



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Programa de Pós-graduação em Química



**CRISTIANE DOS REIS FELICIANO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO  
PARA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PROVENIENTES DO  
CALDO DE FERMENTAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS**

Alfenas/MG

2021

**CRISTIANE DOS REIS FELICIANO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO  
PARA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PROVENIENTES DO  
CALDO DE FERMENTAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas,  
como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Química. Área de Concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariane Gonçalves Santos

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

Feliciano, Cristiane dos Reis

F314s Síntese e caracterização de materiais de acesso restrito para separação de compostos bioativos provenientes do caldo de fermentação de fungos endófitos / Cristiane dos Reis Feliciano – Alfenas, MG, 2021.  
149 f.: il. –

Orientadora: Mariane Gonçalves Santos.  
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.  
Bibliografia.

1. Preparo de amostra. 2. Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas. 3. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas. 4. extração em fase Sólida. 5. Compostos Bioativos - Extração. 6. Nanotubos de Carbono. I. Santos, Mariane Gonçalves. II. Título.

CDD- 543

**CRISTIANE DOS REIS FELICIANO****SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO PARA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PROVENIENTES DO CALDO DE FERMENTAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 30 de julho de 2021

Profa. Dra. Mariane Gonçalves Santos  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Eduardo Costa Figueiredo  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Brenda Lee Simas Porto  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais.



Documento assinado eletronicamente por **Mariane Gonçalves Santos, Professor do Magistério Superior**, em 30/07/2021, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Costa de Figueiredo, Professor do Magistério Superior**, em 30/07/2021, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Brenda Lee Simas Porto, Usuário Externo**, em 04/08/2021, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0561555** e o código CRC **725ACEE2**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus pela força e pela coragem de não desistir nunca dos meus objetivos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Mariane Gonçalves Santos, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, pela confiança em meu trabalho, por toda a ajuda e ensinamentos, pela compreensão e preocupação e por se manter sempre positiva e confiante.

Aos meus pais: Ademir e Maria, pois com toda a certeza, os maiores ensinamentos que tenho na vida foram vocês que me proporcionaram, pelos seus exemplos, por suas sábias palavras, pela presença constante e principalmente pelo carinho.

Ao meu irmão Ricardo, que tanto admiro, que sempre me incentivou e contribuiu diretamente para que esse sonho acontecesse.

Aos meus amigos e família que tornaram essa trajetória mais divertida, pelos seus conselhos e principalmente pelos seus carinhos. Principalmente minhas amigas e amigos Aline, Luana, Mariana, Diailison, Eduardo, Gizele, Daniela, Daysla, Bianca, Andreza, Talita e Nathy que sempre me ajudaram com seus conselhos, pelas nossas conversas e todos os momentos de risos e brincadeiras.

Ao meu namorado Wellington, pela compreensão e por todo apoio nessa jornada. Obrigada por fazer do meu sonho o seu sonho.

Ao colaborador Vinicius, por todos os seus ensinamentos e contribuição para o trabalho. À aluna de iniciação científica Heloísa, por toda sua parceria e dedicação para o desenvolvimento deste trabalho e principalmente por sua amizade.

Quero agradecer aos laboratórios LabIQ, laboratório de pesquisa em sistema de liberação de fármacos e ao laboratório de bioprocessos, em especial ao

doutorando Omar, à mestranda Dajara e à professora Jaine, pelo fornecimento do caldo de fermentação estudado e pelo auxílio na realização dos teste biológicos.

Aos alunos do LATF e às professoras – Isarita e Vanessa; ao professor Eduardo e à Patrícia, agradeço a convivência e por sempre estarem disponíveis.

Aos alunos do Grupo de pesquisa QAI, à professora Giovana e ao professor Pedro, também agradeço a convivência e por sempre estarem a disposição quando necessitei.

Por último agradeço a UNIFAL, ao programa de pós-graduação em química e a todos os órgãos de fomentos, CAPES, FAPEMIG e CNPQ.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*O êxito da vida não se mede pelos caminhos que você conquistou, mais sim pelas dificuldades que superou no caminho. (Abraham Lincoln, 1861)*

## RESUMO

A análise de compostos orgânicos em matrizes complexas é uma tarefa morosa, dispendiosa e que normalmente leva a muitos erros. Assim, a química analítica tem proposto soluções inovadoras para tornar este processo mais eficiente e confiável seguindo esta tendência, este trabalho propôs a utilização de um material de acesso restrito com propriedades magnéticas baseado em nanotubos de carbono (M-RACNTs) para ser utilizado como sorvente na extração em fase sólida dispersiva magnética (MDSPE) de compostos orgânicos oriundos do caldo de fermentação do endófito *Lasiodiplodia sp.* A síntese do material foi realizada por meio da funcionalização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas comercial (CNTs) com nanopartículas magnéticas (M-CNTs) e pelo recobrimento dos M-CNTs com uma camada de albumina sérica bovina (BSA). Os materiais estudados (CNTs, M-CNTs e M-RACNTs) foram caracterizados utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, análise termogravimétrica e potencial zeta. Por meio da caracterização física foi possível avaliar a presença de nanopartículas magnéticas, bem como da camada BSA. Após a caracterização, os M-RACNTs foram então utilizados na MDSPE para obtenção de compostos orgânicos do caldo de fermentação do endófito *Lasiodiplodia sp.* Em estudos preliminares, o material provou ser um bom sorvente e com base nestes resultados foi realizada a otimização multivariada, por meio do planejamento fatorial fracionário, para quatro variáveis independentes: massa de material, tempo de adsorção, volume de solvente e tempo de dessorção, a fim de se obter as melhores condições de extrações. As análises dos extratos foram feitas por GC-MS e LC-MS/MS. Após a realização da otimização, foi possível obter condições ideais de extração para um hidrocarboneto, determinado por GC-MS e dois possíveis derivados de ácido jasmônico, determinados por LC-MS/MS. Conclui-se que o material possui um alto potencial para ser utilizado no processo de extração de compostos orgânicos provenientes do caldo de fermentação de fungos endofíticos, pois apresentou boa capacidade de pré-concentração em comparação a técnica usual (extração líquido-líquido), permite a utilização de pequenas quantidades de amostra e apresenta baixo consumo de solventes orgânicos.

Palavras-chaves: Preparo de amostra; LC-MS/MS; GC-MS; extração em fase sólida; extração de compostos bioativos, CNTs.

## ABSTRACT

The analysis of organic compounds in complex matrices is a time-consuming, expensive, and often error-prone task. Thus, analytical chemistry has proposed innovative solutions to make this process more efficient and reliable. Following this trend, this work proposed the use of a Restricted access materials, with magnetic properties, based on carbon nanotubes (M-RACNTs) to be used as a sorbent in the extraction in solid magnetic dispersive phase (MDSPE), of organic compounds from the fermentation broth of the endophyte *Lasiodiplodia* sp. The synthesis of the material was performed by functionalizing commercial multiple-walled carbon nanotubes (CNTs) with magnetic nanoparticles (M-CNTs) and by coating the M-CNTs with a layer of bovine serum albumin (BSA). The studied materials (CNTs, M-CNTs, and M-RACNTs) were characterized using infrared spectroscopy with Fourier transform, thermogravimetric analysis, and zeta potential. Through physical characterization, it was possible to evaluate the presence of magnetic nanoparticles, as well as the BSA layer. After characterization, the M-RACNTs were then used in MDSPE to obtain organic compounds from the fermentation broth of the endophyte *Lasiodiplodia* sp. In preliminary studies, the material proved to be a good sorbent, and based on these results, multivariate optimization was performed, through fractional factorial planning, for four independent variables: material mass, adsorption time, solvent volume, and desorption time. The extracts were evaluated by using GC-MS and LC-MS / MS. After the optimization, it was possible to obtain ideal conditions of extraction for a hydrocarbon and two possible derivatives of jasmonic acid. It was concluded that the material has a high potential to be used in the sample preparation process for the extraction of organic compounds from endophytic fungi fermentation broth, since presented a greater pre-concentration compared to the usual technique (liquid-liquid extraction), use of small amount of sample and low consumption of organic solvents.

Keywords: Sample preparation; LC-MS/MS; GC-MS; solid phase extraction; extraction of bioactive compounds, CNTs.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas dos compostos isolados do fungo <i>Lasiodiplodia sp.</i> .....	24
Figura 2 -	Mapa conceitual dos estudos realizados com extração e purificação de caldo de fermentação de fungos endofíticos, encontrado na Web of Science nos anos de 2010 a 2020. ....	27
Figura 3 -	Processo de exclusão de interferentes por meio de um RAM já presente em literatura. ....	29
Figura 4 -	Esquema de mecanismo de exclusão de RAMs revestido com BSA .....	30
Figura 5 -	Mapa conceitual dos estudos realizados com materiais de acesso restritos, encontrado na Web of Science nos anos de 2010 a 2020.....	31
Figura 6 -	Classificação de materiais restritos à base de sílica. Tipo A: fases físicas unimodais; tipo B: fases físicas bimodais; tipo C: fases químicas unimodais; e tipo D: fases químicas bimodais.....	32
Figura 7 -	Estrutura de SWCNT e de MWCNT .....	35
Figura 8 -	Esqueleto esteroidal .....	38
Figura 9 -	Formação do fragmento referente à perda da cadeia lateral .....	39
Figura 10 -	Esqueleto básico das flavonas.....	40
Figura 11 -	Proposta da via mecanística de fragmentação de (E)Gal-(E)Cat (m/z 595) a partir de EM/EM, em modo positivo. ....	40
Figura 12 -	Ruptura do anel C das ligações 0 e 2. ....	41
Figura 13 -	Proposta de fragmentação de <i>Lasioplodina</i> .....	42
Figura 14 -	Esquema generalizado para a síntese dos M-CNTs.....	50
Figura 15 -	Fluxograma do processo de extração do caldo de fermentação.....	53
Figura 16 -	Esquema do processo de extração realizados com o caldo de fermentação <i>Lasiodiplodia sp.</i> .....	55
Figura 17 -	Esquema generalizado dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM). ....	56
Figura 18 -	Esquema de reações que ocorrem no processo de revestimento com albumina. Em 1 reação entre o grupamento amina da BSA e o aldeído do glutaraldeído; em 2 reação entre o aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído e o grupo amina de outra molécula e em 3.....	65

Figura 19 -	Variação do potencial zeta dos CNTs, M-CNTs e M-RACNTs em função do pH. ....	66
Figura 20 -	Espectros de FTIR dos CNTs, M-CNTs e M-RACNTs. ....	67
Figura 21 -	Curva de perda de massa dos CNTs, M-CNTs e M-RACNTs. ....	68
Figura 22 -	Cromatogramas obtidos das extrações com: (A) Extrato acetonitrila e Branco, (B) Extrato acetato de etila e Branco, (C) Extrato clorofórmio e Branco e (D) Extrato hexano e Branco. ....	69
Figura 23 -	Cromatogramas comparativos analisados utilizando o GC-MS: (1) Extração com M-RACNTs utilizando o clorofórmio; (2) Extração líquido-líquido utilizando clorofórmio; (3) Extração com M-RACNTs utilizando o Hexano; (4) Extração líquido-líquido utilizando hexano. ....	72
Figura 24 -	Espectro de massa obtido do tridecano. ....	82
Figura 25 -	Proposta de fragmentação para o tridecano. ....	82
Figura 26 -	Espectro de massa obtido do nonadecano. ....	82
Figura 27 -	Proposta de fragmentação para o nonadecano. ....	83
Figura 28 -	Espectro de massas do undecanol. ....	83
Figura 29 -	Proposta de fragmentação causada pela desidratação na molécula de undecanol. ....	84
Figura 30 -	Espectro de massas do 3,5-Di-terc-butilfenol. ....	84
Figura 31 -	Fragmentação proposta para a fragmentação obtida no pico base. ....	84
Figura 32 -	Fragmentação proposta para a fragmentação para o 3,5-Di-terc-butilfenol. ....	85
Figura 33 -	Espectro de massas do tridecanal. ....	85
Figura 34 -	Fragmentação proposta para a fragmentação para o Tridecanal. ....	86
Figura 35 -	Espectro de massas do tetradecanal. ....	86
Figura 36 -	Fragmentação proposta para a fragmentação para o Tetradecanal. ....	86
Figura 37 -	Compostos identificados por CG-EM nos extratos clorofórmio e acetato com atividade antimicrobiana conhecida. ....	88
Figura 38 -	Perfil eletroforético (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida das amostras de caldo de fermentação de fungo endofítico. ....	89
Figura 39 -	Espectro de massa do Hexadecano. ....	91
Figura 40 -	Proposta de fragmentação para o Hexadecano. ....	91
Figura 41 -	Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$ . ....	94

Figura 42 -	Gráfico de perfis para os valores previstos e a desejabilidade para as variáveis analisadas. ....	96
Figura 43 -	Gráfico da comparação dos valores reais e preditos utilizando a equação da reta. ....	98
Figura 44 -	Superfície de resposta para as variáveis massa de material e volume de solvente. ....	100
Figura 45 -	Gráfico de contorno para variáveis massa de material e volume de solvente. ....	100
Figura 46 -	Scans obtidos dos extratos analisados por LC-MS/MS: (A) Extrato acetonitrila; (B) Extrato acetato de etila e (C) Extrato clorofórmio. ....	101
Figura 47 -	Rede molecular obtida na plataforma GNPS da relação dos extratos acetato nos pHs 3,0, 7,0 e 9,0. ....	109
Figura 48 -	Rede molecular obtida na plataforma GNPS da relação dos extratos acetonitrila nos pHs 3,0 7,0 e 9,0. ....	111
Figura 49 -	Rede molecular obtida na plataforma GNPS da relação dos extratos clorofórmio nos pHs 3,0 7,0 e 9,0. ....	112
Figura 50 -	Espectro de massas obtido para o íon precursor $m/z= 311$ . ....	113
Figura 51 -	Proposta de fragmentação para o 5,6,2' - trimetoxiflavona. ....	113
Figura 52 -	Espectros de massas obtidos: (1) $m/z= 325$ ; (2) $m/z= 297$ e (3) $m/z= 339$ . ....	113
Figura 53 -	Proposta de fragmentação para o desmetil-lasiodiplodina apresentada no estudo de SILVA (2007). ....	114
Figura 54 -	Espectro de massa obtido para o precursor $m/z = 279$ . ....	115
Figura 55 -	Espectro de massa obtido para o precursor $m/z = 391$ . ....	115
Figura 56 -	Espectro de massas obtido do íon precursor $m/z = 213$ . ....	116
Figura 57 -	Proposta de fragmentação para o íon precursor $m/z = 213$ . ....	117
Figura 58 -	Espectro de massas obtido para o íon precursor $m/z= 185$ . ....	117
Figura 59 -	Estruturas do (3S,4R) -3-carboxi-2-metileno-heptan-4-olida (1) e o ácido decumbico (2). ....	118
Figura 60 -	Espectro de massas obtido para o íon precursor $m/z= 199$ . ....	118
Figura 61 -	Espectro de massas obtido para o íon precursor $m/z= 147$ . ....	119
Figura 62 -	Principal fragmento obtido no espectro de massas da Lisina. ....	119
Figura 63 -	Espectro de massas obtido pelo íon precursor $m/z= 165$ . (A) experimental e (B) GNPS. ....	119

Figura 64 -	Possível estrutura química identificada no GNPS para o íon precursor m/z= 165.....	120
Figura 65 -	Gráfico de Pareto obtido do planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$ para o íon precursor m/z= 185.....	122
Figura 66 -	Gráfico de perfis para os valores previstos e a desejabilidade para as variáveis analisadas. ....	124
Figura 67 -	Gráfico da comparação dos valores reais e preditos utilizando a equação da reta.....	126
Figura 68 -	Superfície de resposta para as variáveis massa de material e volume de solvente. ....	128
Figura 69 -	Gráfico de contorno para as variáveis massa de material e volume de solvente. ....	128
Figura 70 -	Gráfico de Pareto obtido do planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$ para o íon precursor m/z= 213.....	130
Figura 71 -	Gráfico de perfis para os valores previstos e a desejabilidade para as variáveis analisadas. ....	132
Figura 72 -	Gráfico da comparação dos valores reais e preditos utilizando a equação da reta.....	134
Figura 73 -	Superfície de resposta para: (A) Massa de material e volume de solvente; (B) Massa de material e Tempo de dessorção e (C) Volume de solvente e Tempo de dessorção. ....	136
Figura 74 -	Gráfico de contorno para: (A) Massa de material e Volume de solvente; (B) Massa de material e Tempo de dessorção e (C) Volume de solvente e Tempo de dessorção. ....	137

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz de planejamento fracionário $2^{3-1}$ .....	48
Tabela 2 - Massa dos extratos obtidos de cada solvente extrator utilizado.....	54
Tabela 3 - Valores codificados utilizado no planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$ .....	60
Tabela 4 - Valores reais escolhidos para realização do planejamento fatorial fracionário ...	60
Tabela 5 - Matriz dos valores reais utilizados no planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$ .....	61
Tabela 6 - Relação de metabólitos secundários, segundo a literatura. ....	74
Tabela 7 - Possíveis hidrocarbonetos identificados nos extratos obtidos.....	81
Tabela 8 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos. ....	87
Tabela 9 - Áreas obtidas por meio dos extratos analisados por GC-MS para o composto monitorado com tempo de retenção 18,80min. ....	93
Tabela 10 - Valores codificados, valores reais e resposta analítica da condição quatro .....	95
Tabela 11 - Tabela ANOVA obtida no planejamento para o hexadecano. ....	97
Tabela 12 - Valores reais e valores preditos para a resposta analítica utilizada no planejamento experimental fatorial fracionário .....	97
Tabela 13 - Valores obtidos para os coeficientes das variáveis e de suas interações.....	99
Tabela 14 - Íons precursores selecionados nos extratos analisados. ....	102
Tabela 15 - Áreas obtidas por meio dos extratos analisados por LC-MS/MS para o íon precursor $m/z= 185$ .....	121
Tabela 16 - Valores codificados, valores reais e resposta analítica das condições 5 e 7. ....	123
Tabela 17 - Tabela ANOVA obtida no planejamento para o íon precursor $m/z= 185$ .....	125
Tabela 18 - Valores reais e valores preditos para a resposta analítica utilizada no planejamento experimental fatorial fracionário. ....	125
Tabela 19 - Valores obtidos para os coeficientes das variáveis e de suas interações.....	127
Tabela 20 - Áreas obtidas por meio dos extratos analisados por LC-MS/MS para o íon precursor $m/z= 213$ .....	129
Tabela 21 - Valores codificados, valores reais e resposta analítica das condições 5 e 7. ....	131
Tabela 22 - Tabela ANOVA obtida no planejamento realizado para o íon precursor $m/z= 213$ .....	133
Tabela 23 - Valores reais e valores preditos para a resposta analítica utilizada no planejamento experimental fatorial fracionário. ....	133
Tabela 24 - Valores obtidos para os coeficientes das variáveis e de suas interações.....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
BSA	- Albumina Bovina Sérica, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CG/MS	- Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de massa
CNTs	- Nanotubo de carbono
CIM	- Teste de Concentração Inibitória Mínima
CMM	- Concentração Microbicida Mínima
DHHA	- Ácido trans-2,3, dihidro-3-hidroxi-anatranílico
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DMSPE	- Extração em fase sólida dispersiva magnética
DTG	- Termogravimetria Derivada
EI-MS	- Espectrômetro de massas com ionização por impacto de elétrons
EM	- Espectrometria de massa
F <sub>cal</sub>	- Teste F calculado
F <sub>tab</sub>	- Teste F Tabelado
FT-IR	- Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier
GNPS	- <i>Products Social Molecular Networking</i>
HRF	- Clivagem heterocíclica
Hs-MEFS	- Microextração em sorvente empacotado por headspace
HCl	- Ácido clorídrico
LLE	- Extração Líquido – Líquido
MIPs	- Polímeros de impressão molecular
M-RACNTs	- Nanotubos de Carbono Magnético de Acesso Restrito, do inglês <i>Magnetic Restricted Acces Carbon Nanotubes</i>
MSPE	- Do inglês <i>Magnetic Solid Phase Extraction</i>
MS <sub>reg</sub>	- Média quadrática de regressão
MS <sub>res</sub>	- Média quadrática do resíduo
MS <sub>lof</sub>	- Médias quadráticas da falta de ajuste
MS <sub>pe</sub>	- Erro puro
MWCNTs	- Do inglês <i>Multi-walled Carbon Nanotubes</i>
m/z	- Razão massa/carga

PDMS	- Dimetil Polissiloxano
pI	- Ponto isoelétrico
QM	- Formação de quinona metídeo
RAM	- Material de acesso restrito, do inglês <i>restricted access material</i>
RACNTs	- Nanotubo de carbono de acesso restrito
RACCs	- Carvão ativado de acesso restrito
RDA	- Retro – Diels Alder
RM	- Redes moleculares
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
SPE	- Extração em fase sólida
SWCNTs	- Do inglês <i>Single-walled Carbon Nanotubes</i>
TG	- Termogravimetria
UHPLC-MS/MS	- Cromatografia Líquida de Alto Desempenho acoplado a espectrometria de massa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
2.1	FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	22
2.2	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE CALDOS DE FERMENTAÇÃO .....	26
2.3	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO .....	28
<b>2.3.1</b>	<b>Nanotubos de carbono de acesso restrito</b> .....	34
2.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS .....	37
2.5	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA .....	44
<b>2.5.1</b>	<b>Planejamento fatorial fracionário</b> .....	47
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
3.1	OBJETIVO GERAL .....	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	50
4.1	SÍNTESE DOS NANOTUBOS DE CARBONO MAGNÉTICO DE ACESSO RESTRITO .....	50
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO MAGNÉTICOS .....	51
<b>4.2.1</b>	<b>Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier</b> .....	51
<b>4.2.2</b>	<b>Potencial zeta</b> .....	51
<b>4.2.3</b>	<b>Análise termogravimétrica</b> .....	52
4.3	OBTENÇÃO DO CALDO DE FERMENTAÇÃO DO FUNGO <i>LASIODIPLODIA SP.</i> .....	52
4.4	EXTRAÇÃO DO CALDO DE FERMENTAÇÃO <i>LASIODIPLODIA SP.</i> .....	53
4.5	TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM) .....	55
4.6	ANÁLISE POR SDS-PAGE.....	57
<b>4.6.1</b>	<b>Preparo das amostras</b> .....	57
<b>4.6.2</b>	<b>Preparo do gel de separação</b> .....	57
<b>4.6.3</b>	<b>Preparo do gel de concentração</b> .....	58
<b>4.6.4</b>	<b>Aplicação das amostras e corrida eletroforética</b> .....	58
<b>4.6.5</b>	<b>Revelação e análises dos géis</b> .....	58

4.7	A INFLUÊNCIA DO PH NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS M-RACNTS DOS COMPOSTOS ANALISADOS POR GC-MS .....	59
4.8	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PARA O GC-MS.....	59
4.9	ANÁLISES DOS EXTRATOS BRUTOS E DA INFLUÊNCIA DO PH DA EXTRAÇÃO POR M-RACNTS DOS COMPOSTOS ANALISADOS POR LC-MS/MS .....	61
4.10	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PARA O LC-MS .....	63
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>64</b>
5.1	SÍNTESE DOS M-RACNTS .....	64
<b>5.1.1</b>	<b>Caracterização dos M-RACNTs</b> .....	<b>65</b>
5.1.2.1	Potencial zeta .....	65
5.1.2.2	Espectroscopia no infravermelho.....	67
5.1.2.3	Análise termogravimétrica.....	68
5.2	ANÁLISES DOS EXTRATOS POR GC-MS .....	69
5.3	CIM E CMM DE EXTRATOS BRUTOS.....	87
5.4	ANÁLISE DE ELETROFORESE SDS-PAGE DO CALDO DE FERMENTAÇÃO .....	89
5.5	ESTUDO UNIVARIADO DO PH DO CALDO DE FERMENTAÇÃO POR MEIO DO GC-MS .....	90
5.6	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PARA GC-MS.....	92
5.7	ANÁLISES DOS EXTRATOS BRUTOS E ESTUDO UNIVARIADO DO PH POR LC-MS .....	101
5.8	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PARA A OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO NO LC-MS.....	121
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>138</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>139</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A análise de compostos orgânicos em matrizes complexas requer a utilização de metodologias simples e rápidas que levem a resultados confiáveis. Baseando-se nesta demanda, a química analítica tem proposto soluções viáveis e inovadoras. Atualmente, a busca por sorventes mais eficientes e que minimizem os erros e as perdas durante o processo de extração tem se tornado uma tendência. Desse modo, uma classe de sorventes vem ganhando grande destaque, são os materiais de acesso restrito (do inglês *Restrict Access Materials*- RAM). Esses sorventes são capazes de reter analitos de baixo peso molecular no interior de seus poros e simultaneamente evitar a ligação de macromoléculas, como proteínas e polipeptídios em sua superfície (YIM; JEONG; PARK, 2001).

Um exemplo de matriz complexa, amplamente estudada é o caldo de fermentação de fungos endofíticos. Os fungos endofíticos, são micro-organismo que colonizam os tecidos internos das plantas, sem causar efeito negativo imediato. Esses tecidos podem ser as raízes, caule, folhas, frutos e sementes (ALY *et al.*, 2011). Tais microrganismos são considerados uma fonte importante de metabólitos secundários (compostos bioativos) de interesse para a indústria farmacêutica, alimentícia e para agricultura. Muitos estudos comprovaram que esses metabólitos apresentam atividade fungicida, bactericida e antitumoral, no entanto a variedade de compostos é tão grande que muitos não foram ainda isolados e caracterizados (MACHAVARIANI *et al.*, 2014).

O método de preparo de amostras para a separação de compostos bioativos oriundos do caldo de fermentação de fungos endofíticos normalmente é feito por extração líquido-líquido (LLE). Apesar de ser uma técnica extensamente usada em laboratórios químicos e apresentar vantagens como simplicidade, baixo custo e possibilidade de utilização de uma boa variedade de solventes, a extração líquido-líquido apresenta alguns entraves como baixa seletividade, formação de emulsão, elevado consumo de solventes, analitos ligados a composto com alto peso molecular e solubilidade entre as duas fases (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015). Além de ser uma técnica demorada, utiliza elevados volumes de solventes orgânico, o que acaba ocasionando um alta elevação do seu custo e a alta exposição do pesquisador, pois muitos solventes usados são tóxicos.

Os materiais de acesso restrito possuem muitas vantagens, ao compararmos com a LLE, pois são capazes de fracionar uma amostra biológica, de tal modo, que é possível

se obter uma fração constituída apenas de macromoléculas, como proteínas e outra de analitos, impedindo perdas por interação de analitos e proteína. Esses adsorventes também permitem a injeção direta das amostras, possibilitando assim a redução do uso de solvente orgânico, além da redução de tempo de análise e o aumento da eficiência de extração (FARIA *et al.*, 2017).

Alguns exemplos de RAMs são aqueles baseados em polímeros e nanotubos de carbono, obtidos por meio da modificação de suas superfícies externas com grupos hidrofílicos (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004). Os nanotubos de carbono de acesso restrito podem ser obtidos através da cobertura de CNTs comerciais com albumina sérica bovina (BSA), reticuladas por glutaraldeído. Já os polímeros podem ser obtidos pela modificação de sua superfície, com estrutura hidrofílica modificada, utilizando uma mistura de monometacrilato de glicerol e dimetacrilato de glicerol (SOUZA *et al.*, 2016).

Os Nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) tem sido muito utilizado no preparo de amostras devido às suas propriedades vantajosas, como elevada área superficial, alta capacidade de adsorção, altas estabilidades química e física, facilidade para ser quimicamente modificado, dentre outros. Nesse contexto, as extrações em fase sólida (SPEs) utilizando RACNTs são muito eficientes para a concentração de analitos orgânicos. Apesar da sua eficiência, algumas modificações podem ser realizadas, com o intuito de facilitar sua utilização no preparo de amostras. A associação de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com RACNTs é um bom exemplo, obtendo assim, M-RACNTs (BALDUINO *et al.*, 2019).

Após a modificação, o adsorvente adquire característica magnética suficiente para serem utilizados na SPE dispersiva magnética, em que usa um ímã para remover as partículas que adsorveram os analitos (LAGO *et al.*, 2020). A principal vantagem dessa modificação, comparando com a SPE convencional, é a maior interação entre o sorvente e a amostra, resultando em uma alta recuperação. Além disso, o uso de um ímã é uma estratégia simples e eficiente, que evita problemas recorrentes de bloqueio de cartuchos, comumente enfrentados na SPE convencional.

Além das vantagens destacadas dos M-RACNTs, associar ao desenvolvimento do método analítico a utilização de um planejamento experimental, com o qual pode-se avaliar os efeitos de variáveis sobre respostas analíticas e se determinar quais delas são mais significativas, apresenta inúmeros benefícios. A importância de um bom planejamento experimental diminui os números experimentos e o reduz desperdício de reagentes (PEREIRA, 2014). Para auxiliar nos planejamentos, utiliza-se técnicas de

ferramentas quimiométricas, que vêm contribuindo para aprimorar processo de extração, bem como na preparação rápida de desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e eficientes (PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018).

Dessa forma, levando em consideração as limitações da técnica convencionalmente usada para o isolamento de metabólitos secundários proveniente do caldo de fermentação de fungos endofíticos, que essa matriz apresenta em sua constituição proteínas, e acreditando nas características relevantes e vantagens apresentadas pelos RAMs e a eficiência do planejamento quimiométrico, este estudo propôs a utilização dos M-RACNTs na extração de compostos bioativos provenientes dessa matriz e a otimização do método de extração utilizado, sendo essa aplicação nunca relatada anteriormente na literatura científica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos são micro-organismos encontrados dentro dos tecidos das plantas, habitando principalmente as partes aéreas, como caules e folhas, sem causar danos ao hospedeiro (NEWAN; CRAGG; SNADER, 2003). A maioria dos fungos são transmitidos horizontalmente a seus hospedeiros, por meio dos esporos aéreos. Esse processo pode ocorrer de forma vertical, porém somente quando disseminadas por sementes. Uma vez instalado no interior da planta, tendem a permanecer em estado de latência durante toda a vida útil da planta, ou pelo menos, por um longo período, até que algum fator desfavoreça a condição de simbiose (ALY *et al.*, 2011).

A relação estabelecida pelos micro-organismos endofíticos e o hospedeiro, são dependentes de diversos fatores. Por exemplo, temos o modo de transmissão: em que os fungos ao chegar nas sementes tendem a estabelecer relações mutualística, enquanto fungos de origem na transmissão horizontal tendem a se comportar como antagonista (ALY *et al.*, 2011). Ao exercer uma relação mutualística, funciona como um gatilho biológico estimulando o sistema de defesa da planta, portanto aumentando sua resistência a espécies patogênicas (WEYENS *et al.*, 2009; WHITE; TORRES, 2010).

Nos últimos anos tais micro-organismos têm sido frequentemente estudados como fonte de produtos naturais bioativos, visto que esses produtos possuem um grande potencial na agricultura, nas indústrias de alimentos e farmacêuticas (ZHOU *et al.*, 2014).

Os fungos são fundamentais fontes de substâncias de interesse farmacêutico. Dos 23 mil compostos ativos já obtidos, 42% são provenientes de fungos (CALDERANI; ORLANDELLI; PAMPHILE, 2016). Os metabólitos secundários produzidos por esses micro-organismos podem apresentar atividades antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena entre outros (ZHANG *et al.*, 2015).

O interesse científico por esses micro-organismo surgiu a partir de 1993, quando Stierle e colaboradores publicaram sobre o taxol, um importante fármaco antitumoral, também produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreance*, isolado de *Taxusbrevifolia*. Em seguida, outros compostos com atividade antitumoral, dentre eles, alcalóides da vinca, camptolecina e podofilotoxina também foram obtidos de caldo de fermentação de fungos endofíticos (GREVE *et al.*, 2010; GROTHAUS *et al.*, 2010).

Devido a suas potencialidades em relação aos novos compostos biologicamente ativos, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com intuito de isolar e identificar substâncias produzidas por esses micro-organismos. Nesse estudo o fungo endofítico estudado foi o *Lasiodiplodia sp.*, sendo este, um micro-organismo com um alto potencial de fonte de compostos bioativos já relatados na literatura.

Um exemplo de estudo que realizou o isolamento desse micro-organismo foi Agostini (2016), primeiramente as folhas e os pecíolos foram lavados em água corrente e secos à sombra e temperatura ambiente. Em seguida, em ambiente estéril, realizou a desinfecção do material, utilizando solução de etanol a 70% (v/v) e solução comercial de hipoclorito de sódio. Após, as folhas foram cortadas em fragmentos de 0,5x0,5 cm, foram transferidos para placas de Petri contendo ágar batata dextrose acrescido de cloranfenicol 0,1 g.L<sup>-1</sup> e foram incubadas em estufa BOD a 28°C. Depois do 5º dia de incubação, foi realizado o primeiro repique das colônias crescidas a partir dos fragmentos, sendo estas repicadas para um tubo inclinado contendo ágar batata dextrose e incubadas a 28°C. Os fungos foram identificados utilizando o protocolo descrito por Raeder & Broda (1985). Destacando que foi utilizado o fungo isolado e identificado nesse estudo.

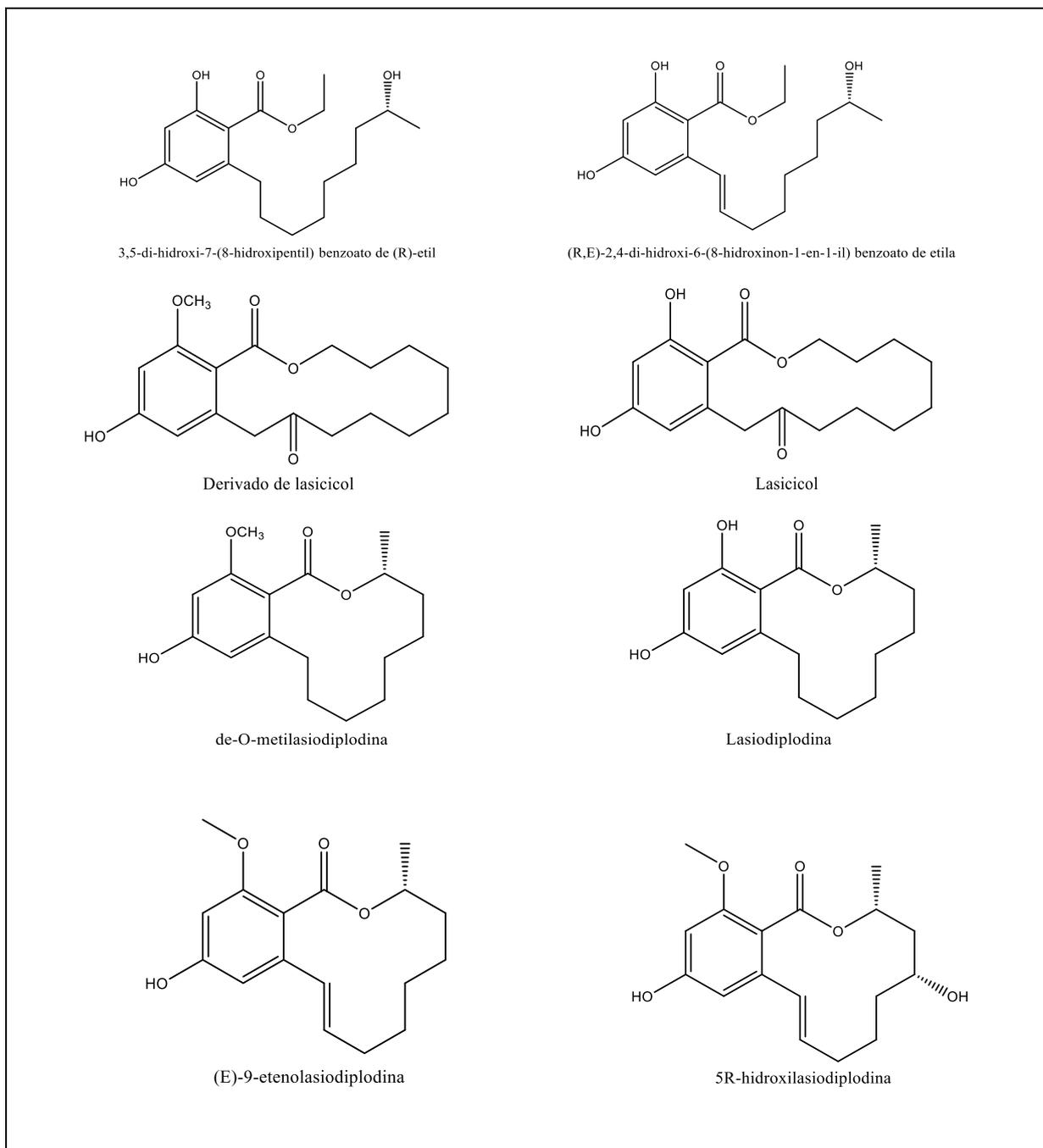
Em pesquisa realizada por Senhua *et al.* (2015) foram isolados do fungo *Lasiodiplodia sp.* derivado da planta medicinal *Acanthusilicifolius*, três novos derivados do ácido β-resorcílico, sendo eles, 3,5-di-hidroxi-7- (8-hidroxi-pentil) benzoato de (R) -etil, (R, E) -2,4-di-hidroxi-6- (8-hidroxi-non-1-en-1-il) benzoato de etila e um derivado da lasicol. Juntamente, foram isolados seis análogos conhecidos, o lasicol, lasiodiplodina, de-O-metilasiiodiplodina, (E)-9-etenolasiiodiplodina, 5R-hidroxi-lasiiodiplodina e 5S-hidroxi-lasiiodiplodina. Suas estruturas foram elucidadas por espectroscópica de RMN 1D e 2D, espectrometria de massas e difração de raios-X. As substâncias apresentaram atividades antiplasmodial, atimicrobiana e citotóxica.

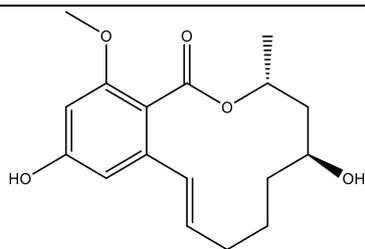
Um outro estudo realizado com o fungo *Lasiodiplodia sp.* obtido da *Houttuynia cordata* Thunb permitiu o isolamento de adenina-alquilresorcino, um alquilresorcinol e também três novos compostos, o 3-O-metil-5- (8-metoxil-6-oxononil) -resorcinol, 3-O-metil-5 - [(7E) -6-oxo-7-nonenil] -resorcinol e o (3S) -3 - [(R) -8-hidroxi-nonil] -6-hidroxi-8-metoxi-3,4-di-hidroisocromano-1-ona. Suas estruturas foram elucidadas por RMN 1D e 2D e espectrometria de massas. Os compostos apresentaram atividades antioxidantes, citotóxicas e antimicrobianas (YU-MENG *et al.*, 2016).

O trabalho realizado por Huang *et al.* (2017) com o fungo *Lasiodiplodia sp.* obtido da planta *Escoccaria gallocha* permitiu o isolamento de duas novas lasiodiplodinas, a

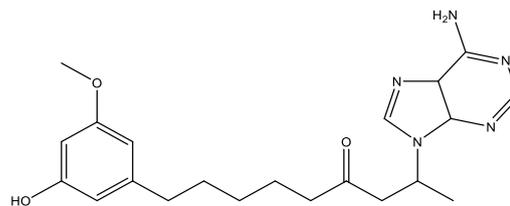
12E, 15R-5-hidroxi-3-metoxi-16-metil-8,9,10,11,14,15-hexa-hidro1H-benzo [c] [1] oxaciclodocecina-1-ona e 24-di-hidroxi-6-(8-oxononil) benzoato de etila, juntamente com três compostos conhecidos. Suas estruturas foram identificadas por RMN 1D e 2D, espectrometria de massas e dicroísmo circular eletrônico. As novas lasiodiplodinas apresentaram uma alta atividade citotóxicas.

Figura 1 - Estruturas dos compostos isolados do fungo *Lasiodiplodia* sp.

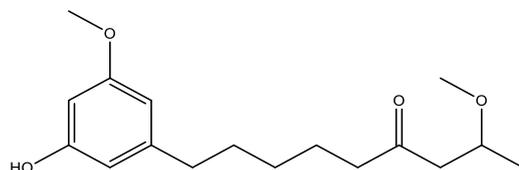




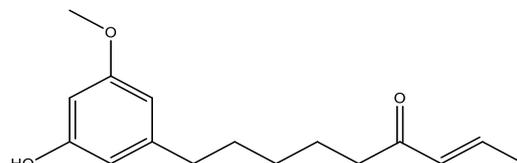
5S-hidroxi-lasiodiplodina



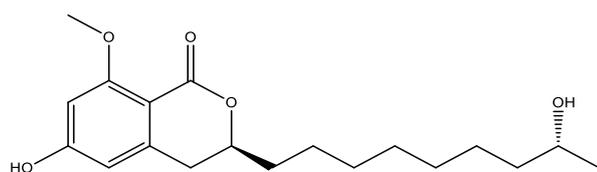
Adenina-alquilresorcino



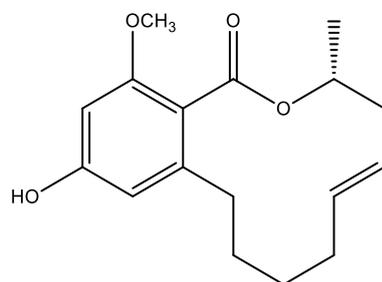
3-O-metil-5-(8-metoxil-6-oxonil)-resorcinol



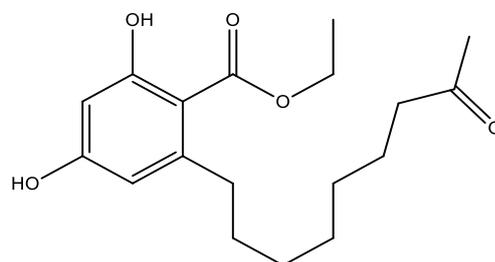
3-O-metil-5-[(7E)-6-oxo-7-nonenil]-resorcinol



(3S)-3-[(R)-8-hidroxi-8-metoxi-3,4-di-hidroisocromano-1-ona



12E,15R-5-hidroxi-3-metoxi-16-metil-8,9,10,11,14,15-hexa-hidro1H-benzo[c][1]oxaciclodecin-1-ona



24-di-hidroxi-6-(8-oxonil) benzoato de etila

Fonte: Autor

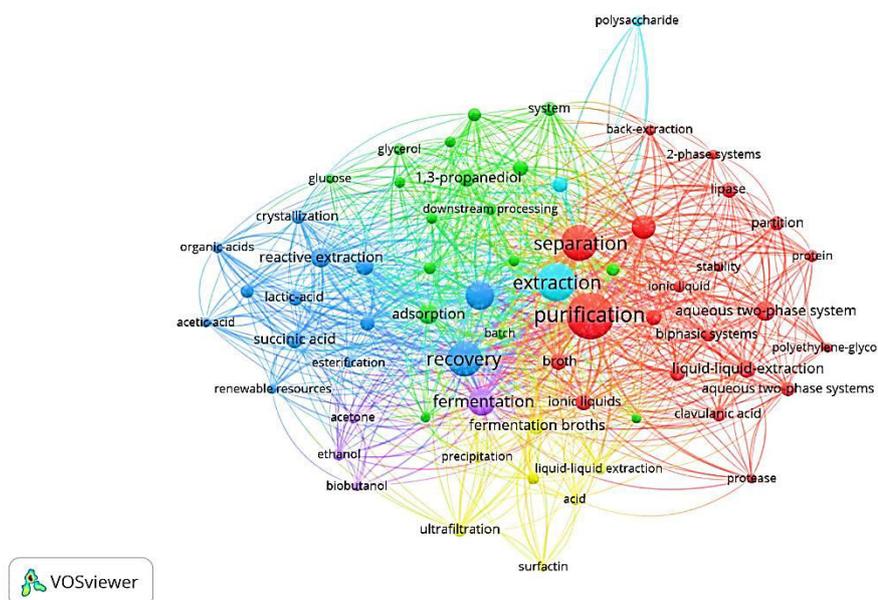
## 2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE CALDOS DE FERMENTAÇÃO

A técnica de preparo de amostras mais utilizada para a extração de compostos bioativos do meio de fermentação de fungos é a extração líquido – líquido (LLE). Tal técnica fundamenta-se na distribuição ou partição de compostos entre líquidos ou fases imiscíveis, sendo que estes compostos apresentam diferentes solubilidades e diferentes interações químicas. Na maioria das vezes se constitui de uma fase aquosa e uma fase orgânica (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

Esta técnica, mesmo possuindo uma elevada eficiência, apresenta baixa seletividade o que dificulta a extração quando se trabalha com amostras complexas. Além disso, a LLE possui alguns problemas de ordem prática, como a formação de emulsão, dificuldade de remoção de analitos ligados a compostos com alto peso molecular, solubilidade entre as fases, entre outros (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A bibliometria é um método de análise bibliográfica quantitativa utilizada para pesquisa científica, que fornece dados para a representação das atuais tendências de pesquisa (SU; LEE, 2010). A fim de se avaliar as técnicas mais utilizadas para a extração de metabólitos secundários provenientes do caldo de fermentação de fungos endofíticos, foi realizada uma busca utilizando a base de dados Web of Science referente aos anos de 2010 a 2020. Foram encontradas 270 referencias de estudos sobre metodologias de separação desses compostos, sendo que cerca de 95% dos estudos foram realizados por extração líquido – líquido. Utilizando o software VOSviewer, foi plotado o mapa conceitual com todos os estudos encontrados, levando em consideração as palavras chaves que estão interligadas e representadas na figura 2, sendo que elas apareceram no mínimo 7 vezes no estudo.

Figura 2 - Mapa conceitual dos estudos realizados com extração e purificação de caldo de fermentação de fungos endofíticos, encontrado na Web of Science nos anos de 2010 a 2020.



Fonte: Autor

Como exemplo de trabalho envolvendo a utilização da LLE para o tratamento de caldos de fermentação de fungos endofíticos, há o estudo de Ramachandran *et al.* (2019), que purificou o caldo de fermentação do fungo *Caulerpa racemosa* utilizando como fase extratora o solvente acetato de etila. O extrato obtido foi avaliado quanto à sua atividade biológica por meio do teste CIM (Teste de Concentração Inibitória Mínima) e apresentou um alto potencial antibactericida.

Outro exemplo é o estudo de Wang *et al.* (2019), que realizou as extrações do caldo de fermentação do fungo endofítico *Cadophora orchidicola* com acetato de etila. O extrato bruto obtido foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se 30 frações, sendo estas juntadas por semelhança, resultando em 9 frações. Dentre elas, apenas a Fração 5 apresentou atividades antifúngica significativa contra quatro fungos patogênicos. Em seguida essa fração foi submetida a cromatografia líquida semipreparativa de alta eficiência em fase reversa, sendo possível o isolamento da cercosporamida.

Além do uso da LLE na purificação de caldo de fermentação de fungos endofitos, nas referências encontradas aparecerem estudos utilizando novas técnicas de purificação de maior eficiência e simplicidade, no entanto, foram encontrados apenas 2 artigos, o que

reforça a importância do desenvolvimento de novas metodologias. O primeiro trabalho foi desenvolvido por Sheng – Jie *et al.* (2018), no qual o preparo de amostra do caldo de fermentação do fungo *Pseudomonas chlororaphis* GP72 foi feito utilizando resina macroporosa de troca catiônica, com o intuito de obter o ácido trans-2,3-di-hidro-3-hidroxi-anatranílico (DHHA). Foram realizadas análises relativas ao desempenho e adsorção de seis resinas, Doo1, HZD-2, JKoo6, HD-8, HZo16 e 732. Os autores concluíram que a resina HD-8 apresentou um alto potencial para separação e purificação da DHHA e de outros compostos bioativos, obtendo uma maior recuperação em comparação a LLE.

O segundo estudo realizado por Oliveira (2017) abordou a separação e identificação de compostos orgânicos voláteis e não voláteis produzidos por dez fungos da família Botryosphaeriaceae e um da família Nectriaceae, utilizando as técnicas de micro-extração em fase sólida por *headspace* e micro-extração em fase sólida com fibra de PDMS. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e por cromatografia líquida de alta eficiência. O estudo apresentou uma alta eficiência de extração e baixo consumo de solvente orgânico, em comparação a trabalhos que utilizaram a LLE.

## 2.3 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO

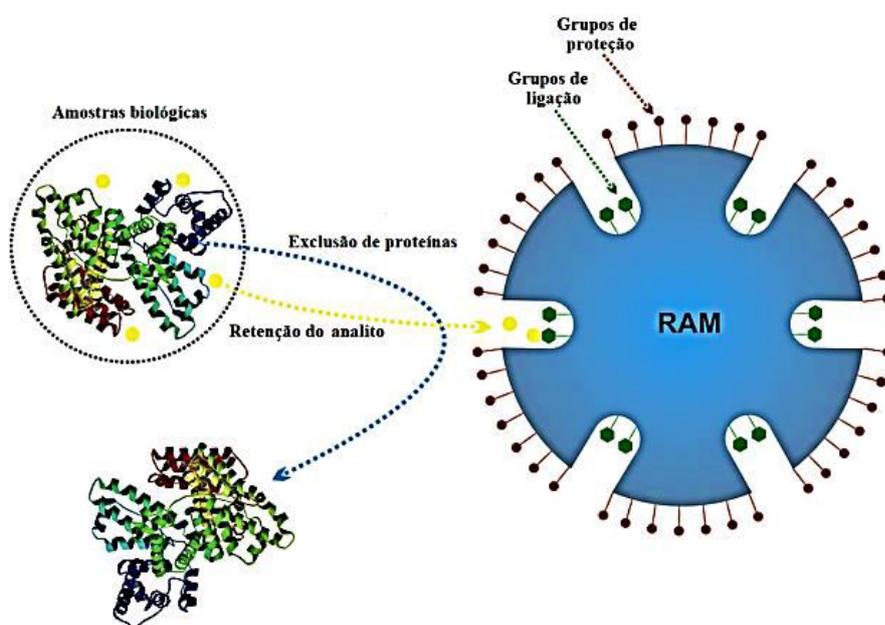
O preparo de amostra em matrizes complexas ricas em macromoléculas, como as proteínas, lipídios entre outras, normalmente demanda uma etapa prévia de preparo, com intuito de removê-las. Usualmente, esta etapa de desproteíntização pode ser realizada mediante a adição de um solvente orgânico miscível em água, sais e ácidos. Porém, a seletividade deste procedimento é considerada baixa, o extrato não é puro e límpido e ainda pode induzir à co-precipitação do analito. Assim, com o intuito de dinamizar a análise desses tipos de matrizes, os materiais de acesso restrito (RAMs) foram desenvolvidos, sendo sua principal utilização para a extração de substância com baixa massa molecular (SADILEK; SATINSKY; SOLICH, 2007).

A expressão acesso restrita (do inglês *restricted access media* - RAMs) primeiramente foi utilizado em 1991, como um termo geral para relatar sobre suportes cromatográficos que possibilitavam a injeção direta de amostras biológicas, permitindo a interação dos analitos de baixo peso molecular dentro dos poros e repelindo a adsorção de macromoléculas. A sua criação é atribuída a Hagestam e a Penkertom em 1985

(HAGESTAM; PINKERTON, 1985; SANTOS – NETO, 2008). A principal vantagem deste tipo de material sobre os outros sorventes é a sua capacidade de suportar repetidas injeções com grandes volumes de amostras, sem que suas propriedades de retenção sejam alteradas.

Os RAMs destacaram-se na literatura nas últimas três décadas e são materiais apropriados para a extração de diferentes compostos de baixa peso molecular e metais diretamente de matrizes complexas e ricas em macromoléculas (KATAOKA; SAITO, 2012; SADÍLEK; DALIBOR; SOLICH, 2007). Os analitos ficam retidos no interior do material extrator, por meio de mecanismos de partição, adsorção e/ou troca iônica. O processo de partição é um método físico baseado na diferença de solubilidade entre os analitos da amostra e a fase extratora. Já o processo de adsorção ocorre na interface entre as fases e no processo de troca iônica, os íons presentes no material de extração são trocados por íons presentes na amostra. Durante esses processos, os interferentes, ou seja, as macromoléculas, são evitados pela camada de grupamentos funcionalizados sobre a superfície do material, através de mecanismos de exclusão física (tamanho) e/ou química (DE FARIA *et al.*, 2017a; KATAOKA; SAITO, 2012). A figura 3 abaixo representa, um esquema genérico para RAMs.

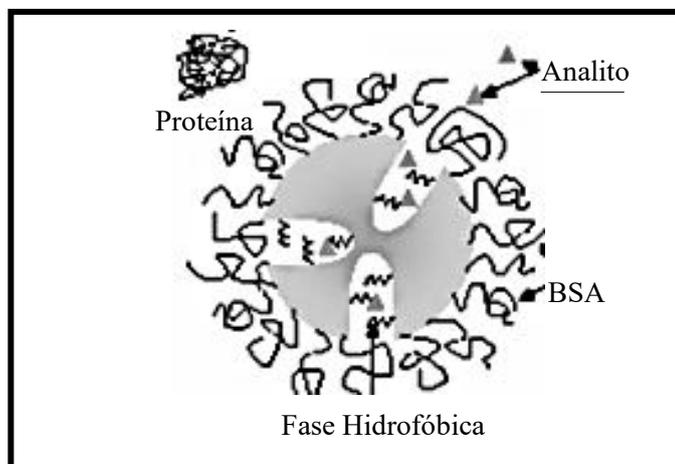
Figura 3 - Processo de exclusão de interferentes por meio de um RAM já presente em literatura.



Fonte: DE FARIA *et al.*, 2017a – adaptado.

Um exemplo de RAM muito utilizado atualmente são aqueles revestidos com albumina sérica bovina (BSA). A BSA é imobilizada sobre um suporte por meio de reações de entrecruzamento, utilizando glutaraldeído. É graças a esse revestimento que o acesso das macromoléculas hidrofílicas com o suporte fica restrito (CASSIANO, 2006).

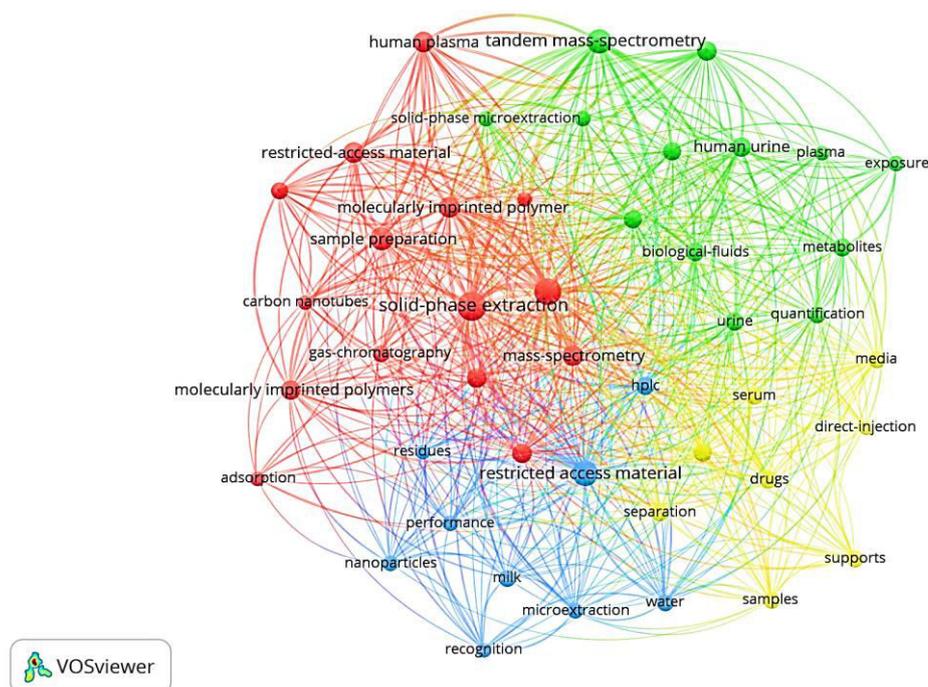
Figura 4 - Esquema de mecanismo de exclusão de RAMs revestido com BSA



Fonte: Autor

Os RAMs são muito utilizados em preparo de amostras biológicas para a extração de vários analitos, principalmente por causa de sua principal característica relacionada à exclusão de macromoléculas. Utilizando também a bibliometria foi realizado uma busca utilizando a base de dados Web of Science referente aos anos de 2010 a 2020, sendo encontradas 155 referências da utilização dos RAMs em estudos voltados para a química analítica, mostrando assim que a utilização desse adsorvente no preparo de amostras complexas, está em crescimento. Utilizando o software VOSviewer, foi plotado o mapa conceitual com todos os estudos encontrados, levando em consideração as palavras chaves representadas na figura 5, sendo que elas apareceram no mínimo 7 vezes no estudo.

Figura 5 - Mapa conceitual dos estudos realizados com materiais de acesso restritos, encontrado na Web of Science nos anos de 2010 a 2020.



Fonte: Autor

Ao analisar a figura 5 pode-se perceber que nenhum estudo apresenta a utilização dos RAMs na extração e purificação do caldo de fermentação de fungos endofíticos, confirmando assim que a metodologia estudada é inédita e nunca foi relatada na literatura. Além disso foi possível a verificação da sua utilização na extração de diferentes matrizes complexas, como, plasma, urina e leite, para a extração de diferentes analitos, como exemplo, fármacos e seus metabólitos. Também verificou-se que os estudos demonstraram o alto potencial de extração dessas matrizes, pois os RAMs possibilitaram uma melhor pré-concentração dos extratos e auxiliaram na redução do tempo experimental e no gasto de solvente orgânico.

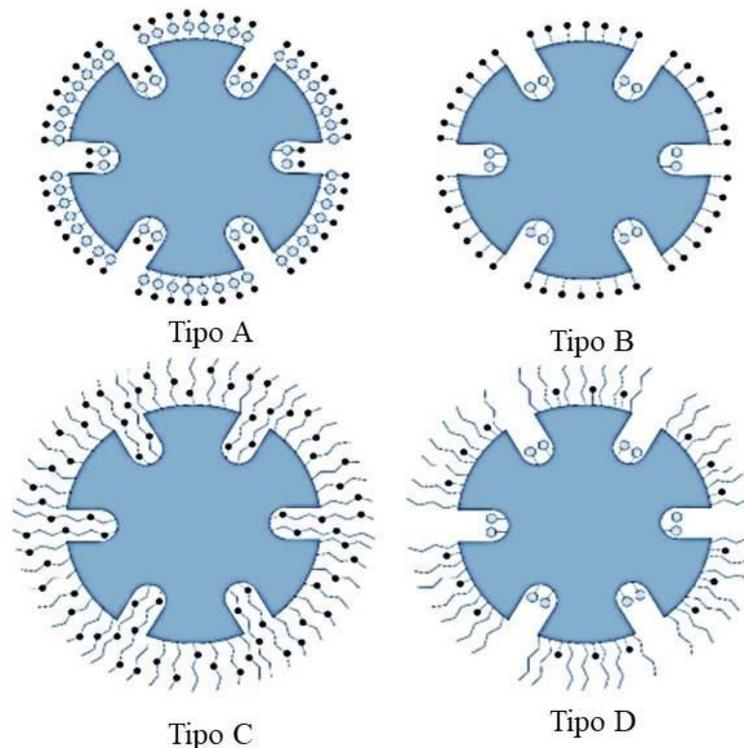
Além disso, vários adsorventes sólidos comerciais podem ser modificados para a obtenção dos RAMs, encontra-se estudos utilizando diferentes adsorventes RAMs, como os nanotubos de carbono (BARBOSA *et al.*, 2015), panos de carvão ativado (ULLAH *et al.*, 2016), polímeros (MORAES *et al.*, 2013) e à base de sílicas comerciais (GONÇALVES *et al.*, 2017).

Os RAMs à base de sílicas são os mais amplamente utilizados, devido às características vantajosas, como longa vida útil e boa capacidade de exclusão proteica

(FARIA *et al.*, 2017). Esses materiais podem ser classificados, de acordo com a sua superfície externa e interna, como fases unimodal ou bimodal, tendo propriedades iguais ou diferentes, respectivamente. Assim, Boss e Rudolphi (1997) classificou os RAMs em quatro grupos distintos: (1) fases físicas unimodais, (2) fases físicas bimodais, (3) fases químicas unimodais e (4) fases químicas bimodais.

As fases físicas unimodais são obtidas por diferentes sílicas porosas, com propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas em ambas as superfícies internas e externas. Enquanto as fases físicas bimodais possuem a camada externa hidrofílica e a camada interna hidrofóbica, que são responsáveis por reter pequenas moléculas por mecanismo de partição. As fases químicas unimodais são obtidas por diferentes sílicas porosas, ambas com grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, onde as superfícies externas e internas possuam a mesma barreira química. Já as fases químicas bimodais são separadas em subgrupos de acordo com a sua superfície externa hidrofílica. A figura 6 representa as quatro classificações dos RAMs:

Figura 6 - Classificação de materiais restritos à base de sílica. Tipo A: fases físicas unimodais; tipo B: fases físicas bimodais; tipo C: fases químicas unimodais; e tipo D: fases químicas bimodais.



Fonte: Adaptado de DE FARIA *et al.*, 2017a.

As quatro categorias mostradas na figura 6 e são classificadas por meio do mecanismo de exclusão e topoquímica de suas superfícies, sendo denominadas tipo A, B, C ou D (NETO; LOPES; CASS, 2015). Cada uma delas é explicada a seguir:

A: Possuem barreira física e homogênea, sendo estas obtidas por meio da funcionalização com grupamentos hidrofílicos ou hidrofóbicos tanto na superfície interna quanto na externa. O acesso a macromoléculas é impedido pelo tamanho dos poros, enquanto o acúmulo é evitado pelas cadeias externas (CASSIANO *et al.*, 2006). Esse material possui como maior vantagem a facilidade de síntese e como desvantagem, a possibilidade de baixa resolução dos picos cromatográficos (DE FARIA *et al.*, 2017a).

B: Atuam também por tamanho dos poros, porém possui diferenças entre os grupamentos internos, geralmente hidrofóbicos e os externos, geralmente hidrofílicos, resultando em um suporte heterogêneo (RUDOLPHI; BOOS, 1997). Essa categoria é a mais utilizada, havendo diferentes materiais comercialmente disponíveis, no entanto pode apresentar baixa seletividade (DE FARIA *et al.*, 2017a).

C: Sua barreira química é constituída pelo mesmo grupamento, podendo ser hidrofílico ou hidrofóbico, tanto na parte interna quanto na externa (RUDOLPHI; BOOS, 1997). No entanto possui uma baixa estabilidade quando comparado aos outros tipos de RAM, por isso não é muito utilizado (DE FARIA *et al.*, 2017a).

D: A superfície química e heterogênea é utilizada para impossibilitar a entrada e o acúmulo de macromoléculas no material extrator (RUDOLPHI; BOOS, 1997). Esse tipo apresenta como principal vantagem a compatibilidade com matrizes biológicas; entretanto, pode apresentar menor vida útil quando comparado com a fase tipo B (DE FARIA *et al.*, 2017a).

Ainda sobre os tipos de RAM, uma classe que vem se destacando é aquela baseada em polímeros de impressão molecular (MIP). Os MIPs são materiais extratores seletivos a um analito ou a uma classe deles (SANTOS *et al.*, 2015). A junção dos MIP com os RAM (materiais com pouca seletividade), gerando os polímeros de impressão molecular de acesso restrito (RAMIP), surge para somar as vantagens dos dois materiais, ou seja, a elevada seletividade e a capacidade de excluir macromoléculas. Vários trabalhos utilizam os RAMIP para a determinação de compostos orgânicos em amostras complexas (DE FARIA *et al.*, 2017a).

Por último, os RAMs baseados em CNTs oferecem vantagens aos métodos analíticos devido a sua estabilidade química e elevada área superficial (DE FARIA *et al.*,

2017b). Recentemente, Barbosa *et al.* (2015, 2016) demonstraram ser possível a obtenção de nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) a partir do recobrimento de CNTs com uma camada externa de BSA. Esse material se mostrou compatível com diferentes amostras complexas não tratadas. Vale ressaltar que procedimento parecido com o realizado para a obtenção de RACNTs também foi aplicado para carvão ativado, resultando no carbono ativado de acesso restrito, RACCs (ULLAH *et al.*, 2016).

Os RAMs vêm se destacando na utilização (DE FARIA *et al.*, 2017a) tanto em sistemas online de extração (DE FARIA *et al.*, 2017c; DE PAULA; DE PIETRO; CASS, 2008) quanto em sistemas off-line (OLIVEIRA; SEGATELLI; TARLEY, 2016; QI *et al.*, 2010), resultando em muitas vantagens para preparo de amostras complexas, principalmente as biológicas, gerando maior confiabilidade nos resultados, exclusão de aproximadamente 100% das macromoléculas presentes na amostra, possibilidade de reuso e menor tempo experimental (BARBOSA *et al.*, 2015; DE LIMA *et al.*, 2016).

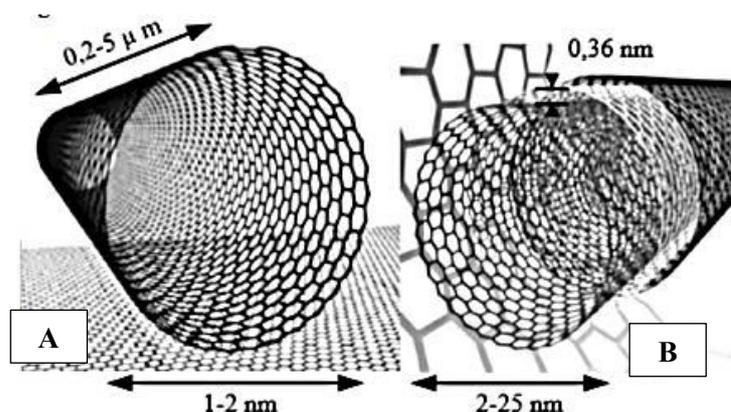
A utilização dos RAMs neste trabalho se justifica pela complexidade da matriz estudada, o caldo de fermentação do endófito *Lasiodiplodia sp.* Esta matriz apresenta uma concentração significativa de peptídeos e proteínas que podem ser adsorvidos na superfície do material extrator e prejudicar a extração dos analitos orgânicos de baixo peso molecular.

### 2.3.1 Nanotubos de carbono de acesso restrito

Os CNTs têm se destacado, por sua estrutura e propriedades únicas que incluem grande área superficial e funcionalidades químicas de superfície (TAN, 2015). Inicialmente as pesquisas relacionadas aos CNTs foram propostas, por Sumio Iijima que descreveu suas estruturas como cilíndricas e ocas, compostas por uma camada circular de carbonos ligados entre si em configuração  $sp^2$  e que possuem distintas propriedades, se comparados a outros materiais (IIJIMA, 1991).

Os CNTs possuem duas classificações: a de paredes simples e de paredes múltiplas. No primeiro caso SWCNTs, originado do inglês *Single-Walled Carbon Nanotubes* possui uma única folha de grafite enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico; já no segundo, os MWCNTs (do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*), um conjunto de CNTs concêntricos (HERBST, 2004), suas estruturas podem ser visualizadas na figura 7A e 7B respectivamente.

Figura 7 - Estrutura de SWCNT e de MWCNT



Fonte: GOMES, 2016.

Dentre as possíveis aplicações dos CNTs, considerada uma das mais importantes na química analítica, pode-se destacar seu uso na SPE, por estes possuírem um alto potencial como sorventes (DUTRA, 2014). A alta capacidade de adsorção dos CNTs comerciais, como sua baixa seletividade, podem levar à sorção de todos os componentes da matriz. Por exemplo, quando os CNTs são usados no processo de extração de amostras biológicas, as proteínas podem ser retidas, diminuindo a eficiência de extração dos analitos, por causa da obstrução dos sítios de ligação.

Para solucionar esse problema, foram desenvolvidos os nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs), que são capazes de reter moléculas ou íons de baixo peso molecular, excluindo, simultaneamente, as macromoléculas da amostra (BARBOSA *et al.*, 2015). Este sorvente foi obtido através do revestimento de CNTs comerciais com albumina sérica bovina (BSA), posteriormente reticulada por glutaraldeído. Essa camada externa de BSA evita a ligação de proteínas proveniente de fluidos biológicos, quando o pH da amostra se encontra maior que o ponto isoelétrico das proteínas (FARIA *et al.*, 2017).

Como exemplo da aplicação dos RACNTs, tem-se o estudo realizado por Cruz *et al.* (2020), que utilizou o material como uma fase estacionária seletiva para micro extração por sorvente compactado (MEPS), com intuito de determinar antipsicóticos (clorpromazina, clozapina, olanzapina e quetiapina) em amostras de plasma não tratadas de pacientes esquizofrênicos, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS). O método desenvolvido apresentou uma alta eficácia para determinação dos fármacos em questão e potencial para biomonitoramento de pacientes esquizofrênicos.

O trabalho realizado por Faria *et al.* (2017) utilizou os RACNTs para determinar 5 drogas anti-hipertensivas de diferentes classes farmacológicas e alguns de seus metabólitos em soro humano. As amostras não tratadas foram injetadas diretamente em um sistema de cromatografia líquida bidimensional usando uma coluna de extração empacotada com nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs). O método validado apresentou uma alta eficiência para análise de amostras de soro humano de pacientes em tratamento com drogas anti-hipertensivas, sendo útil para estudos farmacometabólicos, farmacogenômicos e farmacocinéticos.

Apesar do uso eficiente do RACNTs na SPE convencional, algumas alterações podem ser realizadas para facilitar sua utilização no preparo de amostras. A associação de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com RACNTs é um bom exemplo. Após a modificação, obtém-se os nanotubos de carbono magnéticos de acesso restrito (M-RACNTs), que adquirem características magnéticas suficientes para serem usados na SPE dispersiva magnética, em que se utiliza um ímã para remover o material das amostras (ALIMOHAMMADI; SEDIGHI; JABBARI, 2017). A extração em fase sólida magnética dispersiva (DMSPE, do inglês *Dispersive Magnetic Solid Phase Extraction*), foi utilizada pela primeira vez em 1999 para fins analíticos, por Safarikova e Safarik. No processo de DMSPE, o adsorvente é disperso na amostra, por meio agitação e os analitos ficam retidos no material.

Após etapa de adsorção e com auxílio de um ímã, o material contendo o analito adsorvido é separado do restante da solução e é agitado novamente na presença de um pequeno volume de eluente. Novamente com o auxílio de um ímã (campo magnético) as partículas são separadas da solução do eluente e este é utilizado para determinação do analito, empregando técnicas analíticas instrumentais. A principal vantagem da DMSPE, em comparação com a SPE convencional, é a maior interação entre o sorvente e a amostra, resultando em uma maior eficiência de extração. Além disso, o uso de um ímã para remoção do sorvente da matriz é uma estratégia muito simples e eficiente, pois evita problemas frequentes, como exemplo, o bloqueio de cartuchos, comumente enfrentados na SPE convencional.

O estudo realizado por Lago *et al.* (2020) utilizou a extração em fase sólida magnética dispersiva para extrair organofosforados de amostras comerciais de leite bovino, utilizando como sorvente os M-RACNTs. Os organofosforados extraídos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. O método foi eficiente e com ele foi possível analisar amostras comerciais de leite.

Em um outro trabalho, os M-RACNTs foram usados para extração de Cu e Zn da superóxido dismutase de Cu, Zn (Cu, Zn-SOD), por meio da DMSPE, para obtenção da apoproteína. O material foi capaz de extrair cerca 64 e 62% de Cu e Zn, respectivamente, de 0,140 mol/L da solução aquosa de Cu, Zn-SOD, com apenas uma extração. A superóxido dismutase perdeu cerca de 15% de sua atividade quando Cu e o Zn foram removidos, mas a atividade foi totalmente recuperada quando estes foram reincorporados à estrutura da enzima por adição de uma solução aquosa de ambos os metais. Os autores concluíram que os M-RACNTs são sorventes promissores para obter apoproteínas de metaloproteínas em aplicações biotecnológicas (BALDUINO *et al.*, 2019).

O presente trabalho utiliza os nanotubos de carbono magnéticos de acesso restrito (M-RACNTs), pois esse material possui uma alta capacidade de pré-concentração e exclusão de macromoléculas, auxiliando na purificação e preparo de amostras complexas como o caldo de fermentação de fungos endofíticos. Além disso, este adsorvente por possuir caráter magnético, apresenta praticidade e traz maior dinamismo ao processo de extração. A extração em fase sólida dispersiva magnética traz consigo inúmeras vantagens, como o contato total do sorvente com a amostra e a garantia de uma maior recuperação dos analitos.

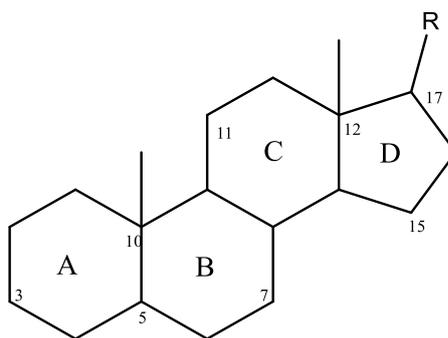
## 2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS

A espectrometria de massas (MS), vem do inglês, *mass spectrometry*, sendo uma técnica analítica que possibilita a identificação e quantificação de uma ampla variedade de compostos (SILVA, 2018). Os primeiros estudos foram realizados por J. J. Thomson por meio das medidas de massa dos elétrons, desde então a MS vem sendo desenvolvida e aprimorada, possibilitando a análise de misturas complexas e analitos considerados minoritários nas amostras (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

A análise por MS, basicamente se consiste na geração ou transferência de íons, por uma fonte de ionização e na separação dos íons pela diferença de razões massa/carga ( $m/z$ ) em um analisador de massas, em seguida ocorre a detecção dos íons, por meio de um detector (GROSS, 2017). A espectrometria de massas pode ser utilizada na quantificação de analitos conhecidos. O espectro de massas frequentemente está associado a outras técnicas, sendo uma delas a cromatografia, seja líquida ou gasosa (VOGEL, 2002).

Os produtos naturais, como por exemplo aqueles oriundos da fermentação de fungos endofíticos, geralmente possuem compostos da classe dos esteroides. A espectrometria de massas, em combinação com a cromatografia gasosa, mostrou ser uma ferramenta eficiente e comumente utilizada para a identificação dessa classe (SANTANA,2011). Os principais picos encontrados em espectros de massas dos esteroides são referentes às clivagens comuns do esqueleto principal (figura 8), como a perda do radical metila. Esse fragmento por si só ou junto com outras clivagens da molécula, é característico de todos os esteroides (FRIEDLAND *et al.*, 1959).

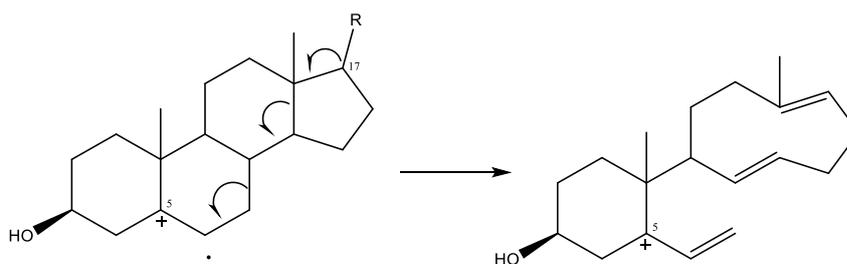
Figura 8 - Esqueleto esteroidal



Fonte: SANTANA, 2011.

Para compostos que possuem um grupo OH na posição 3, os espectros invariavelmente apresentam um pico referente à perda de água a partir do íon molecular (FRIEDLAND *et al.*, 1959). Também é muito comum ocorrer a perda da cadeia lateral. Essa perda do substituinte no carbono C-17, pode ocorrer por si só ou acompanhado da perda de água e/ou de metila. A intensidade do pico desta fragmentação, pode variar entre os compostos, sendo esta, favorecida quando possuímos a presença de uma dupla ligação no carbono C-5, aumentando sua intensidade relativa (figura 9) (WYLLIE *et al.*, 1997).

Figura 9 - Formação do fragmento referente à perda da cadeia lateral



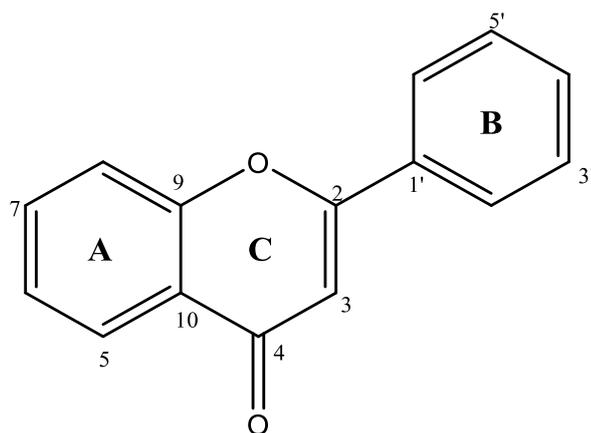
Fonte: SANTANA, 2011.

Outras classes de compostos muito encontradas em fungos endofíticos, são os ácidos graxos, como exemplo, tem-se os ácidos oleico, linoleico e linolênico, respectivamente. Seus espectros de massas podem ser facilmente identificados por meio de alguns tipos resultantes de fragmentos básicos (KEEN; HAMMING, 1971). Os quatro principais fragmentos são:

1. O íon molecular  $M^+$  detectável.
2. O pico do cátion acílio ( $RC=O^+$ ) resultando assim na quebra da ligação  $\alpha$  entre o carbono da carbonila e o oxigênio do radical alcoila.
3. O pico correspondente ao rearranjo de McLafferty para ésteres contendo hidrogênio  $\gamma$  na cadeia acila.
4. O pico intenso correspondente ao íon  $[CH_2=CHCOHOR]^+$ , cujo valor de  $m/z$  é 13 unidades superior ao pico obtido pelo rearranjo de McLafferty.

Nessa matriz também pode-se encontrar compostos das classes das flavonas que são flavonoides que possuem dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico de três carbonos formados via ciclização com um átomo de oxigênio de um dos anéis aromáticos. O anel heterocíclico é denominado C e os dois anéis aromáticos são A e B (Figura 10), sendo a numeração iniciada pelo anel C em direção ao anel A. Uma segunda numeração é utilizada para o anel B. Todas as flavonas apresentam um grupo ceto na posição 4 e uma insaturação entre os carbonos 2 e 3 do anel heterocíclico (HARBONE *et al.*, 1975; MANN, 1986).

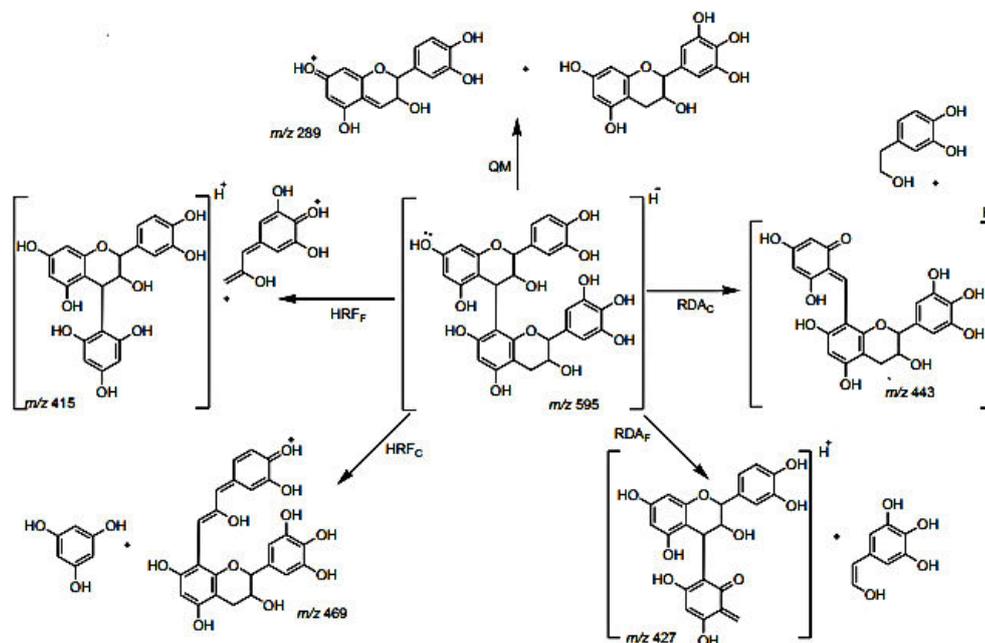
Figura 10 - Esqueleto básico das flavonas



Fonte: SANTANA, 2011.

A partir dos resultados já obtidos de flavonas, como exemplo, a flavan-3-ol do tipo A, foram observados três principais mecanismo de fragmentação: retro-Diels-Alder (RDA), formação de quinona metídeo (QM) e clivagem heterocíclica do anel C (HRF - *heterocyclic ring fission*), além de desidratações e outras perdas (Figura 11) (GU *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2007; SARNOSKI *et al.*, 2012).

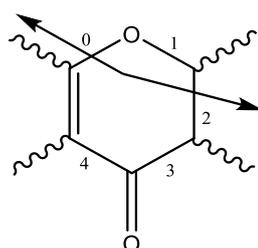
Figura 11 - Proposta da via mecanística de fragmentação de (E)Gal-(E)Cat ( $m/z$  595) a partir de EM/EM, em modo positivo.



Fonte: NETO, 2014.

A reação de Retro-Diels-Alder é considerada uma reação muito importante na fragmentação de flavona. Enquanto os fragmentos obtidos por RDA são especialmente importantes para a caracterização estrutural de agliconas e a parte das flavonas conjugada. Como forma de simplificar as discussões sobre as fragmentações das agliconas, Ma *et al.* (1997) escreveram uma nomenclatura para descrevê-los de modo inequívoco. Um dos fragmentos relatados por eles é a ruptura das ligações 0 e 2 (Figura 12) ocorre geralmente quando analisado no modo positivo, sendo o mecanismo de fragmentação do anel C mais comum.

Figura 12 - Ruptura do anel C das ligações 0 e 2.

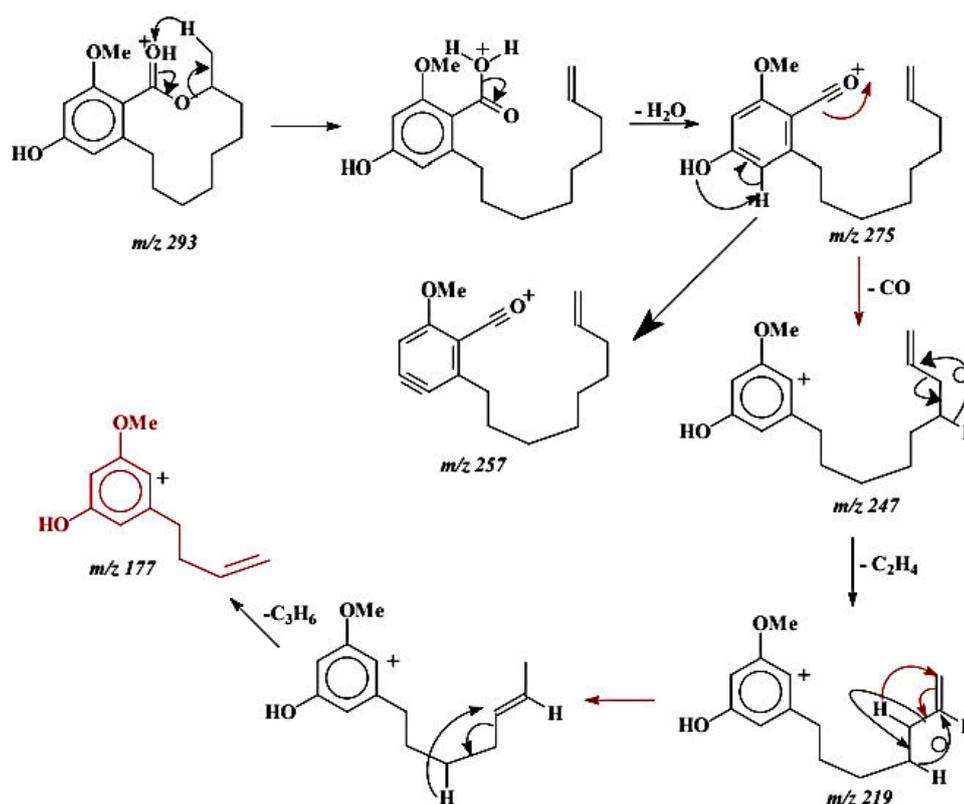


Fonte: SANTANA, 2011.

Outra fragmentação também muito encontrada tanto no modo positivo quanto no negativo é a perda de CO e H<sub>2</sub>O. Por meio do GC-MS é possível a identificação de flavonas voláteis, que também apresentam esses fragmentos característicos, encontrados quando analisadas por LC-MS.

Outro composto frequentemente encontrado em fungos da família *Lasioidiplodia* é a lasiodiplodina (SENHUA *et al.*, 2015). Segundo a literatura (DEWICK, 2009), esse composto é derivado do acetato e mevalonato, sendo assim, espera-se no espectro de massas um pico, referente a clivagem do anel na carbonila terminal, liberando assim uma molécula de água, resultando no pico de razão *m/z* 275. Outras fragmentações muito encontradas, são representadas na figura abaixo:

Figura 13 - Proposta de fragmentação de Lasioplodina



Fonte: SILVA, 2007

Outra classe de compostos muito encontrada nessas matrizes são os hidrocarbonetos, sendo eles subdivididos em alcanos, alcenos e alcinos. Os espectros de massa de alcanos são caracterizados por apresentarem picos íon-moleculares fortes e uma série regular de picos de íon fragmento separados por 14 u.m.a, enquanto os alcenos devem possuir uma fórmula molecular com um índice de deficiência de hidrogênio igual a pelo menos um, sendo que geralmente ocorre a remoção de um dos elétrons da ligação  $\pi$ , não perturbado o esqueleto de carbonos. Quando eles sofrem os processos de fragmentação, resultam em íons fragmentos de fórmulas  $C_nH_{2n}^*$  e  $C_nH_{2n-1}^*$ . Já os alcinos possuem os espectros de massas muito semelhantes aos dos alcenos (PAVIA *et al.*, 2010).

Além de trabalhos na literatura que fornecem os espectros de massas, há também disponíveis bases de dados gratuitas e particulares que disponibilizam essas informações. Dentre elas, duas são atualmente muito utilizadas. A primeira é base de dados é a NIST (*National Institute of Standards and Technology*), que é uma biblioteca de espectros de massas à qual os espectros obtidos experimentalmente são comparados. A segunda é a MassBank, que foi o primeiro repositório público de espectros de massa de compostos

com massa inferior a 300 Da. O banco de dados é constituído de 1018 espectros obtidos por GC-MS. O MassBank é um banco de dados que está sempre crescendo, pois, cada grupo de pesquisa fornece dados de seus próprios servidores distribuídos na Internet.

Os espectros de massas obtidos por meio do equipamento GC-MS, podem ser comparados tanto com dados obtidos em trabalhos anteriores, quanto com aqueles disponibilizados pelas bases de dados, pois a técnica de ionização utilizada é a mesma, impacto de elétrons. Esta técnica possui diversas vantagens na espectrometria de massas de pequenas moléculas orgânicas, pois não é cara e é robusto. Outra vantagem é a obtenção de um padrão de fragmentação reprodutível, pois a fragmentação ocorre sempre com uma energia de 70eV. Isso possibilita a comparação do espectro de massas de um composto da amostra com milhares das bases de dados em questão de segundos, usando apenas um computador, simplificando o processo de determinação ou de confirmação de identidade de um composto (PAVIA *et al.*, 2010).

Outro equipamento também muito utilizado é o LC-MS/MS, sendo que, este possibilita a análise de diversas substâncias com ampla caracterização de polaridade e massa molecular. Essa técnica possibilita analisar compostos não voláteis, polares e frequentemente de alta massa molecular, o que não é possível quando se utiliza um GC-MS.

Nesta técnica é preciso que fase móvel dissolva a amostra sem qualquer interação química. A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado além de possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra, geralmente os três solventes mais utilizados são a água, metanol e acetonitrila. O ionizador mais utilizado nesses equipamentos é o electrospray (ESI) que se baseia no processo de transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa. (BITTENCOURT, 2015). O analisador do tipo triplo quadrupolo, comumente utilizado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, permite fragmentar moléculas com diferentes energias de colisão.

Para auxiliar na análise dos dados qualitativos obtidos por LC-MS/MS, foram criadas plataformas, como a *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), que possibilita a análise de dados brutos pela comparação com aqueles disponíveis na biblioteca espectral de referência, sendo esta alimentada por toda a comunidade científica e livremente compartilhada. Portanto o processo de identificação de substâncias conhecidas e de novos possíveis metabolitos é facilitado, além de permitir a geração das Redes Moleculares (RM), que possibilita a junção de íons percursores, que

possivelmente possuam semelhança estrutural, ou são constituintes da mesma classe de compostos (WANG *et al.*, 2016).

## 2.5 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

A quimiometria é geralmente conhecida na comunidade científica como uma ferramenta estatística que utiliza métodos matemáticos e estatísticos, com o intuito de planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada, disponibilizando ferramentas para o processamento dos dados químicos analisados, com a finalidade de obter o máximo de informação química com a análise dos dados adquiridos (FERREIRA *et al.*, 1999). Com auxílio dela é possível realizar a otimização e o planejamento de ensaios experimentais de tal maneira que conseguimos extrair várias informações, utilizando um pequeno número de experimentos estatisticamente significativos (MA *et al.*, 2015).

Na otimização de metodologias, o mais comum é realizar um processo univariado, visando avaliar uma determinada condição. No entanto, esta abordagem possui dois principais problemas, o primeiro é a obtenção de possíveis pontos de máximo local, onde uma condição considerada ótima, pode ser uma consideração errônea, pois não se leva em consideração as interações de ordem maior. A segunda dificuldade é o alto custo envolvido na realização de todos os estudos independentes (ELLISON; BARWICK; FARRANT, 2009).

Desta forma, os planejamentos multivariados foram criados para serem utilizados como uma ferramenta que auxilia tanto na determinação das interações consideradas de ordem maior quanto na redução de tempo experimental e custo (OLIVEIRA, 2016). Para a realização de planejamento multivariado são utilizadas matrizes pré-definidas com condições de análise e números de experimentos. Em geral, atribuem-se às colunas as diferentes variáveis estudadas e às linhas os experimentos realizados (MORGAN; BURTON; CHURCH, 1989).

Para a realização de um planejamento completo é necessário a utilização de um número de experimentos igual ao produto do número de variáveis de cada fator utilizado. Por exemplo, para um experimento onde a primeira variável envolve 3 condições, a segunda 4 e a terceira 2, são necessários 24 experimentos. O cálculo utilizado para verificar o número de experimentos necessários é a multiplicação do número de condições para cada variável estudada (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Como exemplo da utilização do planejamento multivariado para a otimização do processo de extração de caldo de fermentação de fungos endofíticos, há o estudo desenvolvido por Oliveira (2017) que realizou a otimização das condições de Microextração em sorvente empacotado por *headspace* (HS-MEFS) para extração de compostos voláteis oriundos do caldo de fermentação de fungos da família *Botryosphaeriaceae*. Para a otimização, os autores utilizaram um planejamento experimental  $2^2$ , com duas variáveis quantitativas, sendo elas, temperatura e tempo de extração, em dois níveis (50 e 60 °C; 10 e 30 min). Todos os experimentos foram realizados em duplicata, apenas o ponto central (55 °C e 20 min) foi feito em triplicata. Foram realizados no total 11 experimentos e os dados foram analisados no programa Quality Tools: Statistics in Quality Science. O estudo mostrou que a temperatura é bastante significativa, sendo mais importante do que o tempo de extração e quando analisadas suas interações, percebeu-se que as variáveis são independentes. Portanto, os autores determinaram como condição ótima à temperatura de 60 °C e o tempo de extração de 30 min. Essa metodologia utilizada além de contribuir para a redução do tempo experimental e custos, possibilitou a extração de todas as informações necessárias, permitindo a otimização do processo de extração.

Selegato (2019) estudou estratégias biológicas e analíticas para o aumento da identificação e detecção de analitos orgânicos produzidos por fungos associados às plantas, utilizando LC-MS e RMN. Para a análise inicial os extratos foram submetidos à análise por LC-MS. A otimização do método foi realizada utilizando uma variação sistemática dos parâmetros cromatográficos, por meio do planejamento multivariado. Foram estudadas três variáveis em dois níveis distintos, sendo elas, vazão da fase móvel, presença de aditivos ácidos e tempo de gradiente de solvente orgânico. O melhor procedimento foi escolhido com base no maior número de picos detectados. O estudo mostrou uma alta eficiência, possibilitando a identificação de muitos compostos, além da redução do tempo experimental.

Existem diferentes planejamentos multivariados, como exemplo: o planejamento fatorial completo, o fracionário e planejamentos para geração de modelos de regressão constituídos por matrizes do tipo Doehlert e Box-Behnken. As vantagens em se utilizar planejamento fatorial são inquestionáveis, e são resumidas abaixo:

1. A utilização de um número reduzido de experimentos, quando comparamos com planejamentos univariáveis utilizados;
2. Economia de recursos financeiros;

3. Possibilita a obtenção de resultados mais confiáveis tanto quimicamente, quanto estatisticamente;

4. Possibilita a obtenção de um modelo matemático, permitindo a previsões de condições que não foram testadas;

O planejamento fatorial é dividido entre completo e fracionário. O planejamento fatorial completo tem o objetivo identificar quais fatores tem a influência ou não sobre a resposta, sendo que estes fatores são variáveis independentes (LUNDSTEDT *et al.*, 1998). O planejamento fatorial completo é descrito por  $2^k$ , sendo assim, o número de experimento aumenta rapidamente com o valor de k (número de fatores investigados). Como exemplo, se um planejamento fatorial completo com sete fatores precisasse ser utilizado ( $2^7$ ) seria necessário realizar 128 experimentos, o que resultaria em um aumento no tempo experimental e nos gastos de reagentes. Quando há muitas variáveis, a informação desejada pode ser obtida a partir de um número de ensaios bem menor, correspondente de apenas uma fração do número de experimentos necessários. Segundo Neto, Scarminio e Bruns (2001) isto é possível por dois motivos:

1. Os efeitos principais, ou seja, de primeira ordem tendem a ser maiores que as interações de segunda ordem, que geralmente são maiores que os de terceira ordem e assim por diante. Como essa tendência se acentua para efeitos de ordem maiores, esses efeitos não são significativos, sendo assim, não restam motivos para fazer todos os experimentos de um planejamento fatorial completo.
2. Quando o número de fatores aumenta, aumentam as chances de que um ou mais efeitos não afetem significativamente a resposta, tanto os efeitos principais quanto os de interações, sendo assim, novamente seria desnecessário a análises dessas variáveis por meio de todos os experimentos de um planejamento fatorial completo.

Assim, em situações em que não se conhece a relação completa de todas as variáveis que afetam significativamente a resposta esperada, o ideal é estudar o maior número de variáveis possíveis, impossibilitando a exclusão de fatores que pode vir a ser importantes. Para que isso seja possível sem aumentar o número de experimentos, foi criado o planejamento fatorial fracionário, que utiliza apenas um subconjunto ou “fração” selecionada dos experimentos que estão incluídos em um planejamento fatorial completo. Portanto, é um tipo de planejamento ideal para ser realizado quando os recursos são limitados ou quando 4 ou mais variáveis precisam ser avaliadas (ALVAREZ, 2018).

Vários estudos realizados comprovaram que tanto o planejamento fatorial completo, quanto o fracionário, levam a resultados bem próximos. No estudo desenvolvido por Kechagias *et al.*, 2017, os autores comparam o planejamento fatorial completo e o fracionário para a otimização do método de precisão das forças de corte no torneamento de uma liga de Titânio. Em ambos os planejamentos foram estudadas três variáveis, sendo que no completo realizou-se 27 experimentos e no fracionário apenas 9. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que o uso de planejamento fatorial fracionário para análise da força de corte em o torneamento de ligas de titânio levou a resultados bastante precisos. As análises obtidas pela ANOM dos dois métodos mostrou as mesmas tendências de níveis de parâmetros e as análises obtidas pela ANOVA resultaram nos mesmos resultados. Sendo assim, os autores concluíram que apenas o planejamento fatorial fracionário seria suficiente para a otimização realizada, reduzindo o tempo experimental.

No presente trabalho optou-se por utilizar apenas o planejamento fatorial fracionário, pois além da eficiência já relatada na literatura foi possível a reduzir o número de experimentos, ocasionando menor gasto de solventes orgânicos, CNTs, dentre outros reagentes utilizados na pesquisa.

### **2.5.1 Planejamento fatorial fracionário**

O planejamento fatorial fracionário é uma das contribuições estatísticas mais importantes para a exploração eficiente das variáveis de diferentes fatores controláveis em uma resposta de interesse. Este planejamento é amplamente utilizado em experimentos em campos tão diversos quanto agricultura, indústria, pesquisa médica, entre outros (GUNST; MASON, 2009).

Neste planejamento é possível avaliar preliminarmente os fatores com uma significativa redução do trabalho experimental. Ele viabiliza informações da influência das variáveis nos processos, no entanto, possui a desvantagem que os efeitos principais dessas variáveis podem ser confundidos com os efeitos das interações de outros fatores. Portanto, a análise dos resultados obtidos geralmente é realizada considerando que os efeitos das variáveis principais, ou seja, de primeira ordem, são quase sempre maiores que os efeitos de segunda ordem (FERREIRA, 2015).

O número de experimentos necessários para o planejamento fatorial fracionário é definido pela expressão  $n = 2^{K-x}$  sendo que, (n) é o número de experimentos, (K) o número

de variáveis investigadas e (x) referente à redução de experimentos. Como exemplo, o planejamento mais utilizado e mais simples é o  $2^{3-1}$ , que envolve três variáveis, sendo estas denominadas como A, B e C, resultando em quatro experimentos (FERREIRA, 2015). A fração meia, como é denominado a matriz construída, está apresentada na tabela abaixo:

Tabela 1 - Matriz de planejamento fracionário  $2^{3-1}$

<b>Experimentos</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>AB</b>	<b>AC</b>	<b>BC</b>	<b>ABC</b>
<b>1</b>	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
<b>2</b>	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
<b>3</b>	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
<b>4</b>	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1

Fonte: FERREIRA, 2015

Para a construção da meia fração primeiro deve-se construir um planejamento fatorial  $2^2$  completo para as variáveis A e B, enquanto os níveis para a variável C são obtidos pelo produto das colunas das variáveis A e B. Como esse planejamento vem apresentando uma alta eficiência, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com esse método. O estudo desenvolvido por Prata *et al.*, (2019) usou este planejamento para otimizar os parâmetros de extração utilizando microextração por sorvente empacotado, possibilitando a otimização de 5 variáveis, que juntamente com a metodologia de superfície de resposta, permitiu a obtenção de um método eficiente e vantajoso para a análise de amostras de sangue para a determinação simultânea de morfina, codeína e 6-monoacetilmorfina.

Em outro trabalho, um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , composto por 12 experimentos, foi usado para verificar a influência dos parâmetros operacionais na aplicação da eletrocoagulação para o tratamento de efluentes cosméticos. Os resultados possibilitaram a obtenção de uma condição muito vantajosa para o tratamento desses efluentes, possibilitando a redução do tempo e gastos (TONES *et al.*, 2020). Sendo assim, acreditando-se na eficiência desse planejamento, decidiu-se aplicá-lo na otimização do método de extração proposto neste estudo, com intuito de reduzir o tempo experimental e custos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova metodologia rápida e simples, para separação de compostos orgânicos bioativos provenientes do caldo de fermentação dos endófitos *Lasiodiplodia sp.* por meio da utilização de M-RACNTs.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

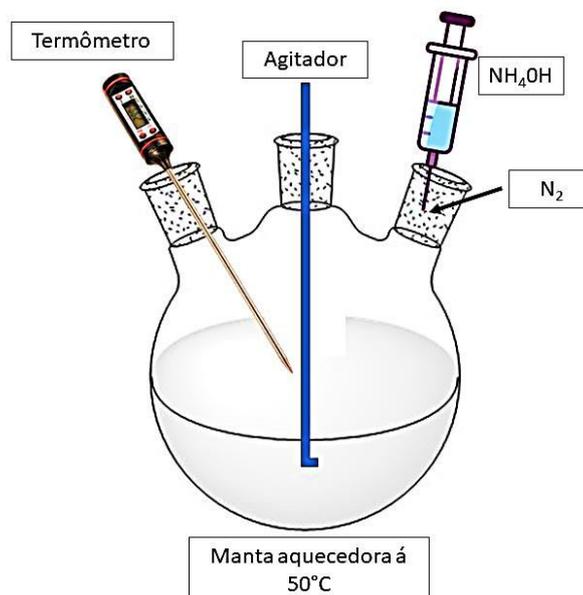
- a) Sintetizar os nanotubos de carbono magnéticos e revesti-los com albumina sérica bovina; dando origem aos M-RACNTs;
- b) Caracterizar os M-RACNTs, por meio de espectroscopia no infravermelho, termogravimetria e potencial zeta;
- c) Avaliar o desempenho dos materiais de acesso restrito obtidos na extração de compostos orgânicos bioativos provenientes do caldo de fermentação do endófito *Lasiodiplodia sp.* por meio de técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas;
- d) Atribuir uma possível identidade aos compostos extraídos;
- e) Otimizar as condições para extração de alguns compostos voláteis e não voláteis;
- f) Realizar o MIC dos extratos brutos obtidos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 SÍNTESE DOS NANOTUBOS DE CARBONO MAGNÉTICO DE ACESSO RESTRITO

Os M-CNTs foram preparados pelo método de co-precipitação química (figura 14) de acordo com a metodologia Qu *et al.* (2007), com algumas modificações. Para tal, 300mL de uma solução de  $0,031\text{mol L}^{-1}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $0,063\text{mol L}^{-1}$   $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  foi aquecida até  $50^\circ\text{C}$ . A mistura foi mantida em agitação por 5 min. Sequencialmente, foram adicionados 250 mg de CNTs de paredes múltiplas e a suspensão foi mantida a  $50^\circ\text{C}$ , em atmosfera de nitrogênio, sob agitação, por 10 min. Posteriormente, 2,5mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  28-30% (m/m) foram adicionados ao balão, gota a gota. O material obtido foi lavado com água e etanol até pH neutro e seco durante 12 h a  $60^\circ\text{C}$  sob vácuo. Este material foi denominado M-CNTs.

Figura 14 - Esquema generalizado para a síntese dos M-CNTs.



Fonte: Autor

Os M-CNTs foram recobertos com BSA de acordo com o protocolo descrito por Barbosa *et al.* (2015). Primeiro, 20 mL de uma solução tampão de fosfato de BSA a 1% (m/v) ( $50\text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 6,0$ ) e 5 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído a 25% (v/v) foram percolados através de um cartucho contendo 500 mg de M-CNTs. O material foi mantido em contato com a solução de glutaraldeído durante 5 h. Depois, 10 mL de

solução aquosa a 1% (m/v) de  $\text{NaBH}_4$  foram escoados através do cartucho. Os M-RACNTs obtidos foram então lavados com 100 mL de água e secos a  $60^\circ\text{C}$  por 12 h.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO MAGNÉTICOS

### 4.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier

As análises no infravermelho foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho de transformada de Fourier - FT-IR (modelo 8400S, Shimadzu®, Tóquio, Japão), com resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$ , localizado no Laboratório Interdisciplinar de Química (LabIQ), UNIFAL-MG, usando pastilha de KBr. A pastilha foi construída utilizando-se 2,0 mg de material (CNTs, M-CNTs e M-RACNTs) e 100,0 mg de KBr, sendo esta mistura homogeneizada e seca em estufa a  $60^\circ\text{C}$  por 24 h. As análises foram realizadas monitorando-se a faixa de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  (32 scans).

### 4.2.2 Potencial zeta

Nas análises de potencial zeta, foram utilizadas suspensões dos materiais CNTs, M-CNTs e M-RACNTs na concentração de  $5\text{mg mL}^{-1}$  em água mili-Q. As suspensões foram mantidas em ultrassom por 30 min, antes das análises, para melhorar a dispersão. Em seguida, 0,2 mL dessa suspensão, foram adicionadas a um volume de 10 mL de soluções tampão fosfato  $0,020\text{ mol L}^{-1}$ , variando o pH de 3 a 10. Efetuou-se a medida do potencial zeta de cada solução utilizando um analisador de partículas Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), localizado no laboratório de Pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármacos (Unifal-MG).

### 4.2.3 Análise termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram efetuadas em um analisador termogravimétrico modelo SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, EUA), localizado no Laboratório Interdisciplinar de Química (LabIQ). Aproximadamente 2 mg das amostras (colocadas em cadinho aberto) foram submetidas a uma variação de temperatura de 25 a 1000°C, sob fluxo de nitrogênio de 100mL min<sup>-1</sup>. A massa das amostras foi continuamente mensurada em função da taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. Com os resultados obtidos, curvas de decaimento de massa e curvas da primeira derivada (DTG) (μg min<sup>-1</sup>) em função da temperatura puderam ser construídas.

### 4.3 OBTENÇÃO DO CALDO DE FERMENTAÇÃO DO FUNGO *LASIODIPLODIA SP.*

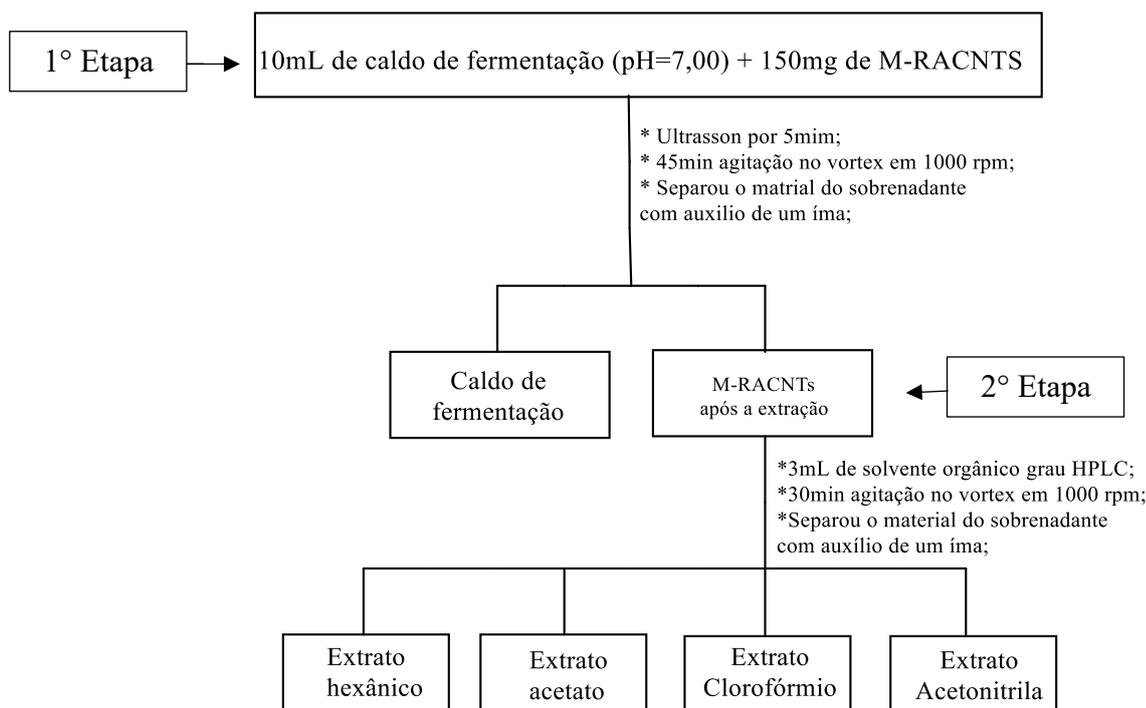
O fungo endofítico usado na pesquisa foi isolado e classificado em trabalhos anteriores. O isolamento foi realizado a partir de folhas saudáveis de *Handroanthus impetiginosus*, segundo a metodologia específica para o isolamento deste tipo de microorganismos, realizado por Araújo *et al.*, (2010). A classificação do mesmo foi realizada por análise sequencial do DNA e inferência filogenética, resultando na identificação de *Lasiodiplodia sp.* (AGOSTINI, 2016).

O fungo isolado foi repicado no meio ágar batata dextrose e incubado durante sete dias em uma caixa de isopor a temperatura ambiente. Após o crescimento, os micélios do fungo foram repicados em dois fragmentos e inoculados em 8 erlenmeyers de 1L contendo 150mL de caldo Czapek como meio de fermentação (glicose 30.0g, NaNO<sub>3</sub> 2.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5g, KCl 0.5g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.01g, extrato de levedura 1.0g colocados em 1000mL de água destilada), que foram incubados à temperatura ambiente durante 21 dias de forma estática. Este processo foi realizado duas vezes, ou seja, duas fermentações foram realizadas com a finalidade de se obter volume de caldo suficiente para o desenvolvimento do trabalho. Após o período de fermentação, o meio de cultura foi filtrado a vácuo para remoção do micélio.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DO CALDO DE FERMENTAÇÃO *LASIODIPLODIA SP.*

Após a obtenção do caldo de fermentação, este foi filtrado novamente em membrana de celulose e o pH foi ajustado a 7, utilizando soluções de HCl 3 molL<sup>-1</sup> e NaOH 1,3 molL<sup>-1</sup>. O processo de extração utilizado está representado na figura abaixo.

Figura 15 - Fluxograma do processo de extração do caldo de fermentação.



Fonte: Autor.

Primeiro uma alíquota de 10 mL do caldo de fermentação, com pH 7,00, foram dispersados 150 mg de M-RACNTs, em um tubo de ensaio. Em seguida, os tubos de ensaio foram mantidos em banho ultrassônico por 5 min, para uma melhor dispersão do sorvente. Após, as amostras foram agitadas por 45 min em um agitador vórtex a uma velocidade de 1000 rpm, com o intuito de garantir o contato total do material com a matriz, facilitando o processo de extração

Em seguida, com o auxílio de um ímã, os M-RACNTs foram recolhidos e o caldo de fermentação separado. Adicionou-se ao tubo de ensaio contendo o adsorvente 3 mL de solvente orgânico (acetonitrila, ou clorofórmio, ou hexano, ou acetato de etila). Os tubos foram agitados por 30 min no agitador vórtex (1000 rpm). Foram realizadas mais duas extrações consecutivas seguindo o mesmo procedimento. Todos os extratos foram

secos a 30 °C, para evitar a volatilização dos compostos extraídos, ressuspensos em 500 µL do mesmo solvente usado na extração e analisados por GC-MS e LC-MS/MS.

O processo de extração foi realizado separadamente, com os 4 solventes orgânicos utilizados, sendo eles: acetonitrila, clorofórmio, hexano e acetato de etila. Esses solventes foram escolhidos com o intuito de se obter 4 extratos com analitos distintos. Após o processo de extração obteve-se 4 extratos, o extrato hexânico, acetato, clorofórmio e acetonitrila. A segunda etapa de extração (Figura 16), foi realizada três vezes com cada solvente separadamente, obtendo-se assim 3 frações de cada solvente, com o intuito de se analisar um ciclo de extração, após as análises os extratos foram juntados, obtendo assim, as seguintes massas:

Tabela 2 - Massa dos extratos obtidos de cada solvente extrator utilizado.

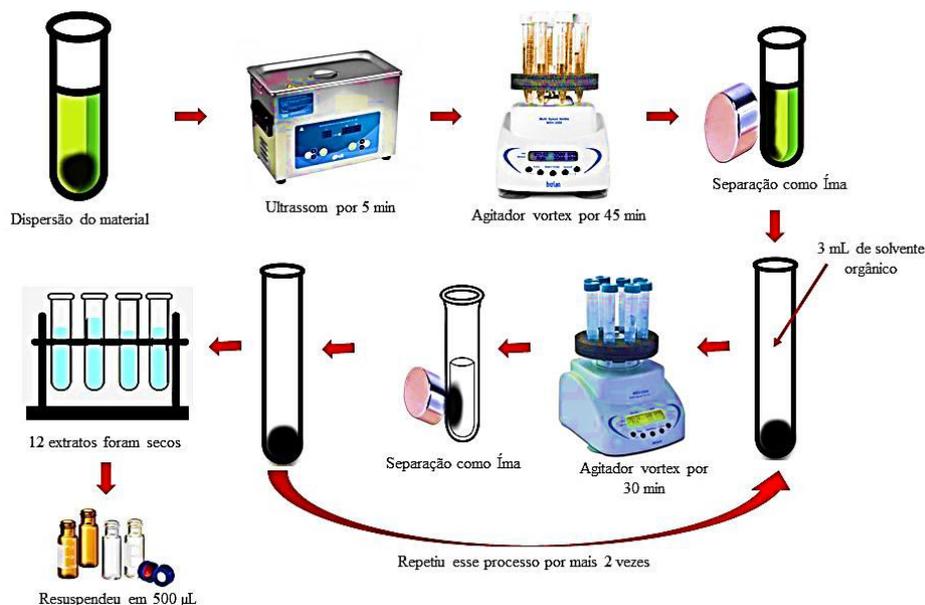
<b>Extratos Brutos</b>	
Acetonitrila	1,4mg
Acetato de Etila	1,4mg
Hexano	4,4mg
Clorofórmio	3,8mg

Fonte: Autor.

Também foram realizadas extrações para o branco de cada solvente separadamente, contendo apenas o M-RACNTs e 10 mL do solvente orgânico.

O esquema do processo de extração está representado na figura 16.

Figura 16 - Esquema do processo de extração realizados com o caldo de fermentação *Lasiodiplodia* sp.



Fonte: Autor

#### 4.5 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM)

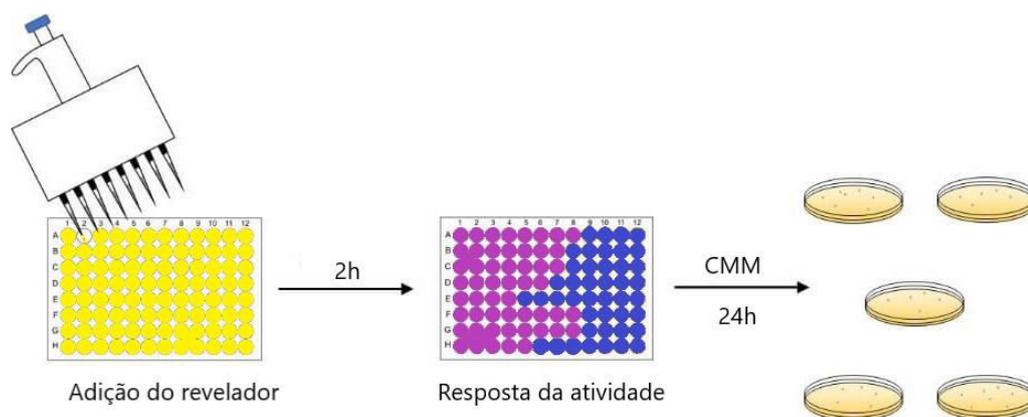
A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos (acetato de etila, acetonitrila, clorofórmio e hexano), obtidos na extração piloto, foi baseada nos padrões CLSI (2008, 2015) para leveduras e bactérias, com algumas modificações. O teste foi realizado no meio Muller Hinton (HIMEDIA, Índia) para atividade contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e no meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) para atividade contra *Candida albicans* (ATCC 10231).

As amostras foram dissolvidas em DMSO (extratos acetonitrila e clorofórmio) e em etanol (extratos acetato de etila e hexano) obtendo-se uma concentração final de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  e foram colocadas em três microplacas de 96 poços sob diluições seriadas ( $400-3,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O inóculo foi preparado em uma suspensão padronizada em espectrofotômetro a 660 nm e transmitância de 75%, correspondendo a  $1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$  (unidades formadoras de colônias por mL). Como controles positivos foram utilizadas a amoxicilina e estreptomicina ( $10-0,078 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, e o fluconazol ( $80-0,625 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para leveduras. As microplacas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Uma solução aquosa de resazurina (0,2%) foi usada como revelador para determinar a viabilidade do inóculo, indicada pela

mudança de cor de azul para rosa (SARKER *et al.*, 2007). O valor da CIM foi determinado como a menor concentração sem variação na cor do revelador. Todos os extratos foram analisados em triplicata. O controle negativo foi feito utilizando-se apenas o DMSO e o etanol, a fim de se verificar se os solventes influenciavam na atividade antimicrobiana.

Como apenas os extratos acetato de etila e clorofórmio apresentaram atividade bacteriostática para Gram-positivos, apenas eles foram utilizados para a determinação da CMM. Sendo assim, uma alíquota de 25  $\mu$ L foi retirada dos poços que não possuíram alteração da cor ao adicionar o revelador. Essa alíquota foi aplicada na superfície de uma placa de Petri contendo ágar Muller Hinton (HIMEDIA, Índia). Essa placa foi incubada a 37°C por 24 h. Os extratos exerceram uma ação bactericida, pois a placa não apresentou crescimento bacteriano. Abaixo segue-se um esquema generalizado de como foi realizado o processo:

Figura 17 - Esquema generalizado dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM).



Fonte: Autor.

## 4.6 ANÁLISE POR SDS-PAGE

### 4.6.1 Preparo das amostras

As análises por SDS-PAGE foram realizadas com o intuito de se investigar a constituição proteica do caldo de fermentação, após a extração com o M-RACNTs. Foram analisados os caldos de fermentação antes e após a extração com M-RACNTs, em diferentes pHs (variando de 2,00 a 8,00 e sem ajuste), separadamente.

Primeiramente as amostras de caldo de fermentação foram secas em uma estufa a vácuo por 18h. Em seguida foram dissolvidas em solução tampão de ruptura, na proporção de 50  $\mu$ L para 150  $\mu$ L de amostra, respectivamente. Para o preparo do tampão, utilizou-se tampão Tris/HCL (0,5 M) em pH 6,8; 0,8 mL glicerol; 1,6 mL SDS 10% m/v; 0,4 mL de 2-mercaptoetanol; 0,4 mL de azul de bromofeno 1% (p/v) e 3,8 mL de água mili-Q. Posteriormente, aqueceu-se cerca de 95°C em banho-maria por 2 minutos. Como padrão foram utilizados os marcadores de peso molecular para proteínas fosforilase b (97,4 kDa), soro albumina bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa) e lisozima (14,5 kDa).

### 4.6.2 Preparo do gel de separação

O gel de separação foi preparado na concentração de 12% com: 8,0 mL de acrilamida/bis-acrilamida; 5,0 mL tampão Tris/HCl (1,5 M) pH 8,8; 200 $\mu$ L SDS 10% m/v e 6,70 mL água destilada. A polimerização do gel foi realizada com a adição 30 $\mu$ L de tetrametiletilenidiamina (TEMED) e 200  $\mu$ L de persulfato de amônia 10 %. Em seguida, a solução foi vertida no interior de duas placas, rapidamente, até uma altura de cerca de 3 cm da extremidade superior das mesmas.

Na sequência, com auxílio de uma pipeta adicionou-se butanol, pelas extremidades das placas até total cobertura da superfície do gel, com o intuito da eliminação de bolhas e nivelamento do gel. Ao fim deste processo, aguardou-se 20 minutos até a completa polimerização e o butanol foi retirado com o auxílio de papel filtro, secando-se a superfície do gel.

#### **4.6.3 Preparo do gel de concentração**

O gel de concentração foi preparado na concentração de 4% partir de 0,665 mL da solução acrilamida/bis-acrilamida, 1,25 mL de tampão de Tris/HCl (0,5M) pH 6,8 e 3,05 mL de água destilada. Os catalizadores foram adicionados na concentração de 10  $\mu$ L de TEMED e 50  $\mu$ L de persulfato de amônia 10%. A solução foi vertida até a extremidade superior das duas placas. Posteriormente foi adicionado o pente que forma os fossos para a aplicação das amostras. Aguardou-se 20 minutos até a completa polimerização do gel e removeu-se o pente. Após os fossos foram secos com papel filtro.

#### **4.6.4 Aplicação das amostras e corrida eletroforética**

Foram aplicados 20  $\mu$ L de amostra por fosso e no primeiro fosso foram aplicados 10  $\mu$ L do padrão. A montagem da cuba inferior foi completada, retirando-se o conjunto de placas com os géis do suporte usado na montagem e encaixando-o na cuba inferior. Dentro das cubas superior e inferior foi inserido o tampão de corrida. A tampa do conjunto foi encaixada, atentando-se para a conexão dos eletrodos. A voltagem de corrida foi fixada em 150 V, acionada no início da corrida. Essa voltagem foi mantida constante até que as amostras alcançassem o final do gel.

#### **4.6.5 Revelação e análises dos géis**

Após a finalização da corrida eletroforética, foi realizada a revelação dos géis em duas etapas. Na primeira, os géis foram mantidos à temperatura ambiente por cerca de 30 min em uma solução corante contendo Cromassie Blue R-250 (0,25%) (contendo 1,25g de Cromassie Blue R 250, 227 mL metanol, 46 mL de ácido acético diluídos em 227 mL de água destilada). Na segunda etapa, os géis foram retirados da solução corante e mantidos à temperatura ambiente em uma solução descorante, contendo 430 mL de metanol e 70 mL de ácido acético diluídos em 500 mL de água destilada, por 24 horas.

#### 4.7 A INFLUÊNCIA DO PH NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS M-RACNTS DOS COMPOSTOS ANALISADOS POR GC-MS

Para realizar o teste de triagem de pH, foram testados um pH ácido, pH neutro e um pH básico, baseando-se em valores já empregados em estudos anteriores com o mesmo caldo utilizando a extração líquido-líquido. Para tal, os pHs estudados foram 3,00, 7,00 e 9,00. O ajuste do pH do caldo foi realizado adicionando-se uma solução de HCl 3,0 mol L<sup>-1</sup> ou de NaOH 3,0 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, foi realizado o processo de extração de forma análoga ao item 4.4, utilizando como solventes de eluição acetato de etila, clorofórmio e acetonitrila. Após, os extratos obtidos foram analisados no GC-MS.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A acoplado a um espectrômetro de massas MS-QP-5050A, com injetor automático (Shimadzu AOC-20i), coluna capilar RtX-5 (5% fenil, 95% polidimetilsiloxano 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm; Restek, Bellefonte, PA, USA) e tratamento de dados através do software GC-MS Solution. 1 µl da amostra foi injetado em um modo *Splitless*, sendo Hélio o gás de arraste utilizado, com uma velocidade linear de 37,7cm/s e pressão de 69,1 kPa. O programa de temperatura do forno foi: temperatura inicial de 80 °C por 2 min, aumento a 200 °C em 10min, sendo essa temperatura mantida constante por 5 min e novamente elevação a 280 °C em 10 min, mantendo-se constante por 4 min. A fonte utilizada foi impacto de elétrons operando a 70 eV.

#### 4.8 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PARA O GC-MS

Para a realização da otimização optou-se por trabalhar com o planejamento fatorial fracionário, para quatro variáveis, sendo elas, massa de material, tempo de adsorção, volume de solvente e tempo de dessorção. Foi construído um planejamento 2<sup>4</sup><sub>1</sub>.

Primeiro foi obtida a matriz com os valores codificados superiores (+1) e inferiores (-1). Também foi realizado um experimento no ponto central, sendo este realizado em triplicata. No total, experimentos foram feitos, conforme representados na tabela abaixo:

Tabela 3 - Valores codificados utilizado no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ 

	Variáveis			
	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>
<b>1</b>	-1	-1	-1	-1
<b>2</b>	1	-1	-1	1
<b>3</b>	-1	1	-1	1
<b>4</b>	1	1	-1	-1
<b>5</b>	-1	-1	1	1
<b>6</b>	1	-1	1	-1
<b>7</b>	-1	1	1	-1
<b>8</b>	1	1	1	1
<b>9</b>	0	0	0	0
<b>10</b>	0	0	0	0
<b>11</b>	0	0	0	0

Fonte: autor

Essa matriz foi construída utilizando-se primeiramente um planejamento  $2^3$  completo para obter os valores das variáveis 1, 2 e 3. Para determinar os valores da quarta variável foi realizado o produto das colunas 1, 2 e 3. Para a escolha dos valores reais foram utilizados parâmetros observados durante o processo da extração piloto, além do conhecimento teórico obtido em estudos realizados anteriormente em outras matrizes. Os valores escolhidos estão na tabela abaixo:

Tabela 4 - Valores reais escolhidos para realização do planejamento fatorial fracionário

	Níveis		
	-1	0	1
<b>V<sub>1</sub> massa (mg)</b>	50	100	150
<b>V<sub>2</sub> tempo adsorção(min)</b>	30	45	60
<b>V<sub>3</sub> volume solvente (mL)</b>	3	6	9
<b>V<sub>4</sub> tempo desorção (min)</b>	10	20	30

Fonte: autor

Após a escolha dos valores reais, esses foram substituídos na matriz dos valores codificados, obtendo-se assim o planejamento utilizado:

Tabela 5 - Matriz dos valores reais utilizados no planejamento fatorial fracionário  $2^{4+1}$ 

	Variáveis			
	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>
<b>1</b>	50	30	3	10
<b>2</b>	150	30	3	30
<b>3</b>	50	60	3	30
<b>4</b>	150	60	3	10
<b>5</b>	50	30	9	30
<b>6</b>	150	30	9	10
<b>7</b>	50	60	9	10
<b>8</b>	150	60	9	30
<b>9</b>	100	45	6	20
<b>10</b>	100	45	6	20
<b>11</b>	100	45	6	20

Fonte: autor

O processo de extração foi realizado igualmente ao descrito anteriormente na extração piloto, utilizando o caldo em pH= 7,00, modificando apenas as condições das variáveis em estudo, utilizando como solvente de eluição o clorofórmio. Os 11 extratos obtidos foram injetados no GC-MS, com as mesma condições anteriormente citadas, no entanto, foram injetados apenas 0,2µL, porque obteve-se extratos com as concentrações mais elevadas do que as obtidas nos extratos analisados anteriormente. A resposta analítica utilizada foi a área do composto selecionado anteriormente com o tempo de retenção 18,80 min. Os dados obtidos foram processados utilizando os programas excel e statistic.

#### 4.9 ANÁLISES DOS EXTRATOS BRUTOS E DA INFLUÊNCIA DO PH DA EXTRAÇÃO POR M-RACNTS DOS COMPOSTOS ANALISADOS POR LC-MS/MS

No LC-MS foram analisados, primeiramente, todos os extratos obtidos para pH= 7,00, sendo estes, clorofórmio, acetato de etila e acetonitrila. Como o extrato hexânico, apresentou na análise por GC-MS apenas hidrocarbonetos, o mesmo não foi avaliado nesta etapa. Em seguida foram analisados os extratos obtidos para pH= 3,00 e 9,00 dos mesmo solventes descritos anteriormente.

Os analitos extraídos foram determinados utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) modelo LC-MS 8030 equipado com um analisador de massas triplo-quadrupolo (Shimadzu®). O sistema era formado por 2

bombas LC-20AD um auto injetor SIL-20 AHT (todos obtidos da Shimadzu<sup>®</sup>) e uma coluna C18 LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B (5  $\mu$ m) de 25 cm. O software para a aquisição e tratamento dos dados foi o LabSolution<sup>®</sup>. Para a separação, o método gradiente foi utilizado, tendo como fase móvel metanol (MeOH) e água com 0,1% ácido fórmico, num um fluxo total de 0,4 mL/min. Primeiramente de 0,01 a 5,00 min manteve-se constante a concentração MeOH em 20% e de água acidificada em 80%, em seguida, aumentou-se para 30% em 5 min, posteriormente aumentou-se para 50% de MeOH em 10 min, mantendo-se essa concentração constante por mais 10 min, e em seguida aumentou-se para 100% MeOH em 15 min, mantendo essa concentração constante por 5 min. Por último retornou-se à condição inicial com 20% de MeOH e 80% de água acidificada em 5 minutos, mantendo constante por 15 min. A corrida teve no total uma duração de cerca de 70 min. Foram injetados 20  $\mu$ L de amostra.

Primeiramente foi realizado um scan no modo positivo e no modo negativo de todos os extratos analisados, sendo monitorados compostos com  $m/z$  de 50 a 600, com o intuito de selecionar os íons precursores de cada composto, e em seguida, fragmentá-los. Para seleção dos íons precursores, foi utilizado como critério picos que apresentassem áreas superiores a 10.000 mil.

Após a seleção dos íons precursores, as amostras foram novamente injetadas, no modo *Product Ion Scan* com o intuito de obter o MS/MS de cada íon precursor descrito na tabela acima, utilizando como energia de ionização 30 eV. Em seguida, os dados obtidos no LC-MS/MS foram analisados na plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), que possui o compartilhamento de dados de espectrometria de massas de diversas fontes de produtos naturais, permitindo a análises de dados brutos por uma biblioteca espectral de referência, alimentada por toda a comunidade científica e livremente compartilhada (WANG *et al.*, 2016).

O GNPS possibilita a criação das *molecular networkings* (redes moleculares), que são capazes de agrupar espectros baseados em suas similaridades espectrais, facilitando a análise dos dados e a identificação das possíveis classes obtidas (WANG *et al.*, 2016). Primeiramente os dados foram convertidos para o formato mzXML utilizando o *software* MSConvert (KESSNER *et al.*, 2008). Em seguida, os arquivos foram submetidos ao fluxo de trabalho do GNPS utilizando o *software* WinSCP.

As redes moleculares (RM) foram criadas utilizando os parâmetros gerais a seguir: os dados foram filtrados removendo todos os picos MS/MS dentro de  $\pm 17 u$  do íon precursor  $m/z$ . Os espectros MS/MS foram filtrados por janelas, sendo escolhidos apenas

os 6 melhores picos, agrupados com MS-Cluster (FRANK *et al.*, 2007), aplicando uma tolerância de massa original de 1,0 *u* e uma tolerância de 0,5 *u* para a criação do consenso. Além disso, os espectros do consenso que continham menos de 2 espectros foram descartados. As redes moleculares foram então criadas, onde as arestas (conexões) foram filtradas para se ter uma pontuação de cosseno maior ou igual a 0,70 e no mínimo 6 íons produtos emparelhados. Após a sua criação, elas foram importadas para o *software* Cytoscape 3.8.

Após as análises das redes obtidas foi realizado o estudo das fragmentações de alguns íons precursores selecionados, com o intuito da possível identificação e confirmação de certas classes de compostos observadas. Este passo foi importante para a identificação de alguns compostos já relatados na literatura em estudos realizados com caldo de fermentação da família *Lasiodiplodia*, a fim de se selecionar um composto para a realização da otimização do método de extração.

#### 4.10 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PARA O LC-MS

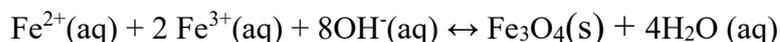
Para o processo de otimização do método de extração para a análise realizada no LC-MS/MS, foi adotado o mesmo procedimento descrito na seção 4.7. Os 11 extratos obtidos foram injetados no LC-MS/MS, com as mesmas condições descritas anteriormente, no modo positivo para a obtenção do MS/MS para os íons precursores  $m/z= 213$  e  $185$ . A resposta analítica utilizada foi a área dos compostos selecionados e os dados obtidos foram processados utilizando os programas excel e statistic.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 SÍNTESE DOS M-RACNTS

O método utilizado para obter Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Magnetita), γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Maghemita), α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Hematita) e α-FeO (OH) (Goethita), foi o de co-precipitação. Segundo Perez *et al* (1998), apenas a magnetita e maghemita são consideradas magnéticas (SUN *et al.*, 2004). A principal diferença entre elas, é a presença de apenas íons férricos na primeira e de íons ferroso e férricos na segunda, sendo responsáveis pela maior estabilidade da maghemita (KIM; TANNENBAUM, 2011).

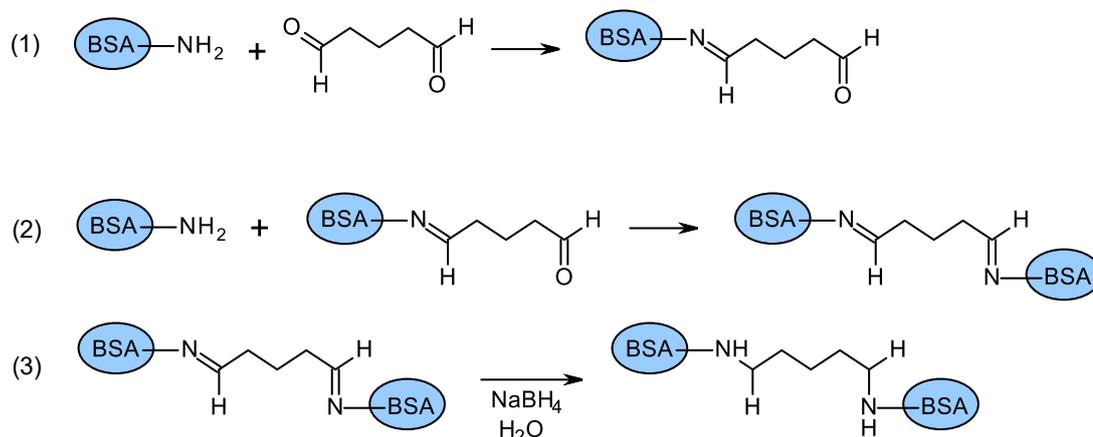
Nesse método, a obtenção da magnetita é feita por meio da utilização de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O em meio aquoso e se inicia com a adição de hidróxido de amônia, pois ocorre o aumento de pH entre 8,0 a 14,0 (GUPTA; AGARWAL; SALEH, 2011). A relação molar recomendada é de 2:1 para os cátions Fe<sup>3+</sup> e Fe<sup>2+</sup> (KEKKONEN *et al.*, 2009), conforme a equação abaixo:



Como a magnetita é instável na presença de O<sub>2</sub>, é necessário que a solução seja mantida sob atmosfera inerte de nitrogênio. A síntese realizada na presença de nanotubos de carbono com paredes múltiplas, possibilita a incorporação das nanopartículas magnéticas em alguns poros deste material, tornando-o magnético. Esse material foi escolhido para o estudo, pois apresenta um alto potencial adsorptivo confirmado em estudos anteriores realizados.

Uma parte do material sintetizado foi revestido com BSA. As reações químicas envolvidas na formação do revestimento com BSA estão representadas na figura 18. Na etapa 1, está representada a reação que ocorre entre o grupamento amina da BSA e o aldeído do glutaraldeído. Em 2 está representada a reação entre o aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído e o grupo amina de outra molécula de albumina, permitindo assim a formação da rede de BSA em volta dos M-CNTs. A reação entre o glutaraldeído e a albumina resulta na formação de iminas, que são compostos pouco estáveis. Assim, justifica-se o uso da solução de borohidreto 1% que foi empregada para reduzir as iminas em aminas, que são compostos estáveis. Em 3 está representada a conversão das iminas em aminas com a adição do borohidreto.

Figura 18 - Esquema de reações que ocorrem no processo de revestimento com albumina. Em 1 reação entre o grupamento amina da BSA e o aldeído do glutaraldeído; em 2 reação entre o aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído e o grupo amina de outra molécula e em 3.



Fonte: Autor.

A finalidade primordial do revestimento é impedir a adsorção das proteínas presentes na matriz no material extrator. Ademais, foi possível verificar que após o revestimento proteico, o material apresentou maior estabilidade, pois ele garantiu a blindagem do adsorvente, prevenindo a perda das nanopartículas magnéticas. Após todo o processo de síntese, foi realizada a caracterização desse material. Para tal, foram utilizadas as seguintes técnicas: potencial zeta, FTIR e a termogravimetria.

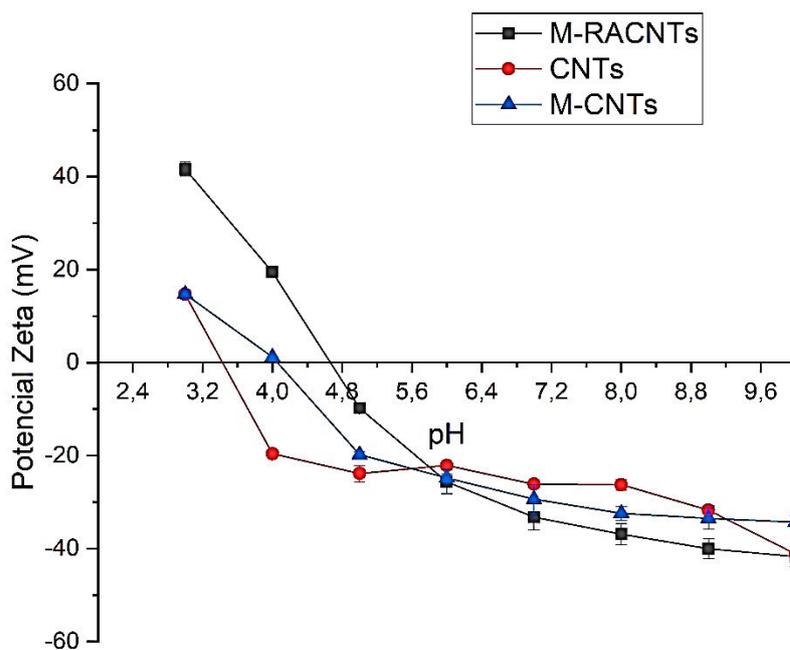
### 5.1.1 Caracterização dos M-RACNTs

#### 5.1.2.1 Potencial zeta

O potencial zeta permite o monitoramento da carga superficial de uma amostra, sendo que sua distribuição pode ser modificada por fatores como: a composição da partícula, o meio dispersante, e o pH e a força iônica da solução (DE MELO *et al.*, 2010). Por meio da Figura 19, é possível observar que houve uma diferença de inclinação entre as curvas dos materiais analisados.

Os estudos de potencial zeta foram realizados para verificar a carga superficial do material de acordo com a variação do pH, bem como seu ponto isoelétrico (pI). A figura 20 apresenta o perfil de cada um dos materiais avaliados (CNTs, M-CNTs e M-RACNTs).

Figura 19 - Variação do potencial zeta dos CNTs, M-CNTs e M-RACNTs em função do pH.



Fonte: Do autor.

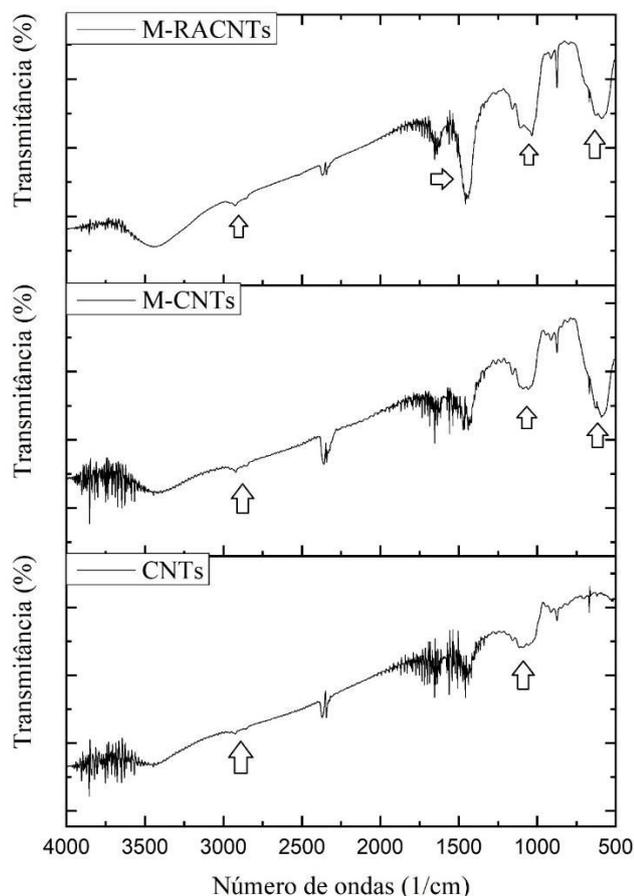
Para os CNTs foi encontrado um pI de aproximadamente 3,40. Os pIs dos M-CNTs e M-RACNTs foram 4,00 e 4,78, respectivamente. Segundo Ferreira (2009) a BSA possui o pI entre 4,70 e 5,60, justificando a elevação do pI dos M-RACNTs comparado aos M-CNTs, o que sugere a existência da camada de BSA no material. É importante ressaltar que acima do pI a carga superficial dos materiais é positiva e abaixo é negativa. No pI, a carga superficial global é igual a zero.

Assim, conhecendo-se como a carga superficial global se comporta de acordo com alteração de pH, é possível favorecer ou não a adsorção de espécies. No caso em questão, o material deve ser capaz de impedir a adsorção de proteínas em sua superfície.

### 5.1.2.2 Espectroscopia no infravermelho

A figura 20 representa os espectros de infravermelho para CNTs, M-CNTs e M-RACNTs. Observa-se que todos os espectros apresentaram bandas entre 2960 – 2850  $\text{cm}^{-1}$ , característica do estiramento C-H e uma banda entre 1000 - 720  $\text{cm}^{-1}$ , característica de estiramento C-C. Observa-se também uma banda de background típica de  $\text{CO}_2$ . Os M-RACNTs e os M-CNTs apresentaram bandas em aproximadamente 550  $\text{cm}^{-1}$ , indicando estiramento Fe-O (MÁRQUES *et al.*, 2011), o que sugere a presença de magnetita. Nos M-RACNTs é possível observar a presença de uma banda que sugerem a presença da BSA, 1450  $\text{cm}^{-1}$ , relativa a Amida II (SILVRSTEIN *et al.*, 2019).

Figura 20 - Espectros de FTIR dos CNTs, M-CNTs e M-RACNTs.

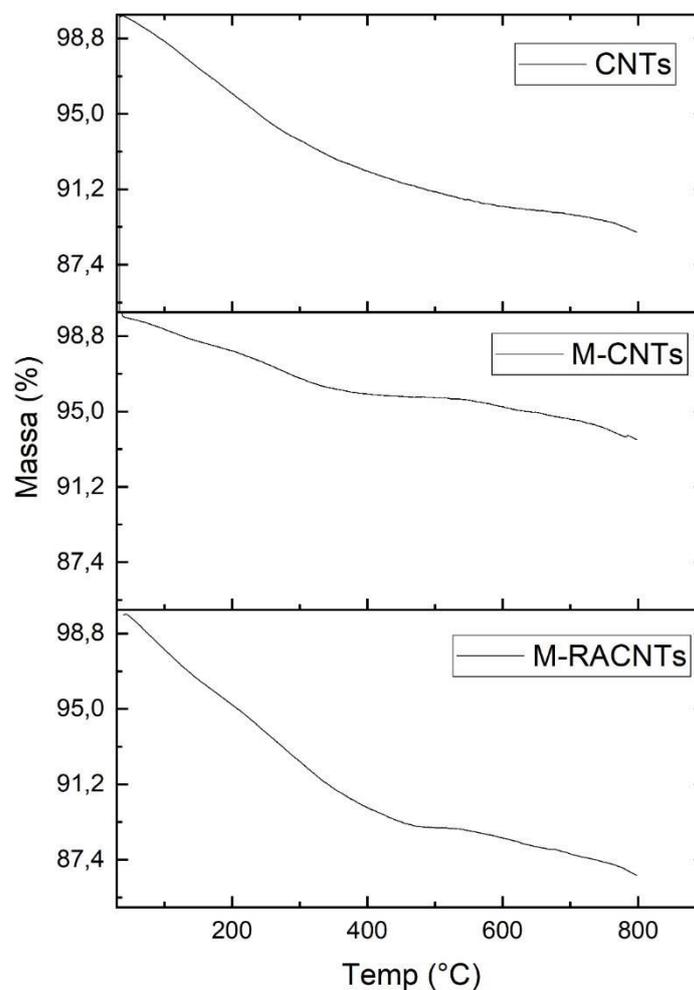


Fonte: Autor

### 5.1.2.3 Análise termogravimétrica

A curva de TG da amostra CNTs (FIGURA 21) demonstrou uma perda de cerca de 12% da sua massa total, enquanto os M-CNTs (FIGURA 21), demonstrou uma perda de apenas 6%. Essa diferença é um indicativo de que as nanopartículas de magnetita foram incorporadas aos nanotubos de carbono, visto que elas não sofreriam degradação em ambiente químico inerte ( $N_2$ ). Já a curva dos M-RACNTs (FIGURA 21) demonstrou uma perda 14%, o que é justificável devido ao revestimento com BSA e consequente degradação desse revestimento em virtude da degradação da proteína. Vale ressaltar que todos os materiais analisados possuem uma elevada estabilidade térmica.

Figura 21 - Curva de perda de massa dos CNTs, M-CNTs e M-RACNTs.



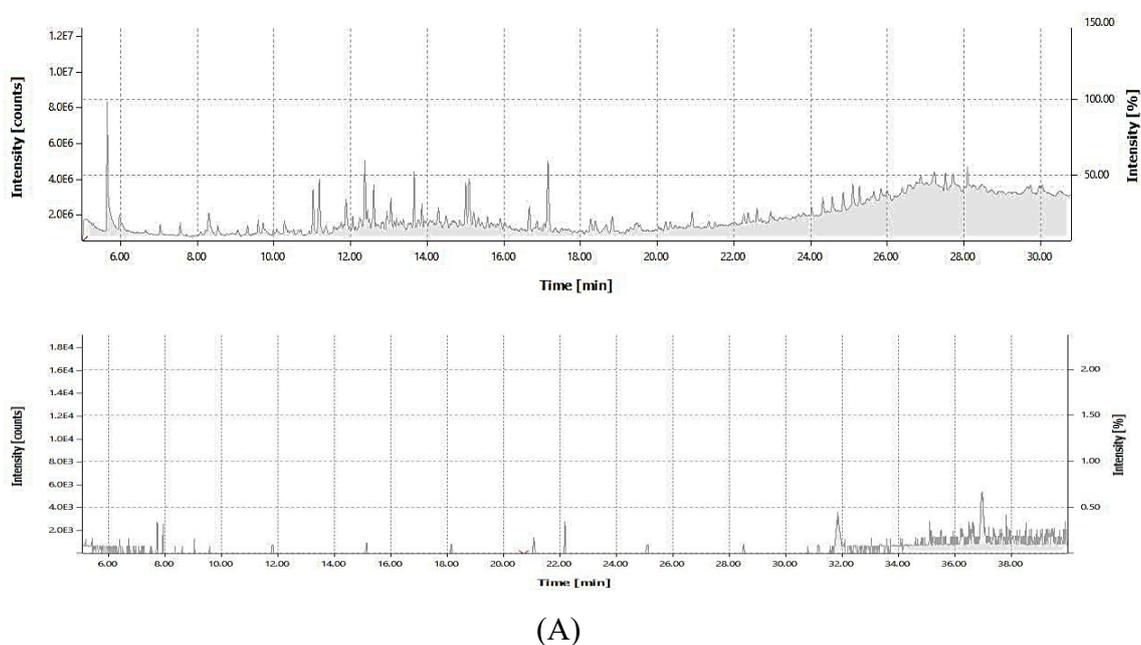
Fonte: Autor

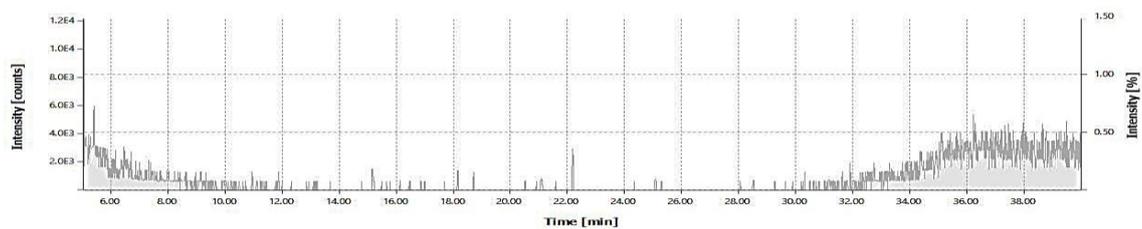
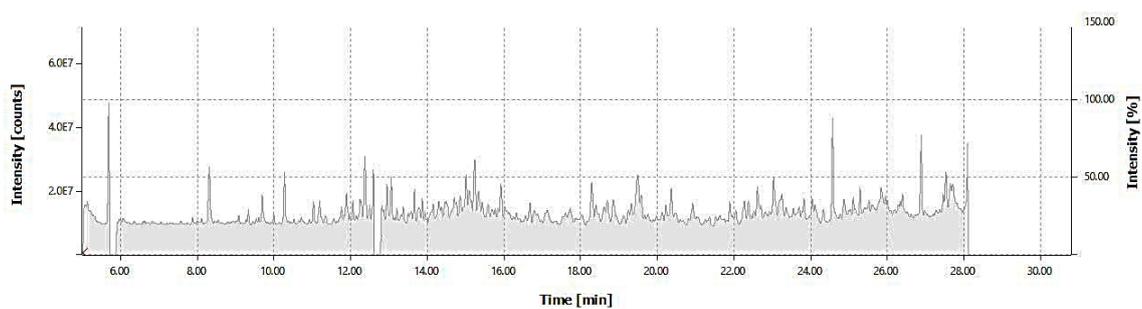
## 5.2 ANÁLISES DOS EXTRATOS POR GC-MS

Nas análises realizada no GC-MS o material apresentou uma boa eficiência de extração, o que pode ser observado ao se analisar os cromatogramas obtidos. O primeiro cromatograma representado na figura 22A foi obtido por meio da extração empregando acetonitrila como solvente de eluição. O segundo, demonstrado na figura 22B, foi obtido com a análise da extração com acetato de etila, o terceiro, representado na figura 22C foi obtido pela extração empregando clorofórmio como solvente de eluição e o último na figura 22D foi obtido por meio da extração como solvente de eluição hexano, com o caldo de fermentação do fungo *Lasiodiplodia sp.* no pH 7,0. Entre as figuras, foram colocados os cromatogramas obtido pela extração do branco para cada solvente de eluição utilizado, com o intuito de verificar se todas as substâncias extraídas eram provenientes do caldo de fermentação.

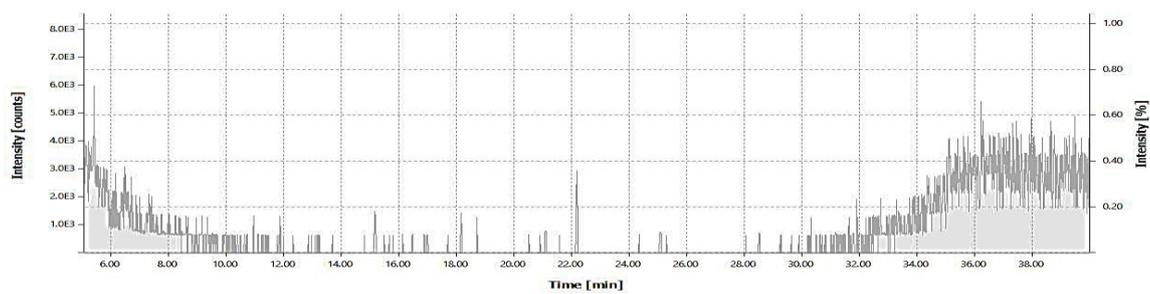
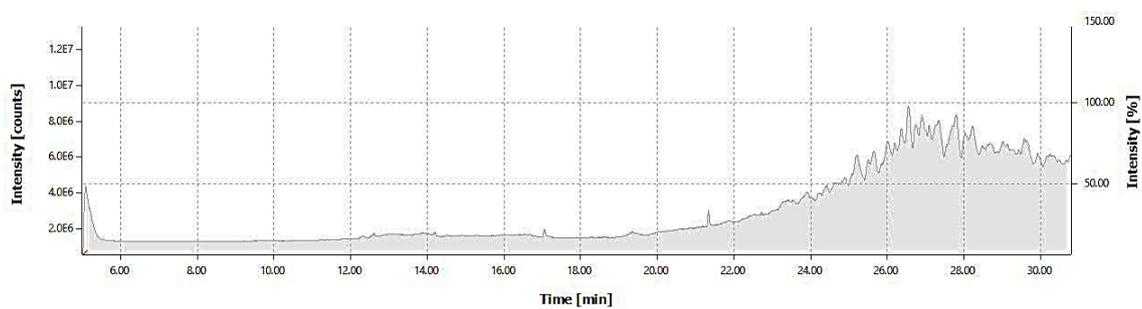
Pode-se observar também, ao analisar as eluições com diferentes solventes, que distintos analitos foram extraídos, visto que os tempos de retenção dos compostos e os espectros de massas foram distintos. Essa separação prévia é esperada, pois os solventes utilizados possuem diferentes polaridades e interações intermoleculares com os analitos.

Figura 22 - Cromatogramas obtidos das extrações com: (A) Extrato acetonitrila e Branco, (B) Extrato acetato de etila e Branco, (C) Extrato clorofórmio e Branco e (D) Extrato hexano e Branco.

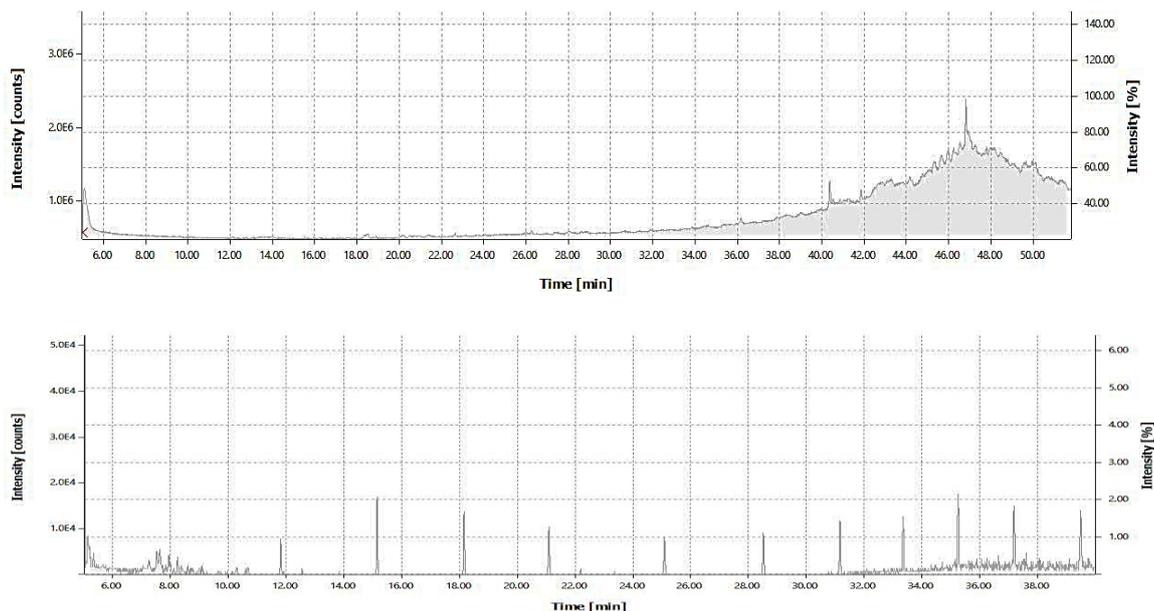




(B)



(C)

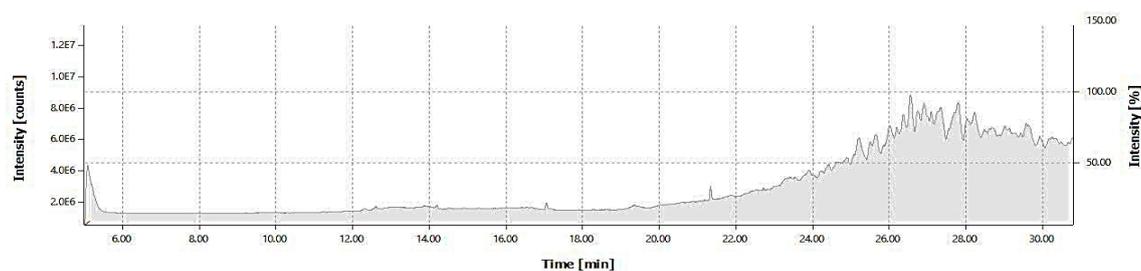


(D)

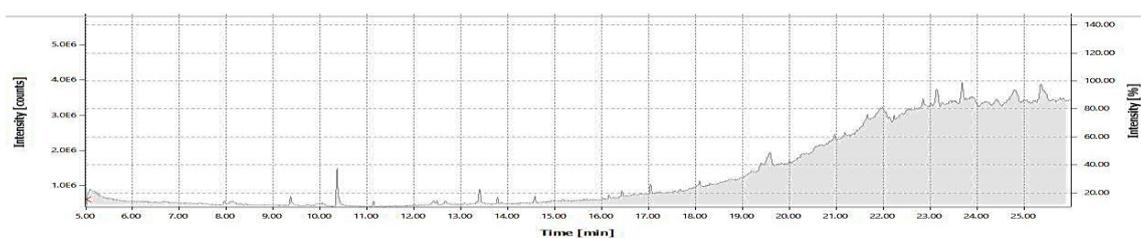
Fonte: Autor

Comparada à extração líquido-líquido convencional, o processo de extração utilizando os M-RACNTs, apresenta maiores vantagens, visto que possibilita menor consumo de solvente orgânico, ausência de formação de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, entre outras. A figura 23 apresenta uma comparação entre cromatogramas obtidos por GC-MS dos extratos obtidos com clorofórmio e hexano em uma LLE convencional e utilizando o método de extração desenvolvido neste trabalho, usando os mesmos solventes de eluição e o mesmo caldo de fermentação. Pode-se verificar uma maior recuperação dos analitos utilizando-se a extração com os M-RACNTs, visto que as intensidades das áreas são maiores, tanto no extrato clorofórmio, quanto para o extrato hexânico.

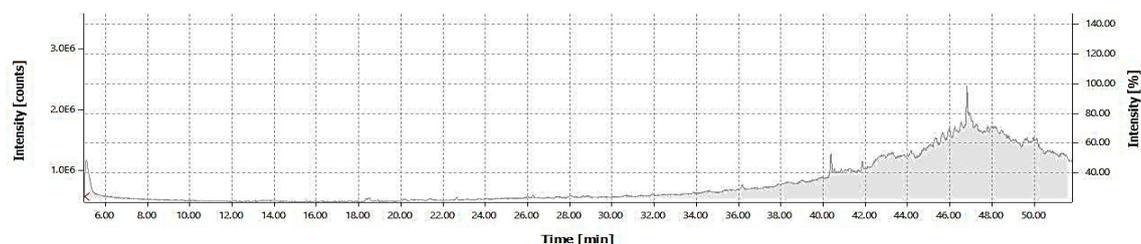
Figura 23 - Cromatogramas comparativos analisados utilizando o GC-MS: (1) Extração com M-RACNTs utilizando o clorofórmio; (2) Extração líquido-líquido utilizando clorofórmio; (3) Extração com M-RACNTs utilizando o Hexano; (4) Extração líquido-líquido utilizando hexano.



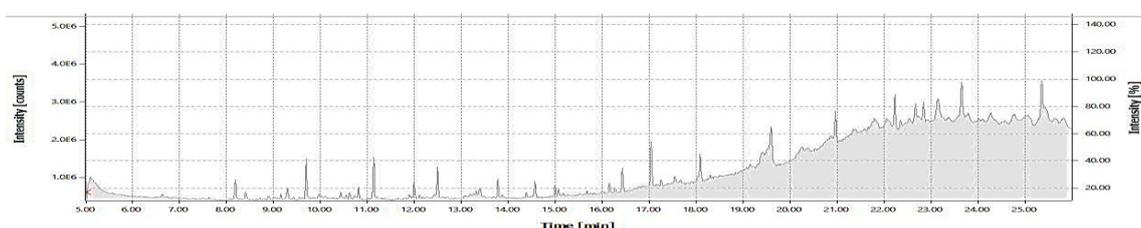
(1)



(2)



(3)



(4)

Após a análise de todos os cromatogramas obtidos, foi realizado um levantamento bibliográfico para investigar quais estudos químicos já foram realizados, mostrando os metabólitos secundários isolados, a fim de que se pudesse comparar os resultados com aqueles obtidos utilizando o método de extração desenvolvido neste trabalho. Os dados foram coletados através de pesquisa em bases de dados nas plataformas Scirus, SciFinder, Science Direct, Web of Science e Periódicos capes, levantando artigos publicados no

período de 2014 a 2021 (Tabela 6). Foram relatados 42 compostos, divididos em várias classes de metabólitos secundários.

Tabela 6 - Relação de metabólitos secundários, segundo a literatura.

(continua)

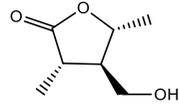
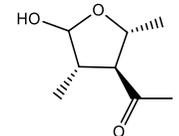
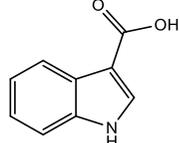
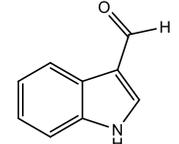
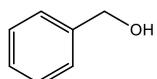
Nº	Nome	Fungo	Atividade biológica	Referência	Estruturas químicas
1	(3S,4R,5R)-4-Hidroximetil-3,5-dimetildiidro-2-furanona	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Aticâncer, antibacteriana, antifúngica, fitotóxica, mitotóxica e antifertilidade	ANDOLFI <i>et al.</i> , 2014	
2	(3R,4S)-Botriodiplodina	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Antimicrobiana e antitumorais	ANDOLFI <i>et al.</i> , 2014	
3	Ácido indol-3-carboxílico	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Antimicrobiana e antitumorais	QIAN <i>et al.</i> , 2014	
4	Indol-3-carbaldeído	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Antimicrobiana	QIAN <i>et al.</i> , 2014	
5	2-Feniletanol	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Fitotóxico, antibacteriano, antifúngica e anti-verme	QIAN <i>et al.</i> , 2014	

Tabela 7 - Relação de metabólitos secundários, segundo a literatura.

(continuação)

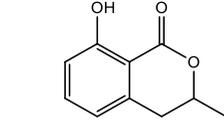
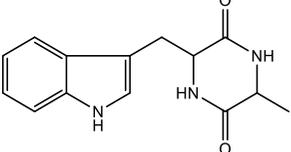
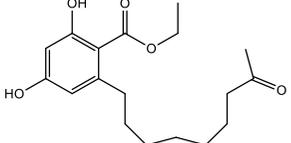
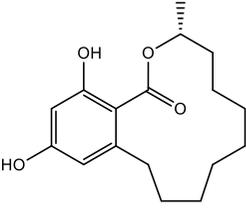
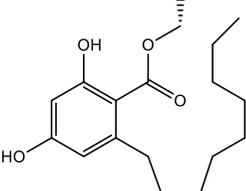
Nº	Nome	Fungo	Atividade biológica	Referência	Estruturas químicas
6	Mellein	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Antioxidante	QIAN <i>et al.</i> , 2014	
7	Ciclo- (Trp-Ala)	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Citotóxica	QIAN <i>et al.</i> , 2014	
8	2,4-di-hidroxi-6- (8-oxononil) benzoato de etila	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Citotóxica	HUANG <i>et al.</i> , 2017	
9	(R) -Zearalano	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Citotóxica	HUANG <i>et al.</i> , 2017	
10	2,4-di-hidroxi-6-nonilbenzoato	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Antioxidante	HUANG <i>et al.</i> , 2017	

Tabela 8 - Relação de metabólitos secundários, segundo a literatura.

(continuação)

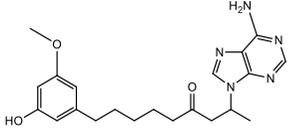
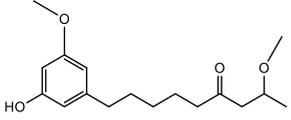
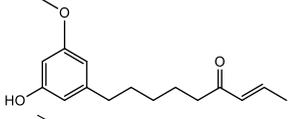
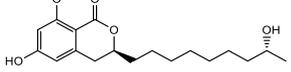
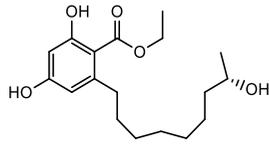
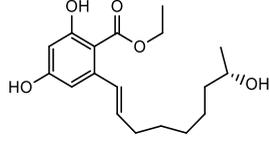
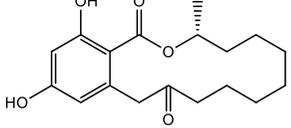
Nº	Nome	Fungo	Atividade biológica	Referência	Estruturas químicas
11	Adenina-alkilresorcino	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antioxidante	YU-MENG <i>et al.</i> , 2016	
12	3-O-metil-5- (8-metoxil-6-oxononil) -resorcinol	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antioxidante	YU-MENG <i>et al.</i> , 2016	
13	3-O-metil-5 - [(7E) -6-oxo-7-nonenil] -resorcinol	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antioxidante	YU-MENG <i>et al.</i> , 2016	
14	(3S) -3 - [(R) -8-hidroxinonil] -6-hidroxi-8-metoxi-3,4-di-hidroisocromano-1-ona	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antioxidante	YU-MENG <i>et al.</i> , 2016	
15	3,5-di-hidroxi-7- (8-hidroxi-pentil) benzoato de (R) -etil	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antiplasmodial, atimicrobiana e citotóxica	SENHUA <i>et al.</i> , 2015	
16	(R, E) -2,4-di-hidroxi-6- (8-hidroxi-non-1-en-1-il) benzoato de etila	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antiplasmodial, atimicrobiana e citotóxica	SENHUA <i>et al.</i> , 2015	
17	Lasico	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antiplasmodial, atimicrobiana e citotóxica	SENHUA <i>et al.</i> , 2015	

Tabela 9 - Relação de metabólitos secundários, segundo a literatura.

(continuação)					
Nº	Nome	Fungo	Atividade biológica	Referência	Estruturas químicas
18	Lasiodiplodina	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antiplasmodial, atimicrobiana e citotóxica	SENHUA <i>et al.</i> , 2015	
19	De-O-metilasiodiplodina,	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antiplasmodial, atimicrobiana e citotóxica	SENHUA <i>et al.</i> , 2015	
20	(E) - 9-eteno-lasiodiplodina	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antiplasmodial, atimicrobiana e citotóxica	SENHUA <i>et al.</i> , 2015	
21	5R-hidroxi-lasiodiplodina	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antiplasmodial, atimicrobiana e citotóxica	SENHUA <i>et al.</i> , 2015	
22	5S-hidroxi-lasiodiplodina	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antiplasmodial, atimicrobiana e citotóxica	SENHUA <i>et al.</i> , 2015	

Tabela 10 - Relação de metabólitos secundários, segundo a literatura.

(continuação)

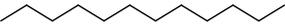
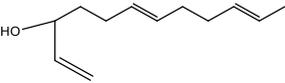
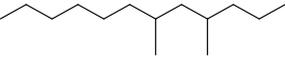
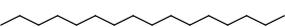
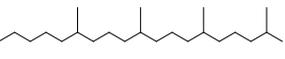
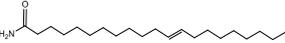
Nº	Nome	Fungo	Atividade biológica	Referência	Estruturas químicas
23	Dodecano	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
24	Trimetildodeca-1,6,10-tri-3-ol	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
25	Pentadecano	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
26	4,6-dimetildodecano	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
27	Octadecano	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
28	Hexadecano	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
29	2,6,10,14-Tetrametilheptadecano	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
30	(Z) -docos-13-enamida	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antimicrobiana	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	

Tabela 11 - Relação de metabólitos secundários, segundo a literatura.

(continuação)

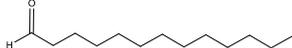
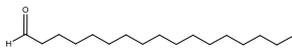
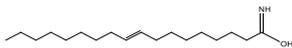
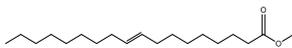
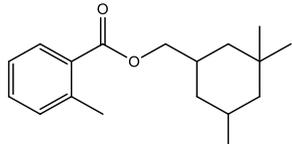
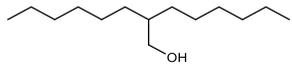
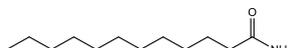
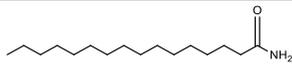
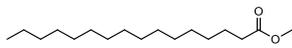
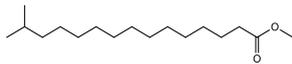
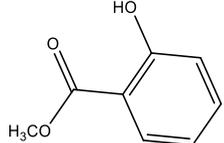
Nº	Nome	Fungo	Atividade biológica	Referência	Estruturas químicas
31	Tetradecanal	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
32	Octadecanal	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
33	(Z) -octadec-9-enamida	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antimicrobiana	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
34	Metil (Z) -octadec-9-enoato	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
35	(3,3,5-trimetilciclohexil) 2-hidroxibenzoato	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
36	1-etenooctadecano	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
37	2-hexiloctan-1-ol	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
38	Dodecanamida	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Antimicrobiana	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	

Tabela 12 - Relação de metabólitos secundários, segundo a literatura.

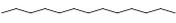
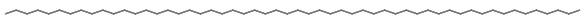
(conclusão)

Nº	Nome	Fungo	Atividade biológica	Referência	Estruturas químicas
39	Hexadecanamida	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
40	hexadecanoato de metila	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
41	metil 14-metilpentadecanoato	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	
42	Salicilato de homomentil	<i>Lasiodiplodia sp</i>	Não possui	GÓMEZ <i>et al.</i> , 2021	

Fonte: Autor

Após a obtenção dos resultados, os espectros foram comparados aos das bases de dados NIST08s.LIB e MassBank. Nas análises por meio do GC-MS, foi possível a identificação apenas de compostos das classes descritas por GÓMEZ *et al.*, 2021 descritos na Tabela 6, uma vez que restringiu-se apenas à identificação de compostos voláteis e semivoláteis. Com essas análises foi possível verificar a existência de hidrocarbonetos (Tabela 7) em todos os extratos analisados, porém em maior quantidade no extrato hexânico, sendo esses compostos já relatados em estudos no gênero *Lasiodiplodia sp.* (OLIVEIRA, 2017; GÓMEZ *et al.*, 2021).

Tabela 13 - Possíveis hidrocarbonetos identificados nos extratos obtidos.

Nº	Estruturas	Grau de similaridade	Estruturas químicas
1	Tridecano	95%	
2	Heptadecano	96%	
3	Hexadecano	94%	
4	Nonadecano	94%	
5	Tridecano	96%	
6	Pentadecano	94%	
7	Esqualeno	95%	
8	Heneicosano	95%	
9	Tetrapentacontano	90%	
10	Dotriacontano	91%	
11	Eicosano	85%	

Fonte: Autor

Os hidrocarbonetos foram identificados por meio da comparação com as bases de dados, além da análise das fragmentações obtidas no espectro de massa. Como exemplo do estudo da fragmentação realizada, tem-se a representação da fragmentação do





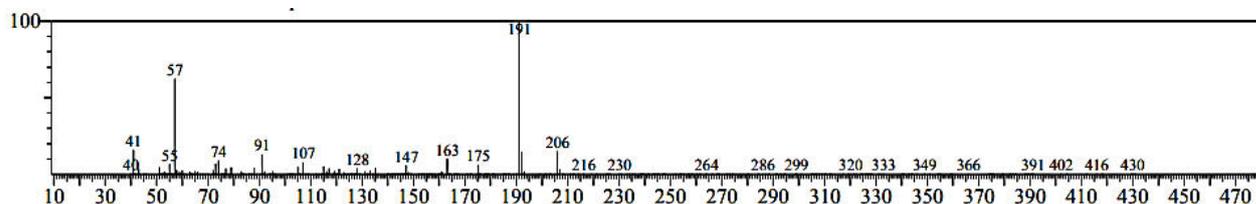
Figura 29 - Proposta de fragmentação causada pela desidratação na molécula de undecanol.



Fonte: Autor.

Nas análises dos extratos clorofórmio e acetato de etila também foram possíveis observar fragmentação característica de compostos derivados de fenol, como exemplo, 3,5-Di-terc-butilfenol, sendo que no espectros aparecem o pico íon-molecular com  $m/z=206$ , característico dessa classe. O espectro obtido está representado na figura abaixo:

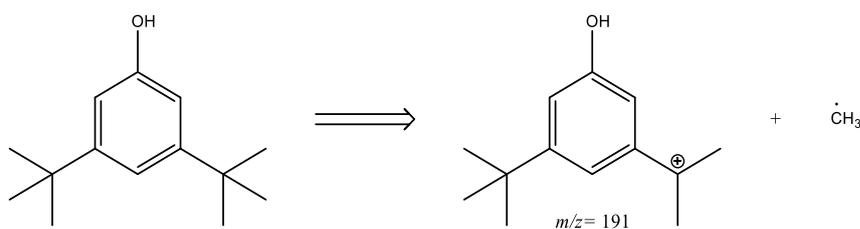
Figura 30 - Espectro de massas do 3,5-Di-terc-butilfenol.



Fonte: Autor

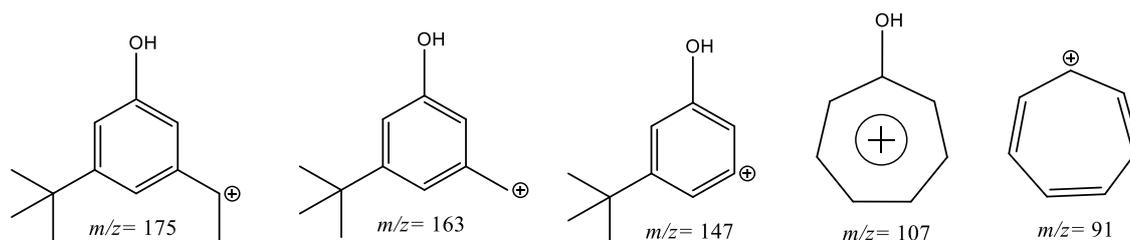
A fragmentação de maior intensidade é a perda do grupo metila com  $m/z= 191$ , formando assim um carbocátion terciário, sendo este o mais estável, estabilizando assim, a molécula. Essa fragmentação pode ser observada na figura 31. Na figura 32 foi apresentado as próximas fragmentações observadas no espectro de massas, sendo estas características dessa classe. Ao comparar o espectro com ambas as bases de dados utilizadas, obteve-se um grau de semelhança de 91% para a NIST e 90% para MassBank.

Figura 31 - Fragmentação proposta para a fragmentação obtida no pico base



Fonte: Autor

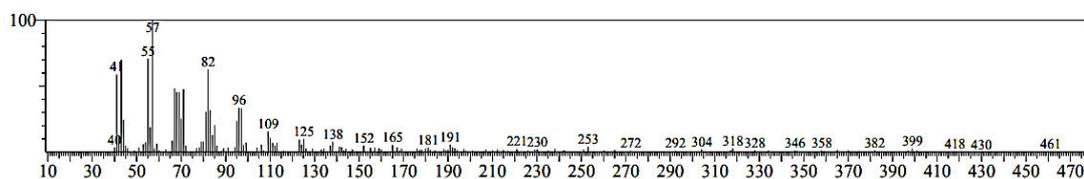
Figura 32 - Fragmentação proposta para a fragmentação para o 3,5-Di-terc-butilfenol.



Fonte: Autor

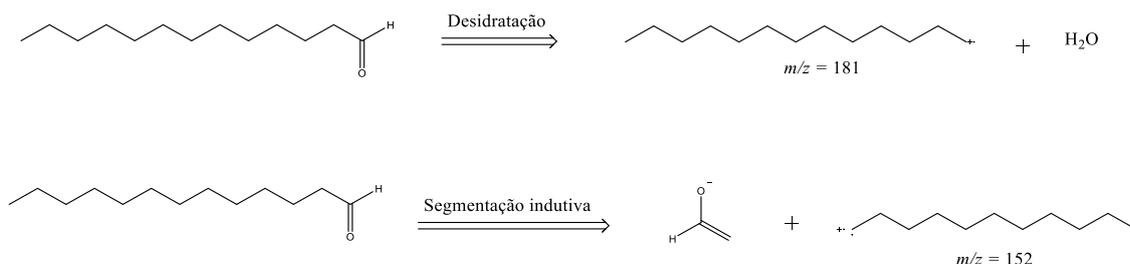
Foi encontrado também um espectro característico de aldeído de cadeia longa, pois apresentaram um fragmento  $[M - 18]$  pela perda de água, sendo esta, uma característica única desta classe, auxiliando na identificação. A segunda fragmentação importante dessa classe é a segmentação  $\beta$  (PAIVA *et al.*, 2016), que também foi observada nos espectros analisados. Foram no total identificados dois possíveis aldeídos, sendo eles, o tridecanal e o tetradecanal. O espectro do tridecanal (FIGURA 33) apresentou o pico  $[M-18]$  igual a  $m/z = 181$  e a apresentou o fragmento por meio da fragmentação  $\beta$  (segmentação indutiva) de  $m/z = 152$ , em seguida, observou-se fragmentação característica de alcanos, resultando em perdas consecutivas de 14 u.m.a (FIGURA 34).

Figura 33 - Espectro de massas do tridecanal.



Fonte: Autor

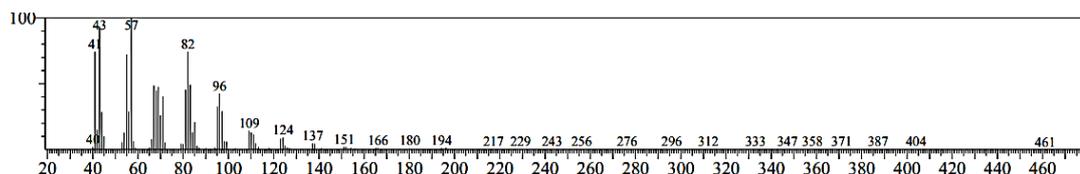
Figura 34 - Fragmentação proposta para a fragmentação para o Tridecanal.



Fonte: Autor

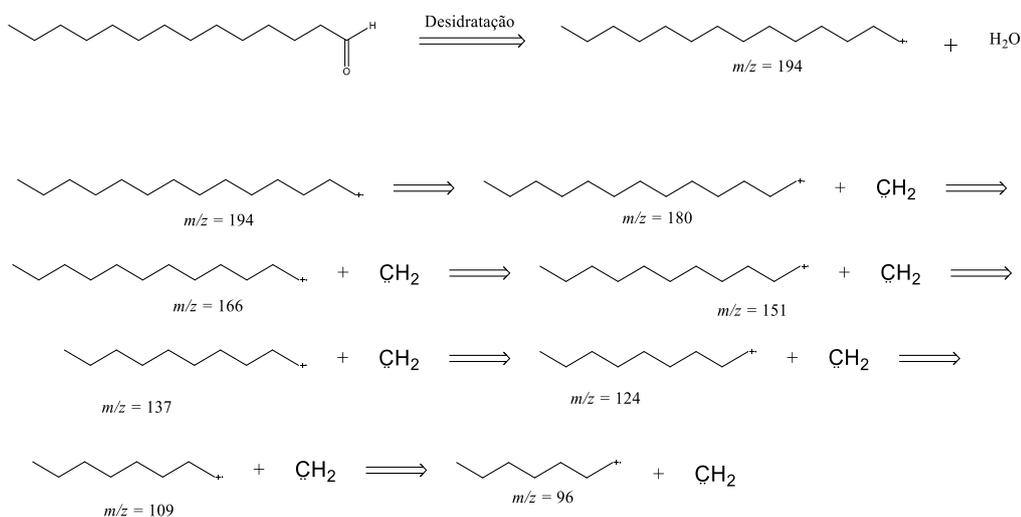
No espectro (FIGURA 35) referente a tetradecanal também foi observado o pico referente ao fragmento [M-18] com  $m/z = 194$ , no entanto, não apresentou o fragmento obtido pela fragmentação  $\beta$ , o que pode significar, que o aldeído foi desidratado antes que ocorresse o processo de fragmentação, resultando assim, em fragmentações consecutivas com perdas de 14 u.m.a, como representado na figura 36. Essa classe também foi encontrada no *Lasiodiplodia sp.*, no estudo realizado por GÓMEZ *et al.*, 2021.

Figura 35 - Espectro de massas do tetradecanal.



Fonte: Autor

Figura 36 - Fragmentação proposta para a fragmentação para o Tetradecanal.



Fonte: Autor

Além dessas possíveis estruturas descritas, foram obtidos cerca de 100 espectros que não apresentaram semelhança com nenhum espectro encontrado nas duas bases de dados utilizadas. Esses podem ser provenientes de compostos inéditos ou ser compostos que não se encontram registrados nas bases de dados.

### 5.3 CIM E CMM DE EXTRATOS BRUTOS

O grau de atividade antimicrobiana foi baseado nos critérios de Holetz *et al.* (2002), que descreve a ação antimicrobiana como forte ( $<100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), moderada ( $100-500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), fraca ( $500-1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e inativa ( $\geq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Esses critérios são muito semelhantes aos descrito no estudo de Kuete (2010), sendo que ambos são bastante restritivos, o que constituiu um requisito para este estudo em relação à avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos. A tabela 8 apresenta os resultados:

Tabela 14 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos.

Patógenos/ Extratos	Teste	Hexano ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Clorofórmi o ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Acetato de etila ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Acetonitrila ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Fármacos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM	>400	100-200	200-400	>400	0,078-0,156 <sup>(A)</sup>
	CMM	>400	100-200	200-400	>400	5-10 <sup>(A)</sup>
<i>Candida albicans</i>	CIM	>400	>400	>400	>400	3,125-6,25 <sup>(E)</sup>
	CMM	>400	>400	>400	>400	-
<i>Escherichia coli</i>	CIM	>400	>400	>400	>400	0,156-0,312 <sup>(F)</sup>
	CMM	>400	>400	>400	>400	-

Fonte: Autor

Nota: <sup>(A)</sup>Amoxicilina.

<sup>(E)</sup> Estreptomicina.

<sup>(F)</sup> Fluconazol.

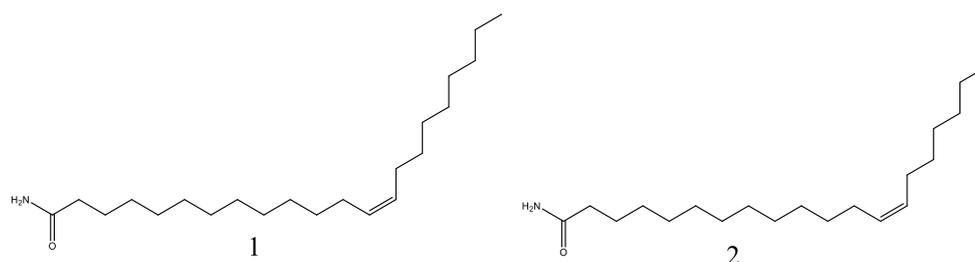
Os extratos Clorofórmio e Acetato de etila apresentaram os melhores valores de CIM e CMM contra patógenos Gram-positivos (TABELA 8), enquanto os extratos Acetonitrila e Hexano não apresentaram atividade nas concentrações máximas testadas ( $\text{CIM} > 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Já nos testes com levedura, nenhum dos extratos apresentaram uma atividade significativa nas concentrações máximas testadas ( $\text{CIM} > 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os extratos Clorofórmio e Acetato de etila apresentaram um efeito bacteriostático e bactericida ( $\text{CMM} > 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para o patógeno *Staphylococcus aureus*.

Após as análises pode-se concluir que foi possível a obtenção de extratos brutos com metabólitos secundários antimicrobianos de natureza apolar a polar moderada. Sendo assim, foram selecionados esses extratos para continuar o estudo. O extrato acetonitrila, mesmo não apresentando uma atividade significativa não foi descartado, pois acredita-se que possua um alto potencial relacionado a compostos bioativos com outras atividades biológicas que não foram estudadas.

Em seguida, por meio da comparação com os compostos identificados no estudo de GÓMEZ *et al.*, 2021, foi possível a identificação do (Z)-icos-11-enamida<sup>1</sup> no extrato clorofórmio e o (Z)-docos-13-enamida<sup>2</sup> (Figura 37) no extrato acetato de etila, sendo estes relatados pelos autores como possuindo efeito antimicrobiano.

O efeito antimicrobiano da (Z)-docos-13-enamida, também conhecido como erucamida, foi descrito no estudo desenvolvido por Adnam *et al.*, (2019). Os autores observaram a formação de pontes de hidrogênio entre a molécula de erucamida e resíduos de aminoácidos da tubulina e glucosamina-6-P sintetase, sendo está interação responsável por suas ações anti-helmínticas e antibacterianas, respectivamente. Espera-se que a (Z)-icos-11-enamida, por pertencer a mesma classe, realize a mesma interação, justificando a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos clorofórmio e acetato.

Figura 37 - Compostos identificados por CG-EM nos extratos clorofórmio e acetato com atividade antimicrobiana conhecida.



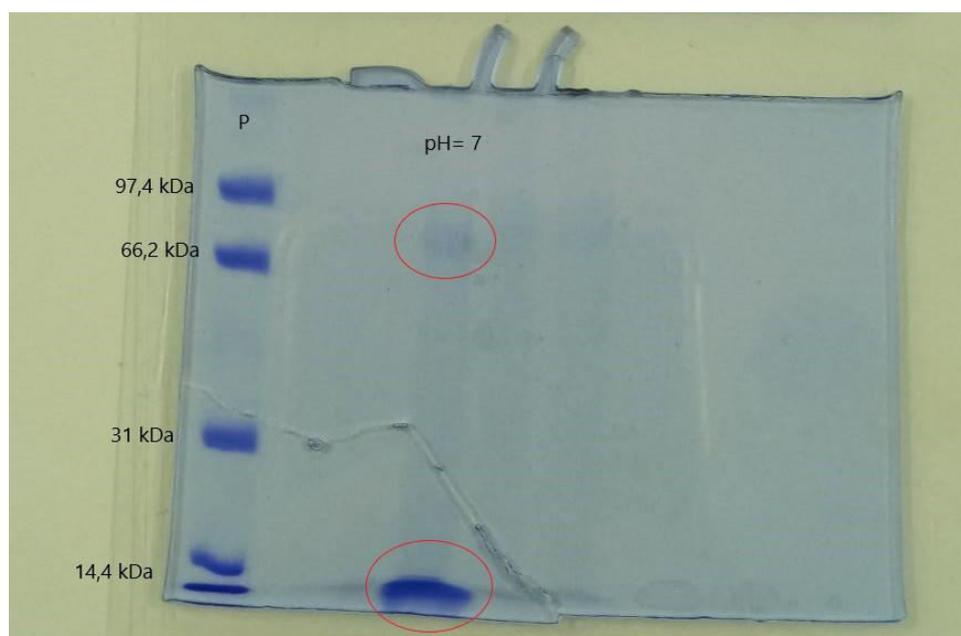
Fonte: autor

Além desse compostos também foram identificados tanto no extrato clorofórmio, como no extrato acetato de etila, o hexadecano, sendo que em ambos os extratos, foi considerado o composto majoritário. Na literatura foram encontrados estudos que relatam a atividade antimicrobiana desse analito (YOGESWARI *et al.*, 2012; FALADE *et al.*, 2017). Sendo que o seu mecanismo de ação é complexo, por isso, não foi totalmente explicado até o momento, mas sabe-se que está relacionado com o caráter lipofílico da sua estrutura (BAUMGART, 2014).

#### 5.4 ANÁLISE DE ELETROFORESE SDS-PAGE DO CALDO DE FERMENTAÇÃO

O método de SDS-PAGE fundamenta-se na migração das proteínas por meio da diferença de massas moleculares. Portanto, aquelas proteínas que apresentam menor peso molecular, terão maior mobilidade eletroforética e eluirão primeiro. A Figura 38 apresenta o gel obtido pela análise realizada por SDS-PAGE, conforme descrito no item 4.6, na seguinte ordem: padrão, pH= 8,0; pH= 7,0; pH= 6,0; pH= 4,0; pH= 3,0; pH=2,0; caldo sem extração e extrato bruto extraído sem ajuste de pH.

Figura 38 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida das amostras de caldo de fermentação de fungo endofítico.



Fonte: Autor

Ao analisar o gel obtido observou-se que o caldo do fungo *Lasiodiplodia sp.* possui uma baixa concentração proteica, pois mesmo após a pré-concentração das amostras, ainda apresentou manchas fracas. Na amostra de pH=7,0 foi possível observar uma mancha clara entre 97,4 kDa e 66,2 kDa e uma banda em 14,4 kDa, confirmando assim, a presença da lisozima no caldo. Como a mancha correspondente ao peso molecular da lisozima foi de alta intensidade, pode-se concluir que esta enzima estava em maior concentração.

Ao analisar o ponto isoeletrico da lisozima (aproximadamente 10,4), espera-se que no pH= 7,00 esta estará carregada positivamente, enquanto a BSA, estará carregada negativamente. Esperava-se que nesse pH ocorresse a atração entre elas, contudo a sua presença em maior quantidade na amostra analisada dá indícios de que o mecanismo primordial de exclusão dos M-RACNTs é a exclusão por tamanho.

Além das proteínas descritas acima, foi observado no pH=8 e na amostra do extrato extraído sem ajuste de pH, uma mancha de alta intensidade retida no fosso, mostrando que o caldo possui proteínas de massa maior que 100 kDa, pois essas não conseguem migrar no gel utilizado.

Em seguida, após a conclusão das análises, foi decidido realizar um processo univariável para estudar a influência do pH no método de extração utilizado, para verificar se as moléculas extraídas seriam diferentes, já que o caldo utilizado possui uma baixa concentração de proteínas e que a maior exclusão realizadas, são constituintes de outras macromoléculas existentes no caldo, que possivelmente também foram excluídas utilizando o mecanismo de exclusão por tamanho. Além do mais, esse foi o primeiro estudo preliminar realizado sobre a constituição proteica do caldo da espécie *Lasiodiplodia*.

## 5.5 ESTUDO UNIVARIADO DO PH DO CALDO DE FERMENTAÇÃO POR MEIO DO GC-MS

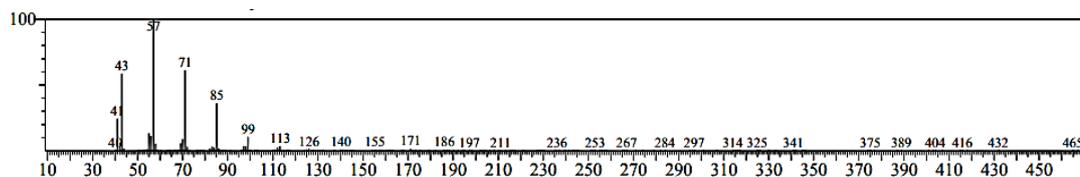
As amostras foram obtidas utilizando os mesmo processos descrito na seção 4.4, sendo assim, em cada pH analisado, foi realizado a análise de um ciclo de extração, resultando assim, em 18 amostras. Após a análise no GC-MS, observou que o pH não exerceu grande influência na extração, visto que em todos os extratos a identidade e área dos mesmos era muito similar, tanto para o acetato de etila, quanto para o clorofórmio e para o acetonitrila.

Portanto decidiu-se por trabalhar no pH 7,00, sendo este, próximo ao pH do caldo que é por volta 8,00. Posteriormente para realizar o processo de otimização foi escolhido apenas o extrato de clorofórmio, pois apresentou maior atividade antimicrobiana.

Como o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método analítico mais eficiente que o usualmente utilizado (ELL) e para demonstrar a possibilidade de otimização do método para compostos voláteis e semi-voláteis, melhorando sua extração, optou-se por escolher um hidrocarboneto para a realização destes testes. O composto em questão é o hexadecano, que apresentou tempo de retenção de 18,80 min e também foi identificado por GC-MS no estudo desenvolvido por GÓMEZ *et al.*, 2021.

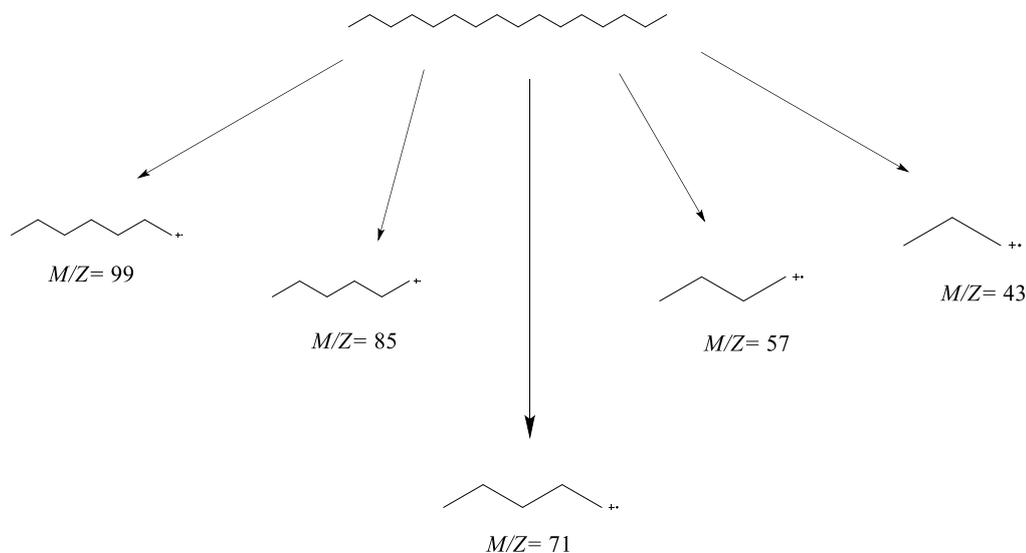
O espectro de massas está representado na figura 39 e a proposta de fragmentação na figura 40.

Figura 39 - Espectro de massa do Hexadecano.



Fonte: autor

Figura 40 - Proposta de fragmentação para o Hexadecano.



Fonte: autor

Como pode ser observado na Figura 40, o espectro obtido possui o pico íon base com razão  $m/z = 57,00$ , o que é característico dessa classe, além de apresentar uma fragmentação com perdas consecutivas de 14 u.m.a. Embora outros compostos presentes no extrato também poderiam apresentar atividade antimicrobiana, o hexadecano foi escolhido para a realização do planejamento experimental, para demonstrar a possibilidade de enriquecimento do extrato bruto para um determinado composto de interesse e melhorar as recuperações na etapa de fracionamento além de ser o composto majoritário no extrato.

## 5.6 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PARA GC-MS

Para a realização da otimização do processo de extração foi utilizado um planejamento fatorial fracionário, para quatro variáveis, sendo elas, massa de material ( $V_1$ ), tempo de adsorção ( $V_2$ ), volume de solvente ( $V_3$ ) e tempo de dessorção ( $V_4$ ), resultando em um planejamento  $2^{4-1}$ , com o intuito de avaliar os contrastes e selecionar as variáveis significativas.

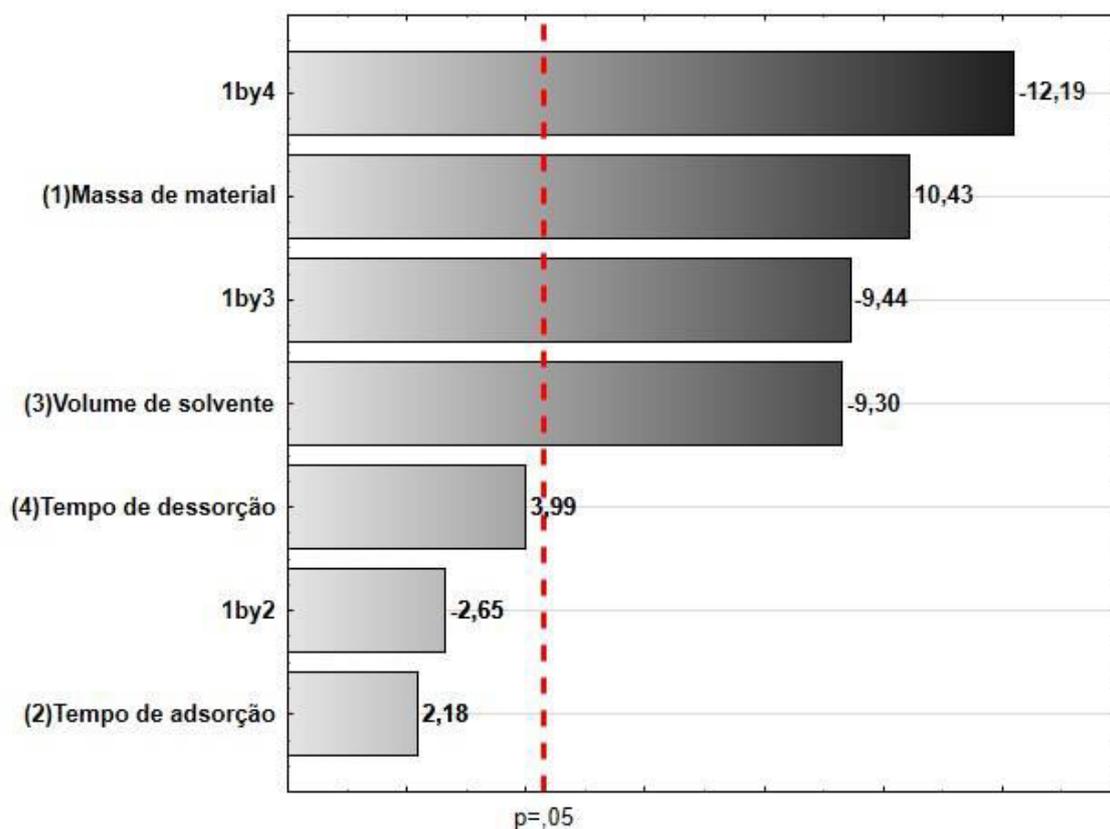
O processo de extração foi realizado para o pH 7,00 e o solvente extrator clorofórmio. Obteve-se no final 11 extratos, sendo 3 réplicas do ponto central. Como resposta analítica utilizou a área do composto selecionado anteriormente, com tempo de retenção 18,80 min. A resposta obtidas estão representadas na tabela abaixo:

Tabela 15 - Áreas obtidas por meio dos extratos analisados por GC-MS para o composto monitorado com tempo de retenção 18,80min.

Extrato	Área
1	2508128
2	13809654
3	11467682
4	17101321
5	9463118
6	9314696
7	4629124
8	5624906
9	8141263
10	9345364
11	8769847

Fonte: autor

Em seguida, por meio dos resultados foi realizado a investigação da significância dos contrastes estudados bem como suas interações ao nível de 95% de confiança a partir do gráfico de Pareto. A magnitude dos contrastes foi representada por colunas, e a linha vertical indica a significância estatística para  $p=0,05$ , ou seja, as variáveis com valores que ultrapassem a linha vertical são estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95% (ARAMABARI; GARCIA; MILLAN, 2000). A figura 41 apresenta o gráfico de Pareto obtido pelo programa *statistic*.

Figura 41 - Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ 

Fonte: autor

De acordo com o gráfico de Pareto, a variável mais significativa, ou seja, a que possui maior influência na resposta analítica obtida é a massa do material. Esta variável apresentou um contraste positivo (10,43), sendo assim, à medida que aumentamos a massa do material também aumentamos a resposta analítica obtida, portanto, pode-se interpretar que a melhor massa a ser utilizada é 150mg. Não foram estudados valores acima de 150 mg com o intuito de evitar o gasto excessivo de material. Portanto, optou-se por utilizar o valor do nível estudado.

Outra variável significativa é o volume de solvente, porém esta apresentou um efeito negativo (-9,30), sendo assim, pode-se dizer que o ideal é utilizar o nível baixo, pois quando aumentamos o volume de solvente consequentemente diminuimos a resposta analítica. Analisando quimicamente isto é justificável, pois aumentando o volume de solvente, consequentemente diluímos as amostras, reduzindo assim a resposta analítica. Portanto foi escolhido trabalhar com o nível baixo, sendo este, 3mL.

Já as variáveis tempo de adsorção e tempo de dessorção se apresentaram antes da linha vertical, ou seja, não são significativas, sendo assim, pode-se utilizar qualquer valor

que esteja dentro do domínio experimental. Ao analisar as interações entre as variáveis, observou-se que a interação mais significativa foi a 1x4, sendo este, um contraste negativo (-12,19), que apresentou ser mais significativos que as variáveis estudadas. Do ponto de vista químico isto é justificável, pois trata-se da interação entre a massa do material e o tempo de dessorção, sendo assim, quanto maior a massa do material maior o tempo de dessorção necessário.

Ao analisar os resultados obtidos da área do composto selecionado, percebe-se que a condição quatro resultou em uma maior resposta analítica. Na tabela abaixo seguem os valores reais e codificados da condição quatro com a resposta analítica obtida:

Tabela 16 - Valores codificados, valores reais e resposta analítica da condição quatro

Experimento	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	v <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	Resposta
4	150 (+1)	60 (+1)	3 (-1)	10 (-1)	17101321

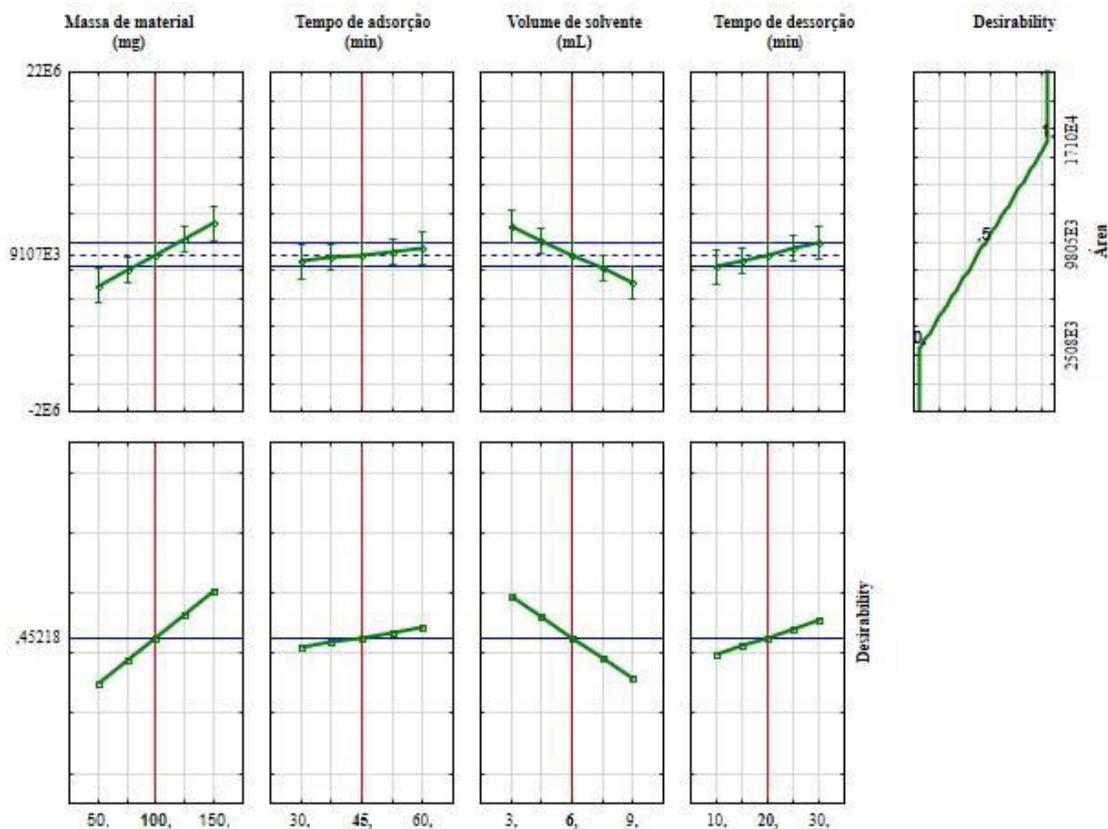
Fonte: Autor

Observa-se que esta é constituída pelo nível alto para a variável um e o nível baixo para a variável três, o que já foi confirmado como ideal ao analisar o gráfico de Pareto. Ao realizar a multiplicação dos valores codificados da variável um e quatro, espera-se a obtenção de um contraste negativo, o que foi observado no gráfico de Pareto. Sendo assim, pode-se concluir que esse contraste está se referindo a condição quatro.

Além dessa observação também há a interação 1x3 que foi significativa, e resultou em um contraste negativo (-9,44). Realizando novamente a multiplicação dos valores codificados da variável um e três, o resultado é um contraste negativo, confirmando novamente a condição quatro. Portanto, a condição quatro foi selecionada como a condição ideal de trabalho para a extração do hexadecano utilizando M-RACNTs.

Posteriormente, foi analisada a função de desejabilidade, com o objetivo de confirmar os valores otimizados para cada variável. A figura 42 apresenta o gráfico de perfis para os valores previstos e desabilidade para as variáveis otimizadas, o gráfico foi obtido pelo programa statistic.

Figura 42 - Gráfico de perfis para os valores previstos e a desejabilidade para as variáveis analisadas.



Fonte: Autor

Ao analisar o gráfico gerado para a variável massa de material, pode-se confirmar que à medida que se aumenta a massa do material, maior será a resposta analítica. Já no gráfico do tempo de adsorção, observa-se que qualquer valor que esteja dentro do domínio experimental pode ser utilizado. Nos gráficos referentes ao volume de solvente e ao tempo de dessorção, pode-se observar um decréscimo quando é utilizado o nível alto, portanto, o ideal é utilizar os valores do nível baixo.

Em seguida foi realizada a validação dos dados, isto é, se os valores previstos estão próximos aos valores experimentais obtidos experimentalmente. Primeiro foi analisada a regressão e a falta de ajuste obtida pelo planejamento, utilizando o teste F. A regressão foi avaliada a partir da razão entre a média quadrática da regressão ( $MS_{reg}$ ) e a média quadrática do resíduo ( $MS_{res}$ ). Espera-se que  $F_{cal} \geq F_{tab}$ , o que foi observado, indicando que o planejamento resultou em uma regressão significativa (Tabela 11). O segundo teste analisado foi o teste F relacionado à falta de ajuste, analisando-se a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste ( $MS_{lof}$ ) e do erro puro ( $MS_{pe}$ ). Espera-se que

o  $F_{cal} < F_{tab}$ , o que foi observado, sendo assim, o planejamento não apresentou falta de ajuste (Tabela 11).

Tabela 17 - Tabela ANOVA obtida no planejamento para o hexadecano.

	SS	MS	F_calculado	F_tabelado	Razão
Regressão	1,67E+14	5,58E+13	313,82	8,89	35,31
Resíduo	1,24E+12	1,78E+11			
Falta de ajuste	5,19E+11	5,19E+11	1,4306	18,5128	0,08
Erro puro	7,25E+11	3,63E+11			
Erro total	1,69E+14				

Fonte: Autor

Por meio dos resultados da tabela 11 pode-se observar que o planejamento possui um ótimo ajuste, visto a razão entre os valores é inferior a 1(0,08). Para confirmar se os valores obtidos estão próximos aos valores preditos, foi realizada a análise em porcentagem, comparando ambos os valores. Essa análise está representada na tabela abaixo:

Tabela 18 - Valores reais e valores preditos para a resposta analítica utilizada no planejamento experimental fatorial fracionário

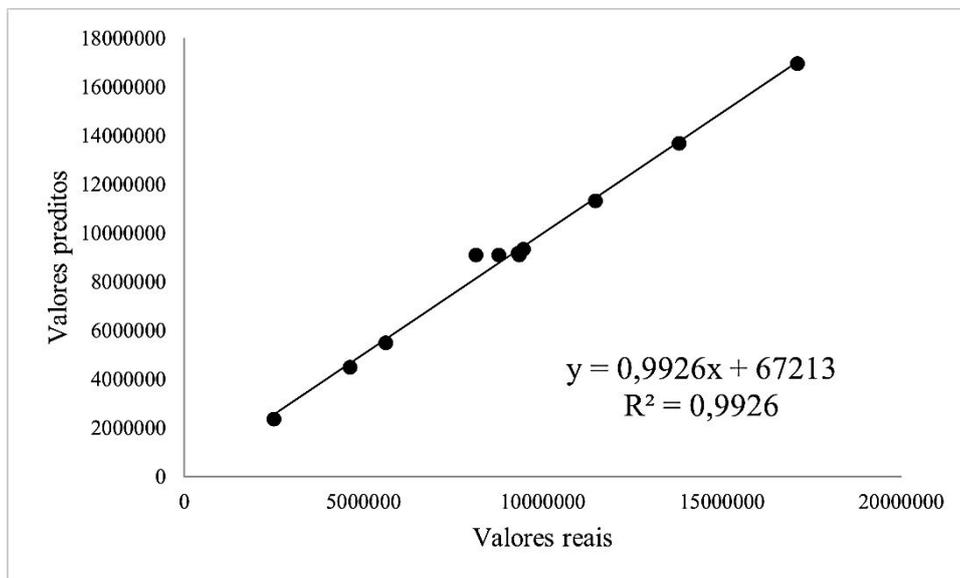
Experimento	Real	Predito	Exatidão (%)
1	2508128	2375127	106
2	13809654	13676653	101
3	11467682	11334681	101
4	17101321	16968320	101
5	9463118	9330117	101
6	9314696	9181695	101
7	4629124	4496123	103
8	5624906	5491905	102
9	8141263	9106828	89
10	9345364	9106828	103
11	8769847	9106828	96

Fonte: Autor

Como pode ser observado na tabela 12 os valores obtidos experimentalmente estão muito próximos dos valores esperados pelo planejamento proposto, sendo assim, pode-se concluir que o objetivo foi atingido, obter uma ótima condição de extração para o hexadecano. Na condição otimizada apenas 3 mL de solvente orgânico e 10 mL do caldo de fermentação são utilizados, o que é muito promissor visto que em ELL são

utilizadas grandes quantidades de caldo e de solvente. Com os valores da tabela 12 foi gerado o seguinte gráfico:

Figura 43 - Gráfico da comparação dos valores reais e preditos utilizando a equação da reta.



Fonte: autor

Na figura 43 os valores preditos são representados pela reta e os valores reais pelas esferas, pode-se perceber que os valores estão muito próximos resultando em um  $R^2$  de 0,9926, ou seja, os valores obtidos podem ser explicados 99% utilizando o planejamento proposto. Portanto conclui-se que a condição selecionada possui total confiabilidade, pois os resultados obtidos estão completamente dentro do esperado.

Por último foram obtidos os valores para os coeficientes das variáveis estudadas e das suas interações, com o objetivo de verificar quais são estatisticamente significativos. Os valores dos coeficientes obtidos com um grau de confiança de 95% estão representados na tabela abaixo:

Tabela 19 - Valores obtidos para os coeficientes das variáveis e de suas interações

Coef	Valores	IC	-95%	95%	Significativo
C <sub>0</sub>	9106828	781292,2	8325535	9888120	sim
C <sub>1</sub>	2222816	916146,3	1306669	3138962	sim
C <sub>2</sub>	465930	916146,3	-450217	1382076	não
C <sub>3</sub>	-1981868	916146,3	-2898014	-1065721	sim
C <sub>4</sub>	851511	916146,3	-64635	1767658	não
C <sub>12</sub>	-565460	916146,3	-1481607	350686	não
C <sub>13</sub>	-2010976	916146,3	-2927122	-1094829	sim
C <sub>14</sub>	-2596876	916146,3	-3513022	-1680729	sim

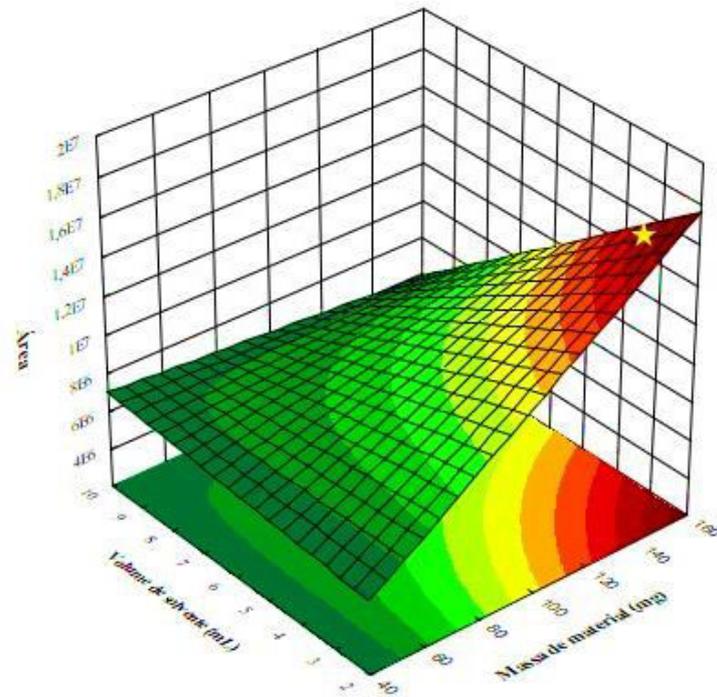
Fonte: Autor

Ao analisar os valores da tabela 13 observa-se que novamente apenas os coeficientes lineares da variável um e da variável três foram significativos, ou seja, novamente confirma-se influência da massa do material e do volume do solvente no processo de extração. Também foi verificado novamente se os coeficientes das interações 1x3 e 1x4 foram significativos. Estes foram selecionados e utilizados para plotar a superfície de resposta e o gráfico de contorno no programa Statistic.

As superfícies de respostas podem ser definidas como um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que possibilitam o ajuste de modelos empíricos para os dados experimentais em relação ao desenho experimental. Podem ser utilizadas em funções polinomiais, quadráticas ou lineares para descrever o sistema estudado, possibilitando a exploração das condições experimentais até a sua otimização (GUEDES, 2015).

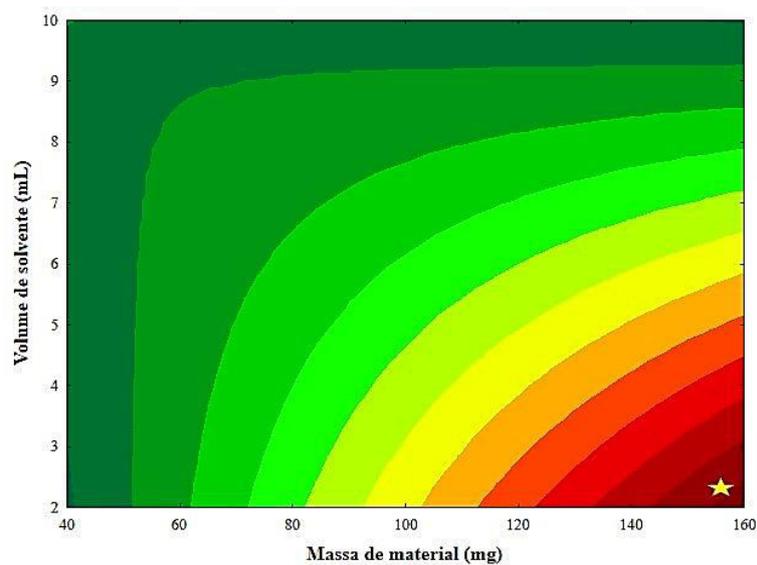
A figura 44 apresenta a superfície de resposta correspondente às variáveis massa de material e volume de solvente. De acordo com a superfície de resposta e o gráfico de contorno (Figura 45), é possível concluir que a maior resposta analítica é obtida com a diminuição do volume do solvente e o aumento da massa de material, esta área foi destacada com uma estrela, confirmando novamente que os melhores valores a serem utilizados são 150 mg de material e 3 mL de solvente de eluição.

Figura 44 - Superfície de resposta para as variáveis massa de material e volume de solvente.



Fonte: Autor

Figura 45 - Gráfico de contorno para variáveis massa de material e volume de solvente.

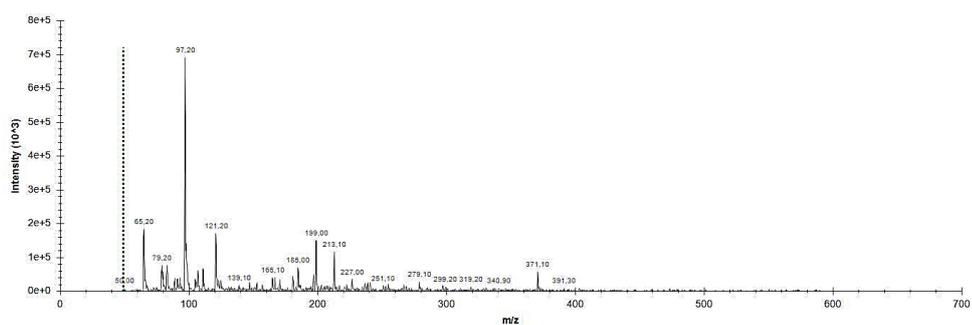


Fonte: Autor

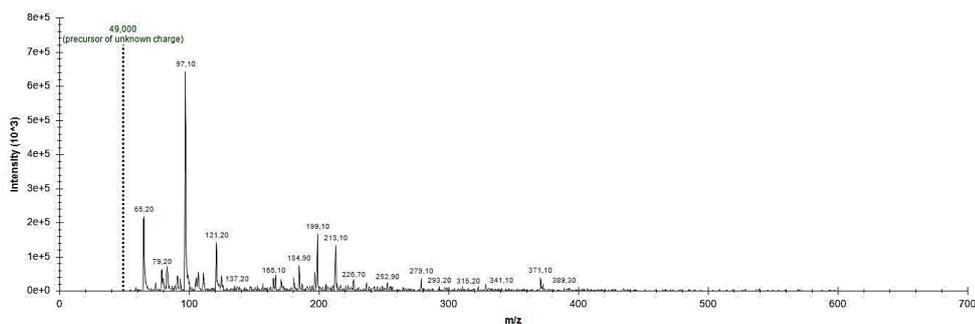
## 5.7 ANÁLISES DOS EXTRATOS BRUTOS E ESTUDO UNIVARIADO DO PH POR LC-MS

Primeiramente foram obtidos os *scans* dos extratos analisados do caldo em pH=7,00, sendo monitorados íons de  $m/z$  de 50 a 600. A figura 46A representa o scan obtido do extrato acetonitrila, a figura 46B é do extrato acetato de etila e a 46C do extrato clorofórmio. Pode-se analisar que em todos os *scans* obtidos há uma certa semelhança entre os íons observados.

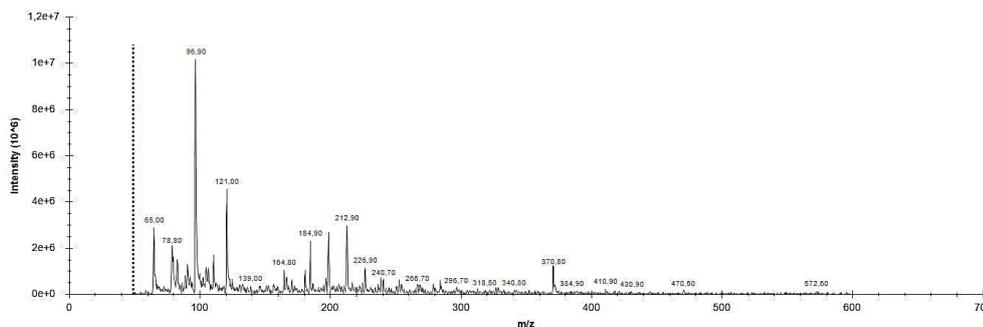
Figura 46 - Scans obtidos dos extratos analisados por LC-MS/MS: (A) Extrato acetonitrila; (B) Extrato acetato de etila e (C) Extrato clorofórmio.



(A)



(B)



(C)

Fonte: Autor

Em seguida foi realizada a comparação dos íons precursores presentes nas análises dos extratos obtidos com o caldo no pH= 3,00 e 7,00. Como houve semelhança nos extratos analisados, optou-se por realizar a análise no modo *Product Ion Scan* para todos os íons precursores que apresentaram áreas superiores a 10.000 mil. Na tabela abaixo são apresentados os precursores selecionados de todos os extratos em diferentes pHs:

Tabela 20 - Íons precursores selecionados nos extratos analisados.

(continua)

Acetato de etila		
Modo positivo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
106	121	121
147	177	177
166	111	111
199	213	213
222	284	284
263	312	279
121	334	288
177	279	284
213	316	316
284	359	327
312	313	341
334	344	359
279	370	281
302	391	313
316	419	344
327	550	370
341	121	391
359	165	419
346	181	550
391	185	121
419	199	165
550	227	185

Tabela 21 - Íons precursores selecionados nos extratos analisados.

(continuação)

Acetato de etila		
Modo positivo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
165		199
185		227
199		
227		
Modo negativo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
209	209	277
255	255	310
277	277	325
265	291	339
297	297	111
310	311	197
346	325	265
291	339	297
311	197	311
325	265	
339	297	
110	311	
195	326	
397	339	
453	397	
	453	
Acetonitrila		
Modo positivo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
106	111	106
115	213	147
121	284	166

Tabela 22 - Íons precursores selecionados nos extratos analisados.

(continuação)

Acetonitrila		
Modo positivo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
146	318	202
111	362	121
213	279	213
284	316	531
345	359	111
491	313	284
531	344	279
312	370	288
334	391	316
316	419	332
341	550	341
391	121	349
419	165	359
550	185	313
165	199	344
181	227	370
185		391
199		419
227		550
		332
		165
		185
		199
		227
Modo negativo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
209	209	277
255	255	291

Tabela 23 - Íons precursores selecionados nos extratos analisados.

(continuação)

Acetonitrila		
Modo negativo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
277	277	297
291	291	311
297	297	325
311	311	339
325	329	
	339	
	111	
	190	
	265	
	325	
	377	
	397	
	283	
Clorofórmio		
Modo positivo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
147	146	106
199	185	147
121	198	199
177	221	222
213	370	121
284	120	177
312	176	111
334	292	213
279	348	284
316	110	531
341	164	284
391	213	304

Tabela 24 - Íons precursores selecionados nos extratos analisados.

(continuação)

Clorofórmio		
Modo positivo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
550	227	279
185	266	313
165	284	334
227	531	370
	593	391
	341	550
	427	165
	449	185
	493	199
	537	227
	581	
	316	
	341	
	391	
	550	
	150	
	170	
	181	
Modo negativo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
209	265	277
255	277	291
277	297	297
311	311	311
325	325	325
339	339	339
	353	110
	110	197

Tabela 25 - Íons precursores selecionados nos extratos analisados.

(conclusão)		
Clorofórmio		
Modo negativo		
pH= 3,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 7,00 ( <i>m/z</i> )	pH= 9,00 ( <i>m/z</i> )
	265	265
	297	297
	325	397
	339	453
	397	283
	479	291
	533	
	569	

Fonte: Autor

Após a seleção dos íons precursores e a obtenção do MS/MS para cada um deles, prosseguiu-se com a análise na plataforma GNPS, visto que se trata de um grande conjunto de dados, a partir dos quais são gerados milhares de espectros de matrizes complexas. Assim, este tipo de análise necessita de estratégias que possibilitem a interpretação e comparação de forma mais dinâmica, o que é conseguido por meio do GNPS (YANG *et al.*, 2013).

A plataforma online GNPS é gratuita e é baseada em armazenamento, análise e divulgação de espectros MS/MS, além de permitir o compartilhamento comunitário de espectros brutos, agrupamento e criação de redes moleculares (WANG *et al.*, 2016). Essa ferramenta tem sido muito utilizada para acelerar a desreplicação de metabólitos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017) e auxiliar na possível identificação de moléculas conhecidas e novos metabólitos (TABOADA *et al.*, 2017).

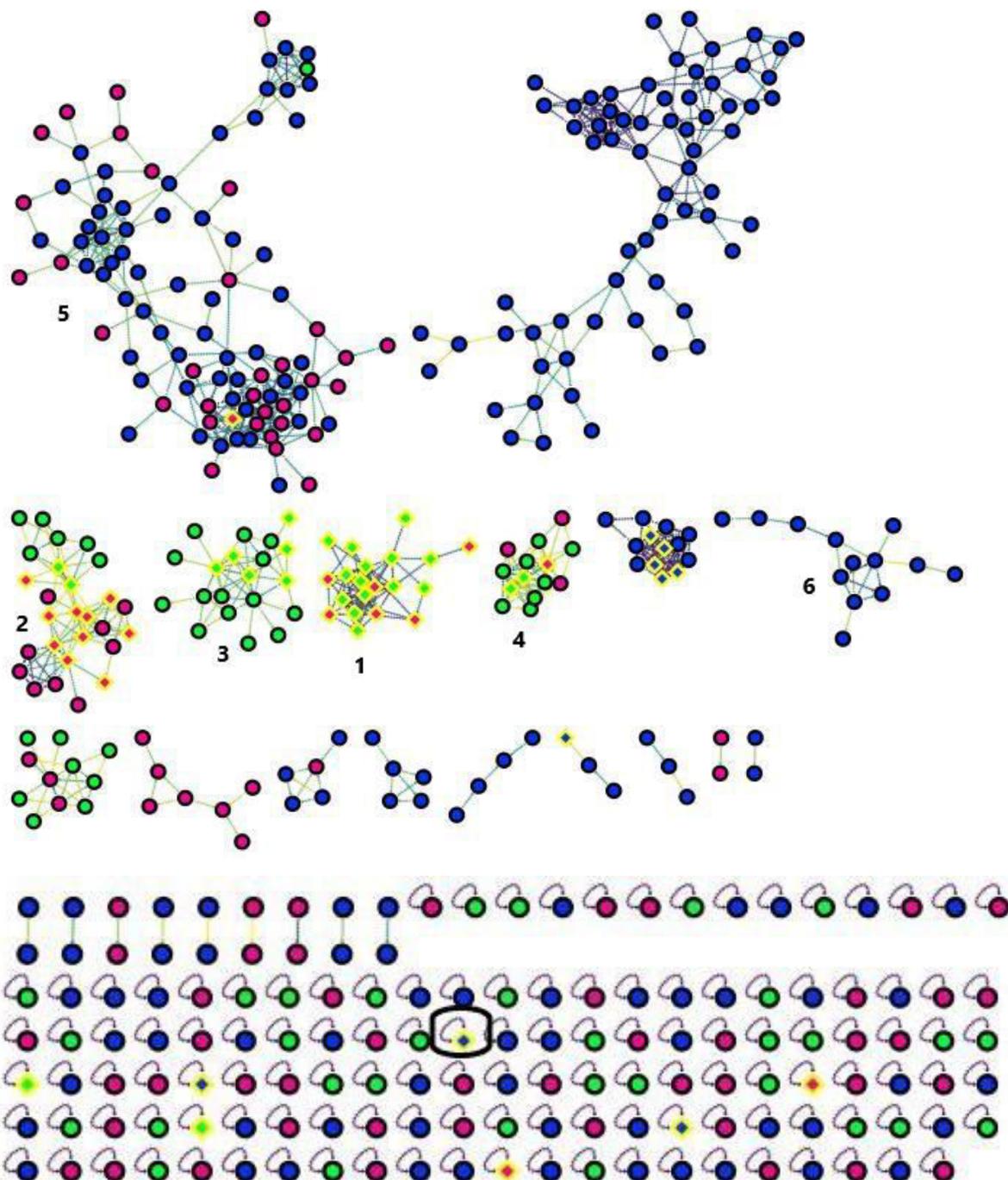
Sabendo-se do potencial dessa plataforma, os dados de MS/MS de todos os extratos obtidos do caldo de fermentação do fungo endofítico *Lasiodiplodia sp.*, foram analisados no GNPS e as redes moleculares para esses dados foram geradas com o intuito de se identificar quais substâncias e classes foram extraídas. As redes moleculares foram criadas conforme descrito anteriormente, tanto para o modo de ionização positivo, quanto para o negativo. Foram criadas três redes moleculares, uma para cada solvente analisado, relacionando-se os três extratos obtidos por cada solvente em diferentes pHs. Foi

escolhida essa estratégia, pois ao analisar os íons precursores selecionados, foi observado que os extratos apresentaram os mesmo íons, alterando apenas a área.

As redes moleculares foram editadas utilizando o software Cytoscape 3.8. As redes moleculares são formadas por nós (*node*), unidos pelas arestas (*edge*), dando origem aos grupos (*clusters*), que possuem metabolitos análogos e apresentam perfil de fragmentação semelhantes (SHANNON *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2016). Primeiramente foi realizado a edição das redes moleculares com o intuito de facilitar o seu entendimento. Os *nodes* foram organizados por meio dos íons precursores analisados para os extratos clorofórmio, acetato de etila e acetonitrila, sendo utilizado a coloração azul para os íons com  $m/z = 100$  a 199; a coloração rosa para os íons com  $m/z = 200$  a 299 e a coloração verde para os íons com  $m/z = 300$  a 500. Além disso foi utilizado a coloração amarela e o formato de losango para representar as classes e compostos identificados no GNPS.

As *edge* foram organizadas utilizando o cosseno no valor de 0,7 a 1, sendo que valor 1 indica espectros idênticos. Para separar o valores de cosseno, foi utilizado um padrão de coloração que se inicia no amarelo (0,7) e termina no azul (1), quanto mais forte a coloração azul, mais próximo do 1 está o valor de cosseno, portanto, mais confiável a identificação. Na imagem a seguir segue a rede molecular obtida pelo extrato acetato:

Figura 47 - Rede molecular obtida na plataforma GNPS da relação dos extratos acetato nos pHs 3,0, 7,0 e 9,0.



Fonte: Autor

No *cluster* destacado com o número um foi identificado o íon precursor  $m/z=311$ , apresentando fragmentação característica da classe flavonoides quando analisado no modo negativo, sendo correlacionado com esse node, os íons precursores  $m/z = 339, 325$  e  $297$ . Portanto, como apresentaram cosseno acima de 0,80 pode-se deduzir que eles

possuem uma estrutura bem semelhante com o  $m/z = 311$ , concluindo que se trata de flavonoides. Essa classe é muito encontrada em extratos do caldo de fermentação de fungos endofíticos, como foi discutido no referencial teórico.

A rede molecular também apresentou o íon precursor  $m/z = 279$ , sendo este identificado como sendo um metabólito da classe benzenoides ou da classe de lactonas, portanto, percebe-se que há duas classes que podem gerar um perfil de fragmentação bem semelhante. Esse *cluster 2* relaciona os íons precursores  $m/z = 279$  e  $391$ , sendo assim, possivelmente os íons pertencem a mesma classe de compostos.

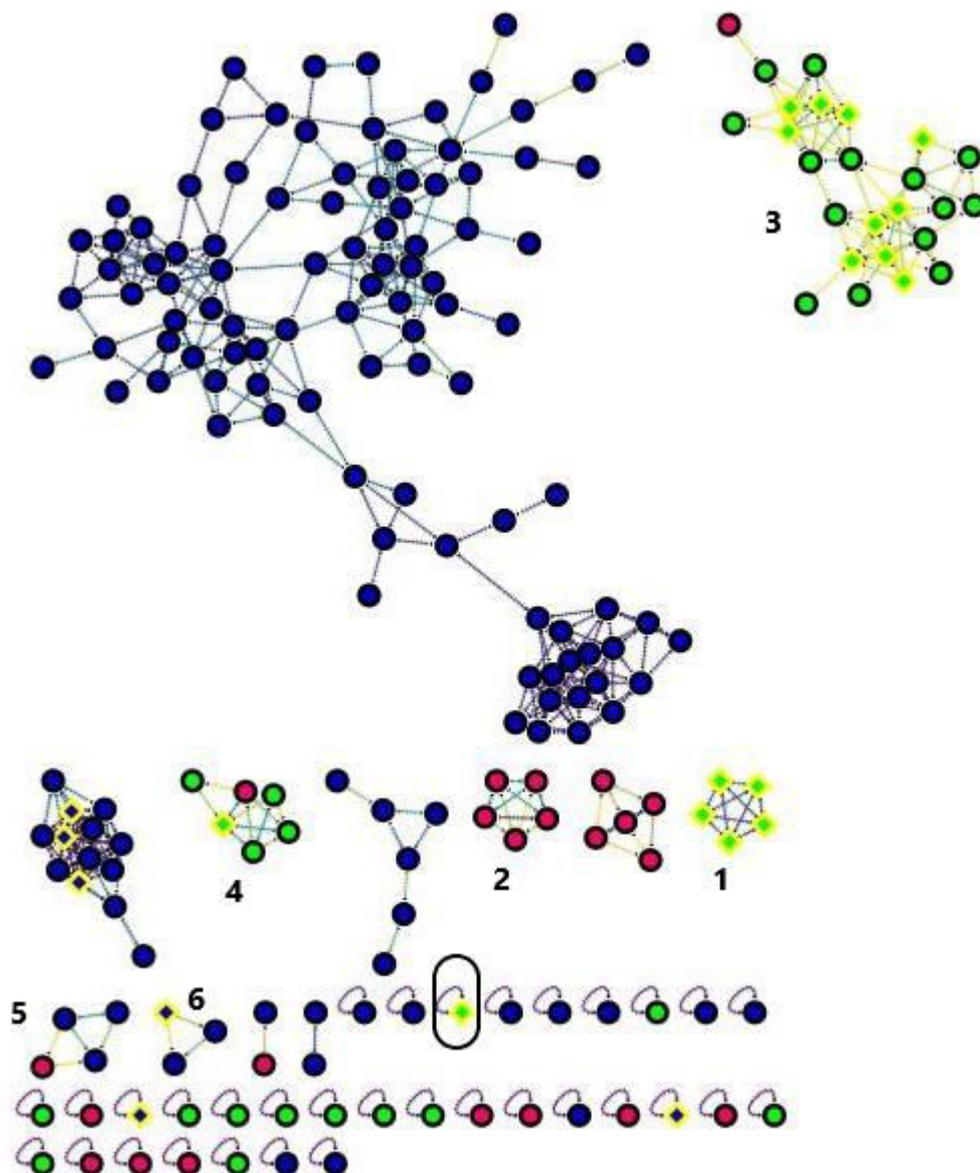
Os íons precursores com  $m/z = 359$  e  $341$ , formaram um cluster (3), são identificados como sendo compostos derivados de ácidos oleicos. O *cluster 4*, é constituído dos íons precursores  $m/z = 288$  e  $316$ , sendo identificados como metabólitos pertencentes a classe dos carboidratos.

O *cluster 5* é constituído pelos íons  $m/z = 213$ ,  $199$  e  $185$ . Este *cluster* chamou muito a atenção, pois o íon  $m/z = 213$  foi muito estudado em outros trabalhos com a espécie *Lasiodiplodia*, sendo isolados e identificados como metabólitos derivados do ácido jasmônico (OLIVEIRA, 2016).

Para o *cluster 6* não foi possível a identificação da classe, porém o que se observou foi que ele é constituído apenas do precursor  $m/z = 147$ , sendo assim, espera-se que esse íon possua uma estrutura bem diferente dos íons descritos acima. O mesmo ocorreu com  $m/z = 165$ , sendo que para este não foi criado nem um *cluster*, apenas um *node* identificado por um círculo. Dessa forma, sua estrutura também deve ser única dentre os metabólitos estudados.

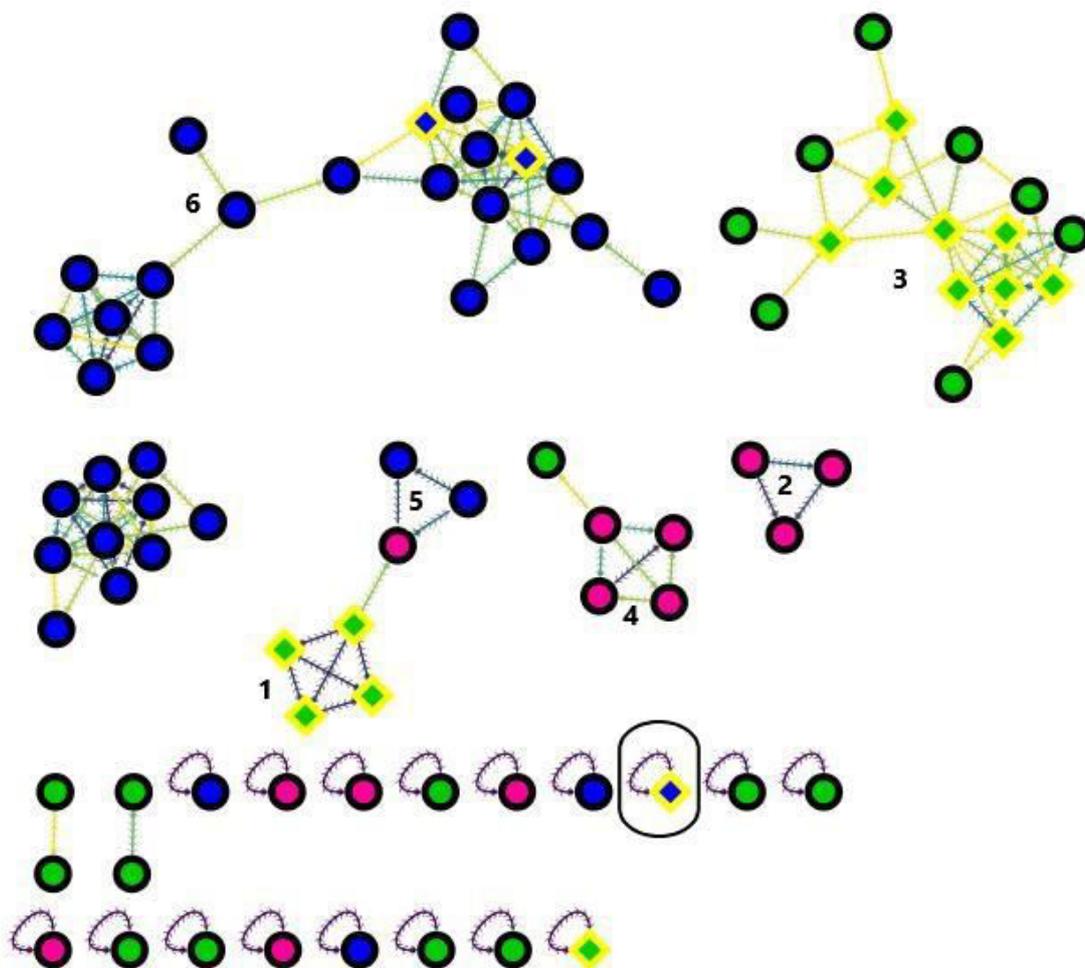
As análises das redes moleculares obtidas dos extratos clorofórmio e acetonitrila, demonstraram, praticamente, a presença das mesmas classes, sendo que a única diferença foi a ausência do íon precursor  $m/z = 391$ , sendo, elas representadas nas figuras 48 e 49.

Figura 48 - Rede molecular obtida na plataforma GNPS da relação dos extratos acetonitrila nos pHs 3,0 7,0 e 9,0.



Fonte: Autor

Figura 49 - Rede molecular obtida na plataforma GNPS da relação dos extratos clorofórmio nos pHs 3,0 7,0 e 9,0.

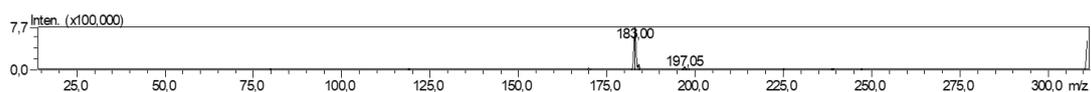


Fonte: Autor

Após as análises prévias na plataforma GNPS, sobre as possíveis classes, foi selecionado para o estudo da fragmentação os compostos constituintes dos clusters 1, 2, 5, 6 e o  $m/z=165$ . Os íons precursores que compõe o *cluster* 1, são:  $m/z=311, 339, 325$  e  $297$ . Na plataforma GNPS, foi gerado um *hit* para o íon  $m/z=311$  correlacionando-o com a 5,6,2'-trimetoxiflavona, apresentado selo bronze e o cosseno de 0,81.

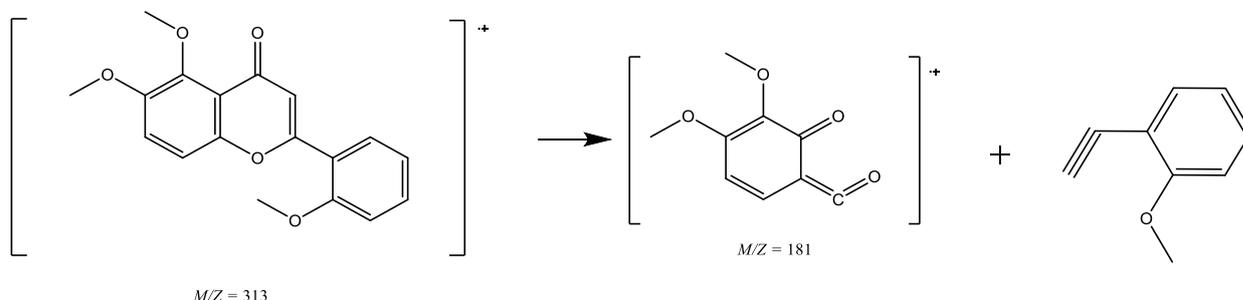
O estudo desenvolvido por Oliveira 2009, avaliou compostos dessa classe, auxiliando assim na proposta de fragmentação sugerida. A figura 50 representa o espectro de massas do íon precursor  $m/z=311$  e a figura 51 a fragmentação proposta para a geração do pico íon base.

Figura 50 - Espectro de massas obtido para o íon precursor  $m/z = 311$ .



Fonte: Autor

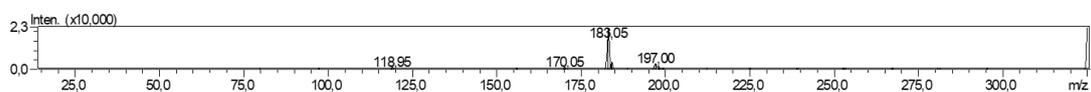
Figura 51 - Proposta de fragmentação para o 5,6,2' - trimetoxiflavona.



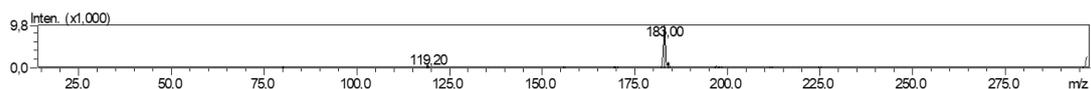
Fonte: Autor

Ao analisar os íons  $m/z = 339$ ,  $325$  e  $297$ , foi possível perceber que eles geraram espectros bem semelhante, apresentando o mesmo pico íon base  $m/z = 183,00$ , portanto, possivelmente se trata de alguma flavona com a estrutura bem semelhante à do íon precursor  $m/z = 311$ . Por isso, observamos suas correlações nas redes moleculares pelo cluster 1, confirmando são da classe dos flavonoides. Os espectros dos íons precursores  $m/z = 339$ ,  $325$  e  $297$  são apresentados na figura abaixo:

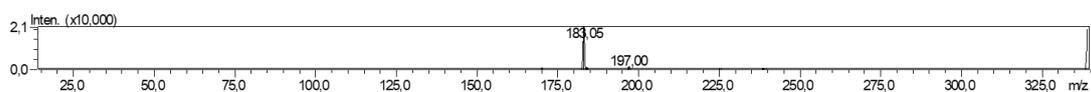
Figura 52 - Espectros de massas obtidos: (1)  $m/z = 325$ ; (2)  $m/z = 297$  e (3)  $m/z = 339$ .



(1)



(2)



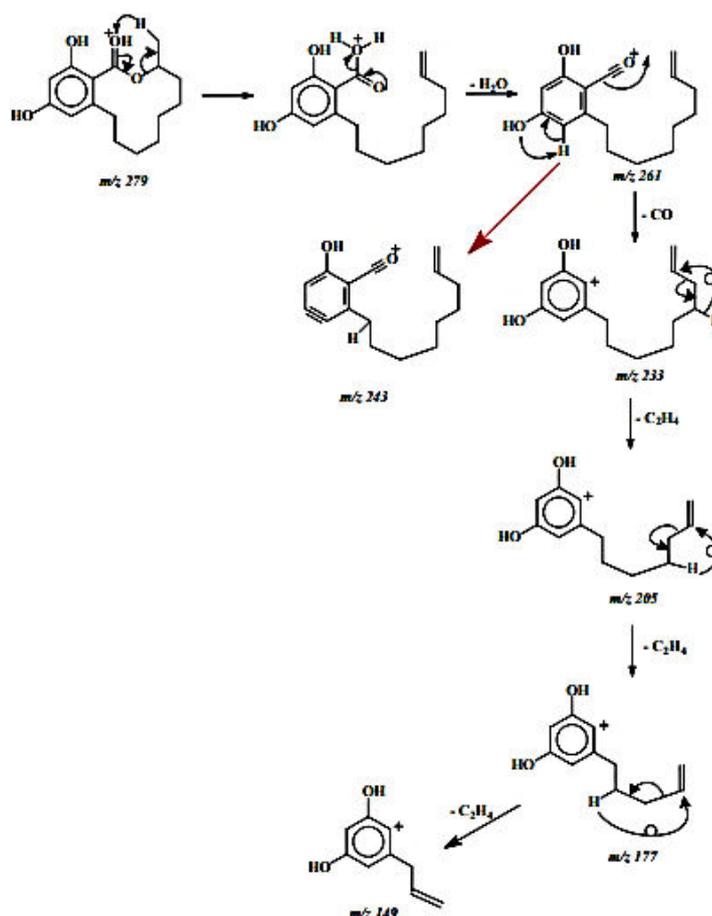
(3)

Fonte: Autor.

Em seguida foram analisados os íons precursores constituintes do *cluster 2*, sendo eles,  $m/z = 279$  e  $391$ . A fragmentação do íon  $m/z = 279$   $[M+H]^+$  gerou um pico íon base com  $m/z = 149$ . Em estudos realizados anteriormente com a espécie *Lasiodiplodia*, foi confirmado a extração de diversos compostos relacionados a lasiodiplodina, que são da classe da lactonas macrocíclicas (SILVA, 2016; SANTOS; MAGALHÃES, 1993). Compostos dessa classe apresentam atividade antimicrobiana, fitotóxica e citotóxica (SULTAN *et al.*, 2014).

No estudo realizado por Silva (2007), foi isolada e identificada a desmetil-lasiodiplodina, por LC-MS/MS (triplo quadrupolo). Tal composto, assim como neste estudo, foi analisado em modo positivo com um equipamento do mesmo tipo, gerando o precursor  $m/z = 279$  e o pico íon base  $m/z = 149,05$ . A figura abaixo descreve a proposta de fragmentação descrita pelos autores:

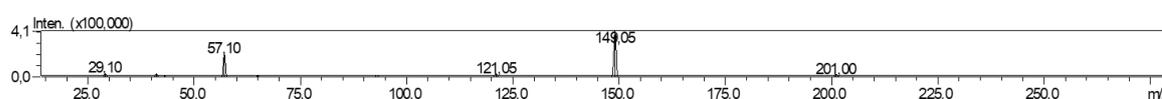
Figura 53 - Proposta de fragmentação para o desmetil-lasiodiplodina apresentada no estudo de SILVA (2007).



Fonte: SILVA (2007).

Ao analisar o espectro de massas da Figura 54, é possível verificar uma semelhança entre os resultados obtidos neste trabalho e os obtidos por Silva (2007), assim, existe a possibilidade de se tratar da mesma substância. Contudo, quando se comparou este resultado com os espectros na plataforma do GNPS, foi possível verificar uma similaridade do tipo bronze, com cosseno 0,80 para o composto Dibutil ftalato. Portanto, devido a utilização de tubos Falcon na extração, sabe-se que pode se tratar de um contaminante, pois esses compostos é utilizado na sua fabricação, para deixá-los mais maleáveis. Para uma confirmação de identidade, da desmetil-lasiodiplodina ou do contaminante, um estudo mais refinado seria necessário.

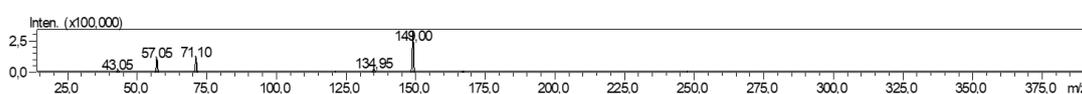
Figura 54 - Espectro de massa obtido para o precursor  $m/z = 279$ .



Fonte: Autor

Ao se analisar o íon precursor  $m/z = 391$   $[M+H]^+$ , observou-se que sua fragmentação também gerou pico íon base com  $m/z = 149,00$ , sendo seu espectro semelhante ao do precursor  $m/z = 279$ . Sendo assim, de acordo com o apresentado pelas redes moleculares, pode-se deduzir que esses compostos pertencem a mesma classe. O espectro de fragmentação do precursor  $m/z = 391$   $[M+H]^+$  é apresentado na figura 55.

Figura 55 - Espectro de massa obtido para o precursor  $m/z = 391$ .



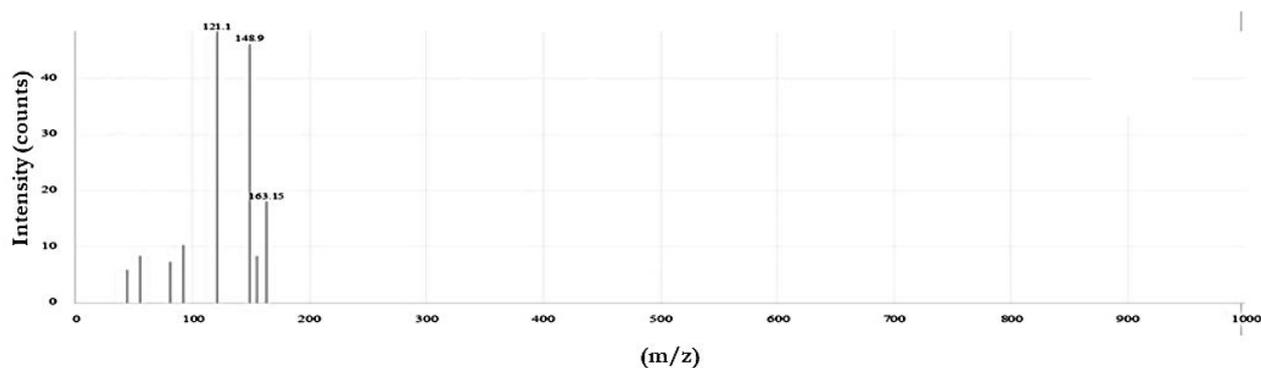
Fonte: Autor

O cluster 5 pode se referir a metabólitos derivados de ácido jasmônico, sendo esta classe já identificada na espécie *Lasiodiplodia* (OLIVEIRA, 2016), o cluster 6 e o node  $m/z = 165$  pode estar relacionado a metabólitos primários que são utilizados na defesa da planta.

Para o *cluster* 5, analisou-se o íon precursor  $m/z = 213$   $[M+H]^+$ , que apresenta o íon pico base de  $m/z = 121$  (Figura 56). Ao se comparar os resultados obtidos com os dados da literatura de compostos já isolados da família *Lasiodiplodia*, foi encontrado o

trabalho desenvolvido por Eng *et al.*, (2016), que estudou o caldo de fermentação do fungo *Lasiodiplodia Theobromae*. Neste, foi possível isolar e identificar compostos derivados do ácido jasmônico, que apresentou o perfil de fragmentação semelhante ao obtido neste estudo.

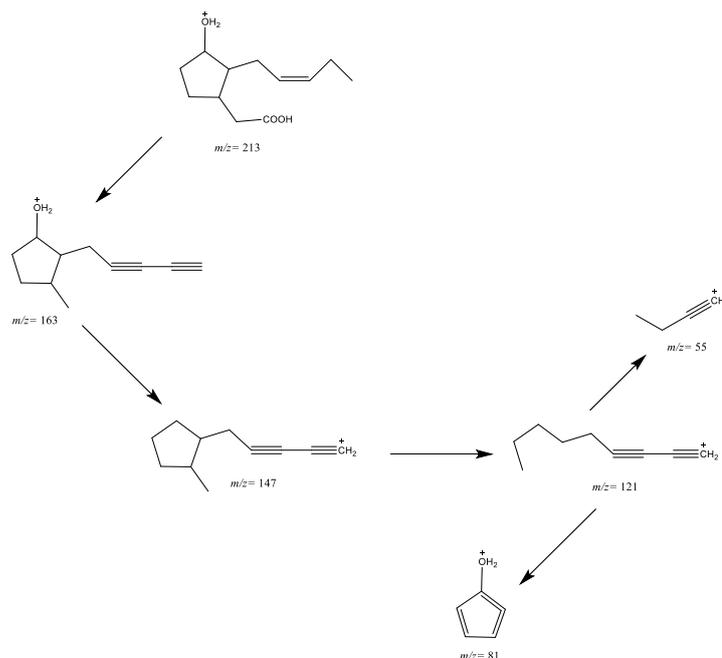
Figura 56 - Espectro de massas obtido do íon precursor  $m/z = 213$ .



Fonte: Autor

Um destes derivados apresenta massa molar igual a 212 g/mol, o pico íon molecular era o  $m/z = 213$  (análise no modo positivo) é o ácido  $5\beta$  – cucurbico, que exibe atividade fitotóxica e citotóxica. Devido à similaridade dos espectros obtidos no estudo de Eng *et al.*, (2016) e os obtidos neste trabalho, supõe-se tratar da mesma substância. A estrutura do metabólito e a proposta de fragmentação estão representadas na figura abaixo:

Figura 57 - Proposta de fragmentação para o íon precursor  $m/z = 213$ .

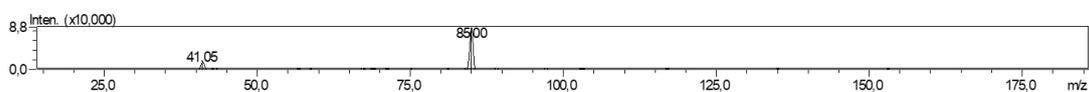


Fonte: Autor

Outro íon precursor constituinte desse cluster é o  $m/z = 185 [M+H]^+$ , que possivelmente possui uma semelhança estrutural com o íon  $m/z = 213$ , no entanto este apresentou apenas o pico íon base  $m/z = 85,00$  (Figura 58), já relatado na literatura por He *et al.*, 2004. Neste estudo faz-se menção a dois compostos que apresentaram o mesmo íon molecular, sendo eles, (3S,4R)-3-carboxi-2-metileno-heptan-4-olida e o ácido decumbico (Figura 59). Os autores descreveram que ambos os composto são toxinas responsáveis pelo aparecimento de manchas pretas na superfície do fruto infectado por essa classe de fungo, sendo sua identificação importante para um melhor entendimento da patogênese de doenças e facilitar programas de rastreamento de plantas resistentes.

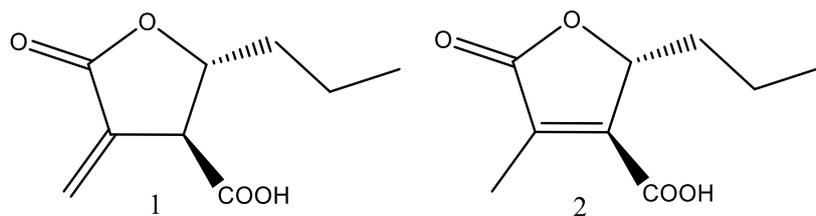
Devido à similaridade dos resultados obtidos pelos autores com os resultados obtidos neste estudo (mesmos picos íon molecular e base), acredita-se que pode se tratar de um desses compostos.

Figura 58 - Espectro de massas obtido para o íon precursor  $m/z = 185$ .



Fonte: Autor

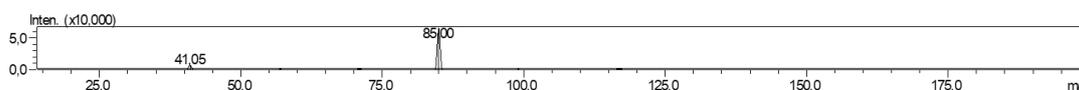
Figura 59 - Estruturas do (3S,4R) -3-carboxi-2-metileno-heptan-4-olida (1) e o ácido decumbico (2).



Fonte: HE *et al.*, 2004.

Ao analisar suas estruturas observa-se que, o que as difere, praticamente é a existência de um heteroatomo no anel de cinco membros, por isso, elas devem ter sido agrupadas nas RM, constituindo o *cluster 5*. O último íon precursor do *cluster 5* é o  $m/z = 199$ , que apresentou um espectro de massas idêntico aos dos precursores  $m/z = 185$ , portanto, esse precursor pode ter sido gerado por algum composto referente a mesma classe isolada e identificada no estudo de He *et al.*, 2004, podendo até mesmo se tratar de uma nova toxina, pois não foram encontrados estudos que descrevessem outras toxinas identificadas dessa classe. Na figura abaixo está representado o espectro de massas obtido.

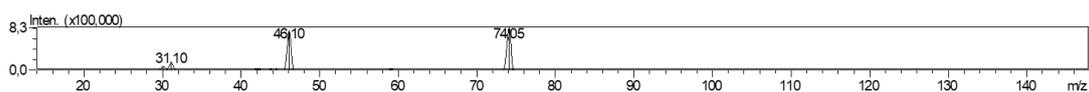
Figura 60 - Espectro de massas obtido para o íon precursor  $m/z = 199$ .



Fonte: Autor

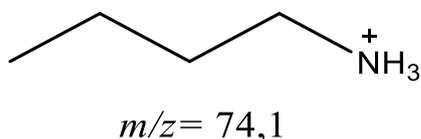
O *cluster 6* apresentou o íon precursor  $m/z = 147$   $[M+H]^+$ , cuja fragmentação gerou o pico íon base com  $m/z = 74,05$  (Figura 61). O GNPS forneceu um perfil de fragmentação semelhante ao da lisina com cosseno de 0,80. Os aminoácidos são comumente encontrados no caldo de fermentação de fungos endofíticos, trata-se de um metabolito primário. No estudo desenvolvido por ABDELNUR (2010) foi obtido o espectro de massas da lisina por ESI(+)-MS/MS, cujo íon precursor foi  $m/z = 147$ . Segundo os autores o pico íon base é obtido pelo perfil de fragmentação apresentado na figura 62.

Figura 61 - Espectro de massas obtido para o íon precursor  $m/z= 147$ .



Fonte: Autor

Figura 62 - Principal fragmento obtido no espectro de massas da Lisina.



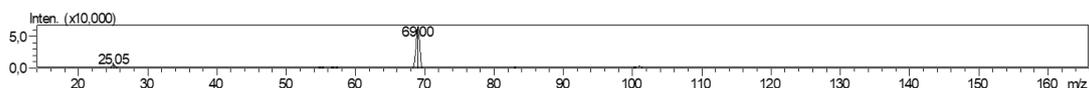
Fonte: ABDELNUR (2010).

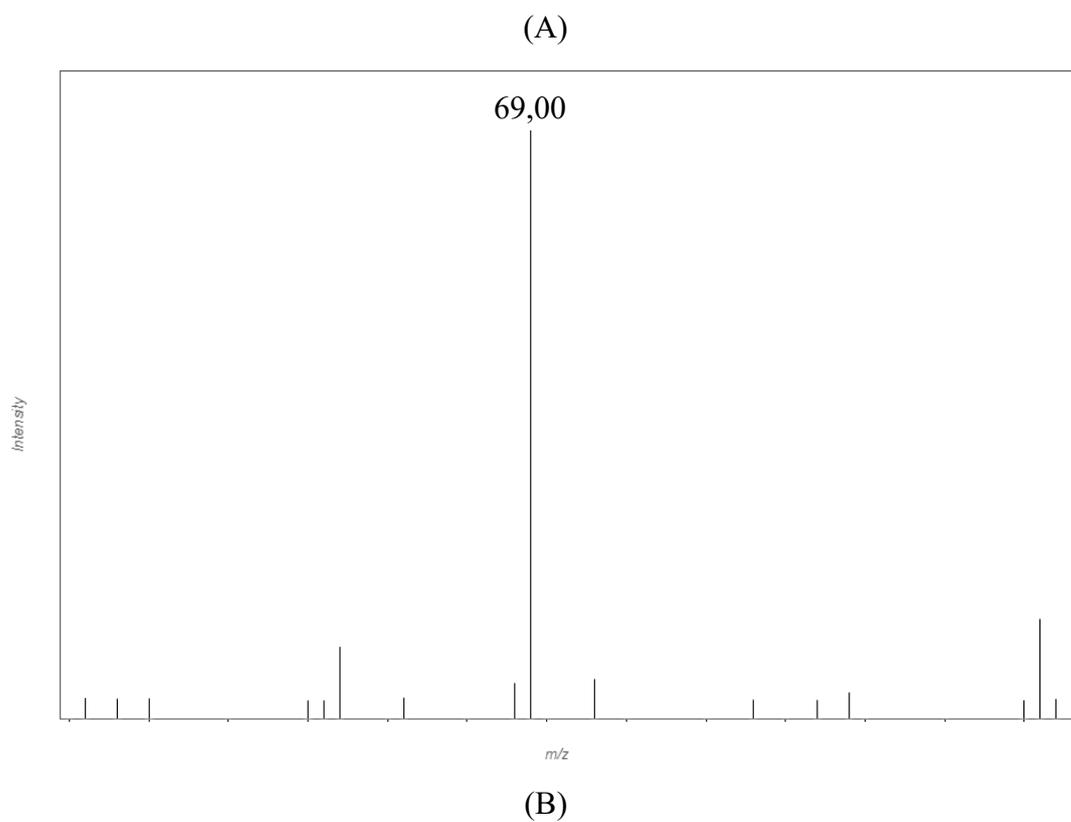
Após a análise do perfil de fragmentação é possível inferir que a substância em questão possivelmente é a lisina e que esta não apresentava nenhuma relação estrutural como nenhum outro íon precursor analisado.

Um outro íon precursor que também não apresentou correlação com nenhum outro foi o  $m/z= 165 [M+H]^+$ , cuja fragmentação gerou um pico íon base  $m/z= 69,00$ .

No GNPS ele foi identificado como sendo o 1,5 anidrosorbitol, apresentando selo bronze, um cosseno de 0,83 e o mesmo pico íon molecular. As condições de análise foram muito similares às utilizadas neste estudo, diferindo apenas na energia de colisão. Dessa forma, possivelmente, trata-se do mesmo composto. A figura 63 representa a comparação do espectro de massas obtido e o espectro de massa fornecido pelo GNPS. A figura 64 traz a possível estrutura identificada.

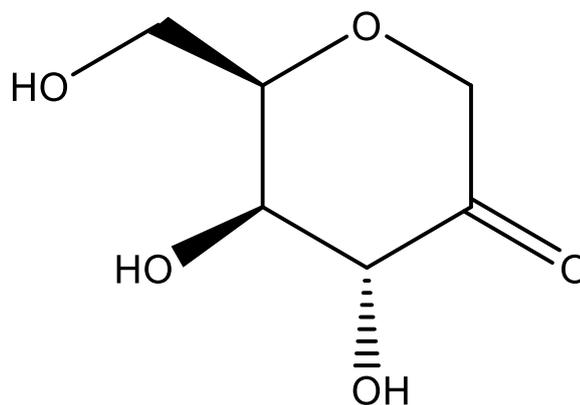
Figura 63 - Espectro de massas obtido pelo íon precursor  $m/z= 165$ . (A) experimental e (B) GNPS.





Fonte: Autor e GNPS.

Figura 64 - Possível estrutura química identificada no GNPS para o íon precursor  $m/z=165$ .



1,5 anidrosorbitol

Fonte: GNPS.

O 1,5 anidrosorbitol possivelmente se trata de um metabolito primário e na literatura há relatos da utilização deste composto para o tratamento de diabetes mellitus do tipo 1 e 2.

Após a realização das análises dos íons precursores, optou-se por utilizar o mesmo planejamento multivariado realizado nas análises por GC-MS. Neste sentido, o objetivo foi demonstrar que é possível melhorar as condições de extração para um determinado composto e melhorar sua recuperação. Para a otimização foram selecionados os íons precursores com  $m/z= 213$  e  $185$ , o primeiro possivelmente se trata de um derivado de ácido jasmônico e o segundo de uma toxina.

#### 5.8 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PARA A OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO NO LC-MS

A otimização das análises por LC-MS foi realizada de forma idêntica ao que foi feito para as análises por GC-MS. Sendo assim os 11 extratos clorofórmicos, sendo 3 experimentos réplicas do ponto central foram avaliados utilizando o método para LC-MS descrito anteriormente no item 4.8. Como resposta analítica utilizou-se a área dos íons precursores com  $m/z= 185$  e  $213$ . Primeiramente serão descritos os resultados obtidos para íon precursor  $m/z= 185$ . As respostas obtidas estão representadas na tabela abaixo:

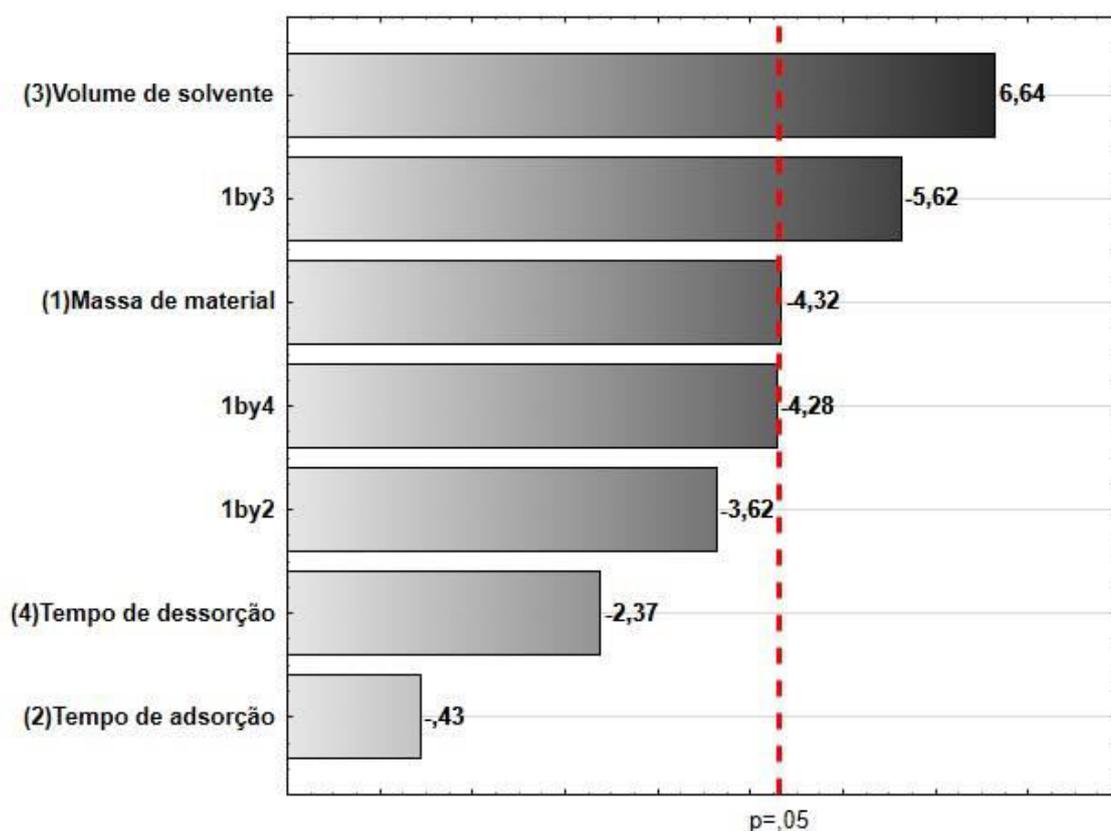
Tabela 26 - Áreas obtidas por meio dos extratos analisados por LC-MS/MS para o íon precursor  $m/z= 185$ .

Extrato	Área
1	7893690
2	8278804
3	8663345
4	8670266
5	10032876
6	9437051
7	10226573
8	7818884
9	9411104
10	9608174
11	9181864

Fonte: Autor.

De posse dos resultados foi realizada a investigação da significância dos contrastes estudados bem como suas interações ao nível de 95% de confiança, a partir do gráfico de Pareto. A magnitude dos contrastes foi representada por colunas e a linha vertical indica a significância estatística para  $p=0,05$ , ou seja, as variáveis com valores que ultrapassem a linha vertical são estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95% (ARAMABARI; GARCIA; MILLAN, 2000). A figura 65 apresenta o gráfico de Pareto obtido pelo programa statistic.

Figura 65 - Gráfico de Pareto obtido do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  para o íon precursor  $m/z=185$ .



Fonte: Autor

De acordo com o gráfico, a variável mais significativa, ou seja, a que possui maior influência na resposta analítica obtida é o volume de solvente. Esta variável apresentou um contraste positivo (6,64), sendo assim, à medida que se aumenta o volume de solvente também se aumenta a resposta analítica obtida, assim o melhor volume a ser utilizado é 9 mL. Não foram estudados valores acima de 9 mL visto que uma das propostas do método é minimizar o gasto de solventes orgânicos.

Outra variável significativa é a massa de material, porém esta apresentou um contraste negativo (-4,32), sendo assim, pode-se dizer que o ideal é utilizar o nível baixo, pois quando se aumenta a massa do material diminui-se a resposta analítica, sendo assim, o ideal é utilizar 50 mg. Pode-se observar as respostas obtidas aqui são inversas às encontradas para as análises por GC-MS. Isto ocorre porque os compostos analisados por GC e LC possuem características físico-químicas distintas. No caso dos compostos de íon precursor  $m/z=185$ , há um indicativo de que este fique mais fortemente sorvido ao material, provavelmente na camada externa de BSA que possui característica mais polar, o que dificulta a sua remoção na etapa de eluição. Assim, menores quantidades de sorventes e maiores quantidades de solventes favorecem maiores recuperações.

Semelhante aos resultados obtidos por GC-MS, as variáveis tempo de adsorção e tempo de dessorção também se apresentaram antes da linha vertical, ou seja, não são significativas, sendo assim, pode-se utilizar qualquer valor que esteja dentro do domínio experimental. Ao analisar as interações entre as variáveis, observou-se que a única interação significativa foi a 1x3, sendo um contraste negativo (-5,62). Isto é justificável pois trata-se da interação da massa do material com o volume de solvente.

Ao analisar as respostas analíticas obtidas selecionado, percebe-se duas condições que fornecem maiores respostas analíticas, sendo elas, a 5 e 7. Na tabela abaixo são demonstrados os valores reais e codificados das condições, bem como a resposta analítica obtida:

Tabela 27 - Valores codificados, valores reais e resposta analítica das condições 5 e 7.

Experimento	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	v <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	Resposta
5	50,00 (-1)	30,00 (-1)	9,00 (+1)	30,00 (+1)	10032876
7	50,00 (-1)	60,00 (+1)	9,00 (+1)	10,00 (-1)	10226573

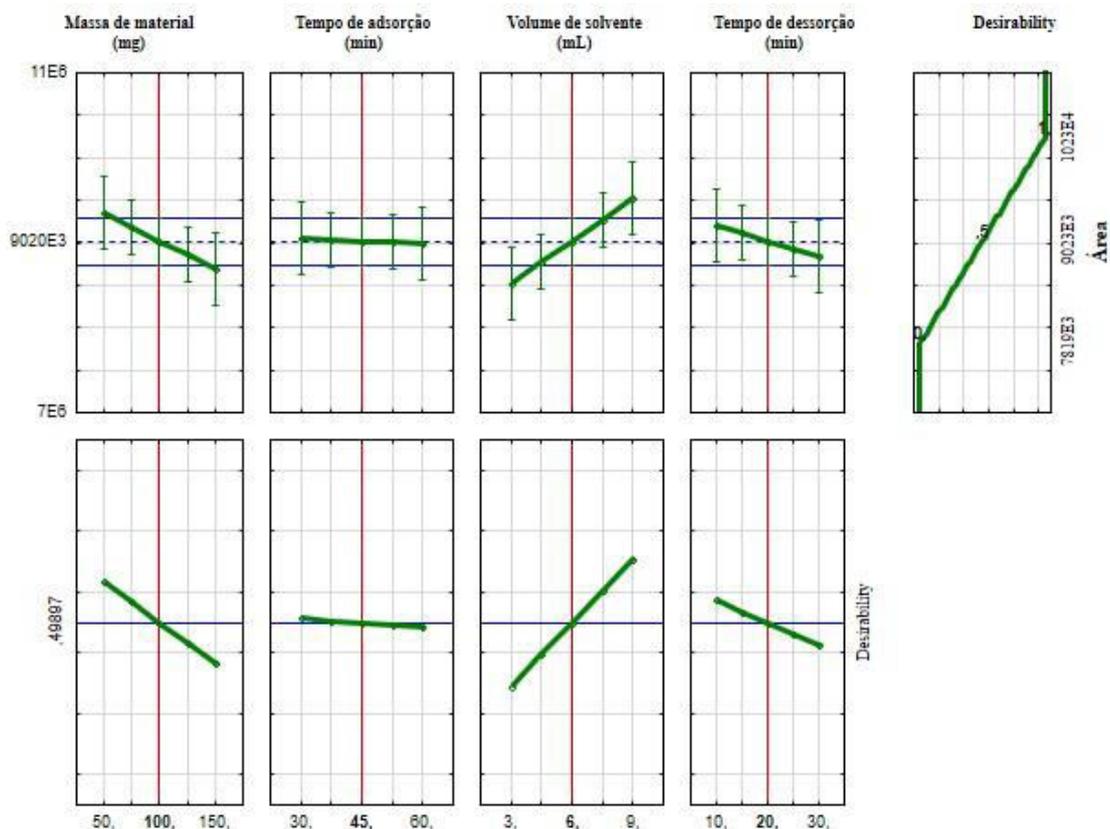
Fonte: Autor

Ao analisar a condições 5 e 7 observa-se que elas são constituídas pelo nível baixo para a variável um e o nível alto para a variável três. Como ambas as condições apresentaram áreas próximas, ambas podem ser utilizadas como condição ideal para a extração do analito.

A função de desejabilidade foi analisada com o objetivo de confirmar os valores otimizados para cada variável. A figura 66 apresenta o gráfico de perfis para os valores

previstos e desejabilidade para as variáveis otimizadas, o gráfico foi obtido pelo programa statistic.

Figura 66 - Gráfico de perfis para os valores previstos e a desejabilidade para as variáveis analisadas.



Fonte: Autor

Ao analisar o gráfico gerado para a variável massa de material, pode-se confirmar que, à medida que ela é aumentada, menor será a resposta analítica, confirmando que o ideal seria utilizar o nível baixo otimizado, ou seja, 50 mg. Já para gráfico do tempo de adsorção, observa-se que qualquer valor que esteja dentro do domínio experimental pode ser utilizado. No gráfico referente ao volume de solvente pode-se observar um decréscimo da resposta quando se utiliza o nível baixo, portanto, o ideal é utilizar os valores do nível alto, 9 mL. Quanto ao tempo de dessorção, mesmo não sendo significativo, observa-se um pequeno decréscimo quando se utiliza o nível alto. A condição 7 apresentou um aumento na área em relação à condição 5, que utiliza o nível alto para essa variável, portanto, essa observação pode indicar que o ideal para o método de extração é a condição experimental 7.

Posteriormente foi realizada a validação dos dados, isto é, se os valores previstos estão próximos aos valores experimentais. Primeiro foi analisada a regressão e a falta de ajuste, utilizando o valor de F. A regressão foi avaliada a partir da razão entre a média quadrática da regressão ( $MS_{reg}$ ) e a média quadrática do resíduo ( $MS_{res}$ ). Espera-se que o  $F_{cal} \geq F_{tab}$ , o que foi observado. Isso indica que o planejamento resultou em uma regressão significativa (Tabela 17). O segundo teste avaliado foi o teste F relacionado à falta de ajuste, analisando-se a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste ( $MS_{lof}$ ) e do erro puro ( $MS_{pe}$ ). Espera-se que o  $F_{cal} < F_{tab}$ , o que foi observado, sendo assim, o planejamento não apresentou falta de ajuste (Tabela 17).

Tabela 28 - Tabela ANOVA obtida no planejamento para o íon precursor  $m/z=185$

	SS	MS	F_calculado	F_tabelado	Razão
Regressão	6,00E+12	2,00E+12	20,39	8,89	2,29
Resíduo	6,87E+11	9,82E+10			
Falta de ajuste	5,96E+11	5,96E+11	13,0948	18,5128	0,71
Erro puro	9,10E+10	4,55E+10			
Erro total	6,69E+12				

Fonte: Autor

Por meio dos resultados da tabela 17 observou-se que o planejamento possui um ótimo ajuste, visto que a razão entre os valores  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  é inferior a 1,00 (0,71). Para confirmar se os valores obtidos estão próximos aos valores preditos, foi realizada a análise em porcentagem. Essa análise está representada na tabela abaixo:

Tabela 29 - Valores reais e valores preditos para a resposta analítica utilizada no planejamento experimental fatorial fracionário.

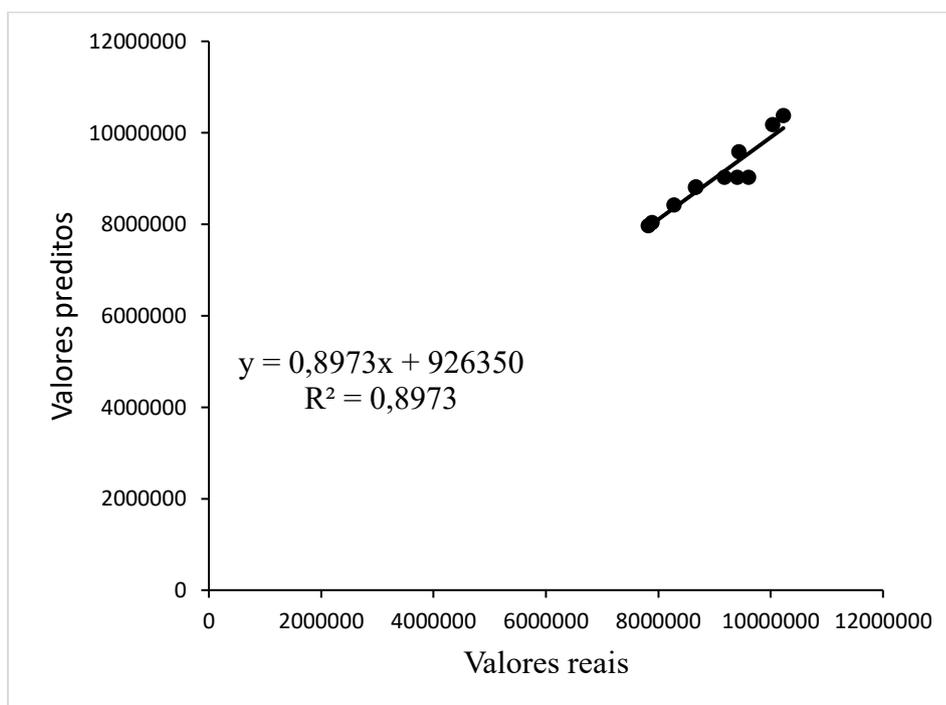
Experimento	Real	Predito	Exatidão (%)
1	7893690	8036243	98
2	8278804	8421357	98
3	8663345	8805898	98
4	8670266	8812819	98
5	10032876	10175429	99
6	9437051	9579604	99
7	10226573	10369126	99
8	7818884	7961437	98
9	9411104	9020239	104
10	9608174	9020239	107
11	9181864	9020239	102

Fonte: Autor

Como pode ser observado na tabela 18, os valores obtidos experimentalmente estão muito próximos dos valores esperados pelo planejamento propostos, o que garante a confiabilidade do modelo proposto.

Com os valores da tabela 18 foi gerado o seguinte gráfico:

Figura 67 - Gráfico da comparação dos valores reais e preditos utilizando a equação da reta.



Fonte: Autor

Na figura 67 os valores preditos são representados pela reta e os valores reais pelas esferas. Pode-se perceber que os valores estão muito próximos, resultando em um  $R^2$  de 0,8973, ou seja, os valores obtidos podem ser explicados 89% pelo modelo, o que para uma amostra biológica complexa é considerado muito bom.

Por último foram obtidos os valores para os coeficientes das variáveis estudadas e das suas interações, com o objetivo de verificar quais são estatisticamente significativos. Os valores dos coeficientes obtidos com um grau de confiança de 95% estão representados na tabela abaixo.

Tabela 30 - Valores obtidos para os coeficientes das variáveis e de suas interações.

Coef	Valores	IC	-95%	95%	Significativo
C <sub>0</sub>	9020239	64329,62	8743451	9297027	Sim
C <sub>1</sub>	-326435	75433,16	-650998	-1872	Sim
C <sub>2</sub>	-32919	75433,16	-357482	291644	Não
C <sub>3</sub>	501160	75433,16	176597	825723	Sim
C <sub>4</sub>	-179209	75433,16	-503772	145354	Não
C <sub>12</sub>	-273757	75433,16	-598320	50806	Não
C <sub>13</sub>	-424444	75433,16	-749006	-99881	Sim
C <sub>14</sub>	-323198	75433,16	-647761	1364	Não

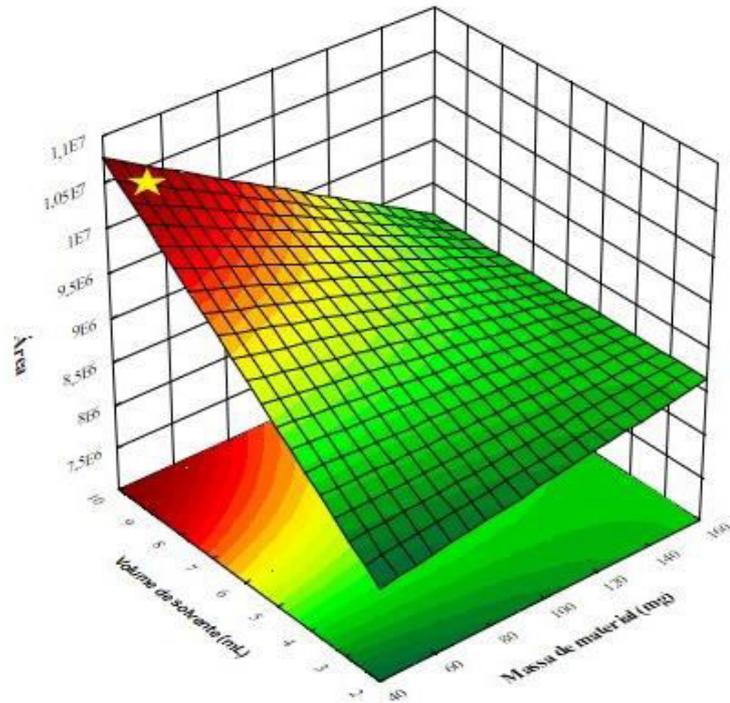
Fonte: Autor

Ao analisar os valores da tabela 19 observa-se novamente apenas os coeficientes lineares das variáveis um e três foram significativos, confirmando novamente a influência da massa do material e do volume do solvente no processo de extração. Também foi que o coeficiente da interação 1x3 foi significativo e que foi discutido anteriormente.

A figura 68 apresenta a superfície de resposta correspondente às variáveis massa de material e volume de solvente. De acordo com a superfície de resposta e o gráfico de contorno (Figura 69) é possível concluir que a maior resposta analítica é obtida com o aumento do volume do solvente e a diminuição da massa de material. Esta área foi destacada com uma estrela.

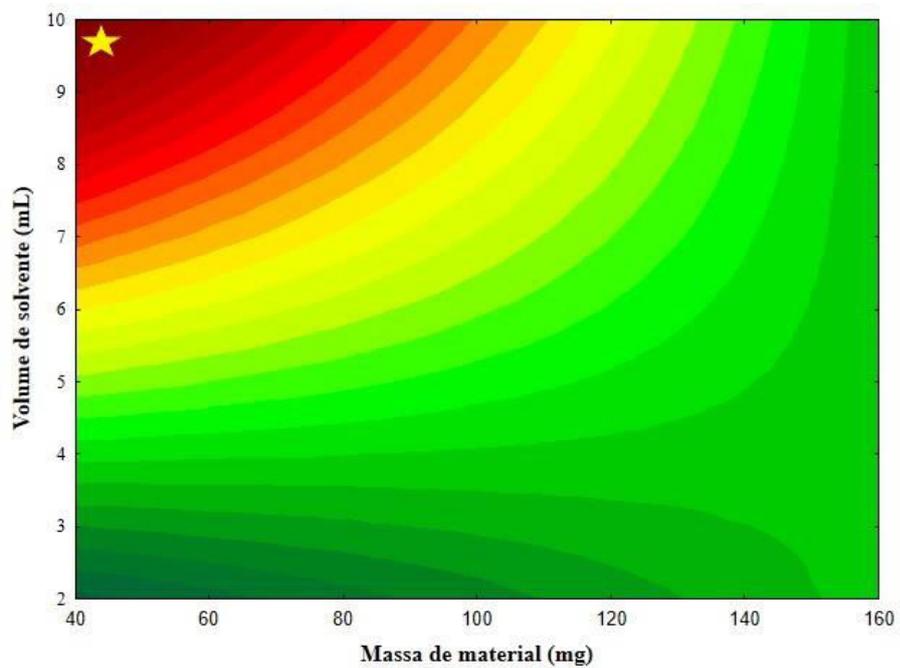
Após todas as análises pode-se afirmar que a melhor condição para a extração do compostos de íon precursor  $m/z= 185$  é a condição 7.

Figura 68 - Superfície de resposta para as variáveis massa de material e volume de solvente.



Fonte: Autor

Figura 69 - Gráfico de contorno para as variáveis massa de material e volume de solvente.



Fonte: Autor

As análises dos resultados obtidos para o composto de íon precursor  $m/z= 213$  serão discutidas a seguir. As respostas analíticas de cada um dos 11 experimentos estão relacionadas na tabela abaixo:

Tabela 31 - Áreas obtidas por meio dos extratos analisados por LC-MS/MS para o íon precursor  $m/z= 213$ .

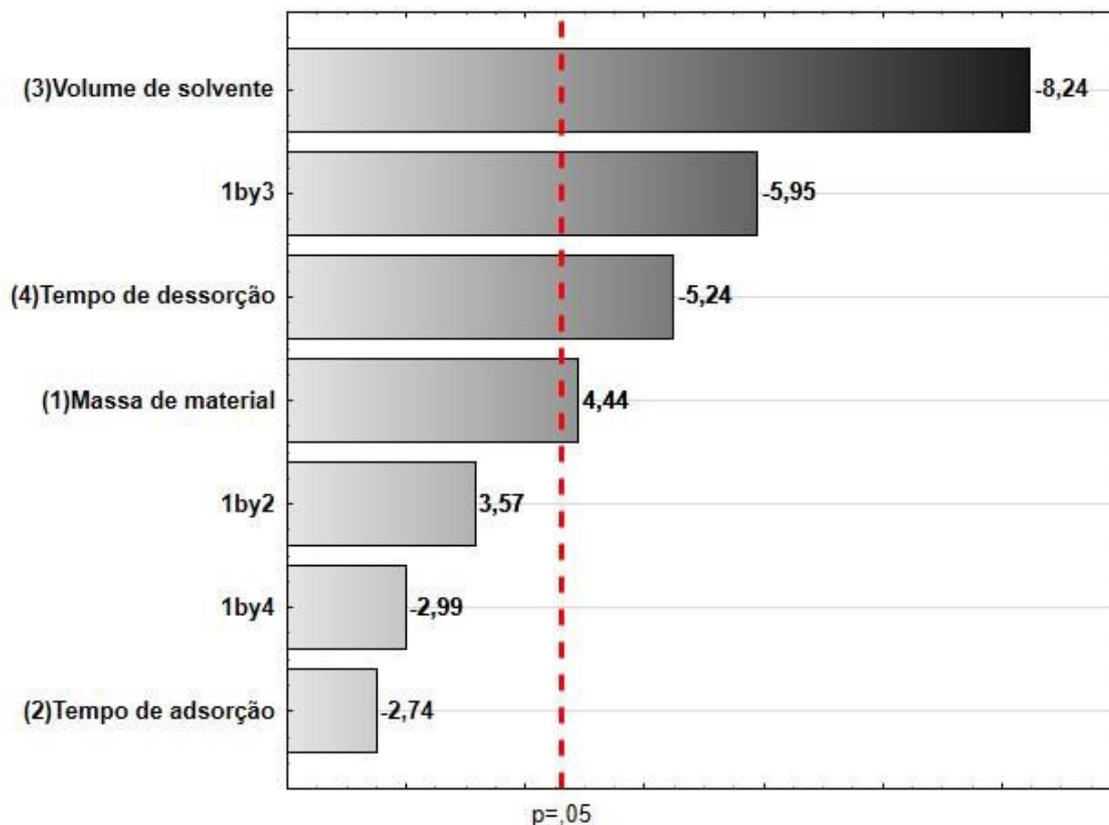
Extrato	Área
1	12835096
2	13092818
3	11436174
4	14571749
5	12095128
6	12120627
7	11429324
8	10912141
9	12532006
10	12122184
11	12510930

Fonte: Autor.

Ao analisar as áreas obtidas, pode-se perceber uma certa semelhança entre todas as condições estudadas, no entanto, no experimento 4, observou uma maior área.

Assim, primeiramente foi realizada a investigação da significância dos contrastes estudados, bem como suas interações ao nível de 95% de confiança, a partir do gráfico de Pareto. A figura 70 apresenta o gráfico de Pareto obtido pelo programa *statistic*.

Figura 70 - Gráfico de Pareto obtido do planejamento fatorial fracionário 24-1 para o íon precursor  $m/z=213$ .



Fonte: Autor

De acordo com o gráfico, a variável mais significativa também foi o volume de solvente. No entanto, para esse íon está variável apresentou um contraste negativo (-8,24), sendo assim, ao contrário do íon precursor  $m/z=185$ , à medida que se aumenta o volume de solvente diminui-se a resposta analítica obtida, portanto, pode-se interpretar que o melhor volume a ser utilizado é 3 mL. A segunda variável mais significativa é o tempo de dessorção, sendo este também apresentado um contraste negativo (-5,24), deste modo, o ideal é usar o nível baixo, sendo este de 10 min. Maiores tempos de dessorção podem favorecer o aparecimento de mais compostos no extrato, o que pode provocar supressão iônica do analito de íon precursor  $m/z=213$ , diminuindo a resposta analítica.

A terceira e última variável significativa é a massa de material, que apresentou um efeito positivo (4,44). Pode-se dizer que o ideal é utilizar o nível alto, pois quando se aumenta a massa do material, aumenta-se a resposta analítica, sendo assim, o ideal é utilizar 150 mg. Pode-se observar que mesmo pertencendo a mesma classe química, os dois compostos avaliados no planejamento fatorial não apresentam o mesmo perfil de

interação com o adsorvente. Dessa forma, ressalta-se a importância em se avaliar de forma individual cada composto.

Ao analisar as interações entre as variáveis, observou-se que, semelhante ao que aconteceu para o composto com precursor  $m/z = 185$ , a única interação significativa foi a  $1 \times 3$ , apresentado um contraste negativo (-5,95). Quimicamente, pode-se observar que o composto de precursor  $m/z = 213$  deve possuir uma menor interação com o sorvente, sendo necessária maior massa para uma maior adsorção, já o composto com precursor  $m/z = 185$  parece apresentar uma maior interação com o solvente orgânico, por isso, necessita de um menor volume na etapa de eluição.

Avaliando-se os experimentos realizados, percebe-se que a única condição que apresenta o nível alto para a variável massa de material, nível baixo para as variáveis volume de solvente e tempo de dessorção, é o experimento 4. Na tabela abaixo estão relacionados os valores reais e codificados da condição quatro com a resposta analítica obtida:

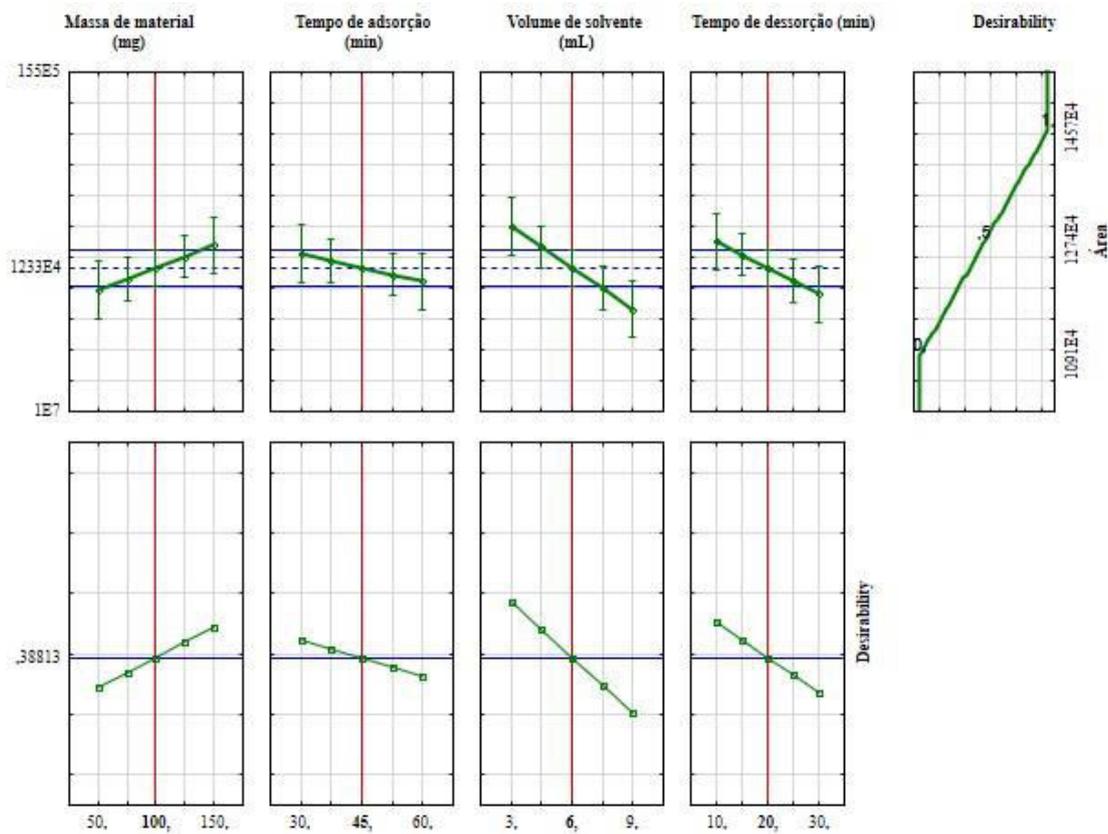
Tabela 32 - Valores codificados, valores reais e resposta analítica das condições 5 e 7.

Experimento	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	v <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	Resposta
4	150 (+1)	60 (+1)	3,00 (-1)	10 (-1)	14571749

Fonte: Autor

A análise da função de desejabilidade (figura 71) apresenta o gráfico de perfis para os valores previstos e desejabilidade para as variáveis otimizadas. O gráfico foi obtido pelo software statistic.

Figura 71 - Gráfico de perfis para os valores previstos e a desejabilidade para as variáveis analisadas.



Fonte: Autor

Ao analisar o gráfico gerado para a variável massa de material, pode-se confirmar que à medida que se aumenta a massa do material, maior será a resposta analítica, ou seja, o ideal é utilizar o nível alto otimizado, 150 mg. Já no gráfico do tempo de adsorção observa-se que qualquer valor que esteja dentro do domínio experimental pode ser utilizado. No gráfico referente ao volume de solvente pode-se observar um decréscimo da resposta quando é utilizado o nível alto, portanto, o ideal é utilizar o nível baixo, 3 mL. Para o tempo de dessorção, observa-se que ocorre um aumento na área quando se utiliza o nível baixo, portanto, o ideal a ser utilizado é 10 min.

Posteriormente foi realizada a validação dos dados, isto é, se os valores previstos estão próximos aos valores obtidos experimentalmente. Concluiu-se que a regressão foi significativa e que o modelo não apresentou falta de ajuste, como pode ser observado na tabela 22:

Tabela 33 - Tabela ANOVA obtida no planejamento realizado para o íon precursor  $m/z=213$

	SS	MS	F_calculado	F_tabelado	Razão
Regressão	9,58E+12	3,19E+12	187,27	8,89	21,07
Resíduo	1,19E+11	1,71E+10			
Falta de ajuste	1,28E+10	1,28E+10	0,2413	18,5128	0,01
Erro puro	1,07E+11	5,33E+10			
Erro total	9,70E+12				

Fonte: Autor

Por meio dos resultados da tabela 22 observou-se que o planejamento apresentou um ótimo ajuste, pois a razão entre os valores é inferior a 1 (0,01). Para confirmar se os valores obtidos estão próximos aos valores preditos, foi realizada a análise em porcentagem, comparando ambos os valores. Essa análise está representada na tabela abaixo:

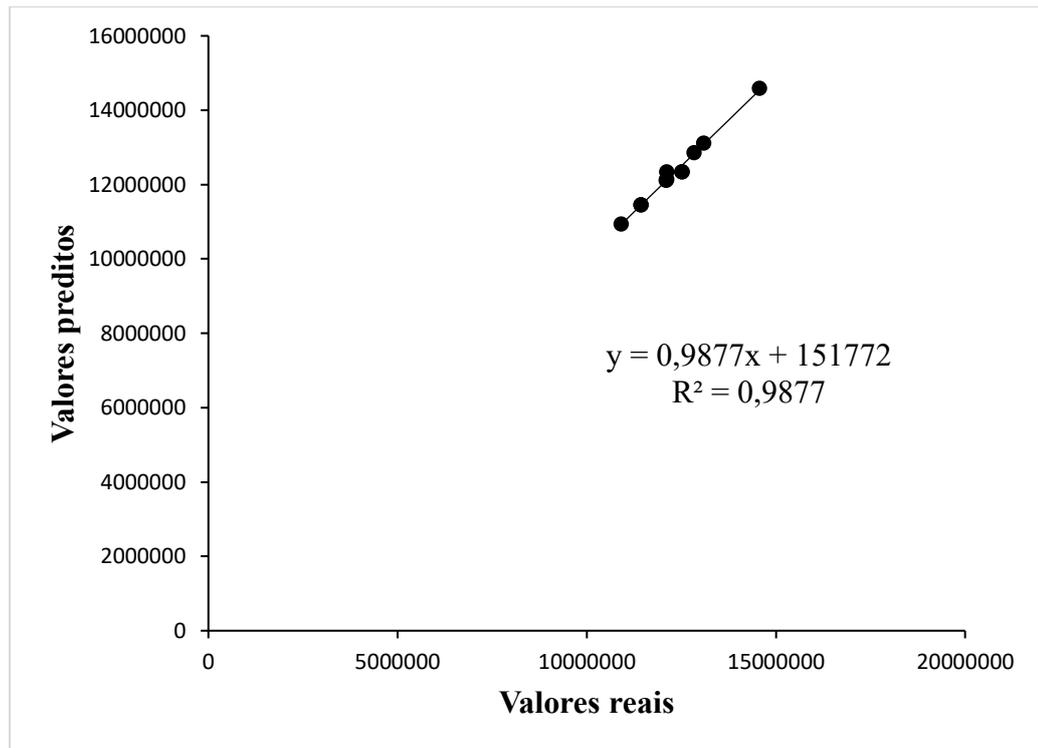
Tabela 34 - Valores reais e valores preditos para a resposta analítica utilizada no planejamento experimental fatorial fracionário.

Experimento	Real	Predito	Exatidão (%)
1	12835096	12856025	100
2	13092818	13113747	100
3	11436174	11457103	100
4	14571749	14592678	100
5	12095128	12116057	100
6	12120627	12141556	100
7	11429324	11450253	100
8	10912141	10933070	100
9	12532006	12332562	102
10	12122184	12332562	98
11	12510930	12332562	101

Fonte: Autor

Como pode ser observado na tabela 23 os valores obtidos experimentalmente estão muito próximos aos valores esperados, atestando a confiabilidade dos resultados. Com os valores da tabela 23 foi gerado o seguinte gráfico:

Figura 72 - Gráfico da comparação dos valores reais e preditos utilizando a equação da reta.



Fonte: Autor

Na figura 72 os valores preditos são representados pela reta e os valores reais pelas esferas. Pode-se perceber que os valores estão muito próximos resultando em um  $R^2$  de 0,9877, ou seja, os valores obtidos podem ser explicados 98% pelo modelo. Por último foram obtidos os valores para os coeficientes das variáveis estudadas e das suas interações, com o objetivo de verificar quais são estatisticamente significativos. Os valores dos coeficientes obtidos com um grau de confiança de 95% estão representados na tabela abaixo:

Tabela 35 - Valores obtidos para os coeficientes das variáveis e de suas interações.

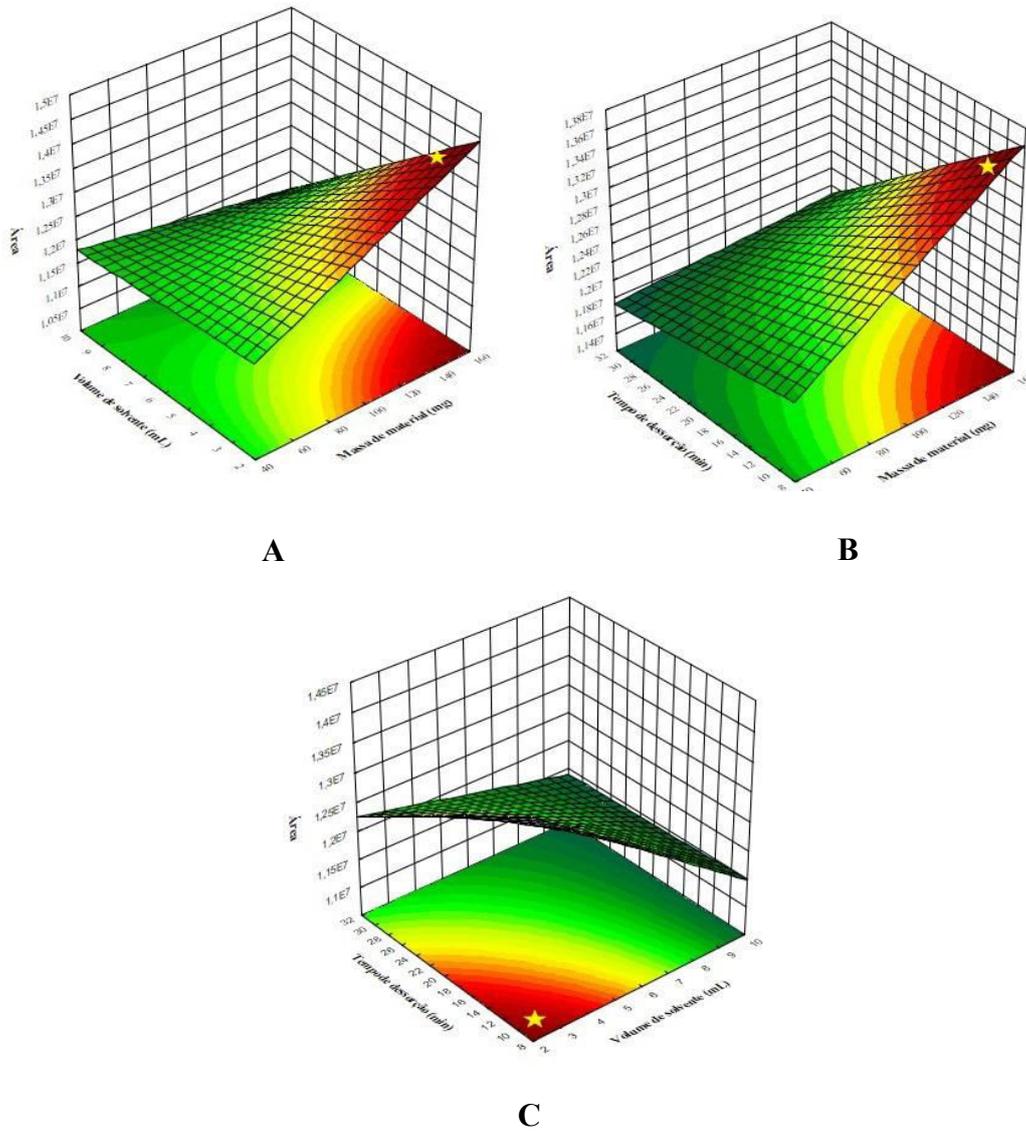
Coef	Valores	IC	-95%	95%	Significativo
C <sub>0</sub>	12332562	69579,01	12033187	12631936	sim
C <sub>1</sub>	362702	81588,62	11654	713749	sim
C <sub>2</sub>	-224285	81588,62	-575333	126762	não
C <sub>3</sub>	-672327	81588,62	-1023375	-321280	sim
C <sub>4</sub>	-427567	81588,62	-778614	-76519	sim
C <sub>12</sub>	291896	81588,62	-59151	642944	não
C <sub>13</sub>	-485623	81588,62	-836670	-134575	sim
C <sub>14</sub>	-244287	81588,62	-595335	106760	não

Fonte: Autor

Ao analisar os valores da tabela 24 observa-se que os coeficientes lineares, da variável um, da variável três e da variável quatro foram significativos, confirmando a influência da massa do material, do volume do solvente e do tempo de dessorção. Também foi verificado que apenas o coeficiente da interação 1x3 foi significativo.

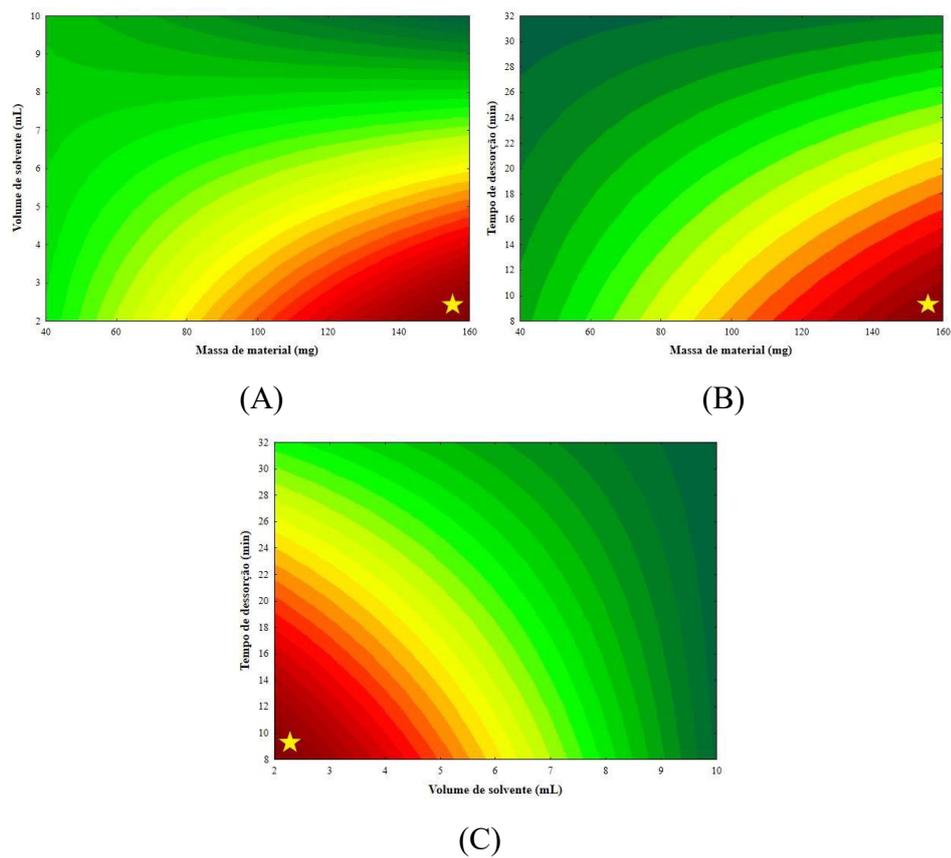
A figura 73 apresenta as superfícies de resposta correspondente às variáveis massa de material, volume de solvente e tempo de dessorção. De acordo com a superfície de resposta e o gráfico de contorno (Figura 74), é possível concluir que a maior resposta analítica é obtida com a diminuição do volume do solvente, o aumento da massa de material, e a redução do tempo de dessorção. Esta área foi destacada com uma estrela nos gráficos gerados. Assim a condição ideal de análise para o composto em questão seria: 150 mg de material, 3 mL de solvente e 10 min de dessorção.

Figura 73 - Superfície de resposta para: (A) Massa de material e volume de solvente; (B) Massa de material e Tempo de dessorção e (C) Volume de solvente e Tempo de dessorção.



Fonte: Autor

Figura 74 - Gráfico de contorno para: (A) Massa de material e Volume de solvente; (B) Massa de material e Tempo de dessorção e (C) Volume de solvente e Tempo de dessorção.



Fonte: Autor

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, um RAM magnético foi obtido por meio da modificação da superfície de nanotubos de carbono de paredes múltiplas comercial com BSA. Através da caracterização por Potencial Zeta, FT-IR e TG foi possível observar que houve a incorporação de nanopartículas magnéticas no material, bem como a eficiência do revestimento e que essas modificações não alteraram a integridade do material.

Segundo os resultados obtidos, os M-RACNTs apresentaram grande potencial para serem utilizados como sorvente em MDSPE com o intuito de pré-concentrar compostos orgânicos provenientes de caldo de fermentação do endófito *Lasiodiplodia sp.* Sua aplicação neste estudo demonstrou que o material sintetizado possui as condições necessárias para adsorver os analitos e simultaneamente excluir as proteínas da matriz.

Os extratos obtidos e analisados neste estudo, apresentam uma grande quantidade de compostos orgânicos. Embora equipamentos de alta resolução para identificação não tenham sido utilizados, foi possível se ter uma ideia das possíveis substâncias extraídas, muitas com atividade biológica já relatada na literatura. Ademais, a substituição da LLE convencional pelo método proposto neste trabalho para obtenção de extratos brutos provenientes do caldo de fermentação do endófito estudado vai de encontro à tendência da Química Verde, uma vez que quantidades de solventes orgânicos significativamente menores foram utilizadas no preparo de amostra.

A otimização multivariada, utilizando planejamento fatorial fracionário, permitiu a otimização do método de extração para compostos com características físico-químicas distintas, melhorando a recuperação destes analitos por meio de poucos experimentos, reduzindo tempo experimental, gastos de solventes orgânicos e do material adsorvente, além de se ter gerado informações sobre os efeitos de quatro variáveis e suas interações.

Por fim, cabe ressaltar que o intuito deste estudo não foi isolar ou separar um metabólito secundário específico oriundo da fermentação do *Lasiodiplodia sp.*, mas avaliar o potencial da MDSPE no preparo desta amostra em substituição a outras técnicas de extração convencionais, o que foi confirmado com os resultados obtidos.

## REFERÊNCIAS

ABDELNUR, Patrícia Verardi. **A espectrometria de massas e as bio-moléculas: relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos marcadores em clínica médica por imageamento químico-seletivo de tecidos.** 2010. Tese (doutorado em química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

ADNAN, M. *et al.* Investigation of the Biological Activities and Characterization of Bioactive Constituents of *Ophiorrhiza rugosa* var. *prostrata* (D.Don) & Mondal Leaves through In Vivo, In Vitro, and In Silico approaches. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1367, abr 2019.

AGOSTINI, Sandra Barbosa Neder. **Prospecção de compostos bioativos no produto de fermentação de fungos endofíticos isolados de *Handroanthusimpetiginosus*.** 2016. Dissertação (mestrado em química) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

ALIMOHAMMADI, Vahid, SEDIGHI, Mehdi, JABBARI, Ehsan. Optimization of sulfate removal from wastewater using magnetic multi-walled carbon nanotubes by response surface methodology. **Water Sci Technol**, v. 76, n. 9-10, p.2593–2602, jul. 2017.

ALY, Amal Hassan, DEBBAD, Abdessamad, PROKSCH, Peter. Funga lendophytes: unique plantin habitant swith great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, abril 2011.

ALVAREZ, Luiz Alberto Contreras. **Proposição de uma rota de síntese verde de nanopartículas de ouro reduzidas com resina de *Virola oleífera* através do planejamento fatorial.** 2018. Dissertação (mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade Federa do espírito santo, Vitória, ES, 2018.

ARAMBARRI, I. *et al.* Optimisation of tin determination in aqua regia-HF extracts from sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry using experimental design. **Analyst**, v. 125, n. 11, p. 2084-2088, set 2000.

ARAÚJO, Wellington Luiz; LACAVA, Paulo Teixeira; MARCO, Joelma; *et al.* Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. [S.l: s.n.], 2010.

BARBOSA, Adriano Francisco. **Síntese e aplicação de nanotubos de carbono de acesso restrito para extração/pré-concentração de cádmio diretamente de amostras de soro humano seguido de análise por espectrometria de absorção atômica.** 2015. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2015.

BARBOSA, A.F. *et al.* Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. **Talanta**, v. 131, p. 213–220, jan. 2015.

BALDUINO, S. J. *et al.* Magnetic restricted access carbon nanotubes for smooth Cu and Zn extraction from Cu, Zn-superoxide dismutase. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 10, p. 1246, set. 2019.

BATISTON, Eduardo Roberto. **Incorporação de nanotubos de carbono em matriz de cimento Portland**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2012.

BAUMGART, Ana Milda Karsten. **Avaliação do potencial antimicrobiano das espécies vegetais *Cicupura paludosa* e *Chenopodium ambrosioides***. 2014. Dissertação (mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade do vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2014.

BITTENCOURT, Samara Favi. **Quantificação de propiltiouracil em plasma humano utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada á espectrometria de massa em tandem: aplicação a um estudo de bioequivalência**. 2015. Dissertação (mestrado em farmacologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2015.

BUDZIKIEWICZ, H., WILSON, J. M., DJERASSI, Carl. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 3688, nov. 1963.

CABRERA, L. C *et al.* Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, jan. 2012.

CALDERANI, Fabiana Alves, ORLANDELLI, Ravelly Casarotti, PAMPHILE, João Alencar. Compostos bioativos com propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos. **UNINGÁ**, v. 25, n. 2, p. 79-86, jan. 2016.

CAMPAÑA, A.M.G. *et al.* Sequential response surface methodology for multioptimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs. **Analytica Chimica Acta**, v. 348, n. 1-3, p. 237 – 246, ago.1997.

CARNEIRO, A. R. G. *et al.* Fast Ephedrine Quantification by Gas Chromatography Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 29, n. 12, p. 2514-2521, dec. 2018.

CARVALHO, Patrícia Lunardelli Negreiros de. **Estudo químico e do potencial biológico do produto da feremntação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis***. 2016. Disertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

CASSIANO, N. M. *et al.* Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Alemanha, v. 384, n. 7–8, p. 1462–1469, abr. 2006.

COLLINS, H. C; BRAGA, L. G., BONATO, S. P. **Fundamentos da cromatografia**. 1. Ed. Campinas: UNICAMP, 2006.

CRUZ, C. J. *et al.* Restricted access carbon nanotube for microextraction by packed sorbent to determine antipsychotics in plasma samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 11, p.2465–2475, fev. 2020.

DABROWSKI, Lukasz. Multidetector systems in gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 185-193, mai. 2018.

DE FARIA, H. D. *et al.* New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, Holanda, v. 959, p. 43–65, jan. 2017a.

DE FARIA, H. D. *et al.* Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Food Chemistry**, v. 225, n. 15, p. 98–106, jun. 2017b.

DE LIMA, M. M. *et al.* On-line restricted access molecularly imprinted solid phase 108 extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis. **Food Chemistry**, v. 197, p. 7–13, abr. 2016.

DE MESQUITA CUNHA, M. *et al.* Eficiência do método de espectrometria de massas em drogas de abuso. **Estudos**, v. 42, n. 4, p. 409-423, dez. 2015.

DE OLIVEIRA, R. R. *et al.* Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. **Planta Medica**, v. 83, n. 7, p. 636-646, mai. 2017.

DE PAULA, F. C. C. R. *et al.* Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching highperformance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1–2, p. 221–226, mai. 2008.

DEWICK, Paul. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Estados Unidos: WILEY, 2009.

DUTRA, Flávia Viana Avelar. **Materiais solventes empregados em diferentes métodos de preparo de amostras**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, MG, 2014.

ENG, F. *et al.* Optimized Jasmonic Acid Production by *Lasioidiplodia theobromae* Reveals Formation of Valuable Plant Secondary Metabolites. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. 167-627, dez. 2016.

ELLISON, Stephen L. R, BARWICK, Vicki J, FARRANT, Trevor J. Duguid. **Practical Statistics for the Analytical Scientist: a bench guide**. 2. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009.

FALADE, O. E. *et al.* Evolution of the mycochemical composition and antimicrobial potency of wild macrofungus, *Rigidoporus microporus* (Sw). **The Journal of Phytopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 115-125, mai. 2017.

FARIA, D. H. *et al.* Online extraction of antihypertensive drugs and their metabolites from untreated human serum samples using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Journal of chromatography A**, v. 1528, p. 41-52, out. 2017.

FERREIRA, Ernando Silva. **Interação da proteína albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, SP, 2009.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 709-716, set. 1999.

FIGUEIREDO, Eduardo Costa, BORGES, Keyller Bastos, QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

FERREIRA, Sergio Luis Costa. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. 1. ed. São Paulo: Vento leste, 2015.

FRANK, A. M. *et al.* Clustering millions of tandem mass spectra. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 01, p. 56-64, jan 2007.

FRIEDLAN, Stephen S, LANE, George H. Mass Spectra of Steroids. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 169-174, fev. 1959.

GOMES, R. A. B. *et al.* Avaliação da oxidação ácida de nanotubos de carbono e seu revestimento com albumina de soro bovino por análises térmicas. In: Congresso Brasileiro de Química, 55, 2015, Goiânia, **Anais [...]**. Goiânia, 2015. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2015/trabalhos/4/7664-21190.html>. Acesso em: 01 jan. 2021.

GOMES, Raphael Antônio Borges. **Avaliação de nanotubos de carbono de acesso restrito na obtenção e determinação de apoproteínas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

GÓMEZ, O. C. *et al.* Melhoria da atividade antimicrobiana após fracionamento de extratos orgânicos de *Lasiodiplodia* sp. fermentação. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 3795-3816, jan. 2021.

GONÇALVES, V.M.F. *et al.* Quantification of alprenolol and propranolol in human plasma using a two-dimensional liquid chromatography (2D-LC). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 141, p. 1–8, abr. 2017.

GU, L. *et al.* Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **J. Mass Spectrom.**, v. 38, n. 12, p. 1272-1280, dez. 2003.

GUEDES, Wesley Nascimento. **Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de metais nos diferyangentes tecidos de siri (*Callinectes danae*)**

- provenientes do estuário do Rio Cachoeira.** 2015. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2015.
- GUNST, Richard F., MASON, Roberto L. Fractional factorial design. **Wiley online library**, v. 1, n. 2, p. 234-244, ago. 2009.
- GUPTA V. K, AGARWAL Shilpi, SALEH Tawfik A. Chromium removal by combining the magnetic properties of iron oxide with adsorption properties of carbon nanotubes. **Water Research, Amsterdam**, v. 45, n. 6, p. 2207-2212, jan. 2011.
- GREVE, H. *et al.* Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 4, p. 537-545, set. 2010.
- GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. 3. ed. Berlin: Springer, 2017.
- GROTHAUS, Paul G., CRAG, Gordon M., NEWMAN, David J. Plant natural products in anticancer drug discovery. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1781-1791, out. 2010.
- HAGESTAM, Helene I., PINKERTON, Thomas C. Internal surface reversed – phase silica supports for liquid chromatography. **Anal. Chem**, v. 57, n. 8, p. 1757 – 1763, jul. 1985.
- HARBONE, J. B; MABRY, T. J; MABRY, H. **The flavonoids**. New York: Academic Press, 1975.
- HE, G. *et al.* Isolation of an  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone derivative, a toxin from the plant pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry, England**, v. 65, n. 20, p. 2803-2807, out. 2004.
- HERBST, Marcelo Hawrylak, MACEDO, Maria Iaponeide Fernandes, ROCCO, Ana Maria. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992, nov./dez. 2004.
- HISAYUKI *et al.* MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal Mass Spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703-714, jul. 2010.
- HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.
- HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, out. 2002.
- HUANG, J. *et al.* New lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318. **Natural Product Research**. v. 31, n. 7, p. 326-332, fev. 2017.
- IJJIMA, Sumio. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, nov. 1991.

JOHNSEN, L. G. *et al.* Gas chromatography – mass spectrometry data processing made easy. **Journal of Chromatography A**, v. 1503, p. 57-64, jun. 2017.

KATAOKA, Hiroyuki, SAITO, Keita. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 4, n. 7, p. 809–832, abr. 2012.

KEEN, Gary W., HAMMING, Mynard C. Mass spectrometry analysis of aliphatic esters. **Mass spectroscopy**, v. 19, p. 308, dez. 1971.

KECHAGIAS, J. *et al.* Comparison of full versus fractional factorial experimental design for the prediction of cutting forces in turning of a titanium alloy: A case study. **International journal of materials**, v. 4, mai. 2017.

KEKKONEN, V. *et al.* Synthesis and characterization of biocompatible magnetic glyconanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1393-1396, mai. 2009.

KESSNER, D. *et al.* ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. **Bioinformatics**, v. 24, n. 1, p. 2534-2536, nov 2008.

KIM, Il T.; TANNENBAUM, Rina. Nanotubos de carbono magnético: síntese, caracterização e propriedades elétricas anisotrópicas. *In*: Marulanda, Jose Maurici (Org.). **Propriedades eletrônicas dos nanotubos de carbono**. 2011. Cap. 3. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/16839>. Acesso em: 03 jan. 2021.

LAGO, C. A. *et al.* Magnetic restricted-access carbon nanotubes for dispersive solid phase extraction of organophosphates pesticides from bovine milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1102, p. 11-23, mar. 2020.

LUNDSTEDT, T. *et al.* Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1-2, p. 3 – 40, ago. 1998.

LYNCH, Kyle B., CHEN, Apeng, LIU, Shaorong. Miniaturized high-performance liquid chromatography instrumentation. **Talanta**, v. 177, p. 94-103, set. 2018.

MA, L. *et al.* Optimization of acidified oil esterification catalyzed by sulfonated cation exchange resin using response surface methodology. **Energy Convers. Manag.**, v. 98, p. 46–53, jul. 2015.

MA, Y. L. *et al.* Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, n. 12, p. 1357, mai. 1997.

MACHAVARIAM, N. G. *et al.* Isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants of the Moscow region, Russia. **World ApplSci J**. v. 30, n. 11, p. 1599-1604, jan. 2014.

MACHTEJEVAS, E. *et al.* Sulphonic acid strong cation-exchange restricted access columns in sample cleanup for profiling of endogeneous peptides in multidimensional

liquid chromatography structure and function of strong cation-exchange restricted access materials. **J. Chromatogr. A**, v. 1123, n. 1, p. 38-46, jun. 2006.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1986.

MÁRQUEZ, F. *et al.* Synthesis and characterization of monodisperse magnetite hollow microspheres. **Soft Nanoscience Letters**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 25-32, abr. 2011.

MILLARD, J. B. High resolution mass spectrometry-I some substituted 8-lactones. **Organic Mass Spectrometry**, v. 1, p. 279-284, jan/fev 1968.

MIERSCH, O. *et al.* Jasmonic acid-like substances from the culture filtrate of *Botryodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v.28, n. 5, p. 1303-1305, set. 1989.

MORAES, G.O.I. *et al.* A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 405, n. 24, p.7687–7696, ago. 2013.

MOREIRA, Gisele Chagas, DIAS, Fabio de Souza. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 247-252, set. 2018.

MORGAN, E. *et al.* Practical exploratory experimental designs. **Chemometr. Intell. Lab**, v. 5, n. 4, p. 283-302, abr. 1989.

NETO B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora de Campinas, 2003.

NETO, A. J. S.; LOPES, B. R.; CASS, Q. B. Preparo de amostras empregando meios de acesso restrito (RAM). In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. (Ed.). **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 97–105.

NETO, Fausto Neto. **Estudo de espécies de Chrysobalanaceae com ação citotóxica: análise metabolômica visando ao entendimento de associações sinérgicas e da complexidade micromolecular**. 2014. Tese (Doutorado em química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2014.

NEWMAN, D.J. *et al.* Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.** v. 66, n. 7, p. 1022–1037, jul. 2003.

NUNES, Fátima Miranda. **Estudo químico do fungo fitopatogênico *Lasiodiplodia Theobromae***. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Fortaleza, CE, 2008.

OLIVEIRA, Francisco Carlos de. **Estudo químico de fungos endofíticos a plantas do bioma da caatinga**. Tese (doutorado em química) – universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2017.

OLIVEIRA, F. M. *et al.* Preparation of a new restricted access molecularly imprinted hybrid adsorbent for the extraction of folic acid from milk powder samples. **Analytical Methods**, Reino Unido, v. 8, n. 3, p. 656–665, nov. 2016.

OLIVEIRA, Natália Velasquez. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica das folhas e do caule da espécie *Acacia langsdorfii* Benth (LEGUMINOSACEAE)**. 2009. Tese (doutorado em química e biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Maceio, AL, 2009.

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S., VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. 5. ed. Norte-Americano: Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, Marcos Roberto de Nascimento. **Obtenção de ésteres etílicos via transesterificação por catálise homogênea de óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) com aquecimento por irradiação com micro-ondas**. 2014. Dissertação (mestrado em engenharia química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2014.

PEREIRA, Fabíola Manhas Verbi, PEREIRA-FILHO, Edenir Rodrigues. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: Um tutorial. **Quim. Nova**. v. 9, p. 1061-1071, jun. 2018.

PRATA, M. *et al.* Determination of opiates in whole blood using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, p. 1-10, dez 2019.

QI, Y. *et al.* Selective extraction of low molecular weight proteins by mesoporous silica particles with modified internal and external surfaces. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, v.398, n. 8, p. 1715–1722, ago. 2010.

QU, S. *et al.* Magnetic assembled electrochemical platform using Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filled carbon nanotubes and enzyme, *Electrochem. Commun.* v.9, n. 12, p.2812–2816, dez. 2007.

RAMACHANDRAN, G. *et al.* Extraction and partial purification of secondary metabolites from endophytic actinomycetes of marine Green alga e *Cauler paracemos* aaga inst multi drug resistant uropathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnonology**, v. 17, p. 750-757, jan. 2019.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, jan. 1985.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams and Wilkin, 1965.

RODRIGUES, C. M. *et al.* Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 21, n. 12, p. 1907-1914, mai. 2007.

- RUDOLPHI, A.; BOOS, K. S. The use of Restricted-Access Media in HPLC, Part 1- Classification and Review. **LC-GC**, p. 602–611, 1997.
- RUSCHEL, C.F.C. *et al.* Otimização do Processo de transesterificação em Duas Etapas Para Produção de Biodiesel Através do Planejamento Experimental Doehlert. **Química Nova**, v.39, n. 3, p. 267-272, fev. 2016.
- SADÍLEK, Petr, SATÍNSKÝ, Dalibor, SOLICH, Petr. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **Trends Anal. Chem**, v. 26, n. 5, p. 375-384, mai. 2007.
- SAFARIKOVA, Mirka, SAFARIK, Ivo. Magnetic solid-phase extraction. **J. Magn. Magn. Mater**, v. 194, n. 1-3, p. 108-112, abr. 1999.
- SANTANA, Andréa Lopes Bandeira Delmiro. **Estudo químico, antitermítico e antifúngico da madeira de lei *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var-cebril (Griseb) von Reis Alt. (Angico-de-Caroço)**. 2011. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2011.
- SANTOS, M. G. *et al.* Direct doping analysis of beta-blocker drugs from urinary samples by on-line molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to liquid chromatography/mass spectrometry. **The Analyst**, v. 140, n. 8, p. 2696– 2703, fev. 2015.
- SANTOS-NETO, A. J. *et al.* Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. *Journal of Separation. Science*, v. 31, n. 1, p. 78–85, jan. 2008.
- SARNOSKI, P. J. *et al.* Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC– MSn. **Food Chem.**, v. 131, n. 3, p. 927-939, abr. 2012.
- SARKER, Satyajit D., NAHAR, Lutfun, KUMARASAMY, Yashodharan. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, ago. 2007.
- SCIGELOVA, M. *et al.* Fourier Transform Mass Spectrometry. **Molecular and cellular Proteomics online**, Rockville, v. 7, n. 10, jul. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3134075>. Acesso em: 18 de fev. 2021.
- SELEGATO, Denise Medeiros. **Metabolomic studies of plant-associated fungi: method development for the increased production and identification of microbial bioactive metabolites**. 2019. Thesis (doutorado em química) – Universidade Estadual Paulista, araraquara, SP, 2019.
- SENHUA, C. *et al.*  $\beta$ -Resorcylic acid derivatives with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from *Lasiodiplodia* sp. ZJ-HQ1, an endophytic fungus in the medicinal plant *Acanthus ilicifolius*. **Phytochemistry Letters**. v. 13, p. 141-146, set. 2015.

SEMREN, Z. T., KARACONJI, B. I., SAFNER, T., BRAJENOVIE, N., LOVAKOVIE, T. B., PIZENT, A. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary volatile organic metabolites: Optimization of the HS-SPME procedure and sample storage conditions. **Talanta**, v. 176, p. 537-543, jan. 2018.

SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, nov. 2003.

SHENG-JIE, Y. *et al.* Development of an efficient method for separation and purification of trans-2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilic acid from *Pseudomonas chlororaphis* GP72 fermentation broth. **Separation and Purification Technology**. v. 202, p. 144-148, ago. 2018.

SILVA, Igor Pereira da. **Espectrometria de massas ambiente: novas abordagens para análise de pesticidas em alimentos**. 2018. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiânia, GO, 2018.

SILVERSTEIN, R. M. *et al.* **Spectrometric identification of organic compounds**. 8. ed. United States: John Wiley & Sons, 2019.

SILVA, Sebastião da Cruz. **Estudo químico de microorganismos associados a *Khaya Ivorensis***. 2007. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, SP, 2007.

SOUVERAIN, S., RUDAZ, S., VEUTHEY, J-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of chromatography B**. v. 801, n. 2, p. 141-156, mar. 2004.

SOUZA, D. I. *et al.* Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica chimica acta**. v. 932, p. 49-59, mai. 2016.

SU, Hsin-ning, LEE, Pei-Chun. Mapping Knowledge Structure by Keyword Co-Occurrence: a first look at journal papers in technology foresight. **Scientometrics**, v. 85, n. 1, p.65-79, jun. 2010.

SUN, S. H. *et al.* Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 1, p. 273-279, jan. 2004.

SKOOG, A. D. *et al.* **Fundamentos da química analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage learning, 2019.

TABOADA, C. *et al.* Naturally occurring fluorescence in frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 14, p. 3672-3677, abr 2017.

- TAN, L. *et al.* Uranium extraction using a magnetic CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – graphene nanocomposite: kinetics and thermodynamics studies. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 2832- 2838, fev. 2015.
- TEOFILO, Reinaldo F., FERREIRA, Márcia M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quím. Nova**, v.29, n.2, p.338- 350, dez. 2006.
- TONES, A. R. M. *et al.* Cylindrical electrochemical reactor in continuous upward flow: Influence of operational parameters in the treatment of cosmetic effluente. **Chemical Engineering and Processing – Process Intensification**, v. 157, p. 108120, set 2020.
- ULLAH, N. *et al.* Restricted access-activated carbon clothesbased lead extraction from human serum: skipping the sample preparation step for biological media. **Int. J. Environ. Anal. Chem**, v. 11, n. 96, p. 1048–1058, ago. 2016.
- VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. 6. ed. São Paulo: Mestre Jou, 2002.
- WANG<sup>1</sup>, L. *et al.* A metabolite of endophytic fungus *Cadophora orchidicola* from *Kalimeris indica* serves as a potential fungicide and TLR4 agonist. **Journal of Applied Microbiology**. v. 126, n. 5, p. 1383-1390, mar. 2019.
- WANG, M. X. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 4, n.8, p. 828-837, ago 2016.
- WEYENS, N. *et al.* Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 248-254, mar. 2009.
- WYLLIE, S.G. *et al.* Electron impact induced fragmentation of cholesterol and related C-5 unsaturated steroids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 725-732, mar. 1997.
- WHITE JR, James F., TORRES, Mónica S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n.4, p. 440-446, nov. 2010.
- YANG, B. *et al.* Identification and Comparison of Constituents of Aurantii Fructus and Aurantii Fructus Immaturus by UFLC-DAD-Triple TOF-MS/MS. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 803, mar. 2018.
- YANG, J. Y. *et al.* Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686-1699, set 2013.
- YIM, D. S. *et al.* Assay of omeprazole and omeprazole sulfone by semi-microcolumn liquid chromatography with mixed-function precolumn. **J. Chromatogr. B**, v. 754, n. 2, p. 487-493, abr. 2001.

YIM, P. *et al.* Mass spectral fragmentation pathways of phthalate esters by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Mass Spectrometry**, v. 47, n. 9, p. 1579-1588, jun. 2014.

YOGESWARI, S. *et al.* Identification and comparative studies of different volatile fractions from *Monochaetia kansensis* by GC-MS. **Global Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 65-71, jan. 2012.

YU-MENG G. *et al.* Ademinealkylresorcionol, the first alkylresorcionol tethered with nucleobase from *lasiodiplodia sp.* **Fitoterapia**. v. 112, p.254-259, jul. 2016.

ZHANG, L. *et al.* Furanonaphthoquinones from *Tabebuia avellaneda* induce cell cycle arrest and apoptosis in the human non-small cell lung cancer cell line A549. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 9-17, mar. 2015.

ZHOU, X. *et al.* A new aromatic amine from fungus *Pestalotiopsis vaccinii*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 35-37, fev. 2014.