UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Paulo Falco Cobra

Aplicações de ressonância magnética nuclear em
estudos metabolômicos de processos biológicos

São Carlos

2016

Paulo Falco Cobra

Aplicações de ressonância magnética nuclear em estudos metabolômicos de processos biológicos

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

Coorientador: Dr. Otavio Henrique Thiemann

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2016

Agradecimentos

À Deus, por todas as oportunidades e auxílios concedidos.

À minha mãe Celina e à minha irmã Joana, por sempre me ajudarem e estarem presentes em cada etapa, sendo apoio indispensável para realização deste projeto. Ao meu avô, pelo incentivo e amor.

Ao Matthew, Sheila e Jeff por me receberem em sua família e por me apoiarem desde o momento que entraram em minha vida.

Ao Dr. Luiz Alberto Colnago, por toda a paciência, humor e dedicação nos mais de 10 anos de orientação e amizade. Sem ele, eu não estaria aqui.

Aos colegas do grupo de RMN da EMBRAPA: André, Bruna, Carlos, Cirlei, Dani, Diego, Luiz, Roberta, Rodrigo, Tati e Tiago, por tornar os dias de trabalho alegres.

Em especial à doutora Maria Gabriela Aparecida Carosio pelos anos de amizade, auxílio e incentivo. Por ter me ajudado nos dias bons e ruins e por ter lido e relido esta tese, oferecendo sugestões de melhoria.

Ao Dr. Otavio Henrique Thiemann pela coorientação e por ceder o espaço e material do LBEST para cultivo de *Leishmania*. Aos colegas de grupo, que me ensinaram quando eu nada sabia sobre cultivo de protozoários, em especial ao pessoal da Sala de Cultura: Ana Laura, Érika, Ivan, Natielli, Thomás e Tulio.

Ao NMRFAM em Madison-WI pelo ano incrível de experiências e aprendizado. Ao Dr. John L. Markley por ter me recebido e aos doutores W. Milo Westler, Mark Anderson, David Aceti, Hamid Eghbalnia e a doutora Fariba Fathi pela troca de experiências e discussões sobre RMN e metabolômica.

À Embrapa Instrumentação, ao Instituto de Física de São Carlos e ao NMRFAM (Department of Biochemistry of UW-Madison) pela infraestrutura dos laboratórios para o desenvolvimento da pesquisa. Ao Instituto de Química de São Carlos-USP pelo suporte acadêmico. À FAPESP (processos número 2012/12847-5 e 2015/025345-8) pelo suporte financeiro e pela oportunidade de estágio no exterior.

E finalmente, a todos que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Resumo

A RMN é uma das principais técnicas usadas no estudo de perfis metabólicos pois é uma técnica quantitativa, altamente reprodutível e não-seletiva. Desta forma, o objetivo desta tese foi a aplicação da RMN no estudo metabólico em diferentes processos biológicos. A primeira aplicação foi na análise do perfil metabolômico e metabonômico dos agentes causadores da leishmaniose. Para tal, foram analisados extratos celulares das espécies *Leishmania major* e *Leishmania donovani* e extratos destas espécies crescidas com os fármacos miltefosina e paromomicina. Os espectros de RMN de ^1H foram analisados pelo programa ChenomX e os espectros de RMN 2D pelo software TopSpin e as bases de dados HMDB e BMRB. Cerca de 50 metabólitos foram identificados, como a adenina, arginina, glutamina, glutamato, manose, isoleucina, leucina e tirosina. Técnicas quimiométricas como PCA, PLS-DA e heatmaps foram utilizadas para investigar os metabólitos responsáveis pela diferenciação das duas espécies bem como entre as culturas com e sem fármacos. O segundo estudo foi com o composto metilglioxal. A presença de metilglioxal em queijos contribui com o escurecimento e deterioração do sabor, mesmo em baixas temperaturas. Por esta razão, foram estudados os produtos da adição de metilglioxal em extrato de queijo parmesão e o comportamento de diferentes espécies de lactobacilos na presença e na ausência de metilglioxal em extrato de queijo parmesão. Os resultados permitiram um entendimento maior das reações envolvidas entre esta molécula e os componentes do queijo, o que ajudará encontrar alternativas para a resolução do problema e aumentar o tempo de prateleira do queijo. O terceiro estudo realizado foi sobre a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. O objetivo deste estudo foi modificar geneticamente uma espécie de lactobacilo para a produção de etanol e analisar a vinhaça de planta de etanol pós-fermentação com levedura. Os espectros de RMN de ^1H e ^1H - ^{13}C mostraram que as bactérias modificadas são eficientes na produção de etanol e que dois açúcares foram erroneamente identificados por cromatografia como maltose e maltotriose quando na verdade eram trealose e arabinose. Por meio destes estudos mostrou-se parte das inúmeras aplicações que a RMN tem na metabolômica e que existem diversas ferramentas estatísticas disponíveis para auxiliar no estudo metabolômico.

Palavras-chave: Ressonância Magnética Nuclear, Metabolômica, *Leishmania*, Miltefosina, Paromomicina, Lactobacilos, Queijo Parmesão, Etanol

Abstract

NMR is one of the main techniques used in metabolic profile studies because it is a quantitative, highly reproducible and non-selective technique. Thus, the aim of this thesis was the application of NMR in metabolic studies of different biological processes. The first application was the analysis of the metabolomic and metabonomic profile of the causative agents of leishmaniasis. Cell extracts of the species *Leishmania major* and *Leishmania donovani* and extracts of these species grown with miltefosine and paromomycin drugs were analyzed. ^1H spectra were analyzed by ChenomX software and 2D spectra by TopSpin software and HMDB and BMRB databases. About 50 metabolites were identified, such as adenine, arginine, glutamine, glutamate, mannose, isoleucine, leucine and tyrosine. Chemometric techniques were used to investigate the metabolites responsible for the differentiation of the two species and between cultures with and without drugs. The second study was with methylglyoxal molecule. The presence of methylglyoxal in cheese contributes to browning and deterioration of flavor, even at low temperatures. For this reason, products of the addition of methylglyoxal in Parmesan cheese extract and the behavior of different species of lactobacilli in the presence and absence of methylglyoxal in Parmesan cheese extract were studied. The results allowed a better understanding of the reactions involved between this molecule and the components of the cheese, which will help find alternatives to solve the problem and increase the shelf life of the cheese. The third study was about the production of ethanol from lignocellulosic biomass. The objective of this study was to genetically modify a lactobacillus species to produce ethanol and analyze the post-fermentation thin stillage. NMR spectra showed that the modified bacteria are efficient in production of ethanol and that two sugars were erroneously being identified by chromatography as maltose and maltotriose when they actually were trehalose and arabinose. These studies showed part of the numerous applications that NMR has in metabolomics and that there are several statistical tools available to assist in metabolomic studies.

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance, Metabolomics, *Leishmania*, Miltefosine, Paromomycin, Lactobacilli, Parmesan cheese, Ethanol

Lista de Ilustrações

- Figura 1-1: O crescimento no número de publicações de metabolôma ou metabonôma descrito no *Web of Knowledge*. Publicações descrevendo aplicações em RMN em preto, em MS em branco e outras técnicas em cinza..... 13
- Figura 1-2: Esquema da sequência de pulsos de ^1H com saturação do sinal da água. No padrão Bruker, zgesgp. Onde d1 é o tempo de preparação, delta são tempos de evolução, p12sp1 é o pulso seletivo para supressão do sinal da água e G1 e G2 são pulsos de gradiente. 15
- Figura 1-3: Esquema de pulsos da sequência padrão de TOCSY. No padrão Bruker, mlevphpp. Ela consiste num tempo de preparação d1, dois pulsos de radiofrequência separados pelo tempo de evolução, d0. O primeiro pulso é de 90 graus e o segundo pulso é o spin-lock de pulsos múltiplos (MLEV-17). 17
- Figura 1-4: Espectro de RMN 2D de ^1H - ^1H TOCSY de uma molécula de açúcar. Os picos cruzados aparecem para os spins acoplados como também para aqueles que embora não estejam acoplados, estão no mesmo sistema de spin e sofrem influência da propagação da magnetização. 17
- Figura 1-5: Esquema de pulsos da sequência padrão de HSQC. No padrão Bruker, hsqcedetgp..... 18
- Figura 1-6: Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC da molécula de dissacarídeo representada abaixo. Como o próton e o carbono estão em frequências diferentes, não existem picos diagonais no espectro de HSQC. 19
- Figura 1-7: Identificação de compostos em espectro de RMN 1D de ^1H por *profiling* de metabólitos alvo. Em preto é mostrado o espectro da amostra sendo estudada, o espectro do composto puro pode ser visto em azul e a soma do sinal de todos os compostos ajustados pode ser vista em vermelho. Em a) é mostrado a identificação da glicose quando os picos do espectro são facilmente sobrepostos pelos picos do composto padrão e em b) é mostrado que mesmo o duplete em 2,43 ppm estando sobreposto, a identificação da carnitina pode ser feita pelo singlete em 3,21 ppm...22
- Figura 1-8: Captura de tela da página do COLMAR ^1H - ^{13}C HSQC web server. A lista de picos de HSQC mostra os 165 picos cruzados de extrato metabólico de *Drosophila melanogaster*. A janela inferior mostra a posição dos picos cruzados (círculos azuis e cruces pretas) em um plano 2D correspondendo ao espectro 2D de HSQC. Os círculos

de borda azul representam os picos cruzados de HSQC que correspondem a um único composto na base de dados, os círculos azuis cheios correspondem aos picos cruzados de múltiplos compostos e as cruces pretas correspondem a picos que não pertencem a nenhum composto da base de dados.....	24
Figura 2-1: Ilustração da câmara de Neubauer.....	32
Figura 2-2: Câmara de Neubauer vista no microscópio com aumento de 20x.....	32
Figura 2-3: Curva de crescimento de <i>L. major</i> e <i>L. donovani</i> partindo de concentração inicial de 1×10^4 cel/mL para ambas espécies.....	36
Figura 2-4: Expansão entre 0,8 e 4,5 ppm dos espectros de ^1H de extratos de <i>L. major</i> (laranja) e <i>L. donovani</i> (azul). As regiões entre 1,5 a 2,5 ppm e 3 a 4 ppm possuem sinais sobrepostos, o que dificulta a identificação metabólica.....	39
Figura 2-5: Expansão entre 5,0 e 8,6 ppm dos espectros de ^1H de extratos de <i>L. major</i> (laranja) e <i>L. donovani</i> (azul).....	40
Figura 2-6: <i>Profiling</i> de metabólitos alvos feito pelo software ChenomX, ilustrando a sobreposição de sinais em regiões pouco povoadas como (a) de 0,90 ppm a 1,10 ppm e regiões com intensa sobreposição de sinais, como mostrado em (b) e na expansão perto da linha de base em (c) da região de 3,10 ppm a 3,25 ppm. Error! Bookmark not defined.	
Figura 2-7: Gráfico de scores entre PC1 e PC2. As variâncias explicáveis estão entre parênteses. Amostras de <i>L. major</i> são representadas pela cruz verde e as amostras de <i>L. donovani</i> pelos triângulos vermelhos.	44
Figura 2-8: Classificação da PLS-DA utilizando diferentes números de componentes principais. A estrela vermelha indica o melhor classificador.	45
Figura 2-9: Metabólitos relevantes identificados pela PLS-DA. As caixas coloridas à direita indicam a concentração relativa dos metabólitos correspondentes em cada um dos grupos estudados. <i>L. donovani</i> é representada no grupo 1 e <i>L. major</i> no grupo 2.	45
Figura 2-10: Placas com 96 poços antes da adição de MTS (a) e pronta para leitura no equipamento de UV SpectraMax (b).	46
Figura 2-11: Primeira curva para determinação da LD50 dos fármacos miltefosina e paromomicina para as espécies <i>L. major</i> e <i>L. donovani</i> após 48 h de adição do fármaco nas culturas em meio 199.	47

Figura 2-12: Segunda curva para determinação da LD50 dos fármacos miltefosina e paromomicina para as espécies <i>L. major</i> e <i>L. donovani</i> após 48 h de adição do fármaco nas culturas em meio 199.	48
Figura 2-13: Gráfico de scores entre PC 1 e PC 2. A variância explicada foi de 34,4 % para PC 1 e 17,8% para PC 2. Amostras de <i>L. major</i> cultivadas com drogas são representadas pela cruz verde e amostras de <i>L. major</i> sem as drogas pelo triângulo vermelho.....	50
Figura 2-14: Gráfico de <i>loadings</i> da Figura 2-13. Quanto mais distante o metabólito (variável) do centro, maior a relevância para separação das amostras.	51
Figura 2-15: <i>Heatmap</i> dos extratos de <i>L. donovani</i> (classe 1) e <i>L. donovani</i> com miltefosina e paromomicina (classe 2).	52
Figura 2-16: Esquema representando o ciclo metabólico do citrato ou ciclo de Krebs.	54
Figura 2-17: Esquema representativo de parte do ciclo de metabolismo de alanina, aspartato e glutamato.....	55
Figura 2-18: Esquema representativo de parte do ciclo de metabolismo de frutose e manose.	56
Figura 3-1: Caminho metabólico do metilglioxal.....	60
Figura 3-2: Espectros de RMN de ¹ H mostrando o surgimento do duplete referente à produção de propilenoglicol nas amostras com MG.....	61
Figura 3-3: Espectros de RMN de ¹ H mostrando o simpleto em 4,375 ppm referente à produção de hidroxiacetona em amostras com MG. Diferenças no alinhamento dos picos são devidas a diferenças de pH entre as amostras.	61
Figura 3-4: Espectros de RMN de ¹ H mostrando o simpleto em 5,285 ppm que monitora produção de metilglioxal em amostras inoculadas com mgsA.	62
Figura 3-5: Espectro de RMN 1D de ¹ H mostrando o simpleto em 4,375 que monitora a hidroxiacetona produzida em amostras inoculadas com mgsA.....	62
Figura 3-6: Espectros de RMN de ¹ H de <i>L. brevis</i> cultivado em 0 e 6 mM de MG. O sinal em 1,37 ppm monitora o consumo de MG e o duplete em 1.13 ppm monitora o aparecimento de propilenoglicol.....	63
Figura 3-7: Espectro de RMN de ¹ H do meio de cultura (azul claro) e da fermentação de <i>L. casei</i> E2 por 12 h, 24 h, 48 h e 96 h (vermelho). A região selecionada, de 3,3	

ppm a 3,9 ppm, mostra o consumo de glicose e a produção de etanol em função do tempo.	68
Figura 3-8: Espectro de RMN de ^1H do meio de cultura (cinza), <i>L. casei</i> E2 depois de 96 h de fermentação (laranja) e <i>L. casei</i> WT depois de 96 h de fermentação (verde). A região selecionada, de 3,3 ppm a 3,9 ppm mostra o consumo de glicose e a produção de etanol pelas duas cepas.	69
Figura 3-9: Índice de refração da vinhaça adquirido com um Phenomenex Rezex ROA – Ácido orgânico H^+ (8%) 300 x 7,8 mm, com um cartucho <i>SecurityGuard</i> Carbo-H 4 x 3,0 mm ID, fase móvel 0,02 M de ácido sulfúrico, taxa de vazão de 0,5 mL/min, temperatura da coluna em 50 °C e volume de injeção 100 μL	70
Figura 3-10: Região entre 2,8 e 4,0 ppm do espectro de RMN de ^1H referente ao pico 1 do HPLC (9,12 min) da amostra de vinhaça após a fermentação com levedura. Os picos coloridos são sobreposições de espectros de compostos puros como demarcado na figura.	71
Figura 3-11: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do pico 1 do HPLC (azul), sobreposto com os espectros de compostos puros de: glicose (laranja e amarelo), maltotriose (roxo e verde) e maltose (vermelho e rosa).	71
Figura 3-12: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do pico 1 do HPLC (azul), sobreposto com o espectro puro de trealose (vermelho).	72
Figura 3-13: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC referente ao pico 1 do HPLC (azul), sobreposto com o espectro de trealose pura.	72
Figura 3-14: Região entre 3,2 e 4,1 ppm do espectro de RMN de ^1H referente ao pico 2 do HPLC (10,13 min) da amostra de vinhaça após a fermentação com levedura. Os picos coloridos representam a deconvolução de espectros de compostos puros de arabinose, glicose, maltose e maltotriose.	73
Figura 3-15: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC referente ao pico 2 do HPLC (azul), sobreposto com os espectros de arabinose (roxo) e cilo-inositol (vermelho) puros.	73

Lista de Tabelas

Tabela 2-1: Metabólitos presentes em extratos de <i>L. major</i> e <i>L. donovani</i> . Deslocamentos químicos em azul estão sobrepostos por sinais de outros compostos ou próximos da região do sinal da água. A abreviação após os números significa (s) singlete, (d) duplete, (dd) duplo duplete, (t) tripleto, (q) quarteto e (m) multiplete. Compostos que não foram confirmados por TOCSY e HSQC não estão disponíveis nas bases de dados, não sendo possível a confirmação.	41
Tabela 2-2: Configuração da placa de 96 poços utilizada no primeiro ensaio de LD50 para os fármacos miltefosina e paromomicina com as espécies <i>L. major</i> e <i>L. donovani</i>	47
Tabela 2-3: Configuração da placa de 96 poços utilizada no segundo ensaio de LD50 para os fármacos miltefosina e paromomicina com as espécies <i>L. major</i> e <i>L. donovani</i>	48
Tabela 3-1: Concentração de metabólitos produzidos por 14 cepas de lactobacilos após 48 horas de cultivo em PCE com 6 mM de MG.....	64
Tabela 3-2: Concentração de metabólitos no meio de cultura (branco), <i>L. casei</i> E2 e <i>L. casei</i> WT depois de normalização pela soma	68

Lista de Abreviações

BMRB - *Biological Magnetic Resonance data Bank*

COLMAR - *COmpLex Mixture Analysis by nmR*

HMDB - *Human Metabolome DataBase*

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

PCA - *Principal Component Analysis*

PLS-DA - *Partial Least Square – Discriminant Analysis*

VIP - *Variable Importance in Projection*

RMN - *Ressonância Magnética Nuclear*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

S/R - *Razão Sinal Ruído*

TOCSY - *TOtal Correlation SpectroscopY*

MG - *MetilGloxal*

PCE - *Extrato de Queijo Parmesão*

Sumário

Capítulo 1. Introdução	Error! Bookmark not defined.
1.1. Metabolômica	12
1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	13
1.2.1. Supressão do sinal da água em espectros 1D de ^1H	14
1.2.2. Espectros bidimensionais	15
1.3. Metabolômica – RMN	19
1.3.1. ChemoMX <i>NMR Suite</i>	20
1.3.2. <i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i> (BMRB)	21
1.3.3. <i>Human Metabolome Database</i> (HMDB)	22
1.3.4. <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (KEGG).....	23
1.3.5. <i>Complex Mixture Analysis by NMR</i> (COLMAR)	23
1.3.6. MetaboAnalyst	25
1.3.7. Pré-tratamento de dados e análises estatísticas	25
Capítulo 2. Análise do perfil metabólico de <i>Leishmania</i> por Ressonância Magnética Nuclear.....	27
2.1. Doenças Tropicais Negligenciadas.....	27
2.1.1. Leishmanioses.....	27
2.2. Objetivos	31
2.3. Materiais e métodos.....	31
2.3.1. Curvas de crescimento	31
2.3.2. Análise metabolômica de <i>Leishmania sp.</i>	33
2.3.3. Estudo de dose letal mediana de miltefosina e paromomicina e análise metabólica de culturas cultivadas com estes fármacos.	34
2.3.4. Meio de cultura, forma de crescimento	31
2.3.5. Preparação das amostras de RMN.....	32
2.4. Resultados e discussões	35
2.4.1. Curvas de crescimento	35
2.4.2. Determinação do número de <i>scans</i> para a sequência 1D de ^1H com supressão do sinal da água por <i>excitation sculpting</i>	Error! Bookmark not defined.
2.4.3. Análise metabolômica de <i>L. major</i> Friedling e <i>L. donovani</i> DD8.....	36
2.4.4. Estudo da Dose Letal Mediana de miltefosina e paromomicina	46
2.5. Conclusões	53
2.6. Perspectivas futuras	53

Capítulo 3. Colaborações	57
3.1. Metilglioxal em queijo parmesão.....	57
3.1.1. Motivação	57
3.1.2. Objetivos.....	57
3.1.3. Materiais e métodos.....	58
3.1.4. Resultados e discussões	59
3.1.5. Conclusões.....	64
3.2. Produção e identificação metabólica de etanol a partir de lactobacilos.....	64
3.2.1. Motivação	65
3.2.2. Objetivos.....	65
3.2.3. Materiais e métodos.....	66
3.2.4. Resultados e discussões	67
3.2.5. Conclusões.....	74
Capítulo 4. Conclusões.....	75
Referências Bibliográficas	77
Apêndice A	84
Apêndice B.....	100

Capítulo 1. Introdução

1.1. Metabolômica

O início do estudo global de metabólitos começou nas décadas de 1960 e 1970 com Horning (1968) e Pauling (1971) que separadamente, utilizaram a cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (GC-MS) para obter o perfil metabólito do sangue humano e de urina, respectivamente.

Atualmente, a pesquisa metabólica pode ser dividida em duas partes: metabolômica e metabonômica. Embora estes termos sejam comumente usados com o mesmo significado, ultimamente vem sendo estabelecido uma definição para cada uma delas. De maneira resumida, metabolôma compreende a análise onde os metabólitos de um sistema biológico ou organismo, em condições normais, são identificados e metabonôma seria o estudo das mudanças destes metabólitos em resposta a estímulos patofisiológicos ou modificações genéticas. (Lindon e Nicholson, 2008)

Dois trabalhos, tidos como os artigos pioneiros em metabonômica e metabolômica, foram publicados em um período de doze meses. Em 1999, Nicholson e colaboradores publicaram um artigo definindo o estudo metabonômico e a aplicação de Ressonância Magnética Nuclear para o estudo de biofluidos humanos. Em 2000, Fiehn e colaboradores publicaram sua pesquisa definindo a aplicação de GC-MS para o estudo do metabolôma de plantas. Estes trabalhos deram início a um entendimento mais amplo de sistemas biológicos de maneira integral, tornando uma necessidade o fornecimento de descrições qualitativas e quantitativas das propriedades emergentes do sistema como um todo. Um sistema biológico pode ser categorizado em quatro constituintes principais: genes, produtos da transcrição, proteínas e metabólitos. Os metabólitos, enquanto unidade básica destes sistemas, se encontram em posição de vantagem para estudo, podendo fornecer informações sobre todos os outros níveis.

As principais técnicas analíticas empregadas para estudos metabolômicos e metabonômicos são baseadas na ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (MS). Isto é devido ao fato de as duas técnicas apresentarem informações espectroscópicas e estruturais relevantes em uma grande variedade de compostos com grande precisão analítica. Entretanto, na MS a amostra interage fisicamente com o instrumento de análise, o que pode causar alterações nas

respostas em curto ou médio prazo. O aumento de publicações sobre o estudo de metabólitos através da RMN e da MS pode ser visto na Figura 1-1.

Figura 1-1: O crescimento no número de publicações de metabolôma ou metabonôma descrito no *Web of Knowledge*. Publicações descrevendo aplicações em RMN em preto, em MS em branco e outras técnicas em cinza.

Fonte: Dunn et al., 2011, p.393.

A espectroscopia de RMN destaca-se por fornecer informações detalhada sobre a estrutura molecular de compostos puros e em misturas complexas, mas pode também ser usada para sondar a mobilidade e a dinâmica de metabólitos moleculares através da interpretação dos tempos de relaxação dos spins nucleares e pela determinação dos coeficientes de difusão molecular. (Liu, Nicholson e Lindon, 1996)

1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das mais importantes técnicas analíticas, com aplicações em química, física, medicina, agricultura, alimentos, materiais, entre outras áreas. A importância de suas aplicações pode ser notada pelos prêmios Nobel outorgados a F. Bloch e E. Purcell, Prêmio Nobel de Física de 1952, pela descoberta da RMN; R. Ernst, Prêmio Nobel de Química de 1991, pelo desenvolvimento da técnica de pulso e RMN multidimensional; K. Wuthrich, Prêmio Nobel de Química de 2002, pelo desenvolvimento da metodologia de determinação de estrutura de proteínas em solução por RMN; e P. C. Lauterbur e P. Mansfield,

Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 2003, pelo desenvolvimento da Tomografia por RMN.

Quando comparada a outras técnicas analíticas, a RMN é certamente a técnica com maior número de aplicações, sendo usada desde quantificação do teor de hidrogênio de combustíveis até a determinação em solução da estrutura tridimensional de proteínas com milhares de átomos. Além disso, é uma técnica não destrutiva, o que possibilita efetuar análises químicas em seres vivos de maneira não invasiva. (Venâncio *et al.*, 2005)

Usualmente são adquiridos espectros de RMN 1D de ^1H e ^{13}C e 2D de ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^{13}C HSQC. O conjunto de informações oferecidos por estas técnicas costuma ser suficiente para a caracterização das amostras e identificação dos metabólitos presentes. Em muitos casos, a concentração de metabólitos não é suficiente para observação direta de ^{13}C , estas informações são obtidas indiretamente pelo espectro de HSQC.

1.2.1. Supressão do sinal da água em espectros de RMN de ^1H

Na análise de amostras biológicas, o solvente utilizado para extrair e solubilizar os metabólitos é a água. Mesmo quando apenas água deuterada é utilizada, o sinal da água costuma ser intenso e sobrepor sinais de outros metabólitos, sendo necessária a utilização de técnicas de supressão deste sinal. Várias técnicas foram desenvolvidas ao longo dos anos para tal finalidade, dentre elas as sequências de pré-saturação (zgpr no padrão Bruker), pré-saturação com pulsos compostos (zgcprr no padrão Bruker), WET (*Water suppression Enhanced through T1 effects*, wetdc no padrão Bruker), WATERGATE (*WATER suppression by Gradient Tailored Excitation*, p3919gp no padrão Bruker), a versão 1D da sequência de NOESY (noesypr1d no padrão Bruker) e a *excitation sculpting* (zgesgp no padrão Bruker).

A técnica de *excitation sculpting*, proposta primeiramente por Hwang e Shaka em 1995 é basicamente uma sequência de spin-eco com pulsos de gradiente de campo magnético antes e depois dos pulsos de refocalização, como pode ser visto na Figura 1-2. A diferença desta técnica, segundo os autores, é que utilizando dois níveis diferentes de gradiente entre dois pulsos de refocalização, não ocorrerá nenhuma refocalização de magnetização indesejada. Desta forma, o valor do pulso de

refocalização se torna secundário uma vez que qualquer valor de pulso vai retornar à magnetização transversa para a sua posição original. Devido à sua robustez e simplicidade esta sequência foi escolhida como técnica para supressão do sinal da água neste trabalho.

Figura 1-2: Esquema da sequência de pulsos de ^1H com saturação do sinal da água. No padrão Bruker, zgesgp. Onde d1 é o tempo de preparação, delta são tempos de evolução, p12sp1 é o pulso seletivo para supressão do sinal da água e G1 e G2 são pulsos de gradiente.

Fonte: TopSpin 3.x – advanced NMR methods; user manual. Bruker, 2010, p.157.

1.2.2. Espectros bidimensionais

Os espectros 1D de RMN são projeções da intensidade do sinal versus frequência. Na espectroscopia de RMN bidimensional a intensidade é projetada em função de duas frequências, normalmente chamadas de F1 e F2. Desta forma, a posição dos picos em um espectro 2D será dada por coordenadas correspondentes a estas frequências. (Claridge, 1999)

Em um espectro 1D, os acoplamentos escalares dão origem à multiplicidade do sinal, também conhecidos por multipletos. Na RMN 2D um fenômeno similar ocorre, onde um conjunto de picos individuais se agrupam dando a impressão de um quadrado ou retângulo agrupado. Estes “multipletos” bidimensionais existem em duas situações: picos diagonais que são centralizados na mesma coordenada de frequência de F1 e F2 e picos cruzados, que ocorrem em diferentes coordenadas de frequência de F1 e F2. (Keeler, 2002)

Os espectros bidimensionais são adquiridos em função de duas variáveis de tempo, t_1 e t_2 e todas as sequências 2D seguem o esquema geral:

Onde no período de preparação a amostra é excitada por um ou mais pulsos e é permitido que a magnetização resultando evolua no período t_1 . No período seguinte, de mistura, a amostra é novamente pulsada e finalmente no período t_2 o sinal é adquirido. (Keeler, 2002)

A aquisição do espectro 2D é realizada da seguinte maneira: primeiramente, t_1 é colocado em zero, a sequência de pulsos acontece e o sinal é adquirido. Quando os spins retornam ao equilíbrio, t_1 é colocado em D1, um tempo arbitrário diferente de zero, específico para cada tipo de experimento e amostra. A sequência de pulsos é aplicada novamente e o sinal adquirido. Após o retorno dos spins ao equilíbrio, t_1 é colocado em 2D1 e tudo se repete. Esse processo normalmente é repetido entre 50 e 500 incrementos de t_1 , obtendo-se um decaimento livre de indução de t_1 em função de t_2 . (Kriwacki e Pitner, 1989)

1.2.2.1. *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY)

A técnica de TOCSY fornece informações sobre relações geminais e vicinais entre os prótons de uma molécula através dos acoplamentos escalares, mas também é capaz de fornecer correlações entre prótons que estão no mesmo sistema de spins, estejam eles diretamente acoplados um ao outro ou não.

A habilidade de transferir magnetização desta maneira provê uma poderosa ferramenta para o mapeamento de correlações, por fazer ainda mais uso da maior dispersão obtida pelos espectros 2D. Esta habilidade é ainda mais vantajosa em sistemas com bastante sobreposição. (Claridge, 1999)

O período de transferência de coerência na sequência de TOCSY ocorre durante o tempo de mistura, chamado aqui de *spin-lock* de pulsos múltiplos. A sequência de TOCSY mais comumente utilizada, ilustrada na Figura 1-3 é a MLEV (mlevphpp no padrão Bruker). O período de tempo de *spin-lock* determinará quão longe será detectada a interação. (Bax e Davis, 1985)

Os picos cruzados adicionais vistos no TOCSY (Figura 1-4), como dito, provêm a correlação entre todos os spins de um sistema, auxiliando a identificação da existência de unidades discretas dentro de uma mesma molécula.

Figura 1-3: Esquema de pulsos da sequência padrão de um experimento de TOCSY. No padrão Bruker, mlevphpp. Ela consiste num tempo de preparação d1, dois pulsos de radiofrequência separados pelo tempo de evolução, d0. O primeiro pulso é de 90 graus e o segundo pulso é o spin-lock de pulsos múltiplos (MLEV-17).

Fonte: TopSpin 3.x – introduction to NMR methods; user manual. Bruker, 2010, p.157.

Figura 1-4: Espectro de RMN 2D de ^1H - ^1H TOCSY de uma molécula de açúcar. Os picos cruzados aparecem para os spins acoplados como também para aqueles que embora não estejam acoplados, estão no mesmo sistema de spin e sofrem influência da propagação da magnetização.

Fonte: Claridge, 1999, p. 202.

1.2.2.2. Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)

A técnica de HSQC provê correlações de deslocamento químico heteronucleares para uma ligação. Somente a magnetização transversa evolui durante o período t_1 sendo esta magnetização gerada pela transferência de polarização dos hidrogênios ligados ao heteroátomo pela sequência de INEPT. Os picos cruzados não contém acoplamento ^1H - ^1H homonuclear durante t_1 uma vez que

apenas a magnetização do heteronuclear evolui neste período, o que permite uma boa resolução nesta dimensão, uma das principais vantagens do experimento de HSQC. (Reynolds *et al.*, 1997)

De maneira resumida, a magnetização do núcleo X (onde X pode ser ^{13}C , ^{15}N etc) evolui durante o tempo t_1 com o pulso de 180° no canal do próton refocalizando a evolução do acoplamento H-X, o que causa o seu desacoplamento, permitindo a evolução apenas do acoplamento heteronuclear. Após este período, a magnetização é transferida de volta pela sequência de INEPT reversa, que produz novamente a magnetização em fase do hidrogênio, que será detectada e adquirida com o átomo X desacoplado. (Claridge, 1999)

A sequência padrão de HSQC mais comumente utilizada é mostrada na Figura 1-5 e um espectro de ^1H - ^{13}C HSQC de um açúcar é exibido na Figura 1-6.

Figura 1-5: Esquema de pulsos da sequência padrão de um experimento de HSQC. No padrão Bruker, hsqcedetgp.

Fonte: TopSpin 3.x – introduction to NMR methods; user manual. Bruker, 2010, p.112.

Figura 1-6: Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC da molécula de dissacarídeo representada abaixo. Como o próton e o carbono estão em frequências diferentes, não existem picos diagonais no espectro de HSQC.

Fonte: Claridge, 1999, p. 240.

1.3. Metabolômica – RMN

A RMN se tornou uma ferramenta muito importante no estudo dos metabólitos. Ela vem sendo usada a mais de 20 anos na pesquisa de perfis metabólicos. Os metabólitos celulares podem ser analisados simultaneamente tanto por RMN de ^1H , quanto por outros núcleos como ^{13}C e ^{31}P . (Dunn *et al.*, 2011) Muitas doenças foram extensivamente investigadas através da metabonômica, como o câncer, diabetes e doenças cardiovasculares e neurológicas. (Madsen, Lundstedt e Trygg, 2010; Mamas *et al.*, 2011; Nordström e Lewensohn, 2010; Vinayavekhin e Saghatelian, 2009).

A espectroscopia de RMN possui benefícios por ser quantitativa, altamente reprodutível e, diferente de outras técnicas, não-seletiva. Ademais, os sinais presentes em um espectro de RMN provêm grande quantidade de informação estrutural e permitem a identificação de constituintes individuais dentro de uma amostra através da interpretação, dentre outras coisas, do deslocamento químico e das constantes de acoplamento. (Dunn *et al.*, 2011)

A preparação de amostras para experimentos metabolômicos de RMN é relativamente mínima. Uma pequena quantidade de solvente deuterado como D₂O ou CDCl₃ é adicionado para prover o sinal do *lock* de frequência, usados para controlar as possíveis flutuações do campo magnético. Um composto referencial para o deslocamento químico, como o DSS ou o TMSPd₄, pode também ser adicionado.(Dunn *et al.*, 2011)

Em geral, tubos de RMN de 3 ou 5 mm são usados para análises, e são necessários 200 ou 600 µL de amostra para cada um dos tubos, respectivamente. Tais volumes preenchem o volume de observação da bobina completamente, maximizando a sensibilidade e permitindo um *shimming* (homogeneização de campo) mais fácil. (Dunn *et al.*, 2011)

Usando uma sequência de pulso como a CPMG, normalmente pode-se identificar de 20 a 40 metabólitos em extratos de tecido (Griffin *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2003), de 30 a 100 metabólitos em urina (Beckwith-Hall *et al.*, 1998; Connor *et al.*, 1998) e de 30 a 65 metabólitos em plasma ou soro sanguíneo. (Brindle *et al.*, 2002; Kirschenlohr *et al.*, 2006; Nagana Gowda, Gowda e Raftery, 2015)

Atualmente existem várias ferramentas para auxiliar a identificação metabólica a partir de espectros de RMN. Bases de dados como BMRB (*Biological Magnetic Resonance data Bank*) e HMDB (*Human Metabolome Data Base*) possuem espectros de RMN de 1D e 2D, bem como informações sobre os metabólitos, atribuição dos sinais entre outras informações. Softwares como ChenoMX, que utilizam uma abordagem de *profiling* de metabólitos alvos facilitam a identificação de moléculas em espectros de 1D. Somando a estas ferramentas, muitos grupos dedicados ao estudo metabolômico por RMN oferecem páginas na internet com ferramentas para busca de compostos em espectros 2D, como o Complex Mixture Analysis by NMR (COLMAR) e ferramentas quimiométricas específicas para análise de dados metabolômicos, como o MetaboAnalyst. (Geladi *et al.*, 2004; Hopke, 2003; Lavine e Workman, 2002; Pan *et al.*, 2007)

1.3.1. ChenoMX NMR Suite

A identificação inequívoca de compostos é praticamente a parte mais importante de um estudo metabólico, porém continua sendo um dos maiores desafios

para pesquisadores, podendo ser considerada como um gargalo limitante na caracterização de metabólitos e identificação de biomarcadores. (Koulman *et al.*, 2009) O *profiling* de metabólitos alvos é uma ferramenta que permite a caracterização de compostos em função de suas assinaturas espectrais, como o deslocamento químico e acoplamento escalar. (Weljie *et al.*, 2006) O software ChenomX utiliza o *profiling* de metabólitos alvos combinando ferramentas de análise espectral com uma base de dados própria com mais de 300 compostos e sua interface gráfica é ilustrada na Figura 1-7.

O primeiro passo após adquirir um espectro e fazer os ajustes de fase e linha de base, que podem ser feitos pelo ChenomX processor, é calibrar a “referência de deslocamento químico” (CSI), normalmente utilizando o DSS ou TSPd4 como referência. O correto ajuste do CSI permitirá ao software ajustar com precisão o deslocamento químico dos outros compostos bem como calcular a concentração dos metabólitos presentes baseando-se na área do CSI e na concentração deste, informada pelo usuário.

A busca por compostos pode ser feita de duas formas: procurando pelo nome de um composto específico ou gerando uma lista de compostos que apresentam sinal em uma região (por exemplo, 0,90 ppm). Ao analisar um composto com vários grupos de sinais, deve-se fazer o ajuste da sobreposição utilizando um sinal simples e de preferência isolado de outros sinais. Se houve saturação do sinal da água durante a aquisição do espectro, é ideal que sejam utilizados picos distantes do pico da água devido a supressão que picos próximos a essa região possam sofrer.

1.3.2. *Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB)*

A base de dados BMRB tem o objetivo de recolher, arquivar e disseminar mundialmente, e em domínio público, espectros e dados quantitativos derivados de investigações de macromoléculas biológicas e metabólitos por espectroscopia de RMN. (Ulrich *et al.*, 2007) Ela pode ser acessada pelo endereço www.bmrwisc.edu onde o espectroscopista terá à sua disposição bases de dados de proteínas, peptídeos, aminoácidos e outros metabólitos.

Na sessão dedicada à metabolômica, pode-se buscar metabólitos por nome, por massa molecular, além de uma busca ampla com alguns ou todos os picos de ^1H em espectros 1D ou ^1H e ^{13}C em espectros 2D de HSQC.

A maioria dos compostos possui informações como concentração e pH da amostra pura, além da temperatura, referência e campo magnético utilizados para aquisição dos espectros. Estão disponíveis espectros de 1D de ^1H e ^{13}C e espectros 2D de ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^{13}C HSQC, bem como a atribuição dos átomos de hidrogênio e carbono da molécula.

Figura 1-7: Identificação de compostos em espectro de RMN 1D de ^1H por *profiling* de metabólitos alvo. Em preto é mostrado o espectro da amostra sendo estudada, o espectro do composto puro pode ser visto em azul e a soma do sinal de todos os compostos ajustados pode ser vista em vermelho. Em a) é mostrado a identificação da glicose quando os picos do espectro são facilmente sobrepostos pelos picos do composto padrão e em b) é mostrado que mesmo o duplete em 2,43 ppm estando sobreposto, a identificação da carnitina pode ser feita pelo singleto em 3,21 ppm.

Fonte: <http://www.chenomx.com/news/img/page23/Chenomx.an010.pdf> acesso em 09/08/2016

1.3.3. Human Metabolome Database (HMDB)

Similar a BMRB, a HMDB é uma base de dados eletrônica disponível publicamente contendo informação detalhada sobre metabólitos encontrados no corpo

humano. Seu objetivo é fornecer informações para o uso em metabolômica, química clínica, descobrimento de marcadores e educação em geral. Ela contém cerca de 42 mil metabólitos solúveis em água ou lipídios. Está ligada a mais 6 bases de dados, dentre elas a KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). (Wishart *et al.*, 2013)

A busca nesta base de dados pode ser feita por nome, massa molecular, picos de espectros de RMN de 1D e 2D bem como picos de espectrometria de massas. Cada um dos compostos catalogados pode oferecer informações como a identificação metabólica, taxonomia química, ontologia, propriedades físicas e biológicas, concentrações normais e anormais em fluidos biológicos e espectros de cromatografia líquida e gasosa com detecção na espectrometria de massas além de espectros de RMN de 1D e 2D.

1.3.4. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*

Esta base de dados tem como objetivo auxiliar na compreensão de células, organismos e até do ecossistema, a partir de informação genômica e molecular. É uma representação virtual de sistemas biológicos, que consiste nos blocos de construção moleculares de genes, proteínas e metabólitos que estão integrados com o conhecimento dos diagramas de redes moleculares, das suas reações e relações. Contém também informações sobre doenças e fármacos como perturbações no sistema biológico. (Kanehisa *et al.*, 2014; Ogata *et al.*, 1999)

1.3.5. *Complex Mixture Analysis by NMR (COLMAR)*

COLMAR é um algoritmo de análise de espectros de RMN, que analisa principalmente espectros de ^1H - ^{13}C HSQC. A base de dados utilizada por este algoritmo possui, em 2016, 555 compostos extraídos das bases BMRB e HMDB. Pode ser acessado pelo endereço <http://spin.ccic.ohio-state.edu>.

O diferencial deste algoritmo na investigação de espectros de ^1H - ^{13}C HSQC é que ele consegue identificar isômeros com baixa taxa de conversão que pertençam ao mesmo metabólito, o que permite uma busca mais precisa no caso de um dos isômeros ter pouca sobreposição espectral e por isto estar abaixo do limite de detecção do HSQC. Os picos cruzados dos espectros de HSQC das bases de dados

foram divididos em diferentes estados isoméricos, permitindo uma busca individual para cada estado isomérico. (Bingol *et al.*, 2015)

Primeiramente deve-se fazer uma lista de sinais do espectro de HSQC e submeter esta lista no campo de busca da página. O usuário será direcionado para uma página semelhante à mostrada na Figura 1-8, onde ele terá acesso aos picos do espectro com correspondência nas bases de dados e aos metabólitos identificados pelo algoritmo de busca.

Figura 1-8: Captura de tela da página do COLMAR ^1H - ^{13}C HSQC web server. A lista de picos de HSQC mostra os 165 picos cruzados de extrato metabólico de *Drosophila melanogaster*. A janela inferior mostra a posição dos picos cruzados (círculos azuis e cruzes pretas) em um plano 2D correspondendo ao espectro 2D de HSQC. Os círculos de borda azul representam os picos cruzados de HSQC que correspondem a um único composto na base de dados, os círculos azuis cheios correspondem aos picos cruzados de múltiplos compostos e as cruzes pretas correspondem a picos que não pertencem a nenhum composto da base de dados.

COLMAR ^{13}C - ^1H HSQC Query

Your name and institute*

Please paste your HSQC peak list (in ppm, 1st column: ^1H , 2nd column: ^{13}C , separated by space(s))

or
or read a spectral file into peak list field no file selected

```
0.6331 17.6835
1.7638 21.8624
2.9144 57.1096
1.3209 22.8866
4.1031 71.2299
3.4138 38.1058
3.2559 50.3041
2.3062 26.7139
2.7458 39.3274
3.0224 51.0619
```

^1H chemical shift cutoff (ppm): ^1H chemical shift range from to ppm

^{13}C chemical shift cutoff (ppm): ^{13}C chemical shift range from to ppm

data for database query and display.

Fonte: Bingol *et al.* 2015, p. 457.

1.3.6. MetaboAnalyst

MetaboAnalyst é um servidor de internet desenvolvido pelo grupo Wishart, o mesmo responsável pela base de dados HMDB, designado para análise, visualização e interpretação de dados metabolômicos de forma abrangente. Seu principal objetivo é oferecer uma variedade de procedimentos comumente utilizados para processamento, normalização e análise estatística multivariada de dados metabolômicos.(Xia e Wishart, 2010)

Ele foi desenvolvido para ser utilizado principalmente com dois tipos de situação: identificar características que são significativamente diferentes entre duas situações e utilizar dados metabolômicos para prever as condições sob estudo e classificá-las. Além disso, ele oferece ferramentas para a identificação de compostos relevantes e o mapeamento de caminhos metabólicos significativos.(Xia *et al.*, 2015)

Para análises estatísticas, o usuário pode utilizar uma tabela com a concentração dos metabólitos, bin espectral, tabela com a intensidade de picos ou uma lista de picos de RMN ou de Espectrometria de Massas. Após escolher o tipo de dado que será utilizado, o usuário é direcionado para uma tela onde pode escolher o tipo de normalização das amostras (por soma, por média, entre outras) e o tipo de escalonamento dos dados (centrado na média, auto escalonamento, escalonamento pareto ou escalonamento de alcance). Logo após, será possível visualizar as análises estatísticas realizadas, como a análise de componentes principais (PCA), análise de discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), Dendogramas e Heatmaps, dentre várias outras opções.

1.3.7. Pré-tratamento de dados e análises estatísticas

Na pesquisa metabolômica, existem algumas etapas entre a obtenção das amostras biológicas a serem estudadas e a interpretação dos resultados. Primeiro as amostras são extraídas e preparadas para análise. Em seguida, diferentes etapas de pré-processamento de dados são aplicadas em ordem para gerar dados “limpos” na forma de dados normalizados que refletirão na concentração dos metabólitos. Estes dados “limpos” podem então ser submetidos a pré-tratamento. Métodos de pré-tratamento escalonam dados “limpos”. Assim, seu foco são as informações relevantes

dos dados, de origem biológica, reduzindo fatores de perturbação como ruído da medida. (Berg, van den *et al.*, 2006)

Dentre as técnicas disponíveis de pré-tratamento, estão os métodos de escalonamento, que são abordagens que dividem cada variável pelo fator de escalonamento, que é diferente para cada variável, visando ajustar as diferenças entre os diferentes metabólitos em diferenças de concentração relativas ao fator de escalonamento. O escalonamento por dispersão de dados mais comum é o auto escalonamento, que usa o desvio padrão como fator de escalonamento.

O escalonamento de Pareto utiliza como fator de escalonamento a raiz quadrada do desvio padrão. Neste método, grandes variações de intensidade ou concentração são mais reduzidas do que pequenas variações, tornando-as menos dominantes quando comparadas com os dados “limpos”. A vantagem deste escalonamento é que os dados escalonados se mantêm mais próximos à medida original do que os dados auto escalonados.

Todas as ferramentas e métodos de identificação de compostos e análise estatística de dados metabolômicos aqui discutidas tem por finalidade facilitar o trabalho do espectroscopista em RMN. A quantidade de novas tecnologias sendo desenvolvidas para a metabolômica de RMN serve para ilustrar o crescimento e importância da área e um dos objetivos desta tese é então, utilizar algumas das ferramentas disponíveis em situações reais de pesquisa, contribuindo não só com outros pesquisadores, mas também com a área de metabolômica em RMN.

Na próxima seção serão estudadas as diferenças metabólicas entre duas espécies do protozoário causador da leishmaniose e as alterações biológicas causadas pela adição de dois fármacos na cultura destas duas espécies. No Capítulo 3 serão analisadas outras situações biológicas que se beneficiaram com o estudo metabolômico por RMN. As técnicas de RMN e metabolômica discutidas neste capítulo serão empregadas nos capítulos a seguir.

Capítulo 2. Análise do perfil metabólico de Leishmania por Ressonância Magnética Nuclear

2.1. Doenças Tropicais Negligenciadas

Doenças bacterianas e parasitárias tropicais, sabidamente negligenciadas segundo a Organização Mundial da Saúde, estão entre as infecções consideradas graves e que afetam cerca de 2,7 bilhões de pessoas que vivem com menos de 1 dólar por dia. Tais doenças, como a doença de Chagas, a dengue, a leishmaniose e a esquistossomose, matam cerca de 530 mil pessoas por ano em todo o mundo. Estas doenças causam um impacto na produtividade dos países, acarretando perdas anuais de bilhões de dólares e mantendo países de baixa renda na pobreza. (World Health Organization, 2009)

Por muito tempo, as doenças negligenciadas receberam pouca ou nenhuma atenção, apesar de sua magnitude e impacto na economia e qualidade de vida. Esta falta de atenção é originalmente causada por dois fatores: não ter um índice de mortes tão alto quanto, por exemplo, o câncer ou não afetar tantas pessoas como a AIDS e não atingir diretamente populações vivendo em países ricos, como os Estados Unidos e o Japão. O sucesso no combate a esta situação reside na habilidade de criar uma consciência global e no investimento ao controle destas doenças que acelerará o desenvolvimento humano e econômico.

Estas doenças frequentemente se agrupam geograficamente, sobrepondo-se, e devido a isto indivíduos são com frequência, afetados por mais de um parasita. A grande maioria dos países pobres é afetada, simultaneamente, por pelo menos cinco doenças tropicais negligenciadas. (WHO, 2009)

Entre as doenças tropicais que possuem um aumento de casos recentemente ou que apresentam surgimento de formas resistentes aos poucos tratamentos disponíveis está a leishmaniose, que pode ser fatal na sua forma visceral se não for diagnosticada e tratada com eficácia.

2.1.1. Leishmanioses

A Organização Mundial de Saúde estima que 350 milhões de pessoas se encontrem em áreas com risco de contrair alguma forma de leishmaniose, 12 milhões estavam infectadas na última pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde

e 1,6 milhões de novos casos são esperados anualmente. A leishmaniose é uma doença predominantemente rural e existe em 88 países em 4 continentes. (WHO, 2009)

A Leishmaniose é uma doença causada por protozoários flagelados, do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*, transmitido através da picada de fêmeas de insetos dípteros da família *Psychodidae*, conhecidos por flebotomíneos, cujo ciclo de vida é ilustrado na Figura 2-1. Possui duas principais variações: a leishmaniose visceral e a cutânea. (World Health Organization, 2010)

A forma cutânea é a mais comum e causada por várias espécies, dentre elas a *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*. Normalmente causa úlceras no rosto, braços e pernas, chegando a produzir até 200 lesões em uma pessoa. Embora as úlceras desapareçam espontaneamente, elas causam incapacidade e cicatrizes severas e permanentes. A forma mucocutânea, variação da forma cutânea que invade as membranas do trato respiratório, causa mutilações e destrói os tecidos moles da boca, nariz e garganta. (WHO, 2010)

A Leishmaniose visceral, também conhecida como Kala-azar, ataca os órgãos internos e é a forma mais severa da doença, causada por espécies como *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum*. É o segundo maior assassino parasitário do mundo, depois da malária. O parasita ataca órgãos como o fígado, baço e até a medula óssea, podendo levar à morte caso não tratada. Os principais sintomas desta variação da doença são febre, perda de peso, anemia e inchaço do fígado e baço. Esta variação pode causar grandes epidemias, difíceis de erradicar, com altos índices de fatalidade. Cerca de 50 mil pessoas morrem por causa desta doença anualmente.

Dos 1,6 milhões de novos casos estimados anualmente, 500 mil são viscerais (90% ocorrendo em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Sudão) e 1,1 milhão, cutânea (90% dos casos no Afeganistão, Argélia, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita, Sudão e República Árabe da Síria) ou mucocutânea (90% ocorrendo no Brasil, Peru e Bolívia). No Brasil existem sete espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença em humanos e mais de 200 espécies de flebotomíneos capazes de realizar a transmissão dos protozoários. (World Health Organization, 2008)

Figura 2-1: Ciclo de vida da *Leishmania* sp.

Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e0/Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, outro problema grave é a infecção mútua da leishmaniose com a HIV. O protozoário pode residir em indivíduos por décadas de forma assintomática. Entretanto, estes casos evoluem rapidamente para leishmaniose visceral severa em pessoas imunossuprimidas. Ao mesmo tempo, em pessoas contaminadas pelo vírus HIV, a leishmaniose acelera o começo da AIDS por imunossupressão cumulativa e através do estímulo da replicação do vírus. Devido à esta coinfeção, a leishmaniose visceral não está mais restringida a áreas endêmicas e os números destes casos só tendem a aumentar. (WHO, 2009)

O Brasil experimentou um aumento brusco nos casos de leishmaniose visceral desde 1999. Historicamente, o Brasil vive ciclos de epidemias rurais a cada 10 anos, mas a leishmaniose começou a aparecer também em áreas urbanas na última década. Isso pode ser explicado pela grande migração de pessoas das áreas rurais para as áreas suburbanas, aumentando a densidade populacional e introduzindo o protozoário em hospedeiros não-imunes. (Ministério da Saúde, 2003)

Segundo o Ministério da Saúde, a leishmaniose visceral encontra-se amplamente difundida, ocorrendo em 19 dos 27 estados brasileiros. Além disso, já houveram surtos da doença relatados nas cidades de Teresina (PI), Natal (RN), São

Luís (MA), Santarém (PA), Fortaleza (CE), Belo Horizonte (MG), Rio de Janeiro (RJ), Palmas (TO) e Araçatuba (SP). (Ministério da Saúde, 2003)

Por mais de 70 anos, a primeira opção de tratamento na maioria dos países foi a aplicação de antimoniais pentavalentes (stibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina). O tratamento é lento, potencialmente tóxico e doloroso requerendo a internação do paciente e administração da droga por via intravenosa. Além disso, se tornou ineficaz em partes da Índia e do Nepal, uma vez que o protozoário se tornou resistente ao tratamento nestas regiões. (Sundar, 2001)

No caso de reincidência, os pacientes precisam de um tratamento com fármacos de maior toxidez, de segunda linha, como a anfotericina B ou a pentamidina. A formulação lipídica recentemente desenvolvida de anfotericina B é altamente efetiva, quase não possui efeitos colaterais e é atualmente a preferida para o tratamento da variante visceral da doença. O problema deste medicamento é que ele é muito caro para ser usado pelos países em desenvolvimento. (World Health Organization, 2005, WHO, 2010)

Atualmente estão disponíveis para tratamento da doença seis fármacos com atividade antileishmania: antimoniais pentavalentes, anfotericina B, miltefosina, paromomicina, sitamaquina e pentamidina. Optou-se por trabalhar neste projeto com miltefosina e paromomicina. A primeira, por ser a única droga com tratamento por via oral e ser a menos tóxica para o hospedeiro humano, além de não ter sua atividade completamente entendida. Já a segunda droga apresenta atividade conhecida para leishmaniose visceral e cutânea e foi escolhida por poder apresentar resultados interessantes para a análise. (SINGH et al., 2012)

Embora não sejam completamente definidos os mecanismos de atuação de ambos os fármacos, é sabido que elas atuam diretamente nos mecanismos de obtenção de energia da *Leishmania*. A miltefosina tem ação conhecida nas mitocôndrias de *L. donovani*, influenciando também os níveis de instauração de ácidos graxos. (Dorlo et al., 2012; Sundar e Olliaro, 2007) A paromomicina, por sua vez, estudada em espécies de *Leishmania* resistentes a este fármaco, atuou diretamente no ciclo de Krebs (ou *TCA cycle - tricarboxylic acid cycle*) e no metabolismo de lipídeos. (Chawla et al., 2011; Jhingran et al., 2009) Desta maneira, embora outros mecanismos de atuação sejam sugeridos para estes fármacos, há evidências de que ambas, direta ou indiretamente, afetem a mitocôndria do protozoário.

2.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a análise do perfil metabólico de *Leishmania major* Friedlin e *Leishmania donovani* DD8, por RMN.

Os objetivos específicos foram:

- 1- Análise metabolômica comparativa de *L. major* (leishmaniose cutânea) e *L. donovani* (leishmaniose visceral) em suas formas promastigotas.
- 2- Análise metabonômica e testes comparativos empregando fármacos (miltefosina e paromomicina) em culturas de *L. major* e *L. donovani*.
- 3- Emprego de técnicas quimiométricas para comparação das diferenças metabólicas existentes entre as diferentes espécies e diferentes formas de cultivo.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1. Meio de cultura, forma de crescimento

Cada litro de meio de cultura utilizado para o cultivo das cepas de *Leishmania* foi preparado da seguinte maneira:

- 100 g de meio 199 (Sigma-Aldrich)
- 40 mL de solução de hepes 1M a pH 7,5 (Gibco)
- 10 mL de adenina 10mM (Sigma-Aldrich)
- 1 mL de biotina 0,1% (Sigma-Aldrich)
- 2 mL de hemina 0,25% (Sigma-Aldrich)
- 5 mL de Penicillin Streptomycin (Gibco)
- 100 mL de soro fetal bovino (Gibco)

Após a mistura de todos os componentes, o meio foi esterilizado por filtração e foi feito posterior teste de esterilidade do meio.

As culturas foram então inoculadas em frascos para cultura celular de 60 mL da *Techno Plastic Products*, na proporção 0,1 mL de cultura para 9,9 mL de meio para *L. major* e *L. donovani*. O repique foi feito na fase estacionária de cada cepa.

2.3.2. Curvas de crescimento

A contagem de células para construção das curvas de crescimento foi feita com um hemocitômetro com retículo de Neubauer, que pode ser visto na Figura 2-2. Neste tipo de contador têm-se uma área total de 9 mm² divididos em quadros de 1mm² cada

um. A distância entre a câmara e a lamínula é também de 1 mm, o que confere a cada quadrante, um volume de 1 mm³. Para a conversão deste volume em cm³ ou mL, basta multiplicar a contagem por 10⁴, pois esta é a diferença de volume entre 1 mm³ e 1 cm³. Na Figura 2-3 é possível observar uma cultura de *L. major* na câmara de Neubauer no aumento utilizado para a contagem dos microrganismos.

Figura 2-2: Ilustração da câmara de Neubauer.

Fonte: <http://www.hemocytometer.org/> acesso em 20/07/2016

Figura 2-3: Câmara de Neubauer vista no microscópio com aumento de 20x.

2.3.3. Preparação das amostras de RMN

No quinto dia após a inoculação dos protozoários (primeiro dia da fase estacionária) foi feita a centrifugação de 250 mL do meio de cultura à 3000 G e 5 °C por 20 minutos. O sobrenadante (meio de cultura) foi descartado e os protozoários precipitados foram lavados em PBS (*Phosphate Buffer Solution*) pH 7,2, ressuspensos

e centrifugados novamente, nas mesmas condições. Esse procedimento foi realizado 3 vezes, com o intuito de lavar todo o meio de cultura das células precipitadas.

As células foram então submetidas a processo de quebra com nitrogênio líquido e banho térmico a 37 °C por 6 vezes. Após essa etapa, a suspensão foi novamente centrifugada, obtendo-se o sobrenadante com os metabólitos de interesse e o precipitado descartado. O sobrenadante foi congelado e armazenado até que todos os sobrenadantes a serem analisados fossem coletados. Após este fato, os sobrenadantes foram submetidos a processo de secagem em uma *CentriVap Benchtop Vacuum Concentrator* da Labconco. O pó resultante referente a cada amostra foi ressuspensão em 700 µL de D₂O e filtradas em centrífuga com filtro de 20 µm Corning Costar Spin-X.

As amostras de RMN foram preparadas com 630 µL de extrato de *Leishmania* em D₂O e 70 µL de solução 1 mM de TSPd4 em D₂O. Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600 equipado com uma sonda criogênica de 5 mm no Centro Nacional de Ressonância Magnética de Madison (NMRFAM), em Madison, Wisconsin, Estados Unidos. A técnica de *excitation sculpting* foi utilizada para suprimir um eventual sinal de água presente. Os espectros de ¹H foram adquiridos com 256 aquisições e a temperatura regulada a 25 °C.

As amostras de RMN foram então concentradas com uma *speedvac* para 60 µL e espectros 2D foram adquiridos em um Bruker Avance III 600 equipado com uma sonda criogênica de 1,7 mm também localizado no NMRFAM. Espectros de ¹H-¹H TOCSY (sequência de pulsos *dipsi2esgpph* no padrão Bruker) e ¹H-¹³C HSQC (*hsqcetgpsisp2.2* no padrão Bruker) foram adquiridos com 256 incrementos, 32 transientes e tempo de espera para relaxação (RD) de 1 s. A largura espectral para ¹H nos dois experimentos foi de 16 ppm e para ¹³C foi de 175 ppm.

2.3.4. Análise metabolômica de *Leishmania sp.*

Com o objetivo de estabelecer padrões comparativos em culturas da espécie *Leishmania sp.*, foi feita inicialmente uma abordagem na qual os níveis normais de metabólitos foram estudados na forma promastigota do parasita, a fim de servirem como referência para os experimentos com os fármacos, onde provavelmente haveriam alterações no metabolismo destes organismos.

Seis amostras de *L. major* Friedlin e seis amostras de *L. donovani* DD8 foram cultivadas e seus extratos analisados por RMN 1D de ^1H e 2D de ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^{13}C HSQC. Os espectros 1D foram analisados pelo software ChenomX e os 2D pelo software TopSpin com auxílio das bases de dados BMRB e HMDB.

Com o perfil metabólico do organismo em questão determinado foi possível, através da conjugação entre RMN e ferramentas exploratórias quimiométricas, realizar a comparação de espectros das duas espécies. Neste caso, ferramentas como PCA (*Principal Component Analysis*) e PLS-DA (*Partial Least Square – Discriminant Analysis*) foram de grande utilidade, por permitirem a identificação dos metabólitos responsáveis pela distinção das amostras. As amostras foram normalizadas pela soma e as variáveis escalonadas por Pareto. As análises estatísticas foram realizadas pelo MetaboAnalyst.

2.3.5. Estudo de dose letal mediana de miltefosina e paromomicina e análise metabólica de culturas cultivadas com estes fármacos.

Para a realização dos ensaios com fármacos, primeiramente foi necessária a determinação da dose letal mediana (LD50) dos fármacos utilizados nos experimentos de metabônoma. Foi utilizado um método colorimétrico, que consistiu na adição de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboxi-metoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio (MTS) em uma placa de 96 poços contendo culturas de *L. major* e *L. donovani* com diferentes concentrações dos fármacos.

O composto de MTS (reagente de Owen) é biorreduzido pelas células ativas a formazan, um produto colorido, que é detectado por espectrômetros de UV-vis. Segundo Berridge, essa conversão é realizada, presumivelmente por NADPH ou NADH, produzido por enzimas em células metabolicamente ativas. (Berridge e Tan, 1993)

Os ensaios foram realizados por adição de 20 μL de MTS diretamente aos poços contendo cultura de células. (Vobecky *et al.*, 1989) Após a adição, esperou-se por 1 hora e em seguida leu-se a absorbância em 490 nm no equipamento Spectramax da Molecular Devices.

Definida a LD50 para os dois fármacos, no terceiro dia após a inoculação dos protozoários no meio de cultura, 35 mg/L de miltefosina e 150 mg/L de paromomicina

foram adicionadas a diferentes culturas de *L. major* e *L. donovani*. As culturas foram mantidas em incubação até o quinto dia, quando foram submetidas ao mesmo protocolo de extração das culturas crescidas sem os fármacos.

Quatro amostras de *L. major* Friedlin com miltefosina e quatro amostras com paromomicina, além de quatro amostras de *L. donovani* DD8 com miltefosina e quatro com paromomicina foram cultivadas e seus extratos analisados por RMN 1D de ^1H (sequência de pulsos zgesgp) e 2D de ^1H - ^1H TOCSY (sequência de pulsos dipsi2esgpph) e ^1H - ^{13}C HSQC (sequência de pulsos hsqcetgpsisp2.2). Os espectros 1D foram analisados pelo software ChenomX e os 2D pelo software TopSpin com auxílio das bases de dados BMRB e HMDB.

A análise estatística das amostras de *L. major* e *L. major* com fármacos foi realizada por PCA e as amostras de *L. donovani* e *L. donovani* com fármacos foram analisadas por heatmap, um tipo de análise estatística por cluster hierárquico. As amostras foram normalizadas pela soma e as variáveis escalonadas por Pareto e o heatmap foi feito utilizando a distância euclidiana e o acoplamento de Ward. As análises estatísticas foram realizadas pelo MetaboAnalyst.

2.4. Resultados e discussões

2.4.1. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento para as células de *L. major* e *L. donovani* podem ser vistas na Figura 2-4. É possível distinguir as quatro fases de crescimento do protozoário: fase lag, onde as células estão ativas, mas ainda não há muito crescimento; está ocorrendo uma adaptação ao meio. Fase log ou fase exponencial, onde a formação de protozoários supera a morte destes e com espaço e nutrientes suficientes observa-se crescimento populacional. Fase estacionária, onde a capacidade máxima populacional que o meio consegue suportar é atingida e nenhuma mudança significativa em relação à população é observada, embora os protozoários ainda estejam consumindo os nutrientes do meio. Fase de declínio ou apoptose, onde a morte das células é maior que a sua produção e os nutrientes do meio se tornam escassos, levando a uma queda populacional.

Saber o período que a cultura se encontra em fase log e quando ela entra em fase estacionária é de extrema importância para a realização de todos os experimentos, o que justifica a necessidade de atenção com esta etapa da pesquisa.

Analisando a Figura 2-3 conclui-se que, com concentração inicial de 10^4 cel/mL para *L. major* e *L. donovani*, a partir do segundo dia inicia-se a fase log, que dura aproximadamente 3 dias. Assim, nos testes com fármacos, após a inoculação inicial, estes foram adicionados no terceiro dia e a cultura interrompida e as amostras para RMN preparadas no quinto dia, quando ocorre o início da fase estacionária.

Figura 2-4: Curva de crescimento de *L. major* e *L. donovani* partindo de concentração inicial de 1×10^4 cel/mL para ambas espécies.

2.4.2. Análise metabolômica de *L. major* Friedling e *L. donovani* DD8

Espectros de RMN de ^1H , ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^{13}C HSQC foram adquiridos para seis amostras de *L. major* e seis amostras de *L. donovani*. Os espectros tiveram fase e linha de base ajustados pelo software TopSpin (Bruker) e podem ser vistos nas Figura 2-6 e Figura 2-7, onde são mostradas as regiões de 0,8 ppm a 4,5 ppm e 5,0 ppm a 8,6 ppm respectivamente, com cerca de 400 sinais.

É importante notar que a intensidade do espectro nas duas figuras é diferente, visando facilitar a visualização dos picos menos intensos, presentes depois de 5 ppm. Para a construção do perfil metabólico das duas espécies do protozoário foi utilizado o software ChenomX (versão 8.2), gerando uma lista de metabólitos. Como pode ser

visto na Figura 2-5, os espectros de RMN de ^1H possuem regiões com sobreposição de sinais que dificultam a análise por 1D, como é mostrado na Figura 2-5.

Assim, espectros de TOCSY e HSQC foram utilizados para confirmar a presença dos metabólitos identificados por RMN 1D. Tais espectros foram analisados em conjunto com espectros de compostos puros disponíveis nas bases de dados BMRB e HMDB. A lista final de 50 metabólitos pode ser vista na Tabela 2-1. Os espectros de RMN 2D podem ser vistos no Apêndice A.

As concentrações dos metabólitos identificados em doze amostras de *Leishmania* foram calculadas usando o software ChemoMX (Apêndice B) e esses dados foram analisados pelo MetaboAnalyst. Esta página da web do grupo Wishart é uma ferramenta quimiométrica direcionada para a análise de dados metabólicos.

A concentração dos metabólitos de cada amostra foi normalizada dividindo-se a concentração de cada metabólito pela soma das concentrações de todos os metabólitos de uma mesma amostra. Em seguida, os dados escalonados por Pareto, o que significa que eles foram centralizados na média e depois divididos pela raiz quadrada do desvio padrão de cada variável. A primeira análise estatística realizada foi a análise de componentes principais (PCA), que é um método não supervisionado. A PCA realiza uma transformação de coordenadas, reescrevendo as variáveis originais em novas variáveis, denominadas componentes principais. Cada componente principal gerada é uma combinação linear de todas as variáveis originais e estas componentes são ortogonais entre si, maximizando a importância estatística das PCs. Esta análise estatística permite a interpretação do peso das variáveis originais e a visualização do conjunto de amostras pelo gráfico das duas primeiras componentes principais. (Eriksson *et al.*, 2013)

Figura 2-5: *Profiling* de metabólitos alvos feito pelo software ChenomX, ilustrando a sobreposição de sinais em regiões mais limpas como (a) de 0,90 ppm a 1,10 ppm e regiões com intensa sobreposição de sinais, como mostrado em (b) e na expansão perto da linha de base em (c) da região de 3,10 ppm a 3,25 ppm.

Figura 2-6: Expansão entre 0,8 e 4,5 ppm dos espectros de ^1H de extratos de *L. major* (laranja) e *L. donovani* (azul). As regiões entre 1,5 a 2,5 ppm e 3 a 4 ppm possuem sinais sobrepostos, o que dificulta a identificação metabólica.

Figura 2-7: Expansão entre 5,0 e 8,6 ppm dos espectros de ^1H de extratos de *L. major* (laranja) e *L. donovani* (azul).

Tabela 2-1: Metabólitos presentes em extratos de *L. major* e *L. donovani*. Deslocamentos químicos em azul estão sobrepostos por sinais de outros compostos ou próximos da região do sinal da água. A abreviação após os números significa (s) singlete, (d) duplete, (dd) duplo duplete, (t) tripleto, (q) quarteto e (m) multiplete. Compostos que não foram confirmados por TOCSY e HSQC não estão disponíveis nas bases de dados, não sendo possível a confirmação.

METABÓLITO	1D ¹ H (ppm)	CONFIRMADO POR TOCSY	CONFIRMADO POR HSQC
2-HIDROXISOCAPROATO	0,91(dd) 1,50(m) 1,70(m) 4,03(dd)	sim	sim
2-HIDROXIVALERATO	0,88(t) 1,35(m) 1,64(m) 4,02(dd)	não	não
ACETATO	1,91(s)	não	sim
ADENINA	8,17(s) 8,23(s)	não	não
ALANINA	1,47(d) 3,75(q)	sim	sim
ARGININA	1,68(m) 1,90(m) 3,23(t) 3,78(t)	sim	sim
ASPARAGINA	2,84(m) 2,94(m) 4,00(dd)	sim	sim
ASPARTATO	2,66(m) 2,81(m) 3,89(dd)	sim	sim
BETAINA	3,25(s) 3,89(s)	não	sim
CARNITINA	2,43(m) 3,23(s) 3,40(m) 4,56(m)	sim	sim
COLINA	3,19(s) 3,51(m) 4,05(m)	sim	sim
CITRATO	2,48(d) 2,68(d)	sim	sim
CREATINA	3,00(s) 3,92(s)	não	sim
DIMETILAMINA	2,70(s)	não	sim
DIMETIL SULFONA	3,16(s)	não	não
ETANOL	1,17(t) 3,64(q)	sim	sim
GLUTAMATO	2,04(m) 2,12(m) 2,35(m) 3,77(dd)	sim	sim
GLUTAMINA	2,13(m) 2,44(m) 3,77(t)	sim	sim
GLUTATIONA	2,16(m) 2,55(m) 2,95(m) 3,78(m)	sim	sim
GLICEROL	3,54(m) 3,64(m) 3,78(m)	sim	sim
GLICINA	3,55(s)	não	sim
GLICOLATO	3,95(s)	não	sim
HISTIDINA	3,25(m) 3,32(m) 4,01(dd) 7,26(s) 8,30(s)	sim	sim
ISOLEUCINA	0,93(t) 1,00(d) 1,25(m) 1,46(m) 1,97(m) 3,67(d)	sim	sim

METABÓLITO	1D ¹ H (ppm)	CONFIRMADO POR TOCSY	CONFIRMADO POR HSQC
LACTATO	1,32(d) 4,12(q)	sim	sim
LEUCINA	0,95(dd) 1,70(m) 3,73(m)	sim	sim
LISINA	1,43(m) 1,50(m) 1,71(m) 1,89(m) 3,02(t) 3,75(t)	sim	sim
MALONATO	3,14(s)	não	não
MANOSE	3,37(m) 3,55-3,94(m) 5,17(d)	sim	sim
METIONINA	2,12(m) 2,19(m) 2,63(t) 3,85(dd)	sim	sim
O-FOSFOCOLINA	3,21(s) 3,59(m) 4,19(m)	não	não
FENILALANINA	3,11(m) 3,28(dd) 4,00(dd) 7,32(m) 7,37(m) 7,42(m)	sim	sim
PROLINA	1,99(m) 2,06(m) 2,34(m) 3,33(m) 3,40(m) 4,12(dd)	sim	sim
PUTRESCINA	1,77(m) 3,04(m)	sim	sim
PIROGLUTAMATO	2,02(m) 2,38(m) 2,49(m) 4,17(dd)	sim	sim
PIRUVATO	2,35(s)	não	sim
SERINA	3,83(m) 3,96(m)	sim	sim
SN-GLICERO-3-FOSFOCOLINA	3,21(s) 3,61(m) 3,67(m) 3,91(m) 4,31(m)	não	não
SUCINATO	2,31(s)	não	sim
TREONINA	1,32(t) 3,58(d) 4,25(m)	sim	sim
TRIPTOFANO	3,32(m) 3,49(m) 4,05(dd) 7,19(m) 7,27(m) 7,35(s) 7,53(d) 7,73(d)	sim	sim
TIROSINA	3,04(m) 3,19(dd) 3,94(dd) 6,89(d) 7,18(d)	sim	sim
UDP-GLICOSE	3,47(t) 3,54(m) 3,76(m) 3,87(m) 4,22(m) 4,36 (m) 5,61(dd) 5,96 (m) 7,92(d)	não	não
URACILA	5,79(d) 7,52(d)	sim	sim
VALERATO	0,87(t) 1,29(m) 1,52(m) 2,18(t)	sim	sim
VALINA	0,98(d) 1,03(d) 2,26(m) 3,60(d)	sim	sim
XANTINA	7,94(s)	não	sim

Porém, a PCA dos espectros de RMN não apresentou uma boa separação das duas espécies de *Leishmania*. Enquanto a natureza não supervisionada da PCA oferece uma redução de dimensões imparcial, ela revela estruturas de grupos apenas quando a variação dentro de um grupo é suficientemente menor do que a variação entre grupos. Assim, métodos supervisionados como a análise de discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) são utilizados quando os grupos de determinadas amostras já são conhecidos e busca-se determinar se: 1) os grupos são realmente diferentes? 2) quais são as características que melhor descrevem as diferenças entre estes dois grupos? (Worley e Powers, 2012)

Buscando responder estas perguntas foi realizada uma PLS-DA para as duas espécies de *Leishmania*. Esta técnica exploratória apresentou uma boa separação dos grupos, exibida na Figura 2-8, com Q², o indicador de significância estatística, em 0,75, mostrado na Figura 2-9.

Também é possível gerar uma lista de metabólitos de acordo com a importância da variável na projeção, VIP (*Variable Importance in Projection*). VIP é uma soma ponderada dos quadrados dos *loadings* da PLS levando em consideração a quantidade explicada pela variação de Y em cada dimensão. Scores VIP são calculados para cada componente individualmente. A lista exibida na Figura 2-10 oferece os dez metabólitos mais importantes na diferenciação das duas espécies de *Leishmania*: putrescina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, o-fosfocolina, adenina, UDP-glicose, manose e malonato.

Figura 2-8: Gráfico de scores entre PC1 e PC2. As variâncias explicáveis estão entre parênteses. Amostras de *L. major* são representadas pela cruz verde e as amostras de *L. donovani* pelos triângulos vermelhos.

Figura 2-9: Classificação da PLS-DA utilizando diferentes números de componentes principais. A estrela vermelha indica o melhor classificador.

Figura 2-10: Metabólitos relevantes identificados pela PLS-DA. As caixas coloridas à direita indicam a concentração relativa dos metabólitos correspondentes em cada um dos grupos estudados. *L. donovani* é representada no grupo 1 e *L. major* no grupo 2.

2.4.3. Estudo da Dose Letal Mediana de miltefosina e paromomicina

Para a determinação da dose letal mediana (LD50) dos fármacos que foram utilizados nos experimentos de metabonôma foi utilizado o método colorimétrico descrito no item 2.3.5. A placa de 96 poços utilizadas para os ensaios de LD50, antes e após a adição de MTS com PMS, pode ser vista na Figura 2-11. É possível observar a diferença de coloração em cada um dos poços devido ao efeito dos fármacos.

Figura 2-11: Placas com 96 poços antes da adição de MTS (a) e pronta para leitura no equipamento de UV SpectraMax (b).

Duas placas foram preparadas, de acordo com a Tabela 2-2, uma para leitura após 24 h e outra para leitura após 48 h da adição dos fármacos. Sabendo-se que os valores de absorbância obtidos são proporcionais à concentração de células vivas, pode-se calcular a LD50 normalizando o controle negativo como 0 e o positivo como 1. Não foram observadas diferenças significativas entre as placas de 24 h e 48h, e por isso decidiu-se por trabalhar com 48 h de inoculação entre os fármacos. A Figura 2-12 apresenta a concentração dos fármacos em função da absorbância normalizada para as duas espécies.

Assim, neste primeiro teste, a LD50 encontrada para a miltefosina foi de 34 mg/L para *L. major* e 16 mg/L para *L. donovani*. Para a paromomicina, não foram encontrados valores de LD50 pois não houve diminuição na quantidade de células vivas, indicando que a concentração do fármaco estava abaixo da necessária.

Uma segunda placa, representada na Tabela 2-3, foi montada com uma faixa mais abrangente de concentrações. Apenas uma placa para 48 h foi feita, uma vez que não houve diferença entre as placas de 24 h e 48 h. Nesta segunda placa (Figura 2-13), os resultados da LD50 para miltefosina se mantiveram para *L. major* (33 mg/L) mas foram um pouco mais elevados para *L. donovani* (30 mg/L). Já a paromomicina,

a LD50 calculada para *L. major* foi de 145 mg/L e para a *L. donovani* de 155 mg/L. Este experimento foi repetido por mais duas vezes, com resultados semelhantes e por este motivo decidiu-se adicionar 35 mg/L de miltefosina e 150 mg/L de paromomicina nos ensaios com estes fármacos.

Tabela 2-2: Configuração da placa de 96 poços utilizada no primeiro ensaio de LD50 para os fármacos miltefosina e paromomicina com as espécies *L. major* e *L. donovani*

<i>L. major</i>							<i>L. donovani</i>					
miltefosina (mg/L)				paromomicina (mg/L)			miltefosina (mg/L)			paromomicina (mg/L)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
B	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
C	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
D	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
E	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12
F	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
G	controle positivo <i>L. major</i>						controle positivo <i>L. donovani</i>					
H	CONTROLE NEGATIVO											

Figura 2-12: Primeira curva para determinação da LD50 dos fármacos miltefosina e paromomicina para as espécies *L. major* e *L. donovani* após 48 h de adição do fármaco nas culturas em meio 199.

Tabela 2-3: Configuração da placa de 96 poços utilizada no segundo ensaio de LD50 para os fármacos miltefosina e paromomicina com as espécies *L. major* e *L. donovani*

<i>L. major</i>							<i>L. donovani</i>					
miltefosina (mg/L)			paromomicina (mg/L)				miltefosina (mg/L)			paromomicina (mg/L)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200	200	200	200	200	200	400	400	400	400	400	400
B	100	100	100	100	100	100	200	200	200	200	200	200
C	50	50	50	50	50	50	100	100	100	100	100	100
D	25	25	25	25	25	25	50	50	50	50	50	50
E	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	25	25	25	25	25	25
F	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
G	controle positivo <i>L. major</i>						controle positivo <i>L. donovani</i>					
H	CONTROLE NEGATIVO											

Figura 2-13: Segunda curva para determinação da LD50 dos fármacos miltefosina e paromomicina para as espécies *L. major* e *L. donovani* após 48 h de adição do fármaco nas culturas em meio 199.

O mesmo processamento de espectro, identificação e quantificação de metabólitos foi feito com 16 amostras pertencentes a quatro grupo: *L. major* com miltefosina, *L. major* com paromomicina, *L. donovani* com miltefosina e *L. donovani* com paromomicina. Os espectros de RMN 1D e 2D destas amostras podem ser vistos no Apêndice A.

Métodos não supervisionados como PCA e heatmap foram utilizados para separar as amostras em dois grupos: parasitas cultivados com e sem a adição dos fármacos. Não foram detectadas diferenças da atuação dos fármacos para uma mesma espécie. Na Figura 2-14 é possível ver a separação entre *L. major* e *L. major* com miltefosina e paromomicina. Analisando o gráfico de *loadings*, na Figura 2-15, é possível eleger os metabólitos que são significativos para a separação das amostras, gerando uma lista com os dez metabólitos mais importantes: arginina, putrescina, manose, glutamina, serina, alanina, isoleucina, glutamato, aspartato e metionina.

Uma outra maneira de analisar os metabólitos identificados, que frequentemente apresenta os mesmos resultados da PCA é o agrupamento hierárquico. Nesta análise, cada amostra ou variável começa como um grupo separado ou ponto e o algoritmo procede para combiná-los até que todos os pontos pertençam a um único grupo, exibidos na forma de dendograma. Dois parâmetros são considerados quando realizando um agrupamento hierárquico. O primeiro é a maneira como calcular a distância entre dois pontos, sendo a mais comumente utilizada a distância Euclidiana. O outro parâmetro são os algoritmos de correlação, incluindo o acoplamento por média (o agrupamento usa os centroides das observações), acoplamento completo (o agrupamento usa o par mais distante de observações entre dois grupos), acoplamento simples (agrupamento usa o par mais próximo de observações entre dois grupos) e acoplamento de Ward (agrupamento para minimizar a soma dos quadrados de quaisquer dois grupos). Para estes dados, os parâmetros usados foram a distância Euclidiana e o acoplamento de Ward. (Eriksson *et al.*, 2013)

Frequentemente, combina-se a exibição de dendograma com mapas de calor ou *heatmaps*. A maneira mais simples de descrever um mapa de calor é que este é uma planilha com cores no lugar de números. A HCA reorganiza as informações do mapa de calor, facilitando a visualização das similaridades e diferenças entre as amostras ou variáveis.

Figura 2-14: Gráfico de scores entre PC 1 e PC 2. A variância explicada foi de 34,4 % para PC 1 e 17,8% para PC 2. Amostras de *L. major* cultivadas com drogas são representadas pela cruz verde e amostras de *L. major* sem as drogas pelo triângulo vermelho.

Figura 2-15: Gráfico de *loadings* da Figura 2-13. Quanto mais distante o metabólito (variável) do centro, maior a relevância para separação das amostras.

O mapa de calor apresentado na Figura 2-16 mostra a separação entre *L. donovani* sem os fármacos (classe 1 em vermelho) e com os fármacos (classe 2 em verde) nas colunas. As linhas mostram os metabólitos responsáveis por tal classificação, com o dendograma à esquerda agrupando as variáveis em dois grupos principais. As cores dentro dos retângulos vão de azul escuro à vermelho escuro, representando a concentração dos metabólitos em cada amostra, permitindo uma rápida visualização das diferenças de concentração entre as amostras. De acordo com o *heatmap*, manose, arginina e lisina são os principais metabólitos para

separação das culturas sem os fármacos e glutamina, betaína, triptofano, leucina, malonato, dimetilamina e creatina os principais metabólitos para separação do protozoário cultivado com os fármacos.

Figura 2-16: *Heatmap* dos extratos de *L. donovani* (classe 1) e *L. donovani* com miltefosina e paromomicina (classe 2).

Não foi possível separar a miltefosina e a paromomicina e identificar quais metabólitos foram alterados com a introdução individual destes fármacos nas culturas das duas espécies de *Leishmania*. Como o mecanismo de atuação dos dois fármacos é similar, alterando o mecanismo de funcionamento do ciclo de Krebs, acredita-se que devido ao limite de detecção da RMN, apenas as perturbações mais aparentes foram percebidas.

Como foi mencionado na introdução deste capítulo, tanto a miltefosina quanto a paromomicina afetam direta ou indiretamente o ciclo de Krebs, exibido na Figura 2-17. Um dos ciclos relacionados com o ciclo de TCA é o ciclo metabólico de alanina, aspartato e glutamato (Figura 2-18), e por este ciclo sabe-se que o 2-oxoglutarato proveniente do ciclo de TCA é convertido em glutamato e posteriormente a glutamina. Tanto para *L. major* quanto para *L. donovani*, nos dois fármacos estudados, foi observada diminuição na concentração de glutamato e o aumento na concentração de glutamina. Isto pode indicar que a produção de 2-oxoglutarato foi afetada, comprometendo a viabilidade do ciclo de Krebs. A maior concentração de glutamina nos extratos de *Leishmania* crescidas com fármacos pode explicar também a queda

na concentração de arginina, uma vez que este aminoácido depende da disponibilidade de glutamina e de 2-oxoglutarato advindo do ciclo de TCA.

Analisando parte do ciclo de metabolismo da frutose e manose (Figura 2-19), observa-se que a manose é convertida a β -D-frutose-1,6P₂ que entrará na glicólise, posteriormente sendo convertida a piruvato e participando do ciclo de Krebs. O aumento no consumo de manose pelas espécies cultivadas com os fármacos sugere, conforme descrito na literatura, que a disfunção mitocondrial causa um aumento no uso da via glicolítica. (Chawla *et al.*, 2011)

2.5. Conclusões

A identificação precisa e quantificação dos metabólitos de *Leishmania sp.* exigiu bastante tempo e dedicação. Com esta etapa concluída, seguiu-se com a análise estatística dos dados pela PLS-DA, obtendo-se os metabólitos responsáveis pela separação das duas espécies. O mesmo procedimento foi aplicado aos extratos de *Leishmania* cultivadas com miltefosina e paromomicina. Embora não tenha sido possível separar estatisticamente o efeito dos dois fármacos, esse fato pode ser explicado pela semelhança de ação delas. A literatura fornece informações sobre possíveis mecanismos de ação dos fármacos e os dados obtidos corroboram um destes mecanismos, a interferência nas funções mitocondriais.

2.6. Perspectivas futuras

Estudos adicionais envolvendo análise dos extratos por espectrometria de massas além da RMN, podem incrementar as informações obtidas, permitindo uma análise mais completa da atuação dos fármacos, a separação quimiométrica destes e o estudo dos seus mecanismos de atuação de forma individualizada.

Figura 2-17: Esquema representando o ciclo metabólico do citrato ou ciclo de Krebs.

Fonte: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00020 acesso em 20/08/2016.

Figura 2-18: Esquema representativo de parte do ciclo de metabolismo de alanina, aspartato e glutamato.

FONTE: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00471 acesso em 20/08/2016.

FRUCTOSE AND MANNOSE METABOLISM

56

Capítulo 3. Colaborações

3.1. Metilglioxal em queijo parmesão

Este trabalho foi realizado em colaboração com o professor doutor Scott Rankin e o aluno de doutorado Neil Gandhi do departamento de Ciências Alimentares da Universidade de Wisconsin-Madison.

3.1.1. Motivação

Metilglioxal (MG) ou piruvaldeído é o aldeído do piruvato. MG é formado como um produto paralelo de vários caminhos metabólicos de muitos microrganismos. Ele é altamente reativo e citotóxico e por causa disso, muitos organismos possuem caminhos racionais para detoxificação do Metilglioxal. Por causa de sua presença em queijos, MG prontamente reage formando compostos que contribuem com a pigmentação e deterioração de sabor. Foi mostrado que a presença de metilglioxal em queijo parmesão pode causar escurecimento em baixas temperaturas, mas o mecanismo de tal reação ainda não foi documentado na literatura. (Urbach, 1995; Divine e Rankin, 2013)

Neste estudo, espécies de lactobacilos associadas à microflora de amadurecimento do queijo foram investigadas pela sua propensão a influenciar escurecimento mediado por metilglioxal e degradação de sabor.

3.1.2. Objetivos

Esse trabalho teve três objetivos independentes, mas correlacionados:

- Identificar os adutos de metilglioxal em extrato de queijo parmesão (PCE) e determinar as principais diferenças metabólicas nos produtos finais em função da produção *in vivo* de MG por *L. casei* 12A mgsA cultivado em PCE;
- Determinar os metabólitos em PCE contendo MG após o crescimento de *L. brevis* 367 tolerante a metilglioxal; e
- Investigar a resposta metabólica de 14 espécies de lactobacilos quando cultivadas em PCE com MG.

3.1.3. Materiais e métodos

Todo o trabalho envolvendo a cultura de lactobacilos, extração de metabólitos e preparo de amostras foi realizado pelo aluno de doutorado Neil Gandhi no *Steele Lab* situado no Departamento de Ciências Alimentares da Universidade de Wisconsin-Madison. As amostras foram transportadas para o centro nacional de ressonância magnética em Madison (NMRFAM) onde as análises de RMN foram feitas.

3.1.3.1. Identificação metabólica de PCE e produção de MG por *L. casei*

Espectros de RMN de ^1H de extrato de queijo parmesão foram adquiridos com o propósito de entender as reações químicas envolvidas na presença de MG. As amostras foram aquecidas para avaliação da influência da temperatura na reatividade do MG. Assim, quatro amostras de PCE foram analisadas: PCE à 25 °C, PCE com 100 mM de MG à 25 °C, PCE à 65 °C e PCE com 100 mM de MG à 65 °C.

A produção de MG por lactobacilos foi avaliada comparando a espécie *L. casei* 12A com dois vetores de expressão diferentes: gusA (tipo selvagem) e mgsA (tipo modificado). A bactéria foi cultivada em PCE com 2% de glicose por 24 h à 27 °C. Depois deste período, o meio de cultura foi centrifugado a 3000 G por 20 min à 4 °C e o sobrenadante foi esterilizado por filtração. Foram feitas duplicatas para avaliação da reprodutibilidade dos resultados.

3.1.3.2. Consumo de MG por *L. brevis*

Para analisar as capacidades dos lactobacilos de detoxificação de MG, quatro amostras foram preparadas: PCE com 2% de glicose, PCE com 2% de glicose e 6 mM de MG, PCE com 2% de glicose inoculado com *L. brevis* 367 e PCE com 2% de glicose, 6 mM de MG e inoculado com *L. brevis* 367. As amostras foram cultivadas por 24 h à 27 °C e centrifugadas a 3000 G por 20 min à 4 °C e o sobrenadante esterilizado por filtração. Amostras foram novamente preparadas em duplicata.

3.1.3.3. Estudo da bioconversão de MG para hidroxiacetona e/ou propilenoglicol por espécies de lactobacilos.

A bioconversão de MG foi estudada com 14 diferentes espécies de lactobacilos: *L. brevis* 367, *L. casei* 12A, *L. casei* 334, *L. curvatus*, *L. fermentun* 14931, *L. fermentun*

8289, *L. plantarum* 14971, *L. plantarum* WCFS1, *L. reuteri* MM4-1A, *L. reuteri* 55730, *L. rhamnosus*, *L. sakei* 23K, *L. sakei* 15521, *L. helveticus* CNRZ32. Todas foram cultivadas em PCE com 2% de glicose e 6 mM de MG por 48 h à 27 °C. As culturas foram centrifugadas a 3000 G por 20 minutos e 4 °C e o sobrenadante foi esterilizado por filtração. Este estudo foi realizado em triplicata.

3.1.3.4. Preparação das amostras de RMN e análise dos espectros

Soluções usadas nas análises de RMN consistiam de 630 µL de PCE após esterilização e 70 µL de uma solução 10 mM de DSS em D₂O, ficando a concentração final do DSS em 1 mM. Os espectros foram adquiridos em um Bruker Avance III 600 equipado com um probe criogênico de 5 mm. Bruker SampleJet e software NMRbot (NMRFAM) foram utilizados para aquisição automática dos espectros. O sinal da água foi suprimido com a sequência *excitation sculpting* e os espectros foram adquiridos com 256 scans e a temperatura controlada à 25 °C. A identificação e quantificação dos metabólitos foi feita com o software ChenomX.

3.1.4. Resultados e discussões

O primeiro passo neste estudo foi a identificação de quais metabólitos de interesse estavam presentes no PCE e comparar o espectro após a adição de 100 mM de MG, seguido por aquecimento das amostras a 65 °C. Metilglioxal forma propilenoglicol (propano-1,2-diol), tendo como intermediários reativos hidroxiacetona (acetol) e lactaldeído, como ilustrado no caminho metabólico mostrado na Figura 3-1. (Booth *et al.*, 2003)

As amostras de MG à 25 °C e 65 °C foram similares, mas apresentam diferenças em relação às amostras com MG antes de depois do aquecimento. A presença de hidroxiacetona e propilenoglicol é observada em ambas as amostras contendo MG, como é possível observar nas Figura 3-2 e Figura 3-3, o que indica que em altas concentrações, MG reage espontaneamente. O lactaldeído não foi detectado em nenhuma amostra. O piruvato estava presente somente nas amostras com MG aquecidas, o que indica que o aquecimento pode induzir a redução de MG a piruvato.

Depois da identificação dos metabólitos no PCE e dos produtos da reação na presença de MG, extrato de queijo foi inoculado com *L. casei* 12A vetor de expressão gusA (tipo selvagem) e vetor de expressão mgsA (tipo modificado) para investigar a capacidade de produção de MG da bactéria modificada. O papel do vetor de expressão mgsA é de permitir a produção de metilglioxal. Considerando que o MG está associado com o amadurecimento e escurecimento do queijo parmesão, poder controlar o consumo ou produção deste metabólito, dependendo da situação é importante. É por este motivo que a habilidade de produzir MG foi avaliada nesta cepa modificada.

Como mostrado nas Figura 3-4 e Figura 3-5, a mgsA produziu metilglioxal (cerca de 500 µM) e hidroxiacetona (cerca de 2,5 mM). O metilglioxal é convertido em hidroxiacetona, o que pode explicar a maior concentração dessa molécula. Uma pequena quantidade de propilenoglicol foi detectada, mas lactaldeído não foi produzido.

Figura 3-1: Caminho metabólico do metilglioxal.

Figura 3-2: Espectros de RMN de ^1H mostrando o surgimento do duplete referente à produção de propilenoglicol nas amostras com MG.

Figura 3-3: Espectros de RMN de ^1H mostrando o simpleto em 4,375 ppm referente à produção de hidroxiacetona em amostras com MG. Diferenças no alinhamento dos picos são devidas a diferenças de pH entre as amostras.

Figura 3-4: Espectros de RMN de ^1H mostrando o simpleto em 5,285 ppm que monitora produção de metilglioxal em amostras inoculadas com mgsA.

Figura 3-5: Espectro de RMN 1D de ^1H mostrando o simpleto em 4,375 que monitora a hidroxiacetona produzida em amostras inoculadas com mgsA.

O passo seguinte foi investigar o consumo de MG em uma cultura de *L. brevis* 367. Primeiramente, PCE contendo 2 mM de MG foi utilizado, mas mesmo com os sinais de MG desaparecendo, nenhum dos produtos de reação foi observado, provavelmente devido à baixa concentração. Uma segunda tentativa, com 6 mM de MG produziu propilenoglicol, como mostrado na Figura 3-6, mas não foi identificada hidroxiacetona.

Figura 3-6: Espectros de RMN de ^1H de *L. brevis* cultivado em 0 e 6 mM de MG. O sinal em 1,37 ppm monitora o consumo de MG e o duplete em 1.13 ppm monitora o aparecimento de propilenoglicol.

Como os meios de cultura de *L. casei* continham hidroxiacetona e os de *L. brevis* continham propilenoglicol, decidiu-se por avaliar 14 cepas de lactobacilos e investigar se as outras cepas apresentariam outros metabólitos.

Das 14 cepas investigadas, somente *L. brevis* 367 e *L. fermentum* 14931 produziram propilenoglicol em alta concentração. Além disso, *L. fermentum* 14931 foi a única espécie a produzir propilenoglicol e hidroxiacetona em concentrações elevadas em relação às outras espécies. As duas cepas de *L. reuteri* estudadas não produziram hidroxiacetona ou propilenoglicol mesmo os picos referentes a MG desaparecendo, indicando que estas espécies metabolizaram a molécula. Todas as outras espécies produziram hidroxiacetona e a concentração produzida em cada amostra pode ser vista na Tabela 3-1.

Tabela 3-1: Concentração de metabólitos produzidos por 14 cepas de lactobacilos após 48 horas de cultivo em PCE com 6 mM de MG.

Lactobacillus sp.	Hidroxiacetona (mM)	Propilenoglicol (mM)
<i>L. brevis</i> 367	-	5
<i>L. casei</i> 12A	3	0,2
<i>L. casei</i> 334	1,5	0,2
<i>L. curvatus</i>	2	0,2
<i>L. fermentun</i> 14931	1,5	5
<i>L. fermentun</i> 8289	4	0,2
<i>L. plantarum</i> 14971	4	0,2
<i>L. plantarum</i> WCFS1	4	0,2
<i>L. reuteri</i> MM4-1A	0,3	0,3
<i>L. reuteri</i> 55730	0,3	0,3
<i>L. rhamnosus</i>	3	0,3
<i>L. sakei</i> 23K	4	0,2
<i>L. sakei</i> 15521	3	0,3
<i>L. helveticus</i> CNRZ32	1	0,3

3.1.5. Conclusões

Metilglioxal é um metabólito de grandes implicações no processo de fabricação de queijo parmesão uma vez que a sua presença pode encurtar o tempo de prateleira, aumentar acidez, causar depreciação no sabor e aspectos visuais devido ao escurecimento. Encontrou-se evidência de que a via de lactaldeído não está sendo usada pelas espécies de lactobacilos, contrariando o que era esperado. Entender como estas bactérias estão influenciando a produção de MG no queijo durante o processo de amadurecimento pode ajudar as fábricas de queijo com a produção de queijo parmesão.

Controlando as espécies de lactobacilos presentes no processo de fabricação do queijo parmesão pode ajudar a controlar a concentração de MG, estendendo o tempo de prateleira e postergando o escurecimento e depreciação do gosto.

3.2. Produção e identificação metabólica de etanol a partir de lactobacilos.

Este trabalho foi realizado em colaboração com o professor doutor James Steele, o pós-doutorando Ekkarat Phromao e a aluna de doutorado Kara Hulce do departamento de Ciências Alimentares da Universidade de Wisconsin-Madison.

3.2.1. Motivação

A demanda mundial para combustíveis renováveis está crescendo. Álcoois, que podem ser produzidos por fermentação microbiana de açúcares, podem servir como substituintes diretos de combustíveis à base de petróleo. (Fortman *et al.*, 2008) Entretanto, um dos desafios enfrentados durante a produção microbiana de álcoois é a toxicidade para o hospedeiro biocatalítico, causando baixa concentração de bactérias e a necessidade de integrar processos de remoção e recuperação adicionais durante a fermentação. (Mukhopadhyay *et al.*, 2008) Desta forma, existe um interesse em avaliar microrganismos com alta tolerância inata a álcoois, uma vez que estes organismos teriam potencial biocatalítico para a produção de álcoois.

Bactérias de ácido láctico (LAB) são conhecidas por sua habilidade de crescer e sobreviver em baixo pH e em altas concentrações de álcoois. (Gold *et al.*, 1992; Jia, Zhang e Li, 2010; Liu, 2014) LAB são agentes primários de deterioração em bebidas alcoólicas como vinho e cerveja, bem como em plantas de bioetanol. (Berezina *et al.*, 2010; Skinner e Leathers, 2004) Dentre as LAB, lactobacilos mostram a maior tolerância à álcoois, algumas espécies conseguindo crescer em até 18% de etanol ou 3% de butanol. (Knoshaug e Zhang, 2009; Liu e Qureshi, 2009)

3.2.2. Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi desenvolver cepas de *Lactobacillus casei* produtoras de etanol, espécie geralmente considerada como segura e altamente utilizada na indústria. Espera-se utilizar *L. casei* para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica como palha de milho. Biomassa lignocelulósica é barata, abundante e renovável, fazendo deste um substrato ideal para a produção de biocombustíveis.

Também foi avaliada a vinhaça da planta de etanol após a fermentação pela levedura, buscando identificar quais açúcares não foram consumidos. Uma vez identificados, novas modificações podem ser feitas na bactéria, para que ela produza etanol a partir do produto da fermentação com levedura, aumento o rendimento do processo.

3.2.3. Materiais e métodos

3.2.3.1. Avaliação de cepa modificada de *Lactobacillus casei*.

Uma abordagem de duas frentes foi empregada pelo pós-doutorando Ekkarat Phromao para redirecionar o fluxo metabólico de *L. casei* 12A para o etanol. A primeira abordagem foi inativar os genes que codificam as enzimas que competem com o caminho 12A para o etanol. A segunda abordagem foi introduzir genes de *Zymomonas mobilis* que codificam as atividades da piruvato carboxilase (Pdc) e álcool desidrogenase II (Adh2).

O processo de fermentação foi realizado em um meio químico definido modificado, que consiste em 36 componentes e é detalhado por Christensen e Steele na Tabela 2, página 3297 do artigo. (Christensen e Steele, 2003) O tipo selvagem (*L. casei* 12A WT) e o tipo modificado (*L. casei* E2) foram cultivados durante um período de 12, 24, 48 ou 96 h à 27 °C. Após o cultivo, o meio de cultura foi centrifugado a 3000 G por 20 min e esterilizado por filtração antes de ser levado ao espectrômetro. Esta etapa da pesquisa foi realizada no *Steele Lab* situado no Departamento de Ciências Alimentares da Universidade de Wisconsin-Madison.

3.2.3.2. Caracterização de compostos não identificados de vinhaça de levedura

Com o objetivo de otimizar ainda mais a produção de etanol, os produtos finais de vinhaça fermentada por levedura foram analisados. A vinhaça foi separada do etanol produzido pela fermentação de levedura e microflora nativa e foi centrifugada, o sobrenadante coletado, esterilizado por filtração e injetado em um equipamento de HPLC pela aluna de doutorado Kara Hulce. Duas amostras, de picos em 9,12 e 10,13 minutos foram coletadas, concentradas e usadas em análises de RMN.

3.2.3.3. Preparação de amostras de RMN

Amostras de RMN foram preparadas no NMRFAM com 630 µL do concentrado obtido no item 3.2.3.1 e 70 µL de uma solução 10 mM de DSS em D₂O, resultando em 1 mM de DSS em 700 µL de amostra. Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600 equipado com uma sonda criogênica de 5 mm. O sinal da água foi suprimido pela técnica de *excitation sculpting*. Os espectros foram adquiridos com 256 aquisições e a temperatura foi regulada a 25 °C.

A amostras do item 3.2.3.2 foram preparadas com 53 μ L de vinhaça e 7 μ L de uma solução 10 mM de DSS em D₂O. Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro de RMN Bruker Avance III equipado com uma sonda criogênica de 1,7 mm. O sinal da água foi suprimido pela técnica de *excitation sculpting* para as sequências de 1D e 2D ¹H-¹H TOCSY.

Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos com 256 scans. ¹H-¹H TOCSY e ¹H-¹³C HSQC foram adquiridos com 256 incrementos, 32 transientes, tempo de espera para relaxação de 1 s. Largura espectral para ¹H de 16 ppm e para ¹³C de 175 ppm. A temperatura foi regulada em 25 °C em todos os experimentos.

Os metabólitos foram identificados e quantificados, nos espectros de RMN de ¹H, pelo software ChenomX. O software TopSpin foi utilizado para análise dos espectros de RMN 2D, em conjunto com as bases de dados BMRB e HMDB. O algoritmo de pesquisa COLMAR foi utilizado para aprofundamento das investigações dos espectros 2D de HSQC.

3.2.4. Resultados e discussões

A análise comparativa de *L. casei* E2 e *L. casei* WT foi iniciada com a aquisição de espectros de RMN de ¹H para ambas cepas, para o meio de cultura e para *L. casei* com diferentes tempos de cultivo. Após a fermentação, o consumo de glicose e piruvato bem como a produção de succinato, lactato, acetato e etanol foram observados para a cepa WT, mas a cepa modificada produziu piruvato e consumiu acetato, praticamente não produzindo succinato e lactato. A Tabela 3-2 mostra a concentração de alguns metabólitos de interesse. Como era mais fácil para os pesquisadores responsáveis pelo projeto acompanharem as fermentações por HPLC, as concentrações aqui apresentadas servem apenas como indicação do que está acontecendo, uma vez que apenas uma amostra de cada foi analisada por RMN.

É possível observar o aumento dos picos referentes ao etanol e a diminuição dos picos referentes à glicose durante as 96 h de fermentação (Figura 3-7). A concentração dos metabólitos é facilmente quantificada por RMN, o que pode permitir, se necessário, que se determine quanto de etanol está sendo produzido pela quantidade de açúcar consumido, estimando a eficácia da bactéria.

O espectro na Figura 3-8, mostra a comparação entre *L. casei* WT, *L. casei* E2 e o meio de cultura como referência. Glicose foi consumida em maior quantidade pelas bactérias modificadas, o que indica que o gene modificado otimizou o consumo de açúcar para a produção de etanol.

Tabela 3-2: Concentração de metabólitos no meio de cultura (branco), *L. casei* E2 e *L. casei* WT depois de normalização pela soma

	Branco (μM)	<i>L. casei</i> E2 (μM)	<i>L. casei</i> WT (μM)
Acetato	104,20	32,09	125,96
Alanina	9,68	4,39	9,91
Etanol	0,00	730,69	0,00
Glicose	807,86	147,12	657,06
Glicerol	29,31	18,43	25,21
Glicina	8,01	2,38	3,32
Lactato	1,52	3,00	153,45
Prolina	12,53	7,46	13,45
Piruvato	1,32	4,32	0,41
Succinato	0,00	0,08	0,20
Treonina	7,97	0,00	5,91
Valina	7,37	2,71	4,39

Figura 3-7: Espectro de RMN de ^1H do meio de cultura (azul claro) e da fermentação de *L. casei* E2 por 12 h, 24 h, 48 h e 96 h (vermelho). A região selecionada, de 3,3 ppm a 3,9 ppm, mostra o consumo de glicose e a produção de etanol em função do tempo.

Figura 3-8: Espectro de RMN de ^1H do meio de cultura (cinza), *L. casei* E2 depois de 96 h de fermentação (laranja) e *L. casei* WT depois de 96 h de fermentação (verde). A região selecionada, de 3,3 ppm a 3,9 ppm mostra o consumo de glicose e a produção de etanol pelas duas cepas.

Já a investigação de metabólitos presentes na vinhaça foi primeiramente feita por HPLC, como pode ser visto na Figura 3-9. O cromatograma atribui maltotriose para o pico em 9,12 min e maltose para o pico em 10,13 min, mas esses açúcares deveriam ter sido consumidos pela levedura durante o processo de fermentação. Este resultado levou à investigação se estes eram realmente os açúcares para estes tempos de retenção e, se não, quais eram os verdadeiros açúcares responsáveis pelos picos cromatográficos.

O primeiro pico separado por HPLC exibiu no espectro de RMN de ^1H uma região com sobreposição espectral entre 3,2 e 4 ppm, como mostrado a Figura 3-10. Usando ChenomX para identificação dos compostos, glicose, maltose e maltotriose foram identificados com necessidade de confirmação nos espectros 2D e em baixa concentração; citrato está presente em baixa concentração e trealose em maior concentração, ambos com confiabilidade na identificação. Foi possível detectar a presença de glicose, maltose, maltotriose e trealose por ^1H - ^1H TOCSY, como visto nas Figura 3-11 e Figura 3-12. Entretanto, os únicos picos resolvidos no espectro ^1H - ^{13}C HSQC (Figura 3-13) foram os da trealose. Como a abundância natural de ^{13}C é de aproximadamente 1% do total de átomos de carbono, era esperado que os sinais dos metabólitos presentes em baixa concentração não apareceriam.

O segundo pico separado por HPLC possui similaridades em relação ao primeiro, como pode ser visto na Figura 3-14; baixas concentrações de glicose, maltose e maltotriose dificultaram a identificação destes metabólitos por RMN 1D de ^1H . É por este motivo que o ^1H - ^1H TOCSY foi usado para confirmar a presença destes açúcares. Diferente do pico 1, o pico 2 não possui sinais de citrato ou trealose e arabinose estava presente em concentração maior do que os outros açúcares. O espectro de ^1H - ^{13}C HSQC (Figura 3-15), exibiu a maioria dos picos cruzados esperados para a arabinose.

Figura 3-9: Índice de refração da vinhaça adquirido com um Phenomenex Rezex ROA – Ácido orgânico H^+ (8%) 300 x 7,8 mm, com um cartucho *SecurityGuard* Carbo-H 4 x 3,0 mm ID, fase móvel 0,02 M de ácido sulfúrico, taxa de vazão de 0,5 mL/min, temperatura da coluna em 50 °C e volume de injeção 100 μL .
mV

Figura 3-10: Região entre 2,8 e 4,0 ppm do espectro de RMN de ^1H referente ao pico 1 do HPLC (9,12 min) da amostra de vinhaça após a fermentação com levedura. Os picos coloridos são sobreposições de espectros de compostos puros como demarcado na figura.

Figura 3-11: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do pico 1 do HPLC (azul), sobreposto com os espectros de compostos puros de: glicose (laranja e amarelo), maltotriose (roxo e verde) e maltose (vermelho e rosa).

Figura 3-12: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do pico 1 do HPLC (azul), sobreposto com o espectro puro de trealose (vermelho)

Figura 3-13: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC referente ao pico 1 do HPLC (azul), sobreposto com o espectro de trealose pura.

Figura 3-14: Região entre 3,2 e 4,1 ppm do espectro de RMN de ^1H referente ao pico 2 do HPLC (10,13 min) da amostra de vinhaça após a fermentação com levedura. Os picos coloridos representam a deconvolução de espectros de compostos puros de arabinose, glicose, maltose e maltotriose.

Figura 3-15: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC referente ao pico 2 do HPLC (azul), sobreposto com os espectros de arabinose (roxo) e cilo-inositol (vermelho) puros.

Para corroborar os resultados obtidos, o software COLMAR (<http://spin.ccic.ohio-state.edu/index.php/colmar>) foi utilizado para analisar os dois espectros de HSQC. Como dito no item 1.3.5 do Capítulo 1, COLMAR é um algoritmo de investigação para a análise de ^1H - ^{13}C HSQC. Ele utiliza as bases de dados BMRB (bmrb.wisc.edu) e HMDB (www.hmdb.ca) para pesquisar diferentes isômeros presentes em uma amostra.

Após gerar e submeter uma lista de sinais para consulta no COLMAR, a amostra do pico 1 do HPLC foi identificada como sendo trealose e a amostra do pico 2 do HPLC foi identificada como L-arabinose e cilo-inositol. Assim, além de confirmar os resultados obtidos anteriormente, COLMAR identificou mais um composto. Analisando o espectro de HSQC do pico 2 do HPLC na Figura 3-15, foi possível confirmar a presença do pico de cilo-inositol. Assim, o que foi inicialmente identificado como maltotriose e maltose pelo HPLC, foi caracterizado como principalmente trealose e arabinose por RMN.

3.2.5. Conclusões

A abordagem usada para modificar *L. casei* para que esta espécie comece a produzir etanol funcionou. Os resultados mostram que a cepa E2 consumiu mais glicose que WT, produzindo uma grande quantidade de etanol. Futuras investigações das diferenças metabólicas entre as duas cepas poderão ajudar ainda mais a melhorar a eficiência da bactéria modificada.

Ademais, sabendo que após a fermentação com a levedura, a vinhaça possui quantidade considerável de trealose e arabinose será possível modificar novamente a bactéria para que ela passe a consumir tais açúcares, melhorando ainda mais o rendimento do processo.

Capítulo 4. Conclusões

Esta tese de doutorado mostrou parte das inúmeras aplicações da metabolômica por RMN e alguns dos softwares e das diversas bases de dados de metabólitos, de caminhos metabólicos e ferramentas estatísticas disponíveis *online* para auxiliar no estudo metabolômico, como o ChemoMX, o BMRB e o MetaboAnalyst.

O estudo das duas espécies de *Leishmania* e do mecanismo de atuação de dois fármacos, miltefosina e paromomicina, no tratamento das doenças, permitiram não só a identificação de metabólitos presentes nas duas espécies como a averiguação de informações presentes na literatura sobre a atuação dos fármacos. Foi possível identificar quais são os metabólitos responsáveis pela classificação de *Leishmania major* Friedlin e *Leishmania donovani* DD8 devido às diferenças de concentração destes metabólitos. Foi também possível identificar quais metabólitos tiveram variação significativa após a introdução dos fármacos e levantar o significado biológico de algumas destas variações.

O estudo das reações do metilglioxal em queijo parmesão mostrou que as cepas modificadas de *Lactobacillus* são capazes de consumir ou produzir esta molécula, de acordo com a necessidade e que as diferentes espécies produzem diferentes produtos de reação, abrindo a possibilidade para novos estudos que permitam entender o motivo pelo qual diferentes espécies utilizam diferentes vias metabólicas. Mesmo assim, as informações obtidas ajudarão a estender a vida do queijo parmesão fresco nas prateleiras.

A análise da cepa modificada de *L. casei* 12A permitiu a comprovação de que esta cepa produz etanol a partir do consumo de glicose e uma vez que ela seja novamente adaptada para consumir os açúcares não utilizados pela levedura na vinhaça, a eficiência do processo de produção do etanol aumentará, contribuindo com esta questão. Além disso, a RMN foi capaz de identificar dois compostos, trealose e arabinose, que estavam sendo erroneamente identificados como maltotriose e maltose pelo HPLC.

Estes resultados mostram a versatilidade da espectroscopia de RMN em analisar diversas matrizes biológicas e fornecer informações que permitem uma investigação completa sobre diferentes problemas em diferentes áreas. A combinação da RMN com outras técnicas analíticas como a HPLC aumenta a versatilidade da

técnica e permite que a investigação seja feita de forma mais completa e precisa. As ferramentas desenvolvidas para a análise de dados metabolômicos por RMN auxiliam em todas as etapas do processo: da identificação e quantificação dos metabólitos à análise estatística dos dados e investigação dos caminhos metabólicos.

A metabolômica por RMN, embora tenha evoluído muito nos últimos anos ainda possui espaço para aprimoramento. Espera-se que com as técnicas e estudos aqui apresentados e discutidos outros pesquisadores consigam entender as vantagens de se utilizar esta técnica e se interessem pelo desenvolvimento de novos métodos, como a automação da identificação metabólica.

Referências Bibliográficas

BAX, A.; DAVIS, D. G. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 65, n. 2, p. 355–360, 1985.

BECKWITH-HALL, B. M. *et al.* Nuclear magnetic resonance spectroscopic and principal components analysis investigations into biochemical effects of three model hepatotoxins. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 260–72, 1998.

BEREZINA, O. V *et al.* Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 635–646, 2010.

BERG, R. A VAN DEN *et al.* Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 142, 2006.

BERRIDGE, M. V; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–82, 1993.

BINGOL, K. *et al.* Unified and isomer-specific NMR metabolomics database for the accurate analysis of $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ HSQC spectra. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 452–459, 2015.

BOOTH, I. R. *et al.* Bacterial production of methylglyoxal: a survival strategy or death by misadventure? **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 6, p. 1406-1408, 2003.

BRINDLE, J. T. *et al.* Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ^1H -NMR-based metabolomics. **Nature Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1439–44, 2002.

CHAWLA, B. *et al.* Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant leishmania donovani. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 1–12, 2011.

CHRISTENSEN, J. E.; STEELE, J. L. Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements.

Journal of Bacteriology, v. 185, n. 11, p. 3297–3306, 2003.

CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. Oxford: Elsevier, 1999. 382 p.

CONNOR, S. C. *et al.* Effects of feeding and body weight loss on the ¹H-NMR-based urine metabolic profiles of male Wistar Han rats: implications for biomarker discovery. **Biomarkers : Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals**, v. 9, n. 2, p. 156–79, 1998.

DIVINE, R. D.; RANKIN, S. A. Short communication: Reducing agents attenuate methylglyoxal-based browning in Parmesan cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6242–6247, 2013.

DORLO, T. P. C. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

DUNN, W. B. *et al.* Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 387–426, 2011.

ERIKSSON, L. *et al.* **Multi- and megavariable data analysis**. 3rd. ed. Malmö: MKS Umetrics AB, 2013. 490 p.

FIEHN, O. *et al.* Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 11, p. 1157–61, 2000.

FORTMAN, J. L. *et al.* Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 375–381, 2008.

GELADI, P. *et al.* Chemometrics in spectroscopy Part 2 . Examples. **Spectrochimica Acta**, v. 59, p. 1347–1357, 2004.

GOLD, R. S. *et al.* Ethanol tolerance and carbohydrate metabolism in lactobacilli. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 45–54, 1992.

GRIFFIN, J. *et al.* Abnormal lipid profile of dystrophic cardiac tissue as demonstrated by one- and two-dimensional magic-angle spinning H-1 NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 46, n. 2, p. 249–255, 2001.

HOPKE, P. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 365–377, 2003.

HORNING, E. C. Use of combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry for clinical problems. **Clinical Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 777, 1968.

HWANG, T.; SHAKA, A. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. **Journal of Magnetic Resonance, Series A**, v. 122, p. 275–279, 1995.

JHINGRAN, A. *et al.* Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 2, p. 111–117, 2009.

JIA, K.; ZHANG, Y.; LI, Y. Systematic engineering of microorganisms to improve alcohol tolerance. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 5, p. 422–429, 2010.

KANEHISA, M. *et al.* Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D199–D205, 2014.

KEELER, J. **Understanding NMR spectroscopy**. Cambridge: Wiley, 2002. 210 p.

KIRSCHENLOHR, H. L. *et al.* Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. **Nature Medicine**, v. 12, n. 6, p. 705–710, 2006.

KNOSHAUG, E. P.; ZHANG, M. Butanol tolerance in a selection of microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, n. 1-3, p. 13–20, 2009.

KOULMAN, A. *et al.* From differentiating metabolites to biomarkers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 3, p. 663–670, 2009.

KRIWACKI, R. W.; PITNER, T. P. Current aspects of practical two dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: applications to structure elucidation. **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 7, p. 531–554, 1989.

LAVINE, B. K.; WORKMAN, J. Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2763–2770, 2002.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 194–204, 2008.

LIU, M.; NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. High-resolution diffusion and relaxation edited one- and two-dimensional ¹H NMR spectroscopy of biological fluids. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 19, p. 3370–6, 1996.

LIU, S. Proteomic analyses of ethanol tolerance in *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929. **PROTEOMICS**, v. 14, n. 21-22, p. 2540–2544, 2014.

LIU, S.; QURESHI, N. How microbes tolerate ethanol and butanol. **New Biotechnology**, v. 26, n. 3-4, p. 117–121, 2009.

MADSEN, R.; LUNDSTEDT, T.; TRYGG, J. Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis. **Analytica chimica acta**, v. 659, n. 1-2, p. 23–33, 2010.

MAMAS, M. *et al.* The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 1, p. 5–17, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 2006. 120 p.

MUKHOPADHYAY, A. *et al.* Importance of systems biology in engineering microbes for biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 228–234, 2008.

NAGANA GOWDA, G. A.; GOWDA, Y. N.; RAFTERY, D. Expanding the limits of human blood metabolite quantitation using NMR spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 706–715, 2015.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica: the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems**, v. 29, n. 11, p. 1181–1189, 1999.

NORDSTRÖM, A.; LEWENSOHN, R. Metabolomics: moving to the clinic. **Journal of**

Neuroimmune Pharmacology : the Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, v. 5, n. 1, p. 4–17, 2010.

OGATA, H. *et al.* KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 29–34, 1999.

PAN, Z. *et al.* Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI-MS in patients with inborn errors of metabolism. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 2, p. 539–49, 2007.

PAULING, L. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 10, p. 2374–2376, 1971.

REYNOLDS, W. F. *et al.* Comparison of ¹³C resolution and sensitivity of HSQC and HMQC sequences and application of HSQC-based sequences to the total ¹H and ¹³C spectral assignment of clonasterol. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 35, n. 7, p. 455–462, 1997.

ROONEY, O. M. *et al.* High-resolution diffusion and relaxation-edited magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy of intact liver tissue. **Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine**, v. 50, n. 5, p. 925–30, 2003.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401–408, 2004.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health : TM & IH**, v. 6, n. 11, p. 849–54, 2001.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 733–740, 2007.

ULRICH, E. L. *et al.* BioMagResBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. D4, p. D402–D408, 2007.

URBACH, G. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 8, p. 877–903, 1995.

VENÂNCIO, T. *et al.* Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, n. 1, p. 34 – 39, 2005.

VINAYAVEKHIN, N.; SAGHATELIAN, A. Regulation of alkyl-dihydrothiazole-carboxylates (ATCs) by iron and the pyochelin gene cluster in *Pseudomonas aeruginosa*. **ACS Chemical Biology**, v. 4, n. 8, p. 617–23, 2009.

VOBECKY, J. *et al.* The reliability of routine pathologic diagnosis of colorectal adenocarcinoma. **Cancer**, v. 64, n. 6, p. 1261–1265, 1989.

WELJIE, A. M. *et al.* Targeted profiling: quantitative analysis of 1 H NMR metabolomics data. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 13, p. 4430–4442, 2006.

WISHART, D. S. *et al.* HMDB 3.0--the human metabolome database in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D801–D807, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of a WHO informal consultation on liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis**. Rome, 2005. 16 p.

_____. **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva, 2008. 96 p.

_____. **Neglected tropical diseases**. Geneva, 2009. 59 p.

_____. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - First WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva, 2010. 169 p.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate analysis in metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2012.

XIA, J. *et al.* MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W251–W257, 2015.

XIA, J.; WISHART, D. S. MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. W1, p. W71–W77, 2010.

Figura A-1: Espectro de ^1H do extrato celular de *L. major* cultivada com miltefosina.

Figura A-2: Espectro de ^1H do extrato celular de *L. major* cultivada com paromomicina.

Figura A-3: Espectro de ^1H do extrato celular de *L. donovani* cultivada com miltefosina.

Figura A-4: Espectro de ^1H do extrato celular de *L. donovani* cultivada com paromomicina.

Parâmetros utilizados nos experimentos de RMN de ^1H - ^1H TOCSY apresentados a seguir.

```

Current Data Parameters
NAME      20160308.LD4C.104.D20
EXPNO      2
PROCNO      1

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20160310
Time        0.36
INSTRUM     spect
PROBHD      1.7 mm CPTCI 1
PULPROG     dipsi2esgpph
TD          2048
SOLVENT      D2O
NS          32
DS          64
SWH         7211.539 Hz
FIDRES      3.521259 Hz
AQ          0.1419947 sec
RG          362
DW          69.333 usec
DE          30.00 usec
TE          298.2 K
D0          0.00005412 sec
D1          1.50000000 sec
D9          0.06000000 sec
D11         0.03000000 sec
D12         0.00002000 sec
D13         0.00000400 sec
D16         0.00020000 sec
IN0         0.00013880 sec
L1          20

===== CHANNEL f1 =====
SF01        600.1328208 MHz
NUC1         1H
P1           12.00 usec
P2           24.00 usec
P6           26.00 usec
P12          2000.00 usec
PLW0         0 W
PLW1         0.28611001 W
PLW10        0.06094700 W
PLW32        0.000000007 W
SPNAM[1]     Squa100.1000
SPOAL1       0.500
SPOFFS1      0 Hz
SPW1         0.00004120 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]      SMSQ10.100
GPNAM[2]      SMSQ10.100
GPNAM[3]      SMSQ10.100
GPNAM[4]      SMSQ10.100
GPZ1          1.00 %
GPZ2          3.00 %
GPZ3          31.00 %
GPZ4          11.00 %
P16           1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD            256
SF01          600.1328 MHz
FIDRES        56.286022 Hz
SW            12.005 ppm
FnMODE        States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI            1024
SF            600.1297362 MHz
WDW           QSINE
SSB           2
LB            0 Hz
GB            0
PC            1.00

F1 - Processing parameters
SI            1024
MC2           States-TPPI
SF            600.1297333 MHz
WDW           QSINE
SSB           2
LB            0 Hz
GB            0

```

Parâmetros utilizados nos experimentos de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC apresentados a seguir.

Current Data Parameters
 NAME 20160308.LD4C.104.D20
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20160309
 Time 19.38
 INSTRUM spect
 PROBHD 1.7 mm CPTCI 1
 PULPROG hsqcetgpsisp2.2
 TD 2048
 SOLVENT D2O
 NS 32
 DS 64
 SWH 7211.539 Hz
 FIDRES 3.521259 Hz
 AQ 0.1419947 sec
 RG 2050
 DW 69.333 usec
 DE 30.00 usec
 TE 298.2 K
 CNST2 145.0000000
 CNST17 -0.5000000
 D0 0.00000300 sec
 D1 2.00000000 sec
 D4 0.00172414 sec
 D11 0.03000000 sec
 D16 0.00020000 sec
 D24 0.00086207 sec
 IN0 0.00002010 sec

===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 600.1328208 MHz
 NUC1 1H
 P1 12.00 usec
 P2 24.00 usec
 P28 0 usec
 PLW1 0.28611001 W
 ===== CHANNEL f2 =====
 SFO2 150.9141262 MHz
 NUC2 13C
 CPDPRG[2] garp
 P3 12.00 usec
 P14 500.00 usec
 P24 2000.00 usec
 PCPD2 60.00 usec
 PLW0 0 W
 PLW2 79.99900055 W
 PLW12 3.20000005 W
 SPNAM[3] Crp60,0.5,20.1
 SPOAL3 0.500
 SPOFFS3 0 Hz
 SPW3 17.60099983 W
 SPNAM[7] Crp60comp.4
 SPOAL7 0.500
 SPOFFS7 0 Hz
 SPW7 17.60099983 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPNAM[1] SMSQ10.100
 GPNAM[2] SMSQ10.100
 GPNAM[3] SMSQ10.100
 GPNAM[4] SMSQ10.100
 GPZ1 80.00 %
 GPZ2 20.10 %
 GPZ3 11.00 %
 GPZ4 -5.00 %
 P16 1000.00 usec
 P19 600.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 256
 SFO1 150.9141 MHz
 FIDRES 194.340790 Hz
 SW 164.833 ppm
 EnMODE Echo-Antiecho

F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 600.1300000 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 echo-antiecho
 SF 150.9028085 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0 Hz
 GB 0

Figura A-5: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do extrato celular de *L. major*.

Figura A-6: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do extrato celular de *L. major*.

Figura A-7: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do extrato celular de *L. major* cultivado com miltefosina.

Figura A-8: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do extrato celular de *L. major* cultivado com miltefosina.

Figura A-9: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do extrato celular de *L. major* cultivado com paromomicina.

Figura A-10: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do extrato celular de *L. major* cultivado com paromomicina.

Figura A-11: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do extrato celular de *L. donovani*.

Figura A-12: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do extrato celular de *L. donovani*.

Figura A-13: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do extrato celular de *L. donovani* cultivada com miltefosina.

Figura A-14: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do extrato celular de *L. donovani* cultivada com miltefosina.

Figura A-15: Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do extrato celular de *L. donovani* cultivada com paromomicina.

Figura A-16: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do extrato celular de *L. donovani* cultivada com paromomicina.

Apêndice B – Concentração de metabólitos

Tabela B-1: Concentração (mM) de metabólitos para extratos de culturas de *L. major* e *L. donovani* e de culturas com os fármacos miltefosina e paromomicina.

	<i>L. major</i>		<i>L. major</i> com miltefosina		<i>L. major</i> com paromomicina		<i>L. donovani</i>		<i>L. donovani</i> com miltefosina		<i>L. donovani</i> com paromomicina	
<i>2-Hidroxisocaproato</i>	0.12	±0.07	0.08	±0.04	0.10	±0.04	0.11	±0.07	0.07	±0.03	0.12	±0.08
<i>2-Hidroxivalerato</i>	0.09	±0.04	0.09	±0.07	0.13	±0.06	0.09	±0.04	0.11	±0.07	0.11	±0.06
<i>Acetato</i>	0.55	±0.15	0.23	±0.15	0.25	±0.11	0.58	±0.18	0.20	±0.04	0.31	±0.12
<i>Adenina</i>	0.42	±0.09	0.36	±0.29	0.36	±0.14	0.45	±0.07	0.29	±0.15	0.44	±0.14
<i>Alanina</i>	1.24	±0.57	1.24	±1.37	1.05	±0.55	1.12	±0.31	0.91	±0.83	1.58	±1.07
<i>Arginina</i>	1.73	±0.70	0.31	±0.14	0.41	±0.23	1.36	±0.40	0.25	±0.07	0.64	±0.16
<i>Asparagina</i>	0.67	±0.34	0.32	±0.11	0.53	±0.35	0.48	±0.21	0.18	±0.08	0.48	±0.29
<i>Aspartato</i>	0.67	±0.34	0.23	±0.05	0.30	±0.19	0.46	±0.09	0.15	±0.05	0.49	±0.20
<i>Betaina</i>	0.04	±0.01	0.03	±0.02	0.06	±0.05	0.03	±0.01	0.02	±0.01	0.09	±0.03
<i>Carnitina</i>	0.15	±0.04	0.09	±0.06	0.14	±0.08	0.13	±0.01	0.06	±0.03	0.14	±0.08
<i>Colina</i>	0.06	±0.02	0.07	±0.05	0.05	±0.02	0.06	±0.02	0.07	±0.04	0.07	±0.03
<i>Citrato</i>	0.15	±0.06	0.09	±0.05	0.17	±0.10	0.14	±0.06	0.08	±0.03	0.19	±0.10
<i>Creatina</i>	0.08	±0.03	0.05	±0.04	0.06	±0.04	0.07	±0.03	0.07	±0.02	0.09	±0.02
<i>Dimetilamina</i>	0.03	±0.02	0.02	±0.01	0.02	±0.01	0.02	±0.01	0.02	±0.01	0.03	±0.01
<i>Dimetil sulfona</i>	0.05	±0.03	0.03	±0.02	0.05	±0.03	0.04	±0.01	0.03	±0.01	0.05	±0.02
<i>Etanol</i>	0.95	±0.58	0.17	±0.09	0.08	±0.04	0.31	±0.42	0.09	±0.04	0.13	±0.06
<i>Glutamato</i>	0.95	±0.58	0.27	±0.12	0.58	±0.47	0.70	±0.35	0.31	±0.24	0.74	±0.24
<i>Glutamina</i>	0.35	±0.16	0.34	±0.16	0.41	±0.27	0.28	±0.04	0.24	±0.10	0.58	±0.22
<i>Glutaciona</i>	0.12	±0.05	0.07	±0.04	0.08	±0.03	0.09	±0.02	0.05	±0.03	0.08	±0.04
<i>Glicerol</i>	0.35	±0.15	0.35	±0.23	0.24	±0.10	0.32	±0.06	0.20	±0.12	0.26	±0.09
<i>Glicina</i>	1.39	±0.25	0.62	±0.40	1.03	±0.67	1.22	±0.23	0.51	±0.23	1.20	±0.34
<i>Glicolato</i>	0.25	±0.12	0.13	±0.07	0.24	±0.13	0.18	±0.07	0.12	±0.07	0.24	±0.15
<i>Histidina</i>	1.27	±0.60	0.46	±0.15	0.76	±0.45	0.81	±0.29	0.41	±0.11	1.04	±0.52
<i>Isoleucina</i>	0.08	±0.02	0.05	±0.03	0.09	±0.07	0.07	±0.02	0.09	±0.09	0.08	±0.03

	<i>L. major</i>		<i>L. major</i> com miltefosina		<i>L. major</i> com paromomicina		<i>L. donovani</i>		<i>L. donovani</i> com miltefosina		<i>L. donovani</i> com paromomicina	
<i>Lactato</i>	1.79	±0.80	0.86	±0.31	1.14	±0.97	1.11	±0.46	0.74	±0.12	1.47	±0.79
<i>Leucina</i>	1.55	±0.59	0.56	±0.19	1.10	±0.75	1.24	±0.40	0.37	±0.20	1.07	±0.68
<i>Lisina</i>	0.17	±0.09	0.11	±0.07	0.21	±0.13	0.08	±0.04	0.11	±0.06	0.22	±0.10
<i>Malonato</i>	0.90	±0.44	0.22	±0.22	0.44	±0.52	0.78	±0.11	0.14	±0.14	0.58	±0.41
<i>Manose</i>	0.58	±0.24	0.21	±0.08	0.34	±0.23	0.34	±0.08	0.17	±0.04	0.36	±0.17
<i>Metionina</i>	0.51	±0.11	0.20	±0.12	0.43	±0.17	0.52	±0.06	0.19	±0.10	0.53	±0.11
<i>O-fosfocolina</i>	0.43	±0.18	0.20	±0.07	0.31	±0.25	0.31	±0.10	0.16	±0.04	0.35	±0.17
<i>Fenilalanina</i>	1.40	±0.53	0.62	±0.21	0.92	±0.49	1.00	±0.39	0.50	±0.11	1.04	±0.34
<i>Prolina</i>	0.80	±0.21	0.63	±0.37	0.98	±0.47	1.00	±0.10	0.62	±0.33	1.00	±0.21
<i>Putrescina</i>	0.24	±0.09	0.15	±0.06	0.19	±0.07	0.18	±0.02	0.14	±0.08	0.23	±0.05
<i>Piroglutamato</i>	0.05	±0.02	0.06	±0.03	0.07	±0.03	0.04	±0.01	0.03	±0.02	0.05	±0.02
<i>Piruvato</i>	0.50	±0.18	0.46	±0.34	0.51	±0.21	0.43	±0.07	0.25	±0.18	0.57	±0.28
<i>Serina</i>	0.66	±0.10	0.33	±0.15	0.52	±0.36	0.62	±0.05	0.24	±0.12	0.60	±0.17
<i>Sn-glicero-3-fosfocolina</i>	0.03	±0.02	0.03	±0.02	0.02	±0.00	0.04	±0.01	0.01	±0.01	0.02	±0.01
<i>Sucinato</i>	0.94	±0.47	0.41	±0.15	0.73	±0.55	0.64	±0.36	0.29	±0.24	0.81	±0.38
<i>Treonina</i>	0.10	±0.03	0.08	±0.03	0.16	±0.13	0.08	±0.02	0.07	±0.02	0.16	±0.06
<i>Triptofano</i>	0.62	±0.24	0.28	±0.14	0.44	±0.27	0.45	±0.11	0.24	±0.08	0.48	±0.16
<i>Tirosina</i>	0.07	±0.05	0.03	±0.02	0.04	±0.01	0.12	±0.06	0.04	±0.03	0.07	±0.03
<i>UDP-glicose</i>	0.16	±0.05	0.09	±0.07	0.08	±0.02	0.13	±0.03	0.06	±0.04	0.12	±0.06
<i>Uracila</i>	0.14	±0.08	0.12	±0.07	0.12	±0.08	0.12	±0.06	0.09	±0.04	0.16	±0.10
<i>Valerato</i>	1.70	±0.49	0.92	±0.36	1.56	±1.07	1.41	±0.42	0.67	±0.19	1.67	±0.66
<i>Valina</i>	0.53	±0.30	0.30	±0.22	0.39	±0.26	0.40	±0.20	0.23	±0.17	0.38	±0.29