

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos

Carlos Henrique Fraia Mateus

Otimização do método extrativo por maceração para obtenção de fitoquímicos de
***Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta)**

São Paulo
2023

Carlos Henrique Fraia Mateus

**Otimização do método extrativo por maceração para obtenção defitoquímicos de
Ochtodes secundiramea (Rhodophyta)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador (a): Dr^a Eliana Nakano

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Mateus, Carlos Henrique Fraia

Otimização do método extrativo por maceração para obtenção de fitoquímicos de Ochtodes secundiramea (Rhodophyta) / Carlos Henrique Fraia Mateus ; orientador(a) Eliana Nakano - São Paulo, 2023.

25 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - .

1. Otimização 2. Extração. 3. Fitoquímicos. 4. Ochtodes I. Nakano, Eliana. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - . IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Carlos Henrique Fraia Mateus, aluno do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

Imediato

06 meses

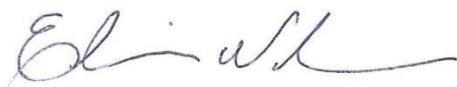
12 meses

Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 31 de janeiro de 2023.

Aluno: 

De acordo,



Orientador (a):

Dedico este trabalho à minha família por todo carinho, incentivo e apoio fundamentais para a minha formação. Especialmente a minha esposa Máira e ao meu filho Antônio, são minha alegria de viver.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a Eliana Nakano por todo apoio, ensinamento e resiliência.

À minha coorientadora M^a Rafaela Paula de Freitas por seu tempo em se dedicar aos ensinamentos laboratoriais.

À Dr^a Maria Graça Salomão por toda amizade, compreensão e oportunidade.

Aos colegas e professores pela agradável convivência, em especial do laboratório de parasitologia pelo profissionalismo de uma ciência construtivista.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Na área do trabalho o valor do belo é encontrar um trabalho que gostem; o valor do benefício é conseguir um emprego que proporcione um salário; o valor do bem significa encontrar um emprego que ajude os outros e que contribua para a sociedade.

Tsunesarubo Makiguchi

RESUMO

MATEUS, Carlos Henrique Fraia. **Otimização do método extrativo por maceração para obtenção de fitoquímicos de *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta)**. 2023. 27 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos) - Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

A esquistossomose é uma doença infecto parasitária que afetando vasta área do planeta, atingindo milhares de pessoas em regiões de baixa renda, com pouca e até inexistência de saneamento básico. No Brasil, a doença é endêmica e causada pelo verme *Schistosoma mansoni*. Atualmente o único medicamento usado para o tratamento e controle da doença é o praziquantel. Contudo, existem estudos demonstrando uma possível resistência a este medicamento. Outro método recomendado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) é o moluscicida niclosamida, usado no combate aos caramujos, porém, afetando peixes, anfíbios entre outros microorganismos. Portanto, são realizadas pesquisas a procura por tratamentos alternativos com base em produtos naturais. Estudos anteriores demonstraram que os extratos brutos da alga marinha *Ochtodes secundiramea* apresentam atividade esquistossomicida. Afim de obter novos extratos com maiores rendimentos de fitoquímicos e relevância custo-benefício para possíveis protótipos de novos fármacos mais eficientes frente ao combate do *Schistosoma mansoni*, neste trabalho apresentamos a otimização do método extrativo a partir do processo de maceração, o qual demonstrou bom rendimento utilizando maior volume de solvente diclorometano e com solvente clorofórmio em menor volume.

Palavras-chave: Esquistossomose. *Schistosoma mansoni*. Algas marinhas. Extratos. Rendimento.

ABSTRACT

MATEUS, Carlos Henrique Fraia. **Optimization of the extractive method by maceration for the maintenance of phytochemicals in *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta)**. 2023. 27 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health: Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Schistosomiasis is a parasitic infectious disease that affects a vast area of the planet, reaching thousands of people in low-income regions, with little or no basic sanitation. In Brazil, the disease is endemic and caused by the worm *Schistosoma mansoni*. Currently, the only drug used for the treatment and control of the disease is praziquantel. However, there are studies demonstrating possible resistance to this drug. Another method recommended by the WHO (World Health Organization) is the molluscicide niclosamide, used to combat snails, however, affecting fish, amphibians and other organisms. Therefore, research is carried out looking for alternative treatments based on natural products. Previous studies have shown that crude extracts of the seaweed *Ochtodes secundiramea* have schistosomicidal activity. In order to obtain new extracts with higher yields of phytochemicals and cost-benefit relevance for possible prototypes of new more efficient drugs against *Schistosoma mansoni*, in this work we present the optimization of the extractive method from the maceration process, which demonstrated good yield using a larger volume of dichloromethane solvent and with chloroform solvent in a smaller volume.

Keywords: Schistosomiasis. *Schistosoma mansoni*. Seaweed. Extracts. Performance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Esquistossomose	11
1.2	Prevenção, Controle e Tratamento	12
1.3	Produtos Naturais	13
1.4	<i>Ochtodes secundiramea</i>	14
1.5	Padronização do Processo Extrativo	15
2	OBJETIVO	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Obtenção das algas	18
3.2	Extração	18
3.3	Avaliação da Atividade Esquistossomicida	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
5.	CONCLUSÕES	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*, afetando principalmente as regiões mais carentes do mundo e em condições de higiene muito precárias. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se uma prevalência global de 240 milhões de pessoas infectadas para as diferentes espécies de *Schistosoma* (WHO, 2022). Considerada uma doença tropical negligenciada (DTN), apresenta uma elevada taxa de incidência em regiões da África, Oriente Médio, América do Sul, Ásia e Filipinas (GUARARIE *et al.*, 2018). O trematódeo *Schistosoma mansoni* é o agente etiológico da esquistossomose mansoni, uma doença infecto parasitária endêmica a cerca de 50 países das Américas, Antilhas e África. No Brasil, o Nordeste e o Sudeste são as regiões mais afetadas (CARVALHO *et al.*, 2018).

Mamíferos como o homem são infectados por parasitas em formas larvais liberados por caramujos de água doce. A esquistossomose pode ser intestinal ou urogenital. A intestinal, conhecida popularmente como barriga d'água, apresenta sintomas de dores abdominais, diarreia, sangue nas fezes, aumento do fígado ou também do baço. Na esquistossomose urogenital, o sintoma majoritário é o sangue na urina, causa danos nos rins e fibrose do ureter e da bexiga podendo evoluir para câncer (WHO, 2023). O ciclo do *S. mansoni*, causador da esquistossomose, ocorre na liberação dos ovos através das fezes ou urina do indivíduo contaminado. Na água, os ovos eclodem e liberam os miracídios que infectam o hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*. Os miracídios se transformam em esporocistos, que se desenvolvem no caramujo, e, após quatro ou seis semanas, saem do caramujo como cercárias e retornam para a água, infectando o homem ou algum outro mamífero como hospedeiro final por penetração através da pele. As cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos durante a penetração, migrando pela circulação venosa passando pelo pulmão, coração e no fígado, onde se maturam em esquistossômulos adultos saindo pela veia porta, acasalando-se nas veias mesentéricas localizadas no intestino (GRYSEELS, 2012; CDC, 2019; GRAHAM *et al.*, 2020).

1.2 Prevenção, Controle e Tratamento

Os programas educacionais baseados na conscientização sobre a doença e os cuidados com a saúde contribuem para a prevenção e controle da esquistossomose, envolvendo melhoria das condições de higiene, saneamento básico e água potável da população. No Japão, esse método possibilitou a sua erradicação, porém, devemos considerar o limite deste efeito em outros países.

Outro método usado para o controle da patologia é o uso de moluscidas, que reduzem o número de caramujos, porém, não os eliminam por completo, são aplicados em larga escala nos lagos e rios, tem logística complexa e de alto custo. Quanto à toxicidade para organismos aquáticos, são necessários o monitoramento e vigilância epidemiológica constante além da obtenção dos dados malacológicos em detalhes sobre o comportamento dos parasitas, pois, devido à sua baixa seletividade não previne por completo a recolonização de caramujos, que também podem se tornar resistentes ao produto químico.

Este método pode contribuir com a prevenção e controle, mas depende de fatores sensíveis, de disponibilidade de uso, alto custo e poucos benefícios que não garantem erradicar a doença, gerando crescente preocupação econômica e ecológica. (GRYSEELS *et al.*, 2006; RAPADO *et al.*, 2013; WHO, 2022).

A quimioterapia preventiva é a opção mais indicada para o tratamento e controle da esquistossomose. Atualmente, o medicamento praziquantel é o único disponível, sendo ativo em todas as espécies de *Schistosoma* e com alta taxa de cura, além do baixo custo e poucos efeitos adversos. Apesar de abarcar um amplo espectro de ação anti-helmíntica alguns pontos são questionados: o praziquantel é ineficaz contra vermes jovens (esquistossômulos) e não tem efeito sobre os ovos que migram pelos tecidos. Estes ovos podem ser excretados durante algumas semanas, mesmo com a morte dos vermes adultos, o que facilita a reinfeção (GRYSEELS *et al.*, 2006-2012; MCMANUS *et al.*, 2018). Portanto, torna-se necessária a busca por novos medicamentos e de outros produtos de interesse no controle da esquistossomose. Atualmente, uma das boas fontes alternativas estudadas há muito tempo, são os produtos naturais.

1.3 Produtos Naturais

Os produtos naturais, especialmente as plantas medicinais, têm sido de grande interesse para a indústria farmacêutica devido ao seu uso em potencial como fitomedicamentos. Pesquisas realizadas estimaram um mercado mundial de US \$83 bilhões em 2008 para os produtos tradicionais, com previsão até 2020 de US \$115 bilhões para as plantas medicinais, incluindo produtos homeopáticos, da medicina Chinesa e Ayurveda (WHO, 2011; HERBALGRAM, 2015). Atualmente, pós-cenário covid-19 em 2020, estes dados foram atualizados para um mercado global com uma estimativa de US \$64,5 bilhões sobre os fitomedicamentos e projetado atingir US \$119,9 bilhões até 2027 (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2022). No Brasil, o mercado estima cerca de US \$400 milhões, representando um aumento de 12% ao ano, sendo superior aos 5% estimados para o crescimento anual dos medicamentos convencionais (ARAUJO *et al.*, 2013; GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2016; CARVALHO *et al.*, 2018). Além do investimento de grandes empresas para o uso como alimentos e para fitoterápicos, também existem os nutracêuticos, podendo trazer benefícios com seu uso em longo prazo. Nos Estados Unidos, por exemplo, a legislação federal DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act) aprovada em 1994, facilitou a produção e o comércio de produtos baseados em plantas medicinais com pesquisas de forte interesse nas áreas de horticultura, fitoquímica e farmacognosia (BREVOORT, 1998; BRISKIN, 2000; CARVALHO *et al.*, 2018).

As plantas medicinais são usadas tradicionalmente ao longo da história para o tratamento de doenças, pois seus extratos brutos possuem uma mistura com enorme diversidade de aleloquímicos e podem apresentar uma variedade de bioatividades contra diferentes patologias, como por exemplo, atividade anticancerígena, antimalárica e anti-helmíntica (WANGCHUK, 2016). Na literatura encontra-se uma crescente publicação de artigos científicos sobre a relevância dos produtos naturais desempenharem um papel importante no processo de desenvolvimento de novos biofármacos e de medicamentos alternativos (NEWMAN, 2016). De acordo com a OMS, para os cuidados primários de saúde, há cerca de 3,4 bilhões de pessoas nos países em desenvolvimento, representando aproximadamente 88% da população global, dependentes dos medicamentos tradicionais à base de plantas (GURIB-FAKIM, 2006; NISSAPATORN, 2021).

Segundo a Sociedade Brasileira de Farmacognosia, entre os produtos naturais,

as algas são exploradas desde o início da civilização, comumente utilizadas pelos povos originários e comunidades tradicionais, para a alimentação e no tratamento de doenças. Atualmente as algas têm grande impacto socioeconômico, sendo consumidas como fonte de proteínas, fibras, pigmentos, vitaminas, minerais, ácidos graxos, entre outros. Podemos citar que tanto os compostos isolados quanto os extratos brutos, podem apresentar importantes atividades biológicas como antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, leishmanicida e até para o tratamento da hanseníase (TANAKA *et al.*, 1975; CARDOZO *et al.*, 2007; STEIN *et al.*, 2011).

O potencial das algas marinhas para o tratamento de doenças parasitárias é conhecido na medicina tradicional a cerca de 300 anos a.C., mas, diferente do conhecimento etnofarmacológico sobre as plantas medicinais, os estudos sobre o uso de extratos brutos de algas marinhas como fonte de fitoquímicos para o tratamento de doenças parasitárias, como a esquistossomose, são pouco explorados (SMITH, 2004; TORRES, 2014).

Um estudo de triagem com extratos de 36 espécies de algas marinhas realizado por nosso grupo, constatou atividade esquistossomicida em extratos de algumas espécies, entre elas se destaca a *Ochtodes secundiramea*, apresentando 100% de mortalidade dos parasitas (STEIN, 2021).

1.4 *Ochtodes secundiramea*

Pesquisas realizadas pelo nosso grupo e no doutoramento de Sara Guibunda Tajú verificaram através de fracionamentos biomonitorados que as algas vermelhas *Porphyra spiralis*, *Ochtodes secundiramea* e algumas espécies do gênero *Laurencia* apresentaram atividade antiparasitária. O avanço nos estudos deste trabalho com os extratos da alga *Ochtodes* na avaliação da atividade esquistossomicida em diferentes estágios do *S. mansoni* resultou em 100% da morte dos parasitas e a inibição da oviposição. Foi possível o isolamento e caracterização de três compostos da classe dos monoterpenos e a identificação de um deles como responsável pela atividade esquistossomicida, e em decorrência dessa descoberta, foi solicitado o pedido de patente para a utilização desses metabólitos com ação esquistossomicida.

1.5 Padronização do Processo Extrativo

Para que haja sucesso em um processo de extração é preciso observar como foi realizada a coleta do material de interesse; devemos ter cuidado na aquisição, no transporte e armazenamento e como será o processo de preparo da biomassa. É necessário ter atenção especial às condições sanitárias para que o preparo seja livre de contaminantes, obtendo uma biomassa de partida de alta qualidade. O processo de extração de compostos bioativos tem a função de separar as substâncias de interesse da biomassa a partir de sua matriz original, e, para isso, alguns fatores são importantes tais como o tipo de solvente ou líquido extrator e a granulometria, que é uma característica relacionada ao material sólido, pois o tamanho da partícula pode influenciar diretamente na eficiência do líquido extrator. Em outras palavras, quanto menores as dimensões da partícula, maior será a área superficial de contato entre o solvente extrator e o material sólido, melhorando o efeito de difusão. Em relação ao solvente ou líquido extrator, além do efeito de coesão, ocorre também a seletividade, pois dependendo da polaridade do grupo de compostos que se pretende extrair, o emprego de diferentes solventes pode alterar a composição do extrato. Todos os processos de extração dependem substancialmente do fenômeno de difusão, portanto, a pureza, a concentração e a reposição do solvente são significativas na velocidade de dissolução, assim como a temperatura, o pH do meio e a agitação do sistema podem determinar a duração do processo extrativo, bem como o resultado que se deseja alcançar (MIGLIATO, 2011; CARDOSO, 2017).

Ainda não há uma padronização conceitual e abrangente para a obtenção de alto rendimento para os extratos brutos baseados em quaisquer categorias de fitoquímicos, seja alcaloides, flavonoides ou terpenoides. Todavia, os estudos paramétricos das técnicas extrativas de prospecção fitoquímica nos permitem estabelecer um desenvolvimento experimental baseado na especificidade para cada um dos grupos fitoquímicos de interesse, e conseqüentemente, desenhar um procedimento operacional padronizado de parâmetros otimizados com potencial em oferecer compostos químicos relevantes a um estudo de escalonamento em bancada.

Tendo em vista o resultado da avaliação da atividade esquistossomicida obtido anteriormente com os monoterpenos da macroalga marinha *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta, Gigartinales) e a solicitação de patente desta aplicação, neste trabalho foram avaliadas a influência do solvente em três proporções

distintas entre a quantidade de biomassa da alga e o volume de solvente utilizado durante o processo extrativo na obtenção dos fitoquímicos desta macroalga.

2 OBJETIVO

Otimizar o método de extração por maceração para obtenção de fitoquímicos da alga marinha *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das algas

Este trabalho faz parte dos estudos desenvolvidos no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan sob a coordenação da Dra. Eliana Nakano, onde é realizada a manutenção do ciclo do *Schistosoma mansoni* e a avaliação da atividade esquistossomicida a partir dos extratos brutos da alga *Ochtodes secundiramea*. O material algáceo foi obtido por meio de coletas feitas na Praia Pontal de Ubu, localizada no estado de Espírito Santo (ES), no município de Anchieta. A alga coletada foi identificada pela Dr^a Erika Stein e após remoção de impurezas, foram mantidas em sacos plásticos com água do mar, armazenadas em freezer até serem transportadas e, posteriormente, liofilizadas.

3.2 Extração

Todo o procedimento de extração foi realizado no escuro, devido à fotossensibilidade que podem apresentar alguns compostos químicos contidos na alga. Antes da execução do experimento todas as vidrarias utilizadas nos procedimentos de extração foram lavadas com Extran® (concentrado de tensoativos neutro), colocadas para secar em estufa e retiradas no dia seguinte. Os materiais foram organizados por ordem de uso sob a bancada para maior segurança na sequência dos procedimentos.

A amostra da alga foi retirada do saco plástico com fecho zip lock e triturada em almofariz com nitrogênio líquido, posteriormente fracionada em três frascos Erlenmeyers de 250 mL. Foram adicionadas em torno de 10 g da massa triturada do material por frasco e submetido à técnica de maceração, de acordo com as proporções 1:2, 1:5 e 1:10 de massa e volume (m/v) de biomassa da alga para solvente extrator. O solvente foi adicionado aos três respectivos Erlenmeyers utilizando provetas graduadas. Cada Erlenmeyer foi devidamente pesado e posteriormente identificado de acordo com a proporção do solvente utilizado, todos os frascos foram vedados com parafilme e cobertos por papel alumínio para não sofrer reação fotoquímica. Em seguida, foi empregada uma pequena agitação manual no recipiente contendo o material da solução extrativa e colocados em capela à

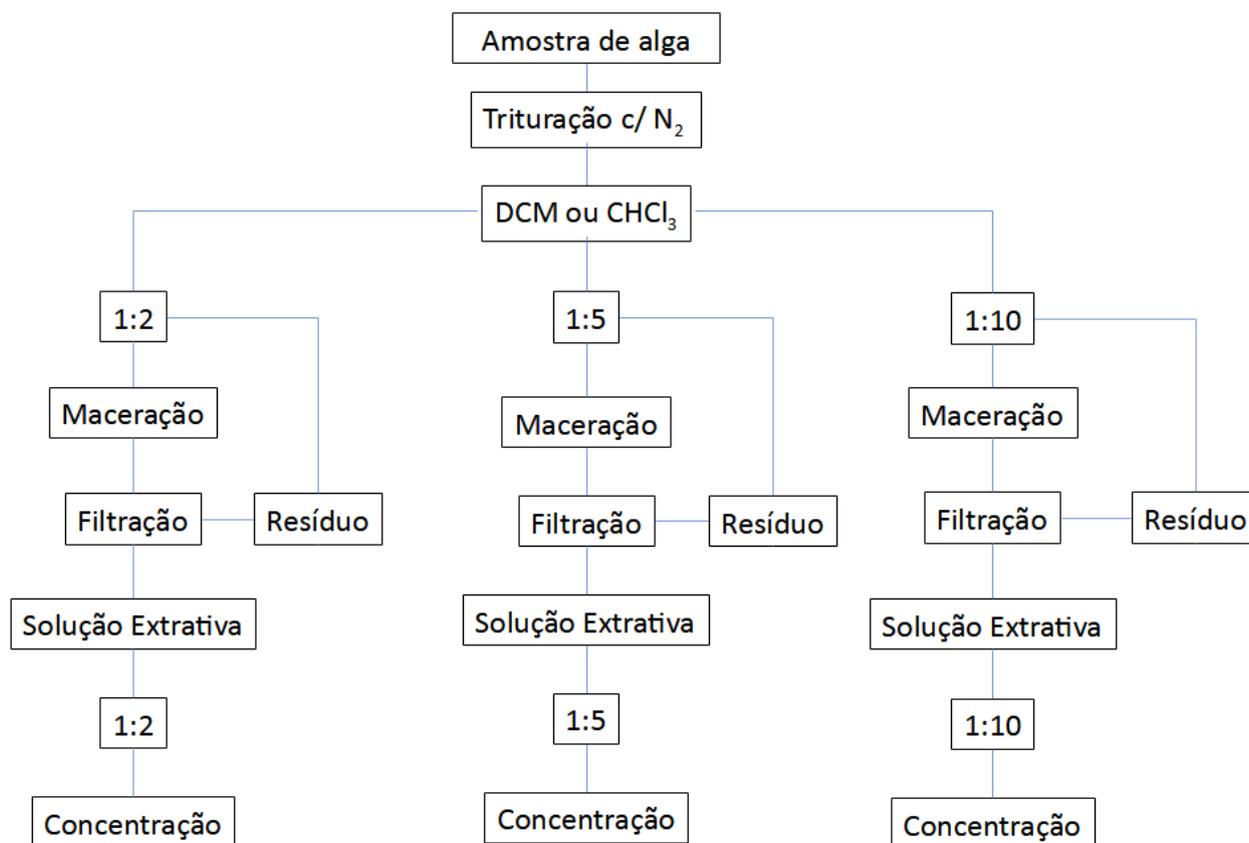
temperatura ambiente por um período de 48 horas.

Após completar o período da maceração, realizou-se uma filtragem à vácuo utilizando um funil de Büchner e papel-filtro qualitativo Whatman para a retirada do filtrado (solução extrativa). Foi realizada a reserva de uma alíquota da solução extrativa em frascos pequenos (vials), devidamente identificados com o número da coleta e da proporção do solvente utilizado. As alíquotas foram armazenadas em freezer para posteriormente ser traçado o perfil cromatográfico. O filtrado foi submetido à concentração em evaporador rotativo e ao término do procedimento, a solução extrativa foi colocada em frascos cobertos ao abrigo da luz e armazenados em freezer até que fosse feita a evaporação do solvente residual e com a biomassa restante, uma nova maceração. Feita a coleta do macerado, o mesmo material algáceo (biomassa de alga) contido no funil de Büchner foi raspado do papel-filtro Whatman e ao mesmo realizou-se uma nova maceração, colocando-o novamente em frasco Erlenmeyer e renovando o líquido extrator com a mesma quantidade proporcional usada anteriormente, seguindo o mesmo período de 48 horas a temperatura ambiente.

No total foram realizadas oito coletas deste processo de maceração para todas as proporções 1:2, 1:5 e 1:10 para ambos os solventes, clorofórmio (CHCl_3) e diclorometano (DCM). Todos os extratos brutos foram separados em frascos cobertos com alumínio em cada coleta realizada, concentrados em evaporador rotativo e armazenados em freezer. Ao final de cada nova maceração, as alíquotas foram separadas por número de coleta de acordo com o seu respectivo solvente extrator e as mesmas levadas ao Laboratório do Instituto de Química da Universidade de São Paulo para análise em cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas, a fim de estudar a influência do solvente frente a sua capacidade de extração. Todas as coletas foram concentradas em evaporador rotativo e posteriormente pesadas para a obtenção dos rendimentos.

As etapas do processo de extração estão descritas abaixo (Figura 1):

Figura 1 - Desenho esquemático do processo de extração de fitoquímicos da alga utilizando os solventes clorofórmio (CHCl_3) e diclorometano (DCM).



Fonte: próprio autor, 2023.

3.3 Avaliação da Atividade Esquistossomicida

Este trabalho faz parte do projeto desenvolvido no Laboratório de Parasitologia pela doutoranda Rafaela Paula de Freitas sobre a avaliação da atividade esquistossomicida de diferentes extratos obtidos da alga e será finalizado após a conclusão do meu programa de aperfeiçoamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho buscamos verificar se o tipo de solvente ou alteração na proporção entre biomassa e solvente influencia no rendimento do extrato bruto de *Ochtodes secundiramea*. Com base no resultado de rendimento das extrações obtido em gramas, realizou-se a normalização em porcentagem das proporções 1:2, 1:5 e 1:10 para ambos os solventes e considerando 100% o peso da biomassa de partida para cada extrato.

Os valores dos rendimentos para DCM e CHCl_3 são exibidos nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 - Rendimentos dos extratos concentrados a partir da extração com diclorometano (DCM).

Coletas	Rendimentos Normalizados (%)			
	DCM	Proporção 1:2	Proporção 1:5	Proporção 1:10
1		0.11	0.06	0.09
2		0.45	0.31	0.93
3		0.54	0.59	0.47
4		0.23	0.25	0.28
5		0.23	0.22	0.19
6		0.27	0.10	1.52
7		0.15	0.16	0.21
8		0.19	0.16	0.15
Média		0.27	0.23	0.48
Média Global		0.33		

Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 2 - Rendimentos dos extratos concentrados de clorofórmio (CHCl_3).

Coletas	Rendimentos (%)			
	CHCl_3	Proporção 1:2	Proporção 1:5	Proporção 1:10
1		0.19	0.23	0.17
2		0.60	0.77	0.87
3		0.75	0.46	0.43
4		0.18	0.32	0.16
5		0.33	0.19	0.18
6		0.27	0.19	0.18
7		0.52	0.26	0.18
8		0.29	0.19	0.23
Média		0.39	0.33	0.30
Média Global		0.34		

Fonte: próprio autor, 2023.

Avaliando a média global entre os dois solventes (DCM e CHCl_3), não observamos diferença significativa, e isto não era o esperado. Então, acreditamos que haja uma interação entre as diferentes proporções e os solventes, o que ajudaria a entender os resultados tão próximos entre si.

Quando observamos a proporção de 1:2 em relação a proporção de 1:5 com o solvente DCM, o rendimento passou de 0,27% para 0,23%, (tabela 1), ou seja, com o aumento na proporção do solvente, verificamos que ocorreu um decréscimo de 0,04% no rendimento, e quando o solvente utilizado foi o CHCl_3 , a redução foi de 0,06% (de 0,39% para 0,33%). Contudo, na maior proporção avaliada (1:10), verificamos diferença nas respostas, pois quando utilizamos o DCM obtivemos o maior rendimento, e com CHCl_3 o menor.

Ao compararmos os resultados mantendo a proporção de 1:2, com a mudança do solvente DCM para CHCl_3 , ocorreu um aumento do rendimento médio em 0,12% (de 0,27% para 0,39%). Entre a proporção 1:5 temos um aumento de 0,10% (de 0,23% para 0,33%) e na proporção 1:10 um decréscimo de 0,18% (de 0,48% para 0,30%).

Com isso, verificou-se que ocorreu uma maior eficiência na extração dos fitoquímicos na proporção de 1:10 com DCM, com rendimento de 0,48% e na proporção de 1:2 com CHCl_3 , com 0,39%. Esse estudo poderá ajudar na escolha da proporção e do solvente a serem utilizados na obtenção de maiores rendimentos no extrato de *Ochtodes secundiramea* e talvez para outras espécies.

Scarminio e colaboradores descreveram que ocorreu a influência do solvente extrator no processo de extração de metabólitos secundários das folhas *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill, popularmente conhecida como fruta-do-conde e usada no combate ao câncer.

Os solventes usados no exemplo citado foram: etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio. Os parâmetros de Snyder são baseados no triângulo de seletividade apresentando valores de alfa (acidicidade), beta (basicidade) e pi (dipolaridade) que medem relativamente as forças de interações moleculares do soluto e solvente tendo como vantagem, o agrupamento dos solventes quimicamente semelhantes pelo tipo de interação específico de cada um.

Foram trabalhados solventes puros quanto de misturas em partes iguais com objetivo de realizar análise metabolômica em uma única fase propondo uma solução para melhorar as condições dos protocolos de extração, maximizar a eficiência na reação e garantir um maior número de metabólitos.

De acordo com as conclusões deste trabalho citado como referência e utilizando os parâmetros de Snyder, acreditamos que os extratos obtidos com diclorometano, que apresenta um caráter levemente ácido e apolar, serão mais ricos em metabólitos como alcaloides, e o clorofórmio, com caráter mais ácido e polaridade intermediária, serão mais ricos em terpenoides e flavonoides.

Os compostos fitoquímicos de extratos vegetais e algáceos são utilizados há muito tempo no preparo de produtos agrícolas, cosméticos e farmacêuticos e ainda são poucos os estudos direcionados para otimização do processo extrativo e rendimento de metabólitos. Portanto, o presente estudo fornece importantes contribuições para a pesquisa na extração dos compostos químicos de *Ochtodes secundiramea* que mostrou conter metabólitos ativos frente ao combate da esquistossomose.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado que a melhor opção para obtenção de fitoquímicos com rendimentos consideráveis da alga *Ochtodes secundiramea* são as proporções 1:10 utilizando o solvente diclorometano (DCM) e 1:2 utilizando o clorofórmio (CHCl₃).

REFERÊNCIAS¹

- AFONSO, S.; Silva, R. R.; Souza, E. B. R.; Scarminio, I. S. Influência do solvente extrator no processo de extração de metabólitos secundários da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill pelos parâmetros de Snyder. **49^a Congresso Brasileiro de Química**. Porto Alegre/RS, 2009.
- ARAUJO, G. S. *et al.* Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 20, n. 1, p. 95-98, 2013.
- ARAUJO, R. F. M. *et al.* Phytomedicines: legislation and market in Brazil. **Rev. Bras. Fazenda**, v. 94, n. 3, p. 331-341, 2013.
- BRISKIN, D. P. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. **Plant Physiol**. Vol. 124, 2000.
- CARDOSO, I.C.; Pereira, H.M.G.; Tappin, M.R.R.; Behrens, M.D. Influência da técnica de extração e do tamanho de partícula do material vegetal no teor de compostos fenólicos totais da tintura das folhas de *Alpinia zerumbet*. **Revista Fitos** v. 11, 2017. DOI:10.5935/2446-4775.20170016.
- CARDOZO, K.H. *et al.* Metabolites from algae with economical impact. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** 146, 60-78, 2007.
- CARVALHO, Omar dos Santos *et al.* Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 27, n. 3, e2017343, set. 2018.
- CARVALHO, A. C. B. *et al.* The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **J. Etnofarmacologia**. p. 29-35, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2017.09.040.
- CDC. Life Cycle *Schistosoma spp.* In: **Center for Disease Control and Prevention**. Parasites Schistosomiasis Biology. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>. Acesso em: 30/08/2022.
- CDC. *Schistosoma spp.* In: **Center for Disease Control and Prevention**. Parasites Schistosomiasis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/>. Acesso em: 30/08/2022.
- GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. Herbal Supplements and Remedies - **A Global Strategic Business Report**, 2022. Disponível em: <https://www.strategyr.com/market-report-herbal-supplements-and-remedies-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp>. Acesso em 04/10/2022.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

GRAHAM, B. B. *et al.* **Schistosomiasis Pulmonary Arterial Hypertension**. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1-18. 2020.

GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n.9541, p. 1106-1118, 2006. ISSN 0140-6736.

GRYSEELS, B. *et al.* Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383-397. 2012.

GUARARIE, D. *et al.* The human-snail transmission environment shapes long term schistosomiasis control outcomes: Implications for improving the accuracy of predictive modeling. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1-19. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006514>

GURIB-FAKIM, A. Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, 27, 1-93, 2006. DOI: 10.1016/j.mam.2005.07.008.

HERBALGRAM. Herbal Dietary Supplement Sales in US increase 6.8% in 2014. American Botanical Council. **Nutrition Business Journal**, n. 107, p. 12. 2015. Disponível em: <https://www.herbalgram.org/resources/herbalgram/issues/107/>. Acesso em 04/10/2022.

MCMANUS, D. P. *et al.* Schistosomiasis. **Nature Reviews, Disease Primers**, 2018. DOI: 10.1038/s41572-018-0013-8.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality Control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) Hydroalcoholic Extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, p. 211-215, 2000.

MIGLIATO, K. F. *et al.* Factorial design of the optimization extraction of *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruits. **SBQ. Química Nova**. v. 34, n. 4, p. 695–699. São Paulo. 2011. ISSN: 0100-4042.

NISSAPATORN, V. *et al.* Natural product-derived drugs for the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD). **Inflammation and Natural Products**, p. 235-259, 2021.

NEWMAN, D. J. and GRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 2016.

RAPADO, L. N. *et al.* Schistosomiasis control using pipartine against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2251, 2013.

SMITH, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 245-262, 2004. ISSN 0921-8971.

STEIN, E.M.; TAJÚ, S.G. *et al.* The Prospective Use of Brazilian Marine Macroalgae in Schistosomiasis Control. **Marine Drugs**, n. 19, p. 234, 2021. DOI: 10.3390/md19050234.

TANAKA, Y.; OKUDA, M.; SONODA, M. Effect of chlorella on levels of cholesterol and triglyceride in liver and serum. **Artery**, n. 4, p. 339-339, 1975.

TORRES, F. A. *et al.* New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 265-276, 2014. ISSN 0102-695X.

WANGCHUK, P. *et al.* Identification of lead chemotherapeutic agents from medicinal plants against blood flukes and whipworms. **Scientific Reports**. 2016.

WHO, World Health Organization. **The World Medicines Situation 2011**. Access To Controlled Medicines. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/111001/retrieve>. Acesso em 04/10/2022.

WHO - World Health Organization. **Schistosomiasis**, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em 16/08/2022.