UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

GISELE ANDRÉ BAPTISTA CANUTO

Avaliação metabolômica comparativa *in vitro* de fármaco candidato ao tratamento de leishmaniose

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
06/05/2016

GISELE ANDRÉ BAPTISTA CANUTO

Avaliação metabolômica comparativa *in vitro* de fármaco candidato ao tratamento de leishmaniose

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências (Química).

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2016

Ao meu querido pai Gilson (*sempre presente*)
e minha querida mãe Rozangela

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as conquistas alcançadas e por me guiar no melhor caminho.

Ao meu marido Tiago, que me dá tanto amor e está sempre ao meu lado, que me apoiou em todas as decisões e escolhas feitas durante o doutorado.

À minha mãe Rozangela, por todo carinho e dedicação, que está sempre ao meu lado me apoiando em todas as difíceis decisões e me incentivando; e ao meu pai Gilson, que sempre foi meu maior incentivador, mas que infelizmente cumpriu seu papel conosco antes do término deste trabalho, mas que sei que de onde estiver, está me dando suporte e forças para nunca desistir dos meus objetivos e sonhos.

À minha irmã Gislaine, que sempre me apoia e me eleva a um nível de significância que faço questão de honrar todos os dias.

À toda minha família por sempre torcer pelo meu trabalho e acreditar na minha capacidade.

À Profa. Dra. Marina F. M. Tavares, pela orientação, amizade e todas as oportunidades durante todos esses anos de trabalho, pelos conselhos e ensinamentos.

À Profa. Dra. Coral Barbas, por abrir as portas em seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos na metabolômica e por me acolher tão bem. *Gracias por todo*.

À Profa. Dra. Ángeles López-Gonzálvez, a Nines, que além de me co-orientar e lutar fortemente pela realização do nosso trabalho, se tornou uma grande amiga, que admiro muito. *Gracias por todo profesoriña*.

Ao Prof. Dr. João P. S. Farah, que sempre me ensinou muito seja de química básica a estatística avançada. Obrigada pelos ensinamentos e amizade.

À Profa. Dra. Maria Júlia M. Alves, pela colaboração essencial, conselhos e todos os ensinamentos na parte biológica.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto Junior, pela colaboração por parte do uso do GC-MS, e a Fabiane Dörr pela ajuda no equipamento e boas conversas.

Ao Dr. Daniel C. Pimenta, pela colaboração por parte do uso do LC-MS, pelos ensinamentos e pelas ótimas conversas.

Ao Dr. Luis Rivas, pelo preparo das células em Madri e ao Dr. André G. Tempone, pela disponibilização das células e ideia de composto para estudo. Ao Prof. Dr. João Lago, pelo fornecimento do metildihidrodieugenol B.

Ao compadre Daniel, sempre fundamental no desenvolvimento dos trabalhos do grupo de pesquisa. Obrigada pela amizade, as longas horas de conversa e por toda ajuda neste e em outros trabalhos.

Aos professores colaboradores do CEMBIO, Javier R., MariPaz L., MariPaz M. e Antonia G. por toda ajuda e ensinamentos. À amiga e técnica do CEMBIO Vanesa, por me auxiliar na adaptação ao novo lugar, pelos ensinamentos em LC-MS e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Emerson A. Castilho-Martins, que me ensinou muito sobre *Leishmania*. Obrigada pela amizade, conselhos e pela parceria acadêmica.

Aos colegas do laboratório Aline K., Aline S., Amanda, Ana Rosa, Andréa, Carol, Fabio, Grazielle, Loraine, Karina, Maicon e Pedro pelas conversas produtivas e boa convivência.

Aos técnicos da bioquímica Célia e Roberto, sempre prontos para ajudar.

Aos professores do Instituto de Química da USP que auxiliaram na minha formação.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 2012/04601-6) e auxílios financeiros na forma de reserva técnica.

À Airbus Military e EADS Casa pela concessão da bolsa de estágio em Madri.

À CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro de projetos de pesquisa do laboratório.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram de alguma forma na execução deste trabalho.

"Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente estruído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão."

São Francisco de Assis

RESUMO

Canuto, G. A. B **Avaliação metabolômica comparativa *in vitro* de fármaco candidato ao tratamento de leishmaniose.** 2016. 129p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A leishmaniose é uma doença negligenciada provocada por parasitas do gênero *Leishmania*, que ocorre em mais de 90 países no mundo, afetando milhões de pessoas. A doença é tratável, mas ainda não tem cura, e o arsenal terapêutico comumente utilizado é limitado, e consiste do uso de fármacos de alta toxicidade. Sendo assim, a busca por novas terapias tem sido encorajada e o uso de compostos ativos isolados de produtos naturais, como plantas, tem se mostrado eficaz. Para uso futuro destes princípios ativos no tratamento, faz-se necessário o entendimento do seu mecanismo de ação. As ciências "ômicas", mais especificamente a metabolômica, que é a análise comparativa dos metabólitos alterados em um sistema biológico após intervenção externa, tem sido bastante aplicada com este objetivo. A abordagem metabolômica é multidisciplinar e as análises são realizadas com auxílio de plataformas analíticas modernas, como as técnicas de separação acopladas a espectrometria de massas (MS). Para tratamento dos dados são utilizadas ferramentas estatísticas avançadas, e as substâncias alteradas são correlacionadas com rotas metabólicas.

Neste trabalho, o mecanismo de ação em *Leishmania infantum* da substância ativa (metildihidrodieugenol B) isolada da planta *Nectandra leucantha*, foi avaliado por abordagem metabolômica global, com multiplataforma de análise (cromatografia gasosa e líquida em fase reversa hifenadas, GC-MS e RPLC-MS, respectivamente). Otimizações de preparo de amostra, extração, e derivatização para GC-MS, para obter o maior número possível de metabólitos foram realizadas nas amostras em estudo.

Promastigotas de *L. infantum* foram crescidos em meio de cultura e após 72 h foram tratados com metildihidrodieugenol B (na concentração de 58.18 μg x mL^{-1}); passadas 48 h de tratamento, a ação enzimática foi interrompida, as células lavadas e congeladas para análise posterior. Metanol:água (1:1) e metanol 100% foram utilizados como solventes extratores para acessar os

metabólitos intracelulares nas análises por GC-MS e RPLC-MS, respectivamente. Derivatização com O-metoxiamina em piridina (15 mg x mL^{-1}) à temperatura ambiente por 90 min, seguida de sililação com BSTFA + 1% TMCS por 30 min à 40 ºC foi realizada para tornar voláteis e estáveis os metabólitos para análise por GC-MS.

Os resultados de ambas plataformas de análise apontou grandes diferenças entre os grupos de amostras tratadas e não tratadas com a substância ativa, e os metabólitos alterados com significância estatística foram correlacionados com o metabolismo de *Leishmania*. Diferentes aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, glicerolipídeos e fosfoslipídeos foram encontrados, em sua maioria, diminuídos com o tratamento. Devido a complexidade do metabolismo do parasita e a grande diversidade dos metabólitos alterados, um mecanismo de ação multi-*target* pode ser atribuído ao dímero de fenilpropanoide. Mudanças no metabolismo da glicólise e gluconeogênese são destacadas, indicando alterações nas fontes de energia da célula. Modificações na composição lipídica da membrana plasmática do parasita também foram observadas, sugerindo variações em sua flexibilidade e fluidez. Os resultados obtidos são preliminares, mas muito importantes para dar o primeiro passo na elucidação da ação desta substância no tratamento da leishmaniose, pleiteando a busca por novas terapias.

Palavras-chave: Metabolômica, multiplataforma de análise, *Leishmania infantum*, extração extracelular, dímero de fenilpropanoide, análise estatística

ABSTRACT

Canuto, G. A. B **In vitro comparative metabolomics evaluation of a drug candidate for leishmaniasis treatment.** 2016. 129p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Leishmaniasis is a neglected disease caused by *Leishmania* parasites, which occurs in more than 90 countries worldwide, affecting millions of people. The disease is treatable but not curable, and the commonly used therapeutic arsenal is limited and consists in the use of highly toxic drugs. The search for new therapies has been encouraged and the use of active compounds, isolated from natural products, such as plants, has been proven effective. For future use of these active compounds in the treatment, it is necessary to understand its mechanism of action. "Omics" sciences, specifically metabolomics, which is the comparative analysis of altered metabolites in a biological system after external intervention, has been widely applied for this purpose. The metabolomic approach is multidisciplinary and the analyzes are performed using modern analytical platforms, such as separation techniques coupled to mass spectrometry (MS). Data treatment are performed with advanced statistical tools and altered metabolites are correlated with metabolic pathways.

In this work, the mechanism of action, in *Leishmania infantum*, of an active compound (methyldehydrodieugenol B), isolated from Nectandra leucantha plant, was evaluated by global metabolomics approach with multiplatform analysis (gas and reversed phase liquid chromatography, GC-MS and RPLC-MS, respectively). Optimizations of sample preparation, extraction and derivatization for GC-MS to obtain the maximum number of metabolites in the samples under consideration were performed.

L. infantum promastigotes were grown in culture medium and after 72 h they were treated with metildihidrodieugenol B (at a concentration of 58.18 μg x mL^{-1}); after 48 h of treatment, enzyme activity was quenched, cells washed and frozen for further analysis. Methanol:water (1:1) and 100% methanol are used as solvent extractor to assess intracellular metabolites for analysis by GC-MS and RPLC-MS, respectively. Derivatization with O-methoxyamine in pyridine (15 mg

x mL^{-1}) at room temperature for 90 min, followed by silylation with BSTFA + 1% TMCS for 30 min at 40°C was performed to make volatile and stable metabolites for analysis by GC- MS.

The results of both analytical platforms showed significant differences between treated and non-treated samples with the active substance, and altered metabolites with statistical significance were correlated with *Leishmania* metabolism. Different amino acids, fatty acids, carbohydrates, and glycerolipids phospholipids were found, mostly decreased with treatment. Due to the complexity of the parasite metabolism and the great diversity of altered metabolites, a multi-target mechanism can be assigned to the methyldehydrodieugenol B. Changes in the metabolism of glycolysis and gluconeogenesis are highlighted, indicating changes in the cell energy sources. Changes in the lipid composition of the parasite plasma membrane were also observed, suggesting variations in its flexibility and fluidity. The results are preliminary, but very important to take the first step into elucidation of the action of this substance in the treatment of leishmaniasis, aiming the search for new pharmaceutical therapies.

Keywords: Metabolomics, multi-analytical platform, *Leishmania infantum*, extracellular extraction, phenylpropanoid dimer, statistical analysis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2FI - *Two-Factor Interaction Model*

AcCoa - Acetil Coenzima A

Ala - Alanina

ALDO - Frutose-bifosfato aldolase

AMA - Amastigotas

AMDIS - *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*

anfoB - Anfotericina B

ANOVA - Análise de Variância

BSTFA - N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

bw - Largura de banda

ȼ - Célula(s)

^{13}C NMR - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CE - Eletroforese Capilar

CL - Leishmaniose Cutânea

CTR - Amostras Controle

CV - Coeficiente de Variação

DHAP - Dihidroxiacetona Fosfato

EI - Impacto de Elétrons

ESI - Ionização por Electrospray

ESI-IT-TOF - *Electrospray Ion Trap Time-of-Flight*

FBPase - Frutose 1,6-Bifosfatase

fwhm - Largura de pico

F - Coeficiente de Fisher

Fru - Frutose

GAP - Gliceraldeído 3-Fosfato

GC - Cromatografia Gasosa

GK - Glicerol 3-Quinase

^{1}H NMR - Ressonância Magnética Nuclear de Próton

HILIC - Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HMDB - *Human Metabolome Database*

IC_{50} - Concentração Média (50%) Máxima Inibitória

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

L. - *Leishmania*

LC - Cromatografia Líquida

LysoPC - Lisofosfatidilcolina

M199 - Meio de Cultura (código 199)

MALDI - Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz

max - Número Máximo de Picos por Cromatograma de Íon Extraído

MCL - Leishmaniose Mucocutânea

minfrac - Fração Mínima de Amostras

MS - Espectrometria de Massas

MT - Miltefosina

m/z - Relação massa/carga

mzwid - Largura de Sobreposição de Faixas de *m/z*'s

NIST - *National Institute of Standards and Technology*

NMR - Ressonância Magnética Nuclear

OH-Pro - Hidroxiprolina

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPLS-DA - *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*

PBS - Tampão Fosfato-Salino

PCA - *Principal Component Analysis*

peakwidth - Largura de Pico Cromatográfico

P - Fosfato (*Phosphate)*

PI - Padrão Interno

PKFK - Fosfofrutoquinase

PLS-DA - *Partial Least Squares Discriminant Analysis*

PRO - Promastigotas

Q^2 - Previsibilidade do Modelo

QC - Controle de Qualidade

R^2 - Variação Explicada

RPI - Ribose 5-Fosfato Isomerase

RPLC - Cromatografia Líquida em Fase Reversa

SM - Esfingomielina

snthresh - Relação sinal/ruído

SPE - Extração em Fase Sólida

TCA - Ciclo do Ácido Tricarboxílico

TIC - *Total Ion Chromatogram*

TMCS - Trimetil cloro silano

TRT - Amostras Tratadas

UV-Vis - Ultravioleta Visível

V. - *Viannia*

VIP - *Variable Importance Projection*

VL - Leishmaniose Visceral

LISTA DE FIGURAS

1.1 Ciclo de vida dos parasitas de *Leishmania* 22

1.2 Resumo das etapas de trabalho para análise metabolômica 30

3.1 Estrutura química do metildihidrodieugenol B, candidato a fármaco para avaliação no tratamento da leishmaniose 54

4.1 Curva de crescimento celular de *L. infantum* 62

4.2 Avaliação do tempo em cultura de parasitas de *L. infantum* após repique celular. **a)** Diagrama de Venn para comparação de número de metabólitos identificados e **b)** Média de intensidade e desvio-padrão de metabólitos selecionados (preto - 48 h, vermelho - 72 h e azul - 96 h) 63

4.3 Cromatograma de íons totais de GC-MS para avaliação de eficiência de lavagem das células. **a)** meio de cultura, **b)** PBS, **c)** lavagem 1, **d)** lavagem 2, **e)** lavagem 3, **f)** lavagem 4, **g)** lavagem 5 e **h)** lavagem 6 66

4.4 Avaliação do número de células de *L. infantum* por amostra: **a)** correlação entre número de células e quantidade de metabólitos identificados por GC-MS, e **b)** média de triplicata da intensidade e desvio de metabólitos identificados. Preto - 4.10^7, vermelho - 6.10^7, azul - 8.10^7 e verde - 10.10^7 promastigotas/mL por amostra 67

4.5 Imagens de microscópio invertido dos pellets de *L. infantum* após extração de metabólitos intracelulares por **a)** tissuelyzer e **b)** ultrassom com sonda 69

4.6 Desenho de mistura de solventes para avaliação da extração de metabólitos intracelulares em *L. infantum*. (A) 100% MeOH, (B) 100% H_2O, (C) H_2O:$CHCl_3$ (1:9), (D) MeOH:$CHCl_3$ (1:9), (E) MeOH:H_2O (1:1), (F) H_2O:$CHCl_3$ (1:1), (G) MeOH:$CHCl_3$ (1:1), (H) MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (6:3:1), (I) MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (2:4:4), (J) MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (6:1:3) e (K) MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (4:3:3). Todas as proporções estão em volume 70

4.7 Cromatogramas de íons totais do estudo da extração por combinação de solventes por GC-MS. Condições de análise na Parte Experimental 73

4.8 Cromatogramas de íons totais do estudo da extração por combinação de solventes por RPLC-MS. Condições de análise na Parte Experimental 74

4.9 Superfície de resposta 2D de modelo 2FI para avaliação do número de compostos **a)** identificados por GC-MS e **b)** putativamente identificados por RPLC-MS 77

4.10 Superfícies de resposta para modelo 2FI para avaliação de tipo de solvente extrator por scores atribuídos às intensidades de metabólitos identificados por **a)** GC-MS e **b)** RPLC-MS 81

4.11 Esquema de reações de oximação seguida de sililação para **a)** aldeídos e cetonas e **b)** açúcares, e **c)** esquema simplificado de reação de sililação para diferentes grupamentos químicos 84

4.12 Diagrama de Venn para comparação de número de metabólitos identificados por GC-MS em extratos de *L. infantum* após derivatização lenta e rápida 85

4.13 Média e desvio-padrão de triplicata de medidas para avaliação do tipo de derivatização em dez metabólitos identificados por GC-MS. Derivatização lenta (16 h de oximação à temperatura ambiente) em preto e rápida (2 h de oximação à 40 ºC) em vermelho. Para ambas as derivatizações, a sililação foi realizada à 70 ºC por 60 min 86

4.14 Média da intensidade e desvios-padrão de padrões analíticos detectados por GC-MS para avaliação da reação de oximação. Condição M-2 (preto): 10 µL de reagente, 40 ºC por 120 min e condição M-4 (vermelho): 10 µL de reagente, 60 ºC por 120 min. Subsequente sililação realizada com 10 µL de BSTFA + 1% TMCS 120 min à 70 ºC 89

4.15 Média da intensidade e respectivos desvios-padrão de padrões analíticos detectados por GC-MS para avaliação da reação de sililação. Condição S-1 (preto): 10 µL de reagente, 40 ºC por 60 min, condição S-2 (vermelho): 10 µL de reagente, 40 ºC por 30 min, condição S-5 (azul): 30 µL de reagente, 40 ºC por 30 min e condição S-8 (verde): 30 µL de reagente, 70 ºC por 30 min. Etapa de oximação realizada com 10 µL de reagente 120 min à 40 ºC 91

4.16 Média da intensidade e desvios-padrão de padrões analíticos detectados por GC-MS para nova avaliação da reação de oximação. Condição 1 (preto): temperatura ambiente por 120 min, condição 2 (vermelho): 40 ºC por 120 min e condição 3 (azul): temperatura ambiente por 90 min. Subsequente sililação realizada com 10 µL de BSTFA + 1% TMCS por 30 min à 40 ºC 93

4.17 Cromatograma típico de amostra controle de *L. infantum* sob as condições otimizadas de extração e derivatização 94

4.18 Esquema ilustrativo de obtenção e preparo de amostras de *L. infantum* par análise metabolômica por diferentes plataformas analíticas 95

4.19 *Scores plot* dos modelos PCA para amostras de *L. infantum* tratadas com metildihidrodieugenol B, analisadas por **a)** GC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.913 e Q^2 = 0.804, e **b)** RPLC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.540 e Q^2 = 0.459. ● QC, amostras controle de qualidade; ■ CTR, amostras controle (não tratadas) e ♦ TRT, amostras tratadas com metildihidrodieugenol B 98

4.20 *Scores plot* dos modelos PLS-DA com predição de QCs para amostras de *L. infantum* tratadas com metildihidrodieugenol B, analisadas por **a)** GC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.968 e Q^2 = 0.958, ANOVA: F = 148.7 e *p*-valor = $1.46x10^{-16}$, e **b)** RPLC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.995 e Q^2 = 0.987, ANOVA: F = 453.8 e *p*-valor = $1.62x10^{-21}$. ▲QC, amostras controle de qualidade previstas; ■ CTR, amostras controle (não tratadas) e ♦ TRT, amostras tratadas com metildihidrodieugenol B 99

4.21 Testes de 100 permutações do modelo PLS-DA da análise metabolômica por **a)** GC-MS e **b)** RPLC-MS, referente ao estudo do mecanismo de ação do metildihidrodieugenol B em *L. infantum* 100

4.22 *Scores plot* dos modelos OPLS-DA para amostras de *L. infantum* tratadas com metildihidrodieugenol B, analisadas por **a)** GC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.971 e Q^2 = 0.957, ANOVA: F = 128.2 e *p*-valor = $2.27x10^{-15}$, e **b)** RPLC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.995 e Q^2 = 0.988, ANOVA: F = 453.8 e *p*-valor = $1.62x10^{-21}$. ■ CTR, amostras controle (não tratadas) e ♦ TRT, amostras tratadas com metildihidrodieugenol B 101

4.23 Representação esquemática da via da glicólise e gluconeogênese. Metabólitos destacados em laranja e verde estão aumentados e diminuídos, respectivamente, em *L. infantum* tratadas com metildihidrodieugenol B. Enzimas destacadas: (ALDO) fructose-bisphosphate aldolase, (FBPase) fructose 1,6-biphosphatase, (GK) glycerol 3-kinase, (PKFK) phosphofructokinase, (RPI) ribose 5-phosphate isomerase. Abreviações: Glc - glucose, PI - phosphatidylinositol, Fru - fructose, P - phosphate, S-adoMet - S-adenosyl methionine, AcCoA - acetyl coenzime A, OH-Pro - hydroxyproline, Ala - alanine, DHAP - dihydroxyacetone phosphate, GAP - glyceraldehyde 3-phosphate, and TCA cycle - tricarboxylic acid cycle. Xylulose/ribulose/ribose e ribitol/arabitol são açúcares indistinguíveis pela técnica de análise (GC-MS) 110

LISTA DE TABELAS

1.1 Principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose e seus possíveis mecanismos de ação 25

1.2 Compilação de trabalhos com abordagem metabolômica em *Leishmania* encontrados na literatura nos últimos 16 anos 43

4.1 Critério de avaliação do solvente extrator por *score* 72

4.2 Número de compostos identificados e putativamente identificados por GC-MS e RPLC-MS, respectivamente, para os solventes extratores estudados 76

4.3 Resultados dos parâmetros estatísticos da ANOVA em modelo 2FI aplicado ao estudo de diferentes solventes extratores para metabolômica por GC-MS e RPLC-MS 78

4.4 *Scores* atribuídos a cada solvente extrator de acordo com a intensidade dos metabólitos identificados ou putativamente identificados 79

4.5 Resultados dos parâmetros estatísticos da ANOVA em modelo 2FI aplicado ao estudo de diferentes solventes extratores para metabolômica da avaliação de scores atribuídos aos metabólitos identificados por GC-MS e RPLC-MS 81

4.6 Estudo das condições das reações de oximação e sililação de derivatização para análise metabolômica por GC-MS 87

4.7 Número de compostos identificados (total) e número de compostos identificados apresentando CV < 30% de intensidade, para estudo da reação de oximação em diferentes condições. Subsequente sililação realizada com 10 μL de BSTFA + 1% TMCS 60 min à 70 ºC .. 88

4.8 Número de compostos identificados e com CV < 30% para avaliação de diferentes condições de sililação. Prévia oximação realizada com 10 μL de O-metoxiamina em piridina (15 mg x mL^{-1}) por 120 min à 40 ºC 90

4.9 Parâmetros do XCMS utilizados no processamento de dados de GC-MS e RPLC-MS 97

4.10 Metabólitos significativos (p-valor < 0.05) e suas características obtidos na avaliação metabolômica *untarget* por GC-MS e RPLC-MS do mecanismo de ação do metildihidrodieugenol B em promastigostas de *L. infantum* 103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

1.1. Leishmaniose 21
1.1.1. Tratamento 23
1.1.2. Produtos Naturais 26
1.2. Metabolômica 27
1.2.1. Preparo de Amostra 31
1.2.2. Técnicas de Análise 33
1.2.3. Tratamento dos Dados 37
1.3. Metabolômica e Leishmaniose 39

2. OBJETIVOS 48

2.1. Objetivo Geral 49
2.2. Objetivos Específicos 49

3. PARTE EXPERIMENTAL 50

3.1. Materiais e Reagentes 51
3.2. Crescimento e Manutenção da Cepa de *L. infantum* 52
3.3. Preparo das Células para Análise Metabolômica 53
3.4. Extração dos Metabólitos Intracelulares 53
3.5. Derivatização para Análise por GC-MS 54
3.6. Candidato a Fármaco e Tratamento das Células para Avaliação Metabolômica 54
3.7. Instrumentação e Condições de Análise 56
3.7.1. GC-MS 56
3.7.2. RPLC-MS 56
3.8. Tratamento dos Dados 57

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 60

4.1. Protocolo de Preparo das Células para Análise Metabolômica 61

4.2. Desenvolvimento de Método para Extração de Metabólitos Intracelulares 68

4.3. Otimização das Etapas de Derivatização para Análise por GC-MS 83

4.4. Análise Metabolômica do Tratamento de *L. infantum* com o Produto Natural Metildihidrodieugenol B 96

5. CONCLUSÕES 111

6. PERSPECTIVAS 113

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 115

SÚMULA CURRICULAR 125

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

A leishmaniose é um conjunto de doenças não infecciosas, causadas por diferentes espécies de parasitas do gênero *Leishmania*, que pertencem à família *Trypanosomatidae*. É encontrada em mais de 90 países, em partes da Ásia, Oriente Médio, África, América do Sul e sul da Europa[1,2]. Existem cerca de vinte espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem[3], dentre estas destacam-se: *Leishmania Viannia braziliensis, Leishmania V. gruyanensis, Leishmania Leishmania major, Leishmania L. tropica, Leishmania L. panamensis, Leishmania L. aethiopica e Leishmania L. infantum* (esta última, também conhecida como *Leishmania L. chagasi*)[4,5].

A manifestação da doença, embora dependa do tipo de parasita encontrado e do estado imunológico do paciente, pode apresentar três formas clínicas: 1) Leishmaniose visceral (VL), na qual os parasitas migram para órgãos viscerais (como fígado, baço, medula óssea); é considerada a forma mais grave, e pode ser fatal, se não tratada, 2) Leishmaniose cutânea (CL), forma mais comum da doença, na qual produz úlceras nas partes expostas do corpo (como pernas e braços), deixando cicatrizes ao longo da vida, e 3) Leishmaniose mucocutânea (MCL), que pode causar lesões grosseiramente desfigurantes (destruição parcial ou total das mucosas das cavidades da boca, nariz e garganta), e é de evolução crônica. Esta forma leva a um grande preconceito da sociedade, em função da grande desfiguração física causada[6,7].

O número de casos de leishmaniose no mundo, muitas vezes é incerto, especialmente pela falta de diagnóstico, falta de informação da população e comunicação às autoridades de saúde. A última atualização da Organização Mundial da Saúde (OMS), em Fevereiro de 2015, estimou o surgimento de 0.7 a 1.3 milhões de novos casos da forma cutânea e de 0.2 a 0.4 milhões de novos casos da forma visceral pelo mundo, e um total de 20 a 30 mil mortes ocorrem anualmente[6]. Mais de 90% dos casos de leishmaniose no mundo ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Brasil, Peru, Sudão, Afeganistão, Argélia, Arábia Saudita, Irã e Síria[8].

A Figura 1.1 apresenta um esquema bastante complexo do ciclo de vida e infecção do parasita, que possui duas formas morfológicas distintas: uma flagelada ou promastigota (PRO), que se encontra livre no tubo digestivo do inseto vetor (flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia*) e outra aflagelada ou amastigota (AMA), encontrada nas células do sistema imunológico dos hospedeiros vertebrados (cães, raposas, ratos e marsupiais)[9].

O vetor adquire a infecção quando pica um vertebrado contaminado, ingerindo macrófagos com as formas AMA do parasita. No tubo digestivo do inseto, essas formas transformam-se em PRO e migram para o esôfago e glândulas salivares do inseto, onde se multiplicam. Quando o inseto pica outro vertebrado, ele transmite o parasita junto com sua saliva, mantendo seu ciclo de vida ativo[3].

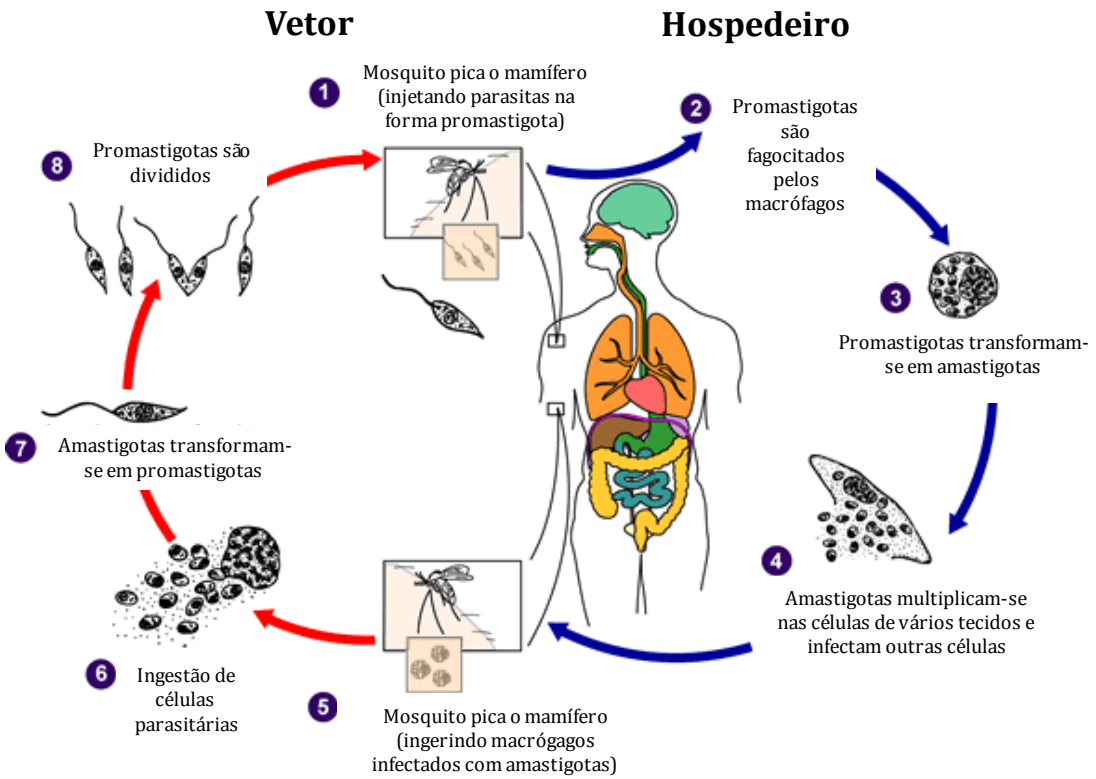


Figura 1.1. Ciclo de vida dos parasitas de *Leishmania*. Adaptada de: *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)[3].

A associação das infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da AIDS, com o protozoário da *Leishmania* caracteriza a co-infecção *Leishmania*/HIV. Uma avaliação do conjunto de manifestações clínicas das leishmanioses em pacientes imunocompetentes indica que não existe um perfil definido que possa ser associado a essa co-infecção, ou seja, a gravidade da manifestação clínica e a resposta ao tratamento estão diretamente relacionadas à condição imunológica do paciente[10].

Grande parte dos fatores de risco para distribuição da leishmaniose no mundo são provocados pelo próprio ser humano e estão associados a condições socioeconômicas, como: urbanizações mal planejadas e condições sanitárias inexistentes ou precárias (esgoto a céu aberto, falta de gestão de resíduos, etc.), além de má nutrição (dietas pobre em proteínas, vitamina A, ferro, etc.), mudanças climáticas (afetada por temperatura e umidade) e, ainda, mudanças ambientais e desflorestamento, afetados pela urbanização[7,11].

A leishmaniose é um problema sério de saúde pública, e sua prevenção e controle estão baseados no diagnóstico e tratamento precoce da doença. É considerada pela OMS uma doença negligenciada[12], e que, portanto, necessita de medidas emergenciais para controle do vetor e ainda, aumento de consciência e educação da população que vive em áreas de risco[11].

1.1.1. Tratamento

Antimoniais pentavalentes, os primeiros tratamentos para VL e CL, foram introduzidos há mais de 60 anos[13]. Gaspar Vianna relatou também a eficácia do tartarato de potássio e antimônio (complexo SbIII) no tratamento da leishmaniose[14]. Atualmente, os antiomoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) continuam sendo os mais utilizados para tratar pacientes infectados, entretanto, apresentam sérios efeitos colaterais, como distúrbios cardiovasculares e gastrointestinais, por exemplo, além de necessitarem de longos períodos de administração, que muitas vezes acarreta em perda de eficiência[13].

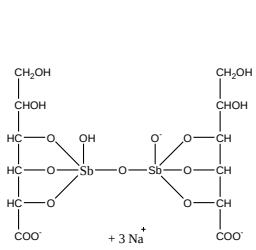
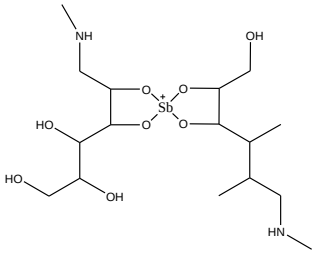
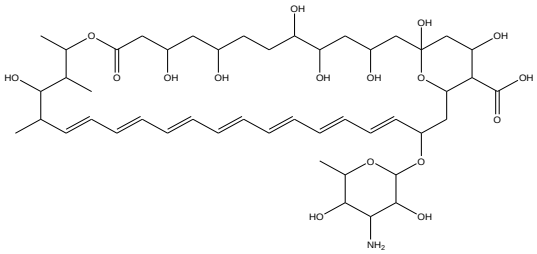
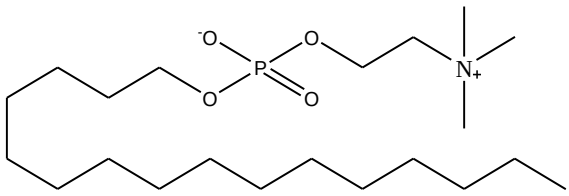
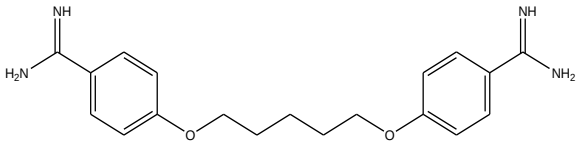
A anfotericina B (anfoB), segunda linha de tratamento da VL, vem apresentando eficácia quando os antimoniais falham, pode ser administrada em formulação única ou em combinação com outros fármacos, mostrando-se uma boa alternativa ao tratamento da leishmaniose. Entretanto, se administrada sem supervisão médica pode causar efeitos nefrotóxicos agudos[13]. A pentamidina também tem sido utilizada como segunda linha de tratamento e apresenta alto grau de toxicidade. Foi introduzida em 1952 e já demonstrou eficácia contra as três formas da doença (VL, CL e MCL)[15].

A miltefosina (MT), primeiro tratamento oral para leishmaniose, foi inicialmente desenvolvida para combater o câncer. Tem demonstrado excelente cura parasitológica contra a *L. donovani*, incluindo casos de parasitas resistentes a antimônio, para a forma cutânea da doença e tem sido testada com êxito no tratamento da VL[16,17]. Apesar de demonstrar bons resultados terapêuticos, este medicamento é bastante caro e efeitos de teratogenicidade já foram comprovados[18].

Apesar da possibilidade de tratamento e existência dos fármacos citados, a leishmaniose é uma doença que não tem cura. Geralmente, pessoas infectadas vivem em áreas de difícil acesso, dificultando o tratamento, que mostra-se bastante agressivo e altamente tóxico. Além disso, os longos períodos de administração e hospitalização afetam a renda das famílias, o que acarreta, em interrupção do tratamento, facilitando o desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados[13]. Com todos esses obstáculos, a eficácia dos tratamentos torna-se um grande desafio e a ação destes, ainda é pouco estudada. A Tabela 1.1 apresenta a estrutura química dos fármacos acima discutidos e elenca os possíveis mecanismos de ação[7].

Uma vez que existem poucos fármacos disponíveis no mercado, e estes apresentam alta toxicidade, e não havendo ainda uma vacina disponível para prevenção da doença, verifica-se uma demanda urgente na descoberta de novos princípios ativos e desenvolvimento de uma nova linha de terapia[7,19].

Tabela 1.1. Principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose e seus possíveis mecanismos de ação.

Fármacos	**Mecanismo de Ação**
Antimoniais  Pentostan  Glucantime	Apoptose[a], β-oxidação de ácidos graxos e fosforilação de adenosina difosfato
Anfotericina B 	Formação de poros na membrana celular, levando a quebra das células promastigotas
Miltefosina 	Apoptose[a], redução do conteúdo de lipídios e inibição de fosfatidiletanolamina-N-metiltransferase, que leva a diminuição da proliferação do parasita.
Pentamidina 	Diminuição do potencial de membrana mitocondrial.

[a] Morte celular programada.

1.1.2. Produtos Naturais

Uma das estratégias de pesquisa mais importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos baseia-se na busca de novos princípios ativos encontrados em produtos de origem natural. O Brasil é um país promissor para este tipo de pesquisa, devido a grandeza territorial e rica biodiversidade, apresentando mais de 55 mil espécies vegetais, 524 mamíferos, 517 anfíbios, 1622 aves, 468 répteis, 3 mil espécies de peixes de água doce, e cerca de 15 milhões de insetos[20].

Moléculas de origem natural provenientes de plantas, assim como toxinas, provenientes de insetos, serpentes, invertebrados marinhos, peixes e anfíbios, vem demonstrando atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral e antiparasitária[21-25]. Dentre as fontes naturais para protótipos de candidatos a fármacos, as plantas são uma das mais promissoras, uma vez que estão em grande abundância e em diferentes espécies, e são ricas fontes de extratos biologicamente ativos, óleos essenciais e substâncias isoladas[26].

Uma interessante revisão sobre produtos naturais que apresentam atividade anti-*Leishmania* foi realizada em 2005 por Rocha e colaboradores, no qual são apresentados mais de uma centena de espécies de plantas e mais de duzentas substâncias químicas de origem natural com atividade contra o parasita[27]. No trabalho de Tempone *et al.* (2008), os autores encontraram cinco extratos metanólicos de diferentes espécies de plantas brasileiras com atividade contra *L. chagasi* e outros quatro com atividade contra *L. amazonensis*. As respectivas concentração efetiva a 50% foram determinadas e os autores ressaltam a importância de *screening* em extratos de plantas, no descobrimento de novos candidatos ao tratamento da leishmaniose[25].

A busca por compostos ativos de fontes naturais e a criação de bibliotecas químicas tem sido uma proposta atrativa no estudo de tratamento de diversas doenças, sobretudo para a leishmaniose. E apesar de hoje existirem inúmeros estudos sobre o tema e uma infinidade de compostos ativos, ainda há carência de investigação sobre o mecanismo de ação desses compostos[28], sendo assim, abordagens, como as ciências "ômicas", que buscam o entendimento da ação

dessas substâncias através da avaliação da sequência gênica e metabolismo afetado, são de grande importância e devem ser encorajadas.

1.2. Metabolômica

Com a evolução das pesquisas científicas, possibilitando o estudo dos genes, proteínas e metabólitos, paralelamente aos avanços na descoberta de novos fármacos, do controle e biomonitoramento de doenças, faz-se necessário o desenvolvimento de ferramentas de investigação das alterações biológicas que ocorrem nos seres vivos devido a fatores genéticos, ambientais e intervenções externas[29].

As ciências "ômicas" tem por objetivo o entendimento sobre o funcionamento dos organismos e suas alterações biológicas. Após a descoberta do genoma (conjunto do material genético de um sistema biológico), os estudos voltaram-se à elucidação das funções de todos os genes, bem como da caracterização de suas interações com fatores ambientais. Com isso, surgiu o transcriptoma (conjunto dos transcritos-RNA), o proteoma (conjunto de proteínas) e o metaboloma (conjunto de metabólitos). Metabólitos são o produto final de processos celulares, sua determinação pode ser considerada a última resposta de um sistema biológico que sofreu alterações[30].

A palavra metabolômica foi descrita pela primeira vez em 2002 por Oliver Fiehn, como sendo a análise quantitativa abrangente do metaboloma[30]. O termo metaboloma foi introduzido em 1998, como sendo o conjunto de metabólitos sintetizados por um organismo[31]. As definições dos termos relativos a análise metabolômica são bastante controversas entre diversos autores da área, como Nicholson *et al.* (1999), que utilizam o termo metabonômica, como sendo a medida quantitativa da resposta metabólica de um sistema após estímulo fisiopatológico ou genético[32], ou Villas-Bôas, que define a análise metabolômica como identificação e quantificação de todos os metabólitos intracelulares (*fingerprinting*) e extracelulares (*footprinting*) abaixo de 1000 Da, usando diferentes técnicas de análise[33]. O ponto crucial é que a metabolômica fornece uma visão integrada da bioquímica em organismos complexos, no qual a

resposta de um sistema é alcançada a nível molecular[34]. Apesar das diferentes maneiras, mas complementares, de definir tal abordagem, neste trabalho será considerado que metabolômica é a análise comparativa dos metabólitos alterados, após intervenção externa, entre grupos de amostras inseridos em um sistema biológico de estudo.

Dentre as estratégias de análise metabolômica estão a identificação e quantificação de uma classe ou grupo de metabólitos pré-estabelecidos, chamada de análise alvo (*target*) ou ainda, a identificação de todos os metabólitos que compõem o sistema estudado, sem conhecimento prévio de quais espécies estão envolvidas, chamada de análise global (*untarget*).

Apesar de ser uma abordagem relativamente nova da ciência, a metabolômica vem sendo bastante aplicada em diversas áreas do conhecimento como: parasitologia e doenças negligenciadas[12], alimentos[35], clínica e nutrição[36], toxicologia[37], plantas[38], entre outras.

Basicamente, o fluxo de trabalho em metabolômica, independente da aplicação ou abordagem *target* e *untarget* compreende as seguintes etapas[39]:

- definição do problema biológico, geralmente uma ou mais perguntas precisam ser respondidas, e aqui define-se o tipo de amostra (biofluido) que será utilizada, sempre baseado no tipo de resposta que se espera; por exemplo, no estudo de uma doença que afeta os rins, urina é a amostra mais indicada, pois reflete as alterações no órgão ;
- planejamento experimental adequado, que inclui amostragem, na qual é definida a quantidade de amostra (n) em cada grupo estudado, para garantir a representatividade do todo, bem como a forma como estas amostras serão coletadas e armazenadas até análise;
- preparo da amostra, é definido de acordo com a abordagem metabolômica a ser desenvolvida (*target* ou *untarget*) e a técnica de análise empregada; neste ponto verifica-se a necessidade de derivatização ou uso de reagentes deuterados. Devem ser considerados a interrupção da atividade enzimática, procedimentos de precipitação de proteínas, extrações seletivas (para análise *target*), ruptura de células e tecidos, diluição, etc.;

- análise das amostras por uma ou mais técnica analítica, geralmente são utilizados métodos abrangentes para cobrir maior quantidade possível de metabólitos (para análises *untarget*), ou um método bastante seletivo (para análises *target*), sempre randomizando as amostras e utilizando amostras de controle de qualidade (QC), que são a mistura de um mesmo volume de todas as amostras envolvidas no estudo;
- processamento dos dados, que inclui obtenção da matriz de dados utilizando ferramentas de detecção de picos, alinhamento, filtro, normalização, etc. para prosseguir com análise estatística (uni e multivariada) para seleção das entidades discriminantes. Diversos softwares licenciados e de livre acesso podem ser utilizados para processamento dos dados;
- identificação dos metabólitos utilizando biblioteca de espectros próprias (*in-house*), *online* (como, Human Metabolome Database - HMDB[40], Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG[41], Metlin[42], etc.) ou comerciais (por exemplo, NIST - *National Institute of Standards and Technology*). Na identificação putativa, a confirmação pode ser realizada por análises de MS/MS, utilizando padrões analíticos autênticos, ou ainda, por metabolômica em fluxo, utilizando compostos marcados (com ^{13}C, por exemplo);
- interpretação biológica dos resultados, verificação de alterações (diminuição ou aumento) dos metabólitos e correlação com rotas bioquímicas, gerando uma resposta ou nova hipótese para o problema inicialmente proposto. Após a interpretação biológica, faz-se necessária uma validação biológica do estudo, através da repetição do experimento com novas amostras, assim como, determinações quantitativa dos metabólitos discriminantes.

Um esquema com algumas características de cada etapa do fluxo de trabalho está representado no Figura 1.2. As principais etapas do fluxo de trabalho (preparo de amostra, análise e tratamento dos dados), que geralmente são as maiores fonte de erros e requerem maior cuidado e tempo, serão discutidas mais detalhadamente nos próximos tópicos.

Figura 1.2. Resumo das etapas de trabalho para análise metabolômica.

1.2.1. Preparo de Amostra

Mesmo com os recentes avanços na área de preparo de amostras para biofluidos, o processo de extração continua sendo uma das etapas mais críticas para a análise metabolômica, podendo demandar muito tempo de trabalho[43]. A complexidade química das amostras biológicas, sua heterogeneidade e faixa variável de concentração dos metabólitos torna o processo de extração ainda mais crítico[39]. O método de extração é uma etapa muito importante, pois pode refletir diretamente na qualidade dos resultados, e consequentemente na interpretação biológica da problemática estudada[44], como observado por Duportet *et al.* (2012). Tais autores testaram diferentes métodos de extração em amostras celulares e não apenas verificaram diferentes metabólitos, como variações nos teores destes, que resultaram em interpretações biológicas contraditórias[45]. Simó *et al.* (2011) também verificaram que o método de extração aplicado pode afetar completamente o resultado final de possíveis metabólitos estatisticamente significativos[46]. Para análise *untarget*, o método de extração deve ser abrangente e preferencialmente acessar a maior quantidade de metabólitos possível, não ser seletivo e não excluir moléculas com propriedades físico-químicas particulares, além de ser não destrutivo ou modificar a composição dos metabólitos química ou fisicamente[47].

Dependendo da natureza da amostra trabalhada (urina, sangue, células, plantas ou tecidos), um procedimento distinto pode estar envolvido no seu preparo[48]. Na análise metabolômica de células, a separação de metabólitos intra e extracelulares é requerida para entendimento dos processos metabólicos. Uma vez que o nível metabólico reflete a última resposta do sistema biológico, uma interrupção rápida do metabolismo e da atividade enzimática, processo chamado de *quenching*, é o primeiro passo do pré-tratamento de amostra[33]. Nesta etapa, é essencial que não haja ruptura da parede celular, a fim de se evitar lixiviação de metabólitos intracelulares, além de garantir remoção completa dos componentes extracelulares, presentes no meio de cultura e liberados pela célula[49]. Caso a análise pretendida seja dos metabólitos extracelulares, o meio deve ser tratado adequadamente, com remoção de proteínas e outros componentes por precipitação com solventes orgânicos. Para análise dos metabólitos

intracelulares, as células intactas devem ser lavadas com solução tampão neutra e então submetidas a processos de extração[45].

A obtenção da melhor metodologia de extração não é simples e depende da matriz com a qual se trabalha, além da técnica de análise. Por isso, muitos autores testam diferentes solventes para obter a melhor resposta para o método utilizado[47,50-52]. Os solventes comumente empregados, sejam puros ou em misturas, são: água, metanol, etanol, clorofórmio, acetonitrila, ácido perclórico e hidróxido de potássio, preferencialmente utilizados a frio (abaixo de 0 ºC), pois garantem a inibição enzimática e problemas de alterações metabólicas são evitados[53].

Algumas amostras de células ou tecidos em função de sua alta rigidez necessitam de auxílio mecânico para quebrar a parede celular e extrair os metabólitos com maior eficiência. Os equipamentos mais empregados para lise celular são: vortex, ultrassom, turrax, tissuelyzer e homogeneizadores de tecidos[49]. Todos esses equipamentos apresentam bons resultados de ruptura da membrana celular, mas a possibilidade de aquecimento e perdas de metabólitos por degradação devem ser levadas em consideração.

Nos métodos de extração em que resultam na diluição dos metabólitos extraídos, um passo de evaporação do solvente pode ser realizado[50]. A baixa concentração dos metabólitos presentes na matriz estudada, bem como a incompatibilidade do solvente extrator, por exemplo, solventes orgânicos (no caso da eletroforese capilar) e água (no caso da cromatografia gasosa) também requerem uma etapa de pré-concentração ou secagem. A extração em fase sólida (SPE) é uma metodologia muito utilizada na pré-concentração de analitos e, principalmente, na purificação de extratos (reduz significativamente efeitos de matriz e remove alguns interferentes como sais, por exemplo). Entretanto, raramente é aplicada à metabolômica, pois é uma técnica de preparo de amostra bastante seletiva, o que restringe seu uso para análises *target*[44,51].

Etapas adicionais podem estar envolvidas no preparo de amostras como reações de derivatização, para tornar os analitos voláteis para serem analisados por cromatografia gasosa (GC) por exemplo, ou ainda, diluição dos extratos em solventes deuterados, para análise por ressonância magnética nuclear (NMR)[54].

1.2.2. Técnicas de Análise

A metabolômica apresenta um grande desafio analítico, sobretudo devido à variação das propriedades químicas, físicas e concentração dos metabólitos presentes em amostras biológicas. Os metabólitos podem apresentar diversas configurações e composições químicas, variando de compostos extremamente polares a compostos apolares. Encontrar um método analítico capaz de cobrir todas as classes de metabólitos em uma única análise não é uma tarefa fácil[55]. As primeiras aplicações em metabolômica são datadas da década de 80, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)[56] e ressonância magnética nuclear (NMR)[57].

A espectrometria de massas (MS) seja por injeção direta, ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) ou acoplada a técnicas de separação (cromatografias líquida e gasosa, LC- e GC-, respectivamente, e eletroforese capilar CE-) é a técnica de detecção mais aplicada a metabolômica atualmente, pois proporciona análises rápidas, sensíveis e seletivas. O acoplamento com as técnicas de separação possibilita a identificação de inúmeros metabólitos, pertencentes a diferentes classes químicas[33,58].

NMR

A NMR foi uma técnica muito utilizada no início dos estudos metabolômicos. Nesta técnica, os núcleos absorvem radiação eletromagnética de uma frequência específica, na presença de um campo magnético forte. A identificação dos metabólitos é feita através da comparação de espectros, que são o registro das frequências dos picos de absorção contra a intensidade das moléculas[58,59].

Uma de suas grandes vantagens é o requerimento de pouca quantidade de amostra, e esta não ser destruída durante a análise, podendo ser analisada posteriormente por técnicas de separação acopladas à MS, cobrindo maior faixa de metabólitos identificados[60]. Outra vantagem é que tem a capacidade de analisar amostras biológicas intactas (fluidos, sólidos e semi-sólidos)[59]. As amostras são apenas misturadas com soluções contendo compostos de

referência (geralmente o tetrametilsilano dissolvido em água deuterada), colocadas na probe de NMR e analisadas, sendo possível realizar a análise de centenas de amostras por dia[58]. Entretanto, para se obter bons resultados é necessário o uso de equipamentos de alta resolução, o que a torna ainda mais cara. A baixa sensibilidade e não seletividade das análises por NMR, aliada ao custo faz com que seu uso nos estudos metabolômicos venha diminuindo nos últimos anos[60], além disso, problemas de sobreposição de sinais e comprometimento de algumas regiões nos espectros, dificultam a identificação dos metabólitos.

GC-MS

Na cromatografia gasosa a separação é baseada na diferença de ponto de ebulição e polaridade das diferentes substâncias químicas e é alcançada executando-se um gradiente de temperatura, eluindo-se os compostos mais voláteis inicialmente. O uso de coluna capilares torna esta técnica de separação muito eficiente e com alta resolução[61]. Em razão do acoplamento do GC com MS utilizar uma fonte de ionização por impacto de elétrons (EI) com energia constante (geralmente, -70 eV), as moléculas são fragmentadas diretamente na fonte, produzindo espectros de MS/MS bastante reprodutíveis. Isso torna a identificação dos compostos facilitada, tornando possível a criação de bibliotecas de espectros. Após deconvolução dos espectros de MS, realiza-se uma comparação dos padrões de fragmentação das substâncias contidas na biblioteca de espectros, que somada à confirmação pelo tempo de retenção (t_R), torna possível a identificação confiável dos metabólitos presentes nas matrizes biológicas[62]. Com isso, problemas como supressão iônica, e co-eluição de compostos (isômeros), comumente observados em LC-MS, são totalmente ausentes em GC-MS[63].

A análise por GC-MS requer que os compostos de interesse sejam voláteis e termicamente estáveis, a aplicação de análise por *headspace* para identificação de aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos vem sendo aplicada. Entretanto, a maioria dos metabólitos que compõem o metaboloma requerem derivatização, para que se tornem voláteis a baixas temperaturas[58]. Apesar da grande vantagem

no grau de credibilidade da identificação dos compostos, o extenso pré-tratamento de amostra aliado a longos tempos de análise, desmotivam o uso desta técnica para estudos metabolômicos[61].

LC-MS

A LC-MS apresenta-se como uma ferramenta muito versátil para realizar a maioria das tarefas de análise em estudos de perfis metabólicos, apresentando alta robustez, sensibilidade e seletividade, sendo de fácil operação[64]. Atualmente, é a técnica analítica mais empregada em metabolômica devido sua habilidade de separar e detectar uma grande faixa de moléculas, permitindo a identificação por elucidação estrutural por MS e quantificação dos analitos de interesse (na ordem de pg x mL^{-1})[65]. Outra grande vantagem é sua compatibilidade com os solventes extratores utilizados, sendo necessário pouco ou nenhum preparo de amostra. Em contrapartida, maiores volumes de solventes são gastos, em comparação com as outras técnicas de separação, além de longos períodos de condicionamento das colunas cromatográficas.

O modo de fase reversa (RPLC-MS), no qual a coluna possui características apolares e a fase móvel é constituída de solventes polares, é bastante utilizado nas análises metabolômica, especialmente por ser compatível com amostras biológicas aquosas, sendo as colunas de C18 as mais empregadas[66]. Outro tipo de abordagem cromatográfica, considerada complementar a C18, é a de interação hidrofílica (HILIC), que utiliza uma coluna contendo fase estacionária polar, em conjunto com fase móvel contendo uma mistura de baixa porcentagem de água e um solvente orgânico menos polar (geralmente acetonitrila), na qual o conteúdo de água vai aumentando gradativamente durante a corrida cromatográfica no modo gradiente[67]. Existe uma infinidade de colunas cromatográficas para HILIC, dentre elas destacam-se: silica gel, zwiterionicas, ciano, diol, etc.[68], seu uso vem crescendo nos últimos anos, sendo verificadas na literatura diversos trabalhos de análise metabolômica em diferentes tipos de biofluidos[69]. Atualmente, esta técnica é capaz de acessar compostos com características mais polares, ao contrário da RPLC-MS, utilizada para separação de substâncias mais apolares.

CE-MS

A CE-MS alia o alto poder de resolução e eficiência da eletroforese capilar com a universalidade e sensibilidade que a espectrometria de massas oferece frente a detectores como o UV-Vis e de fluorescência[70]. O acoplamento CE-MS resulta em uma ferramenta analítica importante, capaz de promover a separação, identificação e caracterização de muitos grupos de moléculas (polares ou iônicas). Dentre as vantagens da técnica podem ser citadas a habilidade de separar compostos em meio aquoso, importante no caso de biofluidos, que apresentam analitos de alta polaridade e, portanto, solúveis em água e ainda, a alta eficiência da coluna capilar, alta resolução promovendo a separação de um número maior de analitos em matrizes complexas, além de curtos tempos de análise[71]. É também uma técnica que utiliza nL de volume de injeção, o que pode ser uma grande vantagem quando se tem pouca quantidade de amostra disponível para o estudo (por exemplo, quando se trabalha com urina de rato, saliva de animais, etc.). Por outro lado, o pouco volume de amostra injetada no capilar e o uso de líquido auxiliar (para introdução dos analitos no MS por ionização *electrospray*, ESI), faz com que haja perda de sensibilidade, em função da diluição da amostra. Apesar disso, existe um grande esforço no desenvolvimento de tecnologias para melhorar a sensibilidade da técnica, como o uso de interfaces sem líquido auxiliar, que vem demonstrando crescente robustez para análises de rotina[72].

Hoje, a CE-MS é uma técnica complementar atrativa para estudos metabolômicos, visto que separa compostos carregados e com características polares. O mecanismo de separação desta técnica é fundamentalmente diferente da cromatografia, fazendo com que esta forneça informação adicional e ortogonal sobre a composição de uma amostra biológica[73].

A elucidação do metaboloma não é uma tarefa trivial, e como mencionado anteriormente devido a complexidade físico-química dos fluidos biológicos obter um resultado completo de uma única plataforma analítica não é factível. O que vem se tornando bastante praticável nos estudos dessa área, sem dúvida, é a utilização de mais de uma técnica de análise, para integrar a informação obtida

nos diferentes métodos, além de confirmar identificações, objetivando maior cobertura do metaboloma, e melhor entendimento da questão biológica em estudo[39].

1.2.3. Tratamento dos Dados

Dados de análises metabolômica são abundantes e bastante complexos, para isso é necessário o uso de ferramentas de tratamento adequadas, especialmente para evitar erros tendenciosos e manter a integridade genuína das diferenças biológicas[74]. O tratamento de dados de metabolômica pode ser dividido em: processamento de dados, cujo objetivo é transformar os dados brutos tridimensionais obtidos das análises por MS e NMR em uma matriz de dados bidimensional, e análise dos dados, que inclui análise estatística e interpretação dos resultados[75].

No geral, o processamento dos dados consiste nos seguintes passos: 1) transformar dados brutos (dados tridimensionais de relação *m/z,* tempo de retenção e intensidade ou área detectada) em picos (volumes), no qual o objetivo é detectar todos os sinais possíveis evitando falsos positivos (como duplicação de sinais ou ruído); 2) agrupamento, combinar todos os dados das diferentes amostras em uma única matriz de dados bidimensional (intensidade de cada *molecular feature*[b] encontrado nas amostras em estudo); 3) alinhamento, para correção de diferenças nos tempo de retenção; e 4) normalização, para remoção de erros sistemáticos das medidas, como escala inadequada ou falta de calibração do equipamento[74,75]. As etapas de processamento podem variar ligeiramente de acordo com o software utilizado. Existem uma série de softwares de livre acesso, como: XCMS[76] (executado em plataforma R ou *online*), MetaboAnalyst[77], Mzmine[78], MetAlign[79], etc. e licenciados, Mass Profiler Professional (Agilent Technologies), Profiling Solution (Shimazu Co.), todos com excelente desempenho no tratamento de dados metabolômicos. Parâmetros para melhorar a qualidade da matriz gerada podem ser variados, como relação sinal/ruído, largura de pico para detecção, faixa de tempo para correção de

[b] Intensidade de uma relação *m/z* em determinado tempo de retenção.

alinhamento, uso de métodos de normalização (mediana, quantile, etc.)[74], fornecendo ao investigador muitas possibilidades de extrair informação de suas análises.

Não é possível eleger o software ideal para processamento de dados em metabolômica. Alguns autores fizeram comparações dos softwares mais utilizados, como o trabalho de Niu *et al.* (2014), que não encontraram os mesmos resultados avaliando oito softwares para tratar dados obtidos da análise de extratos de tomate dopados com padrões de alcanos por GC-MS. Alguns softwares apresentaram cerca de 20% dos resultados como falso positivos, ou seja, uma identificação que não corresponde ao padrão analítico variado intencionalmente nas amostras. Já que não existe o software ideal, os autores chamam a atenção para a necessidade de otimização dos parâmetros de processamento e obtenção do melhor resultado, com menor número de falsos positivos[80].

Uma vez que se obteve a matriz de dados, esta deve ser submetida à análise estatística, para extrair informação relevante dos dados. A análise multivariada inclui: PCA (*Principal Component Analysis*), que é um método não supervisionado que projeta os dados em um espaço bidimensional reduzido, mantendo o máximo de variância possível dos dados originais, PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*), método supervisionado, que associa uma classe a cada observação permitindo melhor separação entre as classes, e OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*), que é uma modificação do modelo PLS-DA, na qual há remoção de variabilidade não relevante para a classificação das amostras, em outras palavras, há uma remoção de ruído. Aliada a análise multivariada, testes estatísticos univariados como teste t de Student, Mann-Whitnney U (ambos realizados para duas classes ou grupos de amostras), ou ANOVA (Análise de Variância) e teste Kruskal-Wallis (ambos para múltiplas classes ou grupos de amostras) são comumente empregados[74].

Muitas são as ferramentas para tratamento e análise de dados de metabolômica, as mais utilizadas estão detalhadamente discutidas em uma revisão interessante de Misra e van der Hooft (2016)[81]. O certo é que com os avanços desses estudos, essas ferramentas estão em constante evolução, sempre buscando melhora na confiabilidade e na qualidade dos resultados gerados. Uma

otimização dos parâmetros utilizados, bem como avaliação criteriosa dos dados, certamente levarão à resultados confiáveis.

1.3. Metabolômica e Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença bastante complexa e que vem sendo bastante estudada nos últimos anos, do ponto de vista metabolômico. Uma série de revisões são encontradas na literatura destacando trabalhos em metabolômica aplicados a *Leishmania*[12,82,83]. Creek *et al.* (2012) compilaram estudos em *Leishmania* e *Trypanosoma brucei*, destacando as técnicas analíticas empregadas na análise metabolômica[84]. Uma descrição do passo a passo do fluxo de trabalho, desde o desenho experimental até o tratamento de dados, para desenvolvimento de metabolômica, com ênfase no mecanismo de ação e resistência de fármacos em *Leishmania*, *T. brucei* e *Plasmodium falciparum*, com explicações das rotas e compostos de interesse, também foi recentemente publicada[85].

Observa-se um crescimento considerável de trabalhos envolvendo abordagens metabolômicas no estudo da leishmaniose. Entretanto, por ser uma ciência relativamente nova, o desenvolvimento de metodologias analíticas, apesar de extremamente importante, tem sido pouco explorado. O trabalho de t'Kindt *et al.* (2010), apresenta um protocolo de extração para análise metabolômica de *L. donovani* utilizando HILIC-MS em modo positivo e negativo[49]. Zhang *et al.* (2014), otimizam uma metodologia de análise por HILIC-MS, através do estudo da composição de fase móvel em três colunas diferentes, no qual demonstram que o tipo de análise afeta diretamente os resultados finais[86]. No contexto de tratamento de dados utilizando amostras de parasitas de *Leishmania*, aparentemente, maior atenção tem sido voltada ao tratamento de dados, como por exemplo: otimização de método de agrupamento de picos, para melhorar a matriz de dados gerados[87], aprimoramento de detecção de picos e métodos de alinhamento, especialmente quando se trabalha com múltiplas amostras e até mesmo replicata de experimentos[88], filtro para remoção de informações redundantes para facilitar a análise estatística e consequentemente

a busca por *m/z*'s nas bases de dados[89], e testes de metodologias de normalização para melhorar a análise estatística dos dados[90]. Possivelmente, o rápido desenvolvimento das ferramentas de tratamento de dados e a busca pela melhoria nos resultados obtidos, fazem com que esta etapa seja mais explorada que os métodos analíticos propriamente ditos, mas isso não os torna menos importantes.

O entendimento do mecanismo de ação e resistência de fármacos comumente utilizados no tratamento da leishmaniose é frequentemente observado em trabalhos com abordagem metabolômica. Multiplataformas de análise (GC-MS, LC-MS e CE-MS) foram utilizadas para estudar o mecanismo de ação e resistência de miltefosina em *L. donovani*[91] e Sb em *L. infantum*[92], sendo que este último já havia sido inicialmente explorado por CE-MS[93], onde foram encontradas alterações metabólicas no sistema redox da célula, além de mudanças na composição da membrana plasmática. Sendo a resistência da *Leishmania* a estes fármacos um problema emergente e devido ao pouco entendimento do metabolismo do parasita, t´Kind *et al.* (2010) e Berg *et al.* (2013) avaliaram do ponto de vista da metabolômica a resistência de *L. donovani* a Sb, encontrando alterações no transporte de metabólitos por modificação na composição da membrana plasmática e, consequentemente, sua fluidez[94,95]. Alteração no metabolismo de lipídios e indução de espécies reativas de oxigênio foram observados na avaliação de dois grupos de *L. infantum*, um resistente a Sb e outro resistente a MT frente a controles[96]. O uso de combinação de fármacos (como Sb, MT, anfoB e paramomicina)[97], além de multi-resistência (Sb e MT)[98], ambos em *L. donovani*, também foram estudados por abordagem metabolômica *untarget*. No geral, alterações do metabolismo redox e vias responsáveis pela sobrevivência do parasita, bem como mudanças na composição da membrana plasmática, tem sido pontos-chave da alteração metabólica responsável pela ação e/ou resistência dos fármacos comumente utilizados no tratamento da leishmaniose.

Apesar do grande apelo e aumento no número de estudos da ação e resistência de fármacos, o entendimento do metabolismo do parasita também tem sido explorado. A metabolômica vem auxiliando nesses estudos através da comparação de diferentes espécies de PRO (*L. major*, *L. donovani* e *L. mexicana*),

mostrando diferenças especialmente no metabolismo de aminoácidos, como no trabalho de Westrop *et al.* (2015). Os autores destacam a importância do estudo global da alteração do metabolismo dos parasitas, uma vez que dependendo da espécie o comportamento frente ao hospedeiro é diferenciado[99]. A comparação das fases de crescimento de PRO (logarítmica e estacionária) foi recentemente apresentada por Arjmand *et al.* (2016), através de análise *untarget* por ^{1}H NMR, destacando diferenças entre ácidos orgânicos de cadeia curta e alguns importantes aminoácidos, como leucina e ornitina[100]. O perfil metabólito em diferentes fases de crescimento também foi investigado por Silva *et al.* (2011) através da análise *untarget* de parasitas coletados de 3 a 6 dias em cultura, apresentando grandes diferenças em glicerolipídeos e esfingolipídeos[101].

O metabolismo de *L. major* em macrófagos[c], seja por abordagem *untarget* por NMR[102] ou *target* por GC-MS[103], também tem sido explorado. A função da arginina, importante metabólito de sobrevivência do parasita, foi avaliada por CE-MS em *L. amazonensis,* através da comparação de células submetidas ou não à privação deste aminoácido (células selvagens e mutantes), demonstrando que o parasita adapta-se facilmente à ausência de arginina, produzindo ou consumindo outros metabólitos em diferentes vias para sua sobrevivência[104].

Trabalhos de comparação entre PRO e AMA também são encontrados. Gupta *et al.* (1999) detectaram dois novos metabólitos em *L. donovani*: a betaina, aumentada em promastigotas e o beta-hidroxibutirato, detectado apenas em AMA axênicos[d] e PRO[105]. Produtos do metabolismo de glicose de AMA e PRO, com uso deste metabólito marcado com ^{13}C foi investigado em *L. pifanoi*[106]. O estudo do metabolismo do carbono, através da incorporação de diversos nutrientes no meio de cultura contendo ^{13}C, em PRO e AMA nas fases logarítmica e estacionária, também foi investigado e os resultados apresentaram importantes alterações na via do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)[107]. O TCA já havia sido estudado pelo mesmo grupo de pesquisa anteriormente, através da análise *target* de *L. mexicana* por ^{13}C NMR e GC-MS, avaliando o efeito da incorporação de glicose, aspartato e alanina no metabolismo do parasita[108].Além de estudos utilizando parasitas de *Leishmania*, trabalhos que focam na busca por

[c] macrófagos: células de defesa
[d] célula axênica: não contaminada ou livre de qualquer organismo vivo.

diagnóstico de VL em amostras de pelo de cães, por abordagem *target*[109], e avaliação da progressão da doença, através de análise de parasitas removidos de biópsia de pacientes com CL, por metabolômica com uso de multiplataforma, e complementação com resultados de proteômica[110], também são encontrados.

Todos os trabalhos em metabolômica envolvendo parasitas de *Leishmania* encontrados na literatura até o momento foram destacados acima. A Tabela 1.2 apresenta uma compilação desses com ênfase em alguns pontos principais como: matriz e grupos estudados, solvente extrator, técnica de análise e classes de metabólitos encontrados.

Tabela 1.2. Compilação de trabalhos com abordagem metabolômica em *Leishmania* encontrados na literatura nos últimos 16 anos.

Objetivo do estudo	Espécie e Matriz de estudo	Grupos estudados	Solvente Extrator*	Técnica e Abordagem	Classes de metabólitos ou Rotas destacadas	Ref
Desenvolvimento de método	*L. donovani* ¢ PRO	¢ selvagens	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	HILIC-MS *Untarget*	Fosfolipídeos, álcoois, nucleotídeos, aminoácidos, etc.	49
Desenvolvimento de método	*L. major* ¢ PRO	¢ selvagens	$CHCl_3$:MeOH (1:3)	HILIC-MS *Untarget* e *target*	Aminoácidos e derivados, carboidratos, ácidos graxos, álcoois, etc.	86
Tratamento de dados	*L. mexicana* ¢ PRO	¢ selvagens e mutantes	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	GC-MS *Untarget*	Não especificado	87
Tratamento de dados	*L. mexicana* ¢ PRO	¢ selvagens e mutantes	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	GC-MS *Untarget*	Não especificado	88
Tratamento de dados	*L. donovani* ¢ de pacientes	3 cepas de pacientes com VL	Não citada	HILIC-MS *Untarget*	Não especificado	89
Tratamento de dados	*L. donovani* ¢ PRO	¢ sensíveis e resistentes a Sb	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	HILIC-MS *Untarget*	Aminoácidos e derivados, álcoois, carboidratos, acilgliceróis, cetonas, etc.	90

Mecanismo de ação e resistência de fármacos	*L. donovani* ♂ PRO	♂ sensíveis, tratadas e resistentes a miltefosina	MeOH:H_2O (1:1), LC e CE $CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1), GC	GC-MS, RPLC-MS e CE-MS *Untarget*	Aminas, ácidos graxos, cetonas, aminoácidos, ácidos orgânicos, esteróis, fosfolipídios, alcalóides, diterpenóides, etc.	91
Mecanismo de ação e resistência de fármacos	*L. infantum* ♂ PRO	♂ sensíveis, tratadas e resistentes a SbIII	MeOH:H_2O (4:1), LC e CE $CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1), GC	GC-MS, RPLC-MS e CE-MS *Untarget* e *target* (C13)	Aminoácidos e derivados, carboidratos, pirimidinas, esfingolípideos, aminas, ácidos graxos, etc.	92
Mecanismo de ação e resistência de fármacos	*L. infantum* ♂ PRO	♂ sensíveis, tratadas e resistentes a SbIII	MeOH:EtOH (1:1)	CE-MS *Untarget*	Aminoácidos e derivados.	93
Resistência de fármacos	*L. donovani* ♂ isoladas de pacientes	♂ sensíveis e resistentes a Sb, pacientes com VL	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	HILIC-MS *Untarget*	Aminoácidos e derivados, esfingolipídios, aminas, vitaminas, carboidratos, ácidos orgânicos, etc.	94
Resistência de fármacos e metabolismo do parasita	*L. donovani* ♂ PRO	♂ sensíveis, resistentes a SbV e resistentes a SbV e SbIII	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	HILIC-MS *Untarget*	Nucleotídeos, carboidratos, aminoácidos e derivados, glicerofosfolipídios, etc.	95

Mecanismo de ação e resistência de fármacos	*L. infantum* ♂ PRO	♂ sensíveis, tratadas e resistentes a miltefosina, resistente SbIII	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	HILIC-MS *Untarget*	Carboidratos, nucleotídeos, hidrocarbonetos, fosfolipídios, etc.	96
Resistência de fármacos	*L. donovani* ♂ PRO	♂ sensíveis, resistentes SbIII, resistentes anfoB, resistente paromomicina e resistente a combinação dessas drogas	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	HILIC-MS *Untarget*	Aminoácidos, carboidratos, álcoois, glicerolipídeos, nucleotídeos, etc.	97
Resistência de fármacos	*L. donovani* ♂ PRO	♂ sensíveis e resistentes a Sb e induzidas a resistência a miltefosina	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	HILIC-MS *Untarget*	Fosfocolinas, vitaminas, aminoácidos e derivados, purinas/pirimidinas, etc.	98
Comparação de diferentes espécies de parasita	*L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana* ♂ PRO	♂ selvagens de cada espécie	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	HILIC-MS *Untarget*	Metabolismo de aminoácidos e derivados	99
Estudo do metabolismo	*L. major* ♂ PRO	♂ em fase log e estacionária	$HClO_4$ (1.8 M) e ajuste de pH (6.8) com KOH	^{1}H NMR Untarget	Aminoácidos e derivados, ácidos orgânicos, etc.	100
Estudo do metabolismo	*L. donovani* ♂ PRO	♂ selvagens coletadas de 3-6 dias de crescimento	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	HILIC-MS *Untarget*	Glicerolipídios, ácidos graxos, esfingolipídios, esteróis, vitaminas, etc.	101

Estudo do metabolismo	*L. major* ¢ PRO	Macrófagos ativados, macrófagos ativados classicamente e não ativados (dois estágios: não infectados e expostos ao parasita)	MeOH:H_2O (4:1)	^{1}H NMR *Untarget*	Carboidratos, aminoácidos e derivados, ácidos orgânicos, fosfolipídios, etc.	102
Estudo do metabolismo	*L. major* ¢ PRO	¢ selvagens e mutantes	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:0.8)	GC-MS *Target* (C13)	Ácidos orgânicos, carboidratos, etc.	103
Estudo do metabolismo	*L. amazonensis* ¢ PRO	¢ selvagens e mutantes (privação de arginina)	MeOH:H_2O (1:1)	CE-MS *Untarget* e *target* (C13)	Biossíntese de poliaminas	104
Estudo do metabolismo	*L. donovani* ¢ PRO e AMA	¢ PRO, AMA axênicas e AMA intracelulares	$HClO_4$ (1.8M) e ajuste de pH (6.8) com KOH (5.4M)	^{1}H NMR *Untarget*	Aminoácidos, fosfocolinas, carboidratos, etc.	105
Estudo do metabolismo	*L. pifanoi* ¢ PRO	¢ PRO e AMA, incubadas com ^{13}C-glicose	$HClO_4$ (60%) e neutralização com KOH (2N)	^{13}C NMR *Target* (C13)	Produtos do metabolismo da glicose	106
Estudo do metabolismo	*L. mexicana* ¢ PRO e AMA	¢ PRO e AMA, ambas nas fases log e estacionária	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	GC-MS e ^{13}C NMR *Untarget* e *target*	Aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, carboidratos, etc.	107

Estudo do metabolismo	*L. mexicana* ¢ PRO	¢ selvagens cultivadas com e sem compostos marcados com C13	$CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1)	^{13}C NMR e GC-MS *Target* (C13)	Aminoácidos e derivados, ácidos orgânicos, etc.	108
Diagnóstico de VL	*L. infantum* Pelo de cachorro	Cães não infectados, infectados sem sinais clínicos e infectados com sinais clínicos	Microextração em fase sólida usando filbra de polidimetilsiloxano divinilbenzeno.	GC-MS *Target*	Hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, etc.	109
Progressão da doença	*L. braziliensis* ¢ PRO de biópsia de pacientes	¢ isoladas de pacientes com CL e MCL	MeOH:H_2O (4:1), LC e CE $CHCl_3$:MeOH:H_2O (1:3:1), GC	GC-MS RPLC-MS e CE-MS *Untarget*	Carboidratos, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos, glicerolipídios, etc.	110

¢- célula(s), *proporções dos solventes em volume

Capítulo 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este projeto de doutorado tem como objetivo investigar o potencial *in vitro* de uma substância química isolada de produto natural, metildihidrodieugenol B, que apresenta atividade anti-*Leishmania*, por meio de abordagem metabolômica *untarget* através de multiplataformas analíticas (GC-MS e RPLC-MS), na análise de metabólitos intracelulares em promastigostas de *L. infantum*.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de protocolo de obtenção e preparo das células.
- Desenvolvimento de método de extração de metabólitos intracelulares em células de *L. infantum* para duas plataformas de análise (GC-MS e RPLC-MS).
- Otimização do método de derivatização para análise por GC-MS.
- Tratamento dos dados da análise metabolômica da ação do metildihidrodieugenol B em *L. infantum*, através de otimização das etapas de processamento e classificação dos dados para busca de discriminantes e correlação com rotas metabólicas.

Capítulo 3

Parte Experimental

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e Reagentes

Acetonitrila (grau MS, Sigma-Aldrich, Alemanha), ácido fórmico (grau LC-MS, Fluka/Sigma-Aldrich, Alemanha), heptano (Sigma-Aldrich, Alemanha), C13 metil éster (Sigma-Aldrich, Alemanha), isopropanol (Sigma-Aldrich, Alemanha), N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida – BSTFA com 1% trimetilclorosilano - TMCS (Sigma-Aldrich, Brasil), cloridrato de O-metoxiamina (Sigma-Aldrich, Suíça), piridina (grau sililação, Sigma-Aldrich, USA), metanol (grau LC-MS, JT Baker, México), clorofórmio (Tedia, USA), meio de cultivo M199 (Sigma,USA), glutamina (Sigma-Aldrich, Alemanha), bicarbonato de sódio (Merck, Alemanha), estreptomicina (Sigma-Aldrich, Alemanha), penicilina (Sigma-Aldrich, Alemanha), soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), hemina (Himedia, Brasil), hidróxido de sódio (Synth, Brasil), DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha), NaCl (Synth, Brasil), KCl (Synth, Brasil), $Na_2HPO_4.2H_2O$ (Synth, Brasil), KH_2PO_4 (QM, Brasil). Todas as soluções aquosas, bem como fase móvel foram preparadas utilizando água ultrapura (sistema MilliQ, Millipore, Brasil).

Padrões analíticos de: alanina, ácido aspártico, glicose, ácido glutâmico, glicina, ácido glicólico, isoleucina, leucina, lisina, ácido málico, ácido mirístico, ácido oxálico, ácido palmítico, fenilalanina, prolina, putrescina, ribitol, serina, treonina, tirosina, ácido esteárico, ácido succínico, trans-hidroxiprolina e valina, obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha), foram preparados na concentração de 20 mg x mL^{-1} para análise por GC-MS.

Vortex (Quimis, Brasil), banho de ultrassom (Quimis, Brasil), tissuelyzer LT (Qiagen, Alemanha), ultrassom com sonda (OMNI Ultrasonic Ruptor 400, USA), banho termostatizado (LAUDA ECO RE 1225, Alemanha), pHmetro (Digimed - DM-22, Brasil), microscópio invertido (Axio Vert. A1, Zeiss, Alemanha), SpeedVac (Thermo Cientific SPD1010, USA), microcentrífuga (Excelsa 3 – Fanen Ltda), capela de fluxo laminar (PEQ-SP1-034 - Trox), câmara de Neubauer (Optik Labor), microscópio óptico para vizualização das células (Elipse TS100 - Nikon), shaker (New Brunswick Scientific, U.S.A.) mantido à 26 ºC foram utilizados neste trabalho.

Todos os materiais de laboratório utilizados para preparo das células e demais ensaios biológicos, como: ponteiras, pipetas Pasteur, garrafas de cultivo, canaletas, placas de ensaio, *eppendorfs*, etc. foram esterilizados antes do uso e abertos somente dentro da capela de fluxo laminar.

3.2. Crescimento e Manutenção da Cepa de *L. infantum*

Promastigotas *de L. infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cedidas pelo Dr. André Gustavo Tempone (Laboratório de Toxinologia Aplicada, Instituto Adolfo Lutz) e cultivadas no Laboratório de Bioquímica de Parasitas no IQ-USP sob supervisão da Profa. Dra. Maria Júlia M. Alves.

Os parasitas foram crescidos à 26 ºC em meio de cultura M199 (enriquecido com 2.2 g de bicarbonato de sódio, 0.3 g de glutamina, 50 mg de penicilina e 0.13 g de estreptomicina), contendo 10% de soro fetal bovino com 0.25% de hemina (preparada em hidróxido de sódio 2.5 mg x mL^{-1}) e 5% de urina masculina[111]. A manutenção e renovação das células foram realizadas duas vezes por semana (segunda e sexta-feira), na qual 5% da cultura crescida foram colocadas em novo meio de cultivo.

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado através da contagem das células em câmara de Neubauer a cada 24 h por 10 dias, no qual inicialmente foram inoculados 1.10^6 promastigotas/mL. A Equação 3.1 foi utilizada para calcular o número de células/mL para construção da curva de crescimento, na qual o número de células corresponde à contagem de dois quadrantes da câmara de Neubauer.

$$promastigotas/mL = \frac{n^{o}\ células}{2} * diluição * 10000 \qquad \textbf{Equação 3.1}$$

3.3. Preparo das Células para Análise Metabolômica

Para obtenção das amostras para análise metabolômica, um repique celular de manutenção é realizado e após, no máximo, 72 h a célula é utilizada para iniciar o tratamento.

Passado o tempo de incubação, a coleta das amostras iniciou-se com a interrupção da atividade celular por paralisação da atividade enzimática (método de *quenching*), no qual a cultura foi colocada em gelo seco e mantida a frio durante todo o procedimento de coleta. As células foram centrifugadas para remoção do meio de cultura e o pellet lavado 2 vezes com solução salina de PBS frio (solução tampão fosfato que é composto por 137 $mmol.L^{-1}$ NaCl, 27 $mmol.L^{-1}$ KCl, 100 $mmol.L^{-1}$ Na_2HPO_4 e 18 $mmol.L^{-1}$ KH_2PO_4, pH 7.4). As amostras foram divididas em alíquotas contendo $1x10^8$ promastigotas/mL por *eppendorf*. Novamente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante aspirado com auxílio de bomba a vácuo. Os *eppendorfs* contendo os pellets foram pesados (para determinação da biomassa) e guardados à -80 ºC até uso.

3.4. Extração dos Metabólitos Intracelulares

A extração dos metabólitos intracelulares em promastigotas de *L. infantum* consistiu na adição de 350 μL de MeOH:H_2O (1:1) a frio nos pellets para análise por GC-MS e 350 μL de MeOH 100% a frio para análise por RPLC-MS. A lise celular foi realizada com auxílio de um ultrassom com sonda, operado à 30% por 1 minuto. As amostras foram posteriormente centrifugadas (10000 g por 10 min) e o sobrenadante removido. Para análise por GC-MS este sobrenadante foi seco em SpeedVac, sem uso de temperatura, para ser posteriormente derivatizado. Para análise por RPLC-MS o sobrenadante foi analisado diretamente.

3.5. Derivatização para Análise por GC-MS

Para etapa de oximação, ao extrato seco foram adicionados 10 μL de O-metoxiamina em piridina (15 mg x mL^{-1}), o vial foi vigorosamente agitado com auxílio de banho de ultrassom e vortex e a reação ocorreu no escuro, à temperatura ambiente por 90 min. A etapa de sililação ocorreu com adição de 10 μL de BSTFA + 1% TMCS, com mistura vigorosa dos reagentes em banho de ultrassom e vortex e a reação ocorreu por 30 min à 40 ºC em banho termostatizado. Após derivatização foram adicionados 100 μL de heptano contendo 10 mg x mL^{-1} de C13 metil éster (padrão interno) para serem analisados por GC-MS.

3.6. Candidato a Fármaco e Tratamento das Células para Avaliação Metabolômica

Um dímero de fenilpropanoide (Figura 3.1), (1-(8-propenil)-3-[3′-metoxi-1′-(8-propenil)fenoxi]-4,5-dimetoxibenzeno, também conhecido como metildihidrodieugenol B, FM = $C_{21}H_{24}O_4$ e MM = 340.41 $g.mol^{-1}$) isolado da planta *Nectandra leucantha*, e que apresenta atividade anti-*Leishmania*, foi utilizado na avaliação metabolômica de um candidato a fármaco para o tratamento da doença.

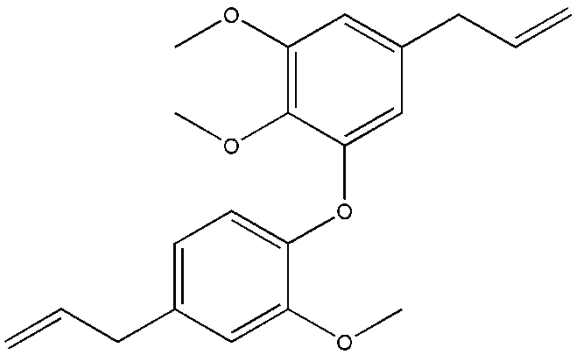


Figura 3.1. Estrutura química do metildihidrodieugenol B, candidato a fármaco para avaliação no tratamento da leishmaniose.

O metildihidrodieugenol B foi extraído e isolado de galhos da planta *Nectandra leucantha*, colhida em 2012 em Cubatão, São Paulo. O procedimento consistiu em extração exaustiva de 320 g do material seco com n-hexano. O extrato cru foi filtrado e concentrado sob vácuo e então percolado em uma coluna de SiO_2 (400 g, 60 x 5.5 cm, Merck, Alemanha), eluições com acetato de etila em n-hexano e metanol em acetato de etila resultaram em 12 frações. A atividade antiparasitária destas frações foram testadas, e a que apresentou maior atividade foi purificada por cromatografia preparativa usando uma coluna de SiO_2 (60 PF254, Merck, Alemanha) e n-hexano:acetato de etila (7:3, v/v) como eluente. A confirmação estrutural do metildihidrodieugenol B foi realizada por NMR e MS[112].

O tratamento das células, para obtenção das amostras do grupo tratado foi realizado como segue: após um máximo de 72 h de repique celular, 4.10^7 promastigotas de *L. infantum* foram inoculados em 140 mL de meio celular (descrito no item 3.2) e deixados crescer sob baixa rotação à 26 ºC até atingir uma densidade de 8.10^7 promastigotas/mL (cerca de 3 a 4 dias). O meio de cultura foi renovado e efetuou-se o tratamento da célula com a substância de interesse, para tal, utilizou-se o composto metildihidrodieugenol B na concentração de sua concentração média (50%) máxima inibitória[e] (IC_{50} = 58.18 μg x mL^{-1}). A substância foi dissolvida em DMSO (solução estoque = 12.4 mg x mL^{-1}) e, portanto, no inóculo das células controle, o mesmo volume de DMSO foi adicionado à cultura, para que os dois grupos estivessem sob as mesmas condições. Passadas 48 h de tratamento, o experimento foi interrompido por *quenching* metabólico em gelo seco e os procedimentos de preparo das células desde o pellet congelado até a extração e derivatização (descritos nos itens anteriores) foram executados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

[e] Medida de eficácia de um fármaco. O valor corresponde à metade (50%) do valor máximo da concentração inibitória do fármaco.

3.7. Instrumentação e Condições de Análise

3.7.1. GC-MS

Análises por GC-MS foram realizadas no laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP sob supervisão do Prof. Dr. Ernani Pinto Junior, onde utilizou-se um cromatógrafo gasoso (modelo 5975C, Agilent Technologies) acoplado à um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (modelo 7890A, Agilent Technologies). A separação dos metabólitos foi realizada em coluna HP5-MS (30 m de comprimento, 0.25 mm diâmetro interno, filme de 0.25 μm de 95% dimetil/ 5% difenilpolisoloxano, Agilent Technologies). Gás Hélio de alta pureza foi utilizado como fase móvel na vazão de 1 mL/min. O injetor do cromatógrafo gasoso foi mantido à 250 ºC, sendo realizado um split 1:10 a 10 mL/min de He, para injeção das amostras. A separação dos analitos foi alcançada através do gradiente: temperatura inicial do forno 60 ºC (mantida por 1 min), aumento até 300 ºC a uma taxa de 10 ºC/min. O tempo total de análise foi de 25 min. As temperaturas da linha de transferência do detector, do filamento da fonte e do quadrupolo foram mantidas à 290, 230 e 150 ºC, respectivamente. A fonte por impacto de elétrons utilizou uma energia de - 70eV e o espectrômetro de massas foi operado em modo scan na faixa de 50 – 600 *m/z*. O software utilizado para operação e aquisição dos dados foi o Agilent ChemStation E.02.02.1431 e Qualitative Analysis Mass Hunter B.05.00 (Agilent Technologies). As condições de análise foram as mesmas utilizadas em trabalhos anteriores[92], para uso da biblioteca Fiehn[113] e NIST para identificação dos metabólitos.

3.7.2. RPLC-MS

As análises por RPLC-MS foram realizadas no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan sob supervisão do Dr. Daniel C. Pimenta, onde utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC-20AD proeminence, Shimadzu Co., Japão) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo *ion trap*

time-of-flight via ioniozação por ESI (ESI-IT-TOF, Shimadzu Co., Japão). O método de separação foi realizado em coluna C18 (2.1 mm x 5 cm, 0.5 μm, Discovery, Supelco) mantida à 40 ºC. A fase móvel foi composta por: A – água ultrapura + 0.1% ácido fórmico e B – acetonitrila + 0.1% ácido fórmico. O gradiente de eluição aplicado foi: 25 – 100 %B por 20 min, 100 %B até 22 min, 100 – 25 %B até 24 min e condicionamento da coluna 25 %B por 5 min, com vazão de 0.2 mL/min. O MS foi operado em modo positivo. A voltagem da interface ESI foi 3.5 kV e a voltagem do detector, 1.66 kV, com temperatura de 200 °C. Os espectros foram obtidos na faixa de 80 a 1000 *m/z*. O software utilizado para operação do equipamento e aquisição dos dados foi o LCMS solution (Shimadzu Co., Japão). As condições de análise no LC foram realizadas de acordo com adaptações da metodologia previamente empregada[91], as voltagens e temperaturas do MS foram utilizadas de acordo com a calibração e ajustes dos parâmetros instrumentais, realizados periodicamente no equipamento.

3.8. Tratamento dos Dados

Dados gerados no GC-MS foram convertidos para *.mzData utilizando o software Mass Hunter Qualitative Analysis B.05.00 (Agilent Technologies) e dados gerados no LC-MS foram convertidos para extensões *.mzXML no software LabSolution (Shimadzu Co., Japão).

As conversões citadas acima foram necessárias para leitura e processamento dos dados pelo software de livre acesso XCMS (versão 1.24.1)[76], executado no programa R versão 3.2.3 (R Development Core Team)[114]. Os sinais obtidos no MS (fragmentos, isótopos e/ou adutos) foram identificados e separados como *molecular features*. As amostras foram alinhadas, agrupadas e o tempo de retenção dos *molecular features* identificados corrigidos.

Os dados de GC-MS foram processados com o método "*matched filter*", no qual foram utilizados os seguintes parâmetros no XCMS: largura de pico - fwhm = 4, relação sinal/ruído - snthresh = 1.5, número máximo de picos por cromatograma de íon extraído - max = 30, agrupamento com correção de largura

de banda - bw = 2, largura das faixas sobrepostas de *m/z*'s - mzwid = 0.25 e fração mínima de amostras necessárias em ao menos um grupo para ser considerada válida - minfrac = 0.5.

No processamento dos dados de LC-MS utilizou-se o método "*centWave*" e os seguintes parâmetros foram utilizados: snthresh = 2.0, largura do pico cromatográfico (min, máx) - peakwidth de 3 a 30 segundos, erro de massa = 5 ppm, mzwid = 0.025, bw = 2 e minfrac = 0.25. Na correção de tempo de retenção (retcor), o método utilizado foi o default do "*obiwarp*" e a faixa de tempo de análise foi restrita de 2.5 a 20.0 minutos, não sendo considerados portanto, analitos no volume morto e na lavagem e pré-condicionamento da coluna.

Em todos os dados, sejam de GC-MS ou LC-MS, após alinhamento e correção dos tempos, aplicou-se a ferramenta "*fillPeaks*", na qual o algoritmo seleciona as *m/z*'s não identificadas nos grupos, lê o dado novamente e integra as regiões com picos perdidos, com o objetivo de eliminar os *missing values*. Os dados foram normalizados pela mediana[124] e pela biomassa (massa do pellet), em ambos os processamentos. Os de GC-MS foram, ainda, normalizados pela intensidade do fragmento mais intenso (*m/z* 74) do padrão interno (C13 metil éster - t_R aproximadamente 13.84 min).

Os dados normalizados foram então submetidos à análise multivariada não-supervisionada PCA e supervisionada PLS-DA com predição de QCs, e OPLS-DA, utilizando escalonamento Pareto, indicado para metabolômica, pois proporciona uma redução de importância de picos (variáveis) mais intensos e, concomitantemente, aumenta os picos menos intensos, que podem ter maior relevância biológica[116]. *Molecular features* discriminantes foram selecionados nos modelos de PLS-DA através de plots de *Variable Importance Projection* (VIP), sendo selecionados aqueles com VIP *score* > 1, essas análises foram realizadas no software SIMCA-P+ 12.0.1 (Umetrics). Ainda na busca por significância estatística, os discriminantes foram também encontrados e confirmados pelo teste não-paramétrico Mann-Withney U, realizado no software Statistica 12 (StatSoft Inc.).

Os metabólitos foram identificados por GC-MS após deconvolução dos espectros, realizada no software *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System* (AMDIS, versão 2.71) utilizando a biblioteca de dados Fiehn

RT Library (FienLib)[113], através de análise por correção de tempo de retenção (mínimo *match factor* = 60, modo reverso, *RT window* = 0.05 min, *component width* = 15) e pela NIST MS Search 2.0 (Agilent Technologies). A correlação entre identificação e correspondente *molecular feature* estatisticamente significativo se deu pelo sinal do fragmento de maior intensidade no espectro.

A identificação dos *molecular features* estatisticamente significativos por RPLC-MS foi realizada através da busca dos *m/z*'s em base de dados públicas, como o *Human Metabolome Database* - HMDB (http://www.hmdb.ca/), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - KEGG (http://www.genome.jp/kegg/) e Metlin - *Scripps Center for Metabolomics* (https://metlin.scripps.edu), utilizando $[M+H]^+$, $[2M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ como possíveis adutos, e erro de massa máximo de 5 ppm.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Protocolo de Preparo das Células para Análise Metabolômica

Um dos passos críticos da abordagem metabolômica é a seleção e preparo das amostras, uma vez que reflete diretamente nos resultados e interpretações finais[39]. É conhecido que a biologia celular e, portanto, o metabolismo das células, varia de acordo com seu crescimento, uma vez que apresentam diferentes fases, que refletem a adaptação do organismo à cultura[117].

Como não existe um protocolo específico para obtenção de parasitas para avaliação metabolômica, o preparo das amostras de células foi otimizado de acordo com: a) tempo dos parasitas em cultura, após repique de manutenção (duplicata de 4.10^7 promastigotas/mL após 48, 72 e 96 h), b) número de lavagens das células com PBS, para remoção completa de compostos extracelulares excretados pelos parasitas ou presentes no meio de cultura (triplicata dos sobrenadantes de 1 a 6 lavagens), e c) número de células por amostra (triplicata de 1, 2, 4, 6, 8 e 10.10^7 promastigotas/mL).

A otimização do protocolo de preparo de amostra para metabolômica iniciou-se com a avaliação do tempo para tratamento ou coleta após repique celular. Para mantê-los vivos em cultura, os parasitas de *L. infantum* são repicados duas vezes por semana, esse repique consiste em transferir 5% em volume das células em cultivo para uma nova garrafa e completar com novas fontes de nutrientes (meio de cultura, soro fetal bovino e urina), garantindo a integridade celular e mantendo as células ativas e em renovação *in vitro*. O uso de urina masculina para crescimento desses parasitas, apesar de não apresentar uma explicação científica clara, tem se mostrado bastante eficiente no crescimento celular[111].

Geralmente, entre 48 e 72 h após repique de manutenção, as células são utilizadas para ensaios biológicos, pois se multiplicaram em quantidade suficiente para atingir sua fase log, de máxima atividade. A Figura 4.1 apresenta a curva de crescimento das células estudadas. Esta curva foi obtida por contagem

de células em câmara de Neubauer a cada 24 h, durante 10 dias, a partir de um inóculo de 1.10^6 células/mL.

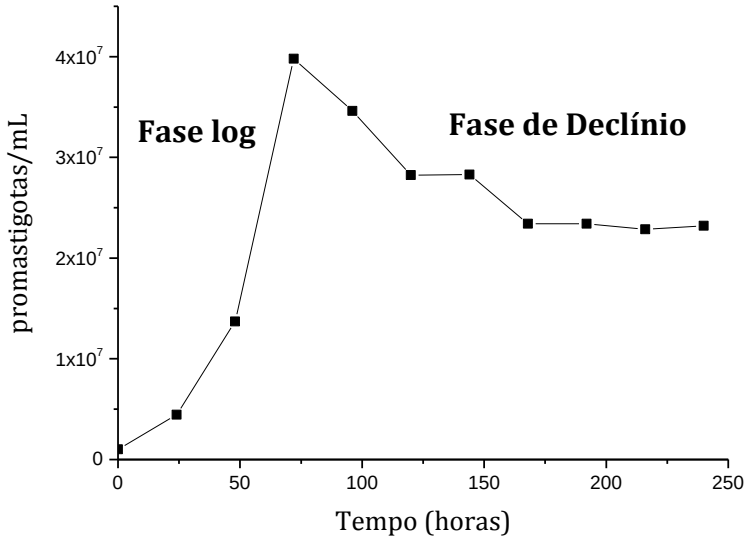


Figura 4.1. Curva de crescimento celular de *L. infantum*.

A construção da curva de crescimento foi necessária para conhecer o organismo estudado, no qual observa-se na Figura 4.1 um aumento exponencial na quantidade de células em cultivo nas primeiras 72 h (fase log) e depois um decaimento e estabilização desta quantidade (fase de declínio), verificando a morte celular. Para se ter segurança de que a fase log é a indicada para os experimentos de metabolômica, fez-se a avaliação dos perfis das células por GC-MS após 48, 72 e 96 h de repique. O limite de 96 h foi estabelecido uma vez que se observa grande decaimento na quantidade de células em cultivo (Figura 4.1), além disso, são observadas mudanças na morfologia do parasita, como o tamanho e formato da célula, que entre 48 e 72 h apresentam formato alongado de 10-15 μm de comprimento e flagelo. Já a partir de 96 h apresentam formato mais arredondado e observa-se perda do flagelo. Os resultados obtidos por GC-MS de duplicata de cada tempo foram avaliados de acordo com os metabólitos identificados no software AMDIS utilizando a biblioteca Fiehn[113] e critério de análise simples com 90% de probabilidade de acerto na comparação espectral,

além da comparação da intensidade de alguns metabólitos selecionados importantes. A quantidade de metabólitos identificados da comparação dos três tempos está representada por um Diagrama de Venn na Figura 4.2a e a comparação da intensidade de sete metabólitos mais intensos está representada na Figura 4.2b.

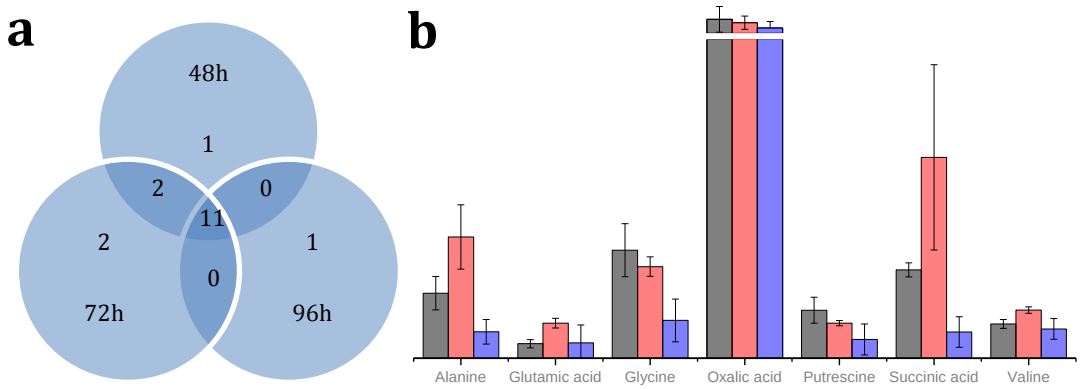


Figura 4.2. Avaliação do tempo em cultura de parasitas de *L. infantum* após repique celular. **a)** Diagrama de Venn para comparação de número de metabólitos identificados e **b)** Média de intensidade e desvio-padrão de metabólitos selecionados (preto - 48 h, vermelho - 72 h e azul - 96 h).

A avaliação dos resultados pela quantidade de metabólitos identificados (Figura 4.2a) indica que o metaboloma do parasita em termos de substâncias presentes não altera drasticamente durante os três tempos avaliados: 14 compostos foram detectados em 48 h, 15 em 72 h e 12 em 96 h. Cabe ressaltar que, nestas análises, estamos restritos a derivatização, que seleciona o tipo de metabólito a ser detectado e, ainda, a biblioteca de espectros e por isso, foram encontrados pouco metabólitos, pois trata-se de identificação. Quando se compara o número de *molecular features*, uma média de 1673, 1757 e 1532 para 48, 72 e 96 h, respectivamente, são observados, indicando a presença de pelo menos, centenas de metabólitos em cada tempo. Em termos quantitativos, a intensidade de sete metabólitos comuns (Figura 4.2b) está diminuída em 96 h, fato já esperado justamente por se conhecer a curva de crescimento celular da *L. infantum* (Figura 4.1), na qual passadas as 72 h de repique a célula entra em sua

fase de declínio, e as células começam a morrer. Nos demais metabólitos verifica-se que ora estão aumentados em 48 h, ora em 72 h. Essas observações confirmam a necessidade de se trabalhar com as células nos estudos de metabolômica entre estes tempos de crescimento. Idealmente para se obter grande quantidade de parasitas e baseado nos resultados acima apresentados, 72 h após o repique foi definido como tempo para início do tratamento.

Outra etapa importante a ser considerada no preparo de amostras para metabolômica é chamada *quenching*, que é a interrupção rápida das atividades enzimáticas e, portanto, do metabolismo celular[33,44]. Este procedimento é de extrema importância, uma vez que se deseja encontrar a resposta ao estímulo dado (no caso, tratamento), no momento definido e por isso qualquer ação futura de enzimas deve ser evitada.

Apesar de o *quenching* poder ser realizado colocando-se solventes ou ácidos a frio diretamente no pellet, estes procedimentos não são os mais indicados e, portanto, não foram adotados neste trabalho, uma vez que podem causar ruptura da parede celular, extraindo alguns metabólitos intracelulares[44]. Shin *et al.* (2010) verificaram perda significativa de metabólitos com o uso de metanol a frio em bactérias durante o *quenching*[118]. Soluções contendo glicerol também foram utilizadas na etapa de *quenching* por Duportet *et al.* (2012) e Villas-Bôas *et al.* (2007)[45,55] , entretanto, o glicerol pode atrapalhar nas análises por GC-MS por ser um metabólito presente em *Leishmania* e facilmente detectável pela técnica de análise, sendo, portanto, descartado seu uso neste trabalho. Para análise metabolômica de promastigotas de *L infantum*, optou-se por um *quenching* colocando os frascos contendo as células diretamente em gelo seco durante todo o manuseio das amostras (lavagem, diluição, contagem, separação do pellet), até serem levadas para armazenamento a -80 ºC.

Após o *quenching*, o meio de cultura deve ser removido por centrifugação e as células lavadas com solução salina de PBS. A remoção completa de metabólitos extracelulares provenientes do meio de cultura e mesmo os que são excretados pelos parasitas é muito importante[49], uma vez que neste estudo o intuito é a identificação das alterações intracelulares. Sendo assim, estudou-se o número de lavagens necessárias no preparo das células através da análise dos sobrenadantes de cada lavagem por GC-MS, e estas foram comparadas ao meio

de cultura removido, bem como a solução de lavagem (PBS). A única diferença no procedimento de preparo dessas amostras foi no meio de cultura, no qual removeu-se as proteínas por precipitação com isopropanol a frio (meio:isopropanol, 1:3, v/v), para evitar problemas na coluna cromatográfica, como por exemplo obstrução por entupimento, além de facilitar a derivatização dos analitos presentes na amostra. A Figura 4.3 apresenta os cromatogramas obtidos por GC-MS.

É possível observar a detecção de diversos compostos no cromatograma do meio de cultura (Figura 4.3a), como glicose e outros açúcares, além de vários aminoácidos, já o cromatograma do PBS (Figura 4.3b) apresenta alguns picos no início e no final da análise, provenientes de produtos da reação de derivatização, como derivados de piridina e ainda, alguns ftalatos, oriundos dos materiais plásticos utilizados. Os cromatogramas das lavagens de 1 a 6 vezes, Figuras 4.3c-h, mostram que a primeira lavagem (Figura 4.3c) não foi suficiente para remoção completa das substâncias extracelulares, seja do meio de cultura ou excretado pela célula durante seu crescimento. A partir da segunda lavagem (Figura 4.3d), o perfil cromatográfico apresenta-se constante e muito semelhante ao do PBS (Figura 4.3b), e nenhum possível metabólito de interesse foi identificado pela biblioteca de espectros, indicando remoção eficiente de substâncias extracelulares.

Através dos estudos dos sobrenadantes das lavagens ficou estabelecido para o protocolo de preparo das células que duas lavagens com PBS a frio são suficientes para remoção dos constituintes extracelulares em *L. infantum*.

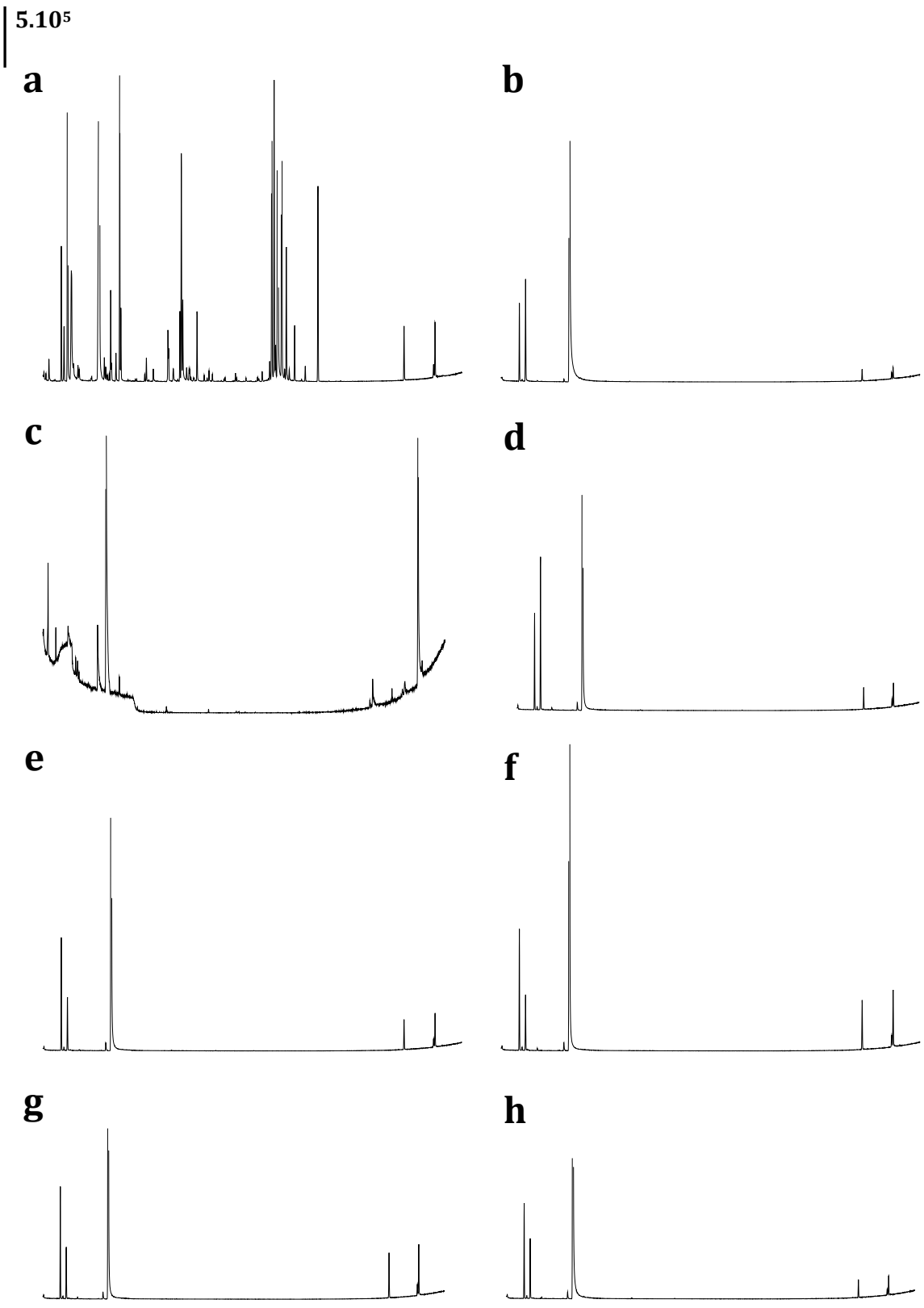


Figura 4.3. Cromatograma de íons totais de GC-MS para avaliação de eficiência de lavagem das células. **a)** meio de cultura, **b)** PBS, **c)** lavagem 1, **d)** lavagem 2, **e)** lavagem 3, **f)** lavagem 4, **g)** lavagem 5 e **h)** lavagem 6.

Após remoção dos constituintes extracelulares, os pellets foram ressuspendidos em PBS e contados em câmara de Neubauer, para serem distribuídas as quantidades desejadas de células por amostra. Métodos convencionais de metabolômica utilizam de 10^7 a 10^8 células por amostra, com o objetivo de obter concentrações adequadas de metabólitos intracelulares para serem detectados pelas técnicas analíticas[119]. Como não existe um padrão neste quesito, o número de células de *L. infantum* também foi estudado. Para isso, foram analisadas triplicatas de 1.10^7 até 1.10^8 promastigotas/mL por GC-MS.

Para número de metabólitos identificados foram encontrados uma média de 6 a 23 metabólitos de 1.10^7 a 1.10^8 células, respectivamente. O gráfico da Figura 4.4a ilustra um aumento exponencial na quantidade de metabólitos identificados quando se aumenta a quantidade de células por amostra. Com relação a quantificação, a Figura 4.4b apresenta a comparação de intensidade média e desvios de dez metabólitos mais intensos selecionados a partir de 4.10^7 a 10.10^7 células por amostra.

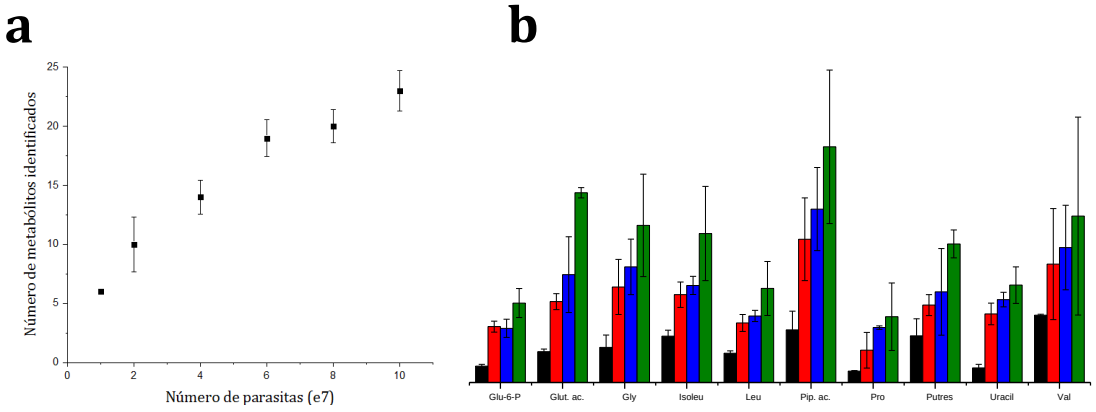


Figura 4.4. Avaliação do número de células de *L. infantum* por amostra: **a)** correlação entre número de células e quantidade de metabólitos identificados por GC-MS, e **b)** média de triplicata da intensidade e desvio de metabólitos identificados. Preto - 4.10^7, vermelho - 6.10^7, azul - 8.10^7 e verde - 10.10^7 promastigotas/mL por amostra.

A quantificação dos metabólitos foi avaliada a partir de 4.10^7 células, pois quantidades inferiores de células se mostraram pouco efetivas neste estudo, visto o pequeno número de metabólitos detectados. Com isso, na Figura 4.4b, observa-se um aumento progressivo na intensidade dos metabólitos detectados, com o aumento do número de células por amostra. Este resultado é de certa forma óbvio, uma vez que com maior número de parasitas, mais se extrairia dos seus metabólitos, contudo, esperava-se que em algum momento a quantidade extraída atingisse um platô e se mantivesse constante. Possivelmente, aumentando-se ainda mais o número de células por amostra esse platô seria atingido, entretanto, este tipo de experimento seria inviável em termos de quantidade de material necessário para execução do estudo. Por isso, a quantidade de 1.10^8 promastigotas/mL por amostra foi fixada neste trabalho, sendo este, um número que nos permite conseguir réplicas da cultura, e que apresenta bons resultados em termos de quantidade de metabólitos e intensidade de sinal alcançados por GC-MS.

4.2. Desenvolvimento de Método para Extração de Metabólitos Intracelulares

Metodologias e protocolos de extração de metabólitos intracelulares são frequentemente encontrados na literatura para diversos organismos vivos[50,118-120]. Em *Leishmania* apenas um protocolo foi encontrado nas bases de dados científicas[49], no qual os autores otimizaram um método de extração de metabólitos intracelulares em parasitas de *L. donovani* para análise por HILIC-MS. Baseado no fato de existir um único protocolo descrito na literatura, e que cobrir o metaboloma com apenas uma técnica analítica é uma tarefa impossível, iniciou-se o desenvolvimento de um protocolo de extração de metabólitos intracelulares em *L. infantum* para as técnicas analíticas (GC-MS e RPLC-MS) aqui empregadas.

O primeiro ponto otimizado na extração foi o tipo de lise celular. Duas metodologias foram testadas para escolha da melhor ruptura da membrana celular para extração dos metabólitos intracelulares: tissuelyzer, com adição de 2

esfera de plástico (aproximadamente 2 mm de diâmetro), aplicando-se 50 Hz por 15 min e ultrassom com sonda por 1 min a 30% de sua potência, usando MeOH:H_2O (1:1) como solvente extrator. A verificação de eficiência de ruptura foi realizada por inspeção visual das células em microscópio invertido. A Figura 4.5 apresenta as imagens obtidas no microscópio.

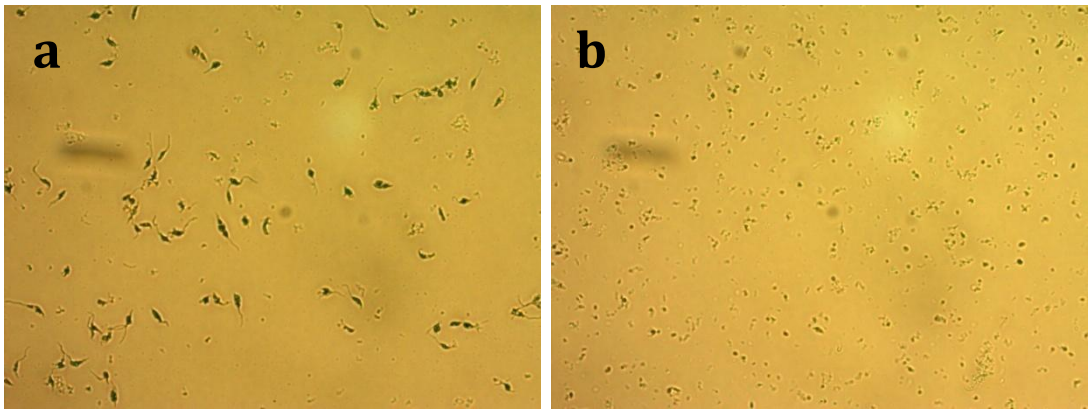


Figura 4.5. Imagens de microscópio invertido dos pellets de *L. infantum* após extração de metabólitos intracelulares por **a)** tissuelyzer e **b)** ultrassom com sonda.

Visualizando a Figura 4.5, fica evidente que o ultrassom com sonda apresentou melhor eficiência na ruptura da membrana celular do parasita, uma vez que observa-se as células completamente destruídas. Na extração com o tissuelyzer (Figura 4.5a), grande parte dos parasitas encontra-se perfeitamente intactas, é possível observar não apenas a forma alongada, como também o flagelo do parasita. Na avaliação dos cromatogramas obtidos das lises (dados não apresentados), o perfil de separação é muito semelhante, são observadas poucas diferenças com relação aos compostos detectados, entretanto, a intensidade dos picos é maior quando se utiliza o ultrassom com sonda. Sendo assim, este tipo de ruptura celular foi selecionada para a extração dos metabólitos.

A próxima etapa estudada foi o tipo de extrator. A obtenção do melhor método de extração vai depender principalmente da matriz com a qual se trabalha e ainda, da técnica analítica utilizada. Por isso, muitos autores testam diferentes solventes para obter a melhor resposta[50-52]. Existem inúmeras

possibilidades de extratores nos estudos de metabolômica. Os alcoóis são os mais comuns, pois apresentam alta compatibilidade com as técnicas de análise, além de precipitarem proteínas e não alterarem o pH da solução. Apesar de alguns autores utilizarem ácidos e hidróxidos na composição do extrator, esta ação não é recomendada, em função da possibilidade de ocorrer precipitação de sais, e no caso do uso de ácidos, por diminuição do pH do meio, pode haver degradação de metabólitos instáveis[47,121]. Por isso o uso destas substâncias nem foi considerado neste trabalho.

Uma avaliação mais criteriosa e completa do tipo de solvente extrator para metabolômica *untarget* foi delineada por planejamento experimental baseado em desenho de misturas, sendo estudados metanol, água e clorofórmio como solventes extratores puros e em misturas (binárias e ternárias). A Figura 4.6 apresenta o esquema do triângulo de solventes utilizado nesta otimização.

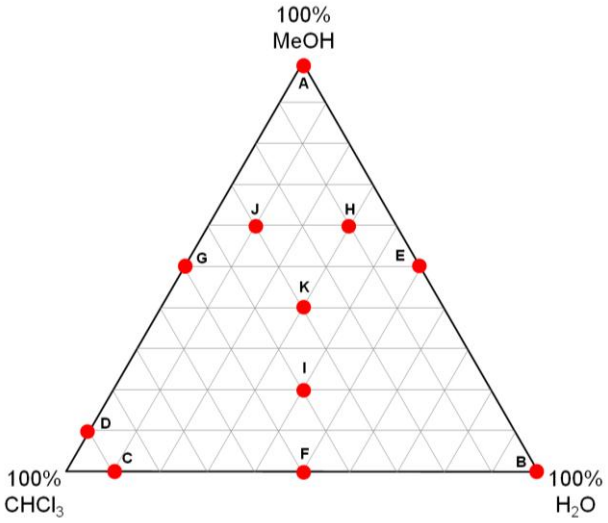


Figura 4.6. Desenho de mistura de solventes para avaliação da extração de metabólitos intracelulares em *L. infantum*. (A) 100% MeOH, (B) 100% H_2O, (C) H_2O:$CHCl_3$ (1:9), (D) MeOH:$CHCl_3$ (1:9), (E) MeOH:H_2O (1:1), (F) H_2O:$CHCl_3$ (1:1), (G) MeOH:$CHCl_3$ (1:1), (H) MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (6:3:1), (I) MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (2:4:4), (J) MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (6:1:3) e (K) MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (4:3:3). Todas as proporções estão em volume.

Em razão da polaridade dos compostos de interesse, não foram analisados extratos com 100% de clorofórmio, uma vez que este solvente extrai muitos plastificantes e, especialmente, lipídios e fosfolipídios[119], cujas identificações não são triviais e necessitam de uma grande quantidade de padrões analíticos para confirmação estrutural. Além disso, nos trabalhos realizados anteriormente no tratamento de *L. infantum* com antimônio[92,93] e de *L. donovani* com miltefosina[91], foram verificados que os fosfolipídios (identificados putativamente por RPLC-MS) não geram informações relevantes para as explicações das alterações biológicas ocorridas durante o tratamento do parasita. A realização de lipidômica seria uma alternativa mais viável e confiável para análise desta classe de substâncias.

O estudo de extração baseado em misturas de solventes foi aplicado para análise metabolômica em GC-MS e RPLC-MS. Cada ponto apresentado na Figura 4.6 foi analisado apenas uma vez e o ponto central (K) em triplicata, para minimização do número de análises, mas sem perda de informação na avaliação estatística dos resultados[122], que foi realizada por metodologia de superfície de resposta utilizando os softwares Design Expert 7.0.0 Trial (Stat-Ease Inc.) e Statistica 12 (StatSoft Inc.). Os resultados obtidos em cada técnica analítica estudada foram avaliados de acordo com os seguintes critérios:

- número de compostos identificados em GC-MS (bibliotecas Fiehn e NIST) e número de compostos putativamente identificados por busca na base de dados HMDB em RPLC-MS, sendo os compostos selecionados descritos em rotas metabólicas de *Leishmania*;
- atribuição de *score*, relativo à soma de valores atribuídos à intensidade dos metabólitos. Os valores de *score* para cada faixa de intensidade para as técnicas empregadas estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Critério de avaliação do solvente extrator por *score*.

GC-MS		**RPLC-MS**	
Score	**Intensidade**	***Score***	**Intensidade**
0	sem pico	0	sem pico
1	$< 10^3$	1	$< 10^6$
2	$10^3 < I < 10^4$	2	$< 10^7$
3	$10^4 < I < 10^5$	3	$< 10^8$
4	$> 10^5$	4	$< 10^9$

As Figuras 4.7 e 4.8 apresentam os TICs (*Total Ion Chromatograms*) de cada solvente estudado em GC-MS e RPLC-MS, respectivamente.

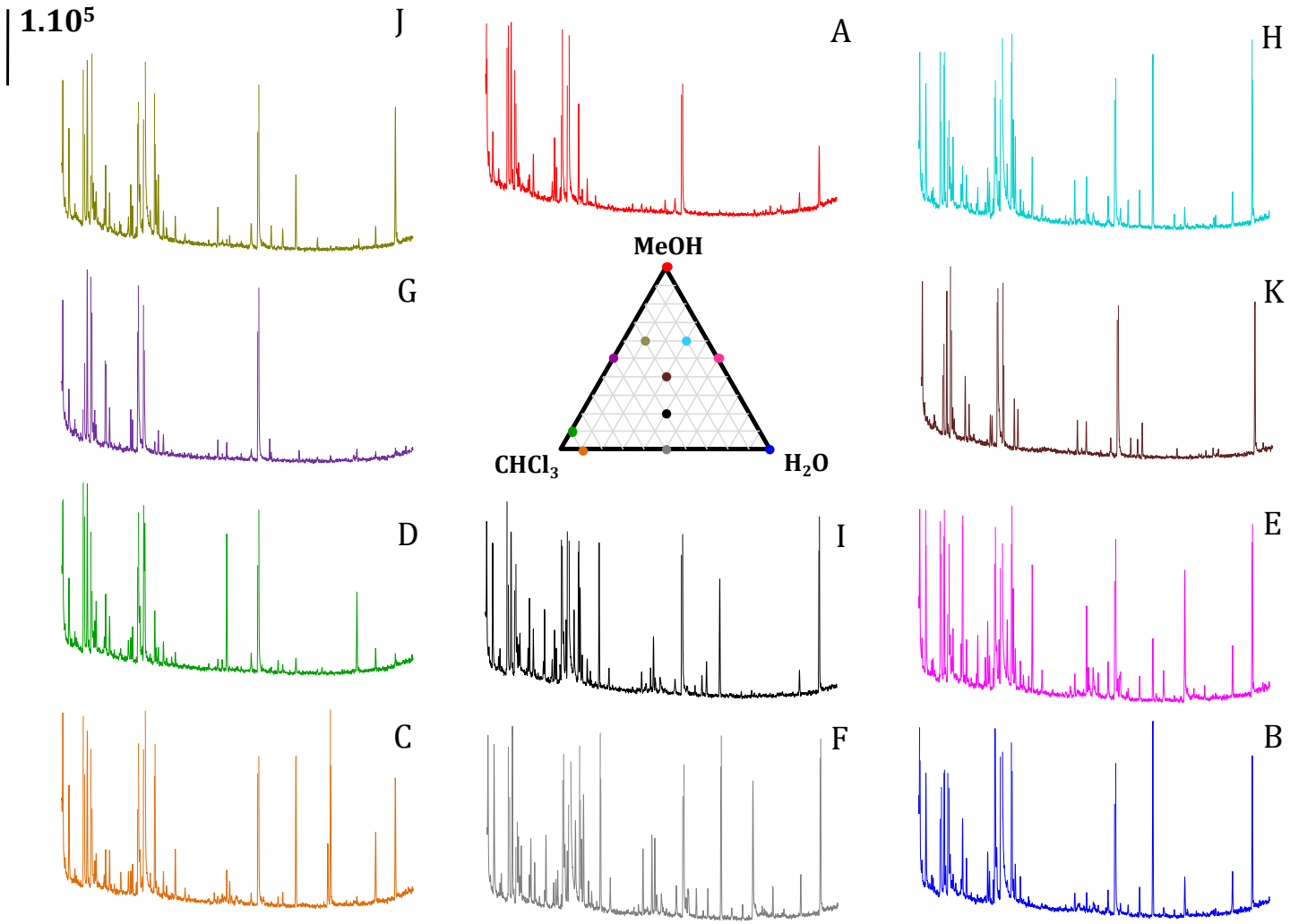


Figura 4.7. Cromatogramas de íons totais do estudo da extração por combinação de solventes por GC-MS. Condições de análise na Parte Experimental.

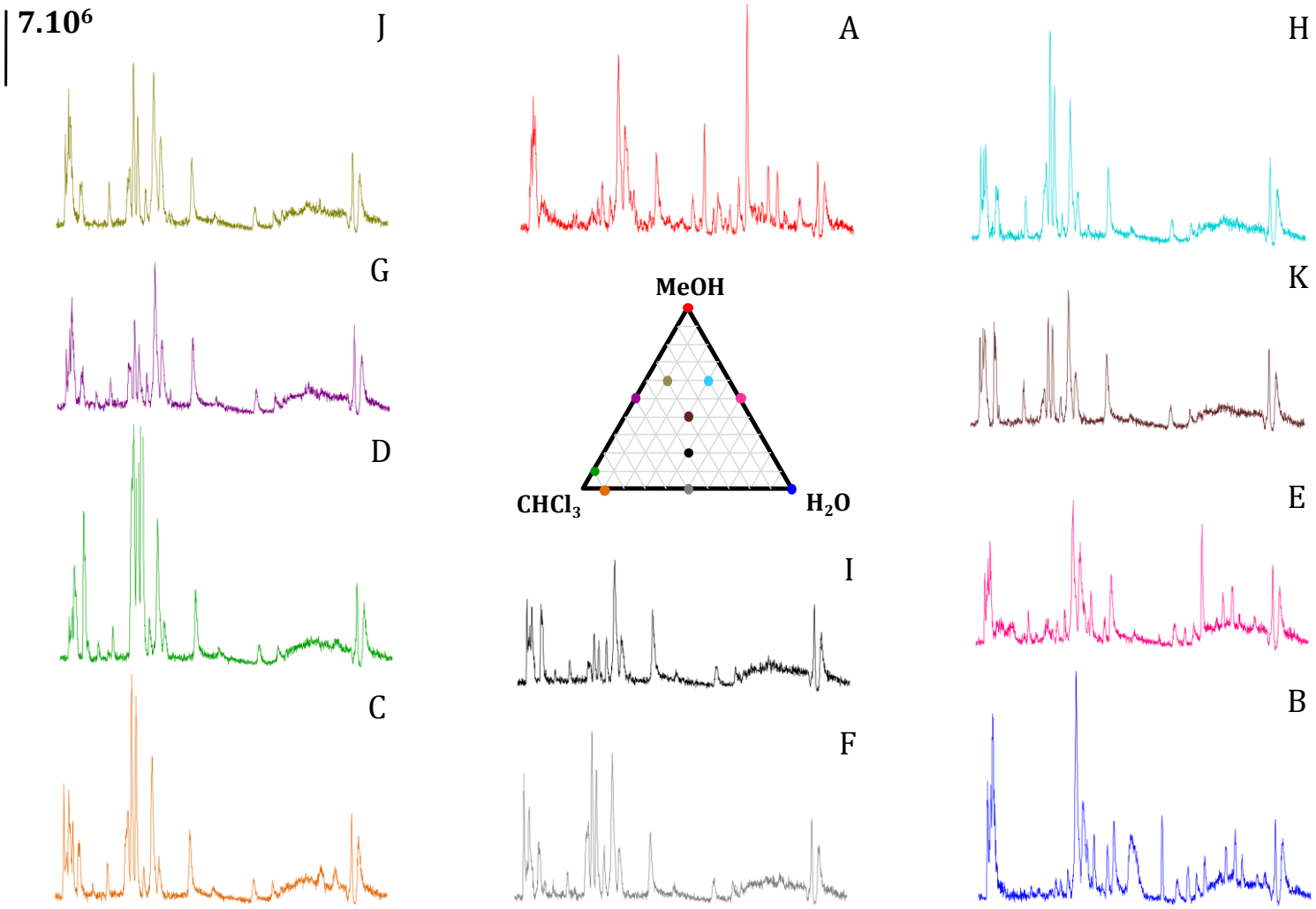


Figura 4.8. Cromatogramas de íons totais do estudo da extração por combinação de solventes por RPLC-MS. Condições de análise na Parte Experimental.

Uma inspeção rápida dos cromatogramas nos permite verificar que nas análises por GC-MS (Figura 4.7) existem poucas diferenças nos perfis cromatográficos, destacando-se as condições C, F e E. Nos cromatogramas obtidos das análises por RPLC-MS (Figura 4.8), os melhores perfis são A, B e E e verifica-se muita semelhança entre os perfis C, F, G, H, I, J e K.

Nas análises por GC-MS foram encontrados alguns aminoácidos e seus derivados (putrescina, leucina, lisina, alanina, glicina, etc.), ácidos orgânicos (esteárico, benzóico, succínico, metilmalônico, etc.) e carbohidratos (galactose, sucrose, etc.). A Tabela 4.2 apresenta o número de compostos identificados nos extratos de cada solvente testado, bem como o número de *molecular features* obtidos na matriz de dados do XCMS, para cada condição.

As buscas das relações *m/z*'s detectadas por RPLC-MS na base de dados pública HMDB geraram centenas de possíveis metabólitos, entretanto, foram contabilizados apenas aqueles que estão descritos em rotas de *Leishmania*. Os resultados para cada solvente testado também estão apresentados na Tabela 4.2. Derivados de aminoácidos, ácidos orgânicos e graxos, além de derivados de nucleotídeos e nucleosídeos, entre outros foram identificados. Para esta avaliação, ficou estabelecido que se excluiriam os derivados de lipídios como: fosfolipídios, esfingolipídios, glicerofosfolipídios, etc., como explicado anteriormente a identificação precisa destes metabólitos é bastante complicada, sendo necessário grande quantidade de padrões analíticos para experimentos de MS/MS.

Tabela 4.2. Número de compostos identificados e putativamente identificados por GC-MS e RPLC-MS, respectivamente, para os solventes extratores estudados.

Condição	**Solvente extrator***	**Metabólitos identificados/ *molecular features* GC-MS**	**Metabólitos putativamente identificados/ *molecular features* RPLC-MS‡**
A	100% MeOH	14/2096	77/1352
B	100% H_2O	16/2110	42/1285
C	H_2O:$CHCl_3$ (1:9)	21/2049	45/875
D	MeOH:$CHCl_3$ (1:9)	20/1957	49/908
E	MeOH:H_2O (1:1)	29/2065	59/1147
F	H_2O:$CHCl_3$ (1:1)	23/2025	41/784
G	MeOH:$CHCl_3$ (1:1)	12/1879	41/758
H	MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (6:3:1)	23/1909	46/744
I	MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (2:4:4)	21/1869	41/638
J	MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (6:1:3)	19/1878	43/681
K#	MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (4:3:3)	10/1816	44/947

*Proporções em volume.

#Resultado da média de triplicata.

‡Metabólitos putativamente identificados, excluindo-se lipídios e seus derivados.

Para ambas as técnicas (GC-MS e RPLC-MS) a análise de variância (ANOVA) do modelo gerado no software Design Expert 7.0 (Stat-Ease) indicou diferença estatisticamente significativa (p-valor < 0.05) entre as medidas, como pode ser observado na Tabela 4.3, confirmando a existência de uma condição na qual a máxima extração prevalece e esta se destaca sobre as demais. Os gráficos da superfície de resposta 2D e os resultados da avaliação estatística (modelo 2FI - *Two-Factor Interaction Model* e parâmetros da ANOVA) estão apresentados na Figura 4.9 e Tabela 4.3, respectivamente.

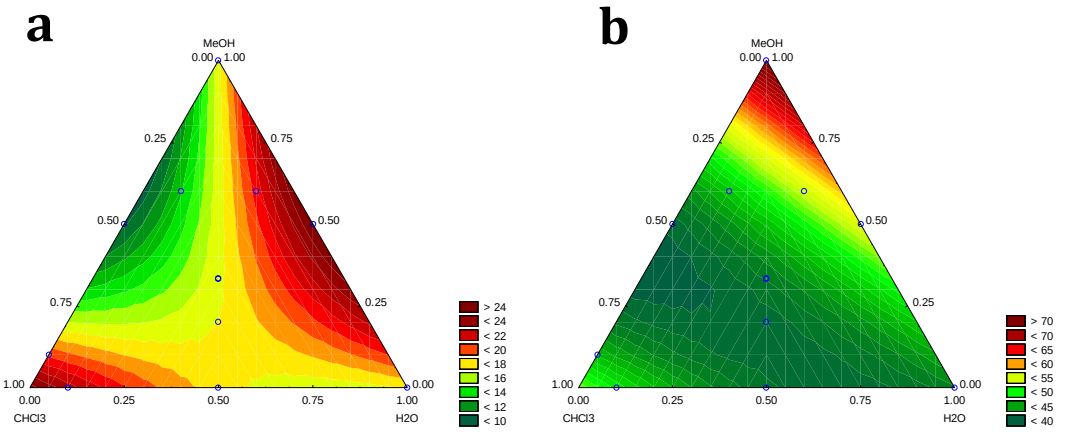


Figura 4.9. Superfície de resposta 2D de modelo 2FI para avaliação do número de compostos **a)** identificados por GC-MS e **b)** putativamente identificados por RPLC-MS.

Tabela 4.3. Resultados dos parâmetros estatísticos da ANOVA em modelo 2FI aplicado ao estudo de diferentes solventes extratores para metabolômica por GC-MS e RPLC-MS.

Parâmetros	GC-MS	RPLC-MS
b_0	607 ± 69	-143 ± 168
b_1 ($F_{parcial}$, p)	609 ± 71 (73.8, 0.0001)	-191 ± 174 (1.21, 0.31)
b_2 ($F_{parcial}$, p)	618 ± 71 (75.6, 0.0001)	-190 ± 174 (1.20, 0.32)
b_3 ($F_{parcial}$, p)	603 ± 71 (72.0, 0.0001)	-205 ± 174 (1.39, 0.28)
b_{12} ($F_{parcial}$, p)	13.3 ± 1.93 (47.3, 0.0005)	-5.20 ± 4.73 (1.21, 0.31)
b_{13} ($F_{parcial}$, p)	-4.67 ± 2.00 (5.43, 0.059)	-25.2 ± 4.9 (26.3, 0.0022)
b_{23} ($F_{parcial}$, p)	3.13 ± 2.04 (2.36, 0.18)	-8.15 ± 5.00 (2.66, 0.1541)
$R^2_{ajustado}$	0.91	0.82
F (modelo)	21.8	9.88
p (modelo)	8.0×10^{-4}	6.5×10^{-4}

$y = b_0 + b_1*MeOH + b_2*H_2O + b_3*CHCl_3 + b_{12}*MeOH*H_2O + b_{13}*MeOH*CHCl_3 + b_{23}*H_2O*CHCl_3$

No rodapé da Tabela 4.3 está apresentada a equação que descreve o modelo estatisticamente significativo (2FI), na qual os parâmetros correspondem a: y - número de metabólitos, b_0 - intercepto do modelo, b_1 - coeficiente relativo à contribuição do metanol, b_2 - coeficiente relativo à contribuição da água, b_3 - coeficiente relativo à contribuição do clorofórmio, b_{12} - coeficiente relativo à contribuição da combinação de metanol e água, b_{13} - coeficiente relativo à contribuição da combinação de metanol e clorofórmio, b_{23} - coeficiente relativo à contribuição da combinação de água e clorofórmio, $R^2_{ajustado}$ - coeficiente de determinação ajustado, F - coeficiente de Fisher do modelo, *p* - *p*-valor do modelo, valores de F e *p* entre parênteses são os coeficientes de Fisher e *p*-valor parciais de cada coeficiente da equação.

Os modelos são estatisticamente significativos, apresentando *p*-valor < 0.05 e coeficiente de Fisher (F > 5). A análise estatística nos mostra que na extração para o GC-MS os três solventes (metanol, água e clorofórmio), quando

avaliados separadamente contribuem de maneira positiva na extração, bem como a combinação metanol:água, enfatizados pelos resultados observados na superfície de resposta (Figura 4.9a). Curiosamente, a estatística dos resultados de RPLC-MS indicou a combinação metanol:clorofórmio como único fator com significância estatística; entretanto, pelo número de metabólitos putativamente identificados é notável que a extração com 100% metanol é a mais eficiente.

Nas superfícies de resposta da Figura 4.9 observa-se que caminhando nas direções de máxima extração dos metabólitos, coloração vermelho mais escuro, nos dados de GC-MS (Figura 4.9a) a proporção MeOH:H_2O (1:1) apresentou maior eficiência na extração, 29 metabólitos no total (Tabela 4.2). Para os resultados apresentados na superfície de RPLC-MS (Figura 4.9b) a máxima extração é alcançada quando se trabalha com 100% MeOH, que resultou em 77 metabólitos putativamente identificados (Tabela 4.2). Cabe mencionar, que nos resultados de GC-MS, a melhor condição (MeOH:H_2O, 1:1) não apresentou o maior número de *molecular features* (2065 no total). As condições 100% H_2O e 100% MeOH apresentaram 2110 e 2096 *molecular features*, respectivamente (Tabela 4.2), entretanto, nestas foram identificados cerca de metade da quantidade de metabólitos observados em MeOH:H_2O (1:1), indicando que nem sempre a maior quantidade de *molecular features* irá refletir na melhor condição, uma vez que muitas destas entidades podem ser apenas ruído extraído dos espectros.

Os resultados obtidos na avaliação do solvente extrator se mostram condizentes com as técnicas de análise empregadas, sendo mais indicado um solvente extrator com características mais polares (como o MeOH:H_2O) para GC-MS e um extrator menos polar que o primeiro (100% MeOH) para detecção e identificação de compostos com características menos polares, que são melhor separados em fase reversa por LC-MS.

Com a finalidade de obter uma resposta completa e quantitativa a respeito da extração, além do número de metabólitos identificados foram avaliadas as intensidades destes. Para tal, valores (*score*) de 1 a 4 foram atribuídos a cada metabólito identificado ou putativo, de acordo com sua intensidade (Tabela 4.1). Ao final, cada solvente extrator apresentou um *score*,

relativo a soma da pontuação atribuída a cada intensidade. A Tabela 4.4 apresenta os *scores* finais de cada solvente extrator para as técnicas de análise.

Tabela 4.4. *Scores* atribuídos a cada solvente extrator de acordo com a intensidade dos metabólitos identificados ou putativamente identificados.

Solvente extrator	***Score* GC-MS**	***Score* RPLC-MS**	**Solvente extrator**	***Score* GC-MS**	***Score* RPLC-MS**
100% MeOH	37	188	MeOH:$CHCl_3$ (1:1)	33	122
100% H_2O	41	122	MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (6:3:1)	57	124
H_2O:$CHCl_3$ (1:9)	61	126	MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (2:4:4)	46	110
MeOH:$CHCl_3$ (1:9)	49	126	MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (6:1:3)	46	112
MeOH:H_2O (1:1)	65	162	MeOH:H_2O:$CHCl_3$ (4:3:3)[#]	27	135
H_2O:$CHCl_3$ (1:1)	53	101			

[#]Resultados da média de triplicata.

Confirmando o já verificado pelo número de metabólitos, a soma dos *scores* também mostrou que as melhores extrações foram: MeOH:H_2O (1:1) - *score* 65 e 100% MeOH - *score* 188 para GC-MS e RPLC-MS, respectivamente. O resultado da superfície de resposta está apresentado na Figura 4.10 e assemelha-se ao apresentado na Figura 4.9. A Tabela 4.5 representa o modelo 2FI juntamente com a os resultados da estatística (ANOVA).

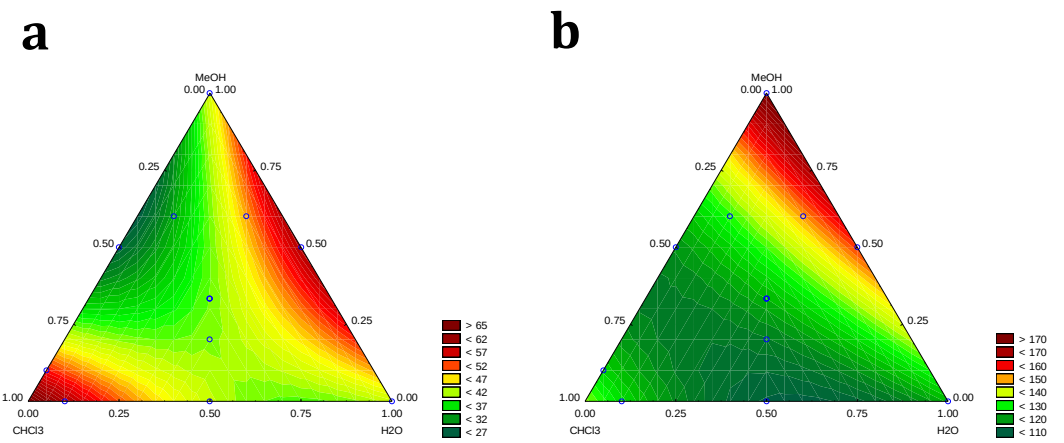


Figura 4.10. Superfícies de resposta para modelo 2FI para avaliação de tipo de solvente extrator por *scores* atribuídos às intensidades de metabólitos identificados por **a)** GC-MS e **b)** RPLC-MS.

Tabela 4.5. Resultados dos parâmetros estatísticos da ANOVA em modelo 2FI aplicado ao estudo de diferentes solventes extratores para metabolômica da avaliação de *scores* atribuídos aos metabólitos identificados por GC-MS e RPLC-MS.

Parâmetros	GC-MS	LC-MS
b_0	1237 ± 150	-1118 ± 490
b_1 ($F_{parcial}$, p)	1235 ± 155 (63.5, 0.0002)	-1269 ± 507 (6.27, 0.046)
b_2 ($F_{parcial}$, p)	1252 ± 155 (65.0, 0.0002)	-1280 ± 508 (6.36, 0.045)
b_3 ($F_{parcial}$, p)	1221 ± 155 (61.8, 0.0002)	-1317 ± 508 (6.73, 0.041)
b_{12} ($F_{parcial}$, p)	25.85 ± 4.22 (37.5, 0.0009)	-5.86 ± 13.8 (0.18, 0.69)
b_{13} ($F_{parcial}$, p)	-15.08 ± 4.38 (11.9, 0.014)	-52.48 ± 14.3 (13.4, 0.011)
b_{23} ($F_{parcial}$, p)	1.22 ± 4.46 (0.075, 0.79)	-33.09 ± 14.6 (5.15, 0.064)
$R_{ajustado}$	0.913	0.700
F (modelo)	21.9	5.67
p (modelo)	0.0008	0.027

$y = b_0 + b_1*MeOH + b_2*H_2O + b_3*CHCl_3 + b_{12}*MeOH*H_2O + b_{13}*MeOH*CHCl_3 + b_{23}*H_2O*CHCl_3$

y - score atribuído ao número de metabólitos identificados, b_0 - intercepto do modelo, b_1 - coeficiente relativo à contribuição do metanol, b_2 - coeficiente relativo à contribuição da água, b_3 - coeficiente relativo à contribuição do clorofórmio, b_{12} - coeficiente relativo à contribuição da combinação de metanol e água, b_{13} - coeficiente relativo à contribuição da combinação de metanol e clorofórmio, b_{23} - coeficiente relativo à contribuição da combinação de água e clorofórmio, $R_{ajustado}$ - coeficiente de determinação ajustado, F - coeficiente de Fisher do modelo, *p* - *p*-valor do modelo.

Em razão da constituição dos solventes extratores para ambas as técnicas de análise terem sido semelhantes, pensou-se em testar uma proporção intermediária MeOH:H_2O (3:1, v/v) em comparação com o ótimo de cada técnica, com a finalidade de checar a viabilidade de se usar o mesmo solvente extrator para duas técnicas de análise, diminuindo o consumo de amostras, pois um único extrato seria dividido para ser analisado em duas técnicas diferentes. Sendo assim, testou-se para GC-MS e RPLC-MS MeOH:H_2O (1:1) *vs.* MeOH:H_2O (3:1, v/v) e 100% MeOH *vs.* MeOH:H_2O (3:1, v/v), respectivamente. Os testes foram analisados em triplicata e a avaliação dos resultados seguiu os mesmos critérios anteriores: número de metabólitos e *scores* das intensidades.

Os resultados obtidos nesta segunda avaliação da extração mostraram que para GC-MS não existe uma diferença significativa por teste t de *Student* entre os solventes avaliados. Uma possível explicação para isto é que pela semelhança dos extratores, MeOH:H_2O (1:1) ou MeOH:H_2O (3:1, v/v), a extração acessa basicamente os mesmos metabólitos e, ainda pelo fato de este tipo de análise ser mais restrita, uma vez que a reação de derivatização se processa em compostos que apresentam prótons permutáveis como carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, entre outros[58] e, que, apesar das análises por GC-MS não serem exatamente dedicadas a separação e detecção de compostos polares, estes são mais frequentemente observados. Já para RPLC-MS, 100% MeOH continuou sendo o melhor extrator, dando diferença significativa, entre a quantidade de metabólitos putativamente identificados, em comparação com o MeOH:H_2O (3:1, v/v). Como não foi possível encontrar um único extrator para duas técnicas de análise, possivelmente em razão da diferença em composição química que cada técnica é capaz de acessar, por isso mesmo são complementares, os solventes utilizados para extração em GC-MS e RPLC-MS foram mantidos como MeOH:H_2O (1:1) e 100% MeOH, respectivamente.

Este estudo aprofundado da extração dos metabólitos intracelulares para análise metabolômica é de extrema importância, uma vez que o método aplicado pode afetar completamente o resultado final de busca de possíveis metabólitos estatisticamente significativos entre as condições testadas[46]. Não existe nenhum trabalho na literatura com estudo sistemático no preparo das células, e

subsequentes extrações de metabólitos intracelulares em *Leishmania* englobando mais de uma técnica de análise.

4.3. Otimização das Etapas de Derivatização para Análise por GC-MS

Em razão de muitos metabólitos conterem grupos funcionais polares e serem termicamente lábeis nas temperaturas de análise por GC-MS, um passo de derivatização é necessário para aumentar a faixa de metabólitos identificados pela técnica analítica[63]. Não existe um método universal para reação de derivatização na análise de compostos não voláteis por GC-MS. Apesar de se encontrarem trabalhos que utilizam derivatização com cloroformiato[123] ou fluoroesterificação[124], a sililação tem se mostrado a mais versátil e mais aplicada em estudos de metabolômica[63], especialmente pela facilidade de identificação, uma vez que existem bibliotecas de espectros dos adutos formados com milhares de substâncias caracterizadas. Como etapa única, a sililação não é suficiente para derivatizar todos os metabólitos presentes nos fluidos biológicos[125], resultando em perda de informação preciosa nos estudos *untarget*. Portanto, a derivatização deve incluir duas etapas: a primeira de metoximação ou oximação, que serve para aumentar a estabilidade das moléculas, pois protege grupos carbonílicos de cetonas e aldeídos, evitando ciclização. Além disso, também inibe a formação de anel dos açúcares, fazendo com que o número de produtos de derivatização resultante de isômeros seja menor. A segunda etapa é então a sililação, na qual os prótons ácidos nas moléculas são substituídos por grupamentos trimetilsilil ($Si(CH_3)_3$), diminuindo o ponto de ebulição dos analitos e aumentando sua estabilidade térmica[63,125]. A Figura 4.11 apresenta esquemas das reações de oximação (a e b) e sililação (a-c) que ocorrem durante a derivatização dos metabólitos para análise por GC-MS.

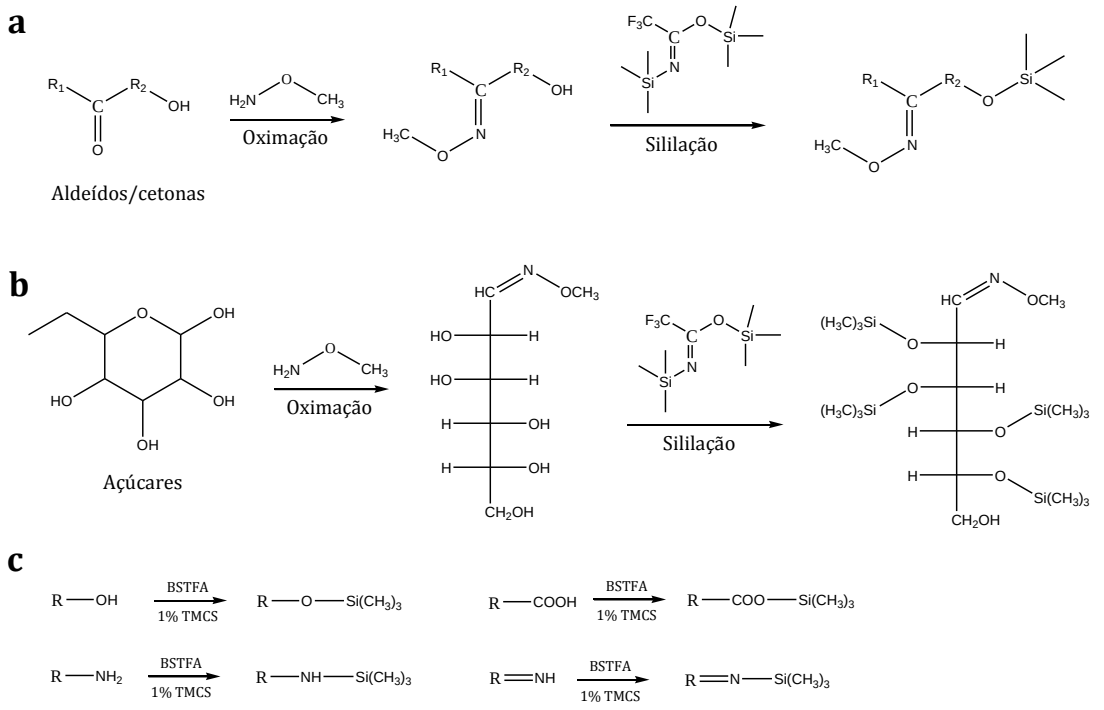


Figura 4.11. Esquema de reações de oximação seguida de sililação para **a)** aldeídos e cetonas e **b)** açúcares, e **c)** esquema simplificado de reação de sililação para diferentes grupamentos químicos.

No geral, a reação de oximação é a que demanda maior tempo na derivatização, podendo ser realizada em um período de 16 h à temperatura ambiente[62,126,127], ou ainda em períodos mais curtos de até 120 min, aplicando-se temperaturas de 30-40 ºC[113,128,129], acelerando a reação sem comprometer o resultado final. A reação de sililação pode ser realizada de 40-70 ºC por 30 a 60 min. A comparação de métodos de derivatização que demandam quantidade de tempo tão diferentes (cerca de 18 ou 4 h) é de suma importância, do ponto de vista analítico e, ainda, para abordagem metabolômica, uma vez que se trabalha com centenas de amostras concomitantemente, na qual além de frequência analítica deseja-se evitar degradação dos constituintes das amostras.

Dois tipos de derivatização foram testadas (denominadas aqui lenta e rápida) em extratos de *Leishmania:* no procedimento rápido, 10 μL de O-metoxiamina em piridina (15 mg x mL^{-1}) foram adicionados ao extrato seco e a reação foi processada em banho termostatizado por 120 min à 40 ºC; no

procedimento lento, os vials contendo a mistura reacional foram cobertos com papel alumínio e deixados durante 16 h à temperatura ambiente. Após a etapa de oximação, 10 μL de BSTFA contendo 1% de TMCS foram adicionados e a reação de sililação ocorreu em banho termostatizado por 60 min à 70 ºC (etapa realizada em ambos os procedimentos, rápido e lento).

A primeira avaliação através da quantidade de metabólitos obtidos indicou a derivatização rápida como a mais adequada, por apresentar quantidade de metabólitos identificados e número de features ligeiramente maior e, obviamente, apresentar redução drástica de tempo em bancada. Na Figura 4.12 está representada a diferença entre as duas derivatizações por um Diagrama de Venn da comparação do número de metabólitos identificados pelas bibliotecas.

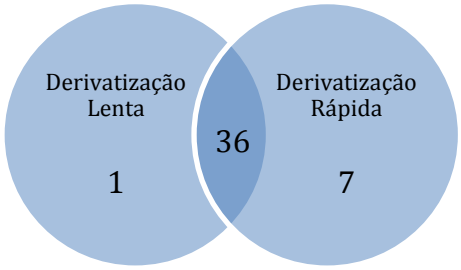


Figura 4.12. Diagrama de Venn para comparação de número de metabólitos identificados por GC-MS em extratos de *L. infantum* após derivatização lenta e rápida.

No geral, 36 metabólitos comuns foram identificados nos dois procedimentos estudados, mas a derivatização rápida apresentou 7 outros que não foram detectados na lenta, e esta apenas 1 que não se observou na rápida. Quanto ao número de features, na derivatização lenta foram obtidos 1339 e na rápida 1354. Metabólitos importantes foram identificados quando se fez a derivatização rápida, como por exemplo: ácido aspártico, prolina, putrescina, ácido pipecólico, ácido glicurônico, não identificados na derivatização lenta. A Figura 4.13, apresenta um gráfico de barras de 10 metabólitos mais intensos dos 36 conjuntamente identificados em ambas as derivatizações, além dos desvios-

padrão correspondentes, a fim de comparar diferenças de intensidade dos picos obtidos.

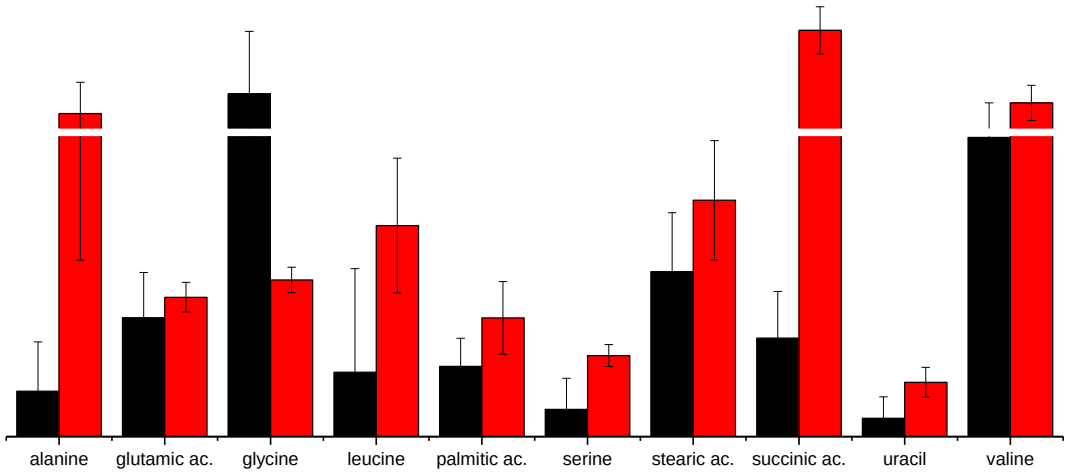


Figura 4.13. Média e desvio-padrão de triplicata de medidas para avaliação do tipo de derivatização em dez metabólitos identificados por GC-MS. Derivatização lenta (16 h de oximação à temperatura ambiente) em preto e rápida (2 h de oximação à 40 ºC) em vermelho. Para ambas as derivatizações, a sililação foi realizada à 70 ºC por 60 min.

Dos dez metabólitos apresentados na Figura 4.13, observa-se que nove possuem maior intensidade de sinal na derivatização rápida, apenas para glicina verificou-se maior sinal na lenta. No geral, para os trinta e seis metabólitos em comum, a derivatização rápida produziu maior sinal dos analitos em comparação com a lenta, sendo, portanto, utilizada neste trabalho. Acredita-se que essa diferença de intensidade dos metabólitos nas derivatizações testadas pode estar associada à degradação dos mesmos quando a oximação se processa por longo tempo (16 h).

Numa busca rápida na literatura é possível verificar uma grande discrepância com relação a parâmetros como volume de reagente, tempo e temperatura das reações de derivatização. Pela ausência de estudos de condições ótimas e na busca por melhor compreensão das etapas envolvidas no processo, além da tentativa de diminuir ainda mais o tempo de bancada, cada etapa foi estudada separadamente, através da análise em triplicata de um mix contendo

24 padrões analíticos (descritos no Capítulo 3, Parte Experimental). As reações foram estudadas em separado, uma vez que a quantidade de experimentos seria muito grande e a avaliação de tantos parâmetros de uma única vez dificultaria a interpretação dos resultados.

Inicialmente, variaram-se as condições de volume de reagente, temperatura e tempo da etapa de oximação (descritas na Tabela 4.6), seguindo com sililação já adotada: 10 μL de BSTFA + 1% TMCS reagindo por 60 min à 70 ºC. Para avaliação da sililação, a melhor condição da oximação foi repetida em novas amostras e variaram-se o volume de reagente, temperatura e tempo de sililação (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Estudo das condições das reações de oximação e sililação de derivatização para análise metabolômica por GC-MS.

	Oximação				**Sililação**		
	V de reagente (μL)	**T (ºC)**	**Tempo (min)**		**V de reagente (μL)**	**T (ºC)**	**Tempo (min)**
M-1	10	40	90	**S-1**	10	40	60
M-2*	10	40	120	**S-2**	10	40	30
M-3	10	60	90	**S-3***	10	70	60
M-4	10	60	120	**S-4**	10	70	30
M-5	30	40	90	**S-5**	30	40	60
M-6	30	40	120	**S-6**	30	40	30
M-7	30	60	90	**S-7**	30	70	60
M-8	30	60	120	**S-8**	30	70	30

*Condições de referência, adotadas inicialmente para derivatização.

Garcia & Barbas (2011) recomendam alguns cuidados importantes durante a derivatização, como: a) eliminar completamente a água dos extratos celulares, b) manter os vials bem fechados durante o processo, para evitar perdas de analitos voláteis, c) certificar-se que o conteúdo seco presente no vial

foi bem misturado ao reagente de oximação, para garantir eficácia da reação, d) deixar que a reação de oximação ocorra no escuro e e) após reação de sililação, esperar que os vials estejam frios antes de adicionar o heptano, evitando perda dos metabólitos volatilizados[62]. Todas essas recomendações foram criteriosamente seguidas durante o processo.

A Tabela 4.7 apresenta os resultados da avaliação da oximação, que mostraram grande variação no número de analitos detectados, de 8 a 23 dos 24 padrões contidos no mix. O coeficiente de variação (CV) foi calculado da triplicata de intensidade dos analitos detectados, com o objetivo de avaliar a repetibilidade da reação, sendo considerado satisfatório (CV < 30%).

Tabela 4.7. Número de compostos identificados (total) e número de compostos identificados apresentando CV < 30% de intensidade, para estudo da reação de oximação em diferentes condições. Subsequente sililação realizada com 10 μL de BSTFA + 1% TMCS 60 min à 70 ºC.

				Número de metabólitos	
	V de reagente (μL)	**T (ºC)**	**Tempo (min)**	**Identificados**	**CV < 30 %**
M-1	10	40	90	21	11
M-2	10	40	120	22	22
M-3	10	60	90	12	3
M-4	10	60	120	23	17
M-5	30	40	90	9	7
M-6	30	40	120	12	9
M-7	30	60	90	8	5
M-8	30	60	120	7	5

Pelos resultados apresentados na Tabela 4.7 é possível observar que as condições M-3, M-5, M-6, M-7 e M-8 não foram satisfatórias quanto à derivatização dos padrões analíticos, e que há grande variação entre suas réplicas, visto as baixas quantidades de substâncias com CV < 30%. A condição

M-1 apesar de grande número de metabólitos detectados, também não apresentou bons CVs. As duas melhores condições foram M-2 e M-4, e por isso a média e desvio-padrão das intensidades dos metabólitos comuns foram avaliados para estas. Na Figura 4.14 estão apresentados doze desses metabólitos.

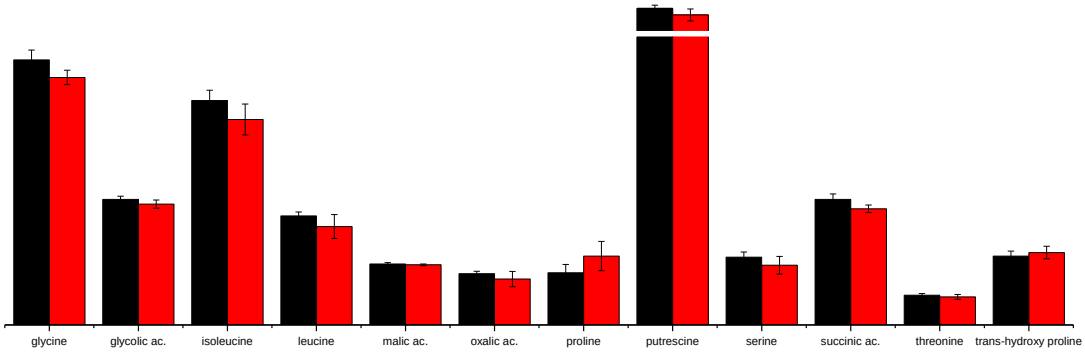


Figura 4.14. Média da intensidade e desvios-padrão de padrões analíticos detectados por GC-MS para avaliação da reação de oximação. Condição M-2 (preto): 10 μL de reagente, 40 ºC por 120 min e condição M-4 (vermelho): 10 μL de reagente, 60 ºC por 120 min. Subsequente sililação realizada com 10 μL de BSTFA + 1% TMCS 120 min à 70 ºC.

As condições M-2 e M-4 não variaram significativamente no quesito intensidade dos metabólitos, entretanto observa-se na Figura 4.14 que, no geral, os metabólitos derivatizados pela condição M-4 são ligeiramente menos intensos e seus desvios-padrão, em alguns casos, são um pouco maiores que a condição M-2; além disso as variações entre as medidas (%CV) de todos os analitos detectados por M-2 estavam abaixo dos 30%. Como verificou-se ocorrência da reação trabalhando-se com uma temperatura mais baixa, 40 ºC, a condição M-2 (10 μL de reagente, 40 ºC por 120 min) foi a escolhida para etapa de oximação, especialmente para tentar minimizar erros por perda de metabólitos por volatilização ou degradação, quando se trabalha com temperaturas mais elevadas.

Determinada as condições da reação de oximação, procedeu-se com o estudo da sililação. Os critérios de avaliação foram os mesmos da oximação. Os resultados de número de metabólitos detectados e o número destes que apresentam CV < 30% de intensidade, estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Número de compostos identificados e com CV < 30% para avaliação de diferentes condições de sililação. Prévia oximação realizada com 10 μL de O-metoxiamina em piridina (15 mg x mL^{-1}) por 120 min à 40 ºC.

				Número de metabólitos	
	V (μL)	**T (ºC)**	**Tempo (min)**	**Identificados**	**CV < 30 %**
S-1	10	40	60	24	21
S-2	10	40	30	24	23
S-3	10	70	60	24	19
S-4	10	70	30	24	17
S-5	30	40	60	24	21
S-6	30	40	30	22	15
S-7	30	70	60	23	18
S-8	30	70	30	24	21

Ao contrário da oximação, a reação de sililação não apresentou grande diferença entre os resultados de cada condição estudada, como observado na Tabela 4.8, uma vez que o número de substâncias detectadas foram praticamente os mesmos nos oito experimentos executados. As condições S-3, S-4, S-6 e S-7 foram as que apresentaram menor quantidade de compostos com CV < 30%. Sendo assim, as demais condições foram avaliadas pela média da intensidade e respectivo desvio-padrão entre as triplicatas. A Figura 4.15 apresenta estes resultados para doze analitos mais intensos.

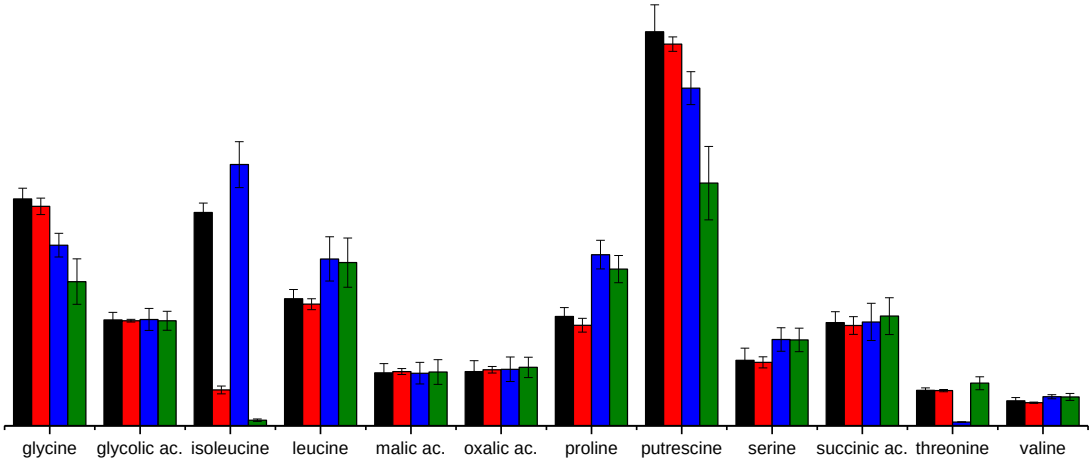


Figura 4.15. Média da intensidade e respectivos desvios-padrão de padrões analíticos detectados por GC-MS para avaliação da reação de sililação. Condição S-1 (preto): 10 μL de reagente, 40 ºC por 60 min, condição S-2 (vermelho): 10 μL de reagente, 40 ºC por 30 min, condição S-5 (azul): 30 μL de reagente, 40 ºC por 30 min e condição S-8 (verde): 30 μL de reagente, 70 ºC por 30 min. Etapa de oximação realizada com 10 μL de reagente 120 min à 40 ºC.

Na avaliação das intensidades dos metabólitos para sililação observa-se grande variação nas diferentes condições (Figura 4.15), na qual dependendo do metabólito uma ou outra condição estudada parece ser melhor. Sendo a repetibilidade um fator importante para qualquer medida analítica, uma avaliação dos desvios-padrão das triplicatas levou-nos a escolher a condição S-2 (10 μL de BSTFA + 1% TMCS mantido à 40 ºC por 30 min), pois foi a que apresentou os menores desvios entre as medidas em comparação com as outras três condições avaliadas, verificado pela maior quantidade de metabólitos com CV < 30%.

Interessantemente, os resultados da sililação apresentados na Tabela 4.8, não mostraram diferença significativa, especialmente quanto ao número de metabólitos identificados, levando-nos a crer que a etapa determinante da derivatização é a oximação. A reação de oximação ocorre para que grupos carbonilas sejam convertidos em oximas e então serem esterificadas pelo trimetilsilil (vindo do TMCS). A reação de oximação é de extrema importância, pois protege os grupos carbonílicos da molécula, dificultando reações indesejáveis de sililação reversíveis, que produzem compostos lábeis[58]. Por isso,

mais um estudo quanto a avaliação da oximação foi realizado, no qual três novas condições foram testadas. Observa-se que utilizando volume de 30 μL a reação não se processa tão bem quanto em 10 μL, possivelmente pelo excesso de reagente, que pode suprimir o sinal obtido no MS, por isso este parâmetro foi fixado com o menor volume. A temperatura e o tempo de reação não mostraram uma correlação significativa, para tanto estudou-se a temperatura ambiente em comparação com o otimizado inicialmente. O tempo de reação de 120 e 90 min foram aplicados à temperatura ambiente. A reação de sililação foi realizada como otimizado anteriormente: 10 μL de BSTFA + 1% TMCS à 40 ºC por 30 min.

Quanto ao número de metabólitos detectados e quantidade dos mesmos com CV < 30% obteve-se:

- Tamb por 120 min - 21 metabólitos detectados e 17 com CV < 30%
- 40 ºC por 120 min - 23 metabólitos detectados e 21 com CV < 30%
- Tamb por 90 min - 24 metabólitos detectados e 23 com CV < 30%

Com relação aos resultados apresentados acima não houve diferença significativa entre as três condições; entretanto, quando avalia-se a intensidade dos dezesseis metabólitos mais intensos e seus desvios-padrão, como pode ser observado na Figura 4.16, a oximação à temperatura ambiente por 90 minutos (barra de cor azul na Figura 4.16) apresenta maior intensidade para a maioria dos metabólitos (com exceção de alanina e tirosina) e seus desvios sempre são menores, comparados as demais derivatizações.

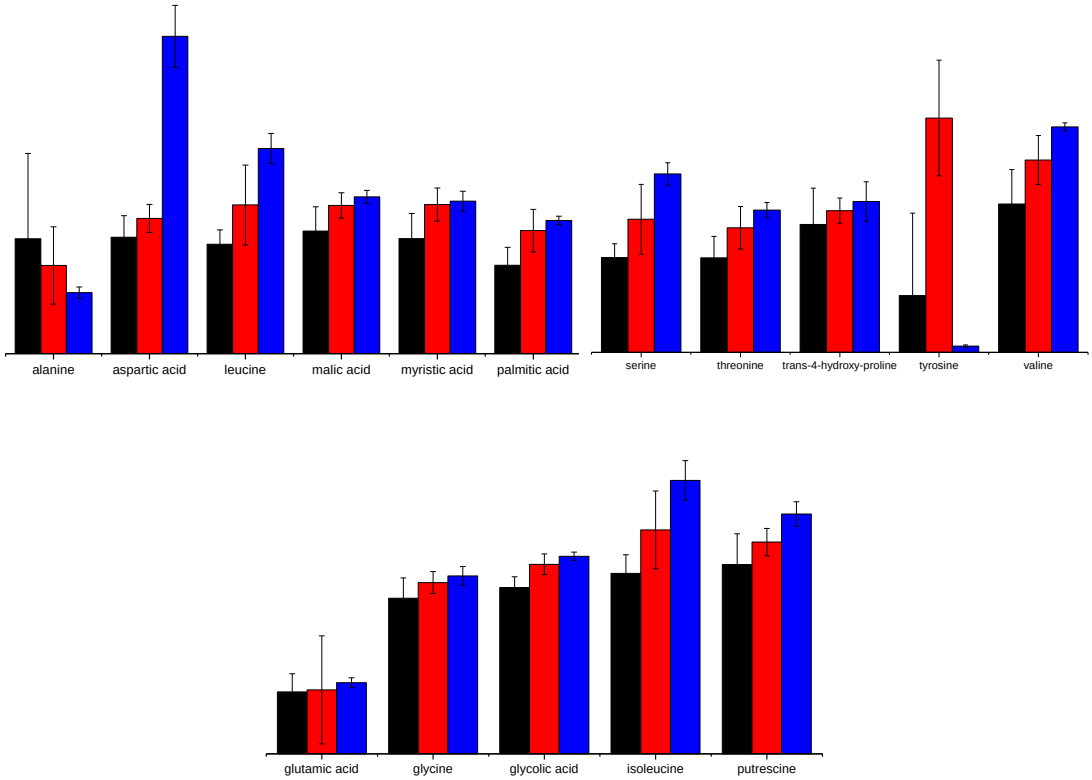


Figura 4.16. Média da intensidade e desvios-padrão de padrões analíticos detectados por GC-MS para nova avaliação da reação de oximação. Condição 1 (preto): temperatura ambiente por 120 min, condição 2 (vermelho): 40 ºC por 120 min e condição 3 (azul): temperatura ambiente por 90 min. Subsequente sililação realizada com 10 µL de BSTFA + 1% TMCS por 30 min à 40 ºC.

Assim, avaliando-se a derivatização de padrões analíticos para eliminar erros de variabilidade entre as amostras, ficou estabelecido o seguinte protocolo de derivatização para metabolômica por GC-MS: oximação com 10 µL de O-metoxiamina em piridina (15 mg x mL^{-1}) reagindo por 90 min à temperatura ambiente, seguido de sililação com 10 µL de BSTFA + 1% TMCS por 30 min à 40 ºC.

Estas condições foram aplicadas à promastigotas de *L. infantum* e demonstraram excelentes resultados, com isso além de se obter uma condição de reação que funciona bem, especialmente em termos de repetibilidade entre medidas e obtenção de importantes metabólitos relacionados a rotas de *Leishmania*, reduziu-se ainda mais o tempo derivatização para 2 horas, aumentando a frequência analítica. A Figura 4.17 apresenta um cromatograma típico de amostra controle de *L. infantum* analisado sob as condições otimizadas

de extração e derivatização por GC-MS, com destaque nas classes de metabólitos que são separadas e identificadas.

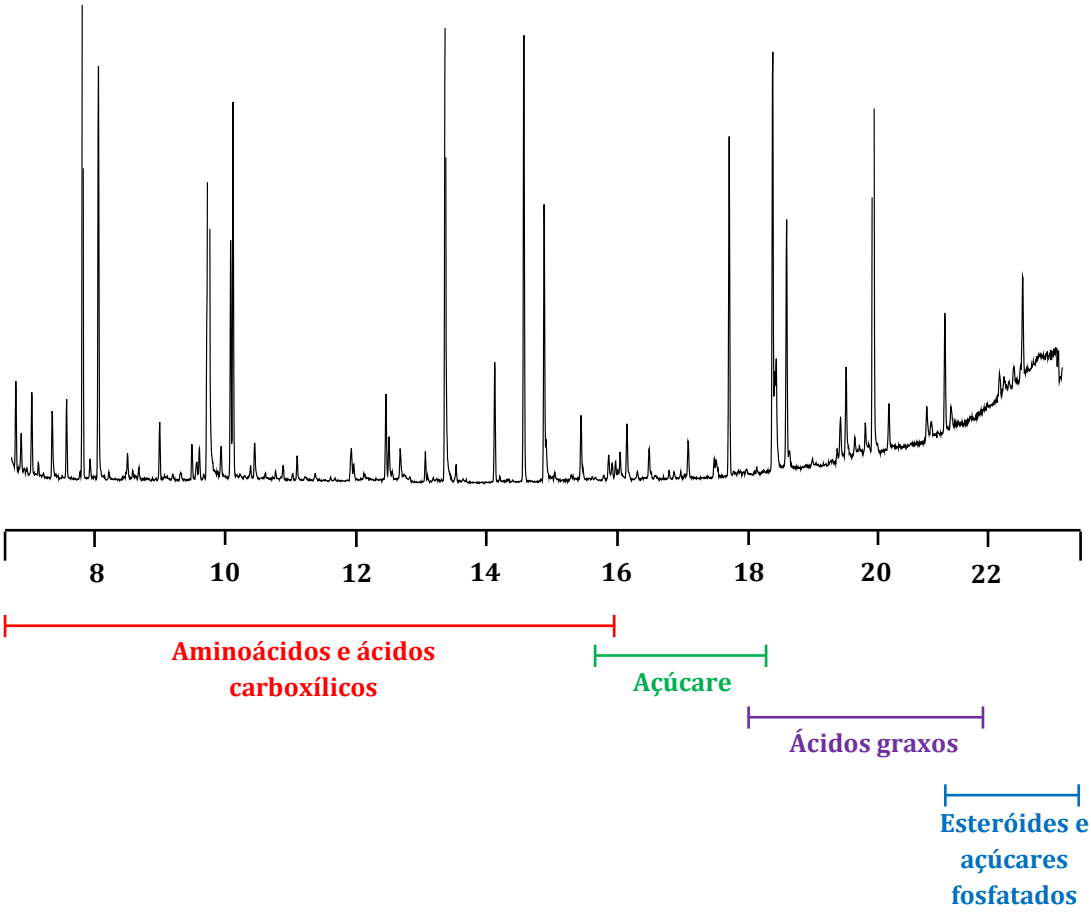


Figura 4.17. Cromatograma típico de amostra controle de *L. infantum* sob as condições otimizadas de extração e derivatização.

Para fins de representação, a Figura 4.18 ilustra um esquema dos procedimentos experimentais otimizados neste trabalho para análise de *L. infantum* por abordagem metabolômica *untarget*, desde o crescimento celular, até a extração e derivatização para GC-MS, bem como a parte de extração e análise do sobrenadante por RPLC-MS.

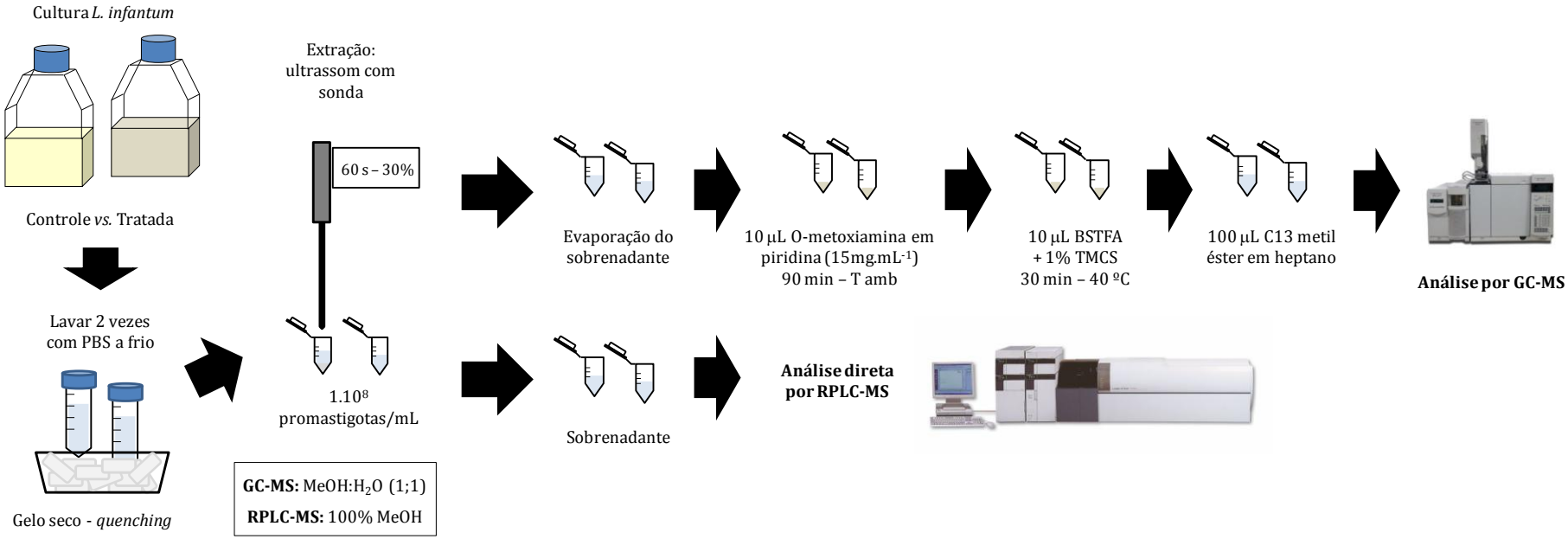


Figura 4.18. Esquema ilustrativo de obtenção e preparo de amostras de *L. infantum* par análise metabolômica por diferentes plataformas analíticas.

4.4. Análise Metabolômica do Tratamento de *L. infantum* com o Produto Natural Metildihidrodieugenol B

Plantas possuem uma grande quantidade de metabólitos secundários que apresentam atividade farmacológica bastante variável. Dentre os compostos bioativos podem ser citados alcaloides, flavonoides, lactonas, terpenoides, taninos, etc. Muitos destes, tem apresentado atividade anti-*Leishmania.* A busca por novas alternativas ao tratamento pode permitir a descoberta de substâncias adequadas para o controle da doença[26], entretanto, o entendimento da ação dessas substâncias ativas a nível metabólico tem sido pouco explorada.

A atividade anti-*Leishmania* de derivados de fenilpropanoide é conhecida.Três dímeros foram testados em *L. donovani*[130] e *L. infantum*[112] e somente um apresentou atividade em ambas as espécies, o metildihidrodieugenol B (Figura 3.1).

Quando testado em *L. infantum*, o metildihidrodieugenol B apresentou atividade contra PRO e AMA e um índice de seletividade[f] acima de 10 e, portanto, foi escolhido aqui para ser estudado seu mecanismo de ação por uma abordagem metabolômica. A substância foi utilizada na concentração de sua IC_{50} (58.18 μg x mL^{-1}), com o objetivo de alterar a atividade celular e, consequentemente, o metabolismo, sem matar todos os parasitas. O preparo das células e tratamento foram realizados de acordo com os procedimentos otimizados neste trabalho.

Para melhor elucidação da ação do metildihidrodieugenol B em PRO de *L. infantum*, a metabolômica *untarget* foi aplicada utilizando GC-MS e RPLC-MS, a fim de cobrir a maior faixa possível de metabólitos, em termos de polaridade. Extratos preparados com MeOH:H_2O (1:1) para GC-MS e 100% MeOH para RPLC-MS foram utilizados na análise de quinze amostras com triplicata biológica em cada grupo (CTR - controles, células não tratadas e TRT - células tratadas com metildihidrodieugenol B). Amostras de controle de qualidade (QCs) foram preparadas a partir da mistura de volumes iguais de todas as amostras utilizadas no estudo, e estas foram analisadas durante toda a sequência analítica (no início, a cada 5 amostras e no fim), com a finalidade de avaliar o desempenho e estabilidade instrumental durante as medidas.

[f] Razão entre a concentração citotóxica e concentração inibitória (ambas com redução de 50%).

Os dados brutos gerados foram convertidos para análise pelo XCMS, e processados para obter a matriz de dados, para ser avaliada por ferramentas de análise uni e multivariada. Dados de GC-MS foram processados pelo método "*matched filter*" e de RPLC-MS pelo método "*centwave*", os parâmetros de detecção de picos, agrupamento e alinhamento utilizados no processamento foram criteriosamente otimizados, através da visualização da matriz gerada em termos de número de *molecular features*, número de *missing values* (zeros) e ainda, desvios padrão nos tempos de retenção durante o alinhamento. Os parâmetros avaliados durante otimização no XCMS para os dados de GC-MS foram: largura de pico (fwhm) de 2 a 6 (um a um), relação sinal/ruído (snthresh) 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 e 3.0, número máximo de picos por cromatograma de íon extraído (max) de 10 a 50 (em intervalos de dez em dez), agrupamento com correção de largura de banda (bw) 1, 2, 3, 5 e 10, largura de faixas sobrepostas de *m/z*'s (mzwid) 0.1, 0.25 e 0.5. Para os dados de RPLC-MS, os parâmetros otimizados foram: snthresh 2, 2.5 e 5, bw 2, 5 e 10, mzwid 0.01 e 0.05 e fração mínima de amostras necessárias em ao menos um grupo para ser considerada válida (minfrac) 0.25, 0.5 e 0.75. O preenchimento dos *missing values* pela função "*fillPeaks*" e normalização pela mediana e biomassa também foram aplicados aos dados antes de obter as matrizes de resultados. A Tabela 4.9 apresenta os parâmetros otimizados para ambos processamentos no XCMS.

Tabela 4.9. Parâmetros do XCMS utilizados no processamento de dados de GC-MS e RPLC-MS.

	GC-MS	**RPLC-MS**
Detecção de picos	fwhm = 4 snthresh = 1.5 max = 30	snthresh = 2 peak width = (3,30)
Agrupamento	bw = 2 mzwid = 0.25 minfrac = 0.50	bw = 2 mzwid = 0.025 minfrac = 0.25
Alinhamento	Default retcor (span = 0.5)	Default retcor "obiwarp"

Para os parâmetros do XCMS não destacados foram utilizados o *default* do software.

A matriz de dados normalizada pela mediana foi também normalizada manualmente em Excel 2007 (Microsoft Office) pela biomassa (massa de pellet de cada amostra); a normalização dos QCs se deu pelo valor médio das biomassas. Adicionalmente, os dados de GC-MS foram também normalizados pelos valores correspondentes ao *m/z* 74, característico do padrão interno (C13 metil éster) utilizado.

Estes dados foram levados ao software SIMCA-P+ 12.0.1 (Umetrics) para avaliação multivariada. Primeiramente, uma análise multivariada não-supervisionada PCA, dos QCs e amostras, foi realizada para avaliação da qualidade dos dados. É possível observar nos plots da Figura 4.19 que as amostras controle (CTR) e tratadas (TRT) apresentam-se completamente separadas em dois grupos com duas componentes, para as duas técnicas analíticas, evidenciando que o metildihidrodieugenol B afeta o metabolismo do parasita. Os QCs encontram-se próximos uns aos outros no centro do plot, indicando que não houve problema instrumental durante a análise dessas amostras. A análise das amostras QC é justamente realizada no início, no fim e entre as amostras em estudo, durante a sequência analítica, para monitorar a performance do método empregado e estabilidade instrumental durante aquisição de dados[131]

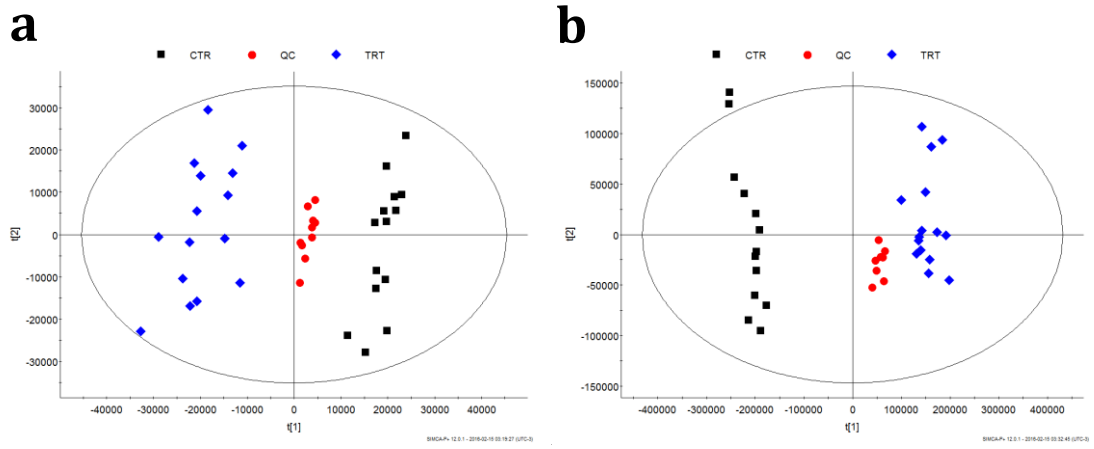


Figura 4.19. *Scores plot* dos modelos PCA para amostras de *L. infantum* tratadas com metildihidrodieugenol B, analisadas por **a)** GC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.913 e Q^2 = 0.804, e **b)** RPLC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.540 e Q^2 = 0.459. ● QC, amostras controle de qualidade; ■ CTR, amostras controle (não tratadas) e ♦ TRT, amostras tratadas com metildihidrodieugenol B.

A distância euclidiana entre os pontos dentro do mesmo grupo reflete o grau de variação de perfil metabólico das amostras[74], no caso como foram realizadas réplicas biológicas, maior dispersão entre as amostras é esperada no plot, como pode ser observada na dispersão vertical entre os grupos CTR e TRT da Figura 4.19. Sendo uma análise não supervisionada, os modelos apresentam-se muito bons em termos de separação dos grupos estudados e parâmetros de qualidade, com variação explicada pelo modelo (ajuste do modelo), $R^2 > 0.91$ (GC-MS) e $R^2 > 0.5$ (RPLC-MS), e previsibilidade do modelo, $Q^2 > 0.8$ (GC-MS) e $Q^2 > 0.45$ (RPLC-MS) são considerados adequados.

Modelos de PLS-DA, análise supervisionada, com predição de QCs, nos quais o modelo é construído apenas com as informações dos grupos de amostra e os QCs são subsequentemente previstos neste modelo, também foram avaliados para confirmar a qualidade dos dados, apresentando 96% de capacidade de previsão (Q^2) para os dados de GC-MS e 98% para os de RPLC-MS, a Figura 4.20 apresenta tais modelos.

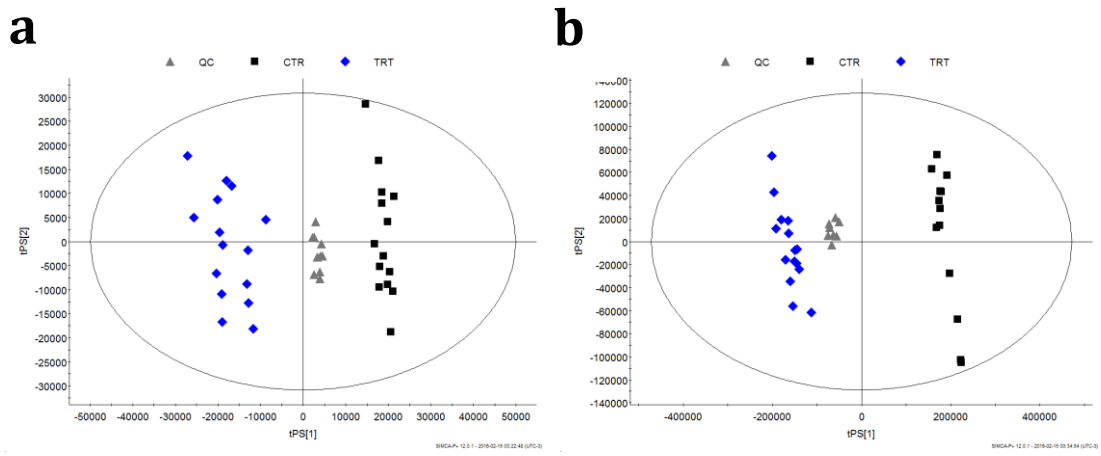


Figura 4.20. *Scores plot* dos modelos PLS-DA com predição de QCs para amostras de *L. infantum* tratadas com metildihidrodieugenol B, analisadas por **a)** GC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.968 e Q^2 = 0.958, ANOVA: F = 148.7 e *p*-valor = 1.46×10^{-16}, e **b)** RPLC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.995 e Q^2 = 0.987, ANOVA: F = 453.8 e *p*-valor = 1.62×10^{-21}. ▲QC, amostras controle de qualidade previstas; ■ CTR, amostras controle (não tratadas) e ♦ TRT, amostras tratadas com metildihidrodieugenol B.

Verificada a qualidade dos dados obtidos, somente as amostras foram reprocessadas com os mesmos parâmetros utilizados anteriormente no XCMS, seguidos dos métodos de normalização já empregados e, novamente, a matriz de dados foi submetida à análise multivariada, para busca dos metabólitos discriminantes entre os grupos. Um novo modelo de PLS-DA foi construído e validado (validação cruzada) por testes de permutações, para verificar se as diferenças entre classificação das amostras no modelo são significativas. Neste teste, a classificação das amostras é intencionalmente forçada ao erro e alteradas em cada modelo permutado. A discriminação entre as classes é baseada na classificação permutada e comparada à classificação do modelo original[132]. Sendo assim, são aceitáveis modelos com valores de R^2 e Q^2 menores do que o construído originalmente com todos os dados. Para ambos os modelos de GC-MS e RPLC-MS, 100 permutações foram realizadas, e os resultados foram os esperados: as permutações apresentaram qualidade inferiores (Figura 4.21), comprovando a confiabilidade nos modelos obtidos com estes dados.

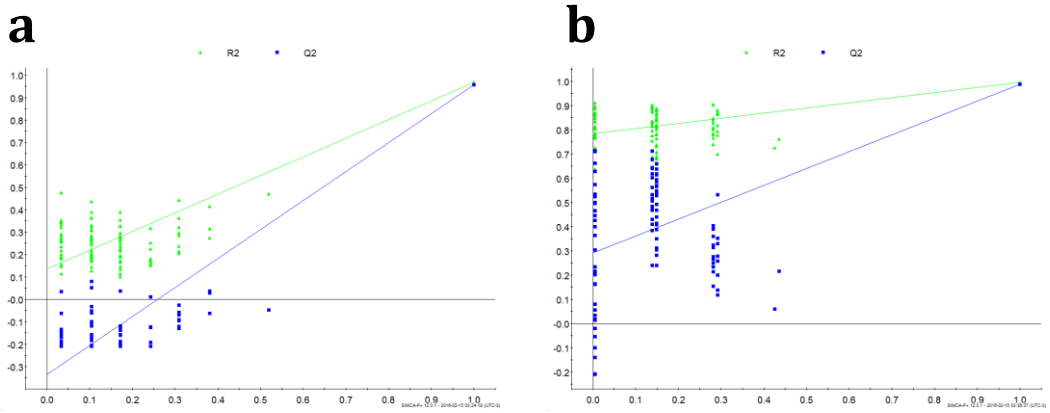


Figura 4.21. Testes de 100 permutações do modelo PLS-DA da análise metabolômica por **a)** GC-MS e **b)** RPLC-MS, referente ao estudo do mecanismo de ação do metildihidrodieugenol B em *L. infantum*.

Para busca de metabólitos discriminantes entre os grupos, uma análise por OPLS-DA, e seus respectivos modelos S-plot foi realizada. O S-plot auxilia na identificação de *molecular features* potencialmente significantes no sistema, baseado nas contribuições do modelo (correlação) e sua confiança

(covariância)[74]. Neste trabalho, o S-plot não foi utilizado como parâmetro para seleção dos discriminantes, uma vez que apresentou poucas entidades com correlação e covariância acima de 0.8. A Figura 4.22 apresenta os modelos de OPLS-DA obtidos para GC-MS e RPLC-MS, nos quais são observadas excelentes separações entre as amostras, com bom ajuste do modelo (R^2) e boa capacidade de predição (Q^2), ambos acima de 90%. A análise de variância (ANOVA) mostrou alta significância estatística para ambos os modelos, com altos valores de coeficiente de Fisher (F) e baixíssimos *p*-valores (F = 128.21 e *p*-valor = $2.27x10^{-15}$ para GC-MS e F = 453.8 e *p*-valor = $1.62x10^{-21}$ para RPLC-MS).

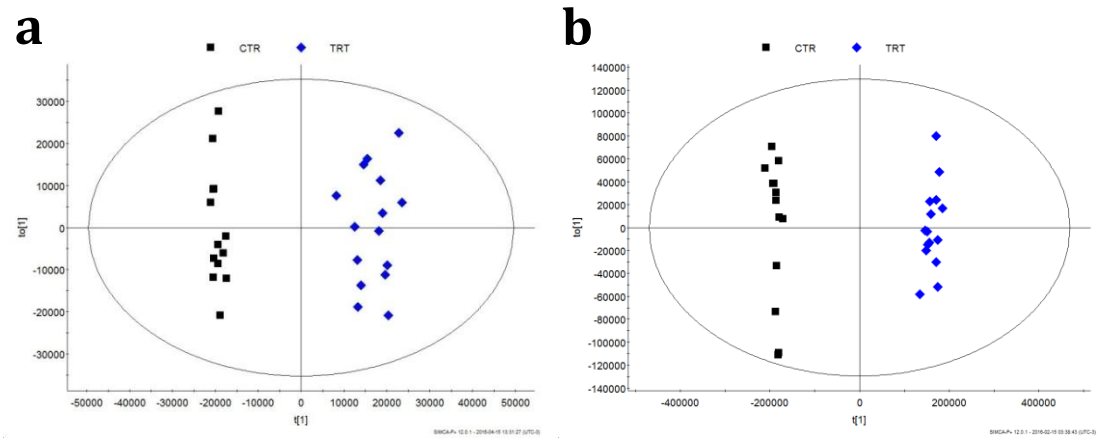


Figura 4.22. *Scores plot* dos modelos OPLS-DA para amostras de *L. infantum* tratadas com metildihidrodieugenol B, analisadas por **a)** GC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.971 e Q^2 = 0.957, ANOVA: F = 128.2 e *p*-valor = $2.27x10^{-15}$, e **b)** RPLC-MS, parâmetros de qualidade do modelo: R^2 = 0.995 e Q^2 = 0.988, ANOVA: F = 453.8 e *p*-valor = $1.62x10^{-21}$. ■ CTR, amostras controle (não tratadas) e ♦ TRT, amostras tratadas com metildihidrodieugenol B.

Uma vez que o S-plot não indicou metabólitos candidatos em número suficiente, os metabólitos discriminantes foram selecionados através dos valores de VIP *score* (VIP > 1.0), obtidos dos modelos de PLS-DA. O VIP *score* indica a importância de cada variável dentro do modelo projetado em um PLS-DA. Estes resultados foram associados a análise estatística univariada por teste Mann-Whitney U. Testes paramétricos, como teste t de Student (comparação entre dois grupos) e ANOVA (comparação entre três ou mais grupos) são comumente utilizados na análise univariada, quando se tem uma distribuição normal dos dados, entretanto, em trabalhos de metabolômica não se verifica uma distribuição normal, especialmente quando se trabalha com *n* baixo, sendo

portanto, aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney U, que é utilizado quando se tem número pequeno de amostras por grupo (n < 20).

A identificação dos metabólitos estatisticamente significativos por GC-MS foi realizada no software AMDIS (versão 2.71), utilizando bibliotecas de espectros comerciais (Fiehn[113] e NIST), através da análise do índice de retenção, que compara o espectro alvo da biblioteca com o pico na amostra, avaliando a similaridade entre eles, seguida de análise por tempo de retenção; além da similaridade espectral, a igualdade do tempo de retenção do pico no cromatograma da amostra e o equivalente na biblioteca permite confirmar a identificação da substância com um maior grau de confiabilidade; este tempo é corrigido de acordo com os resultados experimentais[133]. A caracterização da identificação e sua correlação com o *molecular feature* estatisticamente significativo se faz, portanto, de acordo com a relação *m/z* do fragmento de maior intensidade do espectro de massas do metabólito e o seu tempo de retenção. Nestas análises foram identificados 34 metabólitos nas amostras estudadas, e 20 estavam presentes nos *molecular features* estatisticamente significativos. Na avaliação por RPLC-MS, foram obtidas 720 relações *m/z*'s com significância estatística; que foram levadas a bases de dados públicas (HMDB, KEGG e Metlin) para busca dos possíveis metabólitos correspondentes; nas buscas, foram considerados $[M+H]^+$, $[2M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ como possíveis adutos, e um erro de massa máximo de 5 ppm foi estabelecido. A seleção dos metabólitos putativamente identificados se deu por avaliação da estrutura química do metabólito (sua concordância com a técnica de separação empregada), e possível correlação com rotas de *Leishmania*, totalizando 28 metabólitos putativamente identificados com significância estatística.

Nenhum metabólito em comum foi identificado por ambas as técnicas de análise, demonstrando a complementaridade da informação obtida e enfatizando a importância de se trabalhar com mais de uma técnica e alcançar uma cobertura mais ampla do metaboloma. A Tabela 4.10 apresenta a descrição de todos os metabólitos estatisticamente significativos identificados neste estudo e *fold change*, calculado pela razão entre a média de intensidade do metabólito nas amostras TRT e CTR, valores positivos indicam um aumento do metabólito nas amostras TRT frente às CTR e valores negativos indicam diminuição.

Tabela 4.10. Metabólitos significativos (*p*-valor < 0.05) e suas características obtidos na avaliação metabolômica *untarget* por GC-MS e RPLC-MS do mecanismo de ação do metildihidrodieugenol B em promastigostas de *L. infantum*.

Metabólito	Massa (Da)	Fórmula Molecular	*Fold Change* TRT *vs.* CTR	*p*-valor	Técnica Analítica	Classificação
Putrescine	88.1000	$C_4H_{12}N_2$	+ 1.35	< 0.01	GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues
Alanine	89.0477	$C_3H_7NO_2$	- 0.32	< 0.01	GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues
Cadaverine	102.1157	$C_5H_{14}N_2$	- 0.80	< 0.05	GC-MS	Amines and polyamines
Aminobutyric acid	103.0633	$C_4H_9NO_2$	- 0.53	< 0.05	GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues
Fumaric acid	116.0110	$C_4H_4O_4$	- 0.23	< 0.01	GC-MS	Carboxylic acids and derivatives
Valine	117.0790	$C_5H_{11}NO_2$	- 0.35	< 0.01	GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues
Methylmalonic acid	118.0266	$C_4H_6O_4$	- 0.25	< 0.01	GC-MS	Carboxylic acids and derivatives
trans-4-Hydroxy-L-proline	131.0582	$C_5H_9NO_3$	- 0.20	< 0.01	GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues
Malic acid	134.0215	$C_4H_6O_5$	- 0.31	< 0.01	GC-MS	Carboxylic acids and derivatives
Ribose / Arabinose / Ribulose / Xylose / Lyxose / Xylulose* *(keto and aldopentoses)*	150.0528	$C_5H_{10}O_5$	- 0.69	< 0.05	GC-MS	Carbohydrates and conjugates
Ribitol / Arabitol / Xylitol* (pentoses alcohol)	152.0685	$C_5H_{12}O_5$	+ 1.19	< 0.01	GC-MS	Carbohydrates and conjugates
S-Methylmethionine	164.0745	$C_6H_{14}NO_2S$	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Amino acids, peptides, and analogues
Phenylalanine	165.0790	$C_9H_{11}NO_2$	- 0.62	< 0.05	GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues
3-Phenyllactic acid	166.0630	$C_9H_{10}O_3$	- 0.15	< 0.05	GC-MS	Phenylpropanoids and polyketides

8-Methyl-nonenoic acid	170.1306	$C_{10}H_{18}O_2$	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Fatty acids and conjugates
Glycerol 3-phosphate	172.0137	$C_3H_9O_6P$	+ 0.39	< 0.05	GC-MS	Glycerophospholipids, glycerophospholipids and derivatives
myo-Inositol	180.0634	$C_6H_{12}O_6$	- 0.16	< 0.01	GC-MS	Alcohols and polyols
6-Hydroxymelatonin	248.1160	$C_{13}H_{16}N_2O_3$	+∞	< 0.05	RPLC-MS	Amines and polyamines
Glucose 6-phosphate	260.0297	$C_6H_{13}O_9P$	- 0.44	< 0.05	GC-MS	Carbohydrates and conjugates
S-Hydroxyphenylacetothiohydroximoyl-L-cysteine	270.0674	$C_{11}H_{14}N_2O_4S$	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Amino acids, peptides, and analogues
α-Linolenic acid (C18:3)	278.2246	$C_{18}H_{30}O_2$	- 0.37	< 0.01	GC-MS	Fatty acids and conjugates
Linoleic acid (C18:2)	280.2402	$C_{18}H_{32}O_2$	- 0.41	< 0.01	GC-MS	Fatty acids and conjugates
8-Isoprostane	280.3130	$C_{20}H_{40}$	- 0.84	< 0.05	RPLC-MS	Alkanes and derivatives
Oleic acid (C18:1)	282.2559	$C_{18}H_{34}O_2$	- 0.72	< 0.01	GC-MS	Fatty acids and conjugates
C17 Sphinganine	301.2980	$C_{17}H_{37}NO_2$	- 0.64	< 0.05	RPLC-MS	Shingolipids, phosphoshingolipids and derivatives
Eicosadienoic acid (C20:2)	308.2715	$C_{20}H_{36}O_2$	- 0.22	< 0.01	GC-MS	Fatty acids and conjugates
7-Hydroxy-6-methyl-8-ribityl lumazine	328.1018	$C_{12}H_{16}N_4O_7$	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Carbohydrates and conjugates
13-Docosenoic acid (C22:1)	338.3184	$C_{22}H_{42}O_2$	- 0.72	< 0.05	RPLC-MS	Fatty acids and conjugates
Fructose 1,6-diphosphate	339.9960	$C_6H_{14}O_{12}P_2$	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Carbohydrates and conjugates
3-Ketosucrose	340.1006	C12H20O11	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Carbohydrates and conjugates
Stearoylglycine	341.2929**	$C_{20}H_{39}NO_3$	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Fatty acids and conjugates
Ceramide						Shingolipids, phosphoshingolipids and derivatives

Epimelibiose / Galactinol / Isomaltose / Trehalose / Melibiose / Maltose / Lactose / Sucrose* *(disaccharides)*	342.1162	$C_{12}H_{22}O_{11}$	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Carbohydrates and conjugates
Tetracosahexaenoic acid (C24:6)	356.2715	$C_{24}H_{36}O_2$	- 0.86	< 0.05	RPLC-MS	Fatty acids and conjugates
11-Dehydro-thromboxane B2 / 6-Ketoprostaglandin E1 / Prostaglandin G2	368.2198	$C_{20}H_{32}O_6$	+ 0.05	< 0.01	RPLC-MS	Fatty acids and conjugates
S-Adenosylhomocysteine	384.1215	$C_{14}H_{20}N_6O_5S$	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Amino acids, peptides, and analogues
Lysophosphatidylcholine - LysoPC(14:1)	465.2855	$C_{22}H_{44}NO_7P$	+ 34.09	< 0.01	RPLC-MS	Glycerophospholipids, glycerophospholipids and derivatives
D-Erythro-sphingosylphosphorylcholine	465.3457	$C_{23}H_{50}N_2O_5P$	+ 77.88	< 0.01	RPLC-MS	Shingolipids, phosphoshingolipids and derivatives
Lysophosphatidylcholine - LysoPC(18:3)	517.3168	$C_{26}H_{48}NO_7P$	- 0.51	< 0.01	RPLC-MS	Glycerophospholipids, glycerophospholipids and derivatives
Lysophosphatidylcholine - LysoPC(20:3)	545.3481	$C_{28}H_{52}NO_7P$	- 0.45	< 0.01	RPLC-MS	Glycerophospholipids, glycerophospholipids and derivatives
3-Hexaprenyl-4-hydroxybenzoate / 2-Hexaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone	546.4072	$C_{37}H_{54}O_3$	- 0.44	< 0.01	RPLC-MS	Prenol lipids
2-Hexaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol	548.4229	$C_{37}H_{56}O_3$	- 0.49	< 0.01	RPLC-MS	Prenol lipids
Lysophosphatidylcholine - LysoPC(20:1)	549.3794	$C_{28}H_{56}NO_7P$	- 0.90	< 0.01	RPLC-MS	Glycerophospholipids, glycerophospholipids and derivatives
Deoxycholic acid 3-glucuronide	549.3247	$C_{30}H_{48}O_{10}$	- 0.42	< 0.01	RPLC-MS	Steroids and derivatives
Cholesterol 1-octadecanoic acid	652.6158	$C_{45}H_{80}O_2$	- 0.56	< 0.05	RPLC-MS	Steroids and derivatives
Cholesterol ester (20:1)	678.6314	$C_{47}H_{82}O_2$	- 0.59	< 0.05	RPLC-MS	Steroids and derivatives

Triacylglycerol - TAG(12:0/12:0/20:5)	740.5955	$C_{47}H_{80}O_6$	+∞	< 0.01	RPLC-MS	Glycerophospholipids, glycerophospholipids and derivatives
Shingomyelin - SM(d18:0/22:3)	780.6145	$C_{45}H_{85}N_2O_6P$	- 0.79	< 0.05	RPLC-MS	Shingolipids, phosphoshingolipids and derivatives
Shingomyelin - SM(d18:1/22:1)	784.6458	$C_{45}H_{89}N_2O_6P$	+ 11.5	< 0.01	RPLC-MS	Shingolipids, phosphoshingolipids and derivatives

+∞ significa grandemente aumentado em amostras TRT ou não detectado em amostras CTR.
* compostos indistinguíveis pela técnica analítica empregada. ** massas com mais de uma identificação possível com diferentes classificações química.

É possível observar na Tabela 4.10 que das classes de metabólitos identificadas, quatro podem ser destacadas: aminoácidos, peptídeos e derivados (17%), ácidos graxos e conjugados (17%), carboidratos e conjugados (13%) e glicerolipídios, glicerofosfolipídios e derivados (13%). Devido a grande variedade dos metabólitos alterados com o tratamento do metildihidrodieugenol B em *L. infantum* é possível evidenciar a existência de uma ação multi-*target*, na qual diversas rotas foram afetadas. A Figura 4.23 apresenta um esquema das vias da glicólise e gluconeogênese, na qual estão destacados os metabólitos alterados (laranja - aumentados e verde - diminuídos), com sua indicação do *fold change* (gráficos de barras).

As fontes de carbono e energia foram comprometidas com o tratamento, uma vez que metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), da glicólise, da rota das pentoses fosfato, além do metabolismo de aminoácidos foram reduzidos, como por exemplo, ácido málico (malato), ácido fumárico (fumarato), glicose 6-fosfato, alanina, valina, etc. Todas essas vias estão envolvidas na sobrevivência do parasita. Açúcares são os maiores geradores de energia para a *Leishmania* e são precursores biossintéticos essenciais. Na ausência desses metabólitos, o parasita utiliza aminoácidos como fontes de carbono alternativas[134], sendo esta uma possível explicação para a diminuição destes metabólitos.

A diminuição da *trans*-4-hydroxi-L-prolina, um intermediário da via da biossíntese de prolina e glutamato, reforça perda das fontes de energia com o tratamento, assim como reduções nos teores de alanina e prolina. Uma forte redução dos açúcares, ácidos graxos insaturados e compostos do metabolismo de lipídios (Tabela 4.10), também indicam um comprometimento de vias metabólicas fundamentais para a sobrevivência do parasita. Essa afirmação é sustentada pelo aumento de pentose álcoois (ribitol/arabitol/xilitol), frutose 1,6-bifosfato, glicerol 3-fosfato e putrescina.

A frutose 1,6-bifosfato é um intermediário da glicólise e da gluconeogênese, que são responsáveis pela degradação e síntese *de novo* de açúcares, respectivamente. Uma vez que este metabólito está acumulado, provavelmente aldolase (enzima comum a ambas as vias) e frutose bifosfatase (enzima presente na gluconeogênese) estejam perturbadas com a ação do metildihidrodieugenol B (Figura 4.23). O glicerol-3-fosfato pode ser acumulado:

i) após a conversão de glicerol (na via de gluconeogênese) por meio da glicerol quinase[135,136] ou ii) por acúmulo através de síntese anormal de triacilglicerol. A segunda possibilidade é menos provável, uma vez que o triacilglicerol está acumulado nos parasitas tratados (Tabela 4.9) e, em condições normais, os PRO de *Leishmania* não utilizam ácidos graxos e derivados como fonte de energia[84]. Ocorre acúmulo de polióis (ribitol/arabitol/xilitol), produtos de degradação da ribulose 5-fosfato, que estão associados a distúrbios do metabolismo de açúcares em mamíferos[137-140], como consequência a inibição de ribose-5-fosfato isomerase ou transaldolase, afeta a interconversão de açúcares na via das pentoses fosfato (Figura 4.23).

Igualmente, o metabolismo de lipídios e esteróis são alterados com o tratamento. Parasitas de *Leishmania* são capazes de eliminar e sintetizar ácidos graxos e lipídios. No entanto, *myo*-inositol e ácidos graxos insaturados (como ácido eicosadienoico, ácido linoleico e ácido oleico) estão diminuídos com o tratamento, por outro lado, LysoPC(14:1) e SM(18:1 e 22:1) estão aumentados. Demais fosfolipídios também aparecem diminuídos (Tabela 4.10). O *myo*-inositol tem um papel importante na virulência e sobrevida do parasita, uma vez que faz parte da fração lipídica e conecta os principiais componentes da membrana plasmática com a bicamada fosfolipídica[92]. A diminuição do teor de ácidos graxos insaturados ocorreu provavelmente pela inibição das rotas de elongases e desnaturases do retículo endoplasmático[84,141,142]. Pelos dados obtidos, pode-se sugerir que a composição da membrana plasmática foi alterada, bem como sua flexibilidade e fluidez, além de vias de sinalização dependentes de fosfatidilinositol e síntese *de novo* de glicosilfosfatidilinositol, âncora de importantes proteínas na membrana plasmática.

Adicionalmente ao metabolismo de açúcares e lipídios, a síntese de poliaminas também é afetada. As poliaminas são importantes para a proliferação dos parasitas no interior das células hospedeiras, afetando o curso da infecção e são, portanto, importantes para a sobrevivência do parasita. O acúmulo de putrescina indica que a enzima espermidina sintase, que converte putrescina em espermidina, provavelmente foi inibida, uma vez que nenhum aumento de espermedina foi detectado. Esse metabólito é importante porque é o principal na síntese de tripanotiona, que é um metabólito chave na manutenção do potencial

redox da célula[95], sua inibição leva à proteção do parasita contra o estresse oxidativo/nitrosativo[143,144]. Cabe mencionar que, a não detecção da espermidina pode ser um problema simplesmente analítico, de falta de detecção deste metabólito pelos métodos empregados neste trabalho, o que enfatiza a importância do uso de mais de uma plataforma analítica. Outra possibilidade para o aumacúmulo de putrescina seria um resultado da diminuição de seus metabólitos precursores como: cadaverina, ácidos fumárico e málico, além de metabólitos da via da glicólise.

Em suma, definir uma única rota de atuação do metildihidrodieugenol B em *L. infantum* não é uma tarefa fácil. O metabolismo do parasita é bastante complexo e os resultados obtidos nesta avaliação *untarget* apontaram diversos mecanismos de ação. A diminuição da grande maioria dos metabólitos detectados (Tabela 4.10) indica que a substância ativa age fortemente contra o parasita, especialmente por afetar importantes fontes de energia, além de mudanças na composição da membrana plasmática. A habilidade do parasita em alterar a composição lipídica de sua própria membrana pode ser levada em consideração quando novas formulações farmacêuticas para seu tratamento forem desenvolvidas[101]. Os resultados aqui apresentados são preliminares e por enquanto especulativos e, portanto, estudos complementares (*in vitro* e *in vivo*) se fazem necessários. Ainda assim, estes resultados são um grande passo no desenvolvimento de uma nova linha de terapia alternativa para VL.

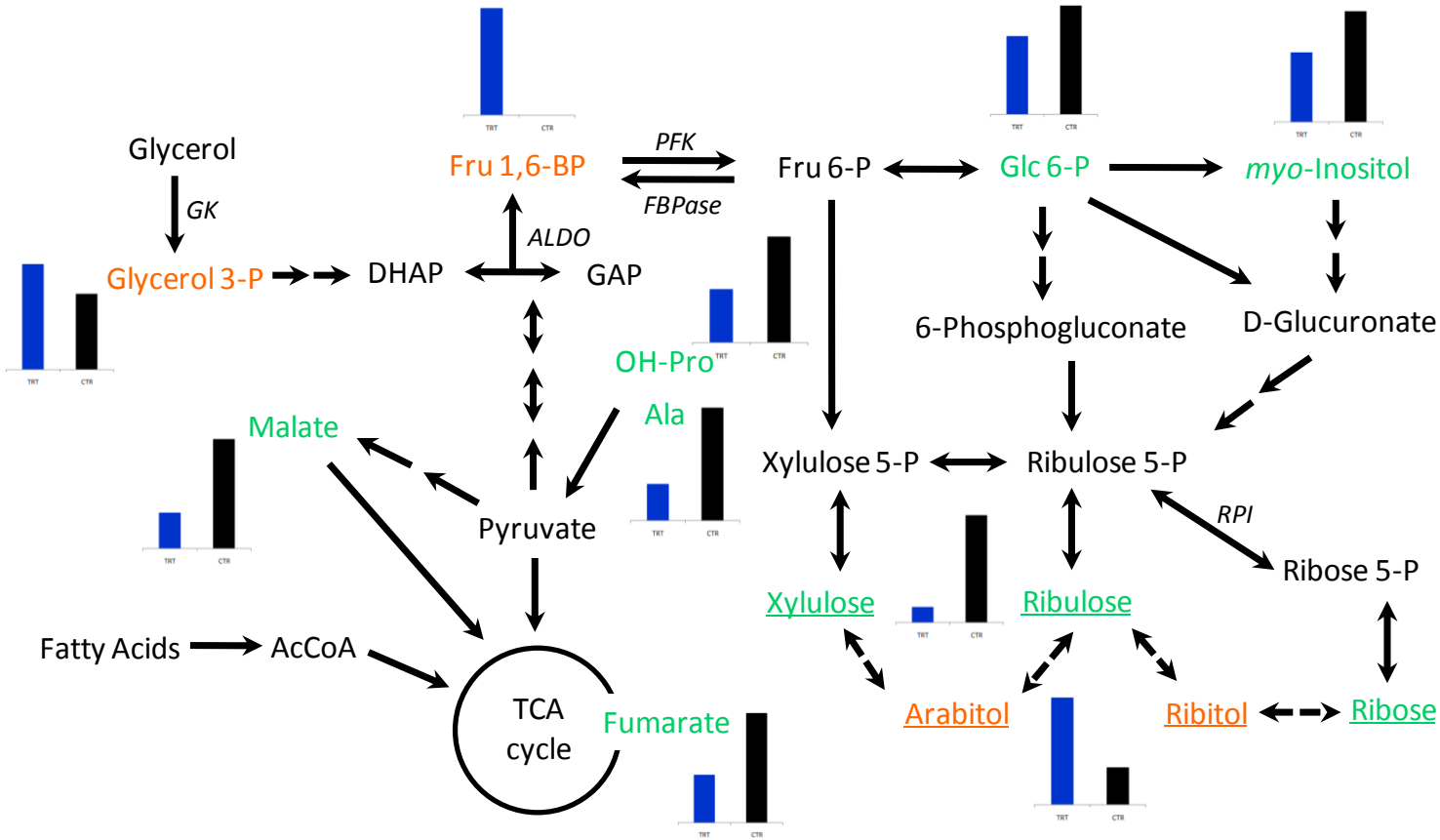


Figura 4.23. Representação esquemática da via da glicólise e gluconeogênese. Metabólitos destacados em laranja e verde estão aumentados e diminuídos, respectivamente, em *L. infantum* tratadas com metildihidrodieugenol B. Enzimas destacadas: (*ALDO*) fructose-bisphosphate aldolase, (*FBPase*) fructose 1,6-biphosphatase, (*GK*) glycerol 3-kinase, (*PKFK*) phosphofructokinase, (*RPI*) ribose 5-phosphate isomerase. Abreviações: Fru - fructose, P - phosphate, AcCoA - acetyl coenzime A, OH-Pro - hydroxyproline, Ala - alanine, DHAP - dihydroxyacetone phosphate, GAP - glyceraldehyde 3-phosphate, and TCA cycle - tricarboxylic acid cycle. Xylulose/ribulose/ribose e ribitol/arabitol são açúcares indistinguíveis pela técnica de análise (GC-MS).

Capítulo 5

Conclusões

5. CONCLUSÕES

A abordagem metabolômica, especialmente com multiplataformas de análise, é uma ferramenta poderosa e muito importante na elucidação das rotas metabólicas, que sofreram alterações provocadas, por exemplo, por intervenção farmacêutica ou substância ativa. Cuidados com coleta e obtenção das amostras, extração dos metabólitos, escolha e otimização de uma metodologia de análise que cumpra com os quesitos necessário para análise global (*untarget*), ou análise alvo (*target*) e, ainda, um processamento criterioso dos dados gerados são de extrema importância. Neste trabalho, o de preparo das células, desde crescimento, tratamento e remoção de constituintes extracelulares, bem como a extração de metabólitos para análise por RPLC-MS e extração e derivatização para análise por GC-MS foram estudados e otimizados de forma sistemática. As melhores condições foram utilizadas na avaliação do mecanismo de ação de um composto ativo em *Leishmania*, isolado de planta (metildihidrodieugenol B). A avaliação metabolômica do tratamento com esta substância foi realizada por GC-MS e RPLC-MS, os dados foram processados em software de livre acesso, com avaliação dos parâmetros de processamento, com a finalidade de obter a melhor matriz de dados. Relações *m/z* discriminantes entre grupos tratados e não tratados foram identificadas em bases de dados públicas e por bibliotecas de espectros de MS. Os resultados obtidos na diferenciação do tratamento do metildihidrodieugenol B em *L. infantum* apontaram um mecanismo multi-*target*, com redução de açúcares, aminoácidos e intermediários de metabolismo de lipídeos. Fontes de energia e carbono se mostraram bastante comprometidas e foi possível observar ainda, que a substância age fortemente sobre a membrana celular. Os resultados aqui apresentados, apesar de terem sido obtidos na forma promastigota e, portanto, não infectante, são preliminares e, inicialmente especulativos. Entretanto, podem contribuir fortemente para a elucidação da ação desta substância nos parasitas, para futuramente ser aplicado no *design* de novas formulações para tratamento da leishmaniose.

Capítulo 6

Perspectivas

6. PERSPECTIVAS

Para continuidade deste projeto seria possível aplicar os estudos de metabolômica *untarget* do metildihidrodieugenol B em outras plataformas analíticas, como CE-MS e HILIC-MS, a fim de obter informação complementar a apresentada sobre as alterações provocadas pelo tratamento.

Análises *target* dos metabólitos significativos também seria interessante para uma avaliação mais rigorosa da magnitude da alteração. Além disso, o preparo de novas amostras e repetição dos experimentos de metabolômica seria uma ferramenta importante para validação biológica.

Como perspectivas finais (a longo prazo) e sinceros desejos, espera-se que esta substância, que apresentou grande potencial no tratamento desta doença, após todos os testes clínicos necessários, chegue até a população enferma. E que possa corresponder às expectativas de tratamento e cura daqueles que tanto precisam, que são tão negligenciados, quanto a doença de que padecem.

Capítulo 7

Referência Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]Leishmaniasis. http://www.who.int/leishmaniasis/en/ Acesso em Fevereiro de **2016**.

[2]Parasites - Leishmaniasis. http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/ Acesso em Fevereiro de **2016**.

[3]Parasites - Leishmaniasis. Biology. http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html Acesso em Fevereiro de **2016**.

[4]Desjeux, P., *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*., 27, **2004,** 305.

[5]Lainson, R., Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In. Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.). *The leishmaniasis in biology and medicine*. Londres: Academic Press, **1987**, v.1, Biology and Epidemiology. Academic Press Inc.: London, 1-120.

[6]Leishmaniasis. WHO - World Health Organization. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/ Acesso em Fevereiro de **2016**.

[7]Ferreira, W. A., Marynkb, W., Mares-Guiaa, M. L., Tavares, C. A. P., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 45, **2003**, 35.

[8]Singh, N., Kumar, M., Singh, R. K., *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 5, **2012**, 485.

[9]Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, **2007**, 182p.

[10]Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV. Brasília, **2004**, 72p.

[11]Savoia, D., *J. Infect. Dev. Ctries*., 9, **2015**, 588.

[12]Canuto, G. A. B., da Cruz, P. L. R., Faccio, A. T., Klassen, A., Tavares, M. F. M., *Electrophoresis*, 36, **2015**, 2336.

[13]Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P., *Adv. Parasitol.*, 61, **2006**, 223.

[14]Frízard, F., Schettini, D. A., Rocha, O. G. F., Demicheli, C. *Quím. Nova*, 28, **2005**, 511.

[15]Croft, S. L., Coombs, G. H., *TRENDS Parasitol*., 19, **2003,** 502.

[16]Fisher, C., Voss, A., Engel, J., *Med. Microbiol. Immunolog.*, 190, **2001,** 85.

[17]Rakotomanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P., Loiseau, P. M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, **2007**, 1425.

[18]Singh, N., *Indian J. Med. Res*., 123, **2006**, 411.

[19]Pécoul, B., *PLoS Med*., 1, **2004**, 1, e6.

[20]Lopes, M. A., Nass, L. L., Melo, I. S., *Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento*, 34, **2005**, 29.

[21]Cruz, L. J., Ramilo, C. A., Corpuz, G. P., Olivera, B. M., *Biol. Bull*., 183, **1992**, 159.

[22]Karalliedde, L., *BJA*, 74, **1995**, 319.

[23]Cudic, M., Bulet, P., Hoffmann, R., Craik, D. J., Otvos Jr, L., *Eur. J. Biochem*., 266, **1999**, 549.

[24]Daly, J. W., *J. Nat. Prod*., 67, **2004**, 1211.

[25]Tempone, A. G., Sartorelli, P., Teixeira, D., Prado, F. O., Calixto, I. A. R. L., Lorenzi, H., Melhem, M. S. C., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103, **2008**, 443.

[26]Rodrigues, I. A., Mazotto, A. M., Cardoso, V., Alves, R. L., Amaral, A. C. F., Silva, J. R. de A., Pinheiro, A. S., Vermelho, A. B., *Mediators Inflamm.*, **2015**, doi.org/10.1155/2015/835910.

[27]Rocha, L. G., Almeida, J. R. G. S., Macêdo, R. O., Barbosa-Filho, J. M., *Phytomed.*, 12, **2005**, 514.

[28]Polonio, T., Efferth, T., *Int. J. Mol. Med.*, 22, **2008**, 277.

[29]Kaddurah-Daouk, R., Kristal, B. S., Weinshilboum, R. M., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*., 48, **2008**, 653.

[30]Fiehn, O., *Plant Mol. Biol.*, 48, **2002**, 155.

[31]Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., Baganz, R., *Trends Biotechnol*., 16, **1998**, 373.

[32]Nicholson, J. K., Lindon, J. C., Holmes, E., *Xenobiotica*, 29, **1999**, 1181.

[33]Villas-Bôas, S., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J., Mass Spectrom. Rev., 24, **2005**, 613.

[34]Nicholson, J. K., Lindon, J. C., *Nature*, 455, **2008**, 1054.

[35]Capozzi, F., Bordoni, A., *Genes Nutr*., 8, **2013**, doi10.1007/s12263-012-0310-x.

[36]Dessi, A., Marincola, F. C., Masili, A., Gazzolo, D., Fanos, V., *BioMed Res. Int.*, **2014**, doi:10.1155/2014/981219.

[37]Zaitsu, K., Hayashi, Y., Kusano, M., Tsuchihashi, H., Ishii, A., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **2015**, doi: 10.1016/j.dmpk.2015.10.002.

[38]Sumner, L. W., Lei, Z., Nikolau, B. J., Saito, K., *Nat. Prod. Rep.*, 32, **2015**, 212.

[39]Álvarez-Sáchez, B., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M. D., *Trends Anal. Chem*., 29, **2010a**, 111.

[40]Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M. A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., Amegbey, G., Block, D., Hau, D. D., Wagner, J., Miniaci, J., Clements, M., Gebremedhin, M., Guo, N., Zhang, Y., Duggan, G. E., Macinnis, G. D., Weljie, A. M., Dowlatabadi, R., Bamforth, F., Clive, D., Greiner, R., Li, L., Marrie, T., Sykes, B. D., Vogel, H.J., Querengesser, L., *Nucleic Acids Res*., 35, **2007**, D521.

[41]Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K. F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., Hirakawa, M., *Nucleic Acids Res.*, 34, **2006**, D354.

[42]Tautenhahn, R., Cho, K., Uritboonthai, W., Zhu, Z. J., Patti, G. J., Siuzdak, G., *Nat. Biotechnol.*, 30, **2012**, 826.

[43]Saric, J., Want, E. J., Duthaler, U., Lewis, M., Keiser, J., Shockcor, J. P., Ross, G. A., Nicholson, J. K., Holmes, E., Tavares, M. F. M., *Anal. Chem*., 84, **2012**, 6963.

[44]Vuckovic, D., *Anal. Bioanal. Chem*., 402, **2012**, 1523.

[45]Duportet, X., Aggio, R. B. M., Carneiro, S., Villas-Bôas, S. G., *Metabolomics*, 8, **2012**, 410.

[46]Simó, C., Ibáñez, C., Gómez-Martínez, A., Ferragut, J. A., Cifuentes, A., *Electrophoresis*, 32, **2011**, 1765.

[47]Maharjan, R. P., Ferenci, T., *Anal. Biochem.*, 313, **2003**, 145.

[48]Römisch-Margl, W., Prehn, C., Bogumil, R., Röhring, C., Suhre, K., Adamski, J., *Metabolomics*, 8, **2012**, 133.

[49]t'Kind, R., Jankevics, A., Scheltema, R. A., Zheng, L., Watson, D. G., dujardin, J. C., Breitling, R., Coombs, G. H., Decupypere, S., *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, **2010**, 2059.

[50]Villas-Bôas, S. G., Hojer-Pedersen, J., Akesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J., *Yeast*, 22, **2005**, 1155.

[51]Theodoridis, G., Gika, H., Franceschin, P., Caputi, L., Arapitsas, P., Scholz, M., Masuero, D., Wehrens, R., Vshovsek, U., Mattivi, F., *Metabolomics*, 8, **2012**, 175.

[52]Park, C., Yun, S., Lee, S. Y., Park, K., Lee, J., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 167, **2012**, 425.

[53]Paglia, G., Magnúsdóttir, M., Thorlacius, S., Sigurjónsson, O.E., Gudmundsson, S., Palsson, B.O., Thiele, I., *J. Chromatogr. B*, 898, **2012**, 111.

[54]Álavrez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., Muque de Castro, M. D., *Trends Anal. Chem.*, 29, **2010b**, 120.

[55]Villas-Bôas, S. G., Bruheim, P., *OMICS*, 11, **2007**, 305.

[56]Tanaka, K., Hine, D. H., *J. Chromatogr. A*, 239, **1982**, 301.

[57]Nicholson, J. K., Buckingham, M. J., Sadler, P. J., *Biochem. J.*, 211, **1983**, 605.

[58]Dunn, W. B., Ellis, D. I., *Trends Anal. Chem*., 24, **2005**, 285.

[59]Putri, S. P., Yamamoto, S., Tsugawa, H., Fukusaki, E., *J. Biosci. Bioeng*., 116, **2013**, 9.

[60]Lenz, E. M., Wilson, I. D., *J. Proteome Res*., 6, **2007**, 443.

[61]Chen, J. H., Singer, S. Chromatographic and Electrophoretic Separations Combined with Mass Spectrometry for Metabonomics. In. Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E. (Eds.). *Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Londres: Elsevier, **2007**, 149.

[62]Garcia, A., Barbas, C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Based Metabolomics In. Metz, T. O. (Ed.). *Metabolic Profiling: Methods in Molecular Biology*. Nova York: Humana Press Inc., **2011**, 191.

[63]Koek, M. M., Jellema, R. H., van der Greef, J., Tas, A. C., Hankemeier, T., *Metabolomics*, 7, **2011**, 307.

[64]Xiayan, L., Legido-Quigley, C., *Electrophoresis*, 29, **2008**, 3724.

[65]Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J., Wilson, I. D., *Anal. Chim. Acta*, 711, **2012**, 7.

[66]Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E. The Handbook of Metabonomics and Metabolomics. 1ª Ed. Amsterdam: Elsevier, 2007, 572p.

[67]McCalley, D. V., *J. Chromatogr. A*, 1171, **2007**, 46.

[68]Jandera, P., *Anal. Chim. Acta*, 692, **2011**, 1.

[69]Cubbon, S., Antonio, C., Wilson, J., Thomas-Oates, J., *Mass Spec. Rev.*, 29, **2010**, 671.

[70]Assunção, N. A., Bechara, E. J. H., Simionato, A. V. C., Tavares, M. F. M., Carrilho, E., *Quím. Nova*, 31, **2008**, 2124.

[71]Barbas, C., Moraes, E. P., Villaseñor, A., *J. Pharm. Biomed. Anal*., 55, **2011**, 823.

[72]Kuehnbaum, N. L., Britz-McKibbin, P., *Chem. Rev.*, 133, **2013**, 2437.

[73]Ramautar, R., Mayboroda, O. A., Somsen, G. W., Jong, G. J. de., *Electrophoresis*, 32, **2011**, 52.

[74]Sugimoto, M., Kawakami, M., Soga, T., Tomita, M., *Curr. Bioinform.*, 7, **2012**, 96.

[75]Katajamaa, M., Orešič, M., *J. Chromatogr. A*, 1158, **2007**, 318.

[76]Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., *Anal. Chem.*, 78, **2006**, 779.

[77]Xia, J., Psychogios, N., Young, N., Wishart, D. S., *Nucleic Acids Res*., 37, **2009**, W652.

[78]Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Oresic, M., *BMC Informatics*, 11, **2010**, 395.

[79]Lommen, A., *Anal. Chem*., 81, **2009**, 3079.

[80]Niu, W., Knight, E., Xia, Q., McGarvey, B. D., *J. Chromatogr. A*, 1374, **2014**, 199.

[81]Misra, B. B., van der Hooft, J. J. J., *Electrophoresis*, 37, **2016**, 86.

[82]Scheltema, R. A., Decuypere, S., t'Kind, R., Dujardin, J. C., Coombs, G. H., Breitling, R., *Parasitology*, 137, **2010**, 1291.

[83]Berg, M., Mannaert, A., Vanaerschot, M., van der Auwera, G., Dujardin, J. C., *Parasitology*, 140, **2013**, 1492.

[84]Creek, D., Anderson, J., McConville, M. J., Barrett, M. P., *Mol. Biochem. Parasitol*., 181, **2012**, 73.

[85]Vincent, I. M., Barrett, M. P., *J. Biomol. Screen*., 20, **2015**, 44.

[86]Zhang, R., Watson, D. G., Wang, L., Westrop, G. D., Coombs, G. H., Zhang, T., *J. Chromatogr. A*, 1362, **2014**, 168.

[87]De Souza, D. P., Saunders, E. C., McConville, M. J., Likić, V. A., *Bioinformatics*, 22, **2006**, 1391.

[88]Robinson, M. D., De Souza, D. P., Keen, W. W., Saunders, E. C., McConville, M. J., Speed, T. P., Likić, V., *BMC Bioinformatics*, 8, **2007**, 419.

[89]Scheltema, R., Decuypere, S., Dujardin, J. C., Watson, D., Jansen, R., Breitling, R. *Bioanalysis*, 1, **2009**, 1551.

[90]Ejigu, B. A., Valkenborg, D., Baggerman, G., Vanaerschot, M., Witters, E., Dujardin, J. C., Burzykowski, T., Berg, M., *OMICS*, 17, **2013**,473.

[91]Canuto, G. A. B., Castilho-Martins, E. A., Tavares, M. F. M., Rivas, L., Barbas, C., López-Gonzálvez, Á., *Anal. Bioanal. Chem.*, 406, **2014**, 3459.

[92]Rojo, D., Canuto, G. A. B., Castilho-Martins, E. A., Tavares, M. F. M., Barbas, C. López-Gonzálvez, Á., Rivas, L., *PLoS One*, 10, **2015**, e0130675.

[93]Canuto, G. A. B., Castilho-Martins, E. A., Tavares, M., López-Gonzálvez, Á., Rivas, L., Barbas, C., *Electrophoresis*, 33, **2012**, 1901-1910.

[94]t'Kind, R., Scheltema, R. A., Jankevics, A., Brunker, K., Rijal, S., Dujardin, J. C., Breitling, R., Watson, D. G., Coombs, G. H., Decuypere, S., *PLoS Negl. Trop. Dis*., 4, **2010**, e904.

[95]Berg, M., Vanaerschot, Jankevics, A., Cuypers, B., Maes, I., Mukherjee, S., Khanal, B., Rijal, S., Roy, A., Opperdoes, F., Breitling, R., Dujardin, J. C., *Mol. Microbiol*., 90, **2013**, 428.

[96]Vincent, I. M., Weidt, S., Rivas, L., Burgess, K., Smith, T. K., Ouellette, M., *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, 4, **2014**, 20-27.

[97]Berg, M., García-Hernández, R., Cuypers, B., Vanaerschot, M., Manzano, J. I., Poveda, J. A., Ferragut, J. A., Castanys, S., Dujardin, J. C., Gamarro, F., *Antimicrob. Agents Chemother*., 59, **2015**, 2242.

[98]Shaw, C. D., Lonchamp, J., Downing, T., Imamura, H., Freeman, T. M., Cotton, J. A., Sanders, M., Blackburn, G., Dujardin, J. C., Rijal, S., Khanal, B., Illingworth, C. J. R., Coombs, G. H., Carter, K. C., *Mol. Microbiol.*, 99, **2015**, 1134.

[99]Westrop, G. D., Williams, R. A. M., Wang, L., Zhang, T., Watson, D. G., Silva, A. M., Coombs, G. H., *PLOS One*, 10, **2015**, e0136891.

[100]Arjmand, M., Madrakian, A., Khalili, G., Dastnaee, A. N., Zamani, Z., Akbari, Z., *Iran. Biomed. J.*, 20, **2016**, 77.

[101]Silva, A. M., Cordeiro-da-Silva, A., Coombs, G. H., *PLoS Negl. Trop. Dis*., 5, **2011**, e1451.

[102]Lamour, S. D., Choi, B. S., Keun, H. C., Müller, I., Saric, J., *J. Proteome Res*., 11, **2012**, 4211.

[103]Naderer, T., Ellis, M. A., Sernee, M. F., De Souza, D. P., Curtis, J., Handman, E., McConville, M. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, **2006**, 5502.

[104]Castilho-Martins, E. A., Canuto, G. A. B., Muxel, S. M., da Silva, M. F. L., Floeter-Winter, L. M., del Aguila, C., López-Gonzálvez, Á., Barbas, C., *Electrophoresis*, 36, **2015**, 2314.

[105]Gupta, N., Goyal, N., Singha, U. K., Bhakuni, V., Roy, R., Rastogi, A. K., *Acta Trop*., 73, **1999**, 121.

[106]Rainey, P. M., MacKenzie, N. E., *Mol. Biochem. Parasitol.*, 45, **1991**, 307.

[107]Saunders, E. C., Ng, W. W., Kloehn, J., Chambers, J. M., Ng, M., McConville, M. J., *PLoS Pathog.*, 10, **2014**, e1003888.

[108]Saunders, E. C., Ng, W. W., Chambers, J. M., Ng, M., Ng, M., Naderer, T., Krömer, J. O., Likić, V. A., McConville, M. J., *J. Biol. Chem.*, 286, **2011**, 27706.

[109]Magalhães-Jr, J. T., Mesquita, P. R. R., Oliveira, W. F. dos S., Oliveira, F. S., Franke, C. R., Rodrigues, F. de M., de Andrade, J. B., Barrouin-Melo, S. M., *Anal. Bioanal. Chem.*, 406, **2014**, 6691.

[110]Alves-Ferreira, E. V. C., Toledo, J. S., De Oliveira, A. H. C., Ferreira, T. R., Ruy, P. C., Pinzan, C. F., Santos, R. F., Boaventura, V., Rojo, D., López-Gonzálvez, Á., Rosa, J. C., Barbas, C., Barral-Netto, M., Barral, A., Cruz, A. K., *PLoS Nelg. Trop. Dis*., 9, **2015**, e0004018.

[111]Singh, S., Mohapatra, D. P., Sivakumar, R., *J. Commun. Dis.,* 32, **2000**, 289.

[112]Grecco, S. S., Sousa, F. S., Jerz, G., Jones, P. G., da Costa-Silva, T. A., Tempone, A. G., Martins, E. G. A., Lago, J. H. G. *Planta Medica*, **2016**, submetido.

[113]Kind, T., Wohçgemuth, G., Lee, D. Y., Palazoglu, M.., Fiehn, O. *Anal. Chem.*, 81, **2009**, 10038.

[114]R Core Team. R: a language and environmental for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, **2016**. URL http://www.R-project.org/

[115]Veselkov, K. A., Vingara, L. K., Masson, P., Robinette, S. L., Want, E., Li, J. V., Barton, R. H., Boursier-Neyret, C., Walther, B., Ebbels, T. M., Pelczer, I., Holmes, E., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., *Anal. Chem.*, 83, **2011**, 5864.

[116]Worley, B., Powers, R., *Curr. Metabolomics*, 1, **2013**, 92.

[117]Alves, E. A., Guimarães, A. C. R. Cultivo Celular. In. Molinaro, E. M., Caputo, L. F. G., Amendoeira, M. R. R. (Orgs.). *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. Rio de Janeiro: EPSJV, **2010**, 215.

[118]Shin, M. H., Lee, D. Y., Liu, K. H., Fiehn, O., Kim, K. H., *Anal. Chem*., 82, **2010**, 6660.

[119]Winder, C. L., Dunn, W. B., Schuler, S., Broadhurst, D., Jarvis, R., Stephens, G. M., Goodacre, R., *Anal. Chem*., 80, **2008**, 2939.

[120]Canelas, A. B., ten Pierick, A., Ras, C., Seifar, R. M., van Dam, J. C., van Gulik, W. M., Heijnem, J. J., *Anal. Chem*., 81, **2009**, 7379.

[121]Hutschenreuther, A., Kiontke, A., Birkenmeier, G., Birkemeyer, C., *Anal. Methods,* 4, **2012**, 1953.

[122]De Barros Neto, B., Scarmínio, I. S., Bruns, R. E. Como fazer experimentos. 4ªEd. Porto Alegre: Bookman, **2010**, 413p.

[123]Smart, K. F., Aggio, R. B. M, Houte, J. R. V., Villas-Bôas, S. G. *Nature Protocols*, 10, **2010**, 1709.

[124]Karamani, A. A., Fiamegos, Y. Ch., Vartholomatos, G., Stalikas, C. D., *J. Chromatogr. A*, 1302, **2013**, 125.

[125]Yi, L., Shi, S., Yi, Z., He, R., Lu, H., Liang, Y., *Anal. Methods*, 6, **2014**, 4380.

[126]Teng, Q., Huang, W., Collette, T. W., Ekman, D. R., Tan, C., *Metabolomics*, 5, **2009**, 199.

[127]A, J., Trygg, J., Gullberg, J., Johansson, A. I., Jonsson, P., Antti, H., Marklund, S. L., Moritz, T. *Anal. Chem*., 77, **2005**, 8086

[128]Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., *The Plant J.*, 23, **2000**, 131.

[129]Ye, G., Zhu, B., Yao, Z., Yin, P., Lu, X., Kong, H., Fan, F., Jiao, B., Xu, G., *J. Proteome Res.*, 11, **2012**, 4361.

[130]da Costa-Silva, T. A., Grecco, S. S., de Sousa, F. S., Lago, J. H. G., Martins, E. G. A., Terrazas, C. A., Varikuti, S., Owens, K. L., Beverley, S. M., Satoskar, A. R., Tempone, A. G., *J. Nat. Prod.*, 78, **2015**, 653.

[131]Sangster, T., Major, H., Plumb, R., Wilson, A. J., Wilson, I. D. *Analyst*, 131, **2006**, 1075.

[132]Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C. J., Smit, S., Vis, D. J., Smilde, A. K., van Velzen, E. J. J., van Duijnhoven, J. P. M., van Dorsten, F. A., *Metabolomics*, 4, **2008**, 81.

[133]Mastrangelo, A., Ferrarini, A., Rey-Stolle, F., García, A., Barbas, C., *Anal. Chim. Acta*, 900, **2015**, 21.

[134]Saunders, E. C., De Souza, D. P., Naderer, T., Sernee, M. F., Ralton J. E., Doyle, M. A., Macrae, J. I., Chambers, J. L., Heng J., Likić, V. A., McConville, M. J., *Parasitology*, 134, **2010**, 1303.

[135] Murray H. W., Berman J. D., Davies C. R., Saravia N. G., *Lancet*, 366, **2005**, 1561.

[136] Rodriguez-Contreras, D., Hamilton, N., *J. Biol. Chem.*, 289, **2014**, 32989.

[137] van der Knaap, M. S., Wevers, R. A., Struys, E. A., Verhoeven, N. M., Pouwels, P. J., Engelke, U. F., Feikema, W., Valk, J., Jakobs, C., *Annals of Neurology*, 46, **1999**, 925.

[138] Verhoeven, N. M., Huck, J. H., Roos, B., Struys, E. A., Salomons, G. S., Douwes, A. C., van der Knaap, M. S., Jakobs, C., *Am. J. Hum. Genet.*, 68, **2001**, 1086.

[139] Huch, J. H., Roos, B., Jakobs, C., van der Knaap, M. S., Verhoeven, N. M., *Mol. Genet. Metab.*, 82, **2004**, 231.

[140] Stone, V., Kudo, K. Y., August, P. M., Marcelino, T. B., Matté, C.,. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 37, **2014**, 21.

[141]Lee, S. H., Stephens, J. L., Englund, P. T., *Nature Rev. Microbiol.*, 5, **2007**, 287.

[142]Ramakrishnan, S., Serricchio, M., Striepen, B., Bütikofer, P., *Prog. Lip. Res.*, 52, **2013**, 488.

[143]Barret, M. P., *Parasitol. Today*, 13, **1997**, 11.

[144]Balaña-Fouce, R., Calvo-Álvarez, E., Álvarez-Velilla, R., Prada, C. F., Pérez-Pertejo, Y., Reguera, R. M., *Mol. Biochem. Parasitol.*, 181, **2012**, 85.

SÚMULA CURRICULAR

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Gisele André Baptista Canuto

Local e data de nascimento: São Caetano do Sul, SP - 28/08/1986

2. EDUCAÇÃO

USP – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011 - atual.
Doutorado em Ciências (Química Analítica).

CEU - Universidad San Pablo, Madri, Espanha, 2011-2012.
CEMBIO - Centro em Excelência em Metabolômica e Bioanálises.
Doutorado sanduíche (Metabolômica).

USP – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009 - 2011.
Mestrado em Ciências (Química Analítica).

UEL – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2005-2008.
Bacharel em Química (com opção Tecnológica) e Licenciatura Plena em Química.

CEFET - Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Cornélio Procópio, PR, 2001-2003.
Ensino médio.

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2013 - 1st International Mass Spectrometry School. International Mass Spectrometry Foundation, IMSF, Siena, Italia.

2012 - Training Course Introduction to Mass Spectrometry. British Mass Spectrometry Society, BMSS, Alderley Park, Grã-Bretanha.

2010 - Minicurso de Metrologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

2010 - Treinamento - Titulador Karl Fischer Titrino Plus. E Titulador Karl Fischer Coulorimétric. Metrohm Pensalab Instrumentacão Analitica, METROHM, São Paulo, Brasil.

2010 - Pre-Symposium Course - Capillary Electrophoresis. Latin Americam Symposium, LACE, Florianópolis, Brasil.

2007 - I Escola de Verão em Química Verde. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

2007 - HPLC: conceitos básicos e aplicações. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brasil.

2006 - Caracterização de Combustíveis Alternativos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Brasil.

2006 - Química de Moléculas Biotivas. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

2005 - Produtos Biotecnológicos obtidos por Fermentação. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

4. OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP (2012/04601-6), 06/2012 - 05/2016.

5. PUBLICAÇÕES

Artigos publicados

CANUTO, G. A. B.; OLIVEIRA, D. R.; DA CONCEIÇÃO, L. S. M.; FARAH, J. P. S.; TAVARES, M. F. M. Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (Fragaria spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. ***Food Chemistry***, v. 192, p. 566-574, 2016.

CANUTO, G. A. B.; DA CRUZ, P. L. R.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; TAVARES, M. F. M. Neglected diseases prioritized in brazil under the perspective of metabolomics. A Review. ***Electrophoresis***, v. 36, p. 2336-2347, 2015.

CASTILHO-MARTINS, E. A.; CANUTO, G. A. B.; MUXEL, S. M.; DA SILVA, M. F. L.; FLOETER-WINTER, L. M.; DEL AGUILA, C.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, Á.; BARBAS, C. Capillary electrophoresis reveals polyamine metabolism modulation in Leishmania (Leishmania) amazonensis wild-type and arginase-knockout mutants under arginine starvation. ***Electrophoresis***, v. 36, p. 2314-2323, 2015.

ROJO, D.; CANUTO, G. A. B.; CASTILHO-MARTINS, E. A.; TAVARES, M. F. M.; BARBAS, C. LÓPEZ-GONZÁLVEZ, A.; RIVAS, L. A multiplatform metabolomic approach to the basis of antimonial action and resistance in Leishmania infantum. ***PLoS One***, v. 10, p. e0130675, 2015.

PEREIRA, M.; SOARES, C.; CANUTO, G. A. B.; TAVARES, M. F. M.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. Down regularion of NO signaling Trypanosoma cruzi upon parasite-extracelullar matrix interaction: changes in protein modification by nitrosylation and nitration. ***PLoS Neglected Tropical Diseases***, v. 9, p. e0003683, 2015.

CANUTO, G. A. B.; CASTILHO-MARTINS, E. A.; TAVARES, M. F. M.; RIVAS, L.; BARBAS, C.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, A. Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in Leishmania. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***, v. 406, p. 3459-3476, 2014.

CANUTO, G. A. B.; CASTILHO-MARTINS, E. A.; TAVARES, M. F. M., LÓPEZ-GONZÁLVEZ, A.; RIVAS, L.; BARBAS, C. CE-ESI-MS metabolic fingerprinting of Leishmania resistance to antimony treatment. ***Electrophoresis***, v. 33, p. 1901-1910, 2012.

NICOLAU, R. M.; CANUTO, G. A. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. . Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. ***Química Nova***, v. 33, p. 885-890, 2010.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. ***Revista Brasileira de Fruticultura***, v. 32, p. 1196-1295, 2010.

Artigo Submetido

CANUTO, G. A. B.; DÖRR, F.; LAGO, J. H. G.; TEMPONE, A. G.; PINTO JUNIO, E.; PIMENTA, D. C., ALVES, M. J. M., TAVARES, M. F. M. New insights into the mechanistic action of a methyldehydrodieugenol B towarrds Leishmania (L.) infantum via a multiplatform based untargetd metabolomics approach. ***Metabolomics***, submetido em Maio 2016.

6. PRÊMIOS

2013 - Premio do Consejo de Colegios Profesionales de Farmacéuticos de Castilla y León, Academia de Farmacia de Castilla y Leon, Universidade de Salamanca pelo trabalho: "Aproximación analítica multiplataforma al estudio del efecto y la resistencia de los fármacos antimoniales en *L. infantum*, una perspectiva metabolómica".