



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Minas – Departamento de Engenharia Ambiental
Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

FILIFE HENRIQUE MIRANDA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO
METANÓLICO DO *Limnoperna fortunei* - MEXILHÃO
DOURADO**

Ouro Preto

2021

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO METANÓLICO DO
Limnoperla fortunei – MEXILHÃO DOURADO

FILIFE HENRIQUE MIRANDA FERREIRA

Trabalho Final de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Engenheiro Ambiental na
Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. D.Sc. Paulo Santos Assis – UFOP

Co-orientador: Prof. D.Sc. Adriano Corrêa Batista – UFOP

Ouro Preto

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

F383c Ferreira, Filipe Henrique Miranda .
Caracterização química do extrato metanólico do limnoperna fortunei
- Mexilhão Dourado. [manuscrito] / Filipe Henrique Miranda Ferreira. -
2021.
61 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Santos Assis.
Coorientador: Dr. Adriano Corrêa Batista.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola
de Minas. Graduação em Engenharia Ambiental .

1. Mexilhão dourado (Limnoperna fortunei). 2. Cromatografia
gasosa-espectrometria de massa (CG-EM). 3. Ligas (Metalurgia) -
Caracterização Química. I. Assis, Paulo Santos. II. Batista, Adriano Corrêa
. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 504:502

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

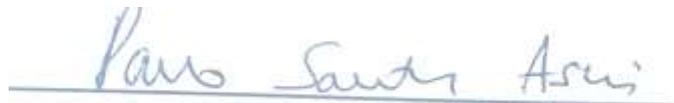
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO METANÓLICO DO *Limnoperna fortunei* – MEXILHÃO DOURADO

Filipe Henrique Miranda Ferreira

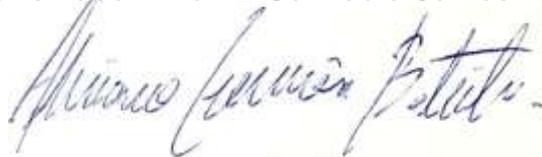
Trabalho Final de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Engenheiro Ambiental na Universidade Federal de Ouro Preto.

Data da aprovação: 27/08/2021

Banca examinadora:



Orientador: Prof. D.Sc. Paulo Santos Assis – UFOP



Co-orientador: D.Sc. Adriano Corrêa Batista – UFOP



Membro: D.Sc. Carlos Henrique Mendes Marcelino – Secretaria de Estado da

Educação do Espírito Santo

*“Ouro Preto foi na nuvem transportada
agora não chovia ainda em Minas
mas já a grande mão ali pousava
a mão que moldaria nas colinas*

Ouro Preto

*Eu vi no ar brilhante a trajectória
das chuvas que trouxeram quantidade
de gestos, architectos da memória
aos poucos pondo o rosto na cidade
de Ouro Preto, Ouro Preto*

*O líquido suspira pela terra
formando gota o casario
as formas que a paisagem não encerra
são corpos que na tarde acaricio
em Ouro Preto, Ouro Preto*

*Sentado na soleira desmaiado
uni-me com a estátua que me beija
a mão que me talhou, do Aleijado
sentou-me incandescente em sua igreja*

*Raiz que reconheço também minha
ou âncora por vezes já sem nó
eu chego aqui como antes já não vinha
em Ouro Preto eu não me sinto só
Ouro Preto, Ouro Preto”*

Sérgio Godinho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, minha mãe Edna, Vovô Beto, Vovó Gorete e aos meus tios, Edelson, Elaine, Eduardo, Élide e Edilson que sempre confiaram, me apoiaram e me aconselharam a manter o foco durante a minha vida e deram condições para que eu chegasse até aqui e sendo minhas referências de dedicação e empatia. E a todos os familiares que de alguma forma estavam presentes me apoiando em minha caminhada.

Aos meus queridos amigos que sempre estiveram ao meu lado: Daniel, Piguin, Igor, Yuri, Caio, Bebeto e Henrique.

À Pamela por estar ao meu lado me fazendo acreditar que eu era capaz, quando sozinho achei que não era. Pelo apoio, carinho e companheirismo que foram essenciais para que eu pudesse ter essa conquista.

Agradeço ao professor Paulo Assis e Adriano, por ter aceitado a orientação, acreditando no projeto e amparado a pesquisa. Esse trabalho é fruto de respeito e parceria.

Aos irmãos da Republica Aquarius pela confiança de sempre, por toda a compreensão durante os anos da graduação e por serem meus incentivadores nos momentos mais difíceis.

Não poderia deixar de agradecer à UFOP por todo o apoio dado durante toda a graduação e pelo ensino gratuito e de qualidade, a Fundação Gorceix e ao CBEIH, que foram suporte financeiro essencial para que esse trabalho pudesse ter sido concluído.

À Samarco pela oportunidade da realização do estágio que foi essencial para a fixação do conteúdo aprendido em sala de aula, à Escola de Minas, e todos os professores. Agradeço por todos os ensinamentos.

RESUMO

O *Limnoperna fortunei* – mexilhão dourado é um bivalve nativo do sudeste asiático e foi detectado pela primeira vez na América do Sul no ano de 1991 no rio da Prata e nos anos seguintes foi localizado em diversas outras partes do continente. Considerando a escassez de estudos dessa espécie no que diz respeito a dados que auxiliem o avanço do conhecimento acerca da biotecnologia e da bioprospecção, base fundamental inclusive para a exploração desse tipo de recurso, este estudo tem como objetivo obter e caracterizar quimicamente o extrato metanólico do molusco visando identificar compostos que possam contribuir com possíveis ações antibacteriana, antifúngico, anti-incrustante e farmacológicas. Nesse âmbito, para a realização do trabalho foi feita a coleta de espécimes de mexilhões vivos na estação ambiental de hidrobiologia e piscicultura do reservatório da Hidroelétrica de Volta Grande localizada na divisa de Minas Gerais com o estado de São Paulo, no município de Conceição das Alagoas. A segunda etapa consistiu na obtenção do extrato bruto utilizando dois diferentes métodos de extração, maceração e Soxhlet. Para a obtenção dos resultados foi utilizado o equipamento de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas onde foi possível identificar 98 compostos no total, desses, 74 compostos no material extraído pelo método de Soxhlet e 72 pelo método de maceração, sendo, 48 compostos presentes em ambas as amostras. Desse total de 98 compostos, foi caracterizado 2 aminas, 7 aldeídos, 9 ácidos carboxílicos, 9 álcoois, 9 haletos orgânicos, 9 hidrocarbonetos, 18 fenóis e 35 ésteres. Os resultados alcançados com esses métodos são um primeiro passo de grande valia para nossa linha de pesquisa que num segundo momento investigará as funções biológicas das moléculas identificadas visando o conhecimento desse invasor e podendo contribuir para seu monitoramento e possíveis utilizações em campos diversos.

Palavras-chaves: *Limnoperna fortunei*, CG/EM, Caracterização Química.

ABSTRACT

The *Limnoperna fortunei* – golden mussel is a bivalve native of Southeast Asia and was first detected in South America in 1991 in the rio da Prata and in the following years it was located in several other parts of the continent. Considering the scarcity of studies of this species with data that help advance knowledge about biotechnology and bioprospecting, a fundamental basis for the exploitation of this type of resource, this study aims to obtain and chemically characterize the methanol extract of the molluscum aiming to identify compounds that may contribute with possible antibacterial, antifungal, antifouling and pharmacological actions. In this context, to carry out the work, specimens of live mussels were collected at the environmental hydrobiology and fish farming station of the Volta Grande Hydroelectric, located on the border of Minas Gerais with the state of São Paulo, in the city of Conceição das Alagoas. The second step consisted of obtaining the crude extract using two different extraction methods, maceration and Soxhlet. To obtain the results, gas chromatography equipment coupled to mass spectrometry was used, where it was possible to identify 98 compounds in total, of these, 74 compounds in the material extracted by the Soxhlet method and 72 by the maceration method, with 48 compounds present in both samples. From this total of 98 compounds, 2 amines, 7 aldehydes, 9 carboxylic acids, 9 alcohols, 9 organic halides, 9 hydrocarbons, 18 phenols and 35 esters were characterized. The results achieved with these methods are a very valuable first step for our line of research, which in a second moment will investigate the biological functions of the identified molecules in order to understand this invader and can contribute to its monitoring and possible uses in different fields.

Keywords: *Limnoperna fortunei*, GC/MS, Chemical Characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécimes de mexilhão dourado.	8
Figura 2 - Locais de invasão do <i>Limnoperna fortunei</i> na América do Sul nos anos de A) 1991, B) 2001, C) 2011 e D) 2020.	9
Figura 3 - Imagem aérea do reservatório de Volta Grande da empresa ENEL (atual detentora dos direitos de concessão da Hidroelétrica).	11
Figura 4 - Representação esquemática do extrator de Soxhlet.	15
Figura 5 - Fórmula estrutural do Metanol.	17
Figura 6 - Cena de satélite indicando o local de coleta dos mexilhões.	28
Figura 7 - Painel de imagens demonstrando o procedimento adotado para a realização de coleta do <i>Limnoperna fortunei</i> . De A a C local de coleta e a coleta dos mexilhões e D local de aclimatização dos mexilhões coletados.	29
Figura 8 - Equipamentos utilizados no trabalho para a caracterização do ambiente em que os mexilhões foram coletados: A) Medidor multiparâmetro - AK88 akso e B) Turbidímetro Digital - TU430 akso.	30
Figura 9 – Agitação da amostra.	31
Figura 10 – Concentração do extrato bruto utilizando o equipamento Rotavapor.	32
Figura 11 – Concentração dos solventes de acordo com a descrição na Tabela 2 e os resultados da extração após 24 h, 48 h e 72 h de experimento.	36
Figura 12– A) Cartucho de papel de filtro (dentro do círculo) com o corpo dos mexilhões e B) Extração em andamento no laboratório utilizando o método de Soxhlet.	37
Figura 13 – 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).	39

Figura 14 – Cromatograma do íon total do extrato do mexilhão dourado obtido via extração por Soxhlet utilizando metanol como solvente (no eixo x é tempo e no eixo y a intensidade, cps).39

Figura 15 – Quantidade de estruturas moleculares químicas encontradas em cada método de extração e quantidade encontrada em comum entre os dois métodos. ..40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Solventes mais utilizados na obtenção de metabólitos secundários. 21	21
Tabela 2 – Resultados obtidos com o processo de extração por maceração.36	36
Tabela 3 – Resultados obtidos utilizando o método de Soxhlet.....38	38
Tabela 4 - Resultados obtidos depois da leitura do cromatograma.41	41
Tabela 5: Quantidade de compostos em relação a sua classificação química. ...50	50

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Objetivo Geral	5
2.1	Objetivos Específicos	5
3	Justificativa / Relevância	6
4	Revisão Bibliográfica.....	7
4.1	Descrição do mexilhão dourado (<i>Limnoperna fortunei</i>) e seu impacto no ambiente 7	
4.2	Área de estudo: Usina Hidroelétrica de Volta Grande	10
4.3	Extração pelo método de maceração	13
4.4	Extração pelo método de Soxhlet.....	14
4.5	Solventes polares - Metanol	16
4.6	Influência dos Parâmetros de extração com tempo, temperatura e composição.....	18
4.7	Descrição de moléculas bioativas – lipídios e metabólitos secundários de moluscos 19	
4.8	Técnica de cromatografia, um apanhado geral	22
4.9	Identificação de moléculas bioativas e genômicas com a técnica de cromatografia	25
5	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1	MATERIAIS	27
5.2	MÉTODOS	28
5.2.1	Coleta das amostras.....	28

5.2.2	Extração pelo método de maceração	30
5.2.3	Extração pelo método de Soxhlet.....	31
5.2.4	Concentração dos extratos – Evaporação rotativa (Rotavapor)	32
5.2.5	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) 33	
6	Resultados e discussões.....	35
6.1	Extração pelo método de maceração	35
6.2	Extração pelo método de Soxhlet.....	37
6.3	Análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) dos extratos obtidos	38
7	Conclusão	51
	Referências.....	53

1 INTRODUÇÃO

O *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) conhecido popularmente como mexilhão dourado, é um molusco bivalve nativo do sudeste asiático (Camboja, China, Coreia, Indonésia, Laos, Tailândia e Vietnã). Contudo, no ano de 1966 foi relatada e considerada espécie invasora em Hong Kong (MORTON, 1977), em seguida teve ocorrência no Japão e em países da América do Sul a partir da década de 1990 (DARRIGRAN & DRAGO, 2000; PASTORINO *et al.*, 1993).

O primeiro registro no continente sul-americano foi no ano de 1991 no rio da Prata, balneário de Bagliardi, local próximo a Buenos Aires (PASTORINO *et al.*, 1993). Essa introdução provavelmente se deu com água de lastro de navios provenientes do sudeste asiático, pois coincidiu com o momento em que o intercâmbio comercial entre países sul-americanos e asiático estava em ascensão (DARRIGRAN & PASTORINO, 1995). Foi classificado por NEWELL (1969), como molusco bivalve, do filo *Mollusca*, família *Mytilidae*, ordem *Mytiloidea*, subclasse *Pteriomorpha* e gênero *Limnoperna*. É da família dos mexilhões marinhos e é encontrado em águas doce e salobra (DARRIGRAN & MANSUR, 2006).

A sua alimentação se dá pela filtração na maioria das vezes de *fitoplâncton*, *zooplâncton* e matéria orgânica particulada em suspensão (MOREIRA, 1995). São animais que se reproduzem com o lançamento de gametas eliminados por outros indivíduos da espécie no ambiente devido a alterações ambientais do meio (MAGALHÃES, 1985). A concha dos bivalves é formada por proteínas e polissacarídeos, carbonato de cálcio (CaCO_3), que está em forma de cristais de aragonita e calcita secretada pelo manto dos moluscos chamada *conchiolina*, um material orgânico de cor marrom e mole (ALMEIDA & OLIVEIRA, 2000).

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), o molusco já está presente em cerca de 40% das hidroelétricas do Brasil. Os custos para os processos de manutenção relacionadas às infestações variam de R\$ 220 mil a R\$ 1,4 milhões por ano para cada usina afetada pela presença

desse invasor. 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 (CASE STUDIES, 2019).

Mesmo com a crescente quantidade de estudos, não existe relato de estratégias que foram bem sucedidas no controle da expansão da invasão do *Limnoperna fortunei* em instalações industriais. Os bivalves podem detectar produtos químicos na água e fechar suas válvulas como uma resposta defensiva, tornando-os tolerantes a uma ampla variedade de substâncias químicas, incluindo oxidantes fortes com o cloro (ULIANO-SILVA *et al*, 2018).

O sequenciamento do genoma é uma das descrições mais relevantes e informativas da biologia das espécies. O substrato genético das populações invasoras, sobre o qual age a seleção natural, pode ser de máxima importância para a compreensão e controle de um invasor biológico (ULIANO-SILVA *et al*, 2018).

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. O grupo de invertebrados aquáticos das esponjas, cnidários, moluscos e ascídias são considerados mais propensos a obtenção de moléculas bioativas (ROCHA *et al.*, 2013).

O potencial medicinal da flora e fauna brasileira se destaca no cenário mundial com grande potencial na pesquisa científica em busca de moléculas bioativas. A busca por compostos bioativos de origem natural com alta capacidade antioxidante aumentou consideravelmente nas duas últimas décadas, principalmente devido ao seu potencial preventivo e no tratamento de doenças cardiovasculares, doenças crônicas e neurodegenerativas (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013). Também se tem as inúmeras classes de metabólitos secundários com grande potencial farmacológico, entre elas estão os alcaloides, flavonoides e as cumarinas (BEZERRA *et al.*, 2006).

A busca por substâncias além das já descobertas se dá com a necessidade de aumentar a eficiência de quimioterapias utilizadas no combate ao câncer a fim de diminuir efeitos colaterais e ter uma maior eficiência no tratamento. Neste sentido, encontrar métodos extrativos eficientes bem como a caracterização de compostos

bioativos a partir de fontes naturais é de grande valia para os pesquisadores (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A extração é uma técnica usada para separação, isolamento e purificação de compostos orgânicos. A extração se baseia na maior solubilidade de um ou mais compostos de uma mistura em determinado solvente. Duas ou mais substâncias podem ser separadas pela extração somente se suas solubilidades forem muito diferentes. A solubilidade de um líquido em outro pode ser prevista por meio das forças intermoleculares e das estruturas dos compostos. Assim, “compostos polares dissolvem compostos polares e compostos apolares dissolvem compostos apolares”.

Compostos que têm grupos polares e apolares tais como acetona, etanol entre outros, são solúveis tanto em líquidos polares como apolares. Uma extração pode ser contínua ou descontínua. A contínua ocorre quando o composto orgânico é mais solúvel em água do que no solvente orgânico. A descontínua consiste em agitar uma solução aquosa com um solvente orgânico num funil de separação, a fim de extrair determinada substância (GUILHON, 2011; SOLOMONS & FRYHLE, 2002).

A separação sólido-líquido é um método usado na separação e ou purificação dos elementos da mistura. No procedimento de extração, o material a ser estudado que está na forma sólida é passado para a fase líquida. A partir desta metodologia é possível fazer o isolamento de compostos puros a partir de um composto de dois ou mais elementos, por meio da separação do componente que se deseja dos outros constituintes.

Existem diversos métodos de extração sólido-líquido, tais como o método de Soxhlet e a maceração; o procedimento ideal a ser usado irá depender das propriedades físico-químicas dos elementos da mistura, por exemplo, sublimação, filtração, decantação, evaporação, recristalização e diversos tipos de destilação para a purificação de compostos líquidos (VOGEL, 1971; BECKER *et al.*, 1997).

As moléculas bioativas podem ser extraídas/identificadas utilizando a cromatografia, que é uma técnica de separação proveniente da purificação de extratos naturais (SOUZA *et al.*, 2013).

Os métodos de cromatografia podem ser empregados em conjunto ou separadamente dependendo da classe dos compostos de interesse a serem separados ou identificados. A cromatografia líquida e a cromatografia gasosa podem ser acopladas a detectores de espectrometria de massas ou a ressonância magnética nuclear. 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 *et al.*, 2016).

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, base fundamental inclusive para a exploração desse tipo de recurso, aqui, de forma exploratória, temos como objetivo extrair a frio e caracterizar extrato bruto do molusco mexilhão dourado buscando a identificação molecular química e num segundo momento explorar suas possíveis aplicações antibacteriana, antifúngico, anti-incrustante e farmacológicas.

2 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar extrato bruto do molusco *Limnoperna fortunei* – mexilhão dourado utilizando 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).

2.1 Objetivos Específicos

- Obter o extrato bruto metanólico 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 compostos químico/molecular do extrato bruto.

3 JUSTIFICATIVA / RELEVÂNCIA

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.

O estudo fitoquímico dessas moléculas vem se desenvolvendo devido ao potencial farmacológico, representando dessa maneira uma alternativa as terapias convencionais. O panorama mundial da pesquisa ligada a identificação das potencialidades de moléculas biotivas e suas aplicações é indicada pela base de dados de patentes, INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) e WIPO (Organização Mundial de Propriedade Intelectual). É notado que a China seguida dos Estados Unidos lideram o ranking de patentes depositadas assim como a existência de um número grande de patentes em âmbito internacional em relação as registradas nacionalmente.

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 dando um primeiro passo na direção de consolidar conhecimentos e habilidades visando num segundo momento as 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 e todas as demais áreas como por exemplo a identificação de compostos úteis na composição de fármacos.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica aborda os seguintes tópicos:

- Descrição do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) e seu impacto no ambiente;
- Área de estudo: Usina Hidroelétrica de Volta Grande;
- Extração pelo método de maceração;
- Extração pelo método Soxhlet;
- Solventes polares – Metanol;
- Influência dos Parâmetros de extração com tempo, temperatura e composição;
- Descrição de moléculas bioativas – lipídios e metabólitos secundários de moluscos;
- Técnica de cromatografia, um apanhado geral;
- Identificação de moléculas bioativas e genômicas com a técnica de cromatografia.

4.1 Descrição do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) e seu impacto no ambiente

A prática de locomoção de espécies de fauna e flora ao redor do mundo se intensificou com um avanço da comercialização de especiarias e ao surgimento de curiosidades na exploração dos europeus a terras desconhecidas. Na maioria das vezes as espécies não se adaptam de forma a conseguir sobreviver devido a condições climáticas, falta de alimentos essenciais e a competição entre espécies pela sobrevivência. Entretanto, quando a espécie tem uma boa adaptação ao clima, ambiente, ausência de predadores e reprodução rápida, pode se tornar um problema e se tornar uma espécie invasora na região causando prejuízos ambientais e até mesmo econômicos (HILL, 2015).

O *Limnoperna fortunei* é uma espécie de mexilhão que possui sua origem na água doce, epifaunal, alimenta-se pela filtração, vida útil estimada de até 3 anos, vive em bandos, crescimento rápido podendo atingir entre 3 cm e 4 cm quando adulto, maturidade sexual rápida e fecundidade alta (DARRIGRAN & DAMBORENEA, 2011).

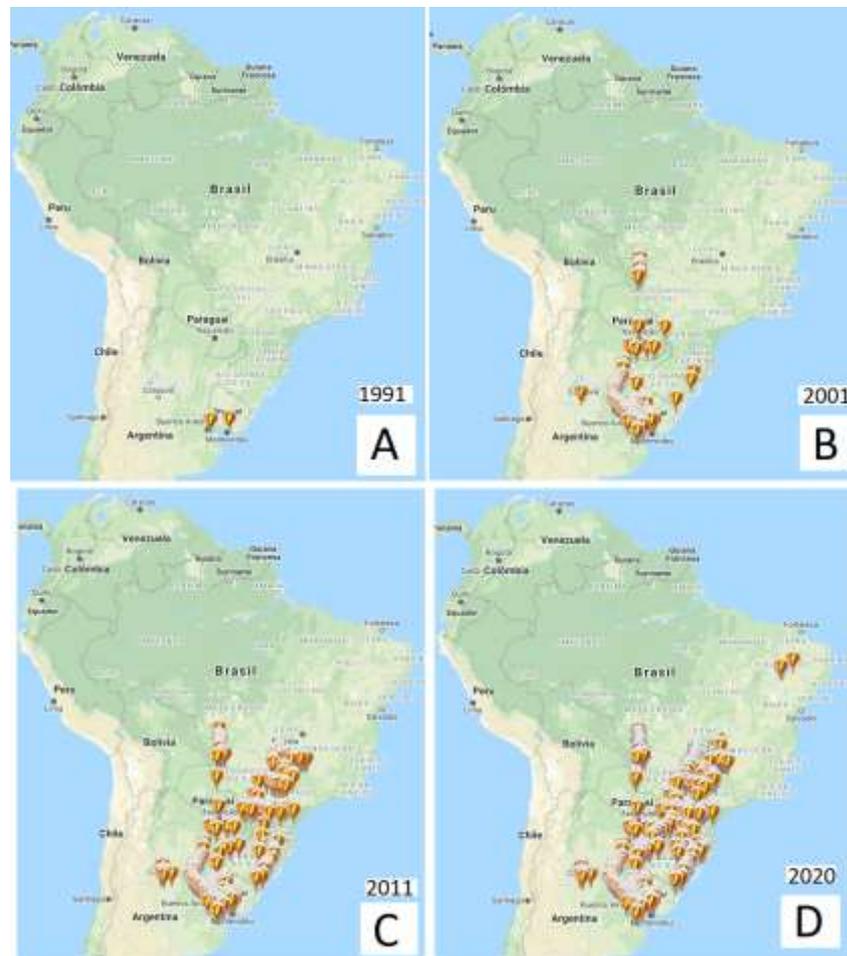
Figura 1 - Espécimes de mexilhão dourado.



Fonte: Elaboração do Autor.

A introdução do mexilhão dourado na bacia do Prata e no rio Guaíba teve dispersão rápida a montante a uma distância de 240 km por ano causando diversos impactos ao meio ambiente (DARRIGRAN *et al.*, 2007; MANSUR *et al.*, 2003).

Figura 2 - Locais de invasão do *Limnoperna fortunei* na América do Sul nos anos de A) 1991, B) 2001, C) 2011 e D) 2020.



Fonte: CBEIH, 2020

Para que fosse possível avaliar a capacidade de invasor do mexilhão dourado foi levado em consideração as variáveis de espaço e tempo. O impacto produzido no início da invasão não teve um crescimento linear, e sim um comportamento inicial exponencial e em seguida uma estabilização. A maior densidade de indivíduos manifestou-se no início da invasão, com o passar do tempo foi estabilizado em densidades menores (MANSUR *et al.*, 2003). Esse desenvolvimento leva em média dez anos para acontecer (DARRIGRAN *et al.*, 2003).

O mexilhão dourado apesar de ser uma espécie de água doce, pode também estar presente em águas salobras com salinidade menor que 3 ppt e consegue sobreviver em valores de pH de 6,2 a 7,4 e concentração de Ca⁺⁺ de 3,96 mg/ L (DARRIGRAN, 2002).

Quando identificado pela primeira vez na América do Sul em 1991, no rio da Prata, a densidade de *Limnoperna fortunei* foi de 4 a 5 indivíduos por m² (DARRIGRAN & PASTORINO, 1995; DARRIGRAN, 2000). Na mesma localidade no ano de 1995, a densidade de mexilhões no mesmo lugar atingiu o pico chegando a 150.000 indivíduos por m² e algum tempo depois se estabilizando a 40.000 indivíduos por m² (DARRIGRAN *et al.*, 2003).

A chegada do *Limnoperna fortunei* mostrou que não são apenas afetados os ambientes naturais, mas também trouxe diversos problemas econômicos aos países Sul-americanos causadas pela bioincrustação que anteriormente era problema em regiões de estuários e costeiras. Dessa forma, grandes indústrias enfrentam problemas de redução de diâmetro de tubos de água, bloqueio de tubulações e diminuição da velocidade da água por bloqueio de larvas em filtros (DARRIGRAN, 2000). Estes problemas foram percebidos em usinas de tratamento de água, usinas hidrelétricas, térmicas, refinarias de petróleo e dutos de esgoto nas cidades. Com isso, os custos aumentam devido a paralisações causadas pela necessidade de limpeza mecânica ou química. Além disso, medidas como substituições de tubos e filtros das tubulações podem se tornar uma necessidade devido à elevação da taxa de oxidação do material o tornando com vida útil reduzida.

4.2 Área de estudo: Usina Hidroelétrica de Volta Grande

O reservatório da Hidroelétrica de Volta Grande está localizado em área tropical (48° 25' e 47° 35' W, 19° 57' e 20° 10' S). É resultado de um barramento feito no rio Grande entre os estados de Minas Gerais e São Paulo. Possui sua casa de força na área pertencente à cidade de Miguelópolis – SP e no lado oposto ocupa área da

cidade de Conceição das Alagoas – MG. Esse reservatório teve início de formação em janeiro de 1970 e no mês de julho de 1974 entrou em operação, possui 221,7 km² de área inundada e com volume igual a 22,68 km³ de águas para geração de energia elétrica. A barragem tem comprimento igual a 2329 m e altura de 56 m. Possui 4 unidades de geradores com potência unitária de 95 MW. (BRAGA & GOMIERO, 1997, CACHAPUZ, 2006).

Figura 3 - Imagem aérea do reservatório de Volta Grande da empresa ENEL (atual detentora dos direitos de concessão da Hidroelétrica).



Fonte: CACHAPUZ, 2006

A fim de minimizar os impactos que essa mega construção causou ao meio ambiente, a CEMIG iniciou uma política de pesquisas envolvendo universidades, instituições e a própria empresa iniciando no ano de 1975. Esse início se deu com um levantamento bioecológico dos reservatórios da bacia do rio Grande que pertenciam à empresa. Esses resultados levaram a implantação da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Volta Grande com uma área total de 391 hectares e o propósito de desenvolver pesquisas nas áreas de limnologia e piscicultura (CACHAPUZ, 2006).

A ameaça do *Limnoperna fortunei* com sua colonização à usinas hidroelétricas no rio Grande, rio Paranaíba e no rio Paraná começaram a partir do ano de 1998 (MANSUR, 2003).

No ano de 2012, pela primeira vez, espécimes de mexilhão dourado foram registradas no reservatório de Volta Grande, localizado no rio Grande, bacia do rio Paraná. Com sua alta capacidade de adaptação à diferentes ecossistemas aquáticos esse molusco pode aderir em diversos tipos de substratos artificiais ou naturais. As incrustações formadas por esse animal são de grandes volumes, pois os indivíduos se sobrepõem fixando-se à superfície e entre si, por meio dos fios de bisso. Dessa forma, acontece a macro aglomeração compacta, impedindo ou diminuindo a passagem de fluxo de água nas turbinas (MANSUR *et al.*, 2012).

No dia 27 de setembro de 2017, a Enel Brasil S.A. participou do “leilão de concessões não prorrogadas” organizado pelo Governo Federal por meio da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), e passou a ter o direito de operar pelo período de 30 anos a usina hidroelétrica de Volta Grande, por um valor total de R\$ 1.420 milhões (ENEEL, 2019).

O grupo Enel Brasil começou sua gestão sobre o ativo em 11 de novembro de 2017. Do total de sua geração, 70% é comercializada através do regime de cotas com uma receita mensal fixa. Os outros 30% da geração são comercializadas no mercado livre. A geração de energia no ano de 2018 foi de 1.166 GWh. Os investimentos da empresa no ano de 2018 foi de R\$ 2,1 milhões, desse valor R\$ 361 mil foi decorrente ao sistema de controle do mexilhão dourado (ENEEL, 2019).

A existência de incrustação associada ao *Limnoperna fortunei* necessita de ações de manutenção, como atividades de limpeza, as quais não estão previstas nos procedimentos de manutenção preventiva desenvolvidos para os hidrogeradores. Dessa forma, aplicações dessas medidas causam paradas não previstas para as unidades geradoras, levando a redução da sua disponibilidade e como consequência a sua produção anual de energia elétrica (FELIX, 2011).

O conhecimento da proliferação e incrustação do mexilhão dourado em componentes dos hidrogeradores, como comportas, tubulações de trocadores de calor, filtros e grades, é de extrema importância para o estabelecimento dos procedimentos de manutenção visando à minimização da incrustação (FELIX, 2011).

A fim de diminuir os problemas que o mexilhão dourado causa nas usinas hidroelétricas, foi criado o Centro de Bioengenharia de Espécies Invasoras de Hidrelétricas - CBEIH no ano de 2010 com o projeto de pesquisa e desenvolvimento ANEEL GT-343 que ganhou sua continuidade no ano de 2018 com o projeto de pesquisa e desenvolvimento ANEEL GT-604 através de uma parceria entre a Companhia de Energia de Minas Gerais (CEMIG) e a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Esse centro tem como objetivo pesquisas no combate aos organismos invasores e tem como áreas de interesse a bioengenharia, modelagem ambiental e o monitoramento das espécies. Com esse e outros projeto de pesquisa e desenvolvimento a companhia de geração de energia já investiu mais de 14 milhões de reais no combate ao *Limnoperna fortunei* (CBEIH).

4.3 Extração pelo método de maceração

Um método de extração sólido-líquido muito utilizado é a maceração. É um processo estático, não exaustivo, fortemente dependente do tipo de farmacógeno, da seleção do líquido extrator e da solubilidade dos compostos que se deseja obter ao final do processo. É um procedimento feito em um recipiente fechado, temperatura ambiente, durante um determinado período de tempo, deve ser realizada agitações frequentes e não acontece a renovação do solvente. Não leva ao esgotamento total da matéria que se extrai, isso, devido a saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula (LIEBERMAN *et al.*, 1990).

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 o trabalho é realizado com substâncias ativas pouco solúveis e plantas com altos índices de proliferação microbiana. É uma das técnicas de extração mais usadas devido a simplicidade da operação e custos bem reduzidos (BASSANI *et al.*, 2013).

4.4 Extração pelo método de Soxhlet

A extração Soxhlet foi desenvolvida inicialmente com o objetivo da determinação da quantidade de gordura existente no leite. Ainda nos dias atuais, é um método amplamente utilizado em escala laboratorial na extração sólido-líquido. É uma técnica que desde sua primeira aplicação é referência nesse tipo de extração (CASTRO & GARCÍA-AYUSO, 1998; CASTRO & PRIEGO-CAPOTE, 2010).

O extrator de Soxhlet é um instrumento de laboratório desenvolvido em 1879 por Franz von Soxhlet. Foi construído inicialmente para a extração de lipídios de materiais no estado sólido. A extração usando esse método é realizada quando um composto investigado tem uma solubilidade pequena em um determinado solvente e as impurezas são insolúveis nesse mesmo solvente. Permite uma operação sem necessidade de monitorização constante, na medida em que funciona por forma a usar uma pequena quantidade de solvente, a qual é constantemente reciclada, para dissolver uma grande quantidade de composto.

O extrator de Soxhlet é composto por três partes principais:

- Um percolador (balão de destilação e um condensador de refluxo), que permite o refluxo do solvente.
- Um dedal (um filtro, constituído normalmente por papel de filtro grosso), que retém as partículas sólidas.
- Um sifão, que esvazia periodicamente a câmara onde o dedal é colocado.

Figura 4 - Representação esquemática do extrator de Soxhlet.



O solvente 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. A câmara vai acumulando lentamente o solvente. O componente 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 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, por várias horas, consoante a quantidade de composto necessária e a facilidade com que este é extraído.

Durante cada ciclo, uma porção de composto não-volátil dissolve-se no solvente. Após várias passagens do solvente pelo material sólido, o composto é concentrado no balão de destilação. A vantagem deste sistema é que, em vez de se recorrer a várias passagens com porções de solvente aquecido pela amostra, usa-se uma pequena porção de solvente, o qual passa várias vezes pela amostra, obtendo-se uma

amostra muito mais concentrada. Após a extração, o solvente é removido, normalmente com o uso de um evaporador rotativo. A porção não solúvel do sólido mantém-se no dedal, sendo depois descartada.

De forma pontual podemos dizer que as vantagens do método de Soxhlet são:

- Utiliza refluxo de solvente para a extração.
- Processo de extração intermitente.
- Só pode ser utilizado em amostras sólidas.
- A quantidade de solvente é maior para que o volume total atinja o volume do sifão no equipamento.
- A amostra não fica em contato direto com o solvente em ebulição, evitando a decomposição dos lipídios.

É um método que não requer um treinamento e especialização profunda, tem a capacidade de extrair mais massa da mostra em comparação a métodos mais modernos como a extração de ondas e fluidos supercríticos (CASTRO & GARCÍA-AYUSO, 1998; MELECCHI, 2005).

O extrato bruto que se deseja, é extraído no ponto de ebulição do solvente, desse modo, pode ocorrer a destruição dos compostos-alvo se exposto a temperaturas elevadas (CASTRO & GARCÍA-AYUSO, 1998).

4.5 Solventes polares - Metanol

A escolha do solvente a ser utilizado é apresentado como um parâmetro de alta importância na extração de compostos bioativos, principalmente quando é buscado a obtenção de um ou mais compostos de interesse (SOUZA, 2015).

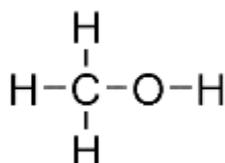
A solubilidade de um composto em um determinado solvente é dependente da sua polaridade, podendo ser polar ou apolar. O estado final da matéria irá depender do solvente que foi inserido na solução. Dessa forma, a solubilidade é entendida como sendo a máxima quantidade possível de um soluto que pode ser dissolvida em uma

determinada quantidade de solvente a uma certa temperatura (COSTA, 2004; PAVIA *et al.*, 2012).

A polaridade de uma molécula é associada ao tipo de ligação que existe entre os átomos. Se a distribuição eletrônica for simétrica nessa ligação, não ocorrerá formação de polos.

Se em uma das partes da molécula houver diferença na quantidade de elétrons, ocorrerá a formação de um polo eletrônico, a distribuição eletrônica será assimétrica e a molécula será considerada polar, tendo como exemplo o metanol (CH₃OH) que é um álcool amplamente utilizado na indústria farmacológica com densidade igual a 792 kg/m³, massa molar igual a 32,04 g/mol, incolor, solúvel em água, tóxico, altamente inflamável e com chamas quase imperceptíveis. Seu ponto de ebulição é atingido a 65 °C e seu ponto de fusão é atingido a - 98 °C (KOTZ, 2010).

Figura 5 - Fórmula estrutural do Metanol.



Se a ligação for entre átomos de mesma eletronegatividade, então a molécula será apolar, porém se a ligação for entre átomos de diferentes eletronegatividades, essa diferença irá induzir o acúmulo de carga em um polo, assim sendo, a molécula será polar (KOTZ, 2010).

A extração total de materiais utilizando solventes polares, como o metanol aquoso, seguida de re-extração com hexano também é uma estratégia muito utilizada para a extração de terpenoides e esteróis (MEDEIROS, 2018).

4.6 Influência dos Parâmetros de extração com tempo, temperatura e composição

Qualquer que seja o processo de extração, a taxa de extração é influenciada por vários fatores, como por exemplo: temperatura, tempo e composição das partículas da matéria-prima, escolha dos solventes, entre outros (ZACHI, 2007).

O solvente colocado na extração pode influenciar significativamente a atividade antioxidante dos extratos obtidos. Água, metanol, hexano, etanol, acetona, soluções aquosas destes solventes são comumente usadas como solvente de extração (HAYOUNI *et al.*, 2007; GÓNZÁLEZ-MONTELOGNGO *et al.*, 2010).

Muitos fatores podem influenciar na extração de compostos bioativos, tais como: a metodologia de extração, a natureza da matriz de estudo, tamanho, o solvente e a concentração utilizada, o tempo e a temperatura de extração (ANDREO & JORGE, 2006).

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 *et al.*, 2016). Fatores como temperatura e tempo de extração e proporção líquido-sólido também afetam a extração com solventes (PIOVESAN, 2016).

As frações de solventes existentes em uma mistura heterogênea são intrinsecamente afetadas pela temperatura, seja na modificação dos seus coeficientes de distribuição ou variando as suas pressões de vapor. Dessa forma, o processo de extração deve ocorrer com um controle de temperatura (LOPES, 2012).

A temperatura pode ser usada como uma variável para alterar a seletividade. Temperaturas elevadas são usadas as vezes para manter baixas viscosidades minimizando os problemas de transporte de massa. Em muitas aplicações, é

necessário um processo de separação suave, pois altas temperaturas podem degradar produtos de interesse (MADHAVAN, 2008).

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 *et al.*, 2015).

Estudos realizados por ROCHA *et al.*, 2013 utilizando metanol como solvente para a obtenção de dois extratos brutos hidroalcoólicos do molusco *Neritina natalensis*, onde foram imersos em metanol absoluto e extração acontecendo durante 72 horas. Neste trabalho os extratos desse molusco apresentaram baixa atividades contra três linhagens de células cancerígenas. Entretanto, esses resultados não satisfatórios podem ter acontecido devido a influências dos parâmetros de extração com tempo, temperatura e composição utilizados por essa equipe de pesquisa.

4.7 Descrição de moléculas bioativas – lipídios e metabólitos secundários de moluscos

Ainda que a utilização dos produtos naturais pelo homem data dos tempos remotos com registros que vem desde 1500 a.C., o desenvolvimento e aplicação dos produtos naturais apresentaram poucos avanços até a década de 1940, somente com a chegada de métodos físicos de análise e de purificação, como por exemplo a espectroscopia na região do visível, ultravioleta e infravermelho, no início dos anos 40 e ressonância magnética nuclear no início dos anos 60 (SOUZA *et al.*, 2007).

Substâncias bioativas são moléculas orgânicas de baixa massa molecular que apresentam uma ampla diversidade química e diversos efeitos sobre os organismos vivos, sendo associadas às mudanças em seu comportamento, fisiologia ou metabolismo. Os produtos gerados a partir desses compostos podem ser aplicados em controle biológico, manejo de pragas, conservação e uso de recursos genéticos, geração de organismos geneticamente modificados, produção de alimentos, fitoterápicos, bioinseticidas e biossensores (EMBRAPA).

As moléculas bioativas podem ser identificadas a partir de triagens reais (biológicas e bioquímicas) ou virtuais (computacionais) de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias, ou ainda por meio de planejamento racional. Contudo, em todos os casos, as propriedades biológicas devem ser determinadas experimentalmente, sendo fundamental o desenvolvimento de ensaios padronizados e validados de alta qualidade (GUIDO *et al.*, 2010).

Metabólitos secundários são moléculas não essenciais para o crescimento, manifestando-se em diversas interações como antagonismos, sinergismos, exercem efeito regulatório ou modular entre microrganismos e outros seres vivos, como plantas, microfauna, mesofauna e animais. Estes compostos concedem vantagens competitivas ao organismo produtor, e podem também ter ações como molécula sinalizadora. Estes compostos podem inibir ou causar mortes do organismo alvo, podendo ser específico ou não o efeito tóxico (DEMAIN, 1998; BERDY, 2005).

Antibióticos são metabólitos secundários isolados de microrganismos e que possuem atividade antibacteriana, antifúngica, antiprotozoário, antitumoral e antiviral. Estes metabólitos possuem ação em diferentes processos celulares, como a replicação e a síntese de macromolécula em células procarióticas e eucarióticas, sendo ativos em baixas concentrações (BERDY, 2005; EL-SHALOURY *et al.*, 2009).

Os metabólitos secundários que se destacam, tanto para os seres humanos como em animais e plantas, são os alcaloides, os fenóis, os óleos essenciais, os taninos, os flavonoides e as saponinas (RODRIGUES *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Solventes mais utilizados na obtenção de metabólitos secundários.

Solventes	Metabólitos Secundários
Água	Antrocianina, Taninos, Saponinas, Terpenos, Polipeptídeos, Lectinas
Etanol	Taninos, Polifenóis, Poliacetileno, Flavonoides, Terpenos, Esterol, Alcaloides
Metanol	Antrocianina, Terpenos, Saponinas, Taninos, Totarol, Quasinoídes, Lactones, Flavones, Fenones, Polifenóis
Clorofórmio	Terpenos, Flavonoides
Éter	Alcalóides, Terpenos, Cumarinas, Ácidos Graxos
Acetona	Fenol, Flavonol

Fonte: PANDEY & TIPATHI (2014)

O ambiente marinho, em especial nas regiões tropicais, possui uma vasta diversidade de espécies comparável àquela presente nas florestas tropicais. Esta riqueza de espécies é capaz de produzir enormes variedades de estruturas químicas com um potencial elevado para descoberta de novas moléculas bioativas (MOLINSKI *et al.*, 2009).

A abundância de compostos químicos no ambiente marinho pode ser devida, em parte, à extrema competição entre os organismos por espaços e recursos. Essa teoria está ligada a organismos sésseis, que conseguem biossintetizar uma diversidade de compostos químicos ou metabólitos secundários, usado para a defesa em um ambiente de competição, oferecendo vantagens evolutivas na prevenção de predação e aderência. Esses compostos são substâncias com valores terapêuticos que causam efeitos nos organismos vivos, como antibióticos, antitumorais, antivirais, inseticidas, substâncias citotóxicas e neurotóxicas, entre outros (DARIAS-JEZEZ, 1998).

Os integrantes do filo *Mollusca* incluem formas tais como os mariscos, as ostras, as lulas, os polvos e os caramujos. Os moluscos constituem o maior filo de invertebrados depois dos artrópodes. Já foram descritas mais de 50.000 espécies de

moluscos, sendo a classe *Gastropoda* a maior deste filo com aproximadamente 30.000 espécies (RUPPERT & BARNES, 1994).

As atividades farmacêuticas vêm se beneficiando do carbonato de cálcio extraído das conchas de moluscos. Os suplementos alimentares que ajudam no confronto e prevenção da osteoporose é um exemplo. Estudos realizados por cientistas nos Estados Unidos apresentaram que no combate a tensão pré-menstrual, o cálcio de concha de ostras reduziu em 50% os sintomas, a depressão e as cólicas (SANT'ANNA *et al.*, 2007).

Estudos realizados com o extrato do nudibrânquio *Hypselodoris zebra* (Heilprin, 1889), revelou a presença de diversos furanosesquiterpenos além dos compostos 5-acetoxi e 5-hidroxi-nakafurano-8 (PEREIRA, 2012). Uma série de novos sesquiterpenos, as dendocarbinas A-N, foram obtidas a partir do extrato etanólico do nudibrânquio *Dendrodoris carbunculosa*, sendo que alguns destes sesquiterpenos exibiram atividade citotóxica contra linhagens de células de leucemia P388 (SAKIO, 2001). Esta espécie de molusco se mostrou uma interessante fonte de substâncias biologicamente ativas, pelo fato de utilizar uma defesa química contra predadores (PEREIRA, 2012). Dessa forma, deve ser realizado experimentos em diferentes espécimes de moluscos a fim de caracterizar novas moléculas para uso na ciência.

4.8 Técnica de cromatografia, um apanhado geral

A cromatografia é uma técnica de separação usada para os componentes de uma mistura complexa. Os constituintes da amostra são divididos entre duas fases, uma que permanece estacionária, à medida que a outra passa entre os interstícios ou sobre a superfície da fase estacionária. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, pode ser gasosa, líquida ou um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária, arrastando os componentes na mistura. O movimento da fase móvel resulta em uma migração diferencial dos componentes da amostra. O mecanismo envolvido nesta migração

diferencial vai depender do tipo de fase móvel e fase estacionária que foi utilizada (PERES, 2002; JACQUES, 2005).

A amostra é inserida no injetor do cromatógrafo por meio de uma seringa pequena ou de um sistema de injeção automático, onde é aquecida e vaporizada, ela pode ser um gás ou um líquido volátil. Em certas temperaturas, as substâncias vaporizam e de acordo com suas propriedades e as propriedades da fase estacionária, são retidas por um determinado tempo, chegando à saída da coluna em momentos diferentes. Os constituintes da amostra se movem na coluna a uma velocidade determinada por vários fatores, e um deles é pela força de retenção, que vai depender da solubilidade destes compostos na fase estacionária e da sua volatilidade na fase móvel. Os componentes da amostra, já separados na coluna, entram no detector, onde são individualmente identificados (COLLINS *et al.*, 1995; WU *et al.*, 2001).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem esse nome pois a sua fase móvel é um líquido. É um método amplamente utilizado na separação de compostos termolábeis e macromoléculas ou espécies iônicas. É utilizada para isolar produtos naturais, purificar produtos de reações químicas, no controle de qualidade de plantas medicinais, busca de metabólitos e moléculas bioativas, em estudo de ecologia química e até mesmo em estudos quimiossistemáticos (PERES, 2002; CORREA *et al.*, 2016).

As fases estacionárias sólidas da cromatografia líquida de alta eficiência levam à separação por adsorção e fases estacionárias líquidas por partição. Essa técnica é caracterizada na fase estacionária pelo uso de colunas estreitas em aço inox, com diâmetro interno de 2 mm a 3 mm, com empacotamento de partículas de tamanhos entre 3 μm a 10 μm . A fase móvel circula perante alta pressão, ao longo da coluna com um fluxo controlado. O uso da fase estacionária por micropartículas permite alta eficiência na separação e a pressão permite análises mais rápidas (CORREA *et al.*, 2016).

A cromatografia gasosa é uma técnica com poder de resolução excelente, muito utilizada pelos pesquisadores para análise de extratos, visto que permite separar os componentes vaporizáveis e fornece um espectro de massas para cada pico

possibilitando análise de várias substâncias de uma mesma amostra. Esse espectro revela a massa molecular e o padrão de fragmentação. Por meio da massa molecular, é obtido dados sobre qual classe química a substância é pertencente. Já o padrão de fragmentação serve para comparar com os dados da bibliografia de espectros de massas do computador. Visto que feita a comparação, o computador mostra as probabilidades quanto à identidade da substância que foi analisada (PERES, 2002; JACQUES, 2005). Conforme os tipos de substâncias a serem analisadas e do detector utilizado, é possível detectar cerca de 10^{-12} g do composto por mL de solução. Essa sensibilidade permite que pequenas quantidades de amostra possam ser analisadas (PERES, 2002; JACQUES, 2005).

A fase estacionária da cromatografia gasosa pode ser um material líquido ou sólido, que proporciona a separação da mistura através de processos químicos e físicos. O que separa as substâncias presentes na amostra por meio das diferenças de solubilidade e volatilidade, é a fase estacionária líquida que é um fluido pouco volátil que recobre um suporte sólido. Como fase móvel é utilizado um gás, chamado gás de arraste, que conduz a amostra através da coluna de separação até o detector, onde os compostos já separados são reconhecidos. Os gases com maior utilização são o hidrogênio (H), argônio (Ar), nitrogênio (N) e hélio (He). Tendo este último pouco utilizado no Brasil devido ao alto custo e difícil obtenção (PERES, 2002; CORREA *et al.*, 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 *et al.*, 2016).

4.9 Identificação de moléculas bioativas e genômicas com a técnica de cromatografia

O conhecimento de novas tecnologias permitiu o sequenciamento do genoma de variadas espécies de organismos. Técnicas refinadas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com alta sensibilidade (LC-MS/MS), viabilizou o estudo molecular em níveis quantitativos e qualitativos (WRIGHT *et al*, 2012; SANSON, 2018).

Esses estudos possuem como ponto de partida o preparo de extratos contendo uma mistura complexa de proteínas que são digeridas a peptídeos com o uso de enzimas (SANSON, 2018).

Em seguida, os peptídeos formados são sujeitos a separação por cromatografia líquida, comumente em sistema de fase reversa. Nesse sistema, a fase estacionária é uma sílica híbrida modificada na qual o ligante, geralmente, é uma cadeia de dezoito carbonos, enquanto que a fase móvel é composta por um sistema binário de água e acetonitrila, com ácido fórmico como modificador de fase e modo de eluição em gradiente. Utilizando essa metodologia se tem primeiro a eluição dos peptídeos hidrofílicos e a medida em que o gradiente aumenta a proporção de fase orgânica que é a acetonitrila, ocorre a eluição dos peptídeos hidrofílicos (SANSON, 2018).

Acoplado ao final do cromatógrafo líquido se encontra um espectrômetro de massas, possuindo uma fonte de ionização. Geralmente é utilizado uma fonte de elétron spray, a qual ocorre a aplicação de uma diferença de potencial na ordem de 2 kV (quilovolt) a 4 kV (quilovolt) para a formação dos íons. No final, restam os íons positivos formados que são direcionados para o interior do espectrômetro de massas (SANSON, 2018).

O objetivo do equipamento de espectrometria de massas é a obtenção de espectros de massas de peptídeos ionizados no primeiro estágio da análise de massas e também isolar e fragmentar peptídeos mais intensos em cada faixa de tempo (COTTRELL, 2011).

Depois dessa análise, é gerado uma grande quantidade de dados de espectrômetro de massas que são analisados em softwares como por exemplo o Mascot, Proteome Discover, Peaks e MaxQuant para que seja possível processar a identificação das proteínas da amostra (COTTRELL, 2011).

Para que o software analise os resultados é necessário fornecer um banco de dados contendo as sequências de aminoácidos de cada proteína do organismo ao qual a amostra pertence. Assim, o algoritmo realiza o processamento dos dados levando em consideração as mesmas variáveis que se empregou durante o experimento, como enzima para digestão, possíveis modificações como oxidação de resíduos de metionina, equipamento utilizado, dentre outros (SANSON, 2018).

Esta revisão bibliográfica foi feita baseada na investigação de uma série de temas importantes para o entendimento da sequência deste trabalho onde será apresentado os resultados e métodos utilizados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção descreverá o trabalhos de campo realizado no reservatório de Volta Grande e experimentos realizados com o intuito da obtenção do extrato metanólico do mexilhão dourado no laboratório de química orgânica do departamento de química - DEQUI e no 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, também, deve-se destaca a utilização do laboratório da Central Analítica de instrumentação do instituo de Química da Universidade de São Paulo (USP).

5.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados na execução deste projeto foram:

- Amostras de mexilhão dourado vivo;
- Medidor multiparâmetro – AK88 akso;
- Turbidímetro Digital - TU430 akso;
- Solvente Metanol (CH_3OH);
- Extrator de Soxhlet;
- Papel de filtro para inserir os mexilhões no Soxhlet;
- Becker de 100 mL;
- Balança analítica;
- Rotavapor;
- Cromatografo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM).

Na sequência do texto foi descrito a execução da metodologia adotada neste projeto.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Coleta das amostras

O trabalho de coleta do *Limnoperna fortunei*, aconteceu no dia 14 de março de 2020 na estação ambiental de Hidrobiologia e Piscicultura da Usina Hidroelétrica de Volta Grande, georreferenciada sob as coordenadas 20°01'32"S; 48°13'09"W, localizada na bacia do rio Paraná e pertencente ao rio Grande na cidade de Conceição das Alagoas, divisa entre os estados de São Paulo e Minas Gerais. Este bivalve é uma espécie exótica no Brasil e não se caracteriza como espécie em extinção ou protegida.

Figura 6 - Cena de satélite indicando o local de coleta dos mexilhões.



Fonte: GOOGLE, 2020

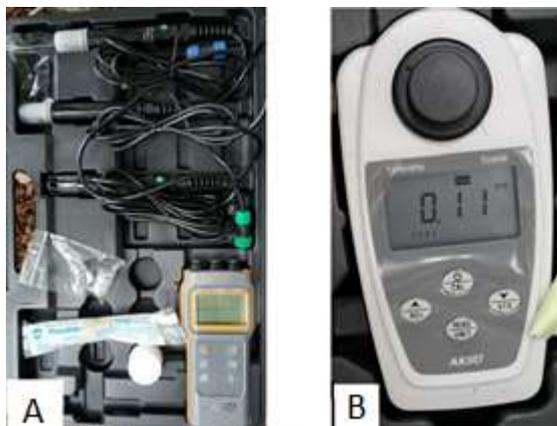
Figura 7 - Painel de imagens demonstrando o procedimento adotado para a realização de coleta do *Limnoperna fortunei*. De A a C local de coleta e a coleta dos mexilhões e D local de aclimatização dos mexilhões coletados.



Fonte: Elaboração do Autor.

No momento da captura dos mexilhões foram mediadas a temperatura da água (29,2 °C), a porcentagem de Oxigênio dissolvido na água (45,50 %), a condutividade elétrica (40,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ – microsiemens por centímetro), o potencial hidrogeniônico – grau de acidez e alcalinidade (7,47 pH) e a Turbidez (0,11 NTU - *Nephelometric Turbidity Unity*). As medidas foram obtidas utilizando o equipamento AK88 medidor multiparâmetro da marca akso e o Turbidímetro Digital - TU430 akso.

Figura 8 - Equipamentos utilizados no trabalho para a caracterização do ambiente em que os mexilhões foram coletados: A) Medidor multiparâmetro - AK88 akso e B) Turbidímetro Digital - TU430 akso.



Fonte: Elaboração do Autor.

Após a coleta, os mexilhões foram transportados em sacolas de pano e colocados em caixas de isopor com água cobrindo os moluscos. Feito isso, foi inserido um aerador para oxigenar a água durante o transporte que foi realizado de acordo com as normas de biossegurança a fim de impedir que a espécie se alastre no meio ambiente.

5.2.2 Extração pelo método de maceração

O primeiro método utilizado foi o de maceração. Os mexilhões passaram por um processo de limpeza com água corrente e remoção de sua concha e em seguida pesados (7,02 g para ser usado no solvente metanol) e posteriormente imersos em 200 mL de solvente a temperatura ambiente por 72 horas. Foi realizado o processo de agitação magnética a cada 12 horas.

Figura 9 – Agitação da amostra.



Fonte: Elaboração do Autor.

A agitação do solvente é importante pois aumenta a difusão turbilhonar e, portanto, aumenta a transferência de material das partículas para o volume da solução. Além disso, a agitação de partículas finas em suspensão previne a sedimentação e o uso mais efetivo é feito nas superfícies que não foram atingidas (RICHARDSON *et al.*, 2002).

5.2.3 Extração pelo método de Soxhlet

O segundo método utilizado foi o de Soxhlet onde os mexilhões foram colocados no cartucho de papel de filtro e pesados (6,98 g na extração por metanol). Nenhuma amostra pode sair do cartucho durante a extração, dessa forma, a preparação do cartucho foi feita de forma rigorosa.

Com a adição do solvente e do cartucho, ligou-se o escoamento de água para que acontecesse o resfriamento do condensador, encontrado na parte superior do

aparelho e posteriormente foi feita a ligação do extrator. Após cerca de 10 min inicia-se a evaporação do solvente e, assim, o processo de extração.

5.2.4 Concentração dos extratos – Evaporação rotativa (Rotavapor)

Os extratos metanólicos foram concentrados em compostos de xarope utilizando o equipamento Rotavapor de extração líquido-líquido, separando o solvente do material de interesse (Figura 11).

Na concentração utilizando a evaporação rotativa, os extratos foram agitados continuamente por rotação, pelo motor do rotoevaporador, eliminando-se o solvente em forma de vapor. O solvente foi condensado no balão, podendo ser recuperado e reutilizado novamente em experimentos futuros. Concentrou-se os volumes de extrato, à temperatura média de 75°C, suficientes para que o solvente entrasse em ebulição.

Figura 10 – Concentração do extrato bruto utilizando o equipamento Rotavapor.



Fonte: Elaboração do Autor.

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

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

A cromatografia gasosa utiliza um canal reduzido ao qual se dá o fluxo, conhecido como coluna, através do qual diferentes componentes da amostra passam em um fluxo de gás condutor, ou gás transportador, a fase móvel em diferentes taxas dependendo de diversas propriedades químicas e físicas e suas interações com um específico recheio da coluna, chamada fase estacionária.

Os constituintes químicos que saem no fim da coluna, são reconhecidos e identificados eletronicamente. A utilidade da fase estacionária na coluna é separar componentes diferentes, provocando em cada um dos componentes da mistura, tempos de retenção diferentes para efetivar o trajeto da coluna. Outros critérios que podem ser usados para alterar o tempo ou a ordem de retenção são a temperatura e a taxa de fluxo do gás condutor.

Amostras de 2 mg do extrato do *Limnoperna fortunei*, foram submetidos à cromatografia gasosa diluídas em 1 mL de metanol. Utilizou-se cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo 2010 Plus. O gradiente de temperatura do forno da coluna: 50,0 °C, temperatura de injeção: 280,00 °C, modo de injeção: Split, modo de controle de fluxo: velocidade linear, pressão: 107,4 kPa, fluxo total: 13,9 mL/min, fluxo da coluna: 1,82 mL/min, velocidade linear: 48,9 cm/s, fluxo de purga: 3,0 mL/min, proporção de divisão: 5,0, splitter Hold: OFF e tempo de equilíbrio: 1,0 min. A temperatura da fonte de íons: 280,00 °C, interface da temperatura: 280,00 °C, tempo de corte do solvente: 2,50 min, modo de ganho do detector: relativo ao resultado do ajuste, ganho do detector: 0,99 kV +0,00 kV, limiar: 1000. A hora de início: 2,60 min, hora de término: 97,60 min, modo ACQ: Scan, tempo do evento: 0,30 s, velocidade de digitalização: 2500, iniciar m/z: 37,00, fim m /z: 660,00, unidade de entrada de amostra: GC. Foi

aplicada o método de padronização interna com objetivo de identificar os analitos voláteis por retenção relativa em relação ao acetato de tocoferol. Para isso, foi utilizado o cromatograma padrão de referências analisadas em CG por padronização interna (CARVALHO, 2002).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

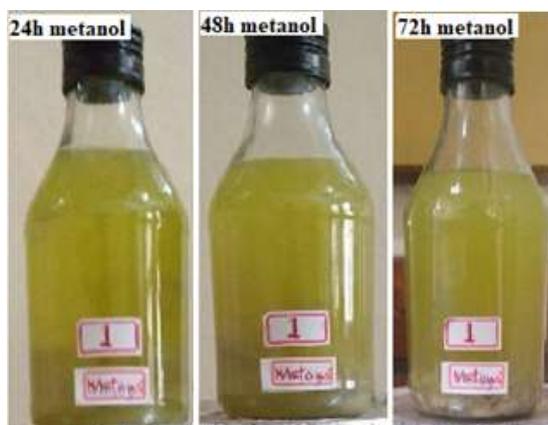
Nesta seção são apresentados os resultados da análise experimental dos extratos brutos obtidos pelos métodos de extração utilizados neste trabalho. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foi utilizada de forma exploratória para identificar os componentes dos extratos metanólicos do *Limnoperla fortunei*.

6.1 Extração pelo método de maceração

Ao final do processo de extração por maceração o solvente extraído pelo evaporador rotativo foi armazenado em frascos de vidro e guardado seguindo procedimentos de segurança do laboratório de química para que possa ser usado em novos experimentos futuros.

Na imagem abaixo (Figura 12) é possível observar o início, o meio e o fim do experimento onde a extração já está sendo vista a olho nu nos recipientes de vidro. Dessa forma, é possível visualizar a diferença na coloração e na turbidez do solvente decorrido os tempos de 24 h, 48 h e 72 h do início do procedimento da extração utilizando o método de maceração.

Figura 11 – Concentração dos solventes de acordo com a descrição na Tabela 2 e os resultados da extração após 24 h, 48 h e 72 h de experimento.



Fonte: Elaboração do Autor.

Depois de passado 72 horas do início do experimento, já é possível perceber a intensa turbidez e coloração amarelada na vidraria, levando a esperar um maior rendimento e efetividade do processo de extração para este intervalo de tempo.

Utilizamos 71,34 g de mexilhões *in natura* para esta etapa. Após sua limpeza foram extraídas as conchas. A massa dos corpos dos mexilhões, 14,08 g foram divididas em duas porções onde 7,02 g foram destinado ao processo de extração por maceração.

Tabela 2 – Resultados obtidos com o processo de extração por maceração.

Amostra	A
Massa inicial dos mexilhões com concha (g)	71,34
Massa final dos mexilhões sem cocha (apenas corpo) (g)	14,08
Concentração de Metanol (%)	100
Massa do mexilhão por tipo de solvente (g)	7,02

Fonte: Elaboração do Autor.

6.2 Extração pelo método de Soxhlet

Inicialmente com o papel de filtro, foi feito um cartucho com o diâmetro interior do corpo do extrator de Soxhlet, para conter as amostra durante a extração.

Figura 12– A) Cartucho de papel de filtro (dentro do círculo) com o corpo dos mexilhões e B) Extração em andamento no laboratório utilizando o método de Soxhlet.



Fonte: Elaboração do Autor.

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

Utilizamos 67,62 g de mexilhões *in natura* para esta etapa. Após sua limpeza foram extraídas as conchas. A massa dos corpos dos moluscos foram divididas em duas porções onde 6,98 g foram destinado ao processo de extração utilizando o método de Soxhlet.

Tabela 3 – Resultados obtidos utilizando o método de Soxhlet.

Amostras	B
Massa de mexilhão com concha (g)	67,62
Massa de mexilhão (corpo) no Soxhlet (g)	6,98
Concentração de Metanol (%)	100
Tempo de extração (min)	60

Fonte: Elaboração do Autor.

Quando o nível de solvente atingia o sifão, o extrato era sifonado pelo braço lateral, levando consigo as substâncias solúveis para o balão de destilação e assim começando um novo ciclo a medida que quando fosse completado o tempo de 60 minutos, o experimento fosse interrompido.

Quanto maior o tempo de extração, maior será o rendimento. Entretanto, o sistema tende a um equilíbrio de concentração com o tempo e o rendimento não aumentará mais a partir deste ponto de estagnação.

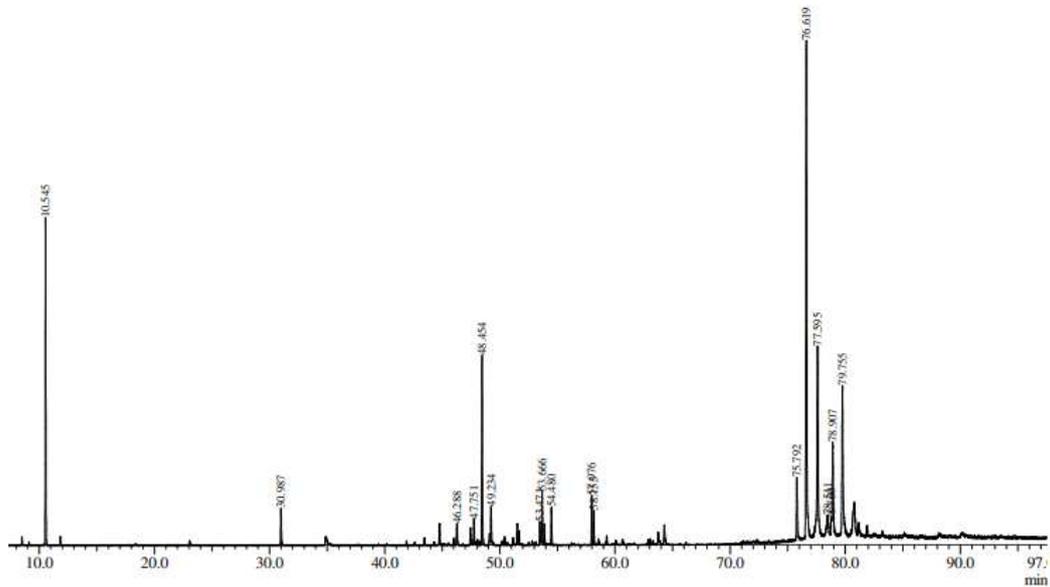
Na maior parte dos casos, a solubilidade dos materiais é elevada com o aumento da temperatura, e assim ampliando a facilidade da extração, dispondo de uma taxa de extração mais alta (RICHARDSON *et al.*, 2002).

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

As amostras obtidas pelos métodos de extração de maceração e Soxhlet foram analisadas via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

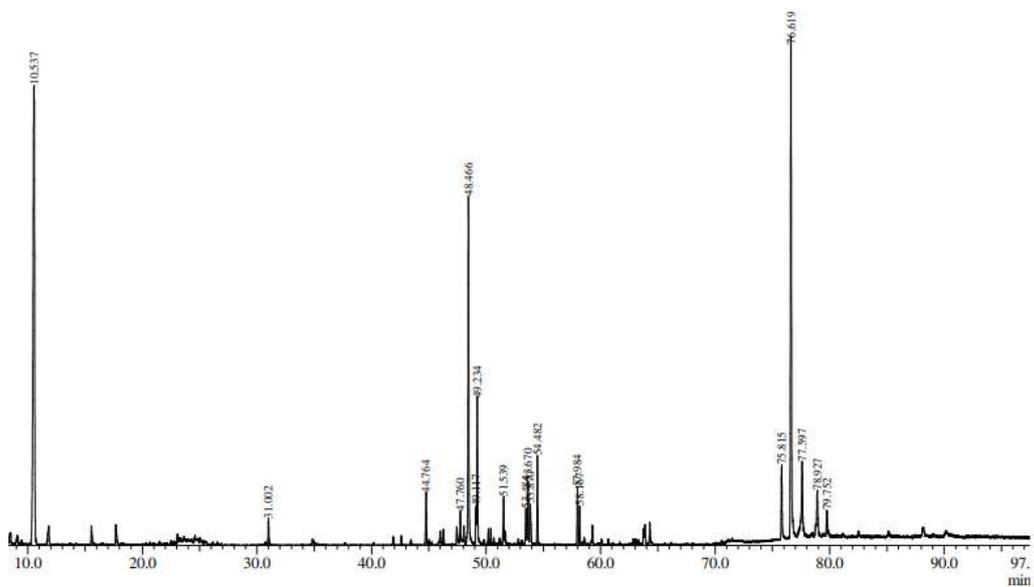
As figuras 12 e 13 representam os cromatogramas de íons totais dos dois métodos de extração.

Figura 13 – 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).



Fonte: Elaboração do Autor.

Figura 14 – Cromatograma do íon total do extrato do mexilhão dourado obtido via extração por Soxhlet utilizando metanol como solvente (no eixo x é tempo e no eixo y a intensidade, cps).



Fonte: Elaboração do Autor.

Figura 15 – Quantidade de estruturas moleculares químicas encontradas em cada método de extração e quantidade encontrada em comum entre os dois métodos.

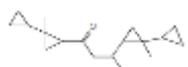


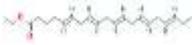
Fonte: Elaboração do Autor.

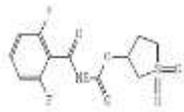
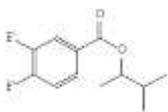
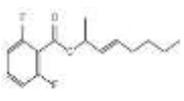
A Tabela 4 apresenta todos os 98 compostos identificados nos extratos do mexilhão dourado e a composição química individual de cada composto obtido utilizando os métodos de extração por maceração e Soxhlet.

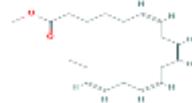
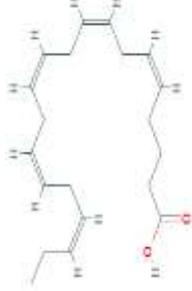
Na análise feita a partir do extrato utilizando o solvente metanol e o Soxhlet foram identificados 74 compostos, já na análise feita a partir do extrato metanólico e utilizando o método de maceração foram identificados 72 compostos. Desses, 48 compostos foram encontrados tanto na extração pelo método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

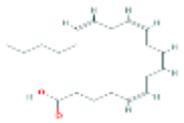
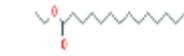
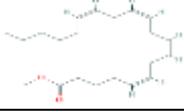
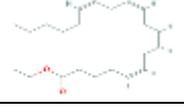
Tabela 4 - Resultados obtidos depois da leitura do cromatograma.

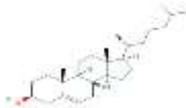
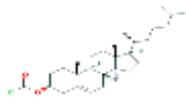
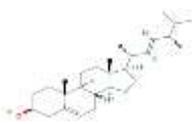
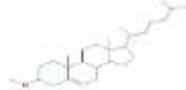
Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Fórmula Estrutural	Classificação Química
Maceração	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	110-42-9	Decanoato de metila		Ésteres
Maceração	C ₁₂ H ₁₈	61227-88-1	5-etil-3-metil-3,4-nonadien-6-ino		Hidrocarboneto
Maceração	C ₁₂ H ₂₂	6975-99-1	6-Dodecine		Hidrocarboneto
Maceração	C ₁₂ H ₂₂	5876-87-9	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
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

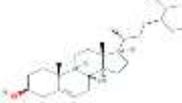
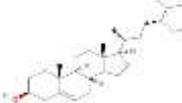
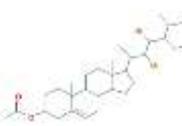
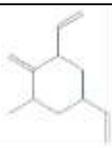
Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Fórmula Estrutural	Classificação Química
Maceração	C19H38O2	112-61-8	Estearato de metila		Ésteres
Maceração	C22H34O2	84494-70-2	Éster etílico de ácido eicosapentaenóico		Ésteres
Maceração	C22H40O2	56599-50-9	2- (7-Heptadeciniloxi) tetrahydro-2H-pirano		Ésteres
Maceração	C27H46O	80-99-9	Lathosterol		Fenóis
Maceração	C28H44O	57-87-4	Ergosterol		Fenóis
Maceração	C28H44O	6538.05.2	Ergost-4,7,22-trien-3alpha-ol		Fenóis
Maceração	C28H44O	97583-19-2	Ergosta-4,7,22E-trien-3beta-ol		Fenóis
Maceração	C28H46O	2465.11.4	Stellasterol		Fenóis
Maceração	C5H12O	1565-80-6	(S) - (-) - 2-Metil-1-butanol		Álcoois
Maceração	C5H12O	137-32-6	2-metil-1-butanol		Álcoois
Maceração	C9H16	6191-90-8	1-butilespiro [2.2] pentano		Hidrocarboneto

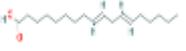
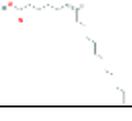
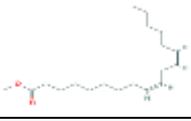
Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Fórmula Estrutural	Classificação Química
Maceração e Soxhlet	C ₁₀ H ₁₆	5989-54-8	(-)-Limoneno		Fenóis
Maceração e Soxhlet	C ₁₀ H ₁₆	5989-27-5	D-Limoneno		Fenóis
Maceração e Soxhlet	C ₁₂ H ₁₁ F ₂ N ₂ O ₅ S	0-00-0	1,1-Dioxidotetrahidrotien-3-il 2,6-difluorobenzoilcarbato		Haletos Orgânicos
Maceração e Soxhlet	C ₁₂ H ₁₄ F ₂ O ₂	0-00-0	Ácido 3,4-difluorobenzoico, 3-metilbutil-2 éster		Haletos Orgânicos
Maceração e Soxhlet	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	110-38-3	Decanoato de etila		Ésteres
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		Aldeído
Maceração e Soxhlet	C ₁₅ H ₁₈ F ₂ O 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		Aldeído

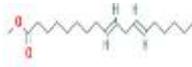
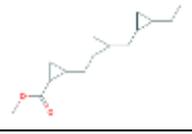
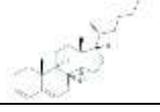
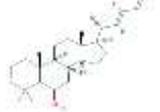
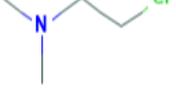
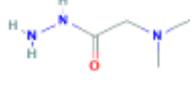
Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Fórmula Estrutural	Classificação Química
Maceração e Soxhlet	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	28267-29-0	Tridecanoato de etila		Ésteres
Maceração e Soxhlet	C ₁₆ H ₃₂ O	629-80-1	Hexadecanal		Aldeído
Maceração e Soxhlet	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₃	0-00-0	Decil 4-carbamoil-1-piperidinaacetato		Ésteres
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		Aldeído
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
Maceração e Soxhlet	C ₁₉ H ₄₀ O	1454-84-8	1-Nonadecanol		Álcoois
Maceração e Soxhlet	C ₂₀ H ₂₆ F ₂ O ₂	0-00-0	Ácido 2,6-difluorobenzoico, éster tridec-2-ínico		Haletos Orgânicos
Maceração e Soxhlet	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	10417-94-4	Ácido eicosapentaenóico		Ácidos Carboxílicos

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Fórmula Estrutural	Classificação Química
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
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 docosahexaenóico		Ácidos Carboxílicos
Maceração e Soxhlet	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	1808-26-0	Etil araquidonato		Ésteres

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Fórmula Estrutural	Classificação Química
Maceração e Soxhlet	C22H44O2	18281-05-5	Etil araquidato		Ésteres
Maceração e Soxhlet	C27H44O	92218-20-7	22-desidrocolesterol		Fenóis
Maceração e Soxhlet	C27H46O	57-88-5	Colesterol		Fenóis
Maceração e Soxhlet	C28H45ClO ₂	7144.08.3	Cloroformato de colesterol		Haleto Orgânicos
Maceração e Soxhlet	C28H46O	474-67-9	Brassicasterol		Fenóis
Maceração e Soxhlet	C28H46O	177962-83-3	Ergost-5,8 (14) - dien-3-ol		Fenóis
Maceração e Soxhlet	C28H46O	17472-78-5	Crinosterol		Fenóis
Maceração e Soxhlet	C28H48O	4651-51-8	22,23-Diidrobrassicasterol		Fenóis
Maceração e Soxhlet	C28H48O	474-62-4	Campesterol		Fenóis
Maceração e Soxhlet	C28H48O	29944-53-4	3-metoxicolest-5-eno		Ésteres

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Fórmula Estrutural	Classificação Química
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 ₂ O 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 ₅ H ₁₂ O	123-51-3	Álcool isoamílico		Álcoois
Maceração e Soxhlet	C ₅ H ₁₂ O	71-41-0	1-pentanol		Álcoois
Maceração e Soxhlet	C ₁₅ H ₂₄ Cl ₂ O ₂	0-00-0	Ácido dicloroacético, éster tridec-2-ínico		Haletos Orgânicos
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-metilidenciclohexano		Hidrocarboneto

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Fórmula Estrutural	Classificação Química
Soxhlet	C ₁₂ H ₂₄ O	112-54-9	Dodecanal		Aldeído
Soxhlet	C ₁₃ H ₂₆ O	26537-04-2	1-dodeceno, 1-metoxi-		Ésteres
Soxhlet	C ₁₃ H ₂₆ O	10486-19-8	Tridecanal		Aldeído
Soxhlet	C ₁₅ H ₁₀ F ₂ O ₃	0-00-0	2-acetilfenil 2,6-difluorobenzoato		Haleto 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
Soxhlet	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	506-21-8	Ácido linoeláidico		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

Método	Fórmula Molecular	CAS	Nome	Fórmula Estrutural	Classificação Química
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
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) -tioureia		Aminas

Fonte: Próprio Autor; Adaptado de PUBCHEM (2021).

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

Tabela 5: Quantidade de compostos em relação a sua classificação química.

Classificação Química	Número de compostos
Aminas	2
Aldeído	7
Ácidos Carboxílicos	9
Álcoois	9
Haleto Orgânicos	9
Hidrocarboneto	9
Fenóis	18
Ésteres	35
Total	98

7 CONCLUSÃO

Na execução deste projeto experimental de caráter exploratório, o molusco *Limnoperna fortunei* foi submetido aos processos 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 de técnicas cromatográficas (CG/EM) foi possível identificar o perfil molecular dos extratos obtidos por diferentes formas de extração.

Na amostra obtida pelo método de Soxhlet foram detectados e identificados 74 compostos químicos, já na amostra obtida pelo método de maceração foram 72, com 48 compostos comuns aos dois tipos. Desse total de 98 compostos, foi caracterizado 2 aminas, 7 aldeídos, 9 ácidos carboxílicos, 9 álcoois, 9 haletos orgânicos, 9 hidrocarbonetos, 18 fenóis e 35 ésteres.

Para trabalhos futuros é sugerido realizar o mesmo experimento utilizando outros solventes e a miscigenação dos mesmos buscando melhorar os resultados da extração. Além disso, realizar a análise biotecnológica dessas moléculas, a fim de identificar metabólitos secundários com possíveis atividades biológicas, com grande potencial antifúngico, antibacteriano, anti-incrustante e nos demais seguimentos como: o farmacológicos e medicinal tais como antioxidante, antialérgica, anticancerígena, antibacteriana, analgésicas, antibióticas, antimicóticas, imunomoduladoras, anti-inflamatória, tónicas, expectorantes e diuréticos.

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, gostaríamos de relatar que este trabalho foi desenvolvido durante a pandemia do COVID 19. Muitos esforços foram realizados para se chegar a estes resultados. Dificuldades na obtenção de amostras e uso de laboratórios e técnicas analíticas impediram grande parte de nossos esforços

destinados a ampliar nossa investigação principalmente no que diz respeito a moléculas bioativas.

REFERÊNCIAS

ANDREO, D. & JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ALMEIDA, M. N. & OLIVEIRA, M. P. Lista comentada e ilustrada dos *Scaphoda Brasileiros* da Coleção do Setor de Malacologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Revista Brasil de Zootecias Juiz de Fora**, v. 2, n. 1, p. 45-56, 2000.

BARBA, F. J.; Zhu, Z.; Koubba, M. *et al.* Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by - products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p.96 - 109, 2016.

BASSANI, V. L.; GONZÁLES, O. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 1, p. 14-17, 2013.

BECKER, H. G. O. *et al.* **Organikum - química orgânica experimental**. 2ª. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1997.

BERMUDEZ-SIERRA, J. J. Extração de lipídios da microalga *Scenedesmus sp.* com diferentes mistura de solventes orgânicos. **Rev. Bio.Agro**, Popayán, v. 16, n. 2, p. 88-98, 2018.

BEZERRA, S. C. R; VIEIRA.A. A; BARBOSA-FILHO. J.M, *et al.* Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1152-1160, 2006.

BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal Antibiot**, v. 58, p. 1-26, 2005.

BRAGA, F. M. S. & GOMIERO, L. M. Análise da pesca experimental realizada no reservatório de Volta Grande, rio Grande (MG/SP). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, p. 131-138, 1997.

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

CASE STUDIES. **CTG BRASIL: Investimento em pesquisa pode levar à erradicação do mexilhão-dourado**. Disponível em: <<https://casestudies.com.br/ctg-brasil-investimento-em-pesquisa-pode-levar-a-erradicacao-do-mexilhao-dourado/>>, 2019. Acesso em: 11/07/2020.

CASTRO, M. D. L. & GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, p. 1-10, 1998.

CASTRO, M. D. L. & PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.

CBEIH. **Centro de Bioengenharia de Espécies Invasoras de Hidrelétricas**. Disponível em: <<http://www.cbeih.org/sobre/>>. Acesso em: 17/06/2020

COSTA N. C. **Análise Orgânica: métodos e procedimentos para a caracterização de organoquímicos**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6^a. ed. Campinas: UNICAMP, 1995.

COTTRELL, J. S. Protein identification using MS/MS data. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1842–1851, 2011.

CORREA, J. B. ; BERNARDI, F. ; GEHRKE, I. T. S. Técnicas cromatográficas combinadas para investigação de moléculas bioativas com potencial biotecnológico. In: **Salão do Conhecimento UNIJUÍ 2016**, Ijuí - RS, 2016.

DARIAS-JEREZ, J. La biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico. **Medio Ambiente Canarias**, v. 9, p. 15-19, 1998.

DARRIGRAN, G. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. **Biological Invasions**, v. 4, p. 145-156, 2002.

DARRIGRAN, G. & DRAGO, E. I. Invasion of the exotic fresh water mussel *Limnoperna fortunei* in South América. **The Nautilus, Melbocerne**, v. 114, n. 2, p. 69-73, 2000.

DARRIGRAN, G & PASTORINO, G. The recent introduction of Asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (*Mytilidae*) into South America. **The Veliger**, p. 171-175, 1995.

DARRIGRAN, G. A. & MANSUR, M. C. D. Distribuição, abundância e dispersão, In: DARRIGRAN, G. & DAMBORENEA, C. (Eds.). **Bio-invasión del mejilón dorado em el**

Continente Americano. 1^a. ed., cap. 6, La Plata: Editora de la Universidad Nacional de La Plata, 2006.

DARRIGRAN, G. & DAMBORENEA, C. Ecosystem engineering impact of *Limnoperna fortunei* in South America. **Zoological science**, v. 28, n. 1, p. 1–7, 2011.

DARRIGRAN, G.; DAMBORENEA, C.; GRECO N. Freshwater invasive bivalves in man-made environments: A case study of larvae biology of *Limnoperna fortunei* in a Hydroelectric Power Plant in South America. **Ambio** **36**, p. 575-579, 2007.

DARRIGRAN, G.; DAMBORENEA, C.; PENCHASZADEH, P. *et al.* Reproductive stabilization of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: *Mytilidae*) after ten years of invasion in the Americas. **J Shellfish Res**, v. 22, p. 141-146, 2003.

DEMAIN, A. L. Induction of micorbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v. 1, p. 259-264,1998.

EMBRAPA - Embrapa recursos genéticos e biotecnologia. **Substâncias bioativas e nanomateriais**. Brasília. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia/gp/bioativos-nanomateriais>>. Acesso em: 15/04/2020.

ENEEL - Enel Green Power Volta Grande S.A. **Relatório da Administração - 2018**. Disponível em: <https://www.enel.com.br/content/dam/enel-br/one-hub-brasil---2018/investidores/informa%C3%A7%C3%B5es-financeiras/2018/DCR%20-%20EGP%20Volta%20Grande_31.12.pdf>, 2019. Acesso em: 10/07/2020.

EL-SHALOURY, S. A.; EL-SHENAWY, N. A.; EL-SALAN, I. M. A. Antimicrobial, antitumoral and in vivo cytotoxycity of actinomyces inhabiting marine shellfish. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1547-1555, 2009.

FAPERJ - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. **Avanços nas Redes Genômica e Proteômica - O que é proteoma**. Disponível em: <<http://www.faperj.br/?id=459.3.3>>, 2005. Acesso em: 10/07/2020.

FELIX, E. P. **Avaliação de técnicas de controle da incrustação por mexilhão dourado em hidrogeradorres visando minimização da indisponibilidade**. Tese (Doutorado em Engenharia), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

GIL-CHÁVEZ, J. G.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVALA J. F. *et al.* Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food

ingredients: An overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5-23, 2013.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av.**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUILHON, G. M. S. P. **Química orgânica experimental**. 1^a. ed. Belém: EDUFPA, 2011.

GOOGLE. **Google Earth Pro**. Versão 7.3. 2020. Imagem de satélite da "Estação ambiental de Hidrobiologia e Piscicultura da Usina Hidroelétrica de Volta Grande". Disponível em: <<https://www.google.com/intl/pt-BR/earth/versions/#download-pro>>. Acesso em 31/05/2020.

GOMIERO, L. M. **Biologia alimentar e reprodutiva de espécies do gênero Cichla (Perciformes, Cichlidae), no reservatório de Volta Grande, rio Grande (MG/SP)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), UNESP, Rio Claro, 1999.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1030-1039, 2010.

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M. *et al.* The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of *Tunisian Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruits extracts. **Food Chemistry**, v. 105, n.3, p. 1126-1134, 2007.

Hill, J. Invasive Species : How They Affect the Environment. **Environmental Science**, Mississippi, 23/02/2015. Disponível em: <<https://www.environmentalscience.org/invasive-species>>. Acesso em 26/03/2020.

JACQUES, R. A. **Caracterização química da erva mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. Tese (Doutorado em Química), UFRGS, Porto Alegre, 2005.

Katritzky, A. R.; Kuanar, M.; Slavov, S. *at al* Quantitative Correlation of Physical and Chemical Properties with Chemical Structure: Utility for Prediction. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 10, p. 5714-5789, 2010.

KOTZ, J. C. **Química geral e reações químicas**. Tradução da 6^a. ed. norte-americana, São Paulo: Cengage Learning, v. 1, 2010

LIEBERMAN, N. H. A.; LACHMAN, L.; SCHWAZTZ, J. B. **Pharmaceutical dosage forms**. 2^a. ed. New York: Maecel de Kiker, v. 2, p.30-57, 1990.

LIST, P. H. & SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. London: Heyden, p. 200, 1989.

LOPES, F. M. P. **Estudos de Equilíbrio Líquido-Líquido na Extração de Poliaromáticos**. Dissertação (Dissertação em Engenharia Química), UFPE, Pernambuco, 2012.

MADHAVAN, R. Optimize Liquid-Liquid extraction. **Cheresources - Chemical and process engineering resources**, 2008, disponível em <<http://www.cheresources.com/content/articles/separation-technology/optimize-liquid-liquid-extraction?pg=1>> acesso em 14 de abril de 2020.

MAGALHÃES, A. R. M. **Teor de proteína do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1957) (Molusca Bivalvia) em função do ciclo sexual**. Tese (Mestrado em Ciências), USP, São Paulo, 1985.

MANSUR, M. C.; SANTOS, C. P.; DARRIGRAN, G.; HEYDRICH, I.; CALLIL, C. T.; CARDOSO, F. R. Primeros dados quali-quantitativos do mexilhao-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e no Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. **Rev Bras Zool**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 75-84, 2003.

MANSUR, M. C. D.; SANTOS, C. P.; PEREIRA, D. *et al.* Moluscos Límnicos – Bivalves. In: **Informe sobre as Espécies Exóticas Invasoras de Águas Continentais no Brasil**. Ministério do Meio Ambiente – MMA, Brasília, cap. 7, p. 131-179, 2012.

MATTANA, R. S.; MAIA E ALMEIDA, C. I.; OLIVEIRA, P. F. C. *et al.* 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 medicinais**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 150-156, 2015.

MEDEIROS, T. D. M. **Estudo da recuperação e purificação do limoneno-1,2-diol obtido por biotransformação fúngica do limoneno**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), UNICAMP, Campinas, 2018.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração**. Tese (Doutorado em Química), UFRGS, Porto Alegre, 2005.

MOLINSKI, T.; DALISAY, D.; LIEVENS, S. *et al.* Drug development from marine natural products. **Nat Rev Drug Discov**. v. 8, p. 69–85, 2009.

MOREIRA, F. M. **Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos do mexilhão *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia)**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas), UFSC, Florianópolis, 1995.

MORTON, B. The biology and functional-morphology of *modiolus-metcalfei* (*bivalviamytilacea*) from singapore mangrove. **Malacologia**, v. 16, n. 2, p. 501-517, 1977.

PUBCHEM. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 13 de junho de 2021.

NEWELL, N. D. Classification of Bivalvia. Treatise on Invertebrate Paleontology Part N Mollusca 6, **The Geological Society of America & University of Kansas**, v. 1, p. 205-223, 1969.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 230-239, 2016.

OKUMURA, F.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 680-683, 2002.

PANDEY, A. & TRIPATHI, S. Conceptof stadardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of pharmacy phytochemitry**, v. 2, n. 5, p. 115-9, 2014.

PASTORINO, G.; DARRIGRAN G.; MARTIN S. *et al.* *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (*Mytilidae*), nuevo bivalvo invasor en aguas del río de La Plata. **Neotropica**, La Plata - Argentina, v. 39, n. 101-102, p. 34, 1993.

PEREIRA, F. R. **Metabólitos Secundários Bioativos e Mediadores de Relação Predador/Prêsa de Invertebrados Marinhos**. Tese (Tese em Fisico-Química), UFSCar, 2012.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *et al.* **Química Orgânica Experimental**, 3ª. ed., São Paulo: Cengage Learning, 2012.

PIOVESAN, N. **Influence of different parameters in blueberry bioactive compounds extraction methods (*Vaccinium ashei* Reade) and antioxidant and antimicrobial activity**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), UFSM, Santa Maria, 2016.

RICHARDSON, J. F.; HARKER, J. H.; BACKHURST, J. R. **Chemical Engineering Volume 2: Particle Technology and Separation Processes**. 5ª. ed. Coulson and Richardson's Chemical Engineering Series, Oxford, U.K.: Butterworth Heinemann, 2002.

RODRIGUES, F. A.; PIMENTA, V. S. C.; BRAGA, K. M. S. *et al.* Obtenção de extratos de plantas do cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.13 n.23; p. 870-887, 2016.

ROCHA, S. M.; MONTE, C. R. S.; SILVA, L. S. *et al.* Avaliação do potencial anticâncer do extrato bruto de Neritina zebra (Gastropoda: Neritidae). In: **65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, Recife - PE, 2013.

RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6ª. ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, p. 972-995, 1994.

SAKIO, Y.; HIRAO, Y. J.; HAYASHI, M. *et al.* Dendocarbins A-N, new drimane sesquiterpenes from the nudibranch *Dendrodoris carbunculosa*, **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 726-731, 2001.

SANSON, A. L. **Análise proteômica da espécie exótica invasora *Limnoperna fortunei* para fins de prospecção de alvos para o controle e monitoramento.** Tese (Doutorado em Biotecnologia), UFOP, Ouro Preto, 2018.

SANT'ANNA, F. S. P.; *S et. al.* **Projeto Valorização dos Resíduos da Maricultura. Sub-Projeto 3: Soluções Tecnológicas Para o Aproveitamento de Conchas de Ostras.** Florianópolis: UFSC, 2007.

SILVA, R. S.; RIBEIRO, C. M. R.; BORGES, M. N. *et al.* Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2234-2237, 2009.

SILVA, R. M. F.; GOMES, T. C. B. L.; ALBUQUERQUE, M. M. *et al.* Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s. v. 14, n. 1, p. 103-09, 2012.

SOUZA, C. G. **Extração de compostos bioativos e pectina da casca de maracujá utilizando sistema pressurizado e ultrassom.** Tese (Mestrado em Engenharia Química), UFC, Fortaleza, 2015.

SOUZA, M. V. N., PINHEIRO, A. C., FERREIRA, M. L. *et al.* Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer, **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 25-42, 2007.

SOUZA, A. T.; OLIVEIRA, D. D.; SALES, M. E. Prospecção Tecnológica: Moléculas Bioativas Derivadas de Produtos Naturais. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão, v. 3, n. 5, p. 148-154, 2013.

SOLOMONS, T.W.G. & FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 7^a. ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 474, 2002.

ULIANO-SILVA, M. *et al.* A hybrid-hierarchical genome assembly strategy to sequence the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei*. **Giga Science**, v. 7, p. 1-10, 2018.

VOGEL, A. I. **Química Orgânica 1 - Análise Orgânica Qualitativa**. 1^a. ed. Rio de Janeiro: Livro Técnico S.A, 1971.

WRIGHT, P. C. *et al.* A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, v. 77, n. 4, p. 738–765, 2012.

WU, J.; LIN, L.; CHAU, F. T. Ultrasound-assisted extraction of *ginseng saponins* from *ginseng roots* and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 347-352, 2001.

ZACHI, R. **Influência da Temperatura no Processo de Extração de Óleo de Soja em Leito Fixo**. Dissertação (Mestrado em Modelagem Matemática), UNIJUI, Ijuí, 2007.