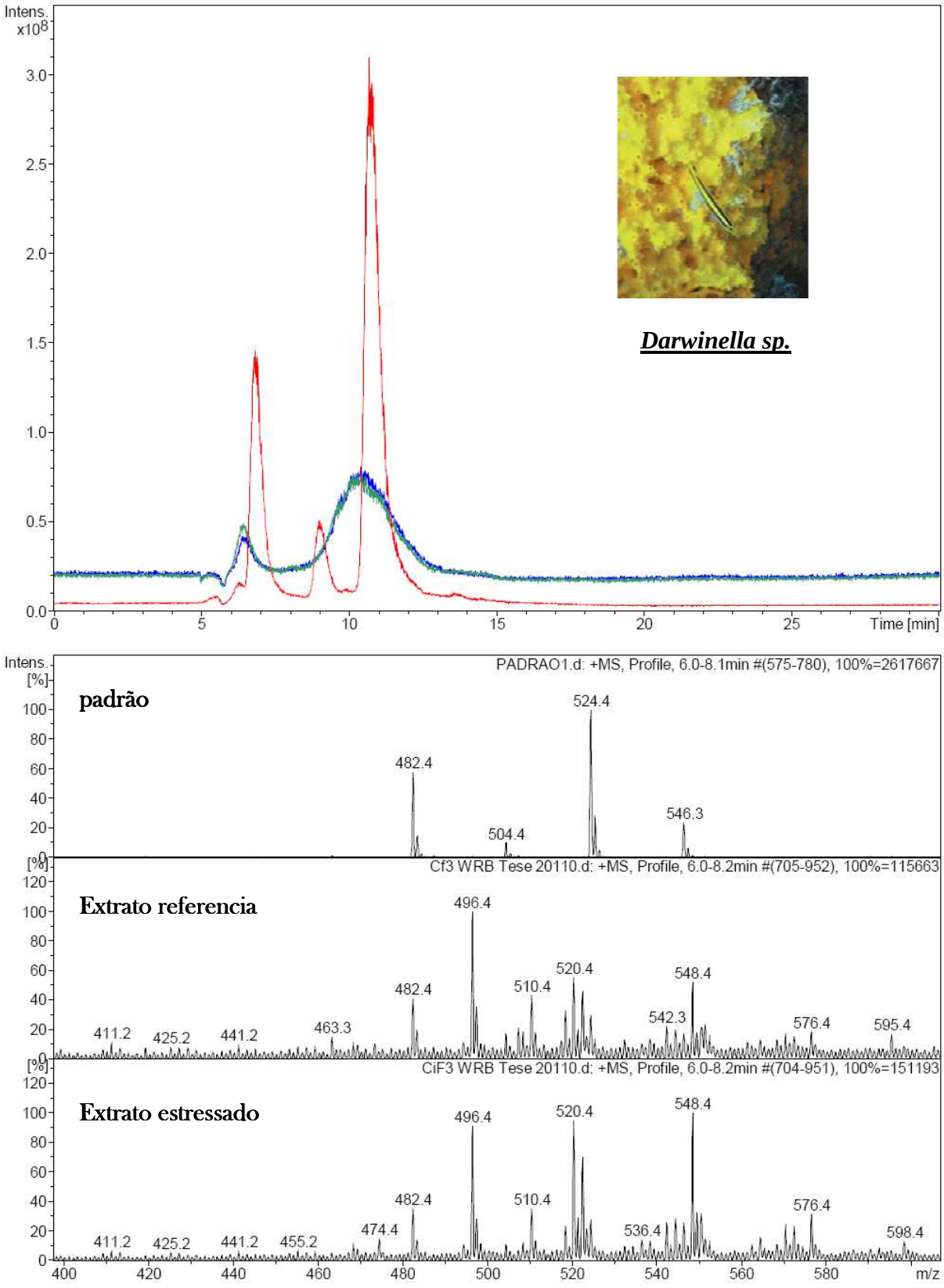


FIGURA 66. CIT (superior) e EM (inferior) faixa de m/z 400 a 600, obtidos para **Esponja marinha *Darwinella sp.*** Frações polares dos extratos referência (AF3) (em azul) e estressado (AiF3) (em verde), comparado aos CIT (em vermelho) e EM dos Padrões de glicerofosfolipídios GPC (16:0/16:0); GPC (14:0/14:0); PAF e Lyso-PAF.

4.2.4 Esponja marinha A*renosclera brasiliensis*

Os CIT obtidos para as frações F3 apresentaram um perfil muitíssimo interessante (Figura 67). Apesar da confirmação da presença do íon m/z 524,4 em ambos os extratos, a elevação da linha base na faixa do tempo de retenção correspondente aos compostos PAF e Lyso-PAF foi muito diminuta, indicando tal composto estar em muito baixa concentração nos extratos ensaiados, não sendo verificado a presença do íon molecular m/z 482,4. Adicionalmente, uma acentuada elevação da linha base entre o quinto e o sexto minuto, apresentada pelos CIT obtidos para as frações F3, indicam a presença de compostos com baixa lipofilicidade, sendo os íons moleculares m/z 467,5 e m/z 483,4, como apresentado pela figura 68, os principais responsáveis por tal elevação.

Cabe ainda ressaltar que esta espécie de esponja marinha, entre as espécies aqui ensaiadas, foi a que produziu os menores teores dos compostos PAF e Lyso-PAF. Contudo, pode ser observado visualmente, quando comparado os CIT para os extratos referencia e estressado, que a razão entre os glicerofosfolipídios menos lipofílicos, eluídos no intervalo de tempo de retenção 5-8 minutos, e aqueles mais lipofílicos (eluídos entre 8 -15 minutos) tornou-se bem maior, o que pode indicar uma possível produção daqueles primeiros em detrimento, ou a partir, desses últimos.

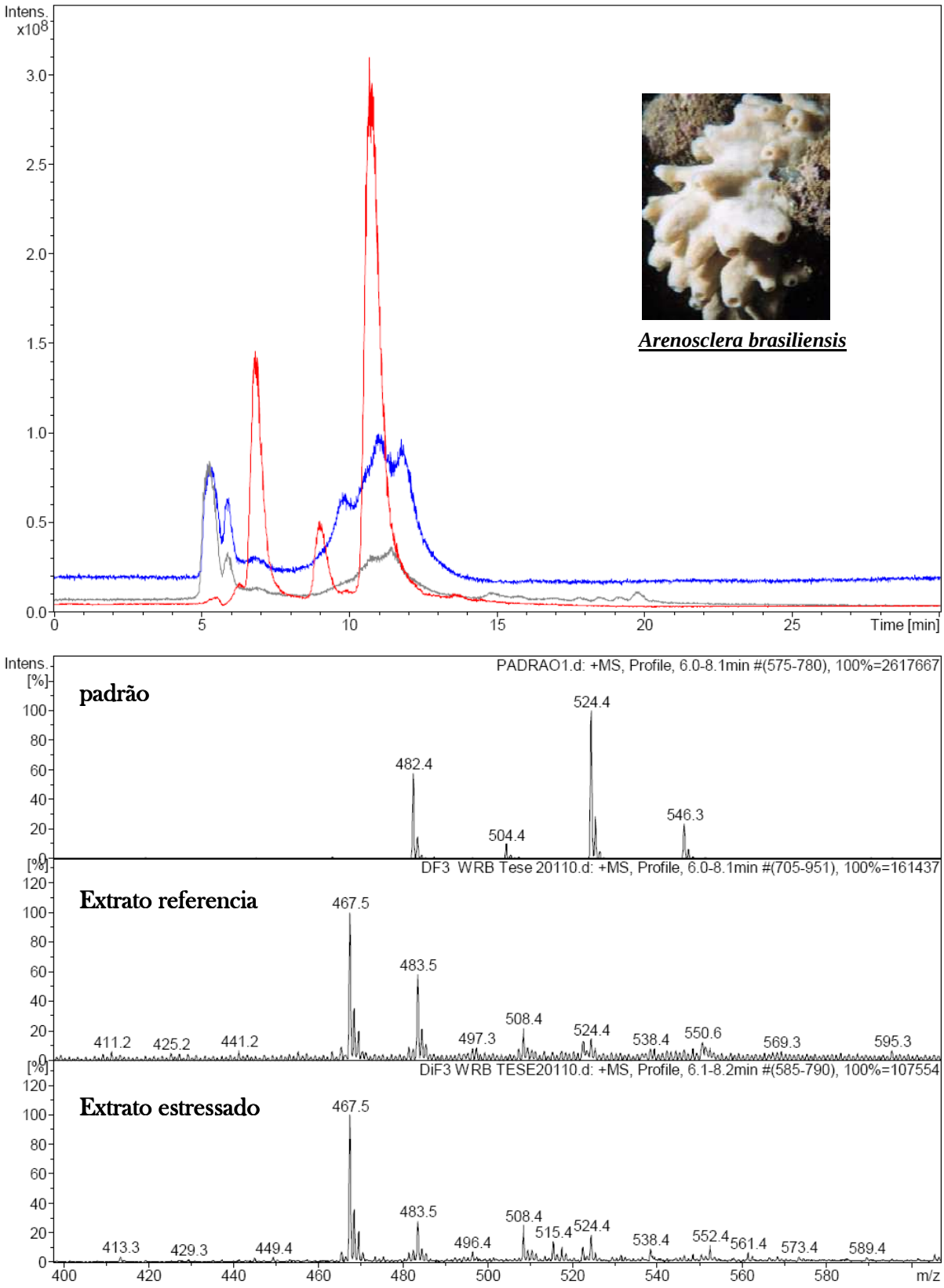


FIGURA 67. CIT (superior) e EM (inferior) faixa de m/z 400 a 600, obtidos para **Esponja marinha *Arenosclera brasiliensis.*** Frações polares dos extratos referência (AF3) (em azul) e estressado (AiF3) (em verde), comparado aos CIT (em vermelho), e EM dos Padrões de glicerofosfolipídios GPC (16:0/16:0); GPC (14:0/14:0); PAF e Lyso-PAF.

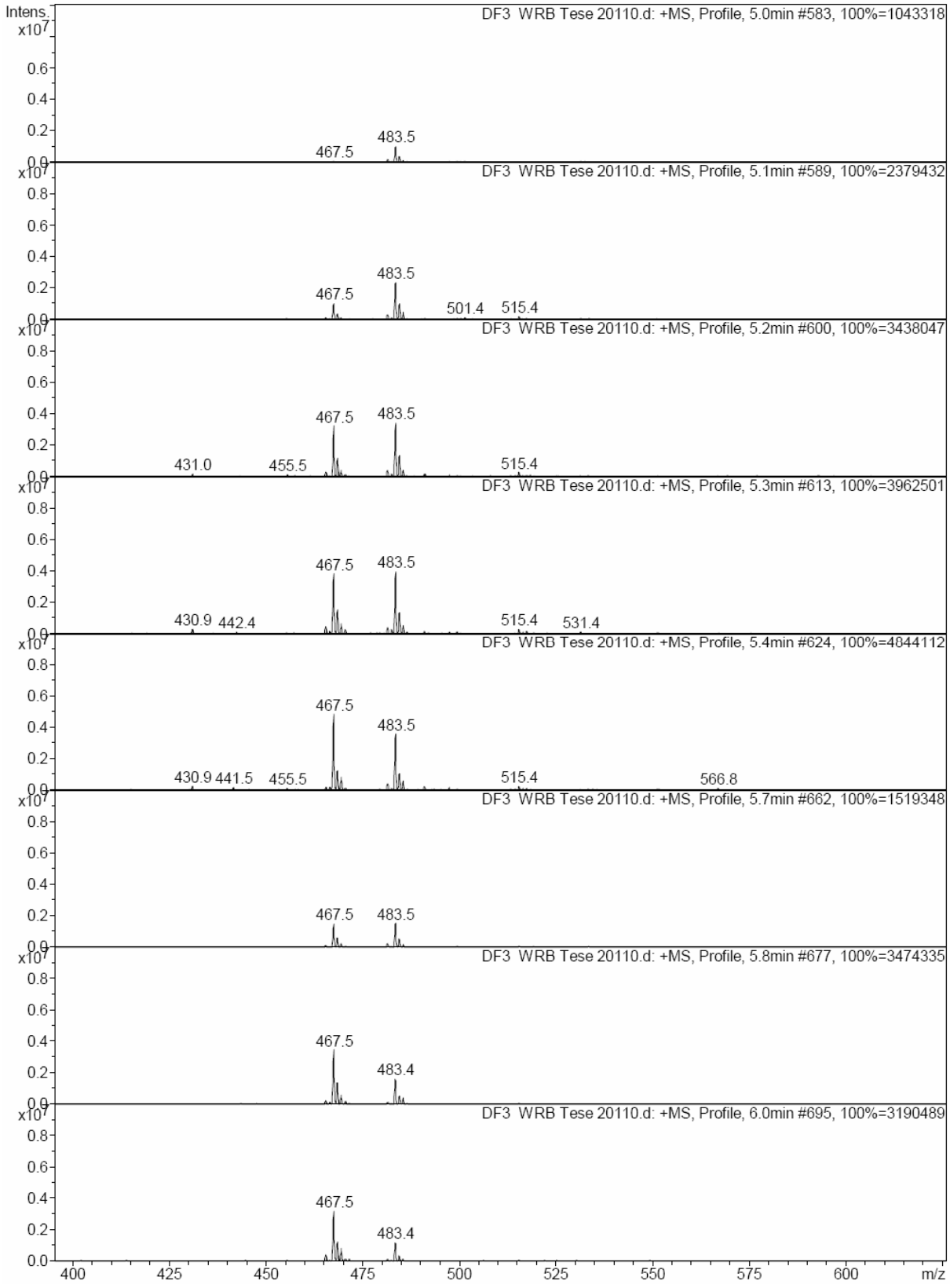


Figura 68. Seqüência temporal dos espectros de massa obtidos entre o quinto e o sexto minuto da eluição (faixa de m/z 400 a 600). Íons moleculares m/z 483 e 467,5 presentes como principais componentes da fração F3 do extrato de referência. Destaca-se a menor lipofilicidade verificada para o íon m/z 483,4, eluído mais rapidamente.

Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

4.2.5 Esponja marinha *Aplysina fulva.*

Os CIT obtidos para as frações F3 (Figura 69) apresentam uma elevação da linha base na faixa de tempo de retenção ligeiramente anterior àquela correspondente aos compostos PAF e Lyso-PAF. Apesar da confirmação da presença do íon m/z 482,4 (lyso-PAF), não foi verificada a presença do íon molecular m/z 524,4 (PAF), contudo foi verificada a eluição do íon molecular m/z 522,4 (PAF-análogo), acredita-se devido à presença de uma insaturação em R1. Também foram detectados os íons m/z 496,4, 508,4 e 552,4 eluindo na mesma faixa de tempo de retenção, indicando tratarem-se de possíveis PAF-análogos.

Como componente principal da fração F3, foi verificado a eluição em 9,5 minutos do íon molecular m/z 732,6 (espectro de massa não apresentado) tendo uma lipofilicidade menor que o GPC (16:0/16:0) usado como padrão. O que indica poder tratar-se, entre os possíveis candidatos designados no Anexo E, do GPC (16:0(*9Z*)/16:0) o qual possui uma insaturação em R1. Adicionalmente, tendo como parâmetro o íon molecular m/z 732,6 como componente principal da fração F3, verifica-se diferentemente do esperado, uma diminuição da concentração do PAF-análogo m/z 522,4, passando de 12,08 %, no extrato referencia, para 9,57 %, no extrato estressado (cálculos não apresentados).

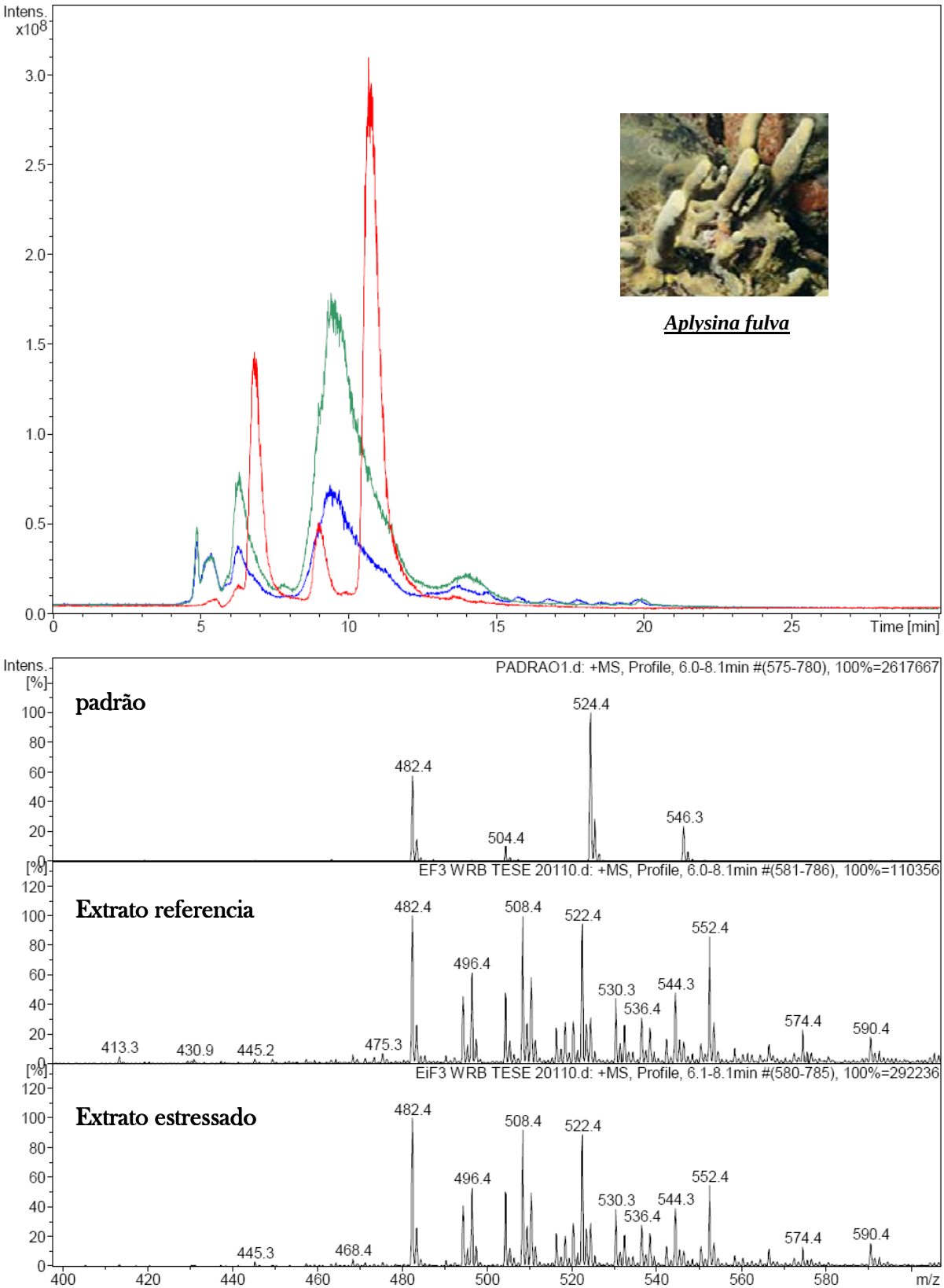


FIGURA 69. CIT e EM (faixa de m/z 400 a 600) obtidos para **Esponja marinha *Aplysina fulva.*** Frações polares dos extratos referência (AF3) (em azul) e estressado (AiF3) (em verde), comparado aos CIT (em vermelho) e EM dos Padrões de glicerofosfolipídios GPC (16:0/16:0); GPC (14:0/14:0); PAF e Lyso-PAF.

Trabalhos realizados pelo Departamento de Química da Universidade de New Castle, Austrália, isolaram e identificaram as substâncias 1-O-hexadecil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina e 1-O-hexadecil-2-OH-sn-glicero-3-fosfocolina presentes no extrato da esponja marinha *Crella incrustans* (BUTLER *et al*., 1996). Também foi identificado no extrato da esponja marinha *Spirastrella abata* uma mistura de glicerofosfolipídios PAF análogos (SHIN *et al.*, 1999; ALAN *et al.*, 2001). Além dos trabalhos de Butler *et al.* (1996), Shin *et al.* (1999) e Alam *et al.* (2001), se podem enumerar os trabalhos de Zhao *et al.* (2003), que identifica dois novos lyso-glicerofosfolipídios no extrato da esponja marinha *Stelletta sp.* coletada na Coréia; de Muller *et al.* (2004), que preconiza que a esponja marinha *Suberites domuncula*, coletada na Croácia, produz, submetida a estresse, alquil-lipídios derivados, tendo sido identificados dois Lyso-PAF compostos em seus extratos; e de Genim *et al.* (2008), que apresenta uma investigação dos principais lipídios existentes em 22 diferentes espécies de esponjas marinhas coletadas nos oceanos Atlântico e Pacífico, nos mares Mediterrâneo e Vermelho e no Golfo Pérsico.

No presente trabalho, os resultados obtidos por espectrometria de massas também comprovaram a presença das substâncias PAF e/ou Lyso-PAF nos extratos de todas as esponjas marinhas ensaiadas. Contudo, apesar de trabalhos anteriores, Thompson e Hanahan, 1963; Sugiura *et al.*, 1991 e Muller *et al.* 2004, afirmarem que o PAF ocorre em uma ampla variedade de organismos e a sua produção possa ser desencadeada por diferentes estímulos estressantes, *p.ex.* danos físicos, substâncias tóxicas, ambiente inóspito ou nocivo, etc., não foi julgado possível validar, com a metodologia aqui empregada (aplicação de estresse por inanição), que houve a indução do aumento da produção de PAF ou PAF-análogos nas espécies de esponjas marinhas ensaiadas.

Além dos íons moleculares específicos m/z 524,4 (PAF) e m/z 482,4 (Lyso-PAF), também foram observados os íons moleculares m/z 467,5; 483,5; 496,4; 508,4; 510,4; 538,4, e 522,4. Cabe ressaltar que a EM^n do íon molecular m/z 496,4, identificado na esponja marinha *Geodia Corticostylifera*, possibilitou propor a estrutura do PAF-análogo 1-O-hexadecil-2-O-metil-sn-glicero-3-fosfocolina, um glicerofosfolipídio homólogo da substância chamada EDELFOSINE reconhecida como um potente agente anticâncer. Adicionalmente, para a esponja marinha *Arenosclera brasiliensis* foi observado um padrão diferenciado, onde foram verificados os íons moleculares m/z 467,5 e m/z 483,5 que acredita-se tratarem, com base em suas lipofilicidades, de ácidos lysofosfatídicos.

4.3 Ensaios com bactérias marinhas

Quanto aos processos de crescimento das bactérias marinhas *Shewanella putrefaciens* (Sp); *Vibrio estuarians* (Ve); *Pseudoalteromonas elyakovii* (Pe); *Polibacter irgensi* (Pi) e *Pseudomonas fluorescens* (Pf), a avaliação quantitativa dos poços inibidos das microplacas confirmou o controle positivo do sulfato de cobre (controle) e a ótima inibição para o produto da alquilação (2ª Síntese), demonstrando ainda satisfatórias inibições para os extratos das esponjas *Arenosclera brasiliensis* e *Geodia cortiscotylifera*.

Os gráficos de percentuais de efeito de inibição (Figura 70), tendo por base de comparação 100% de efeito de inibição obtido pelo controle ($CuSO_4.5H_2O$), demonstram que a bactéria *Pseudoalteromonas elyakovii* (Pe) apresentou uma maior resistência ao efeito biocida proporcionado pelos extratos e pelo produto da 2ª síntese; contudo em relação ao produto de síntese, pode ser verificado um ótimo poder de inibição para uma concentração de

100 µg/l, o que indica que mesmo em baixas concentrações o produto de síntese mostra- se como promissor anti-incrustante com efeito inibidor do crescimento de bactérias marinhas.

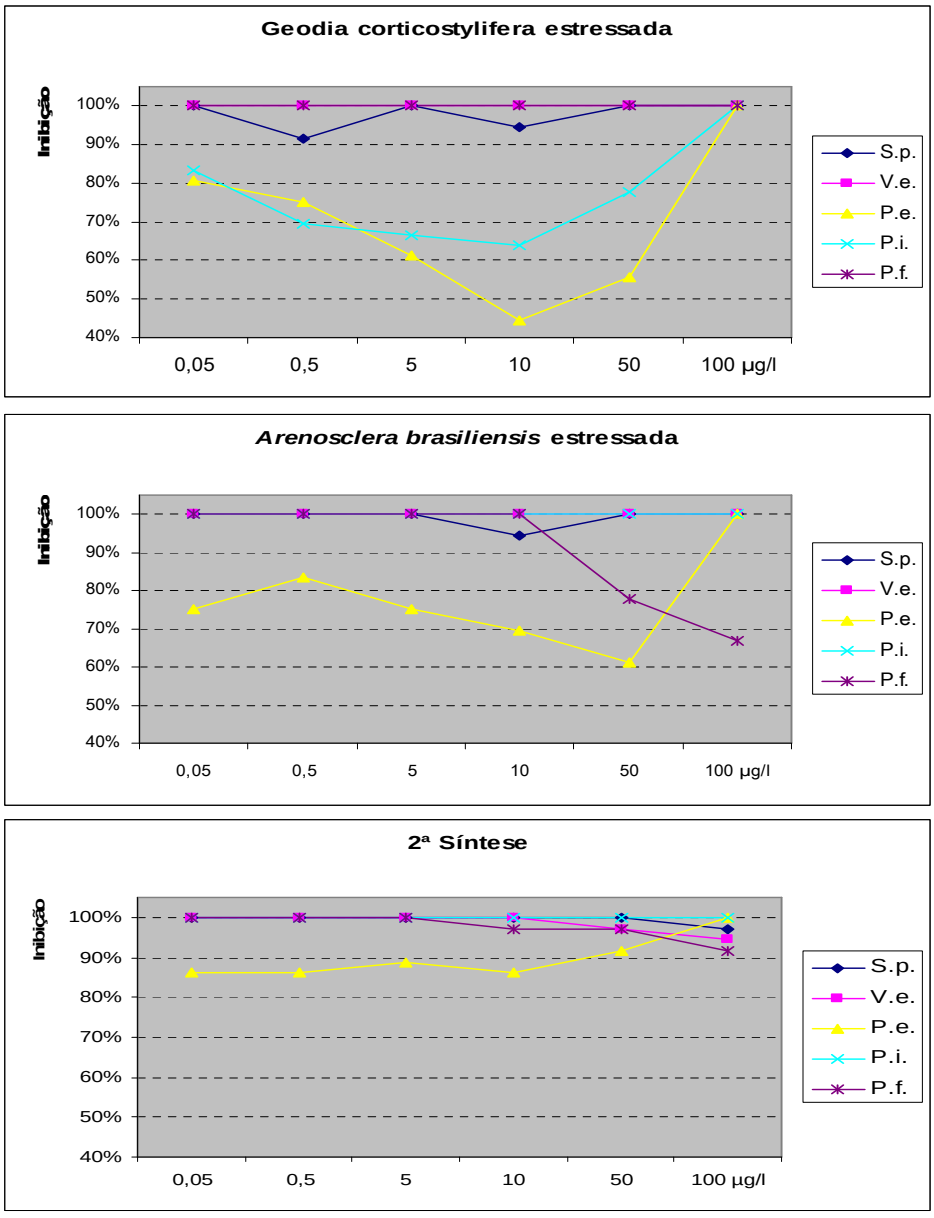


Figura 70. Gráficos de Percentuais do efeito de inibição obtido pelos extratos das esponjas marinhas *Arenosclera b.* e *Geodia c.* (ambas estressadas), e do produto da 2ª síntese comparado aquele obtido pelo controle $CuSO_4.5H_2O$, contra o crescimento das bactérias marinhas *Shewanella putrefaciens* (Sp); *Vibrio estuarians* (Ve); *Pseudoalteromonas elyakovii* (Pe); *Polibacter irgensi* (Pi) e *Pseudomonas* ***fluorescens*** (Pf). Contagem realizada 48 horas após inoculação. Efeito inibidor do crescimento do $CuSO_4.5H_2O$ considerado como 100% para todas as bactérias.

A avaliação estatística dos dados obtidos neste ensaio, visando à verificação das diferenças entre os tratamentos realizados, foi efetuada tendo por hipótese nula, vinculada a ANOVA, o questionamento se os efeitos de inibição dos tratamentos podem ser considerados iguais a um nível de significância de 5%, teve um resultado negativo (ZAR, 1996). A avaliação pos-hoc usando o teste de comparação múltipla de Dunnet, questionando se os valores de inibição dos extratos e do produto da 2ª síntese são iguais aquele obtido pelo tratamento usando o controle, deu resultados negativos para todos os tratamentos (Apêndice D).

4.4 Ensaios com microalgas marinhas

Com relação à inibição do crescimento celular, verificou-se, conforme apresentado pela figura 71, que a solução contendo o produto de síntese apresentou uma inibição superior àquela produzida pela do $CuSO_4$, nos seguintes percentuais: 63 % sobre o crescimento da Diatomácea *Skeletonema costatum*; e 38 % sobre a Prasinofícea *Tetraselmis striata*. e 0,46 % sobre a Clorofícea *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 Hellio *et al*. (2002), pela *Skeletonema costatum*, o que ratifica que métodos usuais do controle da bioincrustação, com o emprego de tintas anti-incrustante contendo cobre, não é de todo efetivo sobre o biofilme formado por algas diatomáceas.

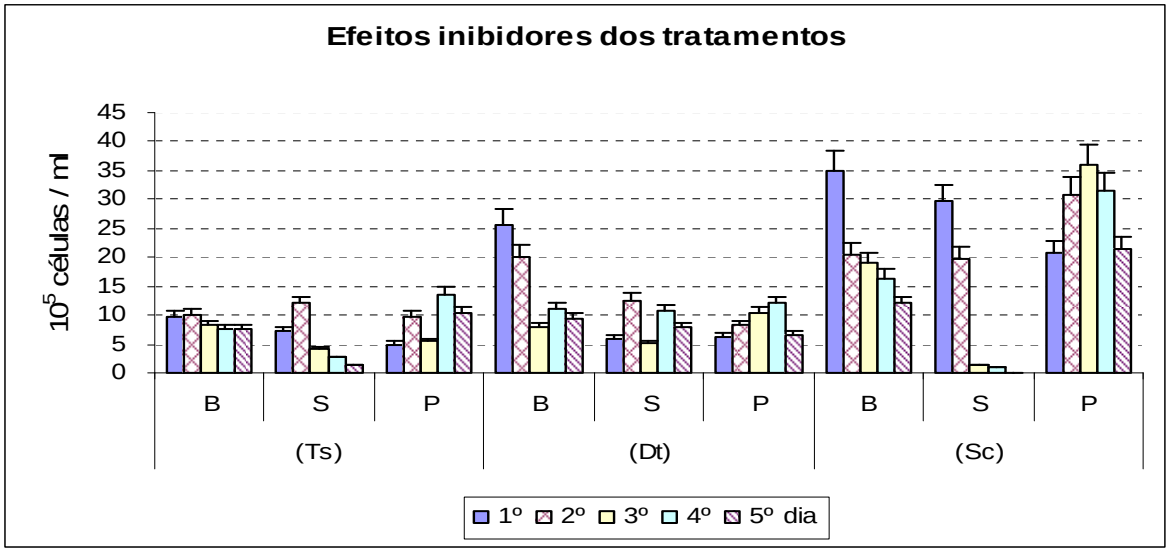


FIGURA 71. Gráfico dos efeitos inibidores das soluções: $CuSO_4$ - Padrão de controle (P); Produto da 2ª síntese (S) e Branco de reagentes (B), sobre o crescimento celular das microalgas marinhas *Tetraselmis striata* (*Ts*); *Dunaliella tertiolecta* (*Dt*) e *Skeletonema costatum* (*Sc*). Contagem realizada diariamente, após inoculação das soluções, por um período total de cinco dias. Concentração celular inicial para todos os tratamentos foi de $5x10^5$cel/ml. Branco de reagentes contendo 150 µL da solução de metanol/diclorometano/água (2:1:1 v/v).

Os gráficos dos efeitos inibidores usando os dados agrupados quanto ao número total de células (ver Apêndice D), demonstram que o produto da 2ª síntese exibe alto nível de inibição contra o crescimento da Diatomácea *Skeletonema costatum* e parece ser ativo contra o crescimento da Prasinofícea *Tetraselmis striata* e pouco ativo contra o desenvolvimento da Clorofícea *Dunaliella tertiolecta* (Figuras 72-74).

Torna-se importante ressaltar a observação da atividade anti-incrustante do produto de síntese, especialmente contra o crescimento de espécies de Diatomáceas, pois esse grupo micro-organismos representa um dos componentes principais da biomassa da microincrustação.

No presente trabalho admitiu-se por suposição, apesar de não testada a hipótese, que glicerofosfolipídios análogos ao PAF ao alcançarem os invólucros celulares de micro-organismos, larvas ou ovos, sejam adsorvidos pelas camadas de peptidoglicanos,

polissacarídeos, lipo-polissacarídeos ou fosfolipídios, constituintes destes invólucros, ocasionando: *i*) danos à membrana plasmática da célula atingida, por exemplo, deformação

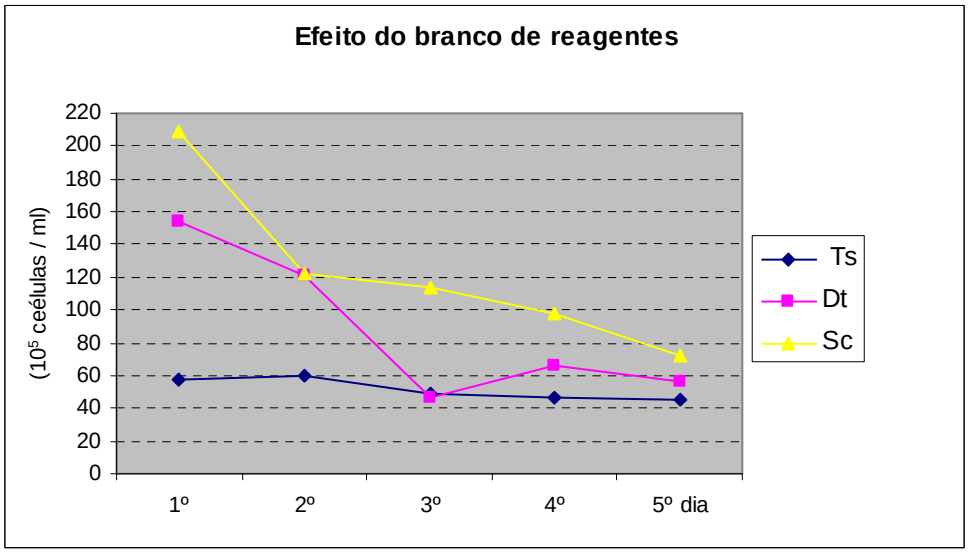


FIGURA 72. Gráfico do efeito inibidor da solução Branco de reagentes (B) sobre o crescimento das microalgas após cinco dias de incubação. Ts – *Tetraselmis striata,* Dt – *Dunaliella tertiolecta,*, Sc – *Skeletonema costatum.* Dados agrupados quanto ao nº total de células.

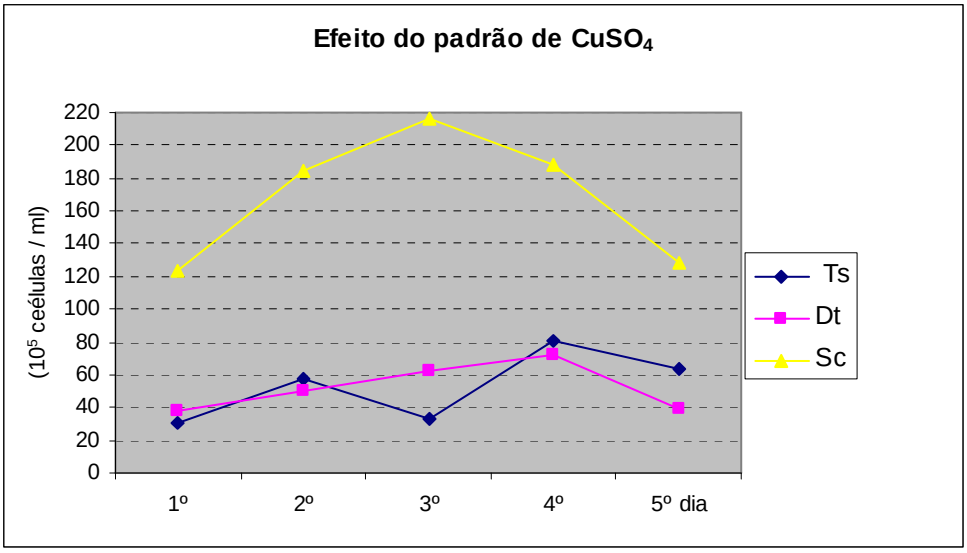


FIGURA 73. Gráfico do efeito inibidor da solução de $CuSO_4$ Padrão de controle (P) sobre o crescimento das microalgas após cinco dias de incubação. Ts – *Tetraselmis striata,* Dt – *Dunaliella tertiolecta,* Sc – *Skeletonema costatum.* Dados agrupados quanto ao nº total de células.

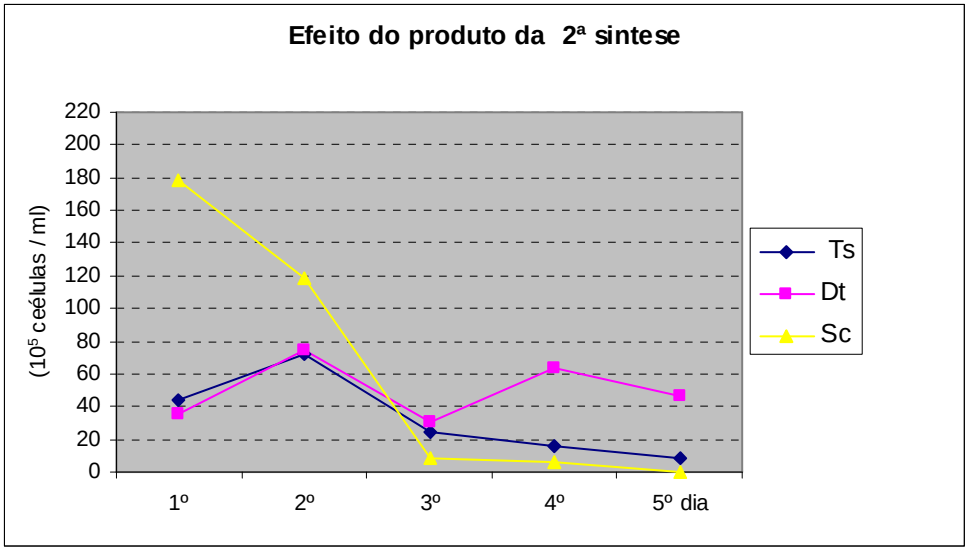


FIGURA 74. Gráfico do efeito inibidor da solução do produto da 2ª síntese (S) sobre o crescimento das microalgas após cinco dias de incubação. Ts – *Tetraselmis striata*, Dt – *Dunaliella tertiolecta*, Sc – *Skeletonema costatum*. Dados agrupados quanto ao nº total de células.

e/ou rompimento; e *ii*) desencadeamento de efeitos biológicos à ação agonista, por exemplo, inflamação, inibição de síntese ou apoptose[39] celular, levando este conjunto de ações à repulsão ou morte destes organismos marinhos responsáveis pela iniciação do processo de formação da bioincrustação e, conseqüentemente, cessando ou mitigando seu desenvolvimento.

Conforme descrito por Maire *et al*. (2000), a desestabilização de uma membrana celular ocasionada pela ação de um composto detergente ocorre em três estágios seqüenciais, onde: *i*) o detergente invade uma região da bicamada de fosfolipídios; *ii*) os fosfolipídios daquela região da membrana tornam-se saturados com o detergente incorporado e passa a coexistir em um equilíbrio termodinâmico com as micelas que começam a se formar; e, *iii*) os fosfolipídios são então totalmente solubilizados pelas micelas formadas, ocorrendo uma desintegração daquela região da membrana celular. Compostos detergentes, com base em suas estruturas

[39] Mecanismo fisiológico celular pelo qual as células desnecessárias, deficitárias ou que comprometam a integridade do organismo se autodestróem.

moleculares, podem ser distribuídos em quatro classes distintas: *i*) iônicos com cadeias lineares, podendo ser catiônico ou aniônico; *ii*) iônicos derivados de sais de ácidos biliares; *iii*) não iônicos; e *iv*) zwitteriônicos, onde nesta última, também podem ser incluídos os glicerofosfolipídios contendo cadeias apolares com seis ou mais átomos de carbono (HAUSER, 2000; SEDDON *et al.*, 2004).

Adicional e complementarmente, entende-se que a sinalização celular é um mecanismo complexo e seletivo, onde proteínas transmembranas estão envolvidas no recebimento do sinal externo, quando do contato do composto com a membrana plasmática e, na resposta a este sinal, com o desencadeamento de vários mecanismos intracelulares, sendo que, nestes processos, concentrações efetivamente baixas, na ordem de nanomolar, já são capazes de deflagrar as reações de ativação celular (ALBERTS *et al*. 2002; BRADSHAW e DENNIS, 2003).

Heringdorf e Jakobs (2007) e Murakami (2011) relacionaram diversos lipídios mediadores que atuam como agonistas para receptores G-PCR, entre os quais se destacam os lyso-glicerofosfolipídios e o ácido lyso-fosfatídico, que regulam, em células de mamíferos, uma ampla gama de funções celulares, como, por exemplo: proliferação, migração, contato célula-célula, adesão, etc. Receptores G-PCR específicos ao PAF e seus análogos, também denominados PAF-receptores (PAFR), sinalizam concomitantemente a ativação das fosfolipases tipo A (PLA_2) e o início da hidrólise do fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PIP_2), levando, respectivamente, a hidrólise de glicerofosfocolinas presentes na membrana celular e a produção do inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3) e diacilgliceróis, associada a uma elevação do afluxo de íons cálcio ao citoplasma, que por sua vez ativa as fosfolipases tipo C cálcio-dependentes levando a uma liberação de acido araquidônico e lyso-fosfatídios (Figura 86), os quais servirão, respectivamente, como substrato para produção de eicosanóides - precursores

da inflamação - e replicação, pela ação das fosfolipases tipo D, de PAF e ácido lyso-fosfatídico, os quais, por sua vez, reiniciam o ciclo (XIE e MEIER, 2004; BROCK, 2011). Adicionalmente, o afluxo de íons cálcio extra-celular, existindo na ordem de 10^{-3} molar, para o interior da célula - onde deve ser mantido tão baixo quanto 10^{-7} molar - pode ocasionar um efeito deletério em importantes mecanismos celulares cálcio dependentes e até mesmo iniciar o processo de apoptose celular (JOSEPH e HAJNOCZKY, 2007; MIKOSHIBA, 2007).

4.5 Testes de campo

Os testes de campo foram realizados, em parceria, pela Divisão de Biotecnologia Marinha do IEAPM e pelo laboratório da empresa International Tintas, em atendimento ao termo de confidencialidade firmado entre o Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM e pela International Tintas - Akzo-Nobel.

4.5.1 Produto da 1ª síntese. Utilizando tinta base contendo cobre

Em todos os tratamentos utilizados (ver item 3.3.3.2) foi observada a presença inicial de biofilme e posterior recrutamento de organismos macro-incrustantes.

No revestimento 1, contendo o produto da 1ª síntese como biocida principal, foi observada a presença de biofilme nas duas primeiras semanas (Figura 75), e de *Obelia dichotoma*, *Bugula neritina e Balanídeos* nas semanas seguintes. A presença de espaço vazio (sem organismos incrustantes) foi observado em todo o processo sucessional, desde a primeira semana, variando de 10-50% de cobertura.

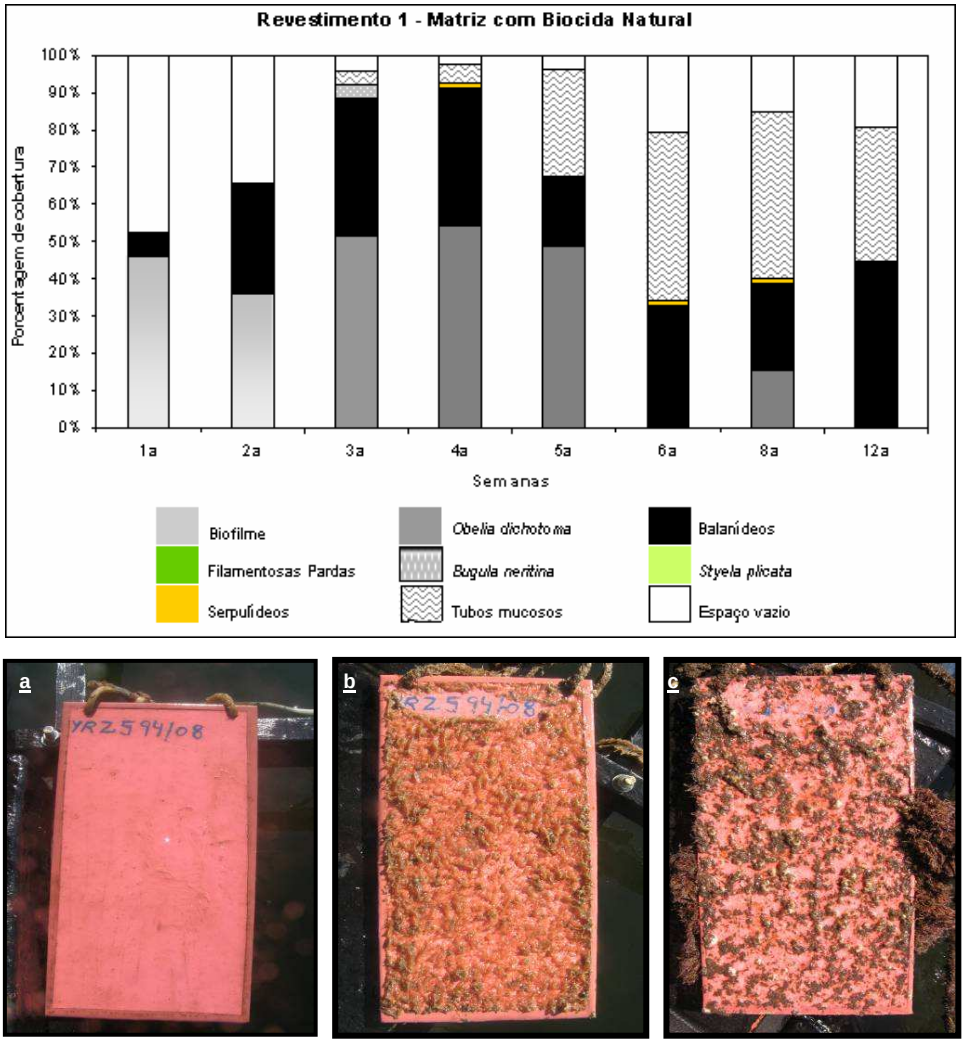


FIGURA 75. Variação do percentual de cobertura dos grupos, espécies incrustantes e espaços vazios. Fotografias mostram o desenvolvimento da comunidade e o aspecto de um dos corpos-de-prova tratado com o Revestimento 1. (a) 1ª semana, (b) 4ª semana e (c) 8ª semana. Não foram constatadas as presenças de Filamentosas pardas e de *Styela plicata*. Fotos realizadas pela Divisão de Biotecnologia Marinha – IEAPM.

No revestimento 2, usando somente a tinta comercial (Figura 76), foi observada a presença de espaço vazio na maior parte do estudo. Contudo, verificou-se a presença de organismos formadores de biofilmes e organismos macro-incrustantes entre a terceira e oitava

semana. Tendo sido constatado somente a presença de biofilme, poucos balanídeos (larvas de cracas) e tubos mucosos.

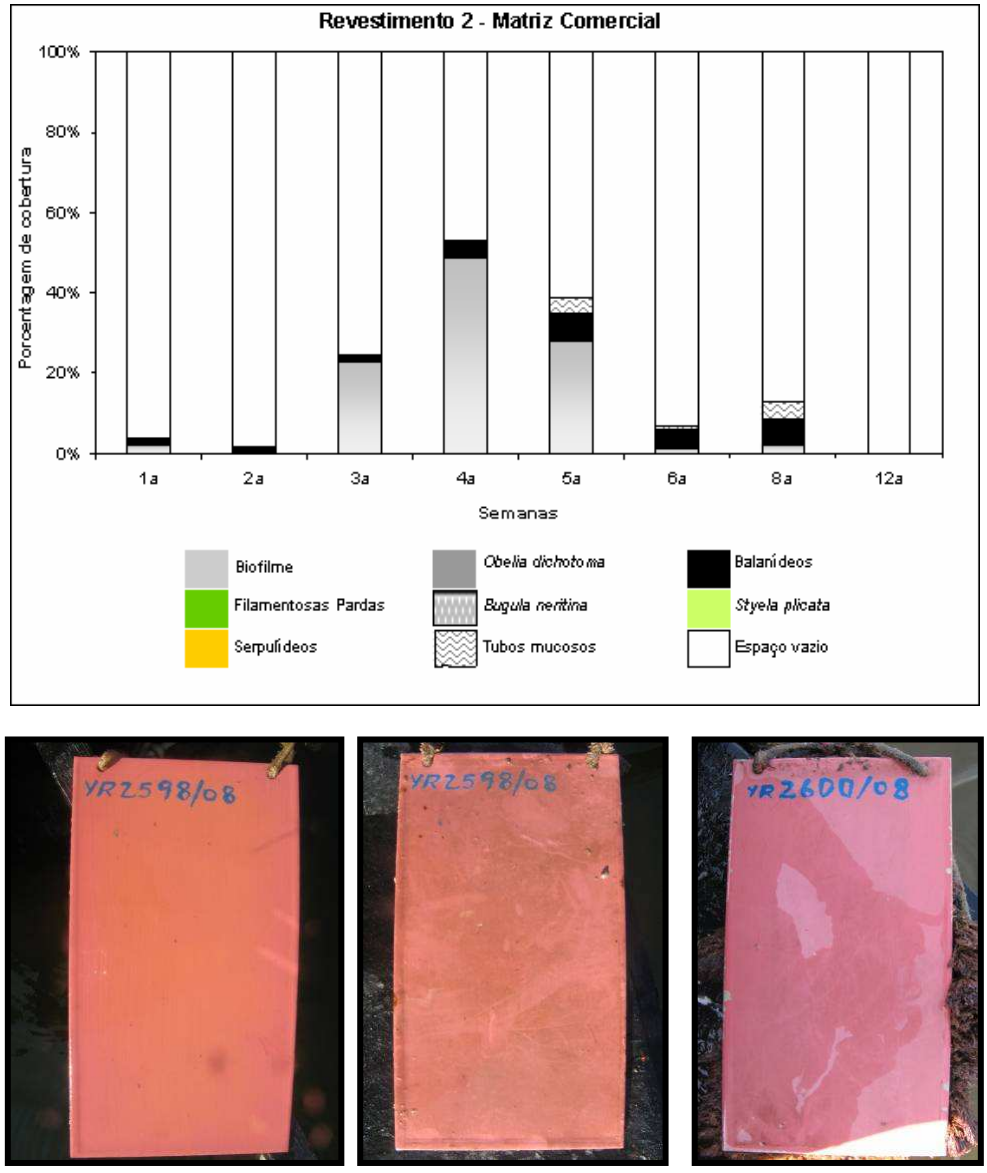


Figura 76. Variação do percentual de cobertura dos grupos, espécies de incrustantes e espaços vazios. Fotografias mostram o desenvolvimento da comunidade e o aspecto de um dos corpos-de-prova tratado com o Revestimento 2. (a) 1ª semana, (b) 4ª semana e (c) 8ª semana. Constatadas somente as presenças de biofilme, balanídeos e tubos mucosos. Fotos realizadas pela Divisão de Biotecnologia Marinha – IEAPM

Os resultados do revestimento 3, tendo cobre como biocida principal e o produto de síntese como biocida aditivo (booster), foram semelhantes aos observados no tratamento 2, só que em maior cobertura (Figura 77).

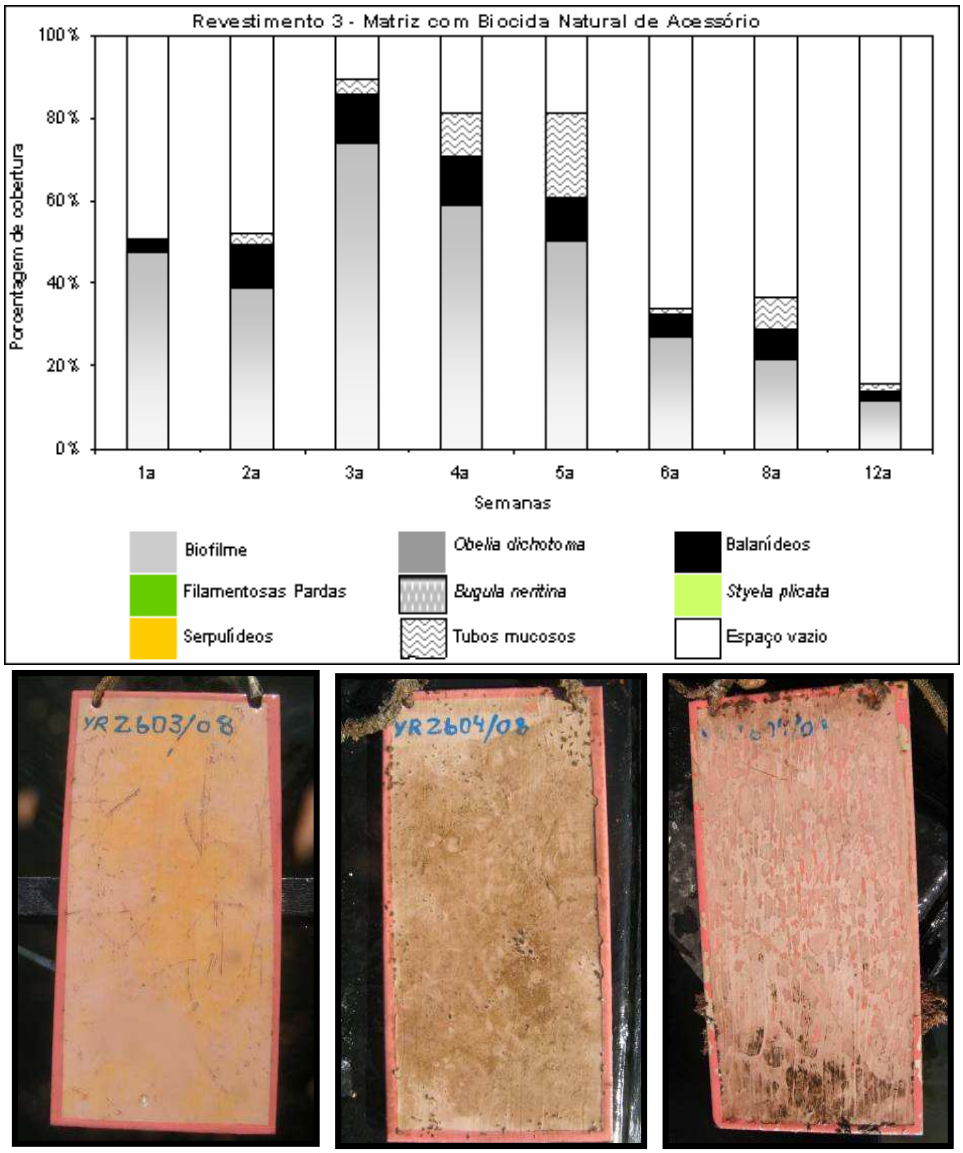


FIGURA 77. Variação do percentual de cobertura dos grupos, espécies de incrustantes e espaços vazios. Fotografias mostram o desenvolvimento da comunidade e o aspecto de um dos corpos-de-prova tratado com o Revestimento 3. (a) 1ª semana, (b) 4ª semana e (c) 8ª semana. Constatadas somente as presenças de biofilme, balanídeos e tubos mucosos. Fotos realizadas pela Divisão de Biotecnologia Marinha – IEAPM

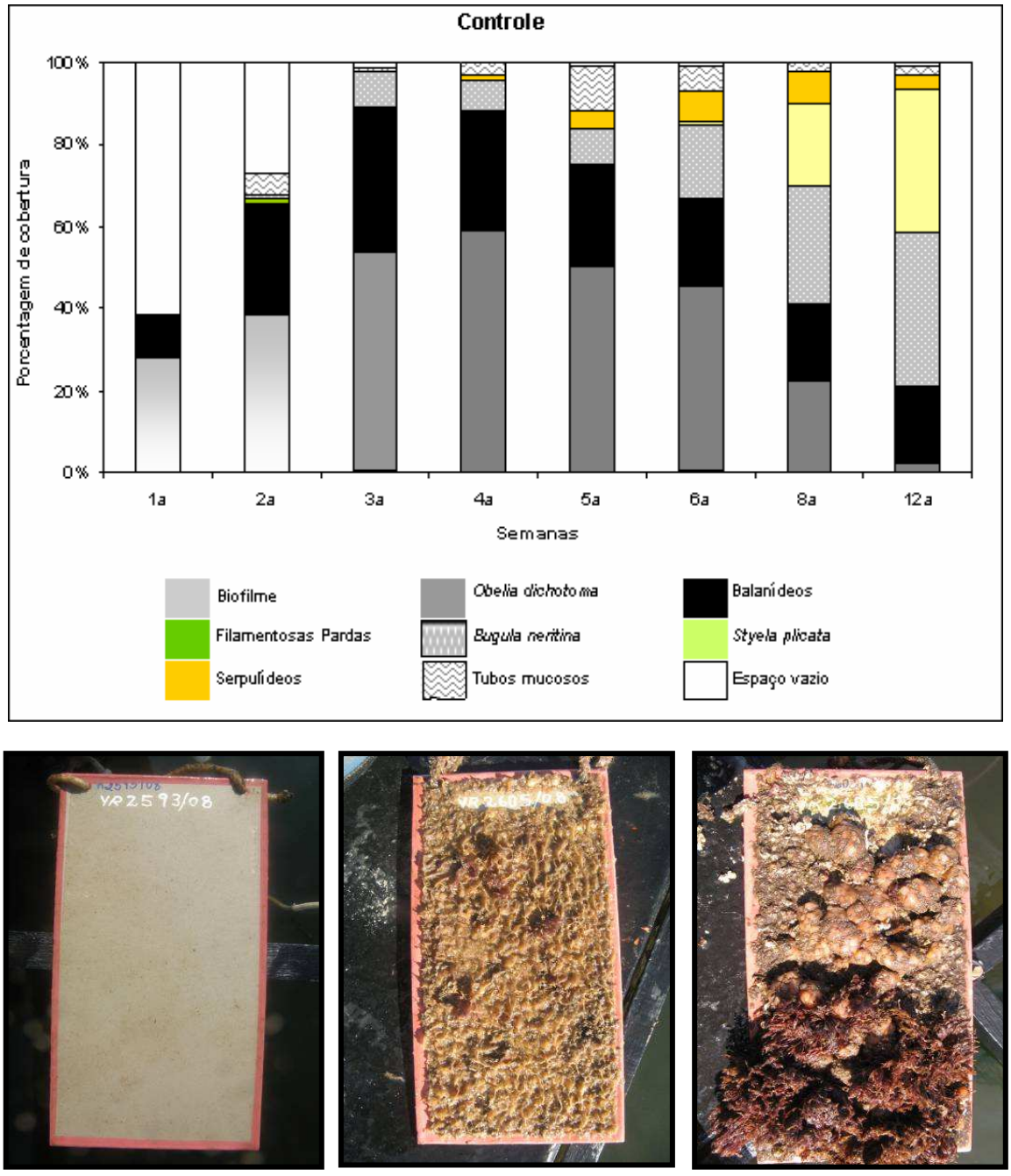


FIGURA 78. Variação do percentual de cobertura dos grupos, espécies de incrustantes e espaços vazios. Fotografias mostram o desenvolvimento da comunidade e o aspecto de um dos corpos-de-prova tratado com Revestimento 4. (a) 1ª semana, (b) 4ª semana e (c) 8ª semana.

No tratamento do revestimento 4, tinta sem biocidas (controle negativo), foi observado uma grande presença de organismos incrustantes quando compara com os outros tratamentos (Figura 78).

A (Figura 79) mostra a sucessão da incrustação no decorrer de um período de 8 meses. Podemos observar que o padrão de cobertura e ocorrência das incrustações entre os revestimentos permaneceu semelhante ao longo do tempo, as diferenças observadas estiveram

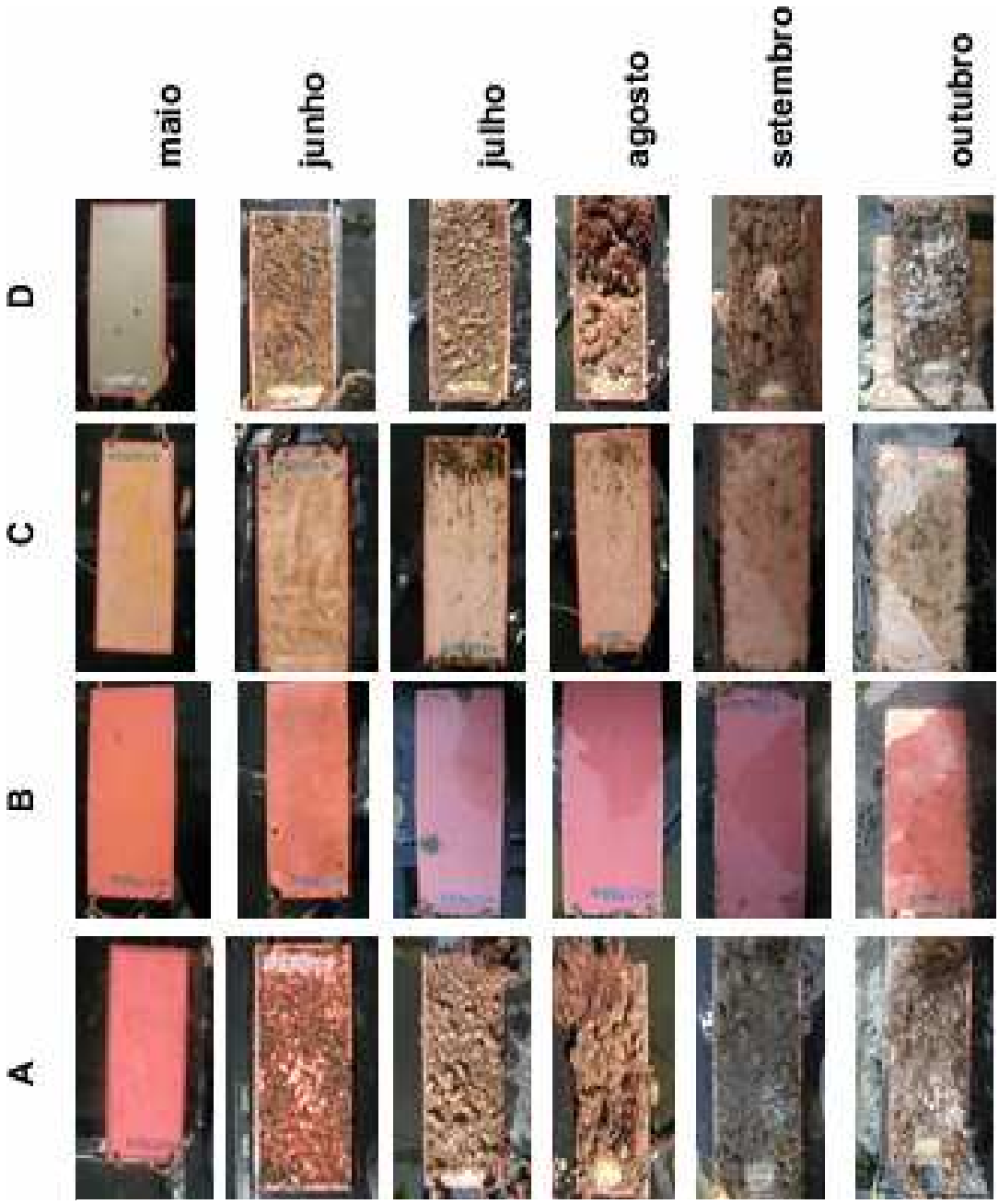


FIGURA 79. Aspecto geral dos corpos-de-prova durante o transcorrer dos ensaios de campo. A – Tinta usando como biocida somente o produto de síntese; B – Tinta comercial sem modificações; C – Tinta comercial usando o produto de síntese em substituição aos biocidas acessórios; D – Controle negativo. Fotos

mais relacionadas com as mudanças na composição das espécies nas placas do que propriamente entre os tratamentos.

Em resumo, observamos que embora o revestimento 1 (substituição do óxido cuproso pelo biocida produto de síntese), não tenha alcançado a mesma eficiência do revestimento 2 (tinta comercial), observamos uma significativa redução da cobertura dos organismos incrustantes quando comparado com o controle (sem biocida). Por outro lado, o revestimento 3 (substituição dos biocidas acessórios com o biocida produto de síntese) apresentou uma eficiência ainda melhor do que o tratamento 1 na redução dos organismos incrustantes.

4.5.2 Produto da 2ª síntese. Utilizando tinta base isenta de cobre

Em todos os tratamentos utilizados (ver item 3.3.3.2), com exceção daquele sem produto biocida (controle), foi observado uma muito boa inibição do desenvolvimento de limo e da fixação de cracas. As figuras 80 a 84 apresentam as condições observadas após uma imersão contínua de 3 semanas no campo de testes da empresa International tintas, localizado na Baía da Guanabara.

Cabe esclarecer aqui, que este segundo teste de campo foi conduzido pela equipe técnica da empresa acima citada, sendo o biocida natural de propriedade do grupo formado pelo LASAPE-UFRJ e pelo IEAPM-MB.

No painel sem biocida (controle negativo), pintado somente com a tinta primer anticorrosiva, foi observado uma massiva presença de limo e de cracas (Figura 80), mostrando a condição extrema do ambiente marinho da baía da Guanabara com relação à incrustação marinha, sendo verificado uma forte adesão dos organismos fixados e constatado a dificuldade da retirada manual.

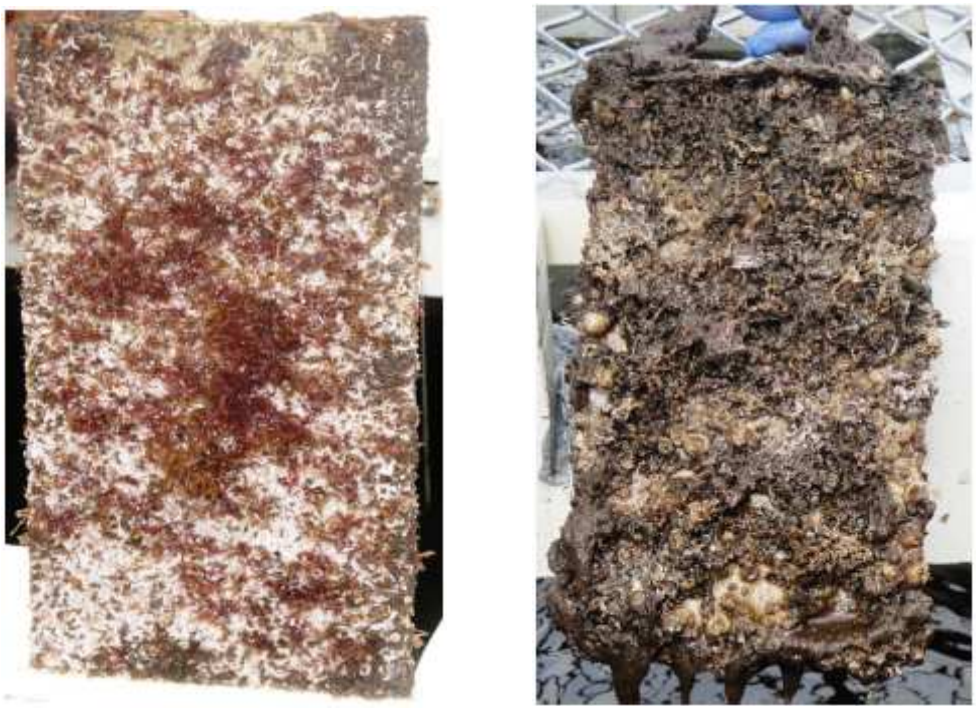


Figura 80. Corpo-de-prova (controle negativo) pintado somente com a tinta anticorrosiva. Inspeção após três semanas de imersão (esquerda) e após oito semanas de imersão (direita). Fotos cedidas pela empresa International Tintas – Akzo Nobel.

Nos painéis pintados com o revestimento A (tinta base *Micron Premium* + 5% biocida 2ª síntese + 2% biocida comercial ECONEA), verificou-se somente uma pequena formação de limo e a total ausência de cracas até a 3ª semana, sendo observado uma intensificação da presença de limo na oitava semana, porém com ainda muito boa ação contra o assentamento de cracas (Figura 81). Cabendo ressaltar a fraca adesão e fácil remoção manual dos organismos fixados.

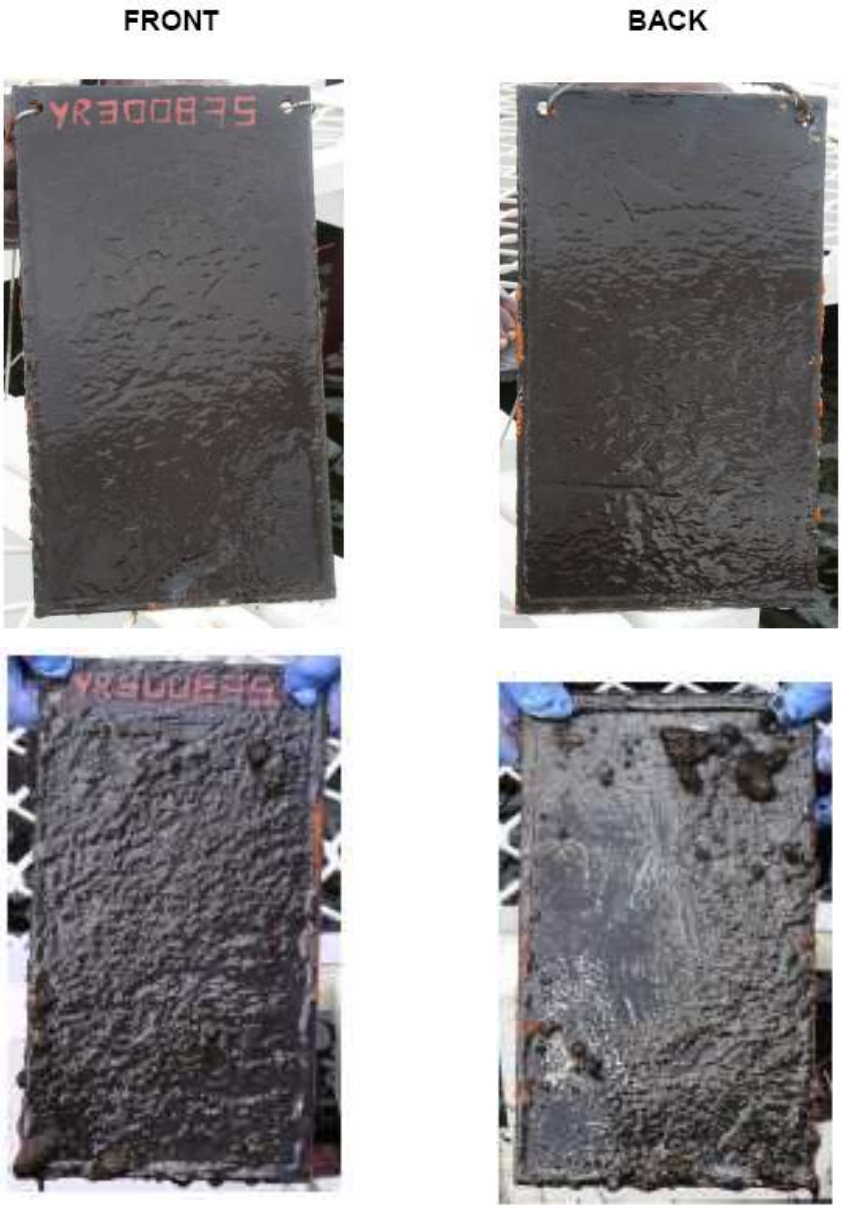


Figura 81. Corpos-de-prova pintados com o revestimento A. Inspeção após três semanas de imersão (superior) e após a oitava semana de imersão (inferior). Fotos cedidas pela empresa International Tintas – Akzo Nobel

Nos painéis pintados com o revestimento B (tinta base *Micron Premium* + 5% biocida 2ª síntese), verificou-se também a total ausência de cracas até a 3ª semana e uma leve presença de cracas na oitava semana (Figura 82). Contudo, ainda foi constatado, em geral, a fraca adesão e fácil remoção manual dos organismos fixados.

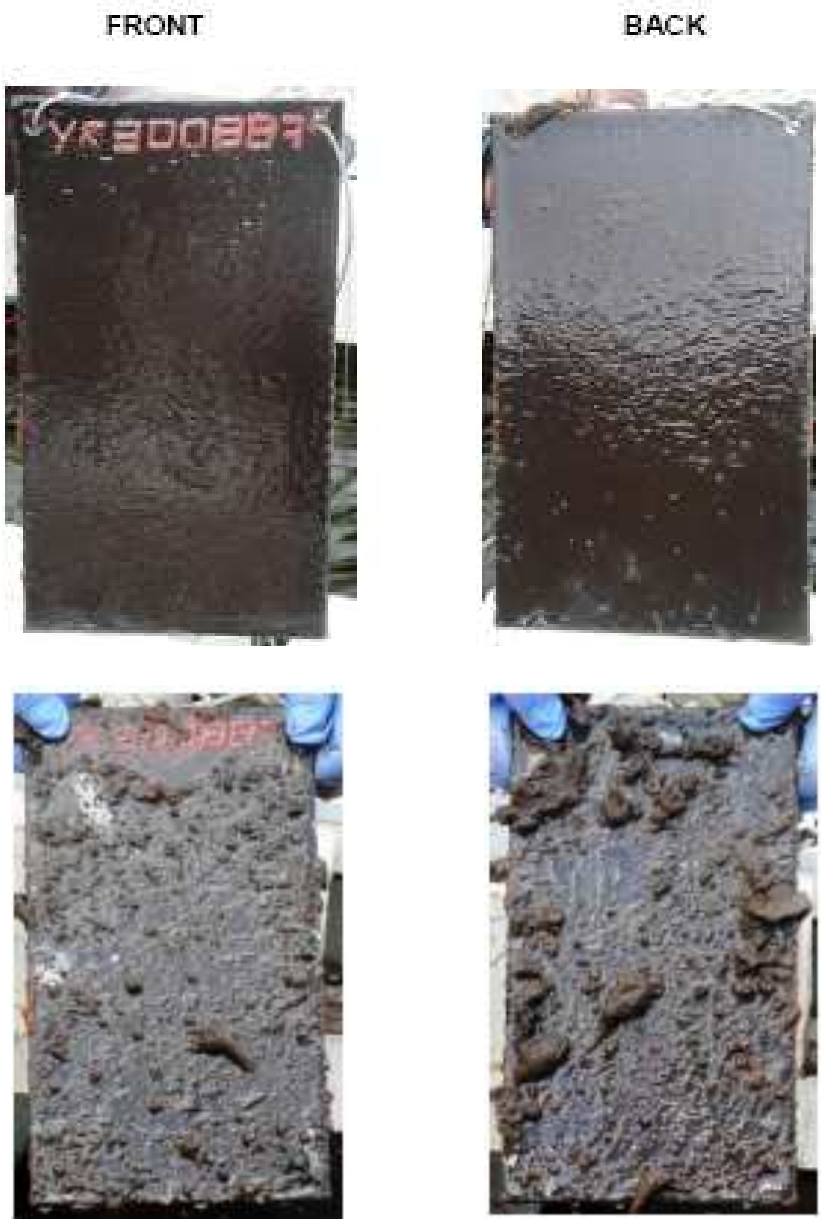


Figura 82. Corpos-de-prova pintados com o revestimento B. Inspeção após três semanas de imersão (superior) e após a oitava semana de imersão (inferior). Fotos cedidas pela empresa International Tintas – Akzo Nobel.

Nos painéis pintados com o revestimento C (tinta base *Micron Premium* + 2% biocida comercial ECONEA), verificou-se também somente uma pequena formação de limo e a ausência de cracas até a terceira semana de imersão, porém, após a oitava semana verificou-se a presença de limo, de muito pouca cracas e de material não consolidado (Figura 83).

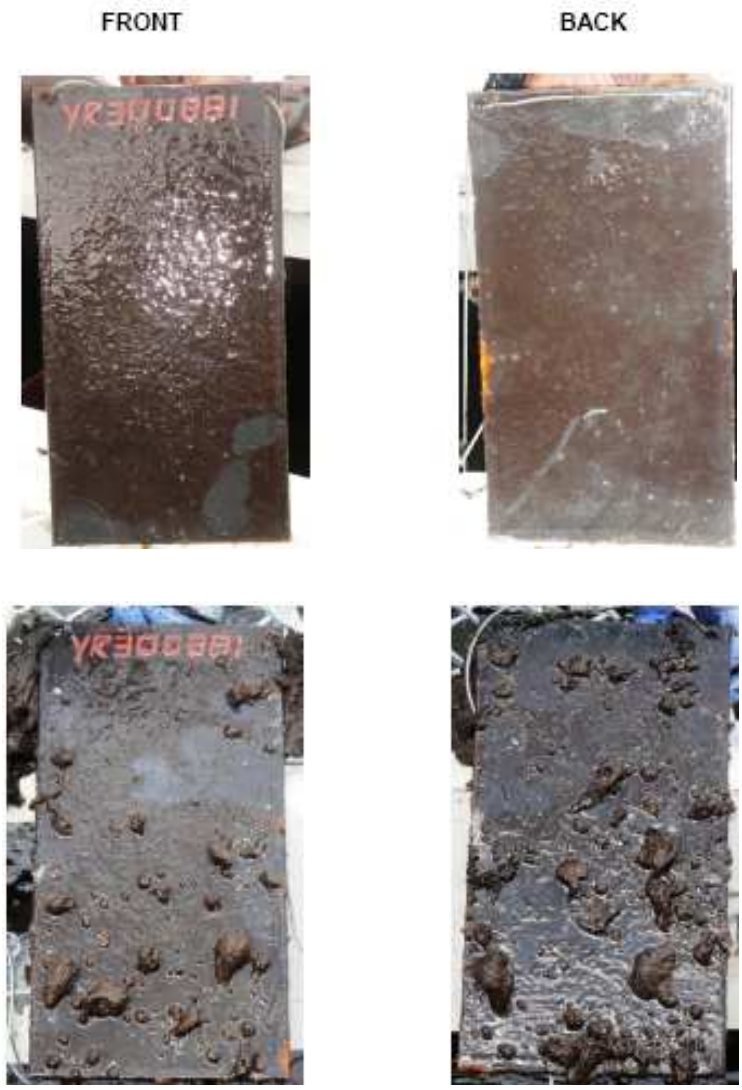


Figura 83. Corpos-de-prova pintados com o revestimento C. Inspeção após três semanas de imersão (superior) e após a oitava semana de imersão (inferior). Fotos cedidas pela empresa International Tintas – Akzo Nobel.

Nos painéis pintados com o revestimento D (tinta base *Micron Premium* + 10% biocida 2ª síntese + 2% biocida comercial ECONEA), verificou-se uma pequena formação de limo e a ausência de cracas até a terceira semana e muito pouca formação de limo e cracas após a oitava semana (Figura 84).

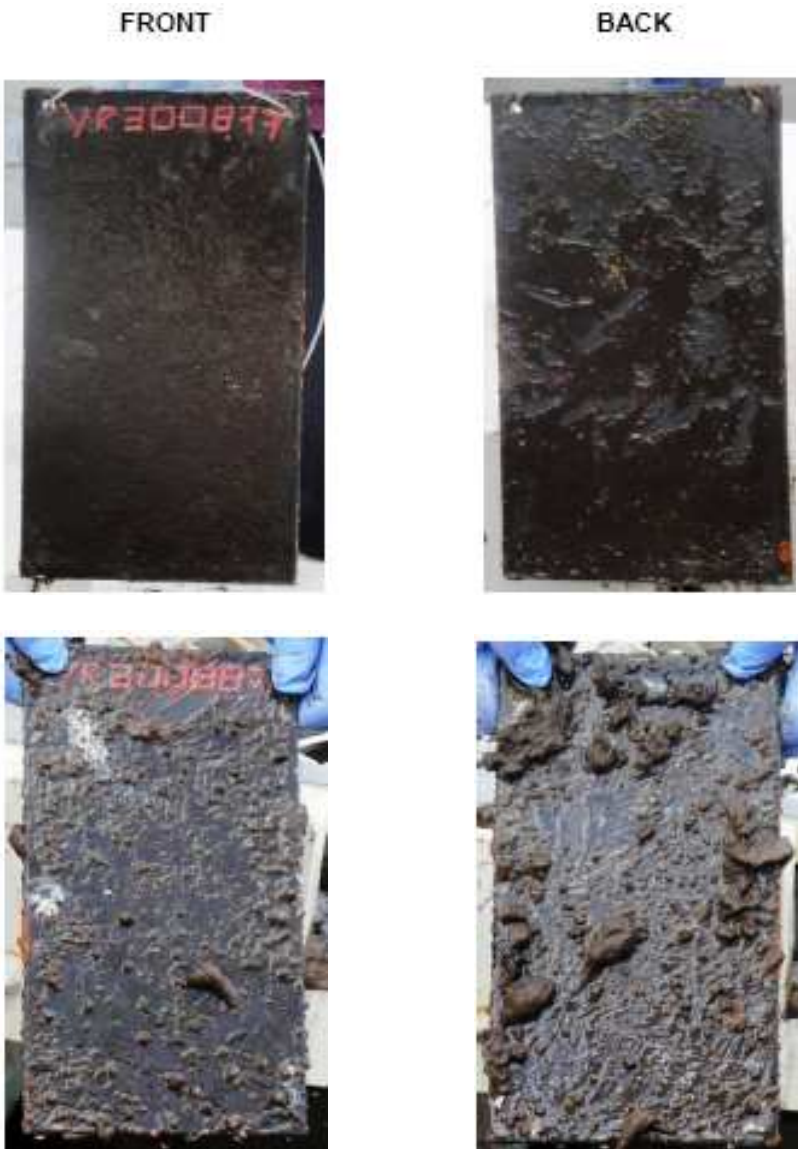


Figura 84. Corpos-de-prova pintados com o revestimento D Inspeção após três semanas de imersão (superior) e após a oitava semana de imersão (inferior). Fotos cedidas pela empresa International Tintas – Akzo Nobel.

Entende-se aqui, que embora o desempenho anti-incrustante do produto da reação de metanólise (1ª síntese) não tenha alcançado aquele do revestimento comercial convencional contendo cobre e aditivos biocidas, foi observada significativa redução do processo sucessional e do crescimento da bioincrustação em relação ao controle, indicando que o seu uso substituindo os aditivos biocidas convencionais das tintas a base de cobre se mostra muito promissor, principalmente pela possibilidade de redução dos custos de fabricação, por ser um composto produzível a partir de matéria-prima pouco onerosa e adicionalmente, pela possibilidade da redução da carga de metais na tinta.

O produto da reação de alquilação (2ª síntese) se mostra muito eficiente como biocida coadjuvante em tintas anti-incrustante isentas de cobre, sendo importante ressaltar a sua atividade anti-incrustante contra o crescimento de espécies de diatomáceas, grupo representativo dos principais micro-organismos formadores do biofilme, os quais não se conseguem conter satisfatoriamente pelo uso dos produtos anti-incrustante comerciais atualmente disponíveis. 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, principalmente nas novas tintas isentas de cobre, pois ele trata-se de um composto biocida isento de metais e com apelo natural, uma vez que estas substâncias são análogas aos compostos naturais do tipo PAF e lyso-PAF.

5 CONCLUSÃO

As presenças de PAF e PAF-análogos em extratos de esponjas marinhas foram confirmadas pela espectrometria de massas. Contudo, não foi julgado possível validar, com a metodologia aqui empregada (aplicação de estresse por inanição), que houve a indução do aumento da produção de PAF ou PAF-análogos nas espécies de esponjas marinhas ensaiadas.

Compostos PAF-análogos podem ser satisfatoriamente sintetizados a partir de lecitinas de soja, sendo este produto de síntese ativo biologicamente e de possível incorporação na produção de tintas marítimas anti-incrustantes.

O produto de síntese exibiu muito boa atividade anti-incrustante contra o crescimento da Diatomácea *Skeletonema costatum* e boa atividade contra o crescimento da outras espécies de microalgas e também contra bactérias marinhas

Os testes de campo demonstraram que os produtos de síntese, em substituição aos biocidas organometálicos acessórios (booster), apresentaram uma melhor eficiência na redução dos organismos incrustantes e apresentaram uma muito boa atividade em ambos os testes de campo com significativa redução da cobertura dos macro-organismos incrustantes quando comparados com os controles negativos (sem biocida).

Com base nos resultados obtidos e no acima exposto, conclui-se que a proposição de uso das substâncias aqui avaliadas como aditivo biocida anti-incrutante parece ser uma alternativa viável para a produção de tintas anti-incrustantes, apresentando-se como uma nova e efetiva perspectiva, considerando a exeqüibilidade operacional da síntese - por utilizar lecitinas de soja, um resíduo da produção de óleo de soja comestível e de biodiesel, como matéria–prima do processo – e seu bom desempenho algicida e bactericida, comparada ao $CuSO_4$ e a outros aditivos biocidas convencionais.

6 RECOMENDAÇÕES

Pode-se observar que as sínteses realizadas para a produção dos compostos do tipo Lyso-GPC e PAF-análogos para uso como biocidas, se mostram possíveis e promissoras para uma produção em larga escala - requerida pelo tipo de indústria envolvida na produção de tintas marítimas - sendo elas de baixa complexidade, julgadas de simples industrialização (aumento de escala) e baixo custo. Propõe-se, deste modo, a realização de um desenvolvimento em escala piloto do processo de síntese realizado neste trabalho, para a obtenção das estruturas químicas análogas do Lyso-PAF, realizando-se concomitantemente os estudos das cinéticas das reações envolvidas e da viabilidade econômica, buscando otimizar as etapas de síntese desenvolvidas no laboratório em reatores industriais.

Apesar do apelo natural dos compostos aqui sintetizados, torna-se também recomendável uma avaliação ecotoxicológica efetiva deste material quando exposto ao meio ambiente aquático, bem como a avaliação de sua meia-vida e de seus possíveis metabolitos, ou seja, sua persistência no ambiente marinho, tarefa que não foi possível realizar neste trabalho.

Também, devido a característica semi-estática dos experimentos desenvolvidos neste trabalho, julga-se necessário a realização de experimentos complementares nos quais devem ser efetuados ensaios dinâmicos considerando o deslocamento da água do mar sobre as placas tratadas ou testes de campo usando-se painéis diretamente pintados no casco de uma embarcação.

REFERÊNCIAS

ABIDI, S.L. e MOUNTS, T.L. High-performance liquid chromatography of phosphatidic acid. **Journal of Chromatography B**, v.671, p. 281-297. 1995.

ABIDI, S.L. Separation procedures for phosphatidylserines. **Journal of Chromatography B**, v.717, p. 279-293. 1998.

AITZETMÜLLER, K. The liquid chromatography of lipids. A critical review. **Journal of Chromatography**, v.113, p. 231-266. 1975.

AKHO, C.C. e MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3th ed. Boca Raton, FL: CRC press. 2008. 930p. ISBN 9781420046632.

ALAN, N. *et al.* Additional bioactive lyso-PAF congeners from the sponge *Spirastrella abata*. **Journal of Natural Products,** v.64, p.533-535. 2001.

ALBERT *et al.*, 2002; **Molecular biology of the cell.** 4ªedição. New York-NY. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054>. Acesso em: Fev.2005.

ALLISON, D.G. Exopolysaccharide production in bacterial biofilms. **Biofilm Journal**, v.3, paper 2. 1998. Disponível em : <http://www.bdt.org.br/bioline/bf>. Acesso em: jan.2009.

ALMGREN, M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1508, p.146-163. 2000.

AMETAJ, B.N. *et al.* Effect of sample preparation, length of time, and sample size on quantification of total lipids from bovine liver. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2105-2110. 2003.

AMSTERDAN, D. **Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media**. In: Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Lorian, V. (Editor). Baltimore-MD: Lippincott Williams & Wilkins. 899p.1996. ISBN 0781749832.

ANTONOPOULOU, S. *et al.* Isolation and structural elucidation of biologically active phospholipids from *Scytonema julianum* (cyanobacteria). **Biochemical Journal**, v.367, p.287-293. 2002.

ARCE, F.T. *et al.* A live bioprobe for studying diatom-surface interactions. **Biophysical Journal**, v.87, p. 4284-4297. 2004.

ATLAS, R.M. **Principles of microbiology.** 2nd ed. Iowa: Wm.C. Brown Publishers.1996. 1298p. ISBN 081510889-3.

BALSINDE, J. Roles of various phospholipases A2 in providing lysophospholipids acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodeling. **Biochemical Journal**, v.364, p.695-702. 2002.

BANERJEE, I; PANGULE, R.C. e KANE, R.S. Antifouling coatings: Recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organism. **Advanced Materials**, v.23, p.690-718. 2011.

BELARBI, E.H. *et al.* Producing drugs from marine sponges. **Biotechnology Advances**, v.21, p.585-598. 2003.

BENFENATTI, E. *et al.* A fast atom bombardment-mass spectrometric method to quantitate lysophosphatidylserine in rat brain. **Journal of Lipid Research**, v. 30, p.1983-1986. 1989.

BERG, J.M.; TYMOCZO, J.L. e STRYER, L. **Biochemistry.** 5ª edição. Cap. 12. Lipids and Cell Membranes. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/BK21154/>. Acesso em: Fev.2010.

BEVERIDGE, T.J. e GRAHAM, L.L. Surface layers of bacteria. **Microbiological Reviews**, v.55, n.4, p.684-705. 1991.

BEVERIDGE, T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.16, p.4725-4733. 1999.

BHADURY, P. e WRIGHT, P.C. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. **Planta**, v.219, p.561-578. 2004.

BHASKAR, P.V. e BHOSLE, N.B. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical process. **Current Science**, v.88, n.1, p.45-53. 2005.

BIEMANN, K. Mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v.32, p.755-780. 1963.

BITTMAN, R. *et al*. Synthesis and biochemical studies of analogs of platelet- activating factor bearing a methyl group at C2 of the glycerol backbone. **Journal of Lipid Research**, v.28, p.733-738. 1987.

BJERVE, K.S.; DAAE, L.N.W. e BREMER, J. The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid-extraction procedures**.** **Analytical Biochemistry**, v.58, p.238-245. 1974.

BLANK, M.L. *et al.* Antihipertensive activity of alkyl ether analog of phosphatidylcholine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.90, p.1194-1200. 1979.

BLOOR, W.R. Biochemistry of the fats. **Chemical Reviews**, v.2, n.2, p.243-300. 1925.

BLUNT, J.W. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v.26, p.170-244. 2009.

BODENNEC, J.; PELLED, D. e FUTERMAN, A.H. Aminopropyl solid phase extraction and 2 D TLC of neutral glycosphingolipids and neutral lysoglycosphingolipids. **Journal of Lipid Research**, v.44, p.218-226. 2003.

BORENSTEIN, S.W. **Microbiologically influenced corrosion handbook.** England: Woodhead publishing Ltd. 1994. 291p. ISBN 1855731274.

BOTITSI, E. *et al.*, Metabolic fate of platelet-activating factor (PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and lyso-PAF (1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine) in FRTL5 cells. **Journal of Lipid Research**, v.39, p.1295-1304. 1998.

BRADSHAW, R.A; DENNIS, E.A. 2003. **Cell signaling: yesterday, today and tomorrow**. In: Handbook of cell signaling Vol. 1. Cap. 1. [USA]: Branshaw R.A. e Dennis E.A. (Editores). Academic press. ISBN: 0-12-124547-0.

BROCK, T. **G Protein-coupled receptors for PGE_2**: many effects from one lipid. Northeastern Association of Forensic Scientists Annual Meeting. Newport, Rhode Island. November 1-5, 2011. Disponível em: <http://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2144>. Acesso em: nov. 2011.

BROUWERS, J.F.H.M., *et al.* Quantitative analysis of phosphatidylcholine molecular species using HPLC and light scattering detection. **Journal of Lipid Research**, v.39, p.344-353. 1998.

BROWN, W.J.; CHAMBERS, K. e DOODY, A. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. **Traffic**, v.4, p.214-221. 2003.

BROWN, D.A. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and rafts targeting signals. **Physiology**, v. 21, p.430-439. 2006.

BURDGE, G.C., *et al.* A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p.781-787. 2000.

BUSSOLINO, F. *et al. Dictyostelium* cells produce platelet-activating factor in response to cAMP. **European Journal of Biochemistry**, v.196, p.609-615.1991.

BUTLER, A.J.; van ALTENA, I.A. e DUNNE, S.J. Antifouling activity of lyso-platelet activating factor extracted from Australian sponge Crella incrustans. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, n.11, p.2041-2061. 1996.

BYRDWELL, W.C. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. **Lipids**, v.36, n.4, p.327-346. 2001.

CALLIGEROU, M. *et al.* Platelet activating factor and lyso-phosphatidylcholines from strawberry. **Phytochemistry**, v.41, n.1, p.89-92. 1996.

CALLOW, M.E. e CALLOW, J.A. Marine biofouling: a sticky problem. **Biologist**, v.49, p.1-5. 2002.

CALLOW, M.E. e CALLOW, J.A. **Biofilms**. In: Progress in Molecular and Subcellular Biology. Subseries: Marine Molecular Biotechnology. p.141-169. Fusetani, N. e Clare, A.S. (Editores): Antifouling Compounds. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 2006.

CAO, S. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. **Chinese Science Bulletin**, v.55, p.1-15. 2010.

CARRASCO-PANCORBO, A.; NAVAS-IGLESIAS, N. e CUADROS-RODRÍGUES, L. From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: modern lipid analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.263-278. 2009.

CASTRO, I.B. ; WESTPHAL, E. e FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração ; novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v.34, n.6, p.1021-1031. 2011.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdoms system of life. **Biological Reviews**, v. 73, p.203-266. 1998.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.271. p.1251-1262. 2004.

CHAMBERLAIN, L.H. Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. **FEBS Letters**, v.559, p.1-5. 2004.

CHAMP, M.A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benfits. **The Science of the Total Environment**, v.258, p.21-71. 2000.

CHEVREUL, M.E. **Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale**. Paris: Chez F.G. Levrault. 1823. 489p. (Disponível para download em: http:// books.google.com).

CHOUDHARY, S. e DANNERT, C.S. Applications of quorum sensing in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1267-1279. 2010.

CHRISTIE, W.W. **Gas chromatography and lipids: a practical guide.** The Oily Press Ltd. (editora). UK. 184p. 1989. (Disponível para download em: http:// lipidlibrary.aocs.org)

CHRISTIE, W.W. **Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids**. In Advances in Lipid Methodology – ONE. P.1-17. UK: The Oily Press Ltd. 1992. (Disponível para download em: http:// lipidlibrary.aocs.org).

CHRISTIE, W.W. **Preparation of lipid extracts from tissues**. In: Advances in Lipid Methodology. Two. p. 195 – 213. Disponível em: <http://www.lipid library.co.uk>. Acesso em: fev.2005.

CHRISTIE, W.W. Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. **Lipids**, v.33, p.343-353. 1998.

CHRISTIE, W.W. Lipidomics – A personal view. **Lipid Technology**, v.21 n.3, p.58-60. 2009.

CIMPAN, G. **Lipophilicity determination of organic substances by reversed-phase thin-layer chromatography**. In: Encyclopedia of Chromatography. Boca Raton-FL: Marcel Dekker, Inc. 2004. 1751p. ISBN 0824741234.

COOPERMAN, B.S. **Allosteric regulation**. In: Encyclopedia of biological chemistry. v.1, p.68-73. Lennarz, W.J. e Lane, M.D. (Editores). Elsevier Inc. ISBN 978012443710-4.

COSKUN, U. e SIMONS, K. Cell membranes: the lipid perspective. **Structure**, v.19, p.1543-1548. 2011.

COSTERTON, J.W., *et al.* Biofilms, the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.8, p.2137-2142. 1994.

CRAWFORD, C.G. e PLATTNER, R.D. Phospholipid molecular species quantitation from mass spectra of underivatized lipids. **Journal of Lipid Research**, v.25, p.518-522. 1984.

CROFT, S.L. e ENGEL, J. Miltefosine – Discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100S, p. S4-S8. 2006.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K. e DUCHÊNE, M. Antiprotozoal activities of phospholipids analogues. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.126, p.165-172. 2003

CUI, Z. e THOMAS, M.J. Phospholipid profiling by tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.2709-2715. 2009.

D'ARRIGO, P. e SERVI, S. Synthesis of lysophospholipids. **Molecules**, v.15, p.1351-1377. 2010.

D'ARRIGO, P., *et al.* A practical selective synthesis of mixed short/long chains glycerophosphocholines. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.147, p.113-118. 2007.

DAFFORN, K.A.; LEWIS, J.A. e JOHNSTON, E.L. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.453-465. 2011.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry.** New Jersey. John Wiley & Sons Inc. 2007. 585p. ISBN 978-0-471-68229-5.

DAVEY, M.E. e O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.847-867. 2000.

DeBEER, D. e KÜHL, M. **Interfacial microbial mats and biofilms.** In: The Benthic Boundary Layer. Cap.15, p.374-394. Boudreau, B.P. e Jorgensen, B.B. (Editores). 2001.

DEBEER, D e STOODLEY, P. **Microbial biofilms**. In: The Prokariotes. A handbook of biology of bacteria, Vol. I: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology. Cap 3.10. 3rd ed. Singapore. Dworkin, M. (editor). Springer Science. 2006. ISBN-10: 0-387-25476-5.

DEKKER, N. Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. **Molecular Microbiology**. v.35, n.4, p.711-717. 2000.

DEMBITSKY, V.M.; REZANKA, T. e SREBNIK, M. Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae class Demospongiae. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.123, p.116-155. 2003.

DEMOPOULOS, C.A.; PINCKARD, R.N. e HANAHAN, D.J. Platelet activating factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.254, n.19, p.9355-9358. 1979.

DENIER, S.P. e MAILLARD, J.Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.92, p. 35S-45S. 2002.

DENIZOT, Y.; DASSA, E.; BENVENISTE, J. e THOMAS, Y. Paf-acether production by Escherichia coli. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.161, n.2, p.939-943. 1989.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A_2. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.18, p.13057-13060. 1994.

DOLE, M.; MACK, L.L. e Hines, R.L. Molecular beams of macroions. **The Journal of Chemical Physics**, v.49, n.5, p.2240-2249. 1968.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Disease**, v.8, n.9, p.881-890. 2002.

DREYFUS, H. *et al*. Successive isolation and separation of major lipid fractions including gangliosides from single biological samples. **Analytical Biochemistry**. v.249, p.67-78. 1997.

DROUILLARD, K.G.; HAGEN, H. e HAFFNER, G.D. Evaluation of chloroform/methanol and dichloromethane/hexane extractable lipids as surrogate measures of sample partition capacity for organochlorines in fish tissues. **Chemosphere**, v.55, p.395-400. 2004.

DUNNE Jr, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.155-166. 2002.

DUNNY, G.M. e LEONARD,B.A.B. Cell-cell communication in gram-positive bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.51, p.527-564. 1997

EGUIA, E. 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, n.2, p.191-202. 2007.

ELLINGSON, J.S. e ZIMMERMAN, R.L. Rapid separation of gram quantities of phospholipids from biological membranes by preparative high performance liquid chromatography. **Journal of Lipid Research**, v.28, p.1016-1018. 1987.

EMRARI, J. **Lipid analysis by HPLC**. In: Encyclopedia of Chromatography. Boca Raton-FL: Marcel Dekker, Inc. 2004. 1751p. ISBN 0824741234.

EPAND, R.M. e EPAND, R.F. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1788, p.289-294. 2009.

EXTON, J.H. **G-protein signaling regulators**. In: Encyclopedia of biological chemistry. v.2, p.147-151. Lennarz, W.J. e Lane, M.D. (Editores). Elsevier Inc. ISBN 978012443710-4.

FAGAN, P.; WIJESUNDERA, C. e WATKINS, P. Determination of mono- and di-acylglycerols in milk lipids. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.251–259. 2004.

FAGER, R.S.; SHAPIRO, S. E LITMAN, B.J. A large-scale purification of phosphatidylethanolamine, lysophosphatidylethanolamine, and phosphatidylcholine by high performance liquid chromatography: a partial resolution of molecular species. **Journal of Lipid Research**, v.18, p.704-709. 1977.

FAHY, E., *et al*. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v.46, p.839-861. 2005.

FAHY, E. *et al.* LIPID MAPS online tools for lipid research. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p.607-612. 2007.

FAHY, E. *et al.*, Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v.50, p.S9-S14. 2009.

FAHY, E. *et al.* Lipid classification, structures and tools. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1811, p.637-647. 2011.

FEDOTENKO, I.A., *et al*. The synthesis of 1,3-diamidophospholipids. **Tetrahedron Letters**, v.51, p.5382-5384. 2010.

FLEMMING, H-C. ; GRIEBE, T, e SHAULE, G. Antifouling strategies in technical systems – a short review. **Water Science and Technology**, v.34, n.5-6, p.517-524. 1996.

FOLCH, J.; *et al.* Preparation of lipide extracts from brain tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v.191, p.833 – 841. 1951.

FOLCH, J.; LEES, M. e STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**. v.226, p.497 – 509. 1957.

FOURCROY, A.F. **Elements d'histoire naturelle et de chimie**. Tome III. 5ª Paris: Chez Cucret. 1786. (Disponível para download em: http:// books.google.com).

FRUHWIRTH, G.O.; LOIDL, A. e HERMETTER, A. Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1772, p.718-736. 2007.

FUSETANI, N. Biofouling and antifouling. **Natural Product Reports**, v.21, p.94-104. 2004.

FUSETANI, N. Antifouling marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 28, p.400-410. 2011

GARAVITO, R.M. e MILLER, S. F. Detergents as tools in membrane biochemistry. **The Journal of Biological Chemistry**, v.31, p.32403-32406. 2001.

GENIM, E.; *et al*. New trends in phospholipids class composition of marine sponges. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.**, v.150, p.427-431. 2008.

GILMAN, A.G. G-proteins: transducers of receptor-generated signals. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.56, p.615-649. 1987.

GIPPERTH, L. The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: direct and indirect effects. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.S86-S95. 2009.

GOREISCH, H.H.; *et al.*, The effect of phosphorylcholine-coated materials on the inflammatory response and fibrous capsule formation: In vitro and in vivo observations. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.68A, p.1–9. 2004.

GRAY, G.M. e YARDLEY, H.J. Lipid compositions of cells isolated from pig, human, and rat epidermis. **Journal of Lipid Research**, v.16, p.434-440. 1975.

GRIFFITHS, W.J. Tandem mass spectrometry in the study of fatty acids, bile acids, and steroids. **Mass Spectrometer Reviews**, v.22, p.81-152. 2003.

GUAM, Z. *et al.*, 2001; Separation and Quantitation of Phospholipids and Their Ether Analogues by high-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.297, p.137–143. 2001.

GUAN, Z. Discovering novel brain lipids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry **Journal of Chromatography B**, v.877, p.2814–2821. 2009.

GURR, M.I.; HARWOOD, J.L. e FRAYN, K.N. **Lipid biochemistry. An Introduction**. 5th ed. Malden-USA. Blackwell Science Ltd. 2002. 320p.

GUSTONE, F.D.; ALANDER, S.Z.; SHAMA, B.K. *et al*. **Nonfood uses of oils and fats.** In: The Lipid Handbook. 3rd ed. Gunstone, F.D.; Harwood, J.L. e Dijkstra, A.J. (Editores). Boca Raton-FL: CRC Press. 791p. ISBN 978-0-8493-9688-5. 2007.

HAIMI, P. *et al.* Software tools for analysis of mass spectrometric lipidome data. **Analytical Chemistry**, v.78, p.8324-8331. 2006.

HALL, L.M. e MURPHY, R.C. Analysis of stable oxidized molecular species of glycerophospholipids following treatment of red blood cell ghosts with t-butylhydroperoxide. **Analytical Biochemistry**, v.258, p.184-194. 1998.

HAMILTON, J.G. e COMAI, K. Separation of neutral lipids and free fatty acids by high-performance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection . **Journal of Lipid Research**, v.25, p.1142-1148. 1984.

HAN, X. e GROSS, R.W. Structural determination of picomole amounts of phospholipids via electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of American Society of Mass Spectrometry**, v.6, p.1202-1210. 1995.

HAN, X. e GROSS, R.W. Structural determination of lysophospholipid regioisomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of American Chemical Society**, v.118, p.451-457. 1996.

HAN, X. e GROSS, R.W. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. **Mass Spectrometry Reviews**, v.24, p.367– 412. 2005.

HANAHAM, DJ. 1986. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. **Annual Review of biochemistry**, v.55, p.483-509.

HAO, C. e MARCH, R.E. A survey of recent research activity in quadrupole ion trap mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.212, p.337-357. 2001.

HAROLDSEN, P.E.; CLAY, K.L. e MURPHY, R.C. Quantitation of lyso-platelet activating factor molecular species from human neutrophils by mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v.28, p.42-49. 1987.

HAUCKE, V. e Di PAOLO, G. Lipids and lipid modifications in the regulation of membrane traffic. **Current Opinion in Cell Biology**, v.19, p.426-435. 2007.

HAUSER, H. Short-chain phospholipids as detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1508, p.164-181. 2000.

HEERKLOTZ, H. Interactions of surfactants with lipid membranes. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v.41, n.3/4, p.205-264. 2008.

HELLIO, C. *et al*. Screening of marine algal extracts for anti-settlement activities against microalgae and macroalgae. **Biofouling**, v.18, n.3, p.205-215. 2002.

HENNEBERRY, A.L.; WRIGHT, M.M. e McMASTER, C.R. The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.3148-3161. 2002.

HERBERT, C.G. e JOHNSTONE, R.A.W. **Mass Spectrometry Basics**. Boca Raton-FL: CRC Press LLC. 2003. 474p. ISBN 0-8493-1354-6

HERINGDORF, D.M.Z. e JAKOBS, K.H. Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1768, p.923-940. 2007.

HO, Y-P. e HUANG, P-C. A novel structural analysis of glycerophosphocholines as TFA/K+ adducts by electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.16, p.1582-1589. 2002.

HO, Y-P.; HUANG, P-C. e DENG, K-H. Metal ion complexes in the structural analysis of phospholipids by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.17, p.114-121. 2003.

HOFFMANN, E. e STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: principles and applications**. 3th ed. England: John Wiley & Sons Ltd. 2007. 489p. ISBN 978-0-470-03310-4.

HOICZYK, E. e HANSEL, A. Cyanobacterial cell walls: news from an unsual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.5, p.1191-1199. 2000.

HOUJOU, T. *et al.* A shotgun tandem mass spectrometric analysis of phospholipids with normal-phase and/or reverse-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.19, p.654-666. 2005.

HOVING, EB. Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids. **Journal of Chromatography B**, v.671, p.341-362. 1995.

HSU, F-F. e 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.

HSU, F-F. e TURK, J. Structural characterization of unsaturated glycerophospholipids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v.19, p.1681–1691. 2008.

HSU, F-F. e TURK, J. Differentiation of 1-o-alk-1-enyl-2-acyl and 1-o-alkyl-2-acyl glycerophospholipids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v.18, p.2065–2073. 2007.

HSU, F-F. e TURK, J. Electrospray ionization/tandem quadrupole mass spectrometric studies on phosphatidylcholines: the fragmentation processes. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v.14, p.352–363. 2003.

HSU, F-F.; BOHRER, A. e TURK, J. Formation of lithiated adducts of glycerophosphocholine lipids facilitates their identification by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v.9, p.516-526. 1998.

HU, C. *et al*., Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.2836–2846. 2009.

HÜBNER, G.; CRONE, C. e LINDNER, B. LipID – a software tool for automated assignment of lipids in mass spectra. **Journal of Mass Spectrometry**, v.44, p.1676-1683. 2008.

ICHIHARA, K. *et al.* 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.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION – IMO. **IMO NEWS**. v.4. p.10. 2008. Disponível em : <http://www.imo.org/MediaCentre/NewsMagazine/Documents/2008/ IMONews No408_web.pdf.> Acesso em: jan.2010.

IUPAC. Nomenclature of lipids. **Journal of Lipid Research**, v.8, p.523-528, 1967;

IUPAC. The nomenclature of lipids (Recommendations 1976). **Journal of Lipid Research**, v.19, p.114-128, 1978.

IVANISEVIC, J. *et al*. Lysophospholipids in the mediterranean sponge oscarella tuberculata: seasonal variability and putative biological role. **Journal of Chemical Ecology**, v.37, p.537-545. 2011.

IVANOVA, P.T. *et al.* Lipids arrays: new tools in the understanding of membrane dynamics and lipid signaling. **Molecular Interventions**, v.5, n.2, p.86-96. 2004.

IVERSON, S. J.; LAND, S. L. e COOPER, M. H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v.36, p.1283-1287. 2001.

IWASAKI, Y e ISHIHARA, K. Phosphorylcholine-containing polymers for biomedical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.381, p.534-546. 2005.

JACKSON, E.M., *et al*. High performance liquid chromatography of platelet-activating factors. **Journal of Lipid Research**, v.25, p.753-757. 1984.

JONES, N.C. e OSBORN, M.J. Interaction of salmonella typhimurium with phospholipid vesicles. Incorporation of exogenous lipids into intact cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.252, n.20, p.7398-7404. 1977,a.

JONES, N.C. e OSBORN, M.J. Translocation of phosphlipid between the outer and inner membranes of salmonella typhimurium. **The Journal of Biological Chemistry**, v.252, n.20, p.7405-7412. 1977,b.

JOSEPH, S.K. e HAJNÓCZKY, G. IP_3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca^{2+} release and beyond. **Apoptosis**, v.12, p.951-968. 2007.

JUNGALWALA, F.B. *et al.* Sensitive analysis of ethanolamine- and serine-containing phosphoglycerides by high-performance liquid chromatography. **Biochemistry Journal**, v.145, p.517-526. 1975.

JUNGALWALA, F.B.; EVANS, J.E. e McCLUER, R.H. High-performance liquid chromatography of phosphatidylcholine and sphingomyelin with detection in the region of 200nm. **Biochemistry Journal**, v.155, p.55-60. 1976.

JUNGALWALA, F.B.; HAUES, L. e McCLUER, R.H. Determination of less than a nanomol of cerebrosides by high performance liquid chromatography with gradient elution analysis. **Journal of Lipid Research**, v.18, p.285-292. 1977.

KAISER, D. **Cell-cell interactions**. In: The Prokariotes. A handbook of biology of bacteria, Vol. I: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology. 3rd ed. 2006.Cap 1.8. Dworkin, M. (Editor). Singapore: Springer Science. ISBN-10: 0-387-25476-5.

KALUZNY, M.A. *et al.* Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. **Journal of Lipid Research**, v.26, p.135-140. 1985.

KERWIN, J.L.; TUININGA, A.R. e ERICSSON, L.H. Identification of molecular species of glycerol phospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v.35, p.1102-1114.1994.

KHALIL, C.N. e LEITE, L.C.F. **Process for producing biodiesel**. US-2005/0011112, USPTO. 20 jan. 2005.

KHALIL, M.B. *et al.* Lipidomic era: acomplishments and challengers. **Mass Spectrometry Reviews**, v.29, p.877-929. 2010.

KHASELEV, N. e MURPHY, R.C. Electrospray ionization mass spectrometry of lysoglycerophosphocholine lipid subclasses. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v.11, p.283–291. 2000.

KIM, H-Y e SALEM Jr, N. Separation of lipid classes by solid phase extraction. **Journal of Lipid Research**, v.31, p.2285-2289. 1990.

KNOTHE, G.; KENAR, J.A. e GUNSTONE, F.D. **Chemical properties**. In: The Lipid Handbook. 3rd ed. Gunstone, F.D.; Harwood, J.L. e Dijkstra, A.J. (Editores). Boca Raton-FL: CRC Press. 2007. 791p. ISBN 978-0-8493-9688-5.

KOEBNIK, R.; LOCHER, K.P. e GELDER, V. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. **Molecular Microbiology**, v.37, p.239-253. 2000.

KOHLER, K.E. e GILL, S.M. Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): a visual basic program for the determination of coral and substrate coverage using random point count methodology. **Computers & Geosciences**, v.32, p.1259-1269. 2006.

KOIZUMI, H et al., The effect of endcap electrode holes on the resonant ejection from an ion trap. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.281, p.108-114. 2009.

KONSTA, L. et al. Revisiting thin-layer chromatography as a lipophilicity determination tool—A comparative study on several techniques with a model solute set. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.53 p.911-918. 2010.

KOSTANTINOUS, I.K. e ALBANIS, T.A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**, v.30, p.235-248. 2004.

KUKSIS, A. **Lipids**. In: Encyclopedia of Analytical Sciences, 2nd ed. Elsevier Ltd. p.63-76. 2005.

KULIKOV, V.I. e MUZYA, G.I. Review: The bioregulatory role of platelet-activating factor in intracellular process and cell-cell interaction. **Biochemistry Moscow**, v. 63, n.1, p.47 – 54. 1998.

LABOWSKY, M.J. et al. **Method and apparatus for the mass spectrometric analysis of solutions**. US-4531056, USPTO. 23 jul. 1985.

LEFKOWITZ, R.J. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.25, n.8, p.413-422. 2004.

LEPAGE, G. e ROY, C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. **Journal of Lipid Research**, v.27, p.114-120. 1986.

LESNEFSKY, E.J. *et al.* Separation and quantitation of phospholipids and lysophospholipids by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.285, p.246-254. 2000.

LIN, J-T. *et al.* Separation of synthetic phosphatidylcholine molecular species by high-performance liquid chromatography on a C column. **Journal of Chromatography A**, v.824, p.169-174. 1998.

LODISH, H. *et al.* **Molecular cell biology**. 6th ed. New York: W.H. Freeman Publisher. 2000. 973p. ISBN. 0716776014.

LOOSDRECHT, M.C.M. *et al.* Influence of interfaces on microbial activity. **Microbiological Reviews**, v.54, n.1, p.75-87. 1990.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de macroalgas marinhas: princípios e aplicações**. Rima editora. 2006. 606 p. ISBN. 8576561131.

MAIRE, M. L.; CHAMPEIL, P. e MOLLER, J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1508, p.86-111. 2000.

MAKIDE, K. et al. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 89, p.135–139. 2009.

MANSFELD, J. 2009; Plant phospholipases A2: perspectives on biotechnological applications. **Biotechnology Letters**, v.31, p.1373-1380.

MARATHE, G.K. *et al.* Lysophosphatidylcholine and lyso-PAF display PAF-like activity derived from contaminating phospholipids. **Journal of Lipid Research**, v.42, p.1430-1437. 2001.

MARCH, R.E. e TODD, J.F.J. **Quadrupole ion trap mass spectrometry.** 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2005. 346p. ISBN 0-471-4888-7.

MARCH, R.E. Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.200, p.285–312. 2000.

MARCH, R.E. Quadrupole ion traps. **Mass Spectrometry Reviews**, v.28, p.961-989. 2009.

MARECHAL, J-P. e HELLIO, C. Challenges for the development of new non-toxic antifouling solutions. **International Journal of Molecular Science**, v.10, p.4623-4637. 2009.

McINTYRE, T.M.; ZIMMERMAN, G.A. e PRESCOTT, S.M. Biologically active oxidized phospholipids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.36, p.25189-25192. 1999.

McMASTER, M.C. **HPLC a practical user's guide**. 2nd ed. [USA]: John Wiley & Sons, Inc. 2007. 238p. ISBN 9780471754015.

MEYER, V. R. 2004. **Practical high-performance liquid chromatography**. 4th ed. John Wiley and Sons. ISBN 0-470-09378-1.

MERRILL Jr, AH. **Sphingolipids**. In: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes 5th ed. Cap. 13. p.363-397. Vance, D.E. and. Vance, J.E (Editores). 2008.

MIKOSHIBA, K. IP_3 receptor/Ca^{2+} channel: from discovery to new signaling concepts. **Journal of Neurochemistry**, v.102, p.1426-1446. 2007.

MILLAR, R.P. e NEWTON,C.L. The year in G protein-coupled receptor research. **Molecular Endocrinology**, v.24, p.261-274. 2010.

MILNE, S. *et al.*, Lipidomics: an analysis of cellular lipids by ESI-MS. **Methods**, v.39, p.92-103. 2006.

MULLER, W.E.G. *et al*. Molecular/chemical ecology in sponges: evidence for an adaptive antibacterial response in *Suberites domuncula*. **Marine Biology**, v.144, p.19-29. 2004.

MURAKAMI, M. Lipid mediators in life science. **Experimental Animals**, v.60, n.1, p.7-20. 2011.

MURPHY, R.C.; FIEDLER, J. e HEVKO, J. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. **Chemical Reviews**, v.101, n.2, p.479-526. 2001.

MUSKETT, R. e ANDERSON, A.C. **Method for production of alkyl esters.** Patent WO 2004/048311. World Intellectual Property Organization. International Bureau. Genebra Suiça. 2004.

MÜTHING, J. e RADLOFF, M. Nanogram detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. **Analytical Biochemistry**, v.257, p.67-70. 1998.

MYHER, J.J. e KUKSIS, A. General strategies in chromatographic analysis of lipids. **Journal of Chromatography B**, v.671, p.3-33.1995.

NAKANISHI, H. *et al.* Analysis of oxidized phosphatidylcholines as markers for oxidative stress, using multiple reaction monitoring with theoretically expanded data sets with reversed-

phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.1366-1374. 2009.

NAKANISHI, H. *et al.* Separation and quantification of sn-1 and sn-2 fatty acid positional isomers in phosphatidylcholine by RPLC-ESIMS/MS. **The Journal of Biochemistry**, v.147, n.2, p.245-256. 2010.

NAVAS-IGLESIAS, N.; CARRASCO-PANCORBO, A. e CUADROS-RODRÍGUEZ, L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, n.4, p.393-403. 2009.

NEVALAINEN, T.J.; QUINN, R.J. e HOOPER, J.N.A. Phospholipase A2 in porifera. **Comparative Biochemistry and Physiology part B**, v.137, p.413-420. 2004.

NIKAIDO, H. e VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiological Reviews**, v.49, n.1, p.1-31. 1985.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.4, p.593-65. 2003.

NIKOH, N. *et al*. An Estimate of Divergence Time of Parazoa and Eumetazoa and That of Cephalochordata and Vertebrata by Aldolase and Triose Phosphate Isomerase Clocks. **Journal o Molecular Evolution**, v.45, p.97-106. 1997.

O'KEEFE, S.F. **Nomenclature and classification of lipids**. In: Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. 3rd ed.. Akoh, C.C. e Min, D.B. (Editores). Boca Raton – FL: CRC Press. 2008. 915p. ISBN. 978-1-4200-4663-2.

OLDHAM, W.M. e HAMM, H.E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. **Nature**, v.9, p.60-71. 2008.

OLSSON, N.U. e SALEM Jr, N. Molecular species analysis of phospholipids. **Journal of Chromatography B**, v.692, p.245-256. 1997.

ONDUKA, T. Toxicity of metal pyrithione photodegradation products to marine organisms with indirect evidence for their presence in seawater. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, n.4, p.991-997. 2010.

OUYANG, Z. *et al*. Rectilinear ion trap: concepts, calculations, and analytical performance of a new mass analyzer. **Analytical Chemistry**, v.76, p.4595-4605. 2004.

OWEN, J.S.; THOMAS, M.J.; WYKLE, R.L. **Platelet Activating Factor**. In Methods in enzymology. v.434. Lipodomics and bioactive lipids: Lipids and cell signaling. Cap.6. San Diego – CA: Elsevier Inc. 2007. ISSN: 0076-6879.

PARIS, C. *et al.* Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.3, p.852-859. 2004.

PARRISH, C.C. *et al.* **Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications**. In: The Handbook of Environmental Chemistry. Vol.5 part D. pp 193 -223. Marine Chemistry. P. Wangersky [Editor]. Berlin: Springer-Verlag 2000.

PARSEK, M.R. e FUQUA, C. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.14, p.4427-4440. 2004.

PATTON, G.M.; FASULO, J.M. e ROBINS, S.J. Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Lipid Research**, v.23, p.190-196. 1982.

PAUL, W. e STEINWEDEL, H. **Apparatus for separating charged particles of different specific charges**. US-2939952, USPTO. 7 jun.1960. (Patente original 1953).

PÉREZ-GILABERT, M.; VELDINK, G.A. e VLIEGENTHART, J.F.G. Oxidation of dilinoleoyl phosphatidylcholine by lipoxygenase 1 from soybeans. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.354, n.1, p.18-23. 1998.

PEREZ-VICTORIA, J.M. *et al.*, Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *leishmania tropica* and chemosensitization by a novel p-glycoprotein-like transporter modulator. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.9, p.2468-2474. 2001.

PETERSON, B.L. e CUMMINGS, B.S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. **Biomedical Chromatography**, v.20, p.227-243. 2006.

PIANOFORTE, K. (2011). **Marine coatings**. Disponível em : <http://www.coatingsworld. com/issues/2011-05/view_features/marine-coatings>. Acessado em: 27nov. 2011.

POLONSKY, J. *et al.* Release of 1-0-alkylglyceryl 3-phosphorylcholine, O-deacetyl platelet-activating factor, from leukocytes: chemical ionization mass spectrometry of phospholipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.77, n.12, p.7019-7023. 1980.

PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN,G.A. e McINTYRE, T.M. Platelet-activating factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.29, p.17381-17384. 1990.

PROPELLER magazine. International Marine Coatings. **Coatings technology: fouling.** n.17. Março 2004. Disponível em:<http://www.international-marine.com>. Acesso em: jan.2005.

PRZETALSKI, S. et al. Influence of amphiphilic compounds on membranes. **Acta Biochimica Polonica**, v.47, n.3, p.627-638. 2000.

PULFER, M. e MURPHY, R.C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. **Mass Spectrometry Reviews**, v.22, p.332-364. 2003.

QUIAN, P-Y.; XU, Y. e FUSETANI, N. Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. **Biofouling**, v.26, n.2, p.223-234. 2010.

RAVEENDRAN, T.V. e MOL, V.P.L. Natural product antifoulants. **Current Science**, v.97, n.4, p.508-520. 2009.

READMAN, J.W. **Development, occurrence and regulation of antifouling paint biocides: historical review and future trends**. In**:** Handbook of Environmental Chemistry, v.5, Water Pollution, part.O, p.1-15.Antifouling Paint Biocides. Konstantinou, I.K. (editor) 2006.

RETRA, K. *et al*. A simple and universal method for the separation and identification of phospholipid molecular species. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.22, p.1853-1862. 2008.

REZANKA, T. e SIGLER, K. Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. **Progress in Lipid Research**, v.48, p.206-238. 2009.

ROBERTS, L.D. *et al*. A matter of fat: an introduction to lipidomic profiling methods. **Journal of Chromatography B**, v.871, p.174-181. 2008.

ROBINS, S.J. e PATTON, G.M. Separation of phospholipid molecular species by high performance liquid chromatography: potentials for use in metabolic studies**. Journal of Lipid Research**, v.27, p.131-139. 1986.

RODBELL, M. Signal transduction: evolution of an idea. Nobel Lecture. **Bioscience Reports**, v.15, n.3, p.117-133. 1994.

RODBELL, M. The complex regulation of receptor-coupled G-proteins. **Advances in Enzyme Regulation**, v.37, p.427-435. 1997.

ROMÃO, W. *et al*. **Composição anti-incrustante, processo para sua preparação, método para prevenir incrustações**. 221009703735. INPI. 30 nov 2010. PI 1004858-8.

_____ **Compostos 1-hidroxi-2-O-acil-sn-glicero-3-fosfocolinas, processo de preparação e composição compreendendo tais compostos**. 221009704294. 30 nov 2011. PI 1004585-6

_____ **1-hidroxy-2-O-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine compounds, preparation process, antifouling composition for its preparation**. EFS ID 11511237. USPTO. 30 nov 2011. (Depósito de Patente).

ROSENTHAL, A.F. e CHODSKY, S.V. New synthetic phosphinate analogues of lecithin. **Journal of Lipid Research**, v.12, p.277-285. 1971.

ROSENTHAL, A.F. New, partially hydrolyzable synthetic analogues of lecithin, phosphatidyl ethanolamine, and phosphatidic acid. **Journal of Lipid Research**, v.7, p.779-785. 1966;

ROSSETO, R.; BIBAK, N. e HAJDU, J. A new approach to phospholipid synthesis using tetrahydropyranyl glycerol: rapid access to phosphatidic acid and phosphatidylcholine, including mixed-chain glycerophospholipid derivatives. **Organic & Biomolecular Chemistry**. 2006.

ROW, K.H. e LEE, J.W. Determination of retention factors of phospholipids in gradient HPLC. **Chromatographia**, v.51, n.1/2, p.61-64. 2000.

RUIZ, J. *et al*. Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. **Analytical Chimica Acta**, v.520, p.201-205. 2004.

RUIZ-GUTIERREZ, V. e PEREZ-CAMINO, M.C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. **Journal of Chromatography A**, v.885, p.321–341. 2000.

RUSSELL, A.D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.750-763. 2003.

SADEK, P.C. **The HPLC solvent guide**. 2nd ed. New York-NY: Wiley-Interscience. 2002. 607 p. ISBN. 0-471-41138-8.

SARIRI, P.R. e TOOSI, A.E.K. Lecithin treatment to prevent protein adsorption onto contact lenses. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v.39, n.4, p.471-474. 2003.

SARKAR, F.H. *et al*. Cellular signaling perturbation by natural products. **Cellular Signalling**, v.21, p.1541-1547. 2009.

SATSANGI, R.K. *et al.* A novel method for the analysis of platelet-activating factor: direct derivatization of glycerophospholipids. **Journal of Lipid Research**, v.30, p.929-937. 1989.

SCHULTZ, S.G. **Membrane transport, general concepts**. In: Encyclopedia of Biological Chemistry. v.2, p.627-630. Lennartz, W.J. e Lane, M.D. (Editores). Elsevier Ltd. 2004. ISBN: 978-0-12-443710-4

SCHULTZ, M.P. *et al*. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. **Biofouling**, v.27, n.1, p.87-98. 2011.

SCRIMGEOUR, C.M. e HARWOOD, J.L. **Fatty acid and lipid structure**. In: The Lipid Handbook. 3rd ed. Gunstone, F.D.; Harwood, J.L. e Dijkstra, A.J. (Editores). Boca Raton-FL: CRC Press. 2007. 791p. ISBN 978-0-8493-9688-5.

SEDDON, A.M.; CURNOW, P. E BOOTH, P.J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1666, p.105-117. 2004.

SEIFERT, K. *et al.* Effects of miltofosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.5, p.1505-1510. 2001.

SHAIKH, N. Assessment of various techniques for the quantitative extraction of lysophospholipids from myocardial tissues. **Analytical Biochemistry**, v.216, p.313-321. 1994.

SHIN, B.A. *et al.* Lyso-PAF analogues and lysophosphatidylcholines from the marine sponge *Spirastrella abata* as inhibitors of cholesterol biosynthesis. **Journal of Natural Products**, v.62, p.1554-1557. 1999.

SHUI, G. *et al*. Sensitive profiling of chemically diverse bioactive lipids. **Journal of Lipid Research**, v.48, p.1976-1984. 2007.

SIESS, W. *et al*. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of Platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.96, p.6931-6936. 1999.

SILHAVY, T.S.; KAHNE, D. E WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.2, p.1-16. 2010.

SIMAS, R.C. *et al*. Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v.135, p.738-744. 2010.

SKOOG, D.A. ; HOLLER, F.J. e NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman. Caracelli, I. *et al*. (tradutores). 2002. 836p.

SNYDER, L.R. HPLC: past, present and future. **Analytical Chemistry**, v.72, n.11, p.412A-420A. 2000.

SOMMER, U. *et al*. LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures. **Journal of Lipid Research**, v.47, p.804-814. 2006.

SONAK, S. *et al*. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.S96–S108. 2009.

SONG, H.; LADENSON, J. e TURK, J. Algorithms for automatic processing of data from mass spectrometric analyses of lipids. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.2847-2854.2009.

SPRANG, S.R. **Structures of heterotrimeric G-protein and their complexes**. In: Handbook of cell signaling, v.1, cap.22. Branshaw R.A. e Dennis E.A. (Editores). USA. Academic press. 2003. ISBN: 0-12-124547-0.

SPRANG, S.R. Cell signaling: binding the receptor at both ends. **Nature**, v.469, p.172-173. 2011.

STAFFORINI, D.M. *et al.* Platelet-activating factor acetylhydrolases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.242, n.29, p.17895-17898. 1997.

STAUNTON, J. e WIESSMAN, K.J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Product Reports**, v.18, p.380-416. 2001.

STOODLEY, L.H.; COSTERTON, J.W. e STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.95-108. 2004.

STOWE, S.D. *et al.* Anti-biofilm compounds derived from marine sponges. Marine Drugs, v. 9, p.2010-2035. 2011.

STREMLER, K.E. *et al.* An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. The **Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.10, p.5331-5334. 1989.

STRYER, L. e BOURNE, H.R. G proteins: a family of signal transducers. **Annual Review of Cell Biology**, v.2, p.391-419. 1986.

SUBBANAGOUNDER, G.; WATSON, A.D. e BERLINER, J.A. Bioactive products of phospholipids oxidation: isolation, identification, measurement and activities. **Free Radical Biology & Medicine**, v.28, n.12, p.1751-1761. 2000.

SUGIURA, T. *et al.* Production of platelet-activating factor in slugs. **Journal of Lipid Research**, v.32, p.1795-1803. 1991.

SUGIURA, T. *et al.* Platelet-activating factor and its structural analogues in the earthworm *Eisenia foetida.* **Biochimica et Biophysica Acta (Lipids and Lipids Metabolism)**, v.1258, p.19-26. 1995.

SUTHERLAND, I.A. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v.147, p.3-9. 2001.

SUZUMURA, M. Phospholipids in marine environments: a review. **Talanta. The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry**, v.66, p.422-434. 2005.

TESTET, E. *et al.* Nonenzymatic synthesis of glycerolipids catalyzed by imidazole. **Journal of Lipid Research**, v.43, p.1150-1154. 2002.

THOMAS, K.V. e BROOKS, S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. **Biofouling**, v.26, n.1, p.73-88. 2010.

THOMAS, M.J. *et al.* Desorption chemical ionization mass spectrometry of 1 -0-al kyl-2-0-acetyl-sn-gl ycero-3-phosphocholines and analogues. **Journal of Lipid Research**, v.27, p.172-176. 1986.

THOMPSON, G.A e HANAHAN, D.J. Identification of a-glyceryl ether phospholipid as major lipid constituents in two species of terrestrial slug. **The Journal of Biological Chemistry**, v.238, n.8, p.2628-2631. 1963.

THOMSON, J.J. Cathode Rays. **Philosophical Magazine and Journal of Science**, v.44, s.5, n.269, p.293-316. 1897. Reprint 2007. Taylor & Francis.

TOKUMURA, A. *et al.* Novel molecular analogues of phosphatidylcholines in a lipid extract from bovine brain: 1-long-chain acyl-2-short-chain acyl-*sn-g*lycero-3-phosphocholines. **Journal of Lipid Research**, v.30, p.219-224. 1989.

TOKUMURA, A. *et al.* Structural identification of phosphatidylcholines having an oxidatively shortened linoleate residue generated through its oxygenation with soybean or rabbit reticulocyte lipoxygenase. **Journal of Lipid Research**, v.41, p.953-962. 2000.

TOKUMURA, A. A family of phospholipids autacoids: occurrence, metabolism and bioactions. **Progress in Lipid Research**, v.34, n.2, p.151-184. 1995.

TSOUKATOU, M. *et al*. Evaluation of the activity of the sponge metabolites avarol and avarone and their synthetic derivatives against fouling micro and macroorganisms. **Molecules**, v.12, p.1022-1034. 2007.

ULLMAN, M.D. e McCLUER, R.H. Quantitative analysis of plasma neutral glycosphingolipids by high performance liquid chromatography of their perbenzoyl derivatives. **Journal of Lipid Research**, v.18, p. 371-378. 1977.

UNDELAND, I. HÄRRÖD, M. LINGNERT, H. Comparison between methods using low-toxicity solvents for extraction of lipids from herring *Clupea harengus*. **Food Chemistry**, v.61, n.3, p.355-365. 1998.

VAN der LUIT, A. *et al.* Alkyl-lysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.42, p.39541-39547. 2002.

VANCE, J.E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. **Journal of Lipid Research**, v.49, p.1377-1387. 2008.

VENABLE, M.E. *et al.*, Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. **Journal of Lipid Research**, v.34, p.691-702. 1993.

VERMA, N.K. e DEY, C.S. Possible mechanism of miltofosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.8, p.3010-3015. 2004.

VICK, B.A. e ZIMMERMAN, D.C. Lipoxygenase, hydroperoxide isomerase, and hydroperoxide cyclase in young cotton seedlings. **Plant Physiology**, v.67, p.92-97. 1981.

VIRTO, C.; SVENSSON, I. e ADLERCREUTZ, P. Enzymatic synthesis of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.651-658. 1999.

WATANABE, J. e ISHIHARA, K. Establishing ultimate biointerfaces covered with phosphorylcholine groups. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v.65. p.155-165. 2008.

WATERS, C.M. e BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.21, p.319-346. 2005

WATSON, A.D. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. **Journal of Lipid Research**, v.47, p.2101-2111. 2006.

WEINSTEIN, R.A. Quorum sensing: bacteria talk sense. **Healthcare Epidemiology**, v.47, p.1070-1076. 2008.

WELCH, E.J. *et al.* Opposing Effects of Platelet-Activating Factor and Lyso-Platelet-Activating Factor on Neutrophil and Platelet Activation. **Molecular Pharmacology**, v.75, p.227-234. 2009.

WELLS, J.A. 2003. **Extracellular and membrane events**. In: Handbook of cell signaling Vol. 1. Branshaw R.A. e Dennis E.A. (Editores). [USA]: Academic press. ISBN: 0-12-124547-0.

WENK, M. R. The emerging field of lipidomics. **Nature Reviews**, v.4, p.594-610. 2005.

WHITEHOUSE, C.M. *et al*. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Analytical Chemistry**, v.57, n.3, p.675-679. 1985.

WISSNER, A. *et al.* Analogues of platelet activating factor (PAF)1. Some modifications of the alkoxy chain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.27, p.1174-1181. 1984.

WISSNER, A. *et al.* Analogues of platelet activating factor 5. multiple oxygen substitution of the alkoxy chain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.29, p.1315-1319. 1986.

WITZKY, N.M. e BITTMAN, R. Synthesis of phosphatidylcholine analogs with an alkyl group at C1 or C3 of the glycerol moiety. **Journal of Lipid Research**, v.26, p.623-628. 1985.

WITZKY, N.M. e BITTMAN, R. Convenient synthesis of racemic mixed-chain ether glycerophosphocholines from fatty alkyl allyl ethers: useful analogs for biophysical studies. **Journal of Lipid Research**, v.27, p.344-351. 1986.

WOODS HOLE OCEANOGRAPHIC INSTITUTE – WHOI. **The history of the prevention of fouling**. In: Marine fouling and its prevention. Menasha-WI: George Banta publishing co. 1952. 388p.

WOJTUSIK, M.J.; BROWN, P.R. e TURCOTTE, J.G. Separation and detection of triacylglycerols by high-performance liquid chromatography. **Chemical Reviews**, v.89, n.2, p.397-406. 1989.

WOLF, C. e QUINN, P.J. Lipidomics: practical aspects and applications. **Progress in Lipid Research**, v.47, p.15-36. 2008.

WRIGHT, T. **Marine coatings market**. 2009. Disponível em: http://www.coatingsworld.com/issues/2009-05/view_features/marine-coatings-market-2009-05-07-09-18-13. Acesso em: 27nov. 2011.

XIA, Y-Q. e JEMAL, M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.23, p.2125-2138. 2009.

XIE, Y. e MEIER, K.E. Lysophospholipase D and its role in LPA production. **Cellular Signaling**, v.16, p.975-981. 2004.

XING, J.; XIE, C. e LOU, H. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.368–378. 2007.

XU, J-P. *et al.* Construction of phospholipid anti-biofouling multilayer on biomedical PET surfaces. **Applied Surface Science**, v.255, p.538-540. 2008.

YAMASHITA, M. e FENN, J.B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **The Journal of Physical Chemistry**, v.88, p.4451-4459. 1984a.

YAMASHITA, M. e FENN, J.B. Negative ion production with the electrospray ion source. **The Journal of Physical Chemistry**, v.88, p.4671-4475. 1984b.

YANG, K. *et al*. Systematic analysis of choline-containing phospholipids using multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p.2924-2936. 2009.

YEBRA, D.M.; KIIL, S. e DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, v.50, p.75-104. 2004.

YEBRA, D.M. *et al.* 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.

YOON, T.H. e KIM, I.H. Phosphatidylcholine isolation from egg yolk phospholipids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.949, p.209–216. 2002.

YOST, C.C.; WEYRICH, A.S. e ZIMMERMAN, G.A. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. **Biochimie**, v.92, p.692-697. 2010.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis.** 3ª edição. New Jersey: Prentice-Hall Inc. 1996. 662p. ISBN 013084542-6.

ZEHETHOFER, N. e PINTO, D.M. Recent developments in tandem mass spectrometry for lipidomic analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.627, p.62-70. 2008.

ERPENBECK, D. e WÖRHEIDE, G. On the molecular phylogeny of sponges (porifera). **Zootaxa**, v.1668, p.107-126. 2007.

ZHANG,W-N. *et al.* Optimization of parameters of high-performance displacement chromatography for separation of soybean phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. **Journal of Chromatography A**, v.1068, p.269-278. 2005.

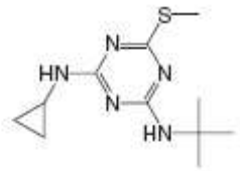
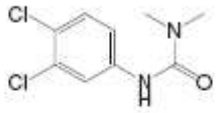
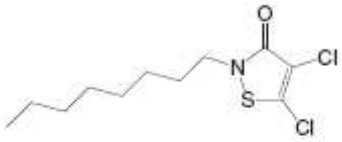
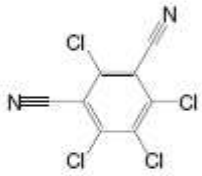
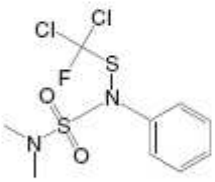
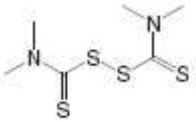
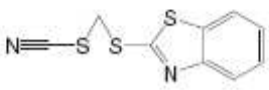
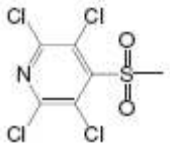
ZHAO, Q. *et al*. New lysophosphatidylcholines and monoglycerides from the marine sponge *Stelletta* sp. **Journal of Natural Products**, v.66, n.5, p.725-728. 2003.

ZHOU, X. *et al.* 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured mcf-7 cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.98, n.4, p.937-944. 1996.

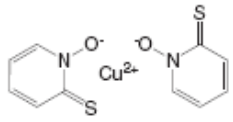
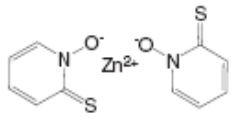
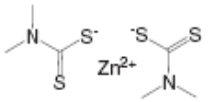
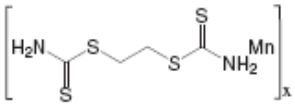
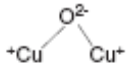
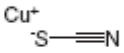
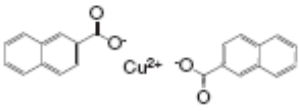
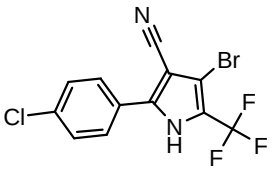
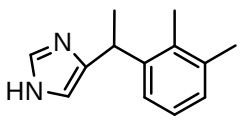
Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance.

APÊNDICE A

Principais aditivos biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes

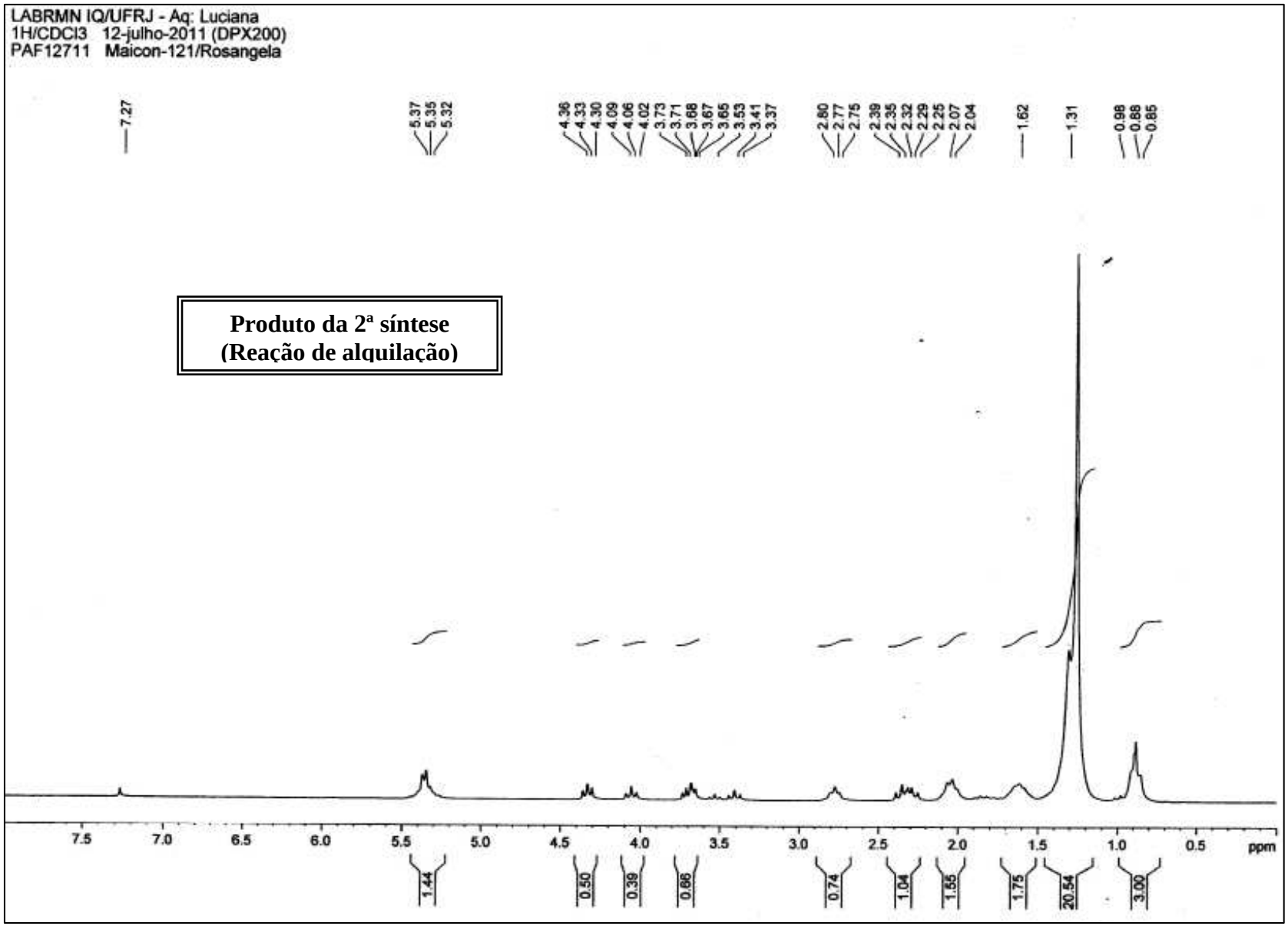
Estrutura	Dados	Funcionalidade
	IRGAROL 1051 / Cybrutyne N'-terc-butil-N-ciclopropil-6-(metil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) CAS 28159-98-0	Algicida Herbicida
	DIURON 3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea CAS 330-54-1	Herbicida
	DCOIT / SEANINE 4,5-Dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona CAS 64359-81-5	Microbiocida
	CLOROTALONIL 2,4,5,6 Tetracloroisoftalonitrila CAS 1897-45-6	Fungicida
	DICLOFLUANIDA N,N-Dimetil-N-fenil-N-(diclorofluorometiltio)-sulfamida CAS 1085-98-9	Fungicida Inseticida
	THIRAM Tetrametil-thiuram-dissulfida CAS 137-26-8	Fungicida
	TCMTB / BUSAN 2-(tiocianometiltio)-benzotiazol CAS 21564-17-0	Microbiocida Fungicida
	DOWICIL S-13 2,3,5,6-tetracloro-4-(metilsulfonil) piridina CAS 13108-52-6	Microbiocida
	TPBP/ BOROCIDE Trifenilborano Piridina CAS 971-66-4	Microbiocida Fungicida

Continuação, Apêndice A.

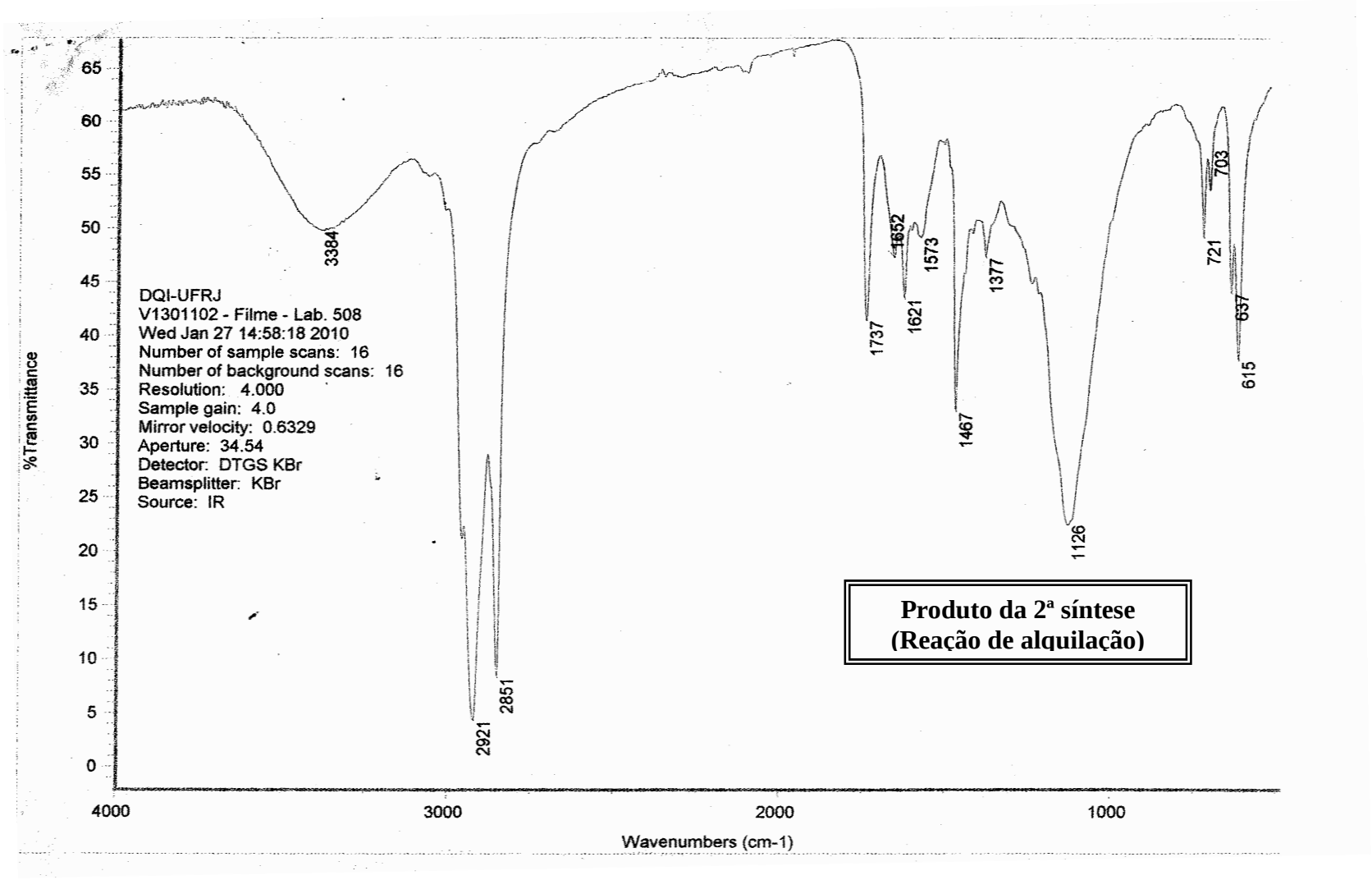
	Cobre Piritiona / CP/ OMADINE Cobre,bis(1,hidroxi-2(1H)-piridinationato (O,S) CAS 14915-37-8	Microbiocida
	Zinco Piritiona / ZP/ Zinc OMADINE (Zinco, bis-(hidroxi-2(1H)-piridinationato-O,S) CAS 13463-41-7	Microbiocida
	ZIRAM / ZIRAME / VANCIDE (Zinco dimetilditiocarbamato) CAS 137-30-4	Fungicida Microbiocida
	MANEBE / MANEX// MANZIN Manganês-etileno-bis (ditiocarbamato) polimérico CAS 12427-38-2	Fungicida
	Óxido cuproso CAS 1317-39-1	Fungicida Inseticida
	Tiocianato de cobre CAS 1111-67-7	Microbiocida
	Naftenato de cobre CAS 1338-02-9	Fungicida Inseticida
	ECONEA™ 2-(p-chlorophenyl)-3-cyano-4-bromo-5-trifluoro-methyl-pyrrole). CAS 122454-29-9	Não especificado! Contudo, conforme informado pelo fabricante, não apresenta propriedade algicida.
	CAPSAICIN RED/ CAPSYN 8-metil-n-vanilil-6-nonamida CAS 404-86-4	Inseticida
	MEDETOMIDINE 4 -[1-(2,3-dimetilfenil)etil]-3-H-imidazole CAS 86347-14-0	Anestésico e analgésico

Fontes: (YEBRA, 2004; READMAN, 2006; THOMAS e BROOKS, 2009; CASTRO, 2011) www.pesticideinfo.org e www.chemnet.com .

APÊNDICE B - Produto da 2ª síntese. Análise espectroscópica por ressonância de hidrogênio RMN-H



APÊNDICE C - Produto da 2ª síntese. Análise espectrofotométrica por infravermelho IV



Batista, W.R. (2012). Utilização de glicerofosfolipídios sintéticos análogos do PAF como agentes anti-incrustantes na composição de tintas marítimas: proposta, síntese, caracterização química e avaliação de performance

APÊNDICE D -Análise estatística dos dados

D.1 Bactérias marinhas

Como avaliação estatística, para verificação das diferenças entre os tratamentos realizados, foi efetuada uma análise da variância (QUADRO 8) dos dados obtidos do teste laboratorial com bactérias (TABELA 2). Firmou-se por hipótese nula o questionamento se os efeitos de inibição dos tratamentos podem ser considerados iguais a um nível de significância de 5%, tendo como fatores testados, os tipos de extratos ou produtos (Fator A) e as diferentes concentrações utilizadas (Fator B); e por variável sob consideração, a inibição do crescimento bacteriano, sendo avaliada a inibição sob as cinco diferentes espécies de bactérias, tratando-as isoladamente e também as assumindo como um conjunto (Bloco somatório dos poços inibidos) (ZAR, 1996. p.252).

QUADRO 8. ANOVA (Two-factor).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Quadrado Médio (MS)
Total	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} X_{ij}^{2}$ - C	ab – 1	
Fator A	$\frac{\sum_{i=1}^{a}\left(\sum_{j=1}^{b} X_{ij}\right)^{2}}{b}$ - C	a - 1	$\frac{SS}{DF}$
Fator B	$\frac{\sum_{i=1}^{a}\left(\sum_{j=1}^{b} X_{ij}\right)^{2}}{a}$ - C	b – 1	$\frac{SS}{DF}$
Resíduo	SS Total – SS fator A – SS fator B	(a-1) (b-1)	$\frac{SS}{DF}$

, onde C = $\frac{\left(\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} X_{ij}\right)^{2}}{ab}$. (Fonte: ZAR, 1996)

TABELA 2. Quantificação do número de poços inibidos durante crescimento bacteriano.

Bactérias*	*Geodia c.* referência	*Geodia c.* estressada	*Arenosclera b.* referência	*Arenosclera b.* estressada	1a Síntese	2a Síntese	Controle
Concentração de 0,05 (µg/ml)							
S.p.	33	36	34	36	34	36	36
V.e.	36	36	36	36	35	36	36
P.e	21	29	31	27	36	31	36
P.i.	36	30	36	36	28	36	36
P.f.	36	36	33	36	34	36	36
Bloco 1	162	167	170	171	167	175	180
0,5(µg/ml)							
S.p.	33	33	36	36	35	36	36
V.e.	36	36	36	36	34	36	36
P.e	28	27	24	30	36	31	36
P.i.	36	25	36	36	29	36	36
P.f.	36	36	36	36	34	36	36
Bloco 2	169	157	168	174	168	175	180
5,0(µg/ml)							
S.p.	32	36	36	36	35	36	36
V.e.	36	36	36	36	33	36	36
P.e	22	22	27	27	36	32	36
P.i.	36	24	36	36	29	36	36
P.f.	36	36	36	36	34	36	36
Bloco 3	162	154	171	171	167	176	180
10(µg/ml)							
S.p.	34	34	36	34	35	36	36
V.e.	36	36	36	36	34	36	36
P.e	21	16	22	25	34	31	36
P.i.	36	23	36	36	27	36	36
P.f.	35	36	36	36	34	35	36
Bloco 4	162	145	166	167	164	174	180
50(µg/ml)							
S.p.	32	36	36	36	32	36	36
V.e.	36	36	35	36	34	35	36
P.e	30	20	28	22	33	33	36
P.i.	36	28	36	36	36	36	36
P.f.	30	36	31	28	33	35	36
Bloco 5	164	156	166	158	168	175	180
100(µg/ml)							
S.p.	28	36	36	36	33	35	36
V.e.	36	36	36	36	30	34	36
P.e	31	36	36	36	31	36	36
P.i.	36	36	36	36	22	36	36
P.f.	26	36	34	24	35	33	36
Bloco 6	157	180	178	168	151	174	180

** Shewanella putrefaciens (S.p.); vibrio estuarians (V.e.); Pseudoalteromonas elyakovii (P.e.); Polibacter irgensi (P.i.), e Pseudomonas fluorescens (P.f.).*

D.1.a Avaliação do efeito de inibição por bloco

A hipótese nula $(Ho)_b$ vinculada a ANOVA (two-factor) (TABELA 3), considerando o efeito inibidor sob o conjunto de todas as bactérias (bloco), após a comparação do fator calculado de (**f**) ao valor crítico unilateral da Distribuição (**F**) (Anexo C), produziu um resultado negativo, ou seja, os efeitos de inibição ao crescimento bacteriano, produzidos pelos tratamentos ensaiados, não podem ser considerados iguais, tendo em vista que aquela hipótese só poderia ser aceita se o valor calculado (**f**) fosse menor que o valor crítico tabelado (**F**).

TABELA 3. ANOVA (two-factor) do efeito inibidor em bloco

$(Ho)_b$: o efeito de inibição do crescimento bacteriano é o mesmo para todos os extratos?

Grupo	7	*G.c.* referencia	*G.c.* estressada	*A.b.* referencia	*A.b.* estressada	1ª Síntese.	2ª Síntese	Controle		
Bloco	6								ΣB_j	
0,05		162	167	170	171	167	175	180	1192	
0,5		169	157	168	174	168	175	180	1191	
5		162	154	171	171	167	176	180	1181	
10		162	145	166	167	164	174	180	1158	
50		164	156	166	158	168	175	180	1167	
100		157	180	178	168	151	174	180	1188	
	ΣG_i	976	959	1019	1009	985	1049	1080	$\Sigma\Sigma X_{ij}$	7077
	Ranking	6º	7º	3º	4º	5º	2º	1º	ΣG^2_i	7165725
									$\Sigma\Sigma X^2_{ij}$	1195575
									ΣB^2_j	8348303
									C	1192475

Analise da Variância

	SS	DF	MS	f	$F_{(0,05;6;30)}$	
total	3100,50	41				
G_i	1813,00	6	302,16	**7,90**	**2,42**	$(Ho)_b$ **rejeitado**
B_j	140,21	5	28,04			
resíduo	1147,28	30	38,24			

Uma avaliação pos-hoc, usando o Teste de Dunnet, questionando se os valores de inibição dos extratos e produtos de síntese são iguais aquele obtido pelo tratamento usando o

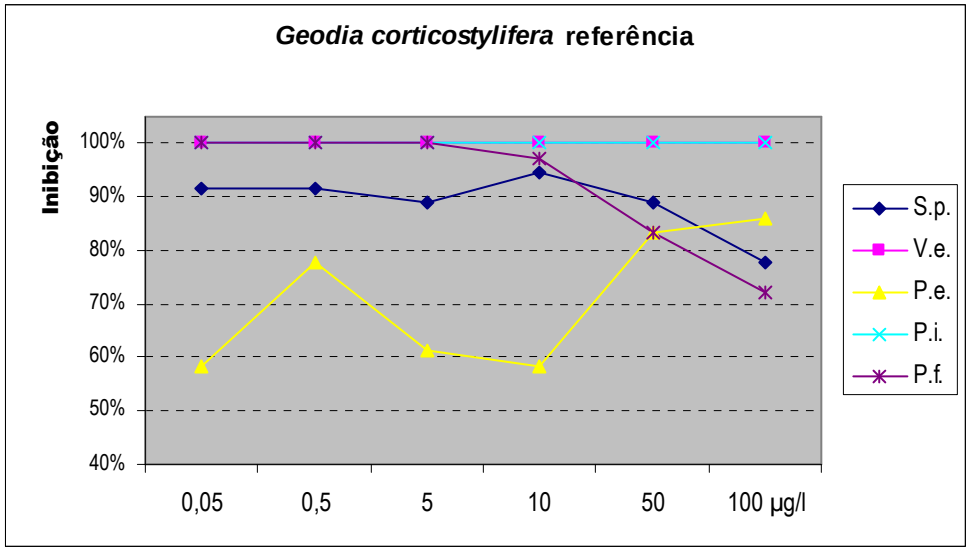
controle (sulfato de cobre), deu resultados negativos para todos os tratamentos (TABELA 4). Nesta avaliação, a hipótese nula $(h_0)_b$ questiona se os valores de inibição de cada item ensaiado é igual àquele obtido para o controle (nível de significância de 5%), sendo o fator calculado de (**q**) comparado ao valor do (**q'**) crítico unilateral de Dunnett com grau de liberdade dos resíduos igual a infinito (Anexo D), onde: **q** = $\frac{\sum \text{Gi}_{\text{controle}} - \sum \text{Gi}_{\text{tratamento}}}{\text{SE}}$; **Gi** = ranking dentro do grupo (i-ésimo), e erro padrão, **SE** = $\sqrt{\frac{ba(a+1)}{6}}$, sendo (**a**) o nº de grupos e (**b**) o nº de blocos (ZAR, 1996. p.271).

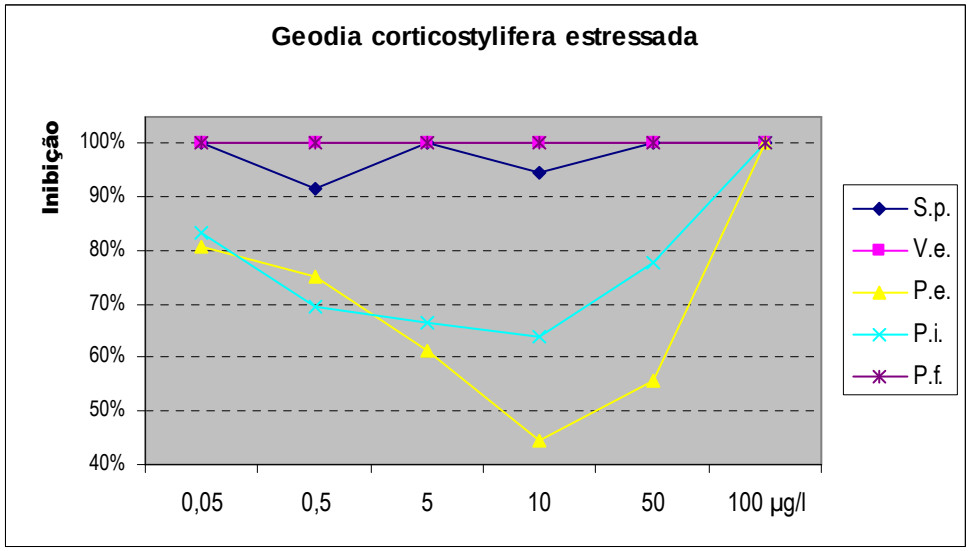
TABELA 4. Comparações dos tratamentos com o Controle.

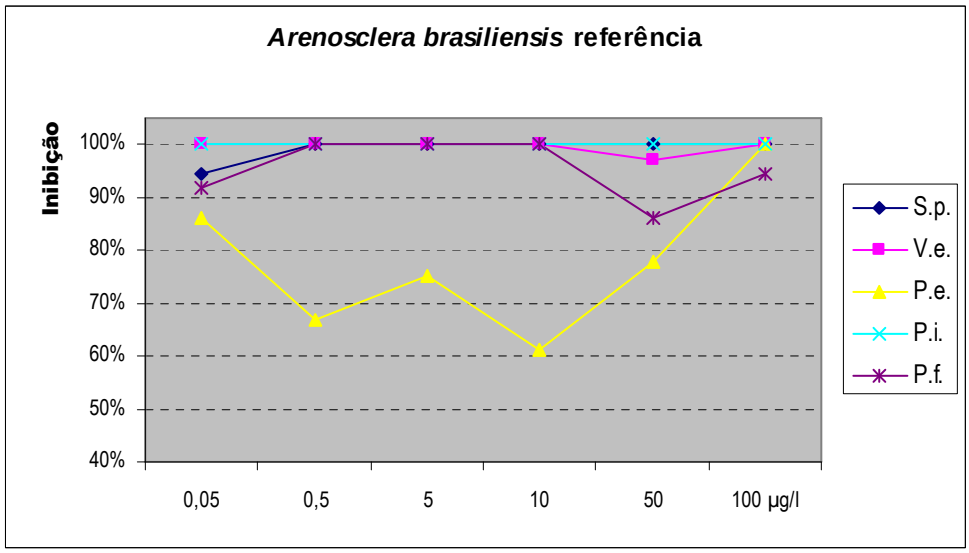
Ranking	ΣGi - ΣGi'	SE	q	q'(0,05;∞;7)	$(h_0)_b$
1º vs 2º	31	7,48	4,142549	2,29	rejeitado
1º vs 3º	61	7,48	8,151468	2,29	rejeitado
1º vs 4º	71	7,48	9,487774	2,29	rejeitado
1º vs 5º	95	7,48	12,69491	2,29	rejeitado
1º vs 6º	101	7,48	13,49669	2,29	rejeitado
1º vs 7º	121	7,48	16,16931	2,29	rejeitado

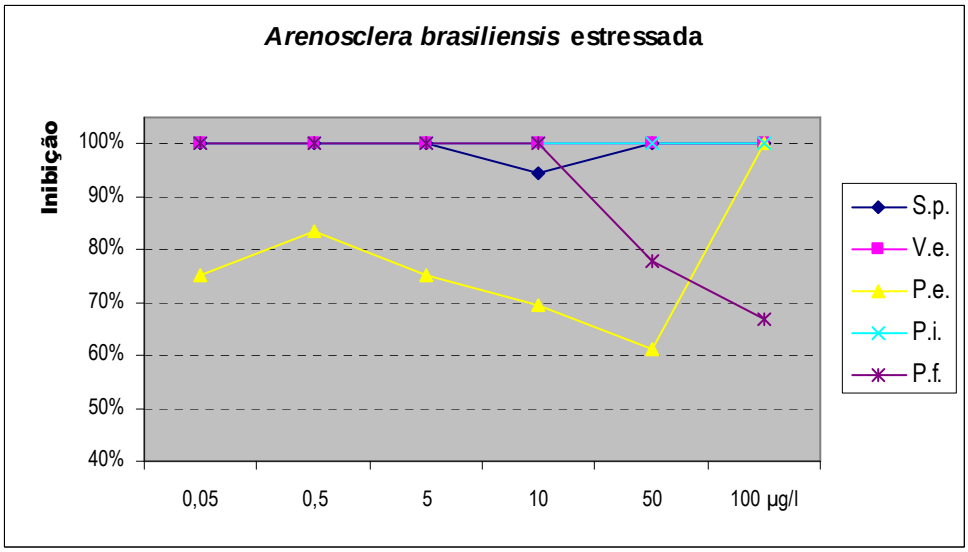
D.1.b Avaliação do efeito de inibição individual

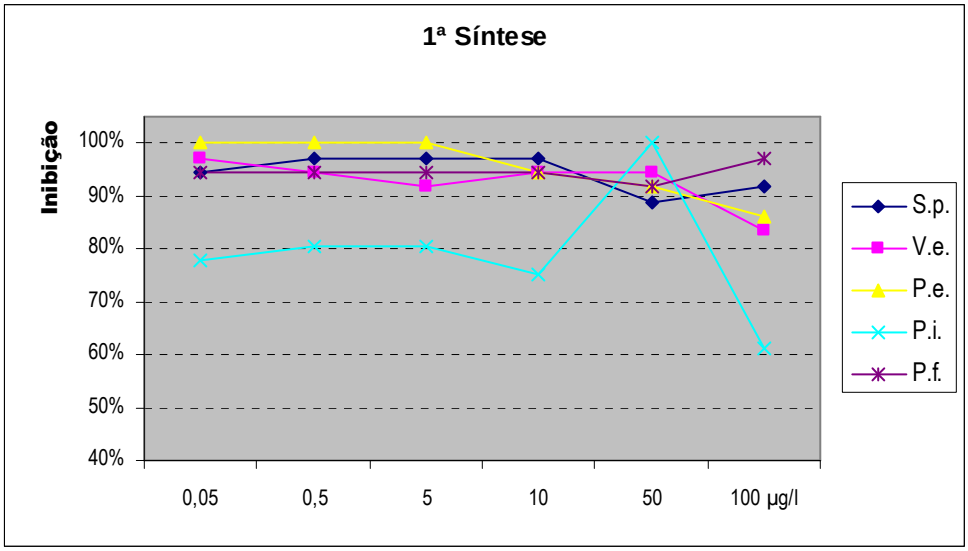
Objetivando uma melhor visualização dos efeitos de inibição inferidos por cada tratamento a cada espécie de bactéria, admitiu-se como percentual máximo de efeito inibidor (100%) aquele causado pelo tratamento controle (sulfato de cobre). A partir desta assunção, para cada tratamento, os totais de poços inibidos, por espécie de bactéria, foram transformados em percentagem de inibição e tratados sistematicamente, resultando nos gráficos mostrados abaixo:

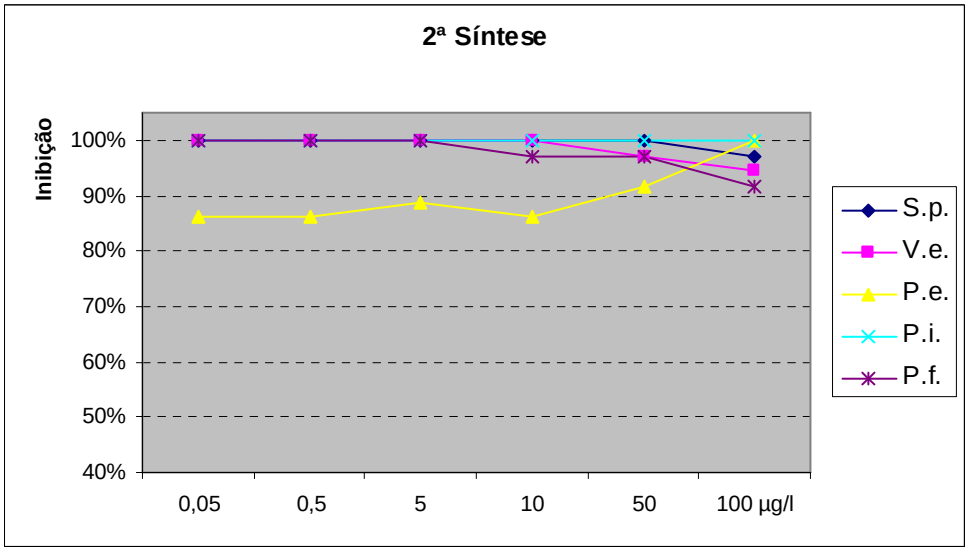

Geodia corticostylifera referência
Inibição
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
0,05
0,5
5
10
50
100 µg/l
S.p.
V.e.
P.e.
P.i.
P.f.


Geodia corticostylifera estressada
Inibição
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
0,05
0,5
5
10
50
100 µg/l
S.p.
V.e.
P.e.
P.i.
P.f.


Arenosclera brasiliensis referência
Inibição
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
0,05
0,5
5
10
50
100 µg/l
S.p.
V.e.
P.e.
P.i.
P.f.


Arenosclera brasiliensis estressada
Inibição
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
0,05
0,5
5
10
50
100 µg/l
S.p.
V.e.
P.e.
P.i.
P.f.


1ª Síntese
Inibição
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
0,05
0,5
5
10
50
100 µg/l
S.p.
V.e.
P.e.
P.i.
P.f.


2ª Síntese
Inibição
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
0,05
0,5
5
10
50
100 µg/l
S.p.
V.e.
P.e.
P.i.
P.f.

D.2 Microalgas marinhas

A TABELA 5 apresenta os resultados obtidos do teste laboratorial com microalgas marinhas, onde a contagem das células esteve relacionada à ação algicida alcançada por cada tratamento.

TABELA 5. Contagem das células (10^5 cel/ml) após ação dos tratamentos.

Ação	1º dia		2º dia		3º dia		4º dia		5º dia	
Branco →T1	11	10	18	13	17	7	7	12	8	10
Branco →T2	8	10	12	8	8	6	4	5	6	7
Branco →T3	11	8	4	4	7	4	6	12	4	10
2ª Sint.→T1	7	4	13	9	3	2	3	3	1	1
2ª Sint.→T2	5	16	8	1	3	3	0	1	0	0
2ª Sint.→T3	5	7	12	29	8	6	3	6	2	4
Padrão→T1	6	6	2	3	7	5	12	11	8	9
Padrão→T2	6	0	7	4	3	9	7	9	5	6
Padrão→T3	5	7	24	18	6	3	24	18	20	15
Branco→D1	25	27	18	28	5	7	7	15	8	10
Branco→D2	21	21	32	18	8	12	10	12	9	9
Branco→D3	28	32	8	17	5	10	12	10	11	9
2ª Sint.→D1	4	4	4	5	7	4	2	1	1	1
2ª Sint.→D2	10	15	15	17	22	25	32	35	20	15
2ª Sint.→D3	4	1	4	5	2	2	1	1	1	1
Padrão→D1	9	7	5	5	2	3	12	12	8	9
Padrão→D2	6	8	12	16	2	2	8	6	7	4
Padrão→D3	2	3	18	19	12	10	12	14	10	9
Branco→S1	22	35	26	15	18	20	18	12	16	10
Branco→S2	36	38	22	18	32	18	35	18	22	12
Branco→S3	33	45	13	28	8	18	10	5	9	3
2ª Sint.→S1	42	25	30	32	0	0	0	0	0	0
2ª Sint.→S2	13	35	12	4	0	8	6	0	0	0
2ª Sint.→S3	38	25	13	28	0	0	0	0	0	0
Padrão→S1	15	12	32	25	45	38	35	38	34	22
Padrão→S2	28	25	28	33	28	32	25	28	19	16
Padrão→S3	16	28	35	32	38	35	32	30	22	15

Para avaliação da inibição do crescimento celular foi calculado o percentual de inibição (% I) a partir dos valores médios de células contabilizadas para cada um dos tratamentos em relação àqueles obtidos para o controle padrão, sendo usado a fórmula,

$$\%\ I\ (i) = 100*[1-(\text{média tratamento} / \text{média controle})]$$

, tendo sido obtido como resultado:

microalga *Skeletonema constatum*, I (*Sc*) = 63,02 % superior aquela obtida para o $CuSO_4$;

microalga *Dunaliella Tertiolecta*, I (*Dt*) = 3,57 % inferior aquela obtida para o $CuSO_4$; e

microalga *DTetraselmis striata*, I (*Ts*) = 37,73 % superior aquela obtida para o $CuSO_4$;

Para visualização das diferenças entre os tratamentos realizados, foi efetuada uma análise da variância tendo como hipótese nula $(Ho)_b$, vinculada a ANOVA (two-factor), o questionamento se os tratamentos podem ser considerados iguais usando os somatórios das células contabilizadas para cada tratamento (blocos) (ver TABELA 6).

TABELA 6. ANOVA TWO FACTOR (RANKING)

Ho : o efeito de inibição do crescimento microalgal é o mesmo para todos os tratamentos.

grupos	9	B→Ts	B→Dt	B→Sc	S→Ts	S→Dt	S→Sc	P→Ts	P→Dt	P→Sc	
blocks	5										**ΣBj**
1º		58	154	209	44	35	178	30	38	124	
2º		60	121	122	72	75	119	58	50	185	870
3º		49	47	114	25	31	8	33	62	216	862
4º		46	66	98	16	64	6	81	72	188	585
5º dia		45	56	72	8	47	0	63	39	128	637
											458
	ΣGi	258	444	615	165	252	311	265	261	841	3412
Ranking ΣGi		3º	7º	8º	1º	2º	6º	5º	4º	9º	3412

							ΣΣ Xij	3412
Analise da Variância							ΣΣ X²ij	1675002
	SS	**DF**	**MS**	**F**	**F(0,05;8;32)**		ΣB²j	2457702
total	135694,6	44					C	258705,4
Gi	76294,98	8	9537,87	**6,78**	**2,25**	***Ho*** **rejeitado**		
Bj	14372,58	4	3593,14				ΣΣ Xij	3412
resíduo	45027,02	32	1407,09					

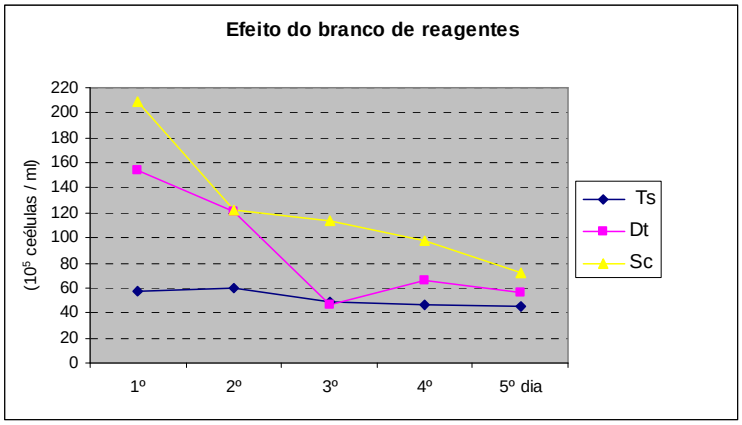
Nesta avaliação foi avaliado a acão de cada tratamento sobre cada espécie de microalga (Tratamento → espécie); sendo os tratamentos B (branco de reagentes); S (produto da 2ª síntese) e P (padrão de $CuS0_4$); e as espécies de microalgas Dt (*Dunaliella tertiolecta*), Sc (*Skeletonma constatum*), e *Ts* (*Tetraselmis striata*).

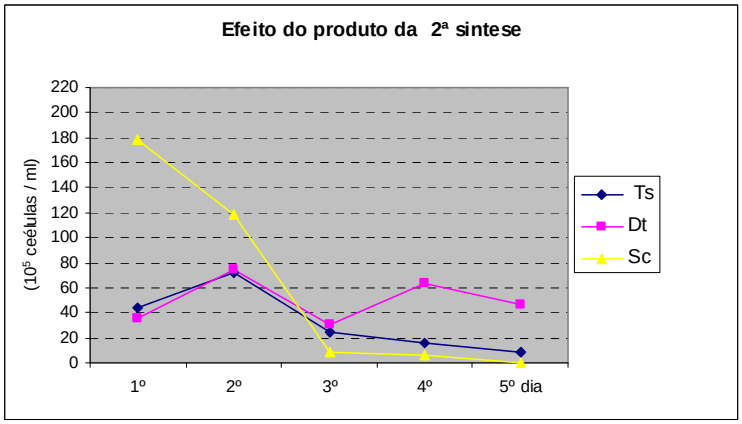
Uma avaliação pos-hoc, usando o Teste de Tukey, questionando se ações inibidoras de crescimento entre o produto da 2ª síntese e aquela obtida pelo tratamento usando o controle (sulfato de cobre), deu resultados negativos para os tratamentos agindo sobre as microalgas *Skeletonma constatum* e *Tetraselmis striata*, contudo verificou-se um resultado positivo para ação dos tratamentos em relação à microalga *Dunaliella tertiolecta* (TABELA 7). Nesta avaliação, a hipótese nula $(h_0)_b$ questiona se os valores de inibição de cada item ensaiado é igual àquele obtido para o controle (nível de significância de 5%), sendo o fator calculado de (**q)** comparado ao valor crítico da distribuição (**q'**) com grau de liberdade dos resíduos (Anexo E); onde: $\mathbf{q} = \frac{\sum \text{Gi}_{\text{controle}} - \sum \text{Gi}_{\text{tratamento}}}{\text{SE}}$; **Gi** = ranking dentro do grupo (i-ésimo), e erro padrão, $\mathbf{SE} = \frac{\mathbf{MS}_{(\text{resíduo})}}{\text{n}}$, sendo (n**)** o nº de dados para cada grupo (ZAR, 1996. p.214).

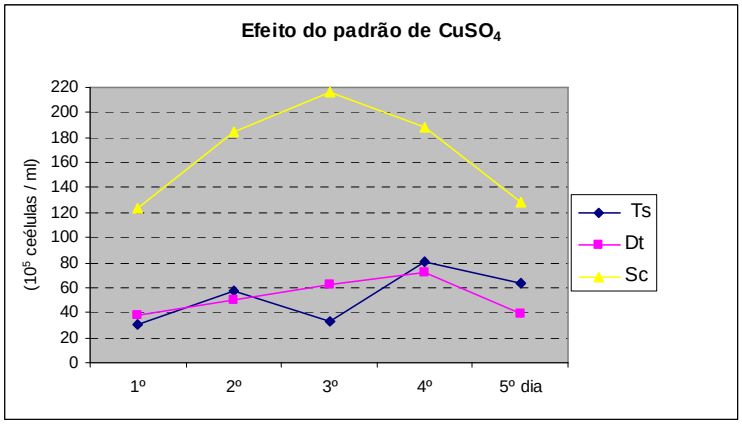
TABELA 7. Comparações entre os tratamentos.

Ranking	**ΣGi - ΣGi'**	**SE**	**q**	**q'**(0,05;32;9)	
1º vs 2º	87	16,77	5,19	4,72	**rejeitado**
1º vs 3º	93	16,77	5,54	4,72	**rejeitado**
1º vs 4º	96	16,77	5,72	4,72	**rejeitado**
2º vs 4º	9	16,77	0,54	4,72	**aceito**
6º vs 9º	530	16,77	31,59	4,72	**rejeitado**

Pelo exposto verificou-se aqui que o produto obtido na 2ª síntese apresentou, quando comparado ao padrão de $CuSO_4$, um alto nível de atividade algicida contra o crescimento da diatomácea *Skeletonema constatum* e uma boa inibição contra a Prasinoficea *Tetraselmis striata*, contudo, não apresentou diferenças quanto sua a ação contra a clorofícea *Dunaliella tertiolecta*. Os gráficos abaixo apresentam as ações de cada tratamento sobre cada espécie de microalga ao longo do experimento.







ANEXO A

Encomendas de navios no mundo. Extrato do shipbuilding statistics (2011).

Year / Country	2004			2005			2006			2007			2008			2009			2010		
	No.	'000GT	share(%)	No.	'000GT	share(%)	No.	'000GT	share(%)	No.	'000GT	share(%)	No.	'000GT	share(%)	No.	'000GT	share(%)	No.	'000GT	share(%)
Japan	1065	49,708	34.0	1,168	51,871	31.6	1,313	56,933	27.3	1,495	63,814	19.4	1,607	63,641	17.3	1,286	51,966	17.3	1,105	42,474	16.3
S. Korea	1015	54,355	37.2	1,140	59,282	36.1	1,413	77,265	37.0	2,242	126,531	38.4	2,303	137,596	37.4	1,675	104,252	34.7	1,357	89,595	34.3
China	790	20,466	14.0	1,027	25,940	15.8	1,650	44,778	21.4	3,139	97,761	29.6	3,999	123,961	33.7	3,523	111,148	37.0	2,967	103,031	39.5
Belgium	0	0	0.0	0	0	0.0	4	12	0.0	2	6	0.0	1	3	0.0	0	0	0.0	0	0	0.0
Denmark	16	1,487	1.0	16	1,584	1.0	11	1,424	0.7	23	1,462	0.4	21	1,148	0.3	12	555	0.2	5	116	0.0
France	12	454	0.3	11	676	0.4	15	851	0.4	20	763	0.2	13	723	0.2	9	438	0.1	9	283	0.1
Germany	117	2,700	1.8	187	4,085	2.5	199	4,151	2.0	203	4,165	1.3	181	3,568	1.0	85	1,988	0.7	55	1,459	0.6
Greece	1	2	0.0	1	16	0.0	2	17	0.0	3	20	0.0	4	7	0.0	4	3	0.0	4	4	0.0
Italy	78	1,815	1.2	91	2,239	1.4	96	2,175	1.0	118	2,570	0.8	98	1,747	0.5	83	1,965	0.7	47	1,293	0.5
Netherlands	171	457	0.3	233	614	0.4	232	622	0.3	253	741	0.2	100	516	0.1	84	452	0.2	70	331	0.1
U.K.	8	5	0.0	5	3	0.0	4	2	0.0	7	2	0.0	9	1	0.0	7	1	0.0	5	1	0.0
Finland	6	412	0.3	13	847	0.5	11	851	0.4	10	826	0.3	7	582	0.2	6	335	0.1	5	131	0.1
Norway	19	37	0.0	33	166	0.1	81	347	0.2	64	264	0.1	36	132	0.0	32	91	0.0	30	130	0.0
Sweden	0	0	0.0	0	0	0.0	4	27	0.0	2	20	0.0	3	37	0.0	2	24	0.0	0	0	0.0
Spain	130	271	0.2	115	441	0.3	143	744	0.4	165	865	0.3	148	784	0.2	120	656	0.2	83	349	0.1
Portugal	9	24	0.0	12	51	0.0	9	60	0.0	15	63	0.0	15	54	0.0	3	11	0.0	2	8	0.0
Europe total	567	7,664	5.2	717	10,722	6.5	811	11,283	5.4	885	11,767	3.6	636	9,302	2.5	447	6,520	2.2	315	4,106	1.6
Brazil	50	261	0.2	40	169	0.1	31	189	0.1	80	1,954	0.6	104	2,394	0.7	118	2,118	0.7	116	2,249	0.9
Poland	127	2,846	1.9	126	2,585	1.6	116	2,322	1.1	122	2,031	0.6	140	1,414	0.4	82	327	0.1	70	305	0.1
Singapore	60	286	0.2	98	340	0.2	77	259	0.1	95	263	0.1	115	451	0.1	107	297	0.1	86	264	0.1
Taiwan	51	2,045	1.4	52	2,224	1.4	58	2,378	1.1	67	2,838	0.9	62	2,647	0.7	47	2,222	0.7	42	1,947	0.7
U.S.A.	49	652	0.4	52	592	0.4	126	724	0.3	132	693	0.2	132	669	0.2	98	526	0.2	72	212	0.1
Croatia	83	2,390	1.6	75	2,360	1.4	61	1,879	0.9	69	1,997	0.6	64	1,665	0.5	36	832	0.3	24	542	0.2
India	62	229	0.2	97	554	0.3	148	780	0.4	246	2,615	0.8	287	3,538	1.0	261	3,424	1.1	257	2,436	0.9
Philippines	30	772	0.5	30	787	0.5	60	1,896	0.9	116	5,160	1.6	117	5,919	1.6	114	6,690	2.2	108	7,064	2.7
Rumania	87	986	0.7	100	1,522	0.9	127	1,681	0.8	146	3,043	0.9	164	3,202	0.9	111	1,944	0.6	80	1,116	0.4
Turkey	138	650	0.4	192	1,222	0.7	247	1,615	0.8	337	2,348	0.7	332	2,650	0.7	225	1,116	0.4	162	804	0.3
Vietnam	66	641	0.4	71	782	0.5	122	2,123	1.0	206	3,204	1.0	327	4,296	1.2	287	3,094	1.0	252	2,452	0.9
Others	407	2,262	1.5	537	3,070	1.9	548	2,770	1.3	678	3,714	1.1	952	4,725	1.3	809	4,036	1.3	809	2,420	0.9
Sub total	1,210	14,020	9.6	1,470	16,207	9.9	1,721	18,616	8.9	2,294	29,859	9.1	2,796	33,569	9.1	2,295	26,626	8.9	2,078	21,811	8.4
World Total	4,647	146,213	100.0	5,522	164,022	100.0	6,908	208,875	100.0	10,055	329,732	100.0	11,341	368,070	100.0	9,226	300,511	100.0	7,822	261,016	100.0

(Note) 1. Data Source : IHS(Former Lloyd's Register) "World Shipbuilding Statistics". Year-end basis.
2. Ship Size Coverage : 100 Gross Tonnage and over.
3. Europe total=Former AWES(present CESA) countries. Excludes Poland (member from '95) , Rumania ('00), Croatia('02), Lithuania & Bulgaria('09) for comparisons with former periods.

ANEXO B

Possíveis estruturas e fragmentos de glicerofosfocolinas (Fonte: Lipidmaps)

C=Number of carbons; DB=Number of double bonds

Nature Lipidomics gateway

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
675.6826	676.4912	PC	28	1	PC(12:0/16:1(9Z))	494.3241	476.3135	440.2772	422.2666	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
675.6826	676.4912	PC	28	1	PC(10:0/18:1(9Z))	522.3554	504.3448	412.2459	394.2353	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
675.6826	676.4912	PC	28	1	PC(18:1(9Z)/10:0)	412.2459	394.2353	522.3554	504.3448	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
675.6826	676.4912	PC	28	1	PC(14:0/14:1(9Z))	466.2928	448.2822	468.3085	450.2979	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
675.6826	676.4912	PC	28	1	PC(16:1(9Z)/12:0)	440.2772	422.2666	494.3241	476.3135	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
675.6826	676.4912	PC	28	1	PC(14:1(9Z)/14:0)	468.3085	450.2979	466.2928	448.2822	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
675.6826	676.5276	PC	29	0	PC(P-16:0/13:0)	-	-	480.3449	462.3343	$C_{37}H_{75}NO_7P$	[M+H]+
Input Mass	**Matched Mass**	**HG**	**C**	**DB**	**Abbreviation**	**M-sn1**	**M-sn1-H2O**	**M-sn2**	**M-sn2-H2O**	**Formula**	**Ion**
676.6461	676.5276	PC	29	0	PC(P-16:0/13:0)	-	-	480.3449	462.3343	$C_{37}H_{75}NO_7P$	[M+H]+
676.6461	676.4912	PC	28	1	PC(10:0/18:1(9Z))	522.3554	504.3448	412.2459	394.2353	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
676.6461	676.4912	PC	28	1	PC(18:1(9Z)/10:0)	412.2459	394.2353	522.3554	504.3448	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
676.6461	676.4912	PC	28	1	PC(14:0/14:1(9Z))	466.2928	448.2822	468.3085	450.2979	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
676.6461	676.4912	PC	28	1	PC(14:1(9Z)/14:0)	468.3085	450.2979	466.2928	448.2822	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
676.6461	676.4912	PC	28	1	PC(12:0/16:1(9Z))	494.3241	476.3135	440.2772	422.2666	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
676.6461	676.4912	PC	28	1	PC(16:1(9Z)/12:0)	440.2772	422.2666	494.3241	476.3135	$C_{36}H_{71}NO_8P$	[M+H]+
Input Mass	**Matched Mass**	**HG**	**C**	**DB**	**Abbreviation**	**M-sn1**	**M-sn1-H2O**	**M-sn2**	**M-sn2-H2O**	**Formula**	**Ion**
689.6807	690.5069	PC	29	1	PC(13:0/16:1(9Z))	494.3242	476.3136	454.2929	436.2823	$C_{37}H_{73}NO_8P$	[M+H]+

689.6807	690.5069	PC	29	1	PC(16:1(9Z)/13:0)	454.2929	436.2823	494.3242	476.3136	$C_{37}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
689.6807	690.5069	PC	29	1	PC(12:0/17:1(9Z))	508.3398	490.3292	440.2772	422.2666	$C_{37}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
689.6807	690.5069	PC	29	1	PC(14:1(9Z)/15:0)	482.3242	464.3136	466.2929	448.2823	$C_{37}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
689.6807	690.5069	PC	29	1	PC(15:0/14:1(9Z))	466.2929	448.2823	482.3242	464.3136	$C_{37}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
689.6807	690.5069	PC	29	1	PC(17:1(9Z)/12:0)	440.2772	422.2666	508.3398	490.3292	$C_{37}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
689.6807	690.5432	PC	30	0	PC(P-16:0/14:0)	-	-	480.3448	462.3342	$C_{38}H_{77}NO_7P$	[M+H]+
689.6807	690.5432	PC	30	0	PC(P-18:0/12:0)	-	-	508.3761	490.3655	$C_{38}H_{77}NO_7P$	[M+H]+
689.6807	690.5432	PC	30	1	PC(O-16:0/14:1(9Z))	-	-	482.3605	464.3499	$C_{38}H_{77}NO_7P$	[M+H]+
689.6807	690.5432	PC	30	0	PC(P-20:0/10:0)	-	-	536.4074	518.3968	$C_{38}H_{77}NO_7P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
701.6923	702.5069	PC	30	2	PC(10:0/20:2(11Z,14Z))	548.3711	530.3605	412.2459	394.2353	$C_{38}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
701.6923	702.5069	PC	30	2	PC(12:0/18:2(9Z,12Z))	520.3398	502.3292	440.2772	422.2666	$C_{38}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
701.6923	702.5069	PC	30	2	PC(14:1(9Z)/16:1(9Z))	494.3242	476.3136	466.2929	448.2823	$C_{38}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
701.6923	702.5069	PC	30	2	PC(16:1(9Z)/14:1(9Z))	466.2929	448.2823	494.3242	476.3136	$C_{38}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
701.6923	702.5069	PC	30	2	PC(20:2(11Z,14Z)/10:0)	412.2459	394.2353	548.3711	530.3605	$C_{38}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
701.6923	702.5069	PC	30	2	PC(18:2(9Z,12Z)/12:0)	440.2772	422.2666	520.3398	502.3292	$C_{38}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
701.6923	702.5069	PC	30	2	PC(17:2(9Z,12Z)/13:0)	454.2929	436.2823	506.3242	488.3136	$C_{38}H_{73}NO_8P$	[M+H]+
701.6923	702.5069	PC	30	2	PC(13:0/17:2(9Z,12Z))	506.3242	488.3136	454.2929	436.2823	$C_{38}H_{73}NO_8P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(10:0/20:1(11Z))	550.3867	532.3761	412.2459	394.2353	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(14:0/16:1(9Z))	494.3241	476.3135	468.3085	450.2979	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(13:0/17:1(9Z))	508.3398	490.3292	454.2928	436.2822	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(12:0/18:1(9Z))	522.3554	504.3448	440.2772	422.2666	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(14:1(9Z)/16:0)	496.3398	478.3292	466.2928	448.2822	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(16:1(9Z)/14:0)	468.3085	450.2979	494.3241	476.3135	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+

703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(16:0/14:1(9Z))	466.2928	448.2822	496.3398	478.3292	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(20:1(11Z)/10:0)	412.2459	394.2353	550.3867	532.3761	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(18:1(9Z)/12:0)	440.2772	422.2666	522.3554	504.3448	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
703.6888	704.5225	PC	30	1	PC(17:1(9Z)/13:0)	454.2928	436.2822	508.3398	490.3292	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
703.6888	704.5589	PC	31	0	PC(P-18:0/13:0)	-	-	508.3762	490.3656	$C_{39}H_{79}NO_7P$	[M+H]+
703.6888	704.5589	PC	31	0	PC(P-16:0/15:0)	-	-	480.3449	462.3343	$C_{39}H_{79}NO_7P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
704.6431	704.5589	PC	31	0	PC(P-16:0/15:0)	-	-	480.3449	462.3343	$C_{39}H_{79}NO_7P$	[M+H]+
704.6431	704.5589	PC	31	0	PC(P-18:0/13:0)	-	-	508.3762	490.3656	$C_{39}H_{79}NO_7P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(13:0/17:1(9Z))	508.3398	490.3292	454.2928	436.2822	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(12:0/18:1(9Z))	522.3554	504.3448	440.2772	422.2666	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(16:0/14:1(9Z))	466.2928	448.2822	496.3398	478.3292	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(20:1(11Z)/10:0)	412.2459	394.2353	550.3867	532.3761	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(18:1(9Z)/12:0)	440.2772	422.2666	522.3554	504.3448	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(17:1(9Z)/13:0)	454.2928	436.2822	508.3398	490.3292	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(16:1(9Z)/14:0)	468.3085	450.2979	494.3241	476.3135	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(14:0/16:1(9Z))	494.3241	476.3135	468.3085	450.2979	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(10:0/20:1(11Z))	550.3867	532.3761	412.2459	394.2353	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+
704.6431	704.5225	PC	30	1	PC(14:1(9Z)/16:0)	496.3398	478.3292	466.2928	448.2822	$C_{38}H_{75}NO_8P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
705.6451	706.5382	PC	30	0	PC(10:0/20:0)	552.4024	534.3918	412.2459	394.2353	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
705.6451	706.5382	PC	30	0	PC(13:0/17:0)	510.3555	492.3449	454.2929	436.2823	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
705.6451	706.5382	PC	30	0	PC(12:0/18:0)	524.3711	506.3605	440.2772	422.2666	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
705.6451	706.5382	PC	30	0	PC(15:0/15:0)	482.3242	464.3136	482.3242	464.3136	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
705.6451	706.5382	PC	30	0	PC(14:0/16:0)	496.3398	478.3292	468.3085	450.2979	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
705.6451	706.5382	PC	30	0	PC(17:0/13:0)	454.2929	436.2823	510.3555	492.3449	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+

705.6451	706.5382	PC	30	0	PC(16:0/14:0)	468.3085	450.2979	496.3398	478.3292	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
705.6451	706.5382	PC	30	0	PC(20:0/10:0)	412.2459	394.2353	552.4024	534.3918	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
705.6451	706.5382	PC	30	0	PC(18:0/12:0)	440.2772	422.2666	524.3711	506.3605	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
705.6451	706.5745	PC	31	0	PC(O-18:0/13:0)	-	-	510.3918	492.3812	$C_{39}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
705.6451	706.5745	PC	31	0	PC(O-16:0/15:0)	-	-	482.3605	464.3499	$C_{39}H_{81}NO_7P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
706.6284	706.5745	PC	31	0	PC(O-18:0/13:0)	-	-	510.3918	492.3812	$C_{39}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
706.6284	706.5745	PC	31	0	PC(O-16:0/15:0)	-	-	482.3605	464.3499	$C_{39}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
706.6284	706.5382	PC	30	0	PC(12:0/18:0)	524.3711	506.3605	440.2772	422.2666	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
706.6284	706.5382	PC	30	0	PC(15:0/15:0)	482.3242	464.3136	482.3242	464.3136	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
706.6284	706.5382	PC	30	0	PC(16:0/14:0)	468.3085	450.2979	496.3398	478.3292	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
706.6284	706.5382	PC	30	0	PC(20:0/10:0)	412.2459	394.2353	552.4024	534.3918	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
706.6284	706.5382	PC	30	0	PC(18:0/12:0)	440.2772	422.2666	524.3711	506.3605	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
706.6284	706.5382	PC	30	0	PC(17:0/13:0)	454.2929	436.2823	510.3555	492.3449	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
706.6284	706.5382	PC	30	0	PC(13:0/17:0)	510.3555	492.3449	454.2929	436.2823	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
706.6284	706.5382	PC	30	0	PC(10:0/20:0)	552.4024	534.3918	412.2459	394.2353	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
706.6284	706.5382	PC	30	0	PC(14:0/16:0)	496.3398	478.3292	468.3085	450.2979	$C_{38}H_{77}NO_8P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
717.7772	718.5382	PC	31	1	PC(14:1(9Z)/17:0)	510.3555	492.3449	466.2929	448.2823	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
717.7772	718.5382	PC	31	1	PC(17:1(9Z)/14:0)	468.3085	450.2979	508.3398	490.3292	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
717.7772	718.5382	PC	31	1	PC(18:1(9Z)/13:0)	454.2929	436.2823	522.3555	504.3449	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
717.7772	718.5382	PC	31	1	PC(15:0/16:1(9Z))	494.3242	476.3136	482.3242	464.3136	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
717.7772	718.5382	PC	31	1	PC(14:0/17:1(9Z))	508.3398	490.3292	468.3085	450.2979	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+

717.7772	718.5382	PC	31	1	PC(13:0/18:1(9Z))	522.3555	504.3449	454.2929	436.2823	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
717.7772	718.5382	PC	31	1	PC(17:0/14:1(9Z))	466.2929	448.2823	510.3555	492.3449	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
717.7772	718.5382	PC	31	1	PC(16:1(9Z)/15:0)	482.3242	464.3136	494.3242	476.3136	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
717.7772	718.5745	PC	32	0	PC(P-18:0/14:0)	-	-	508.3761	490.3655	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
717.7772	718.5745	PC	32	0	PC(P-20:0/12:0)	-	-	536.4074	518.3968	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
717.7772	718.5745	PC	32	1	PC(O-16:0/16:1(9Z))	-	-	482.3605	464.3499	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
717.7772	718.5745	PC	32	0	PC(P-16:0/16:0)	-	-	480.3448	462.3342	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
717.7772	718.5745	PC	32	1	PC(O-18:0/14:1(9Z))	-	-	510.3918	492.3812	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
718.5522	718.5382	PC	31	1	PC(14:1(9Z)/17:0)	510.3555	492.3449	466.2929	448.2823	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
718.5522	718.5382	PC	31	1	PC(17:1(9Z)/14:0)	468.3085	450.2979	508.3398	490.3292	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
718.5522	718.5382	PC	31	1	PC(18:1(9Z)/13:0)	454.2929	436.2823	522.3555	504.3449	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
718.5522	718.5382	PC	31	1	PC(15:0/16:1(9Z))	494.3242	476.3136	482.3242	464.3136	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
718.5522	718.5382	PC	31	1	PC(14:0/17:1(9Z))	508.3398	490.3292	468.3085	450.2979	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
718.5522	718.5382	PC	31	1	PC(13:0/18:1(9Z))	522.3555	504.3449	454.2929	436.2823	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
718.5522	718.5382	PC	31	1	PC(17:0/14:1(9Z))	466.2929	448.2823	510.3555	492.3449	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
718.5522	718.5382	PC	31	1	PC(16:1(9Z)/15:0)	482.3242	464.3136	494.3242	476.3136	$C_{39}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
718.5522	718.5745	PC	32	0	PC(P-18:0/14:0)	-	-	508.3761	490.3655	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
718.5522	718.5745	PC	32	0	PC(P-20:0/12:0)	-	-	536.4074	518.3968	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
718.5522	718.5745	PC	32	1	PC(O-16:0/16:1(9Z))	-	-	482.3605	464.3499	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
718.5522	718.5745	PC	32	0	PC(P-16:0/16:0)	-	-	480.3448	462.3342	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
718.5522	718.5745	PC	32	1	PC(O-18:0/14:1(9Z))	-	-	510.3918	492.3812	$C_{40}H_{81}NO_7P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion

729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(18:2(9Z,12Z)/14:0)	468.3085	450.2979	520.3398	502.3292	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(10:0/22:2(13Z,16Z))	576.4024	558.3918	412.2459	394.2353	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(14:0/18:2(9Z,12Z))	520.3398	502.3292	468.3085	450.2979	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	494.3242	476.3136	494.3242	476.3136	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(12:0/20:2(11Z,14Z))	548.3711	530.3605	440.2772	422.2666	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(20:2(11Z,14Z)/12:0)	440.2772	422.2666	548.3711	530.3605	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(18:1(9Z)/14:1(9Z))	466.2929	448.2823	522.3555	504.3449	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(14:1(9Z)/18:1(9Z))	522.3555	504.3449	466.2929	448.2823	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(17:2(9Z,12Z)/15:0)	482.3242	464.3136	506.3242	488.3136	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(22:2(13Z,16Z)/10:0)	412.2459	394.2353	576.4024	558.3918	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5382	PC	32	2	PC(15:0/17:2(9Z,12Z))	506.3242	488.3136	482.3242	464.3136	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
729.7747	730.5745	PC	33	1	PC(P-16:0/17:1(9Z))	-	-	480.3448	462.3342	$C_{41}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
729.7747	730.5745	PC	33	2	PC(O-16:0/17:2(9Z,12Z))	-	-	482.3605	464.3499	$C_{41}H_{81}NO_7P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
730.7498	730.5745	PC	33	2	PC(O-16:0/17:2(9Z,12Z))	-	-	482.3605	464.3499	$C_{41}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
730.7498	730.5745	PC	33	1	PC(P-16:0/17:1(9Z))	-	-	480.3448	462.3342	$C_{41}H_{81}NO_7P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(14:0/18:2(9Z,12Z))	520.3398	502.3292	468.3085	450.2979	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	494.3242	476.3136	494.3242	476.3136	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(18:2(9Z,12Z)/14:0)	468.3085	450.2979	520.3398	502.3292	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(15:0/17:2(9Z,12Z))	506.3242	488.3136	482.3242	464.3136	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(18:1(9Z)/14:1(9Z))	466.2929	448.2823	522.3555	504.3449	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(12:0/20:2(11Z,14Z))	548.3711	530.3605	440.2772	422.2666	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(17:2(9Z,12Z)/15:0)	482.3242	464.3136	506.3242	488.3136	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(22:2(13Z,16Z)/10:0)	412.2459	394.2353	576.4024	558.3918	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+

730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(20:2(11Z,14Z)/12:0)	440.2772	422.2666	548.3711	530.3605	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(10:0/22:2(13Z,16Z))	576.4024	558.3918	412.2459	394.2353	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+
730.7498	730.5382	PC	32	2	PC(14:1(9Z)/18:1(9Z))	522.3555	504.3449	466.2929	448.2823	$C_{40}H_{77}NO_8P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(12:0/20:1(11Z))	550.3867	532.3761	440.2772	422.2666	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(18:0/14:1(9Z))	466.2928	448.2822	524.3711	506.3605	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(16:0/16:1(9Z))	494.3241	476.3135	496.3398	478.3292	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(10:0/22:1(13Z))	578.4180	560.4074	412.2459	394.2353	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(18:1(9Z)/14:0)	468.3085	450.2979	522.3554	504.3448	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(20:1(11Z)/12:0)	440.2772	422.2666	550.3867	532.3761	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(22:1(13Z)/10:0)	412.2459	394.2353	578.4180	560.4074	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(15:0/17:1(9Z))	508.3398	490.3292	482.3241	464.3135	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(14:1(9Z)/18:0)	524.3711	506.3605	466.2928	448.2822	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(14:0/18:1(9Z))	522.3554	504.3448	468.3085	450.2979	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(17:1(9Z)/15:0)	482.3241	464.3135	508.3398	490.3292	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5538	PC	32	1	PC(16:1(9Z)/16:0)	496.3398	478.3292	494.3241	476.3135	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
731.7684	732.5902	PC	33	0	PC(P-20:0/13:0)	-	-	536.4075	518.3969	$C_{41}H_{83}NO_7P$	[M+H]+
731.7684	732.5902	PC	33	1	PC(O-16:0/17:1(9Z))	-	-	482.3605	464.3499	$C_{41}H_{83}NO_7P$	[M+H]+
731.7684	732.5902	PC	33	0	PC(P-18:0/15:0)	-	-	508.3762	490.3656	$C_{41}H_{83}NO_7P$	[M+H]+
731.7684	732.5902	PC	33	0	PC(P-16:0/17:0)	-	-	480.3449	462.3343	$C_{41}H_{83}NO_7P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
732.6449	732.5902	PC	33	1	PC(O-16:0/17:1(9Z))	-	-	482.3605	464.3499	$C_{41}H_{83}NO_7P$	[M+H]+
732.6449	732.5902	PC	33	0	PC(P-20:0/13:0)	-	-	536.4075	518.3969	$C_{41}H_{83}NO_7P$	[M+H]+
732.6449	732.5902	PC	33	0	PC(P-18:0/15:0)	-	-	508.3762	490.3656	$C_{41}H_{83}NO_7P$	[M+H]+

732.6449	732.5902	PC	33	0	PC(P-16:0/17:0)	-	-	480.3449	462.3343	$C_{41}H_{83}NO_7P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(14:1(9Z)/18:0)	524.3711	506.3605	466.2928	448.2822	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(14:0/18:1(9Z))	522.3554	504.3448	468.3085	450.2979	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(17:1(9Z)/15:0)	482.3241	464.3135	508.3398	490.3292	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(16:1(9Z)/16:0)	496.3398	478.3292	494.3241	476.3135	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(22:1(13Z)/10:0)	412.2459	394.2353	578.4180	560.4074	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(20:1(11Z)/12:0)	440.2772	422.2666	550.3867	532.3761	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(18:1(9Z)/14:0)	468.3085	450.2979	522.3554	504.3448	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(15:0/17:1(9Z))	508.3398	490.3292	482.3241	464.3135	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(16:0/16:1(9Z))	494.3241	476.3135	496.3398	478.3292	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(18:0/14:1(9Z))	466.2928	448.2822	524.3711	506.3605	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(12:0/20:1(11Z))	550.3867	532.3761	440.2772	422.2666	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+
732.6449	732.5538	PC	32	1	PC(10:0/22:1(13Z))	578.4180	560.4074	412.2459	394.2353	$C_{40}H_{79}NO_8P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(13:0/19:0)	538.3868	520.3762	454.2929	436.2823	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(12:0/20:0)	552.4024	534.3918	440.2772	422.2666	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(10:0/22:0)	580.4337	562.4231	412.2459	394.2353	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(15:0/17:0)	510.3555	492.3449	482.3242	464.3136	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(17:0/15:0)	482.3242	464.3136	510.3555	492.3449	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(19:0/13:0)	454.2929	436.2823	538.3868	520.3762	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(20:0/12:0)	440.2772	422.2666	552.4024	534.3918	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(14:0/18:0)	524.3711	506.3605	468.3085	450.2979	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(18:0/14:0)	468.3085	450.2979	524.3711	506.3605	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(16:0/16:0)	496.3398	478.3292	496.3398	478.3292	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.5695	PC	32	0	PC(22:0/10:0)	412.2459	394.2353	580.4337	562.4231	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
733.7463	734.6058	PC	33	0	PC(O-20:0/13:0)	-	-	538.4231	520.4125	$C_{41}H_{85}NO_7P$	[M+H]+

733.7463	734.6058	PC	33	0	PC(O-18:0/15:0)	-	-	510.3918	492.3812	$C_{41}H_{85}NO_7P$	[M+H]+
733.7463	734.6058	PC	33	0	PC(O-16:0/17:0)	-	-	482.3605	464.3499	$C_{41}H_{85}NO_7P$	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	HG	C	DB	Abbreviation	M-sn1	M-sn1-H2O	M-sn2	M-sn2-H2O	Formula	Ion
734.6209	734.6058	PC	33	0	PC(O-20:0/13:0)	-	-	538.4231	520.4125	$C_{41}H_{85}NO_7P$	[M+H]+
734.6209	734.6058	PC	33	0	PC(O-18:0/15:0)	-	-	510.3918	492.3812	$C_{41}H_{85}NO_7P$	[M+H]+
734.6209	734.6058	PC	33	0	PC(O-16:0/17:0)	-	-	482.3605	464.3499	$C_{41}H_{85}NO_7P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(15:0/17:0)	510.3555	492.3449	482.3242	464.3136	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(14:0/18:0)	524.3711	506.3605	468.3085	450.2979	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(18:0/14:0)	468.3085	450.2979	524.3711	506.3605	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(16:0/16:0)	496.3398	478.3292	496.3398	478.3292	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(22:0/10:0)	412.2459	394.2353	580.4337	562.4231	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(20:0/12:0)	440.2772	422.2666	552.4024	534.3918	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(19:0/13:0)	454.2929	436.2823	538.3868	520.3762	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(10:0/22:0)	580.4337	562.4231	412.2459	394.2353	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(12:0/20:0)	552.4024	534.3918	440.2772	422.2666	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(13:0/19:0)	538.3868	520.3762	454.2929	436.2823	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+
734.6209	734.5695	PC	32	0	PC(17:0/15:0)	482.3242	464.3136	510.3555	492.3449	$C_{40}H_{81}NO_8P$	[M+H]+

Disponível em: http://www.lipidmaps.org

ANEXO C

Tabela valores críticos para distribuição F

Table for alpha (1): F(0.05;df1;df2)

df2/df1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.4476	199.5000	215.7073	224.5832	230.1619	233.9860	236.7684	238.8827	240.5433	241.8817
2	18.5128	19.0000	19.1643	19.2468	19.2964	19.3295	19.3532	19.3710	19.3848	19.3959
3	10.1280	9.5521	9.2766	9.1172	9.0135	8.9406	8.8867	8.8452	8.8123	8.7855
4	7.7086	6.9443	6.5914	6.3882	6.2561	6.1631	6.0942	6.0410	5.9988	5.9644
5	6.6079	5.7861	5.4095	5.1922	5.0503	4.9503	4.8759	4.8183	4.7725	4.7351
6	5.9874	5.1433	4.7571	4.5337	4.3874	4.2839	4.2067	4.1468	4.0990	4.0600
7	5.5914	4.7374	4.3468	4.1203	3.9715	3.8660	3.7870	3.7257	3.6767	3.6365
8	5.3177	4.4590	4.0662	3.8379	3.6875	3.5806	3.5005	3.4381	3.3881	3.3472
9	5.1174	4.2565	3.8625	3.6331	3.4817	3.3738	3.2927	3.2296	3.1789	3.1373
10	4.9646	4.1028	3.7083	3.4780	3.3258	3.2172	3.1355	3.0717	3.0204	2.9782
11	4.8443	3.9823	3.5874	3.3567	3.2039	3.0946	3.0123	2.9480	2.8962	2.8536
12	4.7472	3.8853	3.4903	3.2592	3.1059	2.9961	2.9134	2.8486	2.7964	2.7534
13	4.6672	3.8056	3.4105	3.1791	3.0254	2.9153	2.8321	2.7669	2.7144	2.6710
14	4.6001	3.7389	3.3439	3.1122	2.9582	2.8477	2.7642	2.6987	2.6458	2.6022
15	4.5431	3.6823	3.2874	3.0556	2.9013	2.7905	2.7066	2.6408	2.5876	2.5437
16	4.4940	3.6337	3.2389	3.0069	2.8524	2.7413	2.6572	2.5911	2.5377	2.4935
17	4.4513	3.5915	3.1968	2.9647	2.8100	2.6987	2.6143	2.5480	2.4943	2.4499
18	4.4139	3.5546	3.1599	2.9277	2.7729	2.6613	2.5767	2.5102	2.4563	2.4117
19	4.3807	3.5219	3.1274	2.8951	2.7401	2.6283	2.5435	2.4768	2.4227	2.3779
20	4.3512	3.4928	3.0984	2.8661	2.7109	2.5990	2.5140	2.4471	2.3928	2.3479
21	4.3248	3.4668	3.0725	2.8401	2.6848	2.5727	2.4876	2.4205	2.3660	2.3210
22	4.3009	3.4434	3.0491	2.8167	2.6613	2.5491	2.4638	2.3965	2.3419	2.2967
23	4.2793	3.4221	3.0280	2.7955	2.6400	2.5277	2.4422	2.3748	2.3201	2.2747
24	4.2597	3.4028	3.0088	2.7763	2.6207	2.5082	2.4226	2.3551	2.3002	2.2547
25	4.2417	3.3852	2.9912	2.7587	2.6030	2.4904	2.4047	2.3371	2.2821	2.2365
26	4.2252	3.3690	2.9752	2.7426	2.5868	2.4741	2.3883	2.3205	2.2655	2.2197
27	4.2100	3.3541	2.9604	2.7278	2.5719	2.4591	2.3732	2.3053	2.2501	2.2043
28	4.1960	3.3404	2.9467	2.7141	2.5581	2.4453	2.3593	2.2913	2.2360	2.1900
29	4.1830	3.3277	2.9340	2.7014	2.5454	2.4324	2.3463	2.2783	2.2229	2.1768
30	4.1709	3.3158	2.9223	2.6896	2.5336	2.4205	2.3343	2.2662	2.2107	2.1646
40	4.0847	3.2317	2.8387	2.6060	2.4495	2.3359	2.2490	2.1802	2.1240	2.0772
60	4.0012	3.1504	2.7581	2.5252	2.3683	2.2541	2.1665	2.0970	2.0401	1.9926
120	3.9201	3.0718	2.6802	2.4472	2.2899	2.1750	2.0868	2.0164	1.9588	1.9105
inf	3.8415	2.9957	2.6049	2.3719	2.2141	2.0986	2.0096	1.9384	1.8799	1.8307

Fonte: http://www.statsoft.com/textbook/distribution-tables/#f05

ANEXO D

Tabela dos valores máximos para distribuição de Dunnet

Fonte : http://www.forecastingprinciples.com/files/pdf/tables.pdf

Exhibit 3

Multiple Comparisons Against a Benchmark with Prior Hypotheses on Direction (Dunnett's *t* at 5% level for one-tail comparisons between several treatments and a control)

Degrees of Freedom	Number of Treatment Means (Excluding the Control)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	2.02	2.44	2.68	2.85	2.98	3.08	3.16	3.24	3.30
6	1.94	2.34	2.56	2.71	2.83	2.92	3.00	3.07	3.12
7	1.89	2.27	2.48	2.62	2.73	2.82	2.89	2.95	3.01
8	1.86	2.22	2.42	2.55	2.66	2.74	2.81	2.87	2.92
9	1.83	2.18	2.37	2.50	2.60	2.68	2.75	2.81	2.86
10	1.81	2.15	2.34	2.47	2.56	2.64	2.70	2.76	2.81
11	1.80	2.13	2.31	2.44	2.53	2.60	2.67	2.72	2.77
12	1.78	2.11	2.29	2.41	2.50	2.58	2.64	2.69	2.74
13	1.77	2.09	2.27	2.39	2.48	2.55	2.61	2.66	2.71
14	1.76	2.08	2.25	2.37	2.46	2.53	2.59	2.64	2.69
15	1.75	2.07	2.24	2.36	2.44	2.51	2.57	2.62	2.67
16	1.75	2.06	2.23	2.34	2.43	2.50	2.56	2.61	2.65
17	1.74	2.05	2.22	2.33	2.42	2.49	2.54	2.59	2.64
18	1.73	2.04	2.21	2.32	2.41	2.48	2.53	2.58	2.62
19	1.73	2.03	2.20	2.31	2.40	2.47	2.52	2.57	2.61
20	1.72	2.03	2.19	2.30	2.39	2.46	2.51	2.56	2.60
24	1.71	2.01	2.17	2.28	2.36	2.43	2.48	2.53	2.57
30	1.70	1.99	2.15	2.25	2.33	2.40	2.45	2.50	2.54
40	1.68	1.97	2.13	2.23	2.31	2.37	2.42	2.47	2.51
60	1.67	1.95	2.10	2.21	2.28	2.35	2.39	2.44	2.48
120	1.66	1.93	2.08	2.18	2.26	2.32	2.37	2.41	2.45
x	1.64	1.92	2.06	2.16	2.23	2.29	2.34	2.38	2.42

ANEXO E

Tabela dos valores críticos para distribuição q

Fonte : http://www.stat.wisc.edu/courses/st571-ane/tables/tableQ.pdf

$\alpha = 0.05$

k / df	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	18.0	27.0	32.8	37.1	40.4	43.1	45.4	47.4	49.1
2	6.08	8.33	9.80	10.88	11.73	12.43	13.03	13.54	13.99
3	4.50	5.91	6.82	7.50	8.04	8.48	8.85	9.18	9.46
4	3.93	5.04	5.76	6.29	6.71	7.05	7.35	7.60	7.83
5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99
6	3.46	4.34	4.90	5.30	5.63	5.90	6.12	6.32	6.49
7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.36	5.61	5.82	6.00	6.16
8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92
9	3.20	3.95	4.41	4.76	5.02	5.24	5.43	5.59	5.74
10	3.15	3.88	4.33	4.65	4.91	5.12	5.30	5.46	5.60
11	3.11	3.82	4.26	4.57	4.82	5.03	5.20	5.35	5.49
12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.27	5.39
13	3.06	3.73	4.15	4.45	4.69	4.88	5.05	5.19	5.32
14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.13	5.25
15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20
16	3.00	3.65	4.05	4.33	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15
17	2.98	3.63	4.02	4.30	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11
18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.82	4.96	5.07
19	2.96	3.59	3.98	4.25	4.47	4.65	4.79	4.92	5.04
20	2.95	3.58	3.96	4.23	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01
24	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92
30	2.89	3.49	3.85	4.10	4.30	4.46	4.60	4.72	4.82
40	2.86	3.44	3.79	4.04	4.23	4.39	4.52	4.63	4.73
60	2.83	3.40	3.74	3.98	4.16	4.31	4.44	4.55	4.65
120	2.80	3.36	3.68	3.92	4.10	4.24	4.36	4.47	4.56
∞	2.77	3.31	3.63	3.86	4.03	4.17	4.29	4.39	4.47