



REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – UEMG

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



**“MOLÉCULAS BIOATIVAS – *Limnoperna fortunei* –
MEXILHÃO DOURADO”**



Autora: Camila Freitas de Araújo
Orientador: Prof. Dr. Paulo Santos Assis
Coorientador: Dr. Adriano Corrêa Batista

Ouro Preto, abril de 2022



REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – UEMG

Camila Freitas de Araújo

“Moléculas Bioativas - *Limnoperna fortunei* - Mexilhão Dourado”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da REDEMAT, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Análise e Seleção de Materiais
Orientador: Prof. Dr. Paulo Santos Assis
Coorientador: Dr. Adriano Corrêa Batista

Ouro Preto, abril de 2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A663m Araújo, Camila Freitas de.
Moléculas Bioativas - *Limnoperna fortunei* - Mexilhão Dourado.
[manuscrito] / Camila Freitas de Araújo. - 2022.
101 f.: il.: color., tab., mapa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Santos Assis.
Coorientador: Dr. Adriano Corrêa Batista.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Rede Temática em Engenharia de Materiais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais.
Área de Concentração: Análise e Seleção de Materiais.

1. Mexilhão dourado. 2. Fármacos - Extratos. 3. Biomoléculas. I. Assis, Paulo Santos. II. Batista, Adriano Corrêa. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 620

Bibliotecário(a) Responsável: Maristela Sanches Lima Mesquita -CRB-1716



FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Freitas de Araújo

Moléculas Bioativas-Limnoperba-Mexilhão Dourado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Engenharia de Materiais

Aprovada em 29 de abril de 2022.

Membros da banca

Prof. Dr. Ing. Paulo Santos Assis - Orientador(a) - Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Afonso Pelli - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Jorge Luiz Brescia Murta - Universidade Federal de Ouro Preto

O Prof. Gilberto Henrique Tavares Álvares da Silva, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 02/05/2022



Documento assinado eletronicamente por **Gilberto Henrique Tavares Alvares da Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 12/04/2022, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0309757** e o código CRC **E26DD3BB**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a execução desta longa etapa. Este trabalho não seria possível sem a ajuda e colaboração de um conjunto de pessoas, que possibilitaram que este sonho se tornasse real.

Agradeço a Deus por iluminar os meus passos e me fazer realizar mais um sonho!

Aos meus pais, Ana e Carlos, por estarem sempre ao meu lado, por investirem na minha formação e pela confiança em mim.

À minha irmã Carol, pelo carinho, conversas e conselhos. Agradeço pela família forte e pelo apoio que sempre ofereceram.

Agradeço ao professor Dr. Paulo Santos Assis por toda dedicação na orientação deste trabalho, por ter estado presente em todas as etapas, pelo estímulo a publicações internacionais e por sempre me incentivar a pensar grande.

Ao Dr. Adriano Corrêa Batista, por toda atenção, ideias, disponibilidade, confiança, predisposição, por sempre me incentivar desde o início e pela coorientação.

Aos colegas do laboratório de Difração de Raio x, pelas experiências trocadas; e à secretária Ana da REDEMAT.

Agradeço também aos amigos do mestrado (grupo Gelatina), pelos estudos, resenhas, viagens e por fazerem a experiência acadêmica ser mais divertida; a todos os amigos de BH, pelos maravilhosos encontros e pela verdadeira amizade; e aos amigos de Ouro Preto, em especial, as lindas da República Tan Tan por sempre alegrarem meus dias, pela amizade e por fazerem da minha vida ouropretana a melhor possível!

Por fim, agradeço aos demais docentes que, direta ou indiretamente, de alguma forma deram a sua contribuição para que eu chegasse com sucesso ao fim desta etapa; à CAPES pela bolsa e auxílios concedidos, à REDEMAT e à UFOP pelo excelente programa de Pós-graduação e por me proporcionarem um mestrado de alta qualidade, ao CBEIH e à Cemig, projeto GT-604 pela parceria e apoio financeiro de atividades.

Epígrafe

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã”.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

“Para enxergar claro, basta mudar a direção do olhar”.

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE SIGLAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo Geral.....	5
2.2 Objetivos Específicos.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Conceito de Espécie Invasora.....	6
3.1.1 Bioincrustação.....	7
3.2 O molusco Mexilhão Dourado.....	9
3.2.1 Modo de vida e fenômeno de adesão do Mexilhão Dourado.....	13
3.3 Descrição de moléculas bioativas (lipídios e metabólitos secundários).....	16
3.3.1 Moluscos.....	18
3.4 Usina Hidroelétrica de Volta Grande.....	24
3.5 Métodos de extração sólido-líquido utilizados.....	27
3.5.1 Extração por Maceração.....	27
3.5.2 Extração pelo método de Soxhlet.....	27
3.5.3 Solvente utilizado: Metanol.....	30
3.6 Técnica de Cromatografia.....	32
3.6.1 CG-EM.....	35
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	39
4.1 Materiais.....	39
4.2 Métodos.....	40
4.2.1 Obtenção de espécimes de <i>Limnoperna fortunei</i>	40
4.2.2 Extração pelo Método de Maceração.....	42
4.2.3 Extração pelo Método de Soxhlet.....	44
4.2.4 Concentração dos extratos – Evaporação rotativa (Rotavapor).....	45
4.2.5 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Extração pelo método de maceração.....	49
5.2 Extração pelo método de Soxhlet.....	50
5.3 Análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) dos extratos obtidos.....	52

5.4	Identificação de moléculas bioativas	64
6	CONCLUSÕES	72
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
	REFERÊNCIAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Espécimes de <i>Limnoperna fortunei</i> encontrados na bacia do rio São Francisco. ..	9
Figura 3.2 - Espécimes de mexilhão dourado.	11
Figura 3.3 - Usinas Hidrelétricas brasileiras com registros de ocorrência (...)	13
Figura 3.4 - A) Mexilhão dourado aderido em lâmina de vidro (B) Esquema de um fio de bisso e placa (...)	15
Figura 3.5 - Representação esquemática de uma extração com Soxhlet.....	28
Figura 3.6 - Representação de um cromatógrafo de fase gasosa	34
Figura 4.1 - A) Medidor multiparâmetro - AK88 Akso e B) Turbidímetro Digital - TU430 Akso.....	41
Figura 4.2 - A) local de coleta, B) exemplares de mexilhões, C) sacolas de pano com mexilhões dentro e D) local de aclimatização dos mexilhões coletados.....	42
Figura 4.3 - Amostra no agitador	43
Figura 4.4 - Papel filtro com os mexilhões	44
Figura 4.5 - Desenho esquemático de um Rotavapor.....	45
Figura 5.1 - Resultado das extrações.....	50
Figura 5.2 - Extração com Soxhlet.....	51
Figura 5.3 - Cromatograma via extração por maceração	53
Figura 5.4 - Cromatograma via extração por Soxhlet	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Datas e locais de registro da presença do mexilhão dourado na América (...)	12
Tabela 5.1 - Resultados obtidos depois da leitura do cromatograma.....	54
Tabela 5.2 - Quantidade de compostos em relação a sua classificação química	63

LISTA DE SIGLAS

AA - Ácido araquidônico

ALA - Alfa-linolênico

AGE - Ácidos graxos essenciais

AMPs - Peptídeos antimicrobianos

Aneel - Agência Nacional de Energia Elétrica

CBEIH - Centro de Bioengenharia de Espécies Invasoras de Hidrelétricas

CEMIG - Companhia de Energia de Minas Gerais

CG - Cromatografia gasosa

CG/EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

DBOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

DC - Corrente contínua

DEFIS - Laboratório de difração de raios X e crescimento de cristais do departamento de física

DEQUI - Departamento de química

DHA – Ácido Docosahexaenóico

EE - Ésteres etílicos

ELA - Esclerose lateral amiotrófica

EM - Espectrometria de massa

ENS - Sistema nervoso entérico

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

FDA - Food and Drug Administration

Hcs - Hemocianinas

HCL - Ácido clorídrico

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICEB - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

IE - Ionização eletrônica

LA - Ácido linoleico

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MIS - Monitoramento de íons selecionados

MPI - Método da padronização interna

MTC - Medicina Tradicional Chinesa

m/z - Massa-carga

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PI - Padrão interno

PL - Fosfolipídios

PSs - Fitosteróis

psu - Unidades Práticas de Salinidade

PUFAs - Ácidos graxos poliinsaturados

RF - Radiofrequência

RT - Tempo de retenção

TB - Tuberculose

TG - Triacilglicerol

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

USP - Universidade de São Paulo

ω -3 - ômega-3

ω -6 - ômega-6

RESUMO

O mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* é um bivalve de água doce, originário do sudeste asiático e teve sua primeira aparição registrada na América em 1991. A biodiversidade de organismos no ecossistema marinho tem motivado pesquisadores a descobrir muitos produtos naturais marinhos que podem vir a ser desenvolvidos em fármacos. Entre os organismos marinhos, invertebrados como ascídias, esponjas, moluscos e briozoários representam a principal fonte de extratos orgânicos com bioatividades significativas. Considerando a escassez de estudos com moluscos de água doce para obtenção de moléculas bioativas e a necessidade de avanço do conhecimento acerca da biotecnologia e da bioprospecção, base fundamental inclusive para a exploração desse tipo de recurso, esta linha de pesquisa tem como objetivo obter e caracterizar extratos brutos do molusco *Limnoperna fortunei* – mexilhão dourado e analisar possíveis ações antibacteriana, antifúngico, anti-incrustante e farmacológicas. Nesse âmbito, a primeira etapa do trabalho, espécimes de mexilhões vivos foram coletados na estação ambiental de hidrobiologia e piscicultura do reservatório da Hidrelétrica de Volta Grande localizada no município de Conceição das Alagoas - MG. A segunda etapa consistiu na obtenção do extrato bruto utilizando os métodos de extrações por maceração e Soxhlet. Finalizando, os resultados foram obtidos utilizando o equipamento de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, onde 98 compostos foram identificados. Caracterizados como aminas, aldeídos, ácidos carboxílicos, álcoois, haletos orgânicos, hidrocarbonetos, fenóis e ésteres. As moléculas bioativas identificadas com esses métodos são um primeiro passo de grande valia para a linha de pesquisa que, almeja em um segundo momento caracterizar de forma detalhada as funções desses produtos naturais bioativos visando o conhecimento desse molusco, podendo contribuir para seu monitoramento e possíveis utilizações em campos diversos.

Palavras-chave: *Limnoperna fortunei*, fármacos, extratos, substâncias.

ABSTRACT

The golden mussel *Limnoperna fortunei* is a freshwater bivalve, originally from Southeast Asia and had its first appearance in America in 1991. The biodiversity of organisms in the marine ecosystem has motivated researchers to discover many marine natural products that can be developed into pharmaceuticals. Among marine organisms, invertebrates such as sea squirts, sponges, molluscs and bryozoans represent the main source of organic extracts with significant bioactivities. Considering the scarcity of studies with freshwater molluscs to obtain bioactive molecules and the need to advance knowledge about biotechnology and bioprospecting, a fundamental basis even for the exploitation of this type of resource, this line of research aims to obtain and characterize crude extracts of the mollusc *Limnoperna fortunei* – golden mussel and to analyze possible antibacterial, antifungal, antifouling and pharmacological actions. In this context, the first stage of the work, specimens of live mussels were collected at the environmental station of hydrobiology and fish farming of the Volta Grande Hydroelectric reservoir located in the municipality of Conceição das Alagoas - MG. The second step consisted in obtaining the crude extract using the methods of extraction by maceration and Soxhlet. Finally, the results were obtained using gas chromatography equipment coupled to mass spectrometry, where 98 compounds were identified. Characterized as amines, aldehydes, carboxylic acids, alcohols, organic halides, hydrocarbons, phenols and esters. The bioactive molecules identified with these methods are a first step of great value for our line of research, which, in a second moment, aims to further characterize the functions of these bioactive natural products, aiming at the knowledge of this mollusk, being able to contribute to its monitoring and possible uses. in different fields.

Keywords: *Limnoperna fortunei*, pharmaceuticals, extracts, substances.

1 INTRODUÇÃO

O *Limnoperna fortunei* é um molusco bivalve de água doce epifaunal, filtrador, gregário, com larvas planctônicas, vida curta, crescimento rápido, maturidade sexual precoce e alta fecundidade. É nativo de rios e riachos na China e no Sudeste Asiático. Foi registrado pela primeira vez na América em 1991 ao longo da praia argentina de Bagliardi, na margem sul do estuário do Rio da Prata. Darrigran e Pastorino (1993) sugeriram que a introdução não intencional desta espécie na área foi através da água de lastro de embarcações oceânicas (DARRIGRAN & PASTORINO, 1993).

As invasões biológicas estão entre os piores problemas ecológicos da atualidade, considerados pela União Internacional de Conservação da Natureza, a segunda maior fonte de perda da biodiversidade no planeta. No Brasil, entre muitas espécies invasoras, encontra-se o mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). Desde sua chegada à América do Sul, tem causado sérios prejuízos aos ecossistemas e às atividades ligadas ao tratamento de água e produção de hidroeletricidade (Itaipu, 2016).

Calcula-se que a incrustação de mexilhão dourado, espécie invasora sem predadores naturais no Brasil, afete cerca de 40% dos empreendimentos de geração hidrelétrica brasileira, segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) (Plano Nacional de Prevenção, Monitoramento e Controle do Mexilhão-Dourado, 2019). Os custos para os processos de manutenção relacionadas às infestações variam de R\$ 220 mil a R\$ 1,4 milhões anuais para cada uma das usinas afetadas pela presença desse molusco, além de impactos negativos à biodiversidade nativa, prejuízos à pesca, problemas para o setor de saneamento. Uma usina de pequeno porte afetada pelo mexilhão dourado pode ter prejuízo de aproximadamente R\$ 40 mil a cada dia de paralisação para a retirada do espécime das tubulações e turbinas geradoras de energia (CTG BRASIL, s.d.).

Os denominados produtos naturais têm funções ecológicas primárias. Algas e outros organismos marinhos produzem uma variedade vasta e diversificada de compostos orgânicos, a grande maioria dos quais não parece participar diretamente do crescimento e desenvolvimento destes organismos. Estas substâncias, tradicionalmente referidas como metabólitos secundários (CROTEAU, KUTCHAN, & LEWIS, 2000), também conhecidas como metabólitos complementares, *sensu* (SAMMARCO & COLL, 1997), costumam estar

distribuídas entre grupos taxonômicos limitados. Suas funções, muitas das quais permanecem desconhecidas, estão sendo elucidadas com maior frequência (FAULKNER, 1996) e (BLUNT, COPP, MUNRO, NORTHCOTE, & PRINSEP, 2005).

A exploração para a descoberta de produtos naturais de fontes aquáticas está sendo cada vez mais estudada devido ao seu grande potencial antifúngico, antibacteriano e anti-incrustante. A biodiversidade de organismos no ecossistema marinho tem motivado pesquisadores a descobrir muitos produtos naturais marinhos que podem vir a ser desenvolvidos em fármacos. Entre os organismos marinhos, invertebrados como ascídias, esponjas, moluscos e briozoários representam a principal fonte de extratos orgânicos com bioatividades significativas (DA GAMA, PEREIRA, et al., 2002).

As moléculas bioativas podem ser extraídas utilizando a cromatografia, que é uma técnica de separação proveniente da purificação de extratos naturais. Assim sendo técnicas modernas de triagem de extratos complexos como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas podem ser combinadas para a separação e identificação de metabólitos secundários (CORREA, BERNARDI, & GEHRKE, 2016).

O processo de extração, ou seja, a separação com solventes é geralmente empregada quando se quer isolar uma substância que se encontra dissolvida em outra substância líquida. Às vezes, a substância a isolar está misturada com um sólido insolúvel nos solventes orgânicos. Existem duas técnicas de extração: Contínua ou descontínua. Se a substância for mais solúvel no solvente orgânico do que na água, recorre-se ao método descontínuo. Caso contrário utiliza-se o método contínuo, sendo mais comum na extração sólido-líquido (TAMBUN, ALEXANDER, & GINTING, 2020). A escolha do solvente é feita a partir da facilidade de dissolução da substância e da facilidade com que se pode isolar o soluto extraído, isto é, do baixo ponto de ebulição do solvente para sua posterior evaporação (ZACHI, 2007).

A separação sólido-líquido é um método usado na separação e ou purificação dos elementos da mistura. Quando a amostra é um sólido e a fase necessária para análise é um líquido, o processo é chamado de extração sólido-líquido. Uma forma simples e amplamente aplicável de extração sólido-líquido envolve a combinação do sólido com um solvente no qual o analito é solúvel. Por agitação, o analito se divide na fase líquida, que pode então ser separada do

sólido por filtração (CHANIOTI, LIADAKIS, & TZIA, 2014). Existem diversos métodos de extração sólido-líquido, tais como o método de Soxhlet e a maceração, os quais são utilizados nesse trabalho.

Os produtos naturais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de medicamentos e programas de pesquisa, considerando sua incomparável diversidade química e novos mecanismos de ação. Eles também geralmente exibem menor toxicidade sistêmica e ambiental do que suas contrapartes farmacêuticas sintéticas (PRATA, MOGOLLON, & AUGUSTO, 2016). Os organismos marinhos representam uma fonte especialmente rica de produtos naturais estruturalmente diversos em virtude de sua vasta diversidade filogenética e condições ambientais sob as quais evoluíram. Esses compostos são evidentemente valiosos como líderes de medicamentos: até o momento, mais de 30 compostos marinhos entraram em ensaios clínicos para o desenvolvimento de medicamentos, dos quais 12 foram aprovados para uso pela Food and Drug Administration (FDA) e contrapartes internacionais (SUMMER & BROWNE, et al., 2020).

Considerando a escassez de estudos com moluscos para obtenção de moléculas bioativas e a necessidade de avanço do conhecimento acerca da biotecnologia e da bioprospecção em nosso país, base fundamental inclusive para a exploração desse tipo de recurso, esta investigação tem como objetivo obter e caracterizar extratos brutos do molusco *Limnoperna fortunei* – mexilhão dourado visando possíveis ações antibacteriana, antifúngico e anti-incrustante que possa atuar diretamente no combate de bioincrustações atenuando o grande impacto financeiro causado por esta espécie invasora.

Os produtos naturais continuam sendo uma rica fonte de novos medicamentos, e a busca por moléculas bioativas da natureza continua desempenhando um papel importante no desenvolvimento de novos medicamentos. Além disso, há um uso crescente de fitoterápicos para o tratamento de uma infinidade de doenças, e a demanda por mais evidências científicas para sua eficácia e segurança continua sendo um grande desafio.

Nos últimos anos, as atenções da pesquisa têm sido desenvolvidas para a busca de moléculas bioativas devido aos seus vários efeitos benéficos à saúde (AMORIM, LAGE-YUSTY, & LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2012). Os compostos bioativos são componentes que foram obtidos de fontes naturais ou sintéticas e são testados quanto à atividade em várias áreas terapêuticas

importantes. Compostos bioativos possuem atividade que é benéfica para a saúde, e foi demonstrado que moléculas bioativas de alimentos podem alterar a expressão gênica de um hospedeiro em nível celular, influenciando assim a saúde (MacARTAIN, GILL, BROOKS, CAMPBELL, & ROWLAND, 2007).

Almeja-se a capacidade de detecção e caracterização de novos produtos naturais bioativos, concomitantemente à redução dos custos e tempo para obtenção destas moléculas. Para isto, é necessário inovar nos processos e nas tecnologias aplicadas à descoberta de fármacos a partir de produtos naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter e caracterizar o extrato bruto do molusco *Limnoperna fortunei* – mexilhão dourado utilizando o solvente metanol e as técnicas de maceração e soxhlet, visando a identificação química das moléculas pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

2.2 Objetivos Específicos

- Obter o extrato bruto do *Limnoperna fortunei* a temperatura ambiente pelo método de maceração.
- Obter o extrato bruto metanólico do *Limnoperna fortunei* pelo método de Soxhlet.
- Utilizar a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) para identificar os componentes do extrato bruto.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Conceito de Espécie Invasora

Espécies invasoras são organismos que, retirados do seu habitat natural, são inseridos em novos ambientes e devido às condições ambientais favoráveis, como: ausência de predadores naturais, temperatura adequada, disponibilidade de nutrientes, se reproduzem, competindo com espécies nativas e provocando prejuízos ambientais incalculáveis (dentre os quais podemos citar a redução da biodiversidade e a possível extinção de espécies nativas e/ou endêmicas), além de sérios prejuízos econômicos (DARRIGRAN & EZCURRA DE DRAGO, 2000).

Para ser chamada de espécie invasora, ela deve possuir algumas características, tais como ser abundante e amplamente distribuída em sua área de ocorrência natural, ter ampla tolerância ambiental, alta variabilidade genética, ciclo de vida curto, rápido crescimento, maturidade sexual precoce, alta capacidade reprodutiva e alimentação oportunista, para estabelecer-se em um novo ambiente (RICCIARD & RASMUSSEN, 1998). Parker et al (1999) dividiu em 5 partes os impactos causados por uma espécie invasora, são eles: 1) efeitos sobre os indivíduos, alterando as taxas de mortalidade e crescimento; 2) efeitos genéticos, podendo ocorrer até mesmo hibridização entre a espécie nativa e a invasora; 3) efeitos na dinâmica populacional, alterando o crescimento e abundância das populações, e em casos mais extremos podendo levar à extinção; 4) efeitos sobre as comunidades, influenciando na riqueza de espécies, diversidade e estrutura trófica; 5) efeitos nos ecossistemas, modificando a disponibilidade de nutrientes e a produtividade primária. Entre os organismos invasores que afetam as águas continentais se destacam os crustáceos, macrófitas, microrganismos, peixes e moluscos (PARKER, et al., 1999).

Atualmente, nos territórios de água doce do Brasil, temos espécies invasoras de moluscos tanto do grupo dos gastrópodes, como: *Physa acuta*, *Melanoides tuberculata*, *Helisoma duryi* e *Helisoma trivolvis*; quanto dos bivalves: *Corbicula fluminea*, *Corbicula largillierti*, *Corbicula fluminalis*, *Corbicula sp.* e *Limnoperna fortunei* (SANTOS S. B., 2012).

Nos rios brasileiros, esse invasor, vindo de navios transoceânicos, consome grande parte dos alimentos de mexilhões nativos – contribuindo para a sua extinção. Ele também contribui para

a mortandade de peixes que não conseguem digeri-los e de animais como lagostas e outros moluscos, já que os mexilhões grudam em suas superfícies e os impedem de se locomover, defender e ou até de se alimentar.

3.1.1 Bioincrustação

A bioincrustação marinha é vista como um processo resultante da colonização ou crescimento de bactérias, algas e/ou invertebrados sésseis sob superfícies submersas, sejam elas naturais (como rochas, madeiras, outros organismos, etc.) ou feita pelo homem (como cais, plataformas, cascos de navios, cabos, etc.) (DA GAMA, PEREIRA, & COUTINHO, 2009).

Apesar de ser um processo natural, a bioincrustação, quando desenvolvida sobre estruturas feitas pelo homem, acarreta uma série de transtornos e prejuízos a atividades marítimas, levando à visão negativa intrínseca ao próprio nome - *fouling* em inglês significa, além de incrustação, sujeira. Estima-se que, em escala global, sejam gastos pelo menos 450 milhões de dólares ao ano com a prevenção da bioincrustação, e que se este montante não fosse gasto, os prejuízos anuais seriam da ordem de 7 bilhões de dólares/ano. Os problemas derivados da incrustação estão diretamente relacionados ao tipo de estrutura em questão (DA GAMA, PEREIRA, & COUTINHO, 2009).

A primeira fase do processo de bioincrustação constitui na adesão de moléculas sobre uma superfície submersa. Em questão de minutos a superfície adsorve um filme molecular composto por material orgânico dissolvido. Dentro de horas ocorre a segunda fase caracterizada pelo surgimento de micro-organismos. Esses primeiros colonizadores formam um biofilme: um conjunto de células unidas por vezes classificado como micro incrustação (CALLOW & CALLOW, 2002).

A terceira fase ocorre durante duas ou três semanas, e é caracterizada pelo surgimento de uma comunidade biológica formadora de biofilmes capazes de promover a colonização de zoósporos de macroalgas e larvas de macro-organismos, moluscos, ascídias, crustáceos, e poliquetas que acabam formando a incrustação macroscópica (MARTÍN-RODRÍGUEZ, 2015).

A intensificação do comércio marítimo tem aumentado significativamente o intercâmbio de espécies exóticas invasoras, sendo que a principal via de introdução dessas espécies nos portos de todo o mundo é a descarga de água de lastro (SILVA, FERNANDES, SOUZA, LARSEN, & DANELON, 2004), que é um dos muitos vetores de transferência de espécies ao redor do mundo. A água de lastro é o líquido recolhido aos porões dos navios na origem e despejado no destino para dar estabilidade, propulsão e permitir o gerenciamento de manobras dos barcos. Navios são projetados para navegar com seus cascos submersos até certo nível na água. Se um navio não está com sua capacidade de carga completa, necessita encher seus tanques de lastro com água para manter um calado apropriado e estabilidade durante sua viagem. Qualquer volume sólido ou líquido colocado em um navio para garantir sua estabilidade e condições de flutuação é definido como lastro. Diversas espécies de água doce podem ser transportadas e introduzidas em um novo ambiente através do oceano em tanques de água de lastro de navios. É o caso do molusco bivalve invasor, conhecido como mexilhão dourado .

Na figura 3.1, está disposta os espécimes de *Limnoperna fortunei* encontrados na Bacia do Rio São Francisco, onde 1) Larva identificada no reservatório de Sobradinho, BA. 2) Indivíduos coletados nos condensadores da usina hidrelétrica de Sobradinho. 3) Indivíduos coletados em tanques de piscicultura no reservatório de Sobradinho. 4) Indivíduo encontrado no trecho inicial do canal de transposição do Rio São Francisco.

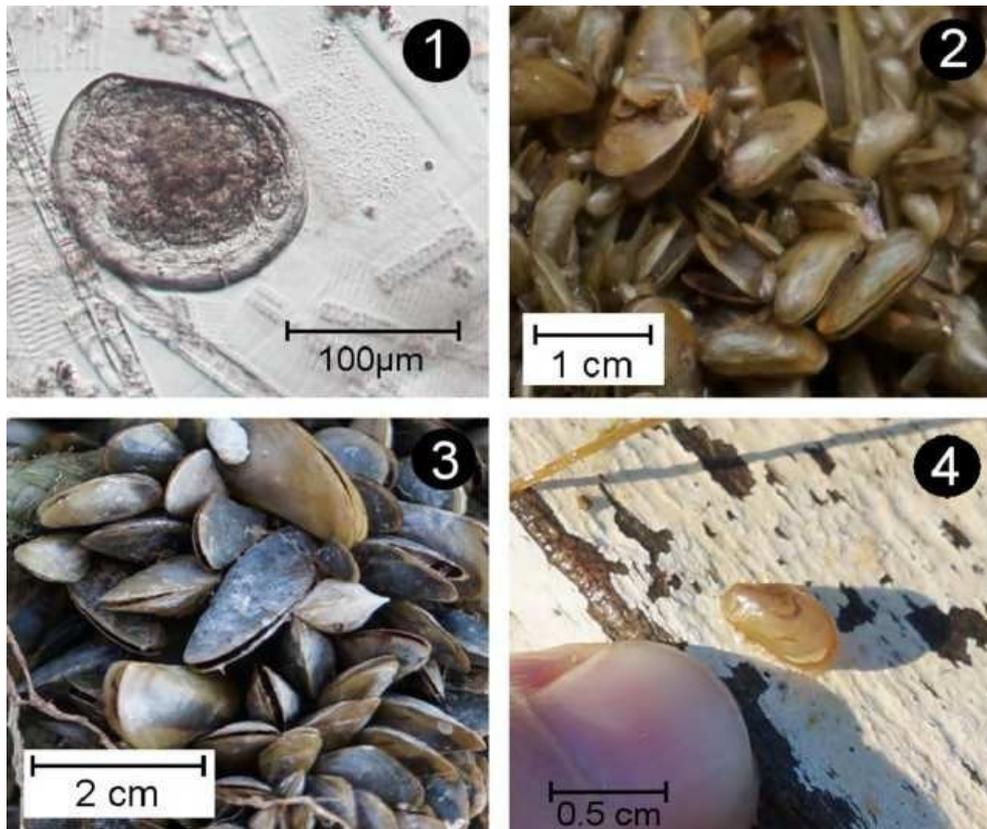


Figura 3.1 - Espécimes de *Limnoperna fortunei* encontrados na bacia do rio São Francisco (BARBOSA, et al., 2018)

3.2 O molusco Mexilhão Dourado

Mollusca representa o segundo filo mais rico em espécies com uma estimativa de 150.000-200.000 espécies existentes divididas em oito classes. Os moluscos se diversificaram para ocupar quase todos os ecossistemas da Terra, de desertos áridos a regiões alpinas, mas a maioria ocorre no mar, onde representam cerca de um quarto de todas as espécies conhecidas. Essa vasta diversidade biológica proporciona aos *Mollusca* uma rica diversidade química. Independente da presença de uma concha, todos os moluscos são essencialmente de corpo mole e carecem de sistemas imunológicos adaptativos com mecanismos de proteção mediados por células específicas de antígenos. Muitos também são lentos ou sésseis e, portanto, aparentemente predispostos à formação de biofilme. Os moluscos podem, portanto, ser vulneráveis à infecção, mas residem em coexistência íntima com micróbios patogênicos. A sobrevivência e o sucesso dos moluscos em ambientes microbianos ricos são atribuídos a defesas químicas robustas e componentes imunes humorais inatos, incluindo hemocianinas (Hcs) e peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os moluscos também demonstraram usar meios químicos de comunicação, interação predador-presa e

comportamento, demonstrando ainda mais sua química funcional diversificada (SUMMER & BROWNE, et al., 2020).

O molusco *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) é um bivalve de água doce, originário do sudeste asiático (MORTON, 1975). Em seu hábitat de origem, a bacia do Rio Yang Tsé, na China, essa espécie aquática compete por nutrientes com outros organismos e ainda sofre predação e ação de parasitas. Assim, as suas populações se encontram relativamente controladas nessa região. Entretanto, ao ser inserido em outras bacias hidrográficas, a sua elevada capacidade de reprodução faz desse organismo um excelente invasor. Na década de 1960, o pequeno molusco já havia se estabelecido em diversas regiões do Japão, Taiwan e Hong Kong, causando vários prejuízos ambientais e econômicos, entre eles a introdução de parasitas de peixes (BRUGNOLI, CLEMENTE, BOCCARDI, BORTHAGARAY, & SCARABINO, 2005).

Este pequeno molusco (aproximadamente ~ 2 - 5 cm), popularmente conhecido como mexilhão dourado (Figura 3.2), teve sua ocorrência relatada na América do Sul pela primeira vez em 1991, no estuário do rio da Prata, Argentina (DARRIGRAN & PASTORINO, 1993). No Brasil, o mexilhão dourado já foi detectado na região do Pantanal Sul-Matogrossense, em 1998 (OLIVEIRA & TAKEDA, at all.,2000), na Usina Hidrelétrica de Itaipu, Foz do Iguaçu (PR), em 2001, causando o entupimento de tubulações e sistemas de arrefecimento (PESTANA & OSTRENSKY, at all., 2010) e no lago Guaíba (RS), em 1999 (MANSUR, RICHINITTI, & SANTOS, 1999). As populações de mexilhão dourado se dispersaram a uma velocidade de aproximadamente 240 quilômetros anuais continente adentro, apenas entre os anos de 1991 e 1998, até chegar ao Brasil (DARRIGRAN & EZCURRA DE DRAGO, 2000).



Figura 3.2 - Espécimes de mexilhão dourado (Autora).

Desde então a proliferação do organismo seguiu uma rota que pode ser observada na Tabela 3.1. Chegando na região do Triângulo Mineiro em torno de 2011. Até o ano de 2014 as áreas invadidas por *L. fortunei* foram principalmente restritas a grandes rios da bacia do Paraná, no centro-sul do Brasil, e para algumas áreas da bacia do Atlântico Sudeste. No entanto, em 2015, a sua presença foi relatada a 1500 km ao norte das áreas invadidas, no reservatório de Sobradinho, no rio São Francisco e (ALMEIDA & BARBOSA, et al., 2016).

Tabela 3.1 - Datas e locais de registro da presença do mexilhão dourado na América do Sul (OLIVEIRA & FERREIRA, 2004),

Ano	Local de aparecimento do mexilhão dourado
1991	Rio da Prata, Buenos Aires, Argentina.
1994	Primeira ocorrência no Uruguai.
1995	Rio Paraná, Usina Hidrelétrica de Yacyretá, Argentina/Paraguai.
1998	Porto de Assunção, Paraguai. Bacia do Alto Paraguai, Corumbá, MS, Brasil.
1999	Bacia do Guaíba, Porto Alegre, RS, Brasil.
2001	Usina Hidrelétrica de Itaipu, Paraguai/Brasil.
2002	Usina hidrelétrica de Porto Primavera, SP/MS, Brasil.
2003-2004	Rio Paraná até na foz com o rio Paranaíba, incluindo as usinas de Porto Primavera, Jupiá e Ilha Solteira, Brasil.

Por meio de compilação bibliográfica e da base de dados do Centro de Bioengenharia de Espécies Invasoras de Hidrelétricas - CBEIH (base.cbeih.org), até o momento foram encontrados registros do mexilhão-dourado em 50 reservatórios (Figura 3.3), sendo sete distribuídos ao longo do trecho do alto rio Jacuí (RS), um no rio Canoas (SC), um no rio Pelotas (SC/RS), três no rio Uruguai (SC/RS), cinco no rio Iguaçu (PR), dois no rio Jordão (PR), um no Tibagi (PR), sete no Paranapanema (SP/PR), seis no Tietê (SP), quatro no Paraná (PR, SP/MS, MS/SP e SP), nove no Grande (sete em SP/MG e um em MG), dois no Paranaíba (MG), um no rio Claro (GO) e um no rio São Francisco (BA) (Plano Nacional de Prevenção, Monitoramento e Controle do Mexilhão-Dourado, 2019).



Figura 3.3 - Usinas Hidrelétricas brasileiras com registros de ocorrência do mexilhão-dourado (CBEIH, 2020)

3.2.1 Modo de vida e fenômeno de adesão do Mexilhão Dourado

Após se estabelecerem, as minúsculas larvas do mexilhão dourado se dispersam rapidamente pela água e a sua invasão também é potencializada por atividades humanas, tais como a pesca e o transporte fluvial, que transportam ativamente essas larvas e, também as colônias incrustantes de mexilhões adultos. A ausência de grandes predadores e parasitas, por exemplo, oferece uma vantagem considerável ao mexilhão-dourado, em comparação com as espécies nativas de moluscos e crustáceos.

O mexilhão dourado possui uma concha nacarada, composta por aproximadamente 95% de matriz mineral. Os indivíduos podem chegar a 5 centímetros de comprimento, mas já são capazes de se reproduzir com apenas 0,5 centímetro, atingindo populações extremamente densas de até 200 mil indivíduos por metro quadrado, aderidos ao substrato e uns sobre os outros, em gerações consecutivas (ALMEIDA & BARBOSA, et al., 2016). Esse pequeno molusco adere a praticamente qualquer substrato sólido, inclusive vidros, PET, teflon, madeira, concreto, etc. No processo de sondagem, o mexilhão dourado se utiliza de um pé muscular, órgão com funções táteis e locomotoras, capaz de sondar o substrato e, em seguida, inicia a ancoragem por meio de fios de bissos. Estes fios são estruturas fibrosas e comumente dividida em três regiões: proximal, distal e placa adesiva, conforme pode ser visto em esquema da Figura 3.4 (WIEGEMANN, 2005). A região proximal se encontra junto à concha do bivalve surge a partir de um ramo central ligado ao músculo retrator interno, que possui aspecto rugoso. A região distal é completamente externa à concha e possui aspecto liso.

Ligada à região distal encontra-se a placa adesiva, responsável pela aderência a diversos materiais (VACCARO & WAITE, 2001). A região proximal é mais elástica que a região distal e esta diferença estrutural é ideal para o organismo se adaptar em ambiente onde deverá absorver impactos e movimento das águas (WIEGEMANN, 2005). A região proximal se encontra junto à concha do bivalve surge a partir de um ramo central ligado ao músculo retrator interno, que possui aspecto rugoso. A região distal é completamente externa à concha e possui aspecto liso.

Ligada à região distal encontra-se a placa adesiva, responsável pela aderência a diversos materiais (VACCARO & WAITE, 2001). A região proximal é mais elástica que a região distal e esta diferença estrutural é ideal para o organismo se adaptar em ambiente onde deverá absorver impactos e movimento das águas (WIEGEMANN, 2005).

Na Figura 3.4, vemos: A) Mexilhão dourado aderido em lâmina de vidro, os fios de bissos podem ser visualizados em processo de estiramento (B) Esquema de um fio de bisso e placa adesiva (a) região proximal, (b) região distal, (c) placa adesiva.

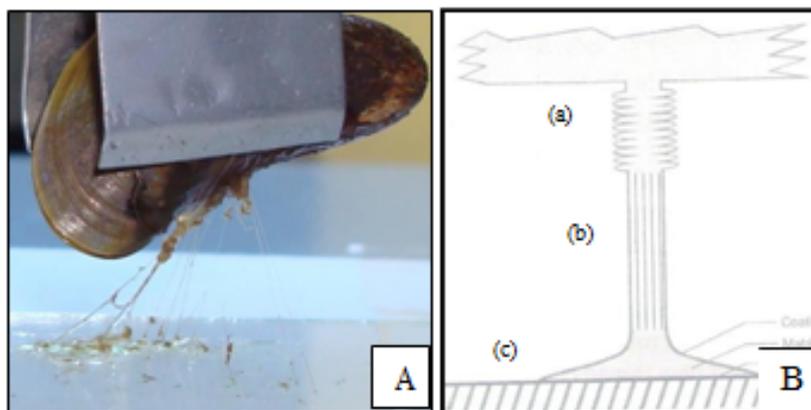


Figura 3.4 - A) Mexilhão dourado aderido em lâmina de vidro (B) Esquema de um fio de bisso e placa adesiva (DUARTE, 2012)

Segundo Crisp et al, (1985) os mexilhões podem se movimentar, e quando isto acontece os fios de bisso são rompidos e regenerados em outro local. Os mexilhões mais jovens apresentam alta atividade. À medida que os mexilhões crescem, perdem a mobilidade e acima de aproximadamente 28 mm de comprimento não podem mais se mover sobre o substrato (CRISP, WALKER, YOUNG, & YULE, et. al., 1985).

Os espaços existentes entre os indivíduos maiores são preenchidos por indivíduos de tamanhos medianos e as frestas restantes pelos menores. O aglomerado torna-se uma estrutura muito compacta, que dificilmente pode ser removida ou capturada por outros organismos (SANTOS, MANSUR, & WURDIG, 2008). Segundo Morton (1975) nos ambientes mais calmos os fios de bisso são mais fracos e em pequeno número. Assim o animal pode facilmente descolar-se do substrato e procurar por um local melhor. Nas águas correntes, ele dispende mais energia construindo um forte aparelho bissal, formando um aglomerado fortemente aderido ao substrato (MORTON, 1975). Geralmente encontrado em locais de águas oxigenadas, capaz de sobreviver com sucesso em águas salinas em até 3 psu (Unidades Práticas de Salinidade) (DARRIGRAN, 2002), lagos, áreas úmidas e outros cursos d'água.

Darrigran e Damborenea (2009) descreveram algumas características que se aplicam ao bivalve *Limnoperna fortunei*: curto período de vida (dois – três anos), rápido crescimento individual, rápida maturação sexual, dióico (sexos separados), gametogênese constante com alta fecundidade, propiciando alta disponibilidade de larvas (2 a 3 picos anuais) e constante assentamento, euritópicos (coloniza diferentes habitats), eurióicos (alta tolerância fisiológica), comportamento de agregação, associação a alguma atividade humana (transporte aquaviário),

ampla variabilidade genética etc. A fecundação ocorre externamente dando origem a uma larva nadante de vida livre que coloniza novos lugares. O ciclo reprodutivo do *L. fortunei* apresenta duas fases, sendo, uma fase larvária planctônica e uma juvenil/adulta. Os gametas masculinos e femininos são liberados na água onde é realizada a fecundação (DARRIGRAN & DAMBORENEA, 2009).

Matsui et al (2001) relaciona a força máxima de tração para retirada do mexilhão dourado de materiais com natureza química e energia superficial diferentes, e afirma que o mexilhão dourado adere mais fortemente em superfícies polares, tais como vidro, e adere com menor intensidade em superfícies apolares, tais como silicone (MATSUI & NAGAYA, et al., 2001)

3.3 Descrição de moléculas bioativas (lipídios e metabólitos secundários)

Substâncias bioativas são moléculas orgânicas de baixa massa molecular que apresentam uma ampla diversidade química e efeitos diversos sobre organismos vivos, sendo associadas às mudanças em seu comportamento, fisiologia ou metabolismo (BENKENDORFF, 2014).

Moléculas bioativas são provenientes da purificação de extratos naturais por meio das técnicas de separação, como a cromatografia. O estudo fitoquímico dessas moléculas vem se desenvolvendo devido ao potencial farmacológico, representando dessa maneira uma alternativa as terapias convencionais. O estudo do potencial medicinal se deu com a gigantesca riqueza da flora e fauna brasileira, o que se demonstrou um grande potencial na pesquisa científica em busca de moléculas bioativas (ALVES & ALVES, 2011).

Os compostos bioativos são moléculas de origem sintética ou natural que são estudadas quanto as suas atividades biológicas e contribuem para importantes descobertas em diversas áreas terapêuticas. Esses compostos podem ser oriundos do metabolismo primário ou secundário. Os metabólitos podem ser utilizados nas indústrias para desenvolver vacinas, antibióticos, isolar produtos químicos para síntese orgânica e obter aminoácidos .

Os metabólitos primários são aqueles considerados imprescindíveis à vida, ao crescimento, ao desenvolvimento e reprodução de um organismo. Entre eles estão os ácidos nucleicos, nucleotídeos, proteínas, aminoácidos, lipídios e carboidratos (PRATA, MOGOLLON, & AUGUSTO, 2016).

Os lipídios não são apenas constituintes das membranas celulares, mas também mediadores-chave de sinalização, agindo assim como lipídios bioativos. Entre os papéis proeminentes exercidos pelos lipídios bioativos estão a regulação imunológica, inflamação e manutenção da homeostase. Evidências acumuladas indicam a existência de uma relação bidirecional entre os sistemas imunológico e nervoso, em que os mediadores inflamatórios podem modular diretamente as emoções que, por sua vez, podem influenciar fortemente as respostas imunes, afetando a saúde. Em conclusão, os lipídios bioativos parecem ser promissores não apenas para uma melhor compreensão dos processos comportamentais básicos, mas também para futuras intervenções terapêuticas capazes de combater suas disfunções e, portanto, curar ou retardar distúrbios afetivos (ABOT, et al., 2021).

Os denominados produtos naturais têm funções ecológicas primárias. Algas e outros organismos marinhos produzem uma variedade vasta e diversificada de compostos orgânicos, a grande maioria dos quais não parece participar diretamente do crescimento e desenvolvimento destes organismos. Estas substâncias, tradicionalmente referidas como metabólitos secundários (CROTEAU, KUTCHAN, & LEWIS, 2000). Dentre as inúmeras classes de metabólitos secundários com grande potencial farmacológico estão os alcaloides, flavonoides e as cumarinas (BEZERRA, VIEIRA, & BARBOSA-FILHO, 2006). A busca por substâncias além das já descobertas se dá com a necessidade de aumentar a eficiências de quimioterapias de combate ao câncer a fim de diminuir efeitos colaterais e ter uma maior eficiência no tratamento.

Os metabólitos secundários, ou comumente chamados de produtos naturais, são os compostos orgânicos produzidos por vários organismos que não estão diretamente envolvidos no crescimento, desenvolvimento ou reprodução do organismo, mas são essenciais nas atividades ecológicas e outras. Alguns são específicos de uma espécie e só são encontrados nelas, mas a transferência horizontal desses metabólitos entre espécies tem desempenhado um papel importante na evolução de alguns organismos. Embora não sejam importantes para a sobrevivência, eles podem ser importantes para outras atividades como proteção, competição e interação de espécies. A maioria dos metabólitos secundários tende a atuar como um mecanismo de defesa contra vários invasores estranhos. Estes são produzidos em quantidades menores e são difíceis de extrair. Algumas categorias de metabólitos secundários têm sido utilizadas em diversos procedimentos biotecnológicos para a formação de fármacos e outros

compostos. Alguns exemplos incluem esteróides, óleos essenciais, fenólicos, alcalóides, pigmentos, antibióticos, etc (DATTA, 2015).

O que é oferecido na utilização de produtos naturais tem a ver com o fato de que as exigências do mercado tendem a observar, cada vez mais, as consequências do uso e a diminuição dos impactos produzidos em qualquer processo.

A biodiversidade de organismos no ecossistema marinho tem motivado pesquisadores a descobrir muitos produtos naturais marinhos que podem vir a ser usado devido ao seu grande potencial antifúngico, antibacteriano, anti-incrustante e podem vir a ser desenvolvidos em terapias. Entre os organismos marinhos, invertebrados como ascídias, esponjas, moluscos e briozoários são considerados mais propensos a obtenção de moléculas bioativas (DA GAMA, PEREIRA, et al., 2002).

3.3.1 Moléculas bioativas em Moluscos

A investigação química de moluscos levou ao isolamento de uma grande variedade de metabólitos primários e secundários bioativos. Estes podem ser sintetizados pelos próprios moluscos, acumulados a partir de fontes alimentares ou produzidos por simbioses. Benkendorff (2014) estabeleceu que, até 2014, mais de 1.145 compostos foram isolados de moluscos marinhos, incluindo peptídeos, esteróis, terpenos, polipropionatos, macrolídeos, derivados de ácidos graxos, compostos nitrogenados e alcalóides (BENKENDORFF, 2014). Desde então, 145 compostos de moluscos adicionais foram documentados em relatórios anuais de produtos naturais marinhos cobrindo os anos de 2014 a 2018 (SUMMER & BROWNE, et al., 2020).

Investigações guiadas por bioensaios e modelos *in vivo* demonstraram as propriedades de extratos de moluscos e componentes purificados com ação antimicrobiana (DOLASHKA, et al., 2016), anticancerígena (ESMAEELIAN, BENKERNDORFF, LE LEU, & ABBOTT, 2018), anti-inflamatória (AHMAD & LIU, et al., 2018), antiespasmódica (SERGYSELS & ART, 2001), bloqueio neuromuscular (ERSPAMER & GLASSER, 1957), cicatrização de feridas (BADIU, LUQUE, DUMITRESCU, CRACIUN, & DINCA, 2010) e imunogênica (GESHEVA, et al., 2015). Atualmente, pelo menos 19 compostos de origem dos moluscos fazem parte do pipeline clínico farmacêutico marinho global e quatro são agora aprovados

pela Food and Drug Administration (FDA) (MAYER), incluindo o poderoso analgésico Ziconotida derivado do veneno de *Conus magus*, um caracol de cone carnívoro, e três derivados da dolastatina originários do tecido da lebre do mar *Dolabella auricularia*: Brentuximab vedotin e Polatuzumab vedotin para o tratamento de cânceres hematológicos (por exemplo, linfoma de Hodgkins) e Enfortumab vedotin para câncer urotérico. No entanto, mais da metade dos metabólitos secundários de moluscos conhecidos nunca foram rastreados quanto à bioatividade potencial, muito menos em estudos in vivo ou ensaios clínicos, e <1% das espécies de moluscos foram investigadas (BENKENDORFF, 2014). De fato, o potencial terapêutico dos produtos naturais derivados desse filo é enorme.

A aplisistatina é um metabólito antileucêmico bem conhecido da lebre marinha *Aplysia angasi* (HOYE, CARUSO, DELLARIA, & KURTH, 1982). Os metabólitos de *Aplysia dactylomela* foram relatados como atividade citotóxica e antitumoral *in vivo* (SCHMITZ, BOWDEN, & TOTH, 1993). A espécie de molusco *Dolabella auricularia* tem sido relatada por produzir vários compostos antineoplásicos e citotóxicos denominados dolastatinas (LUESCH, HARRIGAN, GOETZ, & HORGAN, 2002).

O composto bioativo, Zinconitide, isolado de um caracol, *Conus magnus*, é licenciado pela Elan Pharmaceuticals sob o nome Prialt e é usado para tratamento intratraqueal para dor crônica. Dollastains são compostos antitumorais altamente ativos isolados de uma lesma do mar. Em alguns casos, compostos potencialmente interessantes foram isolados de moluscos, um composto inibidor do vírus HIV do mexilhão verde *Perna viridis* foi estudado e patentado. Kelletin-I e II isoladas de moluscos marinhos, *Kelletia kelletii* inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis* e células leucêmicas L1 como agentes antibacterianos e anticancerígenos. (DATTA, 2015).

Sivasubramanian et al. (2011) estudaram novos compostos bioativos do molusco marinho *Melo melo*. Segundo eles, as atividades antibacterianas foram registradas como zona máxima de inibição contra a cepa de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) do extrato de muco e zona mínima de inibição na cepa de *Salmonella typhi* (*S. typhi*) do extrato de tecido corporal. Foram observadas as atividades antifúngicas dos extratos para atividade máxima contra *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*) e atividade mínima em *Aspergillus flavus* (*A. flavus*). O extrato de muco, tecido nervoso, tecido corporal e rim que apresentou atividade antimicrobiana devido à presença dos peptídeos e grupos amida. Os extratos do

molusco marinho *M. melo* são a fonte potencial de compostos bioativos antibacterianos e antifúngicos. Também foi relatado que a secreção de tinta de espécies de moluscos foi identificada como uma das novas fontes de compostos bioativos. Os extratos de tinta aquosa de *Dollabella auricularia* inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além de *D. auricularia*, amostras de tinta de *Octopus vulgaris* e *Sepia aculeate* apresentaram atividade antifúngica (SIVASUBRANIAN, RAVICHANDRAN, & KUMARESAN, 2011).

Um número surpreendentemente grande de medicamentos tradicionais que incorporam moluscos tem sido usado para tratar doenças respiratórias em culturas em todo o mundo desde a antiguidade até o presente. Na maioria dos casos, há poucos dados para apoiar a aplicação de medicamentos tradicionais (BENKENDORFF, et al., 2015). No entanto, eles fornecem pistas úteis para a descoberta de novos compostos que podem sustentar algumas reivindicações e testes adequados podem ver sua integração nos cuidados de saúde convencionais em pelo menos uma capacidade complementar. Para ilustrar este ponto, o isolamento da efidrina da *Ephedra sinica* (Ma Huang), uma planta usada na Medicina Tradicional Chinesa (MTC) há mais de 2000 anos para tratar asma, tosse e congestão respiratória, levou à síntese do salbutamol (Ventolin) em 1969, um agonista do receptor β_2 -adrenérgico de ação rápida agora considerado a intervenção clínica de primeira linha para asma aguda (LEE, 2011).

Há evidências crescentes de que os moluscos compreendem compostos farmacologicamente ativos que podem ser otimizados para o tratamento e prevenção de doenças respiratórias (SUMMER & BROWNE, et al., 2020).

Vários temas recorrentes emergem sobre a aplicação de medicamentos tradicionais de moluscos para certas doenças respiratórias. Muitos são indicados para o tratamento da tuberculose (TB), tanto pulmonar quanto extrapulmonar. Alves et al (2011) documentaram o uso de carne e conchas de moluscos bivalves usados para tratar TB em toda a América do Sul (ALVES & ALVES, 2011); na Índia, a carne do molusco marítimo *Turbinella* sp. e o de água doce *Plia globosa* é cozida e comida (GOPAL & VIJAYAKUMARAN, et al., 2008) e decocções de numerosas espécies de moluscos marinhos ocorrem na MTC. Os medicamentos tradicionais de moluscos também são indicados para outras doenças respiratórias infecciosas, incluindo gripe, pneumonia, bronquite, sarampo, otite média e infecções gerais do trato

respiratório e estudos biomédicos têm como alvo patógenos responsáveis (SUMMER & BROWNE, et al., 2020).

A maioria dos MTCs e outros medicamentos tradicionais são aplicados em várias condições respiratórias. Por exemplo, o MTC “Yan Qiu Bei” derivado da concha decotada do búzio *Naria erosa* (Cypraeidae) é usado para tuberculose extrapulmonar, falta de ar, muco excessivo e congestão conjuntiva (GUAN & WANG, 2009), enquanto remédios indianos usando *Turbinella sp.* não são usados apenas para TB, mas também para tosse, muco excessivo, dor de garganta, febre, dor de ouvido e asma (GOPAL & VIJAYAKUMARAN, et al., 2008). Nota-se que a maioria dos MTCs e outros medicamentos tradicionais usados para doenças respiratórias são comumente usadas para outras condições não respiratórias (por exemplo, problemas ginecológicos, distúrbios gastrointestinais e doenças cardiovasculares), que podem refletir propriedades anti-inflamatórias e anti-angiotensina gerais. A carne e concha da *Crassostrea rhizophorae* foi usada na América do Sul para câncer, tuberculose, gripe e pneumonia (ALVES & ALVES, 2011), opércula do molusco muricídeo *Chicoreus virgineus* foi usada no Egito Medieval para tumores e doenças dos olhos/ouvidos (NONGMAITHEM, et al., 2017), e o MTC “Mu Li” compreendendo a carne e a concha de 12 *Ostreidae/Grypaeidae sp.* para câncer e tuberculose (GUAN & WANG, 2009).

A concha (e todo o corpo) é a parte do molusco mais frequentemente usada em medicamentos tradicionais para doenças respiratórias. Na MTC, as cascas são moídas em pó ou decotadas (aquecidas para extrair a essência) e ingeridas. Cinzas de conchas de moluscos queimadas ou ossos de chocos, preparadas em pílulas, pastas e soluções, aparecem em vários medicamentos respiratórios tradicionais originários da Índia e da Grécia Antiga; conchas também são usadas na medicina sul-americana e homeopatia. Apenas três estudos biomédicos investigaram extratos de conchas com relevância para doenças respiratórias: concha de búzio em pó (*Monetaria moneta*) (IMMANUEL, et al., 2012) e quitosana de osso de choco (*S. officianalis*) (SHANMUGAM, KATHIRESAN, & NAYAK, 2016), ambos os quais mostram propriedades antimicrobianas *in vitro*.

O corpo sem concha (ou “carne”) é a segunda parte do molusco mais utilizada em medicamentos tradicionais para doenças respiratórias de todas as naturezas. A carne pode ser cozida e comida ou aplicada externamente. Na Grécia Antiga, a carne de cefalópodes (*O. vulgaris*, *S. officianalis*) e a concha de trombeta gigante (*Charonia tritonis*) eram comidas

para condições de baixa imunidade, além de doenças respiratórias infecciosas ou inflamatórias. Entre as tribos nigerianas, a carne é “perfurada para obter o fluido”. Tudo isso pode estar relacionado à hemolinfa circulante (equivalente ao sangue), que representa pelo menos 20% do peso corporal dos moluscos. A hemolinfa é composta em grande parte por hemocianina (Hc), que possui uma gama de bioatividades e está entre os mais potentes imunógenos usados em estudos relacionados a doenças respiratórias. Muitos outros compostos bioativos (por exemplo proteínas, peptídeos e policetídeos) foram derivados do tecido corporal de moluscos (SUMMER & BROWNE, et al., 2020).

A revisão de Dang et al. (2015) apresenta evidências de efeitos antivirais de Hcs e AMPs de moluscos contra uma variedade de vírus humanos, incluindo vírus herpes simplex, vírus Epstein-Barr (DNA de fita dupla, envelopado em lipídios), rotavírus símio (RNA de fita dupla, não envelopado) e poli vírus (RNA de fita simples, não envelopado). Em relação à doença respiratória, a atividade virucida foi demonstrada usando hemolinfa de ostra testada contra adenovírus humano (AdV-5) (DANG, BENKENDORFF, GREEN, & SPECK, et al., 2015).

Textos farmacêuticos do século 18-19 proclamaram os benefícios insuperáveis da helicidade (muco do caracol terrestre *H. pomatia*) para aliviar várias condições respiratórias, como coqueluche, tuberculose, gripe, pneumonia, bronquite crônica e asma (BONNEMAIN, 2005).

Summer et al. (2020) identificou 11 ensaios clínicos em humanos usando compostos de moluscos purificados como tratamentos para doenças respiratórias. Esses ensaios usaram hemocianina de lapa (KLH) como adjuvante/conjugado de vacina (n = 4), kahalalide F (e derivados) para câncer de pulmão (n = 3), helicidade para doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (n = 1), e Lyprinol para asma (n = 3) (SUMMER & BROWNE, et al., 2020). Remédios naturais da espécie de mexilhão de lábios verdes da Nova Zelândia (*Perna canaliculus*) são geralmente promovidos como agentes anti-inflamatórios, eficazes em interromper a progressão de problemas nas articulações e nos tecidos conjuntivos e aliviar os sintomas da artrite. Vários novos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 anti-inflamatórios foram identificados a partir de extratos de *P. canaliculus* (TRESCHOW & HODGE, 2007). Uma gama de nutracêuticos é produzida a partir desta espécie, incluindo pó de mexilhão, um extrato de mexilhão que alega ter propriedades anti-inflamatórias (DOGGRELL, 2011) e um extrato lipídico estabilizado (Lyprinol), agora aprovado pela FDA para uso como um agente

anti-inflamatório alternativo, e medicamentos para tosse contendo helicidina estão disponíveis sem receita nas farmácias europeias há mais de 50 anos (SUMMER & BROWNE, et al., 2020). Lyprinol demonstrou ser eficaz em um modelo de roedor para prevenção de doença inflamatória intestinal (TENIKOFF & MURPHY, et al.,2005) e preparações farmacêuticas contendo extratos de *P. canaliculus* foram patenteadas para uso no tratamento de efeitos colaterais causados à mucosa gastrointestinal após ingestão de analgésicos (McFARLANE & CROFT, 1984).

O extrato corporal de *Limax sp.* demonstrou inibir o crescimento do carcinoma de pulmão em camundongos, e reduzir o aparecimento de sintomas de asma e produção de marcadores inflamatórios em cobaias de forma mais eficaz do que o broncodilatador clínico Aminofilina (YAN & LIN, et al.,2011).

A carne e a concha de *Muricidae sp.* ocorrem em oito MTCs e seus opérculos foram ingeridos como óleos medicinais na Grécia Antiga, Índia Antiga e Egito Medieval para várias doenças respiratórias infecciosas e inflamatórias e câncer. Considerável atenção tem sido dedicada à púrpura de Tyrian (6,6'dibromoindigo e compostos relacionados), um corante têxtil historicamente importante obtido da família *Muricidae*. A pesquisa de produtos naturais, desde então, verificou a atividade antibacteriana, anti-inflamatória e anticancerígena de amplo espectro de compostos precursores da púrpura de Tyrian, pigmentos menores e derivados modificados (AHMAD & LIU, et al.,2018). Extratos de um búzio australiano *Dicathais orbita* contendo esses compostos bioativos mostraram atividade antimicrobiana preliminar contra patógenos respiratórios in vitro (BENKENDORFF, BREMNER, & DAVIS, 2000) e atividade anti-inflamatória em um estudo murino de inflamação pulmonar aguda (AHMAD, et al., 2017). Alguns compostos bioativos também são detectáveis em extratos lipofílicos de *D. orbita operculum*, com relevância para antigas preparações de óleo medicinal (McHUGH, 2013).

A maioria dos medicamentos tradicionais e estudos biomédicos são baseados em extratos e compostos de Gastropoda e Bivalvia, o que não é surpreendente, uma vez que essas classes compreendem a maioria (> 90%) da biodiversidade de moluscos. Existem 21 famílias de Bivalvia utilizadas em medicamentos tradicionais que ainda não foram investigadas cientificamente (SUMMER & BROWNE, et al., 2020).

Gomes et al. (2015), mediu a formação de metástases pulmonares em camundongos tratados com um glicano semelhante a heparina de *Nodipecten nodusus*, um molusco bivalve encontrado ao longo da costa atlântica norte da América. Neste estudo, o tamanho e o número de focos pulmonares metastáticos foram significativamente reduzidos, de dez para um por pulmão (grupos de controle de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e tratamento com heparina de molusco, respectivamente). Os componentes *in vivo* e *in vitro* do estudo de Gomes et al. (2015) demonstraram que a heparina do molusco inibe a interação da P-selectina com o carcinoma do cólon (LS180) e reduz o recrutamento de células inflamatórias, a formação do complexo plaquetário-célula tumoral e a atividade enzimática da heparinase, atenuando assim as metástases (GOMES; KOZLOWSKI, et al.,2015).

Toledo-Piza et al. (2018) demonstraram atividade antiviral com muco concentrado do molusco sem concha terrestre *Phyllocaulis boraceiensis*, em que o pré-tratamento da célula hospedeira reduziu os efeitos citopáticos induzidos pelo vírus da gripe A (H1N1) e do sarampo em até 80% sem citotoxicidade da célula hospedeira (TOLEDO-PIZA & OLIVEIRA, 2018) .

Os moluscos fornecem boas fontes biodisponíveis de zinco. Demonstrou-se recentemente que o zinco inibe a replicação de vírus respiratórios (incluindo influenza e COVID-19), reduz a infecção de células hospedeiras, melhora a função imunológica e age sinergicamente com terapias antivirais padrão (WESSELS, ROLLES, & RINK, 2020). Fatores antivirais isolados de moluscos podem, portanto, ser combinados com zinco para melhorar a atividade. Além disso, extratos de moluscos inteiros, corpos e conchas usados em medicamentos tradicionais provavelmente contêm zinco, que pode ser em parte responsável por alguns benefícios derivados.

3.4 Usina Hidroelétrica de Volta Grande

O reservatório da Usina Hidroelétrica de Volta Grande, área de estudo deste trabalho, encontra-se na bacia do Rio Grande na cidade de Conceição das Alagoas (MG) e Miguelópolis (SP). A usina tem capacidade instalada de 380 MW e garantia física de 230,6 MW médios. A bacia do rio Grande é a segunda maior do estado de Minas Gerais, onde encontra-se o reservatório de Volta Grande. (CACHAPUZ, 2006).

Em fevereiro de 1967 a Cemig ganhou a concessão para realização de Volta Grande. As obras civis foram iniciadas em janeiro de 1970 pela Construtora Mendes Júnior. A inauguração oficial da usina ocorreu em julho de 1974 com a entrada em operação comercial da primeira de suas quatro unidades geradoras de 95 MW, as demais unidades geradoras foram colocadas em operação entre fevereiro e outubro de 1975. Para possibilitar a construção da hidrelétrica, uma ampla área foi inundada e outra desmatada para a retirada de terra, utilizada nas obras da barragem. Para reparar os danos ao meio ambiente pela construção da UHE, foi inaugurada em 14 de janeiro de 1976, a primeira estação ambiental da Cemig foi implantada em áreas remanescentes da usina hidrelétrica de Volta Grande, no curso inferior do rio Grande. Ocupando uma área de 391 ha, a Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Volta Grande, localizada às margens do reservatório da hidrelétrica. Como objetivo primordial a realização de estudos sobre a qualidade da água e o desenvolvimento de técnicas de manejo e reprodução de espécies nativas de peixes na bacia do rio Grande, em parceria com universidades e institutos de pesquisa (CACHAPUZ, 2006).

Em setembro de 2012, foi detectado pela primeira vez a presença de mexilhão dourado na Usina de Volta Grande, localizadas no Rio Grande. A descoberta da espécie invasora na usina ocorreu durante a parada para manutenção programada de uma das máquinas. Os mexilhões têm larvas microscópicas que se fixam no metal de dutos resfriadores. Crescem e se reproduzem numa colônia que entope esses espaços. A infestação obriga a operação a ser parcialmente interrompida e trabalhos de limpeza e controle dos animais precisam ser feitos .

Embora o rio Grande não represente uma hidrovia navegável para embarcações comerciais devido à presença de uma série de barramentos em cascata, registros marcaram a presença do mexilhão em grande parte dele, possivelmente, isto se deu pelo fato de que outros vetores de dispersão estão presentes nestes rios tais como barcos de pesca, piscicultura e uso de areia retirada de locais infestados (SANTOS S. B., 2012).

O mexilhão dourado apresenta elevada capacidade de adaptação aos diferentes ecossistemas aquáticos, podendo aderir a quase todo tipo de substrato, seja ele natural ou artificial. As incrustações formadas pelo mexilhão dourado são volumosas, onde vários indivíduos se sobrepõem fixando-se ao substrato e entre si, pelos fios de bisso, formando assim macro aglomerados compactos (MANSUR M. C., 2012). As populações do mexilhão-dourado continuam crescendo em taxas alarmantes, tornando-o não apenas uma das maiores pragas no

Brasil (BARBOSA, et al., 2016), mas também a espécie invasora de água doce mais agressiva em toda a América do Sul (DARRIGRAN & DAMBORENEA, 2011).

O mexilhão dourado é motivo de atenção nas usinas hidrelétricas localizadas na Bacia Paraná-Paraguai, pois o molusco compromete os sistemas que utilizam água bruta no processo de produção de energia elétrica. O mexilhão invade, ainda em forma de larva, as tubulações por onde passa a água e lá se fixa. Na fase adulta, obstrui as tubulações podendo causar superaquecimento nas máquinas. Neste caso, a única forma de retirar o mexilhão é manualmente. O controle da proliferação é feito por monitoramento e retirada da parte incrustada nas tubulações das hidrelétricas.

A Enel Brasil S.A. participou em 27 de setembro de 2017 do “Leilão de Concessões não prorrogadas” organizado pelo Governo Federal por meio da Agência Nacional de Energia Elétrica (Aneel), e recebeu a concessão para operar por um período de 30 anos a usina hidrelétrica de Volta Grande, por um valor total de R\$ 1.420 milhões. O grupo Enel Brasil iniciou sua gestão sobre a hidrelétrica em 11 de novembro de 2017, seus investimentos em 2018 somaram R\$ 2.1 milhões, dos quais 361 mil foram destinados ao controle do mexilhão dourado (ENEL, 2018).

Através de uma rede que conecta empresas e o governo, o Centro de Bioengenharia de Espécies Invasoras de Hidrelétricas - CBEIH foi criado em 2010 com o propósito de buscar soluções para amenizar os impactos ecológicos, industriais e econômicos causados por espécies invasoras nas usinas hidroelétricas, com o projeto de pesquisa e desenvolvimento ANEEL GT-343 que ganhou sua continuidade no ano de 2018 com o ANEEL GT-604 através de uma parceria entre a Companhia de Energia de Minas Gerais (CEMIG) e a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). O CBEIH tem como objetivo pesquisas no combate aos organismos invasores e tem como áreas de interesse a bioengenharia, modelagem ambiental e o monitoramento das espécies, pois a proliferação descontrolada destes organismos acaba eliminando outras espécies nativas e comprometendo atividades humanas que dependem de recursos naturais, como agricultura, pecuária e geração de energia hidrelétrica. Com esse e outros projetos de pesquisa e desenvolvimento a companhia de geração de energia já investiu mais de 14 milhões de reais no combate ao *Limnoperna fortunei* (CEMIG, 2014).

3.5 Métodos de extração sólido-líquido utilizados

3.5.1 Extração por Maceração

A maceração é um dos métodos mais convencionais de extração devido a simplicidade da operação e custos bem reduzidos. Consiste em colocar a amostra que contém o princípio ativo de interesse em contato com o solvente em um recipiente fechado, é permitido ficar por um período de tempo variável (variando de horas a dias) com agitação ocasional, em temperatura ambiente, sem renovação do líquido extrator. O número de matérias-primas, a seleção de solventes e o tempo correto de extração são fatores que afetam a eficácia desse método. Antes de ser processada, a amostra deve ser devidamente lavada e separada de materiais estranhos, como solo superficial e materiais não adequados para extração (TAMBUN, ALEXANDER, & GINTING, 2020).

A escolha do solvente deve ser feita com base na solubilidade do analito alvo e no equilíbrio entre custo, segurança e preocupações ambientais. Alguns solventes comuns usados na extração são metanol, etanol, acetato de etila e água destilada. Alguns outros solventes como hexano, clorofórmio, butanol, propanol e outros também podem ser utilizados considerando a toxicidade e o preço do solvente (RASUL, 2018).

A técnica de maceração pode ser estática (parada) ou dinâmica (com movimento), com agitação (movimentação em reator) de ambas. É indicado para fabricação de extratos sensíveis a degradação térmica, quando se quer manter bem as características sensoriais da amostra e não exaurir a extração dos ativos. Variações destas operações como a maceração a quente, maceração sob agitação constante e a maceração escalonada e remaceração podem ser feitas com o intuito principal, de aumentar a efetividade da extração (LIST & SCHMIDT, 1989). Esse processo fica restrito quando se trabalha com substâncias ativas pouco solúveis e plantas com altos índices de proliferação microbiana.

3.5.2 Extração pelo método de Soxhlet

Uma forma de extração sólido-líquido é a extração Soxhlet. Esta técnica básica foi desenvolvida em 1879 por Franz Ritter von Soxhlet, que era um químico alemão e fisiologista

nutricional. O aparelho inventado, hoje conhecido como extrator Soxhlet, foi usado pela primeira vez para determinar o teor de gordura no leite. Desde então, a técnica de extração Soxhlet ganhou amplo reconhecimento no campo da preparação de amostras (ZYGLER, STOMINSKA, & NAMIESNIK, 2012).

Utilizado para a extração de lipídios e materiais sólidos que não se dissolvem com água, o Soxhlet consegue armazenar essas substâncias com toda a propriedade e permite que o responsável por manipular os materiais não precise ficar conferindo a todo momento a reação do composto quando estiver em contato com um solvente.

O Soxhlet possui três partes, sendo que a primeira é o reservatório de vidro (dedal), onde deverá ser colocado o sólido a ser extraído, completamente envolto por um papel de filtro. Esse reservatório contém um tubo na parte lateral, podendo esvaziar ou preencher o espaço no qual o composto é colocado. O reservatório de vidro é envolto por outras duas partes: o condensador, que ocasiona o refluxo do solvente que é posto na concentração, e o balão, que fica concentrado na parte de baixo e destila o composto com a adição do solvente. A figura 3.5 mostra a representação esquemática de uma extração com Soxhlet, onde: 1) Barra magnética de agitação, 2) Balão de destilação, 3) Braço de destilação, 4) Dedal, 5) Extração da matéria-prima, 6) Sifão, 7) Saída do sifão, 8) Adaptador de expansão, 9) Condensador, 10) Entrada de água fria, 11) Saída de água fria.

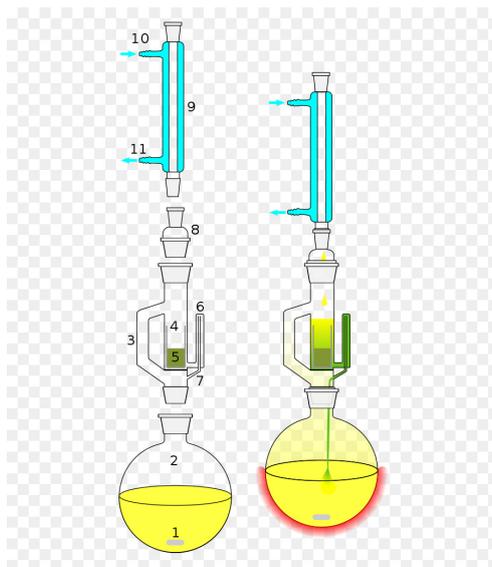


Figura 3.5 - Representação esquemática de uma extração com Soxhlet (JENSEN, 2007)

O solvente de extração é despejado no frasco inferior, seguido pelo dedal na câmara de extração, ele então é aquecido para iniciar-se o refluxo. O vapor do solvente passa por um braço de destilação e enche a câmara onde se encontra o dedal com o material sólido. O condensador assegura que todo o vapor arrefeça, condense e desça para a câmara central do Soxhlet, onde vai acumulando lentamente o solvente. Algum do composto que se pretende extrair dissolve-se no solvente quente. No momento em que quase todo o espaço da câmara central se encontra preenchido pelo solvente, esta é esvaziada pelo sifão. O solvente retorna então ao balão de destilação, completando o ciclo da extração. O dedal assegura que a rápida movimentação do solvente não arraste partículas sólidas para o balão. Este ciclo é repetido várias vezes até que o composto seja completamente extraído. Após a extração, o solvente é removido, normalmente por recurso a um evaporador rotativo, a parte não solúvel do sólido mantém-se no dedal, sendo depois descartada (ABUBAKAR & HAQUE, 2020).

A extração de Soxhlet tem sido amplamente utilizada para extrair compostos bioativos valiosos de várias fontes naturais. Nesta extração, uma pequena quantidade de amostra seca é colocada em um dedal, que é colocado em um frasco de destilação contendo o solvente de interesse particular. Após atingir um nível de transbordamento, a solução do porta-dedal é aspirada por um sifão, que descarrega a solução de volta no balão de destilação. Esta solução transporta os solutos extraídos para o líquido a granel. O soluto permanece no frasco de destilação e o solvente retorna ao leito sólido das amostras. O processo é repetido até que ocorra a extração completa (RAKHEE, MISHRA, SHARMA, & MISRA, 2018).

As mais notáveis vantagens que o método de Soxhlet apresenta são a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação; a temperatura do sistema mantém-se relativamente alta, visto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante; é uma metodologia muito simples que não requer treinamento especializado e que possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração da miscela após o término da extração, pois a amostra esteve envolta no cartucho durante todo o procedimento (LUQUE DE CASTRO & GARCIA-AYUSO, 1998).

O uso do Soxhlet é inteiramente importante para se chegar a uma amostra mais concentrada e com uma porção considerável para estudo e análise.

3.5.3 Solvente utilizado: Metanol

A escolha do solvente a ser utilizado é extremamente importante na extração de compostos bioativos, principalmente quando é buscado a obtenção de um ou mais compostos de interesse (ABUBAKAR & HAQUE, 2020).

O metanol, também chamado de álcool metílico, possui fórmula molecular CH_4O e fórmula estrutural igual a $\text{CH}_3 - \text{OH}$. Trata-se de um composto orgânico formado pelo grupo orgânico álcool. É polar e sua massa molar é igual a 32 g/mol. A temperatura de fusão do metanol é -97°C e a temperatura de ebulição é $64,7^\circ\text{C}$. Além disso, é muito solúvel em água.

A escolha do solvente depende do tipo de composto, da parte do composto a ser extraído, da natureza dos compostos bioativos e da disponibilidade do solvente. Em geral, solventes polares, como água, metanol e etanol, são usados na extração de compostos polares, enquanto solventes apolares, como hexano e diclorometano, são usados na extração de compostos apolares.

Extrações que utilizam solventes são técnicas amplamente difundidas no meio industrial. Esta técnica é chamada de convencional e se aplica para diferentes matrizes, onde a união dos solventes com o processo de aquecimento facilita a transferência de massa, entretanto apresenta desvantagens e riscos de degradação dos compostos termolábeis, além de ser um método com elevado consumo de energia (BARBA, ZHU, KOUBBA, & al, 2016).

Vários fatores enumerados abaixo devem ser levados em consideração ao escolher um solvente de extração. 1) Seletividade: A capacidade de um solvente escolhido para extrair o constituinte ativo e deixar o material inerte; 2) Segurança: O solvente ideal de extração deve ser atóxico e não inflamável; 3) Custo: Deve ser o mais barato possível; 4) Reatividade: O solvente de extração adequado não deve reagir com o extrato; 5) Recuperação: O solvente de extração deve ser rapidamente recuperado e separado do extrato; 6) Viscosidade: Deve ser de baixa viscosidade para facilitar a penetração; 7) Temperatura de ebulição: A temperatura de ebulição do solvente deve ser a mais baixa possível para evitar a degradação pelo calor (ABUBAKAR & HAQUE, 2020).

Os seguintes critérios provavelmente serão considerados na seleção do solvente: 1) Solubilidade das substâncias específicas no solvente: Por exemplo, óleos vegetais constituídos

por triglicerídeos de ácidos graxos são normalmente extraídos com hexano, enquanto que para extração de ácidos graxos livres, são usados álcoois mais polares; 2) Propriedades físicas como baixa tensão interfacial e viscosidade: O solvente deve ser capaz de molhar os sólidos e penetrar através de poros e capilares na matriz. Além disso, sua baixa viscosidade auxilia as taxas de difusão na fase solvente; 3) Recuperação, uma vez que o solvente será reaproveitado nas extrações subsequentes: Se for usada destilação ou evaporação, o solvente não deve formar azeótropos e o calor latente de vaporização deve ser pequeno; 4) Perigos e custos: Idealmente, o solvente deve ser atóxico, não perigoso, não reativo, não inflamável, inofensivo ao meio ambiente e barato. A prevenção de perdas de solvente pode ser obtida através de um melhor projeto de processo (CHANIOTI, LIADAKIS, & TZIA, 2014).

Dentre as vantagens em se utilizar o solvente orgânico polar (por exemplo o metanol), destacam-se a menor concentração de taninos extraídos, facilitando a posterior purificação, e a possibilidade de regeneração do solvente.

Propriedade do Grupo orgânico Álcool é de natureza polar, miscível com água e pode extrair metabólitos secundários polares. *Vantagens*: É auto conservante em concentração acima de 20%. Não é tóxico em baixa concentração e é necessária uma pequena quantidade de calor para concentrar o extrato. *Desvantagens*: Não dissolve gorduras, gomas e cera; é inflamável e volátil (ABUBAKAR & HAQUE, 2020).

O rendimento de uma extração química pode depender do tipo de solvente com diferentes polaridades, pH, tempo de extração e temperatura, bem como da composição química da amostra. Sob as mesmas condições de tempo e temperatura, o solvente e as propriedades químicas da amostra tornam-se os dois fatores os mais importantes. No início de 2008, solventes como éter de petróleo, acetato de etila, metanol, diclorometano e butanol foram comumente usados para a extração de compostos fenólicos de microalgas marinhas (JUSTINO, DUARTE, C, D, & ROCHA-SANTOS, 2014).

O efeito mais visível da temperatura é a mudança na viscosidade do solvente, do óleo e na solubilidade dos componentes do óleo bruto. Com a elevação da temperatura ocorre uma diminuição nas viscosidades do solvente e do óleo e, assim, acontece um aumento na solubilidade do óleo. Dessa forma, é esperado um aumento da velocidade da extração, facilitando o processo de difusão (ZACHI, 2007).

Com relação à influência de tempos de extração no rendimento e composição química de óleos essenciais, foi observado que trabalhos na literatura sobre o tema são escassos, entretanto, são essenciais para obtenção da maximização do rendimento dos resultados (MATTANA, MAIA E ALMEIDA, & OLIVEIRA, 2015).

3.6 Técnica de Cromatografia

A Cromatografia é uma das técnicas de análise química mais empregada. Dentre seus vários tipos, elas servem para identificar substâncias, purificação e ou separação de compostos. É uma poderosa técnica de separação, amplamente empregada para a análise qualitativa e quantitativa de misturas complexas.

A descoberta da cromatografia é atribuída ao botânico russo Mikhail S. Tsvet, pois em 1901 reconheceu a base físico-química da separação e a aplicou de forma racional e organizada à separação dos componentes de extratos de folhas. Tsvet descreveu uma técnica que é usada hoje essencialmente da mesma forma. Ele embalou uma coluna vertical de vidro com um material adsorvente, como alumina, sílica ou açúcar em pó, adicionou uma solução de pigmentos vegetais ao topo da coluna e lavou os pigmentos através da coluna com um solvente orgânico. Os pigmentos se separaram em uma série de faixas coloridas discretas na coluna, divididas por regiões totalmente livres de pigmentos. Como Tsvet trabalhava com substâncias coloridas, ele chamou o método de cromatografia (chrom = cor e graphie = escrita), podendo levar à errônea ideia de que o processo seja dependente da cor) (SALATINO, 2016).

Apesar deste estudo e de outros anteriores, que também poderiam ser considerados precursores do uso dessa técnica, a cromatografia foi praticamente ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta. A partir daí, diversos trabalhos na área possibilitaram seu aperfeiçoamento e, em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação, o qual resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas (GIDDINGS & CALVIN E KELLER, 2020).

A técnica de cromatografia consiste numa substância, podendo ser um gás ou líquido denominado fase móvel, que transporta a amostra a ser analisada através de uma outra substância (líquido ou sólido) chamada de fase estacionária, que pode estar contida no interior

de uma coluna ou sobre uma placa. Desta forma, os componentes da mistura são separados pelas diferenças de afinidade através das duas fases.

A cromatografia tem inúmeras aplicações nos campos biológico e químico. É amplamente utilizada em pesquisa bioquímica para a separação e identificação de compostos químicos de origem biológica. Na indústria do petróleo a técnica é empregada para analisar misturas complexas de hidrocarbonetos.

Como método de separação, a cromatografia tem várias vantagens em relação às técnicas mais antigas – cristalização, extração com solvente e destilação, por exemplo. É capaz de separar todos os componentes de uma mistura química sem exigir um extenso conhecimento prévio da identidade, número ou quantidades relativas das substâncias presentes. É versátil, pois pode lidar com espécies moleculares que variam em tamanho; além disso, pode ser usado com grandes ou pequenas quantidades de material. Seu poder de resolução é inigualável entre os métodos de separação (GIDDINGS & CALVIN E KELLER, 2020).

A cromatografia serve para identificação de substâncias, purificação de compostos e separação de componentes de misturas. Nenhum outro método é tão poderoso e de aplicação tão generalizada como a cromatografia. Os equipamentos desta técnica podem ainda ser acoplados a outros equipamentos de outras técnicas de análise, tornando a cromatografia ainda mais poderosa e robusta (SALATINO, 2016).

Existem muitos tipos de cromatografia, porém daremos foco a cromatografia gasosa, utilizada no presente trabalho.

A cromatografia gasosa (CG) foi descrita pela primeira vez em 1952 com a separação de uma mistura de pequenos ácidos carboxílicos. Um cromatógrafo a gás usa uma coluna de fluxo, através da qual diferentes constituintes químicos de uma amostra passam em uma corrente de gás (gás transportador, fase móvel) em taxas diferentes, dependendo de suas propriedades químicas e físicas e de sua interação com um enchimento de coluna específico, chamado a fase estacionária. A função da fase estacionária na coluna é separar diferentes componentes, fazendo com que cada uma saia da coluna em um momento diferente.

Outros parâmetros que podem ser usados para alterar o tempo de retenção são a vazão do gás de arraste, o comprimento da coluna e a temperatura.

No início, foram usadas colunas compactadas; no entanto, o poder do CG foi substancialmente melhorado pela introdução de colunas capilares tubulares abertas revestidas de parede, inicialmente de vidro, mas substituídas por colunas capilares de sílica fundida mais duráveis em 1976. Isso foi considerado um grande avanço no desenvolvimento do CG. À medida que os produtos químicos saem da coluna, eles são detectados eletronicamente (MEDEIROS, 2018).

A figura 3.6 mostra a representação esquemática de um cromatógrafo de fase gasosa.

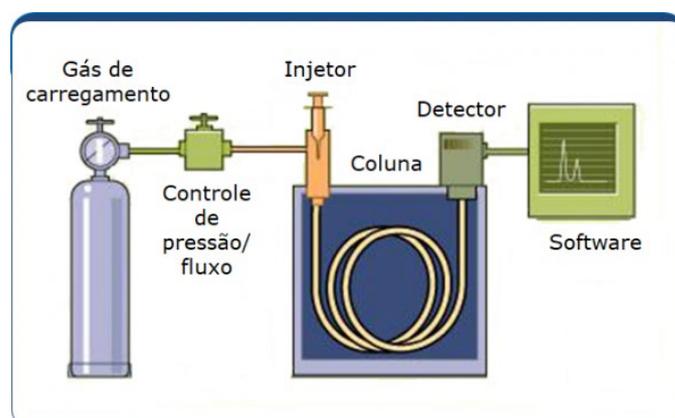


Figura 3.6 - Representação de um cromatógrafo de fase gasosa (SALATINO, 2016)

A espectrometria de massa (EM) é uma técnica analítica usada para identificar e quantificar diferentes produtos químicos presentes em uma amostra medindo a razão massa-carga e a abundância de íons em fase gasosa. A história da espectrometria de massa começou em 1912, quando os primeiros espectros de massa de compostos, como Ne, N₂, CO₂ e COCl₂, foram obtidos. Os primeiros instrumentos comerciais dedicados à análise orgânica foram construídos durante a Segunda Guerra Mundial, com maior aplicação na época na petroquímica.

Em um procedimento típico de EM uma amostra (sólida, líquida ou gasosa) é ionizada, por exemplo, bombardeando-a com elétrons (ionização eletrônica – IE). Isso pode fazer com que algumas das moléculas da amostra se quebrem em fragmentos carregados. Esses íons são então separados de acordo com sua relação massa-carga, normalmente acelerando e submetendo-os a um campo magnético ou elétrico ou medindo o tempo necessário para chegar ao detector: íons com a mesma relação massa-carga sofrerão a mesma quantidade de deflexão. Existem atualmente quatro tipos principais de analisadores: setor magnético, armadilha de íons, quadrupolo (Q) e tempo de voo (ToF).

Os íons são detectados por um mecanismo capaz de reconhecer partículas carregadas.

Os átomos ou moléculas na amostra podem ser identificados correlacionando massas teóricas com as massas identificadas ou através de um padrão de fragmentação característico.

Em 1958, foram introduzidos os primeiros instrumentos de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). No início da década de 1960, o desenvolvimento de computadores acessíveis e miniaturizados auxiliou na simplificação do uso desse instrumento, além de permitir grandes melhorias no tempo de análise de uma amostra. O grande avanço no CG/EM ocorreu em 1968 com a introdução das primeiras unidades de processamento de dados. Em 1981, as colunas capilares de sílica fundida foram aplicadas pela primeira vez para CG/EM, e hoje, é a coluna mais utilizada nessa análise (MEDEIROS, 2018).

Os detectores de espectrômetro de massa (EM) são os mais poderosos de todos os detectores de cromatografia gasosa. Em um sistema CG/EM, o espectrômetro de massa varre as massas continuamente ao longo da separação. Quando a amostra sai da coluna de cromatografia, ela passa por uma linha de transferência para a entrada do espectrômetro de massa. A amostra é então ionizada e fragmentada, normalmente por uma fonte de íons de impacto de elétrons. Durante este processo, a amostra é bombardeada por elétrons energéticos que ionizam a molécula fazendo com que ela perca um elétron devido à repulsão eletrostática. O bombardeio adicional faz com que os íons se fragmentem. Os íons são então passados para um analisador de massa onde os íons são classificados de acordo com seu valor m/z , ou razão massa-carga. A maioria dos íons são carregados apenas uma vez (SANTOS, PONTES, NETA, & MORAIS, 2016).

A diversidade estrutural e propriedades químicas das moléculas vegetais e animais apresentam desafios na caracterização e identificação eficaz em matrizes complexas mesmo com os avanços da tecnologia. As metodologias mais frequentes para análises de matrizes complexas de moléculas bioativas e metabólitos secundários tem sido a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa associadas a espectrometria (CORREA, BERNARDI, & GEHRKE, 2016).

3.6.1 CG/EM

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) é uma das chamadas técnicas analíticas hífenizadas. Na verdade, são duas técnicas que são combinadas para formar

um único método para análise de misturas de produtos químicos orgânicos. A cromatografia gasosa separa os componentes de uma mistura e a espectrometria de massa caracteriza cada um dos componentes individualmente.

A combinação das duas técnicas permite avaliações qualitativas e quantitativas de uma amostra contendo vários compostos orgânicos. Os usos para CG/EM são numerosos, incluindo pesquisa química, geológica, ambiental e forense.

Quando CG é combinado com EM uma poderosa ferramenta analítica é criada. Os instrumentos são acoplados usando uma linha de transferência aquecida pela qual a última parte da coluna passa e termina na entrada da fonte de íons EM onde os compostos eluidos da coluna são convertidos em íons. Misturas complexas de produtos químicos podem ser separadas, identificadas e quantificadas. Isso o torna ideal para a análise de centenas de compostos de peso molecular relativamente baixo encontrados em materiais ambientais e biológicos. Como um método de separação em fase gasosa, o CG requer que os analitos sejam volatilizados antes de sua separação. Portanto, para que um composto seja analisado por CG/EM, ele deve ser suficientemente volátil e termicamente estável (GIDDINGS & CALVIN E KELLER, 2020).

Para análise de amostras líquidas, um volume conhecido do analito é injetado em uma porta injetora aquecida geralmente a 250-300 C (entrada do CG), geralmente usando uma microseringa. Um gás transportador (geralmente hélio) varre as moléculas de analito vaporizadas através da coluna. A separação ocorre por uma combinação de interações cinéticas, físicas e químicas com o enchimento da fase estacionária, resultando na eluição de vários componentes em tempos diferentes. O momento em que cada componente atinge a saída, o tempo de retenção (RT), é definido como o tempo desde que a injeção é feita (tempo zero) até quando ocorre a eluição. À medida que o instrumento funciona, um software de computador gera um gráfico chamado cromatograma. O cromatograma indicará os tempos de retenção e o espectrômetro de massa usará os picos para determinar que tipo de moléculas existem na mistura (GIDDINGS & CALVIN E KELLER, 2020).

Em um CG/EM, a coleta de dados pode ser realizada de duas maneiras: varredura completa e monitoramento de íons selecionados (MIS).

O modo de varredura completa tem como alvo uma ampla gama de fragmentos de massa, normalmente de m/z 50 a m/z 600, e é útil na determinação de compostos desconhecidos em uma amostra. Em contraste, o MIS monitora apenas íons selecionados associados a uma substância específica. Esta é uma análise rápida e eficiente, principalmente se o analista tiver informações prévias sobre uma amostra ou estiver procurando apenas algumas substâncias específicas.

A elucidação da estrutura de compostos naturais por CG/EM foi o grande avanço no desenvolvimento da geoquímica de biomarcadores, inicialmente para a pesquisa de exploração de petróleo e depois para a geoquímica orgânica em geral. Em geoquímica, os biomarcadores são definidos como compostos derivados de fontes biológicas (ou seja, plantas, micróbios e animais) que retêm algumas, se não todas, as características estruturais de sua molécula precursora após serem preservadas no registro geológico ou liberadas no meio ambiente. Assim, eles podem ser rastreados até sua origem biológica (natural) (PRATA, MOGOLLON, & AUGUSTO, 2016).

Os métodos atuais de instrumentação e derivatização estenderam o conceito de biomarcador para outras disciplinas, como aplicações ambientais, alimentícias e forenses, onde compostos naturais e sintéticos (antropogênicos) são encontrados. A aplicação de biomarcadores como traçadores tem sido amplamente utilizada na determinação de fontes, transporte e produtos de transformação de matéria orgânica em amostras aquáticas, de solo e atmosféricas. Por exemplo, biomarcadores de plantas superiores, como diterpenóides e fenóis de lignina, têm sido usados para rastrear entradas terrestres em águas costeiras marinhas e de mar aberto (ABUBAKAR & HAQUE, 2020).

O acoplamento de CG e EM na década de 1960 foi um grande desenvolvimento, primeiro no campo da petroquímica e depois para a geoquímica orgânica em geral. A elucidação de biomarcadores permitiu suas aplicações como traçadores moleculares para inúmeros processos em estudos geológicos e ambientais utilizando compostos naturais e antropogênicos. Espera-se que o número de novos compostos identificados, bem como as aplicações de traçadores de biomarcadores, continue aumentando.

As utilidades do CG/EM para ciências interdisciplinares contemporâneas também continuarão a se expandir, especialmente à medida que as capacidades dos instrumentos analíticos se

desenvolvem ainda mais com maior sensibilidade, facilidade de operação, menor manutenção, melhor tecnologia de separação e maior eficiência de ionização (MEDEIROS, 2018).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa é uma poderosa ferramenta analítica para o controle de qualidade de ativos e formas farmacêuticas. Apresenta elevada exatidão nos resultados, permitindo a identificação e/ou a quantificação dos compostos presentes com confiabilidade.

A técnica de CG/EM não se limita apenas a área química, pelo contrário, pode ser utilizada pelas mais variadas áreas e tendo resultados confiáveis e possíveis de serem realizados. Por isso, é uma técnica de suma importância que deve ser difundida e aplicada (SANTOS, PONTES, NETA, & MORAIS, 2016).

Na indústria farmacêutica a cromatografia é usada para o controle de qualidade de ativos e formas farmacêuticas. Na indústria alimentícia, pode-se usar a cromatografia gasosa para análise de alguns constituintes de alimentos, como lipídeos e carboidratos (COLLINS, BRAGA, & BONATO, 2006).

Até o presente momento, a espectrometria de massas (EM) vem sendo a técnica de detecção mais escolhida para análise de metabólitos devido a sua abrangência, sensibilidade e seletividade, principalmente após o surgimento de técnicas mais suaves de ionização e de alta resolução. Entretanto, apesar do potencial da EM, por si só, esta técnica não é capaz de resolver uma mistura complexa de metabólitos, sendo altamente requerida e fundamental à elucidação estrutural, uma previa etapa de separação e simplificação da amostra para posterior detecção no EM. A cromatografia é um dos mais valiosos e difundidos métodos indicados para essa função (PRATA, MOGOLLON, & AUGUSTO, 2016).

A diversidade estrutural e propriedades químicas das moléculas vegetais e animais apresentam desafios na caracterização e identificação eficaz em matrizes complexas mesmo com os avanços da tecnologia. As metodologias mais frequentes para análises de matrizes complexas de moléculas bioativas e metabólitos secundários tem sido a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa associadas a espectrometria (CORREA, BERNARDI, & GEHRKE, 2016).

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho de campo foi realizado no reservatório da Usina Hidrelétrica de Volta Grande. Duas amostras do mexilhão dourado foram extraídas pelos métodos de maceração e Soxhlet com o intuito da obtenção do extrato metanólico do mesmo. Os laboratórios utilizados para as técnicas de extração foram: laboratório de química orgânica do departamento de química - DEQUI e o laboratório de difração de raios X e crescimento de cristais do departamento de física – DEFIS, ambos do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas - ICEB da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Campus Morro do Cruzeiro. Além disso, houve a utilização do laboratório da Central Analítica de instrumentação do instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) para a identificação de compostos orgânicos pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

4.1 Materiais

Os materiais utilizados na execução deste projeto foram:

- Amostras de mexilhões dourados vivos;
- Medidor multiparâmetro – AK88 akso;
- Turbidímetro Digital - TU430 akso;
- Solvente Metanol (CH₃OH);
- Extrator de Soxhlet;
- Papel de filtro;
- Becker de 100 mL;
- Balança analítica;
- Rotavapor;
- Cromatografo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas QP-2020 da Shimadzu.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção de espécimes de *Limnoperna fortunei*

Para a obtenção de espécimes que já se encontravam adaptadas ao ambiente, foram realizadas visitas técnicas a hidrelétrica de Volta Grande, onde já possui infestação estabelecida pelo mexilhão dourado.

O trabalho de coleta do *Limnoperna fortunei*, aconteceu nos dias 14 de março e 28 de outubro de 2020 na estação ambiental de Hidrobiologia e Piscicultura da Usina Hidroelétrica de Volta Grande. Na ocasião das visitas, exemplares adultos de *Limnoperna fortunei* foram coletados no reservatório da hidrelétrica e transportados até a Universidade Federal de Ouro Preto para a realização dos ensaios.

O reservatório de Volta Grande, localizado no rio Grande na divisa dos estados de Minas Gerais e São Paulo, foi invadido pelo mexilhão dourado, com reporte do registro da invasão fornecido pela empresa gestora, no ano de 2012.

Segundo (ALMEIDA & BARBOSA, et al., 2016), a espécie conhecida popularmente no Brasil como mexilhão dourado, o *Limnoperna fortunei*, é uma das espécies de mexilhão de água doce da família *Mytilidae*, a qual está representada em maior parte por mexilhões que habitam oceanos e estuários. De acordo com Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por ter uma ampla aptidão de dispersão e reprodução, além de praticamente não ter predadores na fauna brasileira, o mexilhão se espalha com rapidez, por isso a espécie é considerada invasora. Conforme dados da literatura, as invasões biológicas são a segunda maior causa de extinção de espécies, atrás apenas da destruição de habitats. O mexilhão dourado está entre as espécies invasoras que mais causam impactos em ambientes aquáticos. Estações de tratamento de água e as usinas hidrelétricas são bastante afetadas, pois ao se fixar no interior das instalações hidráulicas impedem parcial ou totalmente o fluxo de água, reduzindo a produtividade e ocasionando danos físicos à própria estrutura (VIDAL, 2019).

A abundante disponibilidade do mexilhão dourado possibilita uma visão de reaproveitamento das partes do animal, como as conchas e as partes moles, tendo impacto direto na destinação

do resíduo gerado. Sendo possível transformar uma espécie invasora em um "asset", isto é, quando um problema se torna um ativo positivo. Este bivalve é uma espécie exótica no Brasil e não se caracteriza como espécie em extinção ou protegida.

No momento da coleta dos mexilhões foram realizadas amostras de água e mensurados os parâmetros físicos e químicos: temperatura, potencial hidrogeniônico, turbidez, potencial de oxidação/redução e condutividade foram analisados com auxílio do equipamento AK88 medidor multiparâmetro da marca Akso e o Turbidímetro Digital - TU430 Akso.

A figura 4.1 mostra os equipamentos utilizados no trabalho para a caracterização do ambiente em que os mexilhões foram coletados:

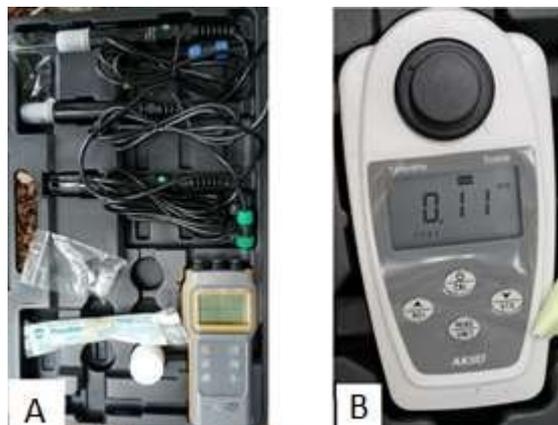


Figura 4.1 - A) Medidor multiparâmetro - AK88 Akso e B) Turbidímetro Digital - TU430 Akso (Elaboração da autora).

Os indivíduos visualizados em quase que na totalidade dos substratos são mexilhões adultos variando entre cerca de 1 e 2 cm de comprimento da concha, incrustados em aglomerados aparentemente bem estabelecidos. Encontrados também nos aglomerados de mexilhões maiores (1-2 cm) fixados em tijolos e fragmentos de rochas, mexilhões menores (4-9 mm). Estes se encontravam distribuídos de maneira esparsa e somente são possíveis de serem visualizados com bastante aproximação, isto é, retirando o substrato da água, lavando-o e fazendo uma inspeção visual em terra.

Exemplares de *L. fortunei* foram coletados em substratos fixos e incrustados sobre flutuadores que delimitam a área da Usina Hidrelétrica de Volta Grande. As coletas foram realizadas manualmente e os indivíduos coletados foram acondicionados em sacolas de pano e levados também sobre os substratos em que se encontravam. Foram transportados em uma caixa de

isopor com capacidade para 20 L contendo água do reservatório e um aerador para oxigenar a água durante o transporte.

No laboratório, os indivíduos foram mantidos na caixa de isopor com capacidade para 20 L com aeração constante até o momento da realização dos ensaios.

Por medida sanitária e de biossegurança, todo o processo foi submetido a um rígido controle, evitando-se, assim, eventual risco de disseminação de indivíduos de *L. fortunei* através da rede pluvial ou do sistema de tratamento de água. Além disso, todo material utilizado, tanto na coleta como na parte experimental, após seu uso foi desinfetado com soluções de hipoclorito de sódio a 12%.

A figura 4.2 mostra o painel de imagens demonstrando o procedimento adotado para a realização de coleta do *Limnoperna fortunei*.



Figura 4.2 - A) local de coleta, B) exemplares de mexilhões, C) sacolas de pano com mexilhões dentro e D) local de aclimatização dos mexilhões coletados (Elaboração da autora).

4.2.2 Extração pelo Método de Maceração

Ao chegarem ao laboratório, os mexilhões dourados passaram por um processo de limpeza com água corrente, foram pesados e as partes moles dos animais foram separadas das conchas com o auxílio de uma espátula. Toda concha do animal foi descartada segundo as normas de segurança para evitar contaminação local.

Em seguida, eles foram pesados (7,02 g a ser usado com o solvente escolhido) e imersos em um recipiente fechado com 200 ml de metanol a temperatura ambiente por um período de 72 horas. O processo de agitação magnética se fez a cada 12 horas.

A fim de evitar o uso de indivíduos em más condições, utilizou-se somente os mexilhões com as conchas inteiras e os que se encontravam fixados ao substrato do isopor. Cada indivíduo foi utilizado somente uma vez.

A agitação ocasional do solvente auxilia a difusão e também garante a dispersão da solução concentrada acumulada ao redor da superfície das partículas, trazendo assim as partículas frescas dissolvidas para a superfície para posterior extração. Um recipiente fechado é usado para evitar a evaporação do solvente durante o período de extração.

A figura 4.3 representa a amostra no agitador magnético:



Figura 4.3 - Amostra no agitador (Elaboração da autora).

Segundo as normas de segurança, o primeiro passo é não descartar restos de amostras diretamente na rede de esgotos comuns. Na fase larval, não é possível visualizar o mexilhão. Assim, qualquer amostra de água, coletada em corpos hídricos, contaminados ou sob suspeita de contaminação, devem receber cuidados especiais que garantam a eliminação de qualquer forma de propagação. Desta forma os resíduos de coleta oriundos de áreas de risco, como triângulo mineiro e sul do estado de Minas Gerais, áreas localizadas próximo aos locais onde já se encontra o mexilhão, devem passar por severo controle de desinfecção. Assim pedaços

de plantas aquáticas devem ser enterrados e os restos de amostras devem ser descartados em fossa seca. As vidrarias devem ser desinfetadas em HCl 10% (CAMPOS, RUCKERT, & ROLLA, 2003).

4.2.3 Extração pelo Método de Soxhlet

O soxhlet foi a ferramenta usada neste segundo processo de extração. Partes moles de novos mexilhões foram pesadas (6,98 g a ser usado com o solvente escolhido) e colocadas completamente envoltas em um papel filtro. Deve-se prender bem o papel filtro para que nenhuma parte do mexilhão consiga se soltar durante o processo de extração.

Esta ferramenta consiste em várias partes, incluindo uma fonte de calor, frasco de fundo redondo, extrator de soxhlet e condensador. Em escala de laboratório, essas ferramentas são combinadas para extrair os mexilhões. A amostra é colocada em um extrator de soxhlet que foi envolto em um dedal e o metanol é despejado em um frasco de destilação. A utilização de dispositivos condensadores neste método de extração visa condensar o solvente evaporado para que possa ser reaproveitado.

Após cerca de 10 minutos, inicia-se a evaporação do solvente. O processo continua até que a amostra seja completamente extraída. O extrato no frasco é então processado. A figura 4.4 mostra o papel filtro envolto com os mexilhões no Soxhlet.

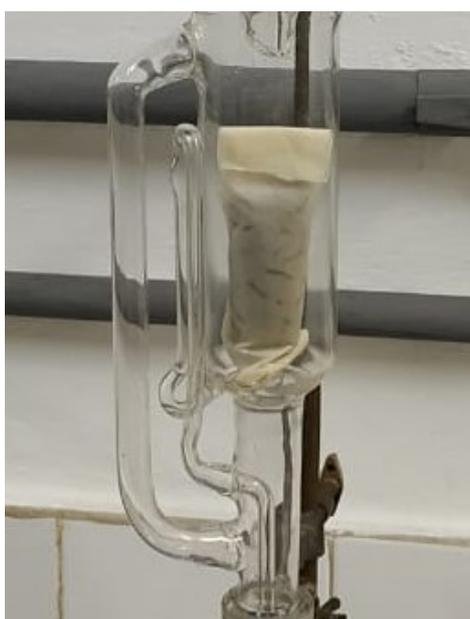


Figura 4.4 - Papel filtro com os mexilhões (Elaboração da autora)

4.2.4 Concentração dos extratos – Evaporação rotativa (Rotavapor)

Os extratos metanólicos foram concentrados em compostos de xarope utilizando o equipamento Rotavapor de extração líquido-líquido. Um evaporador rotativo é um equipamento usado principalmente para remover solvente de uma amostra por meio de “evaporação sob pressão reduzida”. A presença de pressão reduzida no aparelho faz com que o solvente (no balão de fundo redondo) ferva a uma temperatura inferior à normal. Ao girar o frasco de fundo redondo aumenta a área de superfície do líquido e, portanto, a taxa de evaporação. O vapor do solvente viaja para o condensador de água mais frio, onde se condensa e pinga em um frasco receptor separado. Este processo é como o solvente é removido, deixando um composto concentrado no frasco original de fundo redondo. A temperatura média utilizada foi de 75°C, suficientes para que o solvente entrasse em ebulição.

A figura 4.5 mostra os componentes de um Rotavapor, onde A) Frasco de fundo redondo B) Banho-maria C) Motor rotativo F) Condensador de água G) Frasco receptor/reservatório coletor H) Torneira de conexão da bomba de vácuo.

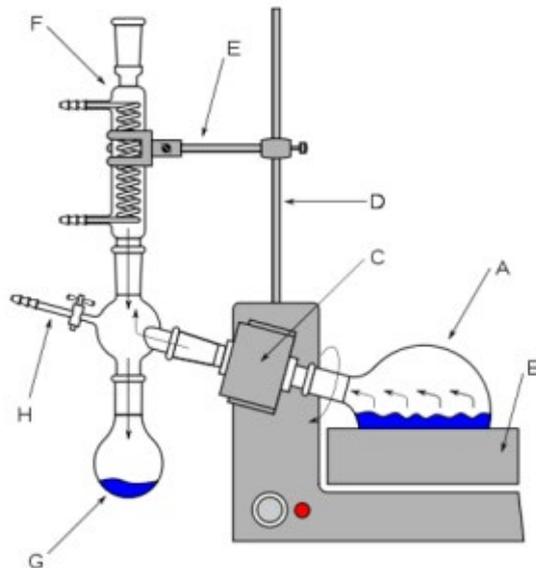


Figura 4.5 - Desenho esquemático de um Rotavapor (JUSTINO, DUARTE, C, D, & ROCHA-SANTOS, 2014)

A evaporação rotativa é frequentemente usada para remover solventes com pontos de ebulição relativamente baixos de uma amostra. Isso ocorre porque um rotavapor é simples de usar, relativamente rápido para obter a remoção do solvente (dependendo do volume e do solvente)

e é encontrado na maioria dos laboratórios orgânicos. Também é muito mais eficiente do que a evaporação sob pressão atmosférica.

Dessa forma, com os 2 extratos já concentrados, foi possível obter um volume considerável para as amostras que foram extraídas utilizando o metanol nos processos de maceração e de Soxhlet.

4.2.5 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Metabólitos secundários podem ser definidos como compostos que não estão diretamente envolvidos com o crescimento e desenvolvimento dos organismos, mas são essenciais para a sobrevivência e continuidade da espécie. Devido a sua grande diversidade estrutural (alcalóides, terpenóides, glicosídeos, fenóis, policetídeos, produtos da síntese de ácidos graxos, peptídeos) e o alto grau de dificuldade de análise (matrizes de alta complexidade), o avanço instrumental para a análise de metabólitos secundários é necessária. Até o presente momento, técnicas multidimensionais não-abrangentes como CG/EM, são umas das mais utilizadas para este tipo de análise.

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa é uma poderosa ferramenta analítica para o controle de qualidade de ativos e formas farmacêuticas. Apresenta elevada exatidão nos resultados, permitindo a identificação e/ou a quantificação dos compostos presentes com confiabilidade.

A espectrometria de massa é uma técnica analítica poderosa usada para identificar e quantificar analitos usando a razão massa-carga (m/z) de íons gerados a partir de uma amostra. É útil para a análise de uma ampla gama de analitos clinicamente relevantes, incluindo pequenas moléculas, proteínas e peptídeos. Quando a espectrometria de massa é acoplada ao cromatógrafo gasoso, os analisadores, como o quadrupolo, expandem as capacidades analíticas com amplas aplicações clínicas. Além disso, devido à sua capacidade de identificar e quantificar proteínas, a espectrometria de massa é amplamente utilizada no campo da proteômica.

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação, amplamente empregada para a análise qualitativa e quantitativa de misturas complexas. Nela, a separação é baseada no ponto de ebulição dos analitos. Após a separação, as moléculas são direcionadas para fonte de íons por

impacto de elétrons, onde um filamento produz uma descarga eletrônica capaz de ionizá-las. Estes íons produzidos são direcionados para o analisador quadrupolar.

A função do analisador de massas é separar os íons formados na fonte de ionização, de acordo com suas respectivas razões massa-carga (m/z).

O analisador de massa quadrupolo consiste em quatro hastes condutoras paralelas de seção transversal hiperbólica espaçadas em torno de um eixo central ao longo do qual os íons são conduzidos. As hastes são conectadas a geradores de radiofrequência (RF) e de corrente contínua (DC), e as hastes adjacentes são de fase de RF oposta. Para um determinado conjunto de potenciais de RF e DC, apenas íons dentro de uma faixa estreita de m/z terão uma trajetória estável e atingirão o detector; todos os outros íons atingirão os bastonetes e serão neutralizados. O quadrupolo funciona como um filtro, que permite que os fragmentos de diferentes valores de m/z cheguem com tempos diferentes ao detector (multiplicadora de elétrons) e, desta forma, possam ser diferenciados (SIEGEL, SAUKKO, & HOUCK, 2013).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/EM) é o método mais padronizado em metabolômica, com quase 50 anos de protocolos estabelecidos para análises de metabólitos e muitos outros intermediários do metabolismo primário. Hoje, chamamos esse perfil de “metabolômica” para enfatizar a necessidade de identificar e quantificar todas as pequenas moléculas que estão presentes em uma determinada situação biológica e usar esses perfis como saída da maquinaria celular em resposta a perturbações genéticas ou ambientais (FIEHN, 2016).

A biblioteca NIST14 compreende espectros de massa GC/EM para 242.477 compostos únicos, dos quais aproximadamente um terço registrou tempos de retenção padronizados, permitindo o uso de dois parâmetros ortogonais (espectral de massa e correspondência de índice de retenção) para identificação de compostos.

Além dessas bibliotecas padronizadas, o GC/EM possui vantagens específicas que levaram a rotular essa tecnologia como o “padrão ouro” em metabolômica, (LU, LIANG, DUNN, SHEN, & KELL, 2008) ou seja, o método contra o qual as abordagens mais recentes devem ser comparadas no que diz respeito à amplitude, sensibilidade e especificidade das detecções de metabólitos. Mais notavelmente, a ionização de elétrons leva a padrões de fragmentação

complexos e ricos que podem ser explorados para aumentar a especificidade na correspondência espectral de massa.

O cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa com analisador de quadrupolo da Shimadzu modelo GCMS-QP2020 NX, foi usado para identificar os compostos nos extratos do mexilhão dourado. Amostras de 2 mg do extrato do *Limnoperna fortunei* foram submetidos à cromatografia gasosa diluídas em 1 mL de metanol. A separação foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida RTX-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas em 250 e 300 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi mantida a 50°C por 5 min, aumentada para 280°C a uma taxa de 3°C/min, e então mantida constante por 23 min. Hélio de alta pureza (99,9999%), a uma vazão constante de 1 mL/min, foi usado como gás de arraste, e a injeção foi feita usando um modo split com divisão: 5,0 e tempo de equilíbrio: 1,0 min. Uma análise espectral de massa de impacto de elétrons foi realizada em energia de ionização a 280 °C. A detecção foi realizada no modo de varredura do Scan (m/z) entre 37 e 660 amu. A hora de início: 2,60 min, hora de término: 97,60 min, unidade de entrada de amostra: GC.

Foi aplicada o método de padronização interna com objetivo de identificar os analitos voláteis por retenção relativa.

O método da padronização interna (MPI) atenua os problemas oriundos da incerteza do volume de amostra aplicado e consiste em adicionar às soluções usadas para obter a curva analítica um composto, de forma que sua concentração seja a mesma em todas as soluções. Este composto é denominado de padrão interno (PI). É um método muito útil pois independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como por exemplo a temperatura da coluna e tamanho da amostra (VALENTE, AUGUSTO, & RIEDO, 2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A equipe de pesquisadores da área de Engenharia de Materiais UFOP/Ouro Preto ligados ao Projeto GT 604 esta alocada no Laboratório de Difração de Raios X e Crescimento de Cristais do Departamento de Física – DEFIS do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas – ICEB da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, Campus Morro do Cruzeiro. A equipe é multidisciplinar composta pelas especialidades de Física e Engenharias de Materiais, Ambiental e Civil. A equipe trabalha com a investigação de biomateriais, os resultados da análise experimental dos extratos brutos obtidos pelos métodos de extração são aqui apresentados e foram elaborados pelos mesmos. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foi utilizada de forma exploratória para identificar os componentes dos extratos metanólicos do mexilhão dourado.

No momento da coleta dos mexilhões foram realizadas amostras de água e mensurados os parâmetros físicos e químicos: temperatura, potencial hidrogeniônico, turbidez, potencial de oxidação/redução e condutividade.

- Temperatura da água (29,2 °C);
- Porcentagem de Oxigênio dissolvido na água (45,50 %);
- Condutividade elétrica (40,3 \square S/cm – microsiemens por centímetro);
- Potencial hidrogeniônico – grau de acidez e alcalinidade (7,47 pH);
- Turbidez (0,11 NTU - *Nephelometric Turbidity Unity*).

5.1 Extração pelo método de maceração

A extração é o primeiro passo para separar os produtos naturais desejados das matérias-primas. A extração de produtos naturais passa pelas seguintes etapas: o solvente penetra na matriz sólida; o soluto se dissolve nos solventes; o soluto é difundido para fora da matriz sólida; os solutos extraídos são recolhidos.

Foram utilizados 71,34 g de mexilhões para esta etapa. Como já escrito antes, os mexilhões dourados passaram por um processo de limpeza com água corrente, foram pesados e as partes moles dos animais foram separadas das conchas com o auxílio de uma espátula. A massa dos corpos dos mexilhões utilizada nesse processo de extração por maceração foi de 7,02g.

Podemos observar na figura 5.1 o início, o meio e o fim do experimento onde a extração já pode ser vista a olho nu nos recipientes de vidro. Sendo assim possível visualizar a diferença na coloração e na turbidez do metanol decorrido os tempos de 24 h, 48 h e 72 h do início do procedimento da extração pelo método de maceração.



Figura 5.1 - Resultado das extrações (Elaboração da autora)

Passadas 72 horas desde o início do experimento, percebe-se a intensa turbidez e coloração amarelada na amostra, onde podemos esperar um maior rendimento e efetividade do processo de extração para este intervalo de tempo.

O metanol extraído pelo evaporador rotativo no final do processo de extração foi guardado em frascos de vidro e armazenado na estufa do laboratório de química, seguindo procedimentos de segurança do mesmo para que em experimentos futuros ele possa ser utilizado.

5.2 Extração pelo método de Soxhlet

Novos mexilhões inteiros foram pesados. Foram utilizados 67,62 g de mexilhões para esta etapa. A massa dos corpos dos mexilhões utilizada nesse processo de extração pelo método de Soxhlet foi de 6,98 g. A parte mole foi então completamente envolta em um papel filtro para que coubesse no reservatório de vidro do extrator, também conhecido como dedal, para conter a amostra durante o processo de extração.

A figura 5.2 mostra o experimento de extração dos mexilhões utilizando o Soxhlet:

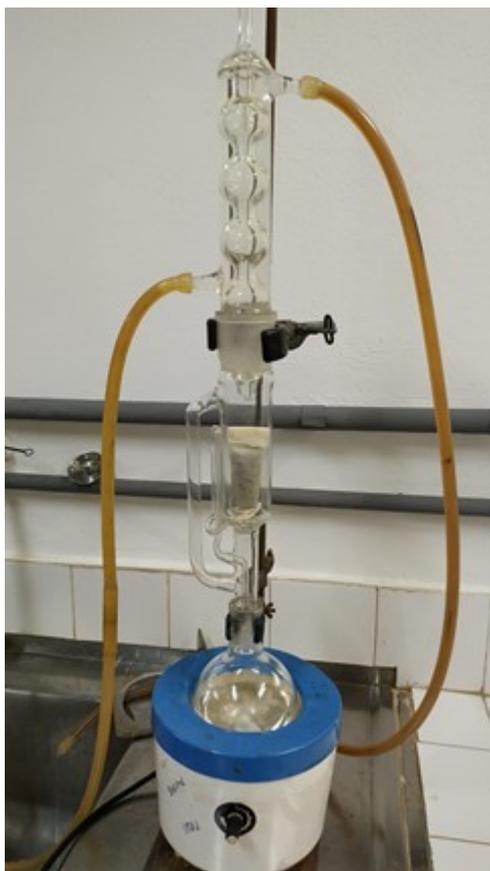


Figura 5.2 - Extração com Soxhlet (Elaboração da autora).

O experimento na extração teve seus ciclos de sifonada analisados através do comportamento em função do tempo e temperatura.

O vapor do metanol passa por um braço de destilação e enche a câmara onde se encontra o dedal com a amostra dos mexilhões. No momento em que quase todo o espaço da câmara central se encontra preenchido pelo metanol, esta é esvaziada pelo sifão. O metanol retorna então ao balão de destilação, completando o ciclo da extração. O dedal assegura que a rápida movimentação do solvente não arraste partículas sólidas para o balão. Este ciclo é repetido várias vezes até que o composto seja completamente extraído. Completado o tempo de 4 horas, o experimento foi interrompido. Após a extração, o metanol foi removido utilizando um evaporador rotativo, a parte não solúvel da amostra manteve-se no dedal, sendo depois descartada.

Quanto maior o tempo de extração, maior será o rendimento. A solubilidade dos materiais é elevada com o aumento da temperatura, na maior parte dos casos, ampliando assim a

facilidade da extração, dispondo de uma taxa de extração mais alta (RICHARDSON, HARKER, & BACKHURST, 2002).

Os compostos bioativos marinhos são obtidos principalmente por extração com solvente e extração Soxhlet, mas outras metodologias de extração podem ser empregadas, como extrações aquosas, ácidas e alcalinas (JUSTINO, DUARTE, C, D, & ROCHA-SANTOS, 2014).

5.3 Análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) dos extratos obtidos

Depois de passar pelo evaporador rotativo, as amostras obtidas pelos métodos de maceração e Soxhlet foram analisadas via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

As figuras 5.3 e 5.4 representam os cromatogramas de íons totais dos dois métodos de extração utilizados. A figura 5.3 é o Cromatograma do íon total do extrato do mexilhão dourado obtido via extração por maceração utilizando metanol como solvente (no eixo x é mostrado o tempo em minutos e no eixo y a intensidade, cps). A figura 5.4 representa o Cromatograma do íon total do extrato do mexilhão dourado obtido via extração pelo método de Soxhlet utilizando metanol como solvente (no eixo x é mostrado o tempo em minutos e no eixo y a intensidade, cps).

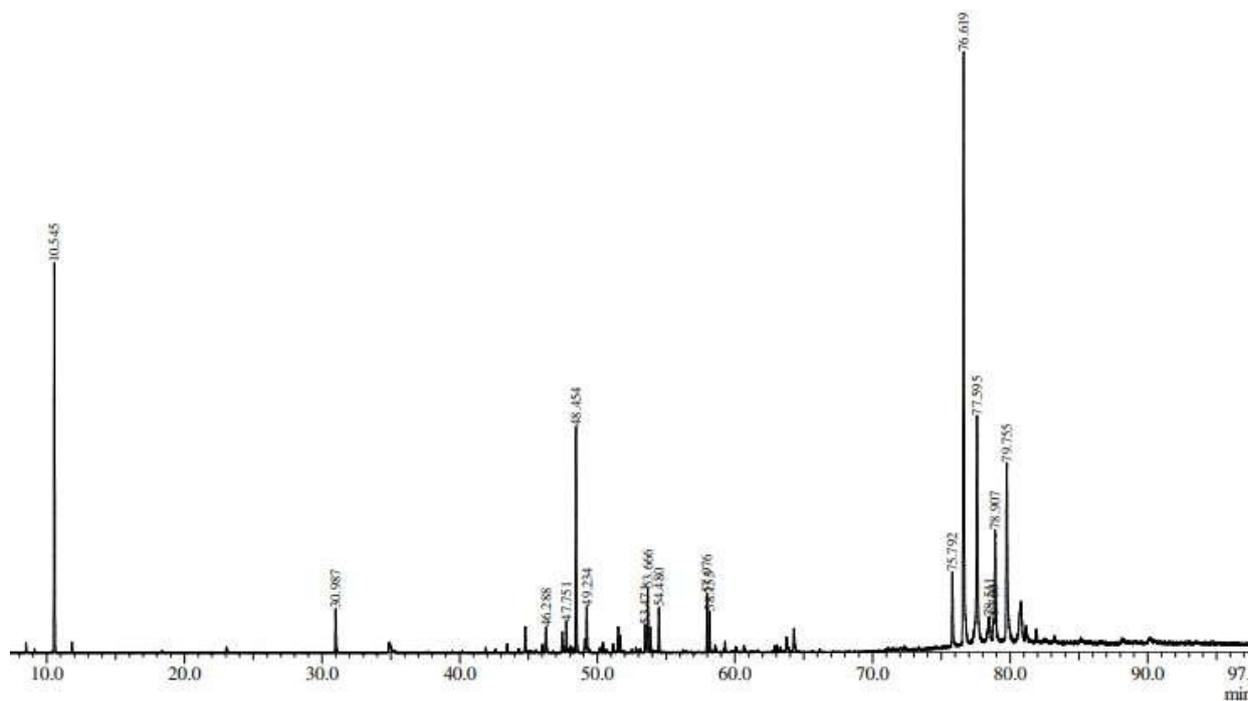
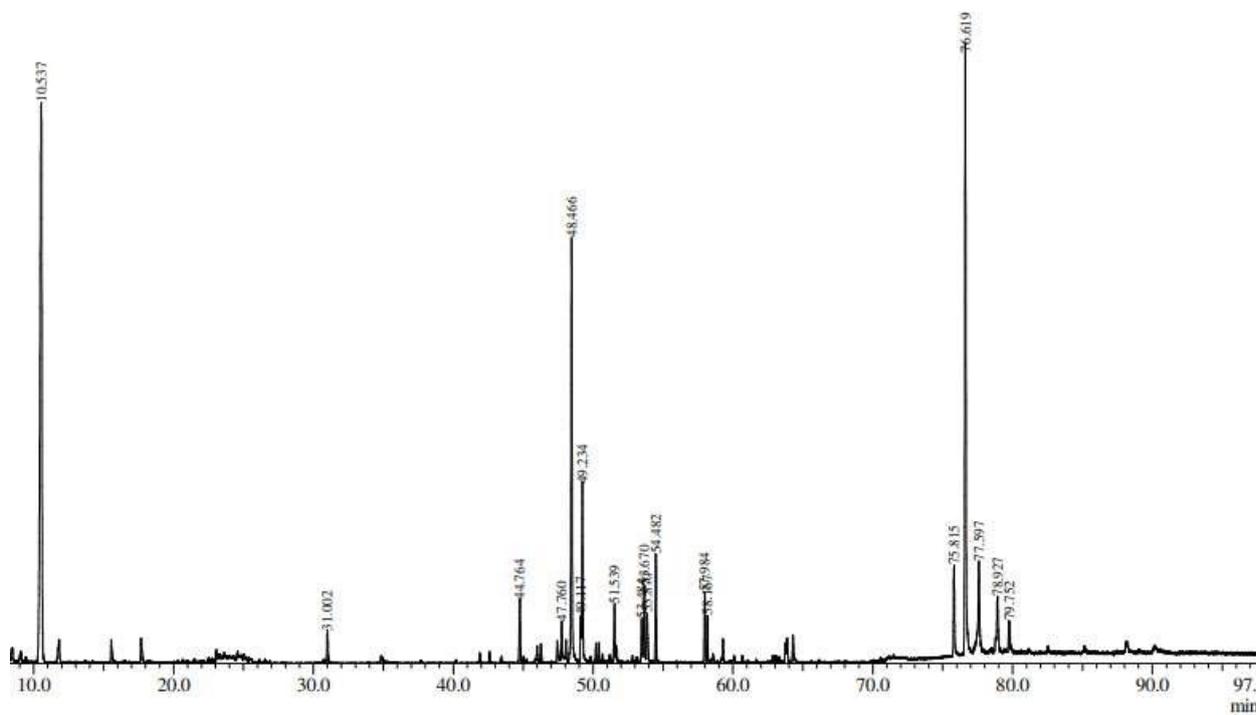


Figura 5.3 - Cromatograma via extração por maceração (Elaboração da autora).



A tabela 5.1 apresenta todos os 98 compostos identificados nos extratos do mexilhão dourado e a composição química individual de cada composto obtido utilizando os métodos de extração por maceração e Soxhlet.

Na análise feita a partir do extrato utilizando o solvente metanol e o Soxhlet foram identificados 74 compostos, já na análise feita a partir do extrato metanólico e utilizando o método de maceração foram identificados 72 compostos. Desses, 48 compostos foram encontrados tanto na extração pelo método de Soxhlet quanto pelo método de maceração.

Tabela 5.1 - Resultados obtidos depois da leitura do cromatograma (Elaboração da autora e adaptado de PUBCHEM (2021)).

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Maceração	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	110-42-9	Decanoato de metila	Ésteres
Maceração	C ₁₂ H ₁₈	61227-88-1	5-etil-3-metil-3,4-nonadien-6-ino	Hidrocarboneto
Maceração	C ₁₂ H ₂₂	6975-99-1	6-Dodecine	Hidrocarboneto
Maceração	C ₁₂ H ₂₂	5876-87-9	1,11-Dodecadieno	Hidrocarboneto
Maceração	C ₁₄ H ₂₆	35216-11-6	7-Tetradecina	Hidrocarboneto
Maceração	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1731-88-0	Tridecanoato de metila	Ésteres
Maceração	C ₁₅ H ₂₄	13877-93-5	Cis-cariofileno	Hidrocarboneto
Maceração	C ₁₆ H ₂₆	71673-32-0	1,11-Hexadecadiyne	Hidrocarboneto

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Maceração	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	62691-05-8	(S) -12-Metiltetradecanóico éster metílico	Ésteres
Maceração	C ₁₈ H ₂₆ O	0-00-0	1,3-Bis-(2-ciclopropil, 2-metilciclopropil) -but-2-en-1-ona	Ésteres
Maceração	C ₁₈ H ₃₄ O	54467-85-5	2-Octilciclopropeno-1-heptanol	Álcoois
Maceração	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	6929-04-0	15-metilhexadecanoato de metila	Ésteres
Maceração	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	112-61-8	Estearato de metila	Ésteres
Maceração	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	84494-70-2	Éster etílico de ácido eicosapentaenóico	Ésteres
Maceração	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	56599-50-9	2- (7-Heptadeciniloxi) tetrahydro-2H-pirano	Ésteres
Maceração	C ₂₇ H ₄₆ O	80-99-9	Lathosterol	Fenóis
Maceração	C ₂₈ H ₄₄ O	57-87-4	Ergosterol	Fenóis
Maceração	C ₂₈ H ₄₄ O	6538.05.2	Ergost-4,7,22-trien-3alpha-ol	Fenóis

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Maceração	C ₂₈ H ₄₄ O	97583-19-2	Ergosta-4,7,22E-trien-3beta-ol	Fenóis
Maceração	C ₂₈ H ₄₆ O	2465.11.4	Stellasterol	Fenóis
Maceração	C ₅ H ₁₂ O	1565-80-6	(S) - (-) - 2-Metil-1-butanol	Álcoois
Maceração	C ₅ H ₁₂ O	137-32-6	2-metil-1-butano	Álcoois
Maceração	C ₉ H ₁₆	6191-90-8	1-Butilespiro [2.2] pentano	Hidrocarboneto
Maceração e Soxhlet	C ₁₀ H ₁₆	5989-54-8	(-) -Limoneno	Fenóis
Maceração e Soxhlet	C ₁₀ H ₁₆	5989-27-5	D-Limoneno	Fenóis
Maceração e Soxhlet	C ₁₂ H ₁₁ F ₂ NO ₅ S	0-00-0	1,1-Dioxidotetrahidrotien-3-il 2,6-difluorobenzoilcarbamato	Haleto Orgânicos
Maceração e Soxhlet	C ₁₂ H ₁₄ F ₂ O ₂	0-00-0	Ácido 3,4-difluorobenzoico, 3-metilbutil-2 éster	Haleto Orgânicos
Maceração e Soxhlet	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	110-38-3	Decanoato de etila	Ésteres

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Maceração e Soxhlet	$C_{13}H_{26}O_2$	627-90-7	Undecanoato de etila	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{14}H_{26}O$	65128-96-3	(Z) -Tetradec-7-enal	Aldeídos
Maceração e Soxhlet	$C_{15}H_{18}F_2O_2$	0-00-0	Ácido 2,6-difluorobenzoico, éster oct-3-en-2-ilo	Haletos Orgânicos
Maceração e Soxhlet	$C_{15}H_{30}O$	75853-51-9	13-Metiltetradecanal	Aldeídos
Maceração e Soxhlet	$C_{15}H_{30}O_2$	28267-29-0	Tridecanoato de etila	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{16}H_{32}O$	629-80-1	Hexadecana	Aldeídos
Maceração e Soxhlet	$C_{18}H_{34}N_2O_3$	0-00-0	Decil 4-carbamoil-1-piperidinaacetato	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{18}H_{34}O_2$	54546-22-4	Etil 9-hexadecenoato	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{18}H_{36}O$	638-66-4	Octadecanal	Aldeídos
Maceração e Soxhlet	$C_{18}H_{36}O_2$	628-97-7	Hexadecanoato de etila	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{19}H_{30}O_2$	73097-00-4	Estearidonato de metila	Ésteres

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Maceração e Soxhlet	$C_{19}H_{40}O$	1454-84-8	1-Nonadecanol	Álcoois
Maceração e Soxhlet	$C_{20}H_{26}F_2O_2$	0-00-0	Ácido 2,6-difluorobenzoico, éster tridec-2-inílico	Haletos Orgânicos
Maceração e Soxhlet	$C_{20}H_{30}O_2$	10417-94-4	Ácido eicosapentaenóico	Ácidos Carboxílicos
Maceração e Soxhlet	$C_{20}H_{32}O_2$	506-32-1	Ácido araquidônico	Ácidos Carboxílicos
Maceração e Soxhlet	$C_{20}H_{34}O_2$	1783-84-2	Ácido dihomo-gama-linolênico	Ácidos Carboxílicos
Maceração e Soxhlet	$C_{20}H_{38}O_2$	6512-99-8	Etil octadec-9-enoato	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{20}H_{38}O_2$	111-62-6	Oleato de etila	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{20}H_{38}O_2$	6114-18-7	Ácido 9-octadecenóico, éster etílico	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{20}H_{40}O_2$	111-61-5	Estearato de etila	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{20}H_{42}O$	629-96-9	1-Eicosanol	Álcoois
Maceração e Soxhlet	$C_{21}H_{34}O_2$	2566-89-4	Araquidonato de metila	Ésteres

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Maceração e Soxhlet	$C_{21}H_{36}O_4$	18465-99-1	1-Monolinolenoil-rac-glicerol	Álcoois
Maceração e Soxhlet	$C_{22}H_{32}O_2$	6217-54-5	Ácido docosaheptaenóico	Ácidos Carboxílicos
Maceração e Soxhlet	$C_{22}H_{36}O_2$	1808-26-0	Etil araquidonato	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{22}H_{44}O_2$	18281-05-5	Etil araquidato	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{27}H_{44}O$	92218-20-7	22-Desidrocolesterol	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{27}H_{46}O$	57-88-5	Colestero	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{28}H_{45}ClO_2$	7144-08-3	Cloroformato de colestero	Haletos Orgânicos
Maceração e Soxhlet	$C_{28}H_{46}O$	474-67-9	Brassicasterol	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{28}H_{46}O$	177962-83-3	Ergost-5,8 (14) - dien-3-ol	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{28}H_{46}O$	17472-78-5	Crinosterol	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{28}H_{48}O$	4651-51-8	22,23-Diidrobrassicasterol	Fenóis

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Maceração e Soxhlet	$C_{28}H_{48}O$	474-62-4	Campesterol	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{28}H_{48}O$	29944-53-4	3-metoxicolest-5-eno	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_{29}H_{48}O$	83-48-7	Estigmasterol	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{29}H_{50}O$	83-46-5	Beta-Sitosterol	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{29}H_{50}O$	29365-29-5	Fitoesteróis	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{29}H_{50}O_3$	41721-93-1	Colestano-3,5-diol, 5-acetato, (3beta, 5alpha) -	Fenóis
Maceração e Soxhlet	$C_{31}H_{50}Br_2O_2$	50633-49-3	Acetato de 22,23-dibromostigmast-5-en-3-il	Haletos Orgânicos
Maceração e Soxhlet	$C_{31}H_{50}O_2$	4651-48-3	Acetato de estigmasterol	Ésteres
Maceração e Soxhlet	$C_5H_{12}O$	123-51-3	Álcool isoamílico	Álcoois
Maceração e Soxhlet	$C_5H_{12}O$	71-41-0	1-pentanol	Álcoois
Maceração e Soxhlet	$C_{15}H_{24}Cl_2O_2$	0-00-0	Ácido dicloroacético, éster tridec-2-inílico	Haletos Orgânicos

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Soxhlet	C ₁₁ H ₂₂ O	0-00-0	trans-2-decen-1-ol, éter metílico	Ésteres
Soxhlet	C ₁₂ H ₁₈	74742-35-1	1,5-Bis (etenil) -3- metil-2- metilidene-ciclohexano	Hidrocarboneto
Soxhlet	C ₁₂ H ₂₄ O	112-54-9	Dodecanal	Aldeídos
Soxhlet	C ₁₃ H ₂₆ O	26537-04-2	1-dodeceno, 1- metoxi-	Ésteres
Soxhlet	C ₁₃ H ₂₆ O	10486-19-8	Tridecanal	Aldeídos
Soxhlet	C ₁₅ H ₁₀ F ₂ O ₃	0-00-0	2-acetilfenil 2,6- difluorobenzoato	Haletos Orgânicos
Soxhlet	C ₁₅ H ₃₀ O	26537-05-3	Éter, metil 1- tetradecenil	Ésteres
Soxhlet	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	2091-29-4	Ácido 9- hexadecenóico, (9Z)	Ácidos Carboxílicos
Soxhlet	C ₁₇ H ₃₄ O	15519-14-9	Éter, 1-hexadecenil metil	Ésteres
Soxhlet	C ₁₈ H ₃₂ O	56554-35-9	9,17- Octadecadienal, (Z) -	Aldeído
Soxhlet	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	60-33-3	Ácido linoleico	Ácidos Carboxílicos

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Soxhlet	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	506-21-8	Ácido linoelaídico	Ácidos Carboxílicos
Soxhlet	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	593-39-5	Ácido Petroselínico	Ácidos Carboxílicos
Soxhlet	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	2027-47-6	Ácido 9-octadecenóico	Ácidos Carboxílicos
Soxhlet	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	112-63-0	Linoleato de Metila	Ésteres
Soxhlet	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	2462-85-3	Linoleaidato de Metila	Ésteres
Soxhlet	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	1089325-29-0	(Z) -Etil heptadec-9-enoato	Ésteres
Soxhlet	C ₁₉ H ₃₈ O	26537-06-4	Éter, metil 1-octadecenil	Ésteres
Soxhlet	C ₂₀ H ₄₀ O	930-02-9	Éter Octadecil Vinílico	Ésteres
Soxhlet	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	10152-71-3	Metil 2 - ({2 - [(2-etilciclopropil) metil] ciclopropil} metil) ciclopropano-1-carboxilato	Ésteres
Soxhlet	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	5908-87-2	Etil docosanoato	Ésteres

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Classificação Química
Soxhlet	C ₂₇ H ₄₄	747-90-0	Cholesta-3,5-dieno	Hidrocarboneto
Soxhlet	C ₂₉ H ₄₈ O	0-00-0	Cholesta-22,24-dien-5-ol, 4,4-dimetil-	Álcoois
Soxhlet	C ₄ H ₁₀ ClN	107-99-3	2-cloro-N, N-dimetiletanamina	Haletos Orgânicos
Soxhlet	C ₄ H ₁₁ N ₃ O	55-85-6	2- (Dimetilamino) acetohidrazida	Aminas
Soxhlet	C ₅ H ₁₃ N ₃ S	86114-63-8	(2-Dimetilamino-etil) -tiourea	Aminas

O resultado da classificação por grupo químico de todos os compostos obtidos, é mostrado na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Quantidade de compostos em relação a sua classificação química (Elaboração da autora).

Classificação Química	Número de Compostos
Aminas	2
Aldeídos	7
Ácidos Carboxílicos	9
Álcoois	9
Haletos Orgânicos	9
Hidrocarbonetos	9
Fenóis	18
Classificação Química	Número de Compostos
Ésteres	35
Total	98

5.4 Possíveis aplicações dos compostos obtidos

Os moluscos são ricos em nutrientes essenciais e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e a alta ingestão dietética de mariscos e PUFAs tem sido associada a menor risco de doenças respiratórias crônicas e melhores resultados de saúde (SUMMER & BROWNE, et al., 2020).

Os moluscos marinhos são excelentes fontes de compostos nutricionalmente importantes, como ácidos graxos, aminoácidos e esteróis. Os ácidos graxos são essenciais para a vida, devido ao seu papel fundamental como uma boa fonte de energia, constituintes da membrana, bem como mediadores metabólicos e de sinalização (DATTA, 2015).

Cerca de 90% de nossas gorduras alimentares vêm na forma de triglicerídeos, que são compostos de ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos consistem em uma cadeia de átomos de carbono, com um grupo metil em uma extremidade e um grupo ácido na outra. Cada átomo de carbono tem um número de átomos de hidrogênio ligados a ele – o número exato de átomos de hidrogênio em cada carbono depende se a gordura é saturada ou insaturada (MANHEZI, BACHION, & PEREIRA, 2008).

A gordura é denominada “monoinsaturada” se houver uma ligação dupla e “poliinsaturada” se houver duas ou mais ligações duplas. O ômega-3 e o ômega-6 são ácidos graxos, ambos os tipos de gordura poliinsaturada.

Diferentes espécies de moluscos marinhos são geralmente ricas em compostos de ácidos graxos de ω -3 (especialmente ácido α -linolênico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico). As espécies de mexilhões de água doce, no entanto, incluem uma maior proporção de compostos de ácidos graxos de ω -6 (especialmente ácido linoleico e ácido araquidônico). A relação $\Sigma\omega 6/\Sigma\omega 3$ é de 2:4 em mexilhões de água doce, mas as espécies marinhas têm relações de 0,1:1,0 (HADFIELD e PAUL, 2001)

Os ácidos graxos ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) são componentes importantes das membranas celulares e são precursores de muitas outras substâncias no corpo, como aquelas envolvidas na regulação da pressão arterial e nas respostas inflamatórias. Há cada vez mais suporte para os ácidos graxos ômega-3 na proteção contra doenças cardíacas fatais e sabe-se que eles têm efeitos anti-inflamatórios, que podem ser importantes neste e em outras

doenças. Há também um interesse crescente no papel dos ácidos graxos ômega-3 na prevenção do diabetes e certos tipos de câncer (LUNN & THEOBALD, 2006).

O corpo humano é capaz de produzir todos os ácidos graxos de que necessita, exceto dois: ácido linoleico (LA) - um ácido graxo ômega-6 e ácido alfa-linolênico (ALA) - um ácido graxo ômega-3. Estes devem ser consumidos a partir da dieta e são denominados “ácidos graxos essenciais”. Ambos os ácidos graxos são necessários para o crescimento e reparo, mas também podem ser usados para produzir outros ácidos graxos. Por exemplo, ácidos araquidônicos (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). A disponibilidade de ácidos graxos polinsaturados linoléico (ômega 6) e alfa-linolênico (ômega3) para a espécie humana depende do fornecimento alimentar, sendo encontrados em óleos vegetais, sementes, peixes oleosos (por exemplo, salmão, cavala, arenque), ostras, carne, gema de ovo, margarinas, folhas e fitoplâncton. Uma vez que o fitoplâncton encontra-se no topo da cadeia alimentar marinha, todas outras formas marinhas de vida eventualmente tornam-se ricas nesses ácidos graxos. O ácido linoléico é importante no transporte de gorduras, manutenção da função e integridade das membranas celulares e age como imunógeno local. Também possui propriedades anti-inflamatórias e o sistema imune, sua falta pode causar erupção cutânea e prejudicar no crescimento, ou seja, ele é essencial na dieta. Já o ácido alfa-linolênico é benéfico a vários tipos de câncer, é responsável pela potencialização da maioria das atividades cerebrais, sua falta pode causar anormalidades neurológicas e está ligada a problemas de crescimento (HALIM e HALIM, 2020).

Os ácidos linoleico e linolênico são importantes na formação de prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos, que desempenham papel importante na mediação de reações imunológicas alérgicas e inflamatórias (TRUMBO & SCHLICKER, et al., 2005).

Desde 1929, os ácidos graxos essenciais (AGE) vem sendo estudados no que diz respeito aos problemas relacionados às lesões de pele. Tanto os ácidos graxos ω -3 como os ω -6 são importantes no que diz respeito a manutenção da rigidez da pele pois evitam a perda de água transepidérmica, garantindo assim a sua elasticidade e integridade (BELDA & POURCHET-CAMPOS, 1991).

Segundo (MANHEZI, BACHION, & PEREIRA, 2008):

No Brasil temos disponíveis as seguintes apresentações comerciais utilizadas no tratamento de feridas, genericamente denominadas pelos profissionais como AGE: Dersani® (Saniplan), Sommacare® (LM Farma) e Dermosan® (Sunny Day). Na formulação do Dersani® está descrita a seguinte composição: ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, lecitina de soja, vitamina A, vitamina E, ácido capróico e óleo de girassol (ácido linoléico). No Sommacare® estão descritos os seguintes componentes: óleo de soja hidrolisado, óleo de girassol (ácido linoléico), triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico. A formulação do Dermosan® indica como composição: ácido cáprico, ácido láurico, ácido linoléico, ácido caprílico, ácido capróico, ácido palmítico, ácido mirístico, lecitina de soja, palmitato de retinol (vitamina A) e acetato de tocoferol (vitamina E). Como pode ser visto, embora na apresentação comercial faça referência a composição de ácidos graxos essenciais está presente na formulação apenas um deles, o ácido linoléico.

As doenças cardiometabólicas são um fardo significativo para a saúde e a economia em todo o mundo, uma vez que contribuem para a mortalidade em indivíduos de todas as idades, raças e sexos. Com base na meta-análise, os PUFAs ω -3 e ω -6 são ácidos graxos essenciais ao funcionamento do organismo e, por não serem sintetizados no corpo humano, são consumidos principalmente por meio de fontes alimentares e suplementos nutricionais. A significância dos ω -3 na cardiometabólica é clara, ou seja, na redução de agentes inflamatórios que podem contribuir para a síndrome metabólica, além de serem essenciais na prevenção de doenças cardiovasculares como trombose. Similarmente, ω -6 são importantes na promoção da saúde cardiovascular, reduzindo os níveis de colesterol (HALIM e HALIM, 2020).

O ácido eicosapentaenóico (EPA), como um ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa ômega-3 (PUFA ω -3), é amplamente distribuído no corpo de vários produtos marinhos. Notavelmente, o EPA exibe muitas atividades fisiológicas importantes, que foram consideradas pelos pesquisadores como benéficas na prevenção ou tratamento de várias doenças, como aliviar doenças cardiovasculares, melhorar a função cognitiva e reduzir a pressão arterial. O EPA é vendido principalmente como suplementos de ω -3 em uma forma concentrada como ésteres etílicos (EE) ou triacilglicerol (TG). Curiosamente, nos últimos anos, as formas de fosfolipídios (PL) contendo EPA foram relatadas como tendo atividade fisiológica mais significativa em comparação com as formas TG ou EE (ZHANG & XU, et al., 2019).

Ele também é usado para doença da artéria coronária, depressão, sintomas da menopausa, transtorno de personalidade limítrofe e hipertrigliceridemia.

De acordo com Shi et al (2022) os fosfolipídios enriquecidos com EPA (EPA-PL) podem aliviar a síndrome metabólica regulando a expressão de genes associados ao metabolismo lipídico em camundongos ApoE^{-/-}. Também relatou que o EPA-PL exibiu efeitos protetores positivos contra a lesão renal induzida pela obesidade. Além disso, EPA-PL teve um efeito terapêutico significativo contra lesão renal aguda induzida por vancomicina. Além disso, EPA dietético e ácido docosahexaenóico (DHA) tiveram um efeito anti-hipertensivo positivo através da regulação do sistema renina-angiotensina em ratos com hipertensão (SHI & ZHANG, *et al.*, 2022).

O ácido docosahexaenóico (DHA) é um ácido graxo ômega-3. Pode ser encontrado no óleo de peixe oceânico frio e é sintetizado a partir do ácido α -linolênico. Tem um papel como substrato para a síntese de diferentes mediadores lipídicos bioativos, como resolvinas, maresinas e protectinas. Esses mediadores lipídicos estão envolvidos na regulação da inflamação, agregação plaquetária, imunidade, contração do músculo liso e função renal (CHEN, ESSELMAN, JUMP, & BUSIK, *et al.*, 2005).

Os efeitos anti-inflamatórios do DHA têm sido relatados em várias doenças inflamatórias, incluindo aterosclerose e artrite reumatóide (WELDON & MULLEN, *et al.*, 2007).

O DHA inibe a pancreatite aguda induzida pela ceruleína em ratos, reduzindo o edema pancreático, a atividade da mieloperoxidase, os níveis de peróxido lipídico e IL-6 e a ativação de NF- κ B. Esses estudos mostram que a atividade antioxidante do DHA pode contribuir para seu efeito inibitório na inflamação pancreática (CHUNG, LIM, & KIM, 2021).

O ácido graxo poliinsaturado ω -6, ácido araquidônico (AA) e seus metabólitos têm atraído muita atenção na biologia cardiovascular e do câncer, particularmente em relação a processos inflamatórios e doenças (WANG, *et al.*, 2021).

Ele está disponível em grandes quantidades em alimentos de origem animal: carnes, peixes, laticínios e ovos (ABEDI e SAHARI, 2014). Em humanos, o ácido araquidônico pode ser sintetizado por alongamento e saturação do ácido linoleico, um ácido graxo essencial.

O AA é uma potente molécula bioativa. Quando liberado dos fosfolipídios da membrana, é convertido em uma variedade de compostos bioativos, chamados eicosanóides. Esta família

de moléculas inclui prostaglandinas, leucotrienos e outros lipídios, que atuam como mediadores e reguladores da inflamação e cicatrização de feridas. Eles também contribuem para o tônus vascular, metabolismo lipídico, função da barreira epitelial, dor e muito mais (DENNIS & NORRIS, 2015). Por esse motivo, a lipidômica é um método popular na investigação de processos como inflamação e terapias anti-inflamatórias (MAZALEUSKAYA, et al., 2016). Recentemente, um desses eicosanóides (12-HETE) foi identificado como uma enterosina, uma molécula bioativa capaz de controlar o sistema nervoso entérico (ENS) e contribuir para o eixo intestino-cérebro (ABOT, et al., 2021).

O ácido araquidônico e outros ácidos graxos poliinsaturados são essenciais para o desenvolvimento, reparo e manutenção do cérebro e para a proteção dos neurônios (LIU & GREEN, et al., 2015). Embora os resultados sejam inconclusivos, estudos exploraram o papel do ácido araquidônico e dos eicosanóides na depressão (GOPALDAS, et al., 2019), esclerose lateral amiotrófica (ELA) (GREGORY, et al., 2020), doença de Alzheimer (GOOZEE, et al., 2017), doença de Parkinson (WILKOMMEN, et al., 2018) e transtorno bipolar (RAPOPORT, 2014). A pesquisa mostra que os suplementos de ácido araquidônico também podem ter um efeito benéfico na disfunção cognitiva (KOTANI, et al., 2006).

Investigações metabolômicas e lipidômicas recentes sobre os efeitos do vírus SARS-CoV-2 revelaram uma ligação a desequilíbrios nos níveis de ácido araquidônico e eicosanóides. O ácido araquidônico foi identificado como um marcador da gravidade da doença (BARBERIS, et al., 2020), levando os autores a concluir que a fosfolipase A2 pode ser um alvo potencial para o tratamento de COVID-19. As propriedades antivirais sugeridas do ácido araquidônico e metabólitos relacionados também levaram à sua recomendação como potencial terapêutico (DAS, 2020).

Lyprinol é um extrato lipídico patenteado do mexilhão de lábios verdes (*Perna canaliculus*) endêmico da Nova Zelândia, foi lançado no mercado mundial em 1998 como um agente anti-inflamatório prontamente e livremente disponível. Desde então, ele tem sido submetido a uma série de ensaios clínicos para estudar seus efeitos na osteoartrite, artrite reumatóide, asma e câncer (SUKUMARAN, et al., 2010). Lyprinol contém os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 ácido eicosapentaenóico, ácido docosahexaenóico e ácido 7,11,14,17-eicosatetraenóico, que são estruturalmente semelhantes ao ácido araquidônico, o precursor dos agentes inflamatórios prostaglandinas e leucotrienos. O Lyprinol presumivelmente inibe a enzima ciclooxigenase e

a enzima lipoxigenase competitivamente, reduzindo os níveis de prostaglandinas e leucotrienos, exercendo assim sua função anti-inflamatória (DOGGRELL, 2011).

Os esteróis e estanois vegetais também são conhecidos como fitoesteróis, que são componentes bioativos cuja estrutura é semelhante à do colesterol; os esteróis são as formas insaturadas (sitosterol e campesterol), e os estanois são os derivados saturados (sitostanol e campestanol). Seu principal papel é reduzir o colesterol LDL, inibindo a absorção intestinal do colesterol. Eles são encontrados naturalmente em frutas, vegetais, óleos vegetais, nozes e sementes (POLI & MARANGONI, 2021).

Muitas pesquisas relataram que os fitosteróis possuem uma ampla variedade de propriedades farmacológicas interessantes, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antidiabéticos, quimiopreventivos e antiateroscleróticos (SALEHI, et al., 2021).

Resumidamente, os fitosteróis (PSs) são moléculas biologicamente ativas com múltiplas aplicações na saúde, e evidências crescentes têm mostrado que a sua atividade depende de vários critérios, como formulação e solubilidade na matriz alimentar (POUDEL, et al., 2019). No entanto, como os humanos não podem sintetizar PSs, eles devem obtê-los da dieta.

Há cada vez mais evidências científicas que apoiam a ideia de que os PSs e seus derivados têm múltiplas propriedades farmacológicas, incluindo habilidades de promoção do bem-estar humano. Esses benefícios para a saúde incluem uma grande capacidade de reduzir os níveis de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuindo assim o risco de muitas doenças (PLAT, et al., 2019). Além disso, os PSs também modulam a inflamação, têm efeitos antioxidantes, antiúlcera, imunomoduladores, antibacterianos, antifúngicos, intervêm na cicatrização de feridas e inibição da agregação plaquetária (OGBE, et al., 2015).

Experimentos em animais e métodos celulares mostraram que os PSs podem conferir um grande número de efeitos biológicos, incluindo agentes quimiopreventivos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antidiabéticos, antiateroscleróticos e cardioprotetores.

Vários estudos relataram que os PSs possuem propriedades anticancerígenas através da interação com vários alvos e vias celulares.

O β -sitosterol isolado de *Asclepias curassavica* foi relatado como eficaz no câncer colorretal em uma abordagem relacionada à dose (BASKAR, IGNACIMUTHU, PAULRAJ, & NUMAIR, et al.). Vários experimentos também revelaram que β -sitosterol é eficaz em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (HERBST, et al., 2010) e induziu significativamente a redução da viabilidade celular em células de câncer do colo do útero (HeLa) em uma abordagem relacionada à dose, interferindo na fragmentação do DNA através do aparecimento de uma população de células sub-G1 (ALVAREZ-SALA, et al., 2019).

Estudos in vivo provaram que o estigmasterol pode inibir vários mediadores pró-inflamatórios e de degradação da matriz envolvidos no desencadeamento da degradação da cartilagem induzida pela osteoartrite, pelo menos em parte através da inibição da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (GABAY, et al., 2010).

Várias investigações também explicaram um papel modulador dos PSs na aterosclerose devido aos seus efeitos anti-inflamatórios (NASHED; YEGANESH, et al., 2005).

Em um estudo in vitro, Alvarez-Sala et al. (2019) utilizaram uma mistura de PS selecionada, composta de β -sitosterol, campesterol, estigmasterol ou β -criptoxantina (β -Cx), e observaram que os PSs preveniram a eriptose, reduziram o influxo de Ca^{2+} , a superprodução de ROS, a depleção de GSH e a hemólise. No entanto, quando ambos os compostos bioativos foram coincubados, eles impediram completamente a hemólise, a eriptose e a depleção de GSH e, portanto, podem ser considerados candidatos promissores para a cura de doenças associadas à eriptose (ALVAREZ-SALA, et al., 2019).

Mais recentemente, Schepers et al. (2020) destacaram em um artigo de revisão efeitos neuroativos proeminentes de PSs derivados de origem marinha. Como principais afirmações, os autores destacaram claramente a capacidade do fucosterol, 24(S)-saringosterol, sitosterol e estigmasterol de reduzir a formação de placas $\text{A}\beta$; a capacidade do fucosterol e do 24(S)-saringosterol de neutralizar os déficits de memória; a capacidade do fucosterol de aumentar os níveis de acetilcolina no cérebro; e a capacidade de 24(S)-saringosterol de aumentar a depuração de $\text{A}\beta$ (SCHEPERS, et al., 2020).

A investigação fitoquímica nas raízes de *Indigofera heterantha* resultou no isolamento de dois compostos identificadas como β -sitosterol e Estigmasterol com base em técnicas

espectroscópicas e comparando suas propriedades físicas relatadas na literatura. Os testes biológicos revelaram que o β - sitosterol apresentou atividade antidiabética significativa enquanto o Estigmasterol apresentou boa atividade estabilizadora de membrana em HRBC (ZEB; KHAN, et al., 2017)

O ergosterol é uma componente chave nas membranas celulares dos fungos, mas ausente nas dos animais. Tornou-se um alvo muito útil para drogas antifúngicas. O ergosterol também está presente nas membranas celulares de alguns protistas, como os tripanossomas, tornando-o base para o uso de alguns antifúngicos contra a doença do sono da África Ocidental (NV, YAN, & JIANG, 2016)).

Pelos resultados obtidos experimentalmente na pesquisa de Galvao et al. (2003), evidencia-se uma boa correlação entre o conteúdo de ergosterol e biomassa fúngica metabolicamente ativa. O teor de ergosterol pode indicar o crescimento fúngico e, dessa forma, ser utilizado como bioindicador de contaminação por herbicida (GALVAO, GUERREIRO, SOUZA, & COURA, et al., 2003).

Ragasa et al (2018) relataram em seu artigo que o extrato diclorometano dos corpos de frutificação de *L. tigrinus* forneceu cerevisterol, e uma mistura de stellerol e ergosterol. Até onde se sabe, este é o primeiro relato sobre o isolamento de 1-3 dos corpos de frutificação de *L. tigrinus*. Estudos anteriores sobre extratos de *L. tigrinus* mostraram propriedades antibacterianas parcialmente atribuídas ao stellerol, que foi relatado como exibidor de propriedades antibacterianas. Além disso, o extrato de *L. tigrinus* indicou propriedades antioxidantes com o ergosterol contribuindo para esta bioatividade. Cerevisterol e stellerol foram relatados como possuindo atividade anti-inflamatória, enquanto stellerol e ergosterol mostraram propriedades anticancerígenas (RAGASA, et al., 2018).

A indústria farmacêutica está crescendo rápida e continuamente. Apesar do grande número de medicamentos produzidos a cada ano, a demanda pela descoberta de novos medicamentos é imperativa. A motivação para descobrir novos medicamentos inclui o advento de novas doenças e infecções.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho destaca que há uma escassez de pesquisas sobre a bioatividade de extratos e compostos de moluscos, principalmente os de água doce, considerando a alta diversidade de espécies deste filo e seu mérito como medicamentos tradicionais.

Na execução deste projeto experimental de caráter exploratório, o molusco *Limnoperna fortunei* foi submetido aos processos de extração pelos métodos de maceração e Soxhlet, ambos utilizando o metanol como solvente, possibilitando assim a obtenção e identificação de vários grupos de moléculas químicas.

Por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi possível identificar o perfil molecular dos extratos obtidos: na amostra obtida pelo método de maceração foram detectados e identificados 72 compostos químicos; na amostra obtida pelo método de Soxhlet foram 74. Desses compostos identificados, 48 são comuns às duas técnicas utilizadas. Foram identificados 98 compostos distintos, sendo caracterizados em 2 aminas, 7 aldeídos, 9 ácidos carboxílicos, 9 álcoois, 9 haletos orgânicos, 9 hidrocarbonetos, 18 fenóis e 35 ésteres.

O Filo Mollusca é uma fonte promissora de moléculas bioativas de importância clínica e científica, com alguns produtos atualmente no mercado para uso como medicamentos, suplementos e vários outros ainda em ensaios e desenvolvimentos clínicos. Como vimos nessa revisão, investigações guiadas por bioensaios e modelos in vivo demonstraram as propriedades de extratos de moluscos e componentes purificados com ação antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória, antiespasmódica, bloqueio neuromuscular, cicatrização de feridas e imunogênica; e seu potencial terapêutico na prevenção e tratamento de doenças respiratórias.

Os moluscos marinhos tornaram-se o foco de muitos estudos químicos destinados a isolar novos produtos naturais e metabólitos secundários. Como há poucas informações disponíveis sobre a química das espécies terrestres e de água doce, este trabalho se concentrou nos marinhos. A intensa pressão para encontrar e desenvolver novas moléculas bioativas para uso como fármacos continuará a impulsionar a bioprospecção de moluscos, especialmente em vista da atividade biológica com aplicações médicas que foram descobertas até o momento.

Por isso é tão importante aprofundar no estudo sobre o mexilhão dourado; identificar, determinar e extrair os seus compostos bioativos para o campo da pesquisa científica e farmacológica.

A ampliação do campo de pesquisa para abranger bivalves de água doce e algumas classes menores de moluscos pode valer a pena, dada a possibilidade de evolução divergente de vias metabólicas e pressões seletivas distintas para metabólitos secundários. Em particular, o *Limnoperna fortunei* seria digno de uma investigação mais aprofundada dada a sua disponibilidade, capacidade de sobreviver a diversos ambientes e devido a identificação de várias moléculas bioativas nele encontradas com potencial uso para uma variedade de aplicações medicinais.

Os produtos naturais provenientes dos moluscos fornecem uma nova e rica fonte de diversidade química que pode contribuir para a concepção e desenvolvimento de novas drogas terapêuticas potencialmente úteis. Os dados das literaturas disponíveis revelam que os moluscos não são apenas o recurso para descobrir vários agentes bioativos, mas também para identificar novos alvos celulares para a descoberta de medicamentos. Uma interação proativa entre pesquisadores, cientistas, setor farmacêutico e autoridades reguladoras governamentais é importante para a incorporação deste novo e desafiador agente biológico em aplicações clínicas.

Dessa forma, a pesquisa realizada poderá contribuir para futuros estudos sobre esse espécime que possui capacidades de sobrevivência a diversos ambientes e diferentes condições do meio.

Por último e não menos importante, gostaria de relatar que este trabalho foi desenvolvido durante a pandemia do COVID 19. Muitos esforços foram realizados para a chegada destes resultados. Dificuldades na obtenção de amostras e uso de laboratórios e técnicas analíticas impediram grande parte dos esforços destinados a ampliar a investigação principalmente no que diz respeito a moléculas bioativas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Para trabalhos futuros é sugerido realizar o mesmo experimento utilizando outros solventes e a mistura dos mesmos buscando melhorar os resultados da extração;
- Realizar outros processos de extração e comparar os resultados obtidos. Alguns métodos modernos de extração, como extração de fluidos supercríticos, extração líquida pressurizada e extração assistida por micro-ondas, também têm sido aplicadas na extração de produtos naturais, e oferecem algumas vantagens, como menor consumo de solventes orgânicos, menor tempo de extração e maior seletividade;
- Aprofundar na análise biotecnológica dessas moléculas, a fim de identificar metabólitos secundários com possíveis atividades biológicas, com grande potencial antifúngico, antibacteriano, anti-incrustante, farmacológicos e medicinais tais como: antioxidante, antialérgica, anticancerígena, antibacteriana, analgésicas, antibióticas, antimicóticas, imunomoduladoras, anti-inflamatória, tônicas, expectorantes e diuréticos.

REFERÊNCIAS

- ABEDI, E., & SAHARI, M. A. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food science & nutrition*.
- ABOT, A., WEMELLE, E., LAURENS, C., PAQUOT, A., POMIE, N., CARPER, D., . . . KNAUF, C. (2021). Identification of new enterosynes using prebiotics: roles of bioactive lipids and mu-opioid receptor signalling in humans and mice. *Gut Microbiota Original Research*, 70, 1078-1087.
- ABUBAKAR, A. R., & HAQUE, M. (Janeiro de 2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 1-10.
- AHMAD, T. B., LIU, L., KOTIW, M., & BENKENDORFF, K. (2018). Review of anti-inflammatory, immune-modulatory and wound healing properties of molluscs. *Journal Ethnopharmacol*, 156-178.
- AHMAD, T. B., RUDD, D., BENKENDORFF, K., MAHDI, L. K., PRATT, K. A., DOOLEY, L. W., & KOTIW, M. (2017). Brominated indoles from a marine mollusc inhibit inflammation in a murine model of acute lung injury. *PLoS ONE*(12).
- ALMEIDA, A. C., & BARBOSA. (et al., 2016). O invasor dourado. *Sei. Sou. Brasil* 164, 36-41.
- ALMEIDA, A. C., BARBOSA, N. P., SILVA, F. A., FERREIRA, J. A., CARVALHO, V. A., CARVALHO, M. D., & CARDOSO, A. V. (2016). O invasor dourado. *Sei. Sou. Brasil* 164, 36-41.
- ALVAREZ-SALA, A., ATTANZIO, A., TESORIERE, L., GARCIA-LLATAS, G., BARBERÁ, R., & CILLA, A. (2019). Apoptotic effect of a phytosterol-ingredient and its main phytosterol (β -sitosterol) in human cancer cell lines. . *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 70, 323-334.
- ALVES, R. R., & ALVES, H. N. (2011). The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 9.
- AMORIM, K., LAGE-YUSTY, M. A., & LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. (2012). Changes in bioactive compounds content and antioxidant activity of seaweed after cooking processing. *CYTA J. Food*, 10, 321-324.
- BADIU, D. L., LUQUE, R., DUMITRESCU, E., CRACIUN, A., & DINCA, D. (2010). Amino acids from *Mytilus galloprovincialis* (L.) and *Rapana venosa* molluscs accelerate skin

wounds healing via enhancement of dermal and epidermal neoformation. *Protein Journal*, 81-92.

BARBA, F. J., ZHU, Z., KOUBBA, M., & al, e. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by - products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, pp. 96-109.

BARBERIS, E., TIMO, S., AMEDE, E., VANELLA, V. V., PURICELLI, C., CAPPELLANO, G., . . . al, e. (2020). Large-Scale Plasma Analysis Revealed New Mechanisms and Molecules Associated with the Host Response to SARS-CoV-2. *International journal of molecular sciences* , 21(22), 1-25.

BARBOSA, N. P. (2018). Indicadores Ecológicos. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.01.005>.

BARBOSA, N. P., SILVA, F. A., OLIVEIRA, M. D., SANTOS-NETO, M. A., CARVALHO, M. D., & CARDOSO, A. V. (2016). *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): fi RST recorde na bacia do rio São Francisco, Brasil. *Lista de Verificação 12, 1846*.

BARBOSA, N. P., SILVA, F. A., OLIVEIRA, M. D., SANTOS-NETO, M. A., CARVALHO, M. D., & CARDOSO, A. V. (2016). *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): fi RST recorde na bacia do rio São Francisco, Brasil. *Lista de Verificação 12, 1846*.

BASKAR, A. A., IGNACIMUTHU, S., PAULRAJ, G. M., & NUMAIR, K. S. (s.d.). Chemopreventive potential of beta-Sitosterol in experimental colon cancer model--an in vitro and in vivo study. *BMC Compl. Alternative Med*, 24, 1-10.

BELDA, M. C., & POURCHET-CAMPOS, M. A. (1991). Ácidos Graxos Essenciais em nutrição: uma visão atualizada. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, pp. 3-4.

BENKENDORFF, K. (2014). Chemical diversity in molluscan communities: From natural products to chemical ecology. Em A. D. Cosmo, & W. Winlow, *Neuroecology and Neuroethology in Molluscs: The Interface between Behaviour and Environment* (pp. 13-41). New York: Nova Science Publishers.

BENKENDORFF, K., BREMNER, J. B., & DAVIS, A. R. (2000). Tyrian purple precursors in the egg masses of the Australian muricid, *Dicathais orbita*: A possible defensive role. *J. Chem. Ecol.*(26), 1037-1050.

BENKENDORFF, K., RUDD, D., NONGMAITHEM, B. D., LIU, L., YOUNG, F., EDWARDS, V., . . . ABBOTT, C. A. (2015). Are the traditional medical uses of muricidae

molluscs substantiated by their pharmacological properties and bioactive compounds? *Marine Drugs*, 5237-5275.

BEZERRA, S. C., VIEIRA, A. A., & BARBOSA-FILHO, J. M. (2006). Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. *International Immunopharmacology*, 1152-1160.

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

BLUNT, J. W., COPP, B. R., MUNRO, M. H., NORTHCOTE, P. T., & PRINSEP, M. R. (2005). Marine natural products. *Natural Products Reports*, 22, 15-61.

BONNEMAIN, B. (2005). Helix and drugs: Snails for western health care from antiquity to the present. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, 2, 25-28.

BRUGNOLI, E., CLEMENTE, J., BOCCARDI, L., BORTHAGARAY, A., & SCARABINO, F. (2005). Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) distribution in the main hydrographical basins of Uruguay: update and predictions. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 235-244.

CACHAPUZ, P. (2006). *Usinas da CEMIG: A História da Eletricidade em Minas e no Brasil, 1952-2005*. Rio de Janeiro: Centro da Memória da Eletricidade no Brasil.

CALLOW, M. E., & CALLOW, J. A. (2002). Marine biofouling: a sticky problem. 49, 1-5.

CAMPOS, M. C., RUCKERT, G. V., & ROLLA, M. E. (2003). Nota sobre procedimentos de segurança no cultivo e manutenção de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) em laboratório. . *IX Congresso Brasileiro de Limnologia*.

CBEIH. (2020). *Centro de Bioengenharia de Espécies Invasoras*. Acesso em 10 de Agosto de 2021, disponível em Base colaborativa de dados sobre invasões biológicas: <http://base.cbeih.org/>

CEMIG. (2014). Companhia Energética de Minas Gerais. O mexilhão Dourado, uma ameaça às águas e hidrelétricas brasileiras. *Ed. CEMIG*, 24.

CHANIOTI, S., LIADAKIS, G., & TZIA, C. (Novembro de 2014). Chapter 6: Solid-Liquid Extraction. *Food Engineering Handbook*, pp. 254-283.

CHEN, W., ESSELMAN, W. J., JUMP, D. B., & BUSIK, J. V. (2005). Anti-inflammatory effect of docosahexaenoic acid on cytokine-induced adhesion molecule expression in human retinal vascular endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 4342-4347.

CHUNG, S. A., LIM, J. W., & KIM, H. (2021). Docosahexaenoic Acid Inhibits Cytokine Expression by Reducing Reactive Oxygen Species in Pancreatic Stellate Cells. *Journal of Cancer Prevention*, 26, 195-206.

- CLAUDI, R., & MACKIE, J. L. (1994). Practical manual for zebra mussel monitoring and control. *Lewis Publishers*, 227.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., & BONATO, P. S. (2006). Fundamentos da Cromatografia. *Editora da UNICAMP*.
- CORREA, J. B., BERNARDI, F., & GEHRKE, I. T. (2016). Técnicas cromatográficas combinadas para investigação de moléculas bioativas com potencial biotecnológico. *Salão do Conhecimento*.
- CRISP, D. J., WALKER, G., YOUNG, G. A., & YULE, A. B. (et. al., 1985). Adhesion and substrate choice in mussels and barnacles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 104(1), 40-50.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., & LEWIS, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B, Grissem W & Jones R (eds) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant*.
- CTG BRASIL. (s.d.). Acesso em 15 de julho de 2021, disponível em Investimento em pesquisa pode levar a erradicação do mexilhão dourado: casestudies.com.br
- DA GAMA, PEREIRA. (et al., 2002). The Effects of Seaweed Secondary Metabolites on Biofouling. *Biofouling*, 18, n. 1, 13-20.
- DA GAMA, B. A., PEREIRA, R. C., & COUTINHO, R. (2009). Bioincrustação marinha. In: Pereira, R.C. & Soares-Gomes, A. (orgs.). *Biologia Marinha*, 12(2), 299-318.
- DANG, V. T., BENKENDORFF, K., GREEN, T., & SPECK, P. (2015). Marine snails and slugs: A great place to look for antiviral drugs. *Journal Virol.*(89), 8114-8118.
- DARRIGRAN, G. (2002). Potential impact filter-feeding invaders on temperate in-land freshwater environments. *Biological Invasions*, 4, 145-156.
- DARRIGRAN, G., & DAMBORENEA, C. (2009). Introdução a biologia das invasões. *O mexilhão dourado na América do Sul: Biologia, dispersão, impacto, prevenção e controle. Cubo Editora*, 1-246.
- DARRIGRAN, G., & DAMBORENEA, C. (2011). Ecosystem engineering impacts of *Limnoperna fortunei* in South America. *Zoological Science* 28, 1-7.
- DARRIGRAN, G., & EZCURRA DE DRAGO, I. (2000). Ivasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America. *The Nautilus*, 114(2), 69-73.
- DARRIGRAN, G., & PASTORINO, G. (1993). Bivalvos invasores en el Rio de La Plata, Argentina. *Comunicações de la Sociedad Malacologica Del Uruguay*, 7, pp. 309-313.

- DARRIGRAN, G., DAMBORENEA, C., & GRECO, N. (2007). An evaluation pattern for antimicrofouling procedures: *Limnoperna fortunei* Larvae study in a hydroelectric power plant in South America. *AMBIO* 36, 575-579.
- DAS, U. N. (2020). Can Bioactive Lipids Inactivate Coronavirus (COVID-19)? *Archives of medical research*, 51(3), 282-286.
- DATTA, D. e. (2015). Bioactive Compounds from Marine Invertebrates for Potential Medicines - An Overview. *International Letters of Natural Sciences*, 34, 42-61.
- DAVIS, A. R., TARGETT, N. M., McCONNEL, O. J., & YOUNG, C. M. (1989). Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. *Bioorganic Marine Chemistry*, 3, 85-114.
- DE NYS, R., STEINBERG, P. D., WILLEMSSEN, P., DWORJANYN, S. A., GABELISH, C. L., & KING, R. J. (1995). Spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling*, 8, n. 4, 259-271.
- DENNIS, E. A., & NORRIS, P. C. (2015). Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation. *Nature reviews Immunology*.
- DOGGRELL, S. A. (2011). Lyprinol—is it a useful anti-inflammatory agent? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-7.
- DOLASHKA, P., DOLASHKI, A., VAN BEEUMEN, J., FLOETENMEYER, M., VELKOVA, S., & VOLTER, W. (2016). Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from *Helix* and *Rapana* snails. *Curr. Pharm. Biotechnol*, 263-270.
- DUARTE, M. S. (2012). *Efeito de superfície na aderência de Limnoperna fortunei (Dunker, 1857) [manuscrito] /*.
- ENEL. (2018). *Relatório da Administração*. Enel Green Power Volta Grande S.A.
- ERSPAMER, V., & GLASSER, A. (1957). The pharmacological actions of murexine (urocanylcholine). *Journal Pharmacol. Chemother*, 176-184.
- ESMAEELIAN, B., BENKERNDORFF, K., LE LEU, R. K., & ABBOTT, C. A. (2018). Simultaneous assessment of the efficacy and toxicity of marine mollusc-derived brominated indoles in an in vivo model for early stage colon cancer. *Integr. Cancer Ther.*, 248-262.
- FAULKNER, D. J. (1996). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 13, 75-125.
- FIEHN, O. (Abril de 2016). Metabolomics by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Molecular Biology*.
- FILIPPO, R. (2003). Mexilhão dourado nos ecossistemas brasileiros. *SEPRONEWS. Série meio ambiente. Ano 1, n. 3*.
- FUSETANI, N. (2004). Biofouling and antifouling. *Natural Product Reports*, 21, 94-104.

GABAY, O., SANCHEZ, C., SALVAT, C., CHEVY, F., BRETON, M., NOURISSAT, G., & al, e. (2010). Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis Cartilage*, 18, 106-116.

GALVAO, J. G., GUERREIRO, M. J., SOUZA, J. A., & COURA, S. M. (2003). USING THE FUNGI *Fusarium oxysporum* AS BIOINDICATOR OF AMETRINE BY MEASURING BIOMASS AND EROGOSTEROL. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(4), 840-845.

GESHEVA, V., CHAUSHEVA, S., STEFANOVA, N., MIHAYLOVA, N., DOUMANOVA, L., IDAKIEVA, K., & TCHORBANOV, A. (2015). Helix pomatia hemocyanin - a novel bio-adjuvant for viral and bacterial antigens. *Int. Immunopharmacol*, 162-168.

GIDDINGS, J., & CALVIN E KELLER, R. A. (10 de Novembro de 2020). Cromatografia. *Enciclopédia Britânica*.

GIORDANI, S., NEVES, P. S., & ANDREOLI, C. V. (2005). Limnoperna fortunei ou mexilhão dourado: impactos causados, métodos de controle passíveis de serem utilizados e a importâncias do controle de sua disseminação. *23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*.

GOMES, A. M., KOZLOWSKI, E. O., BORSIG, L., TEIXEIRA, F., VLODAVSKY, I., & PAVAO, M. S. (2015). Antitumor properties of a new non-anticoagulant heparin analog from the mollusk *Nodipecten nodosus*: Effect on P-selectin, heparanase, metastasis and cellular recruitment. *Glycobiology*(25), 386-393.

GOOZEE, K., CHATTERJEE, P., JAMES, I., SHEN, K., SOHRABI, H. R., ASI, P. R., . . . al, e. (2017). Alterations in erythrocyte fatty acid composition in preclinical Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 676(7), 1-9.

GOPAL, R., & VIJAYAKUMARAN. (et al., 2008). Marine organisms in Indian medicine and their future prospects. *Nat. Prod. Radiance*, 139-145.

GOPALDAS, M., ZANDERIGO, F., ZHAN, S., OGDEN, R. T., MILLER, J. M., RUBINFALCONE, H., . . . SUBLETTE, M. E. (2019). Brain serotonin transporter binding, plasma arachidonic acid and depression severity: A positron emission tomography study of major depression. *Journal of Affective Disorders*, 257, 495-503.

GREGORY, T. C., McLAUGHLIN, R. J., CUTTLER, C., SAUBER, G. J., WEEKS, D. L., HILLARD, C. J., & WEISS, M. D. (2020). Endocannabinoids and related lipids in serum from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*, 63(1), 120-126.

GROZEA, C. M., & WALKER, G. C. (2009). Approaches in designing non-toxic polymer surfaces to deter marine biofouling. *Soft Matter*, 5, 4088-4100.

- GUAN, H. S., & WANG, S. G. (2009). Chinese Marine Materia Medica. *Shanghai Scientific and Technical Publishers*, 371.
- HADFIELD, M. G., & PAUL, V. J. (2001). Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. *Marine Chemical Ecology*, 431-461.
- HALIM, M., & HALIM, A. (2020). Omega 3 versus Omega 6 Polyunsaturated Fatty Acids in Cardio-Metabolic Health. *Journal Health Care and Research*, 1(2), 83-100.
- HERBST, R. S., ECKHARDT, S. G., KURZROCK, R., EBBINGHAUS, S., ODWYER, P. J., GORDON, M. S., & al, e. (2010). Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.*, 28, 2839-2846.
- HOYE, T. R., CARUSO, A. J., DELLARIA, J. F., & KURTH, M. J. (1982). Two syntheses of d,l-aplysinatin. *Journal J. Am. Chem. Soc.*, 104, 6704-6709.
- IMMANUEL, G., THADDAEUS, B. J., USHA, M., RAMASUBBURAYAN, R., PRAKASH, S., & PALAVESAM, A. (2012). Antipyretic wound healing and antimicrobial activity of processed shell of the marine mollusc *Cypraea moneta*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*, 1643-1646.
- Itaipu, B. (Dezembro de 2016). *Mexilhão Dourado e o meio ambiente*. Fonte: <https://www.itaipu.gov.br/meioambiente/mexilhao-dourado>
- JUSTINO, C. I., DUARTE, K., C, F. A., D, D. A., & ROCHA-SANTOS, T. (2014). Chapter 3 - Classical Methodologies for Preparation of Extracts and Fractions. *Comprehensive Analytical Chemistry*, pp. 35-67.
- KOTANI, S., SAKAGUCHI, E., WARASHINA, S., MATSUKAWA, N., ISHIKURA, Y., KISO, Y., . . . YAMASHIMA, T. (2006). Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neuroscience research*, 56(2), 159-164.
- KOWALSKI, E. L., & KOWALSKI, S. C. (Julho de 2008). REVIEW ON METHODS OF GOLDEN MUSSEL CONTROL IN PIPES. *REVISTA PRODUÇÃO*, 8, n.2.
- LEE, M. R. (2011). The history of Ephedra (ma-huang). *J. R. Coll. Physicians Edinb.* , 78-84.
- LIST, P. H., & SCHMIDT, P. C. (1989). *Phytopharmaceutical Technology*.
- LIU, J. J., GREEN, P., MANN, J. J., RAPOPORT, S. I., & SUBLETTE, M. E. (2015). Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: Implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. *Brain Research*, 1597, 220-246.

LU, H., LIANG, Y., DUNN, W. B., SHEN, H., & KELL, D. B. (2008). Comparative evaluation of software for deconvolution of metabolomics data based on GC-TOF-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 215-227.

LUESCH, H., HARRIGAN, G. G., GOETZ, G., & HORGEN, F. D. (2002). The cyanobacterial origin of potent anticancer agents originally isolated from sea hares. *Curr. Med. Chem.*, 20, 1791-1806.

LUNN, J., & THEOBALD, H. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. Em *Nutrition Bulletin* (pp. 178-224).

LUQUE DE CASTRO, M. D., & GARCIA-AYUSO, L. E. (1998). Extração Soxhlet de Materiais Sólidos: Uma Técnica Desatualizada com um Futuro Inovador Promissor. *Analytica Chimica Acta*, pp. 1-10.

MacARTAIN, P., GILL, C. I., BROOKS, M., CAMPBELL, R., & ROWLAND, I. R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutr. Rev.*, 65, 535-543.

MACKIE, G. L., & CLAUDI, R. (2010). Monitoring and control of macrofouling mollusks in fresh water systems. *CRC*, 1-508.

MANHEZI, A. C., BACHION, M. M., & PEREIRA, A. L. (2008). Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 620-628.

MANSUR, M. C. (2012). *Moluscos Limnicos - Bivalves*. Brasília.

MANSUR, M. C., RICHINITTI, L. M., & SANTOS, C. P. (1999). *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), molusco bivalve invasor, na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*. 7 (2), 147-150.

MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. J. (2015). From Broad-Spectrum Biocides to Quorum Sensing Disruptors and Mussel Repellents: Antifouling Profile of Alkyl Triphenylphosphonium Salts. Em *PLoS ONE* (Vol. 10, pp. 1-30).

MATSUI, N. K., & NAGAYA. (et al., 2001). Attachment strength of *Limnoperna fortunei* on substrates, and their surface properties. *Biofouling*, 17, 29-39.

MATTANA, R. S., MAIA E ALMEIDA, C. I., OLIVEIRA, P. F., & al, e. (2015). Efeitos de diferentes tempos de extração no teor e composição química do óleo essencial de folhas de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.]. *Revista Brasileira Plantas Medicinai*s, 17(1), 150-156.

MAYER, A. M. (s.d.). Acesso em 15 de outubro de 2021, disponível em Clinical Pipeline: Marine Pharmacology.: <https://www.midwestern.edu/departments/marinepharmacology/clinical-pipeline.xml>

MAZALEUSKAYA, L. L., LAWSON, J. A., XUANWEN, L., GRANT, G., MESAROS, C., GROSSER, T., . . . FITZGERALD, G. A. (2016). A broad-spectrum lipidomics screen of antiinflammatory drug combinations in human blood. *JCI Insight*.

McFARLANE, S. J., & CROFT, J. E. (1984). *Patente N° US4455298*.

McHUGH, J. (2013). Blattes de byzance in India: Mollusk opercula and the history of perfumery. . *J. R. Asiat. Soc.*(23), 53-67.

MEDEIROS, P. M. (2018). Cromatografia Gasosa–Espectrometria de Massa (GC–MS). . *Enciclopédia de Geoquímica*.

Ministério do Meio Ambiente. (2006). Em *Espécies exóticas invasoras: situação brasileira* (p. 24). Brasília: MMA.

MORTON, B. (1975). The Colonization of Hong Kong’s raw water supply system by *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilacea) from China. *Malacol*.

NAKANO, D., & STRAYER, D. (2014). Biofouling animals in fresh water: biology, impacts, and ecosystem engineering. *Frontiers in Ecology and the Environment* 12 (3), 167-175.

NASHED, B., YEGANESH, B., HAYGLASS, K. T., & MOGHADASIAN, M. H. (2005). Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. *J. Nutr.*, 135, 2438-2444.

NONGMAITHEM, B. D., MOUATT, P., SMITH, J., RUDD, D., RUSSEL, M., SULLIVAN, C., & BENKENDORFF, K. (2017). Volatile and bioactive compounds in opercula from Muricidae molluscs supports their use in ceremonial incense and tradicional medicines. *Sci. Rep.*, 1-14.

NV, Q.-Z., YAN, L., & JIANG, Y. Y. (2016). The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. *Virulence*, 7(6), 649-659.

OGBE, R. J., OCHALEFU, D. O., MAFULUL, S. G., & OLANIRU, O. B. (2015). A review on dietary phytosterols: their occurrence, metabolism and health benefits. *Asian J. Plant Sci. Res.* , 5, 10-21.

OLIVEIRA, M. D., & FERREIRA, R. A. (2004). Medida de Controle da Dispersão da Espécie Exótica “Mexilhão Dourado” (*Limnoperna fortunei*) no Pantanal Sul. *Circular Técnica*, 51. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Embrapa Pantanal(1ª).

OLIVEIRA, M. D., & TAKEDA. (at all.,2000). Ocorrência da espécie exótica Mexilhão Dourado (Bivalvia, Mytilidae) no rio Paraguai, Pantanal, Brasil. *In: Simpósio sobre recursos naturais e sócioeconômicos do Pantanal. Manejo e Conservação* 3. *Resumo.Embrapa/CPAP*, p. p. 264.

- OLIVEIRA, M. D., TAKEDA, A. M., BARBOSA, D. S., & CALHEIROS, D. F. (2000). Ocorrência da espécie exótica Mexilhão Dourado (*Bivalvia*, *Mytilidae*) no rio Paraguai, Pantanal, Brasil. *In: Simpósio sobre recursos naturais e sócioeconômicos do Pantanal. Manejo e Conservação 3. Resumo. Embrapa/CPAP*, p. p. 264.
- PARKER, I., SIMBERLOFF, D., LONSDALE, W., GOODELL, K., WONHAM, M., & al, e. (1999). Impact: Toward a Framework for Understanding the Ecological Effects of Invaders. . *Biological Invasions*, 1, 3-19.
- PAWLIK, J. R. (1992). Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 30, 273-335.
- PESTANA, D., & OSTRENSKY. (at all., 2010). . Prospecção fazer molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nos principais Corpos hídricos do Estado do Paraná, Brasil. *Pap. Avulsos. Zool.* 50, 553-559.
- PESTANA, D., OSTRENSKY, A., TSCHÁ, M. K., & BOEGER, W. A. (2010). . Prospecção fazer molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nos principais Corpos hídricos do Estado do Paraná, Brasil. *Pap. Avulsos. Zool.* 50, 553-559.
- Plano Nacional de Prevenção, Monitoramento e Controle do Mexilhão-Dourado.* (2019). Acesso em 11 de Maio de 2019, disponível em Researchgate: https://www.researchgate.net/publication/333104734_PLANO_NACIONAL_DE_PREVENC_AO_CONTROLE_E_MONITORAMENTO_DO_MEXILHAODOURADO_Limnoperna_fortunei_NO_BRASIL
- PLAT, J., BAUMGARTNER, S., VANMIERLO, T., LUTJOHANN, D., CALKINS, K. L., BURRIN, D. G., . . . GROEN, A. K. (2019). Consequences of human development in a plant-based environment? *Prog Lipid Res*, 74, 87-102.
- POLI, A., MARANGONI, F., CORSINI, A., MANZATO, E., MARROCCO, W., MARTINI, D., . . . VISIOLI, F. (2021). Phytosterols, Cholesterol Control and Cardiovascular Disease. *Nutrients*, 13(2810), 1-13.
- POUDEL, A., GACHUMI, G., WASAN, K. M., BASHI, Z. D., EL-ANEED, A., & BADEA, I. (2019). Development and Characterization of Liposomal Formulations Containing Phytosterols Extracted from Canola Oil Deodorizer Distillate along with Tocopherols as Food Additives. *Pharmaceutics*, 11(185), 1-16.
- PRATA, P. S., MOGOLLON, N. G., & AUGUSTO, F. (2016). Técnicas cromatográficas multidimensionais na investigação de metabólitos secundários. *Scientia Chromatographica*.
- RAGASA, C. Y., TAN, M. C., CASTRO, M. E., MARIQUIT, M., REYES, D. L., OYONG, G. G., & SHEN, C. (2018). Sterols from *Lentinus tigrinus*. *Pharmacog Journal*, 1079-1081.

- RAKHEE, MISHRA, R., SHARMA, R. K., & MISRA, K. (2018). Chapter 9 - Characterization Techniques for Herbal Products. *Science Direct*, pp. 171-202.
- RAPOPORT, S. I. (2014). Lithium and the other mood stabilizers effective in bipolar disorder target the rat brain arachidonic acid cascade. *ACS chemical neuroscience*.
- RASUL, M. G. (Dezembro de 2018). Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages. *Blue Eyes Intelligence Engineering and Sciences Publication Retrieval*.
- Rasul, M. G. (Dezembro de 2018). Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages . *Blue Eyes Intelligence Engineering and Sciences Publication Retrieval*.
- RICCIARD, A., & RASMUSSEN, J. B. (1998). Predicting the identity and impact of future biological invaders: a priority for aquatic resource management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1759-1765.
- RICHARDSON, J. F., HARKER, J. H., & BACKHURST, J. R. (2002). Chemical Engineering. Em *Particle Technology and Separation Process*. Oxford: Coulson and Richardson's Chemical Engineering Series.
- RITTSCHOF, D. (2000). Natural product antifoulants: one perspective on the challenges related to coatings development. *Biofouling*, 15, 119-127.
- RIVAS, C. e. (28 de 05 de 2021). *bioinvasoes-aquaticas-impactos-mexilhao-dourado*. Acesso em 10 de 08 de 2021, disponível em [//www.tratamentodeagua.com.br](http://www.tratamentodeagua.com.br)
- SAINI, R. K., & KEUM, Y. S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. . *Life Sci*, 255-267.
- SALATINO, M. L. (2016). *Técnicas Básicas de Cromatografia*. Instituto de Química - USP.
- SALEHI, B., QUISPE, C., SHARIFI-RAD, J., CRUZ-MARTINS, N., NIGAM, M., MISHRA, A. P., . . . KOCH, W. (2021). Phytosterols: From Preclinical Evidence to Potential Clinical Applications. *Front. Pharmacol*, 11, 1-18.
- SAMMARCO, P. W., & COLL, J. C. (1997). Secondary metabolites – or primary? Re-examination of a concept through a marine example. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*, 2, 1245-1250.
- SANTOS, C., MANSUR, M. C., & WURDIG, N. L. (2008). Variações no comprimento dos indivíduos de uma população do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), ao longo do ano, na praia do veludo, lago Guaíba, RS, Brasil (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 25, n. 3, 389-396.

- SANTOS, M. T., PONTES, M. A., NETA, M. N., & MORAIS, M. F. (2016). Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (cg-em) e suas diversas aplicações. *Anais I CONBRACIS*.
- SANTOS, S. B. (2012). Espécies de moluscos límnicos invasores no Brasil in: Mansur MDC, Santos CP, Pereira D, Paz ICP, Zurita MLL, Rodriguez MTR, Nehrke MV, Bergonci PEA. Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle. Porto Alegre, RS.
- SCHEPERS, M., MARTENS, N., TIANE, A., VANBRABANT, K., LIU, H. B., LUTJOHANN, D., & al, e. (2020). Edible seaweed-derived constituents: an undisclosed source of neuroprotective compounds. *Neural Regen Res*, 15, 790-795.
- SCHMITZ, F. J., BOWDEN, B. F., & TOTH, S. I. (1993). Antitumor and cytotoxic compounds from marine organism. *Marine Technology*, 1, 197-308.
- SERGYSELS, R., & ART, G. (2001). . A double-masked, placebo-controlled polysomnographic study of the antitussive effects of helcidine. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.*, 35-47.
- SHANMUGAM, A., KATHIRESAN, K., & NAYAK, L. (2016). Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan and phosphorylated chitosan from cuttlebone of *Sepia kobeensis* (Hoyle, 1885). *Biotechnol. Rep*, 25-30.
- SHI, H. H., & ZHANG. (et al., 2022). EPA-Enriched Phospholipids Alleviate Renal Interstitial Fibrosis in Spontaneously Hypertensive Rats by Regulating TGF- β Signaling Pathways. *Marine Drugs*, 20.
- SIEGEL, J. A., SAUKKO, P. J., & HOUCK, M. M. (2013). *Quadrupole Mass Analyzer*.
- SILVA, J. S., FERNANDES, F. d., SOUZA, R. C., LARSEN, K. T., & DANELON, O. M. (2004). Água de Lastro e Bioinvasão. In: SILVA, J. S. V. & SOUZA, R. C. C. L. 2004. Água de Lastro e Bioinvasão.
- SIVASUBRANIAN, K., RAVICHANDRAN, S., & KUMARESAN, M. (2011). Preliminary Studies for a New Antibiotic from the Marine Mollusk Melo melo (Lightfoot, 1786). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, 310-314.
- SPACCESI, F., & RODRIGUES CAPITULO, A. (2012). *Benthic communities on hard substrates covered by *Limnoperna fortunei* Dunker (*Bivalvia*, *Mytilidae*) at an estuarine beach (Rio de la Plata, Argentina)* (Vol. 71). *Journal of Limnology*.
- SPRECHER, S. L., & GETSINGER, K. D. (2000). Zebra mussel chemical control guide. *Technical Report ERDC/ELTR-00-1*.
- SUKUMARAN, S., PITTMAN, K. B., PATTERSON, W. K., TOWNSEND, A., BROADBRIDGE, V., & PREÇO, T. J. (2010). A phase I study to determine the safety,

tolerability and maximum tolerated dose of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) lipid extract, in patients with advanced prostate and breast cancer. *Annals of Oncology*, 21(5), 1089-1093.

SUMMER, K., & BROWNE. (19 de November de et al., 2020). Molluscan Compounds Provide Drug Leads for the Treatment and Prevention of Respiratory Disease. *Marine Drugs*, pp. 1-50.

SYLVESTER, F., BOLTOVSKOY, D., & CATALDO, D. (2007). *The invasive bivalve Limnoperna fortunei enhances benthic invertebrate densities in South American floodplain rivers*. *Hydrobiologia*.

TAMBUN, R., ALEXANDER, V., & GINTING, Y. (2020). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review . *Materials Science and Engineering*.

TENIKOFF, D., MURPHY, K. J., LE, M., HOWE, P. R., & HOWARTH, G. S. (2005). Lyprinol (stabilized lipid extract of New Zealand green-lipped mussel): a potential preventative treatment modality for inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, 40, 361-365.

TOLEDO-PIZA, A. R., OLIVEIRA, M. I., NEGRI, G., MENDONCA, R. Z., & FIGUEIREDO, C. A. (2018). Polyunsaturated fatty acids from *Phyllocaulis boraceiensis* mucus block the replication of influenza virus. *Arch. Microbiol*(200), 961-970.

TRESCHOW, A. P., HODGE, L. D., WRIGHT, P. F., WYNNE, P. M., KALAFATIS, N., & MAGRIDES, T. A. (2007). Novel anti-inflammatory ω -3 PUFAs from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147, 645-656.

TRUMBO, P., SCHLICKER, S., YATES, A. A., & POOS, M. (2005). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and aminoacids. . *Food and Nutrition Board*, 102(11), 769-849.

VACCARO, E., & WAITE, J. H. (2001). Yield and Post-Yield Behavior of Mussel Byssal Thread: A Self-Healing Biomolecular Material. *Biomacromolecules*, 2, n. 3.

VALENTE, A. L., AUGUSTO, F., & RIEDO, C. R. (Abril de 2021). ANÁLISE QUANTITATIVA POR CROMATOGRAFIA. *Chemkeys*.

VIDAL, F. S. (2019). . Uso de Métodos Químicos como Ferramenta de Prevenção e Controle do Mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* (DUNKER, 1857). . *Dissertação. Escola de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.*, 83 p.

- WANG, B., WU, L., CHEN, J., DONG, L., CHEN, C., WEN, Z., . . . WANG, D. W. (2021). Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther*, 6, 1-30.
- WELDON, S. M., MULLEN, A. C., LOSCHER, C. E., HURLEY, L. A., & ROCHE, H. M. (2007). Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *Journal Nutr. Biochem.*, 18, 250-258.
- WESSELS, I., ROLLES, B., & RINK, L. (2020). The potential impact of zinc supplementation on COVID-19 pathogenesis. *Front. Immunol.*(11), 1712.
- WIEGEMANN, M. (2005). Adhesion in blue mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): Mechanisms and technical applications. *Aquatic Sciences*, 67, 166-176.
- WILKOMMEN, D., LUCIO, M., MORITZ, F., FORCISI, S., KANAWATI, B., SMIRNOV, K. S., . . . MICHALKE, B. (2018). Metabolomic investigations in cerebrospinal fluid of Parkinson's disease. *PloS one*, 1-16.
- YAN, K. P., LIN, G. Q., LUO, Q. F., & XIE, J. K. (2011). Effect of *Limax* lyophilized powder on bronchial asthma. *Journal Chin. Med. Mater.*(34), 1086-1089.
- ZACHI, R. (2007). *Influência da Temperatura no Processo de Extração de Óleo de Soja em Leito Fixo*. UNIJUI, Dissertação de Mestrado em Modelagem Matemática.
- ZEB, M. A., KHAN, S. U., RAHMAN, T. U., SAJID, M., & SELONI, S. (2017). Isolation and biological activity of β -sitosterol and stigmasterol from the roots of *Indigofera heterantha*. *Pharm Pharmacol Int J.*, 5(5), 204-207.
- ZHANG, T. T., & XU. (et al., 2019). Health benefits of dietary marine DHA/EPA-enriched glycerophospholipids. *Prog. Lipid Res.*, 75.
- ZYGLER, A., STOMINSKA, M., & NAMIESNIK, J. (2012). 2.04 - Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec. *Analytical Techniques for Scientists*, pp. 65-82.