



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE

ABORDAGEM METABOLÔMICA APLICADA EM PROMASTIGOTAS
DE *Leishmania amazonensis* TRATADAS COM MEFLOQUINA

HEITER VALVERDE MAGALHÃES BONESS

Salvador

2025

HEITER VALVERDE MAGALHÃES BONESS

ABORDAGEM METABOLÔMICA APLICADA EM PROMASTIGOTAS
DE *Leishmania amazonensis* TRATADAS COM MEFLOQUINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química do Instituto de Química da
Universidade Federal da Bahia como requisito
para o curso de Doutorado em Química – área de
concentração em Química Analítica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gisele A. B. Canuto

Salvador

2025

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI – UFBA.

B712 Boness, Heiter Valverde Magalhães

Abordagem metabolômica aplicada em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com mefloquina / Heiter Valverde Magalhães Boness. -- Salvador, 2025.

84 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Gisele André Baptista Canuto

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química.) -- Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química, 2025.

1. metabolômica. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. promastigotas. 4. mefloquina. 5. fármacos de reposição. I. Canuto, Gisele André Baptista. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU: 547:616.9



TERMO DE APROVAÇÃO

HEITER VALVERDE MAGALHÃES BONESS

“ABORDAGEM METABOLÔMICA APLICADA NA INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA
MEFLOQUINA FRENTE A PROMASTIGOTAS DE LEISHIMANIA AMAZONENSIS”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Profª Draª Gisele André Baptista Canuto *Gisele*
Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira *Leonardo Sena Gomes Teixeira*
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Fábio, de Souza Dias *Fábio de Souza Dias*
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia, (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Profª Drª Lourdes Cardoso de Souza Neta *Lourdes Cardoso de Souza Neta*
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCONE AUGUSTO LEAL DE OLIVEIRA
Data: 04/08/2025 09:08:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Salvador, 01 de agosto de 2025.

À minha pequena Maria Lis.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e confiança depositados em mim, em especial à Andressa, presente durante esta jornada, e à minha mãe Edgloria, por ter sido sempre um exemplo de determinação.

Aos professores e professoras que fizeram parte de minha formação desde a graduação, contribuindo para além de aspectos intelectuais, em especial ao Prof. Dr. Frederico Guaré, Prof.^a Dr.^a Nídia Roque e Prof.^a Dr.^a Zênis Novais.

À Pror.^a Dr.^a Gisele A. B. Canuto, pela orientação, apoio e extrema paciência em diversos momentos durante este longo período.

Aos colegas do BioMet, em especial a Hanna, Samara e Rafaela, que participaram e me auxiliaram em momentos distintos deste projeto.

À Marina Menezes pela amizade, cafés e conversas sobre os rumos dos nossos doutorados.

Aos colegas do IQ que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Milena B. P. Soares, Dr. Vinícius P. C. Rocha e Dahara Carvalho, pela colaboração através da realização do cultivo das células de *Leishmania*, ensaios biológicos e disponibilização da infraestrutura do Instituto de Tecnologia em Saúde localizado no SENAI - CIMATEC.

Ao Laboratório de Análises Cromatográficas e Espectrométricas (LACE) do IQ – UFBA por disponibilizar o uso do LC-MS, e em especial à Prof.^a Dr.^a Regina Geris, por todos os esforços para implantação do laboratório.

Ao Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) do Instituto de Geociências – UFBA por disponibilizar o uso do GC-MS.

Às agências de fomento CNPq, CAPES, FAPESB e FINEP.

*É preciso não ter medo,
É preciso ter a coragem de dizer.*

Rondó da Liberdade de Carlos Marighella

BONESS, H. V. M. **Abordagem metabolômica aplicada em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com mefloquina.** 84 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2025.

RESUMO

Leishmanioses correspondem a um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Trypanosomatidae) que persiste como um grave problema de saúde afligindo principalmente as populações mais vulneráveis social e economicamente. Entre as medidas para controle e redução da incidência da doença, a quimioterapia representa uma ferramenta indispensável; porém, enfrenta obstáculos devido ao surgimento de resistência do parasita *Leishmania* spp. aos principais fármacos em uso. Neste contexto, a metabolômica tem sido aplicada no campo da parasitologia em investigações dos mecanismos de ação dos fármacos usados no tratamento das leishmanioses assim como, na busca por novos agentes anti-*Leishmania*. Neste trabalho, buscou-se investigar o potencial da mefloquina, um agente antimarial, frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis* através de uma abordagem metabolômica global. Esta abordagem utilizou técnicas de separação acopladas a espectrometria de massas como plataformas analíticas, mais especificamente, a cromatografia líquida em fase reversa acoplada a espectrometria de massas (RPLC-MS) em modo positivo e modo negativo de ionização, e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Após processamentos dos dados, avaliou-se a diferenciação entre o grupo tratado com a mefloquina e o grupo não tratado (controle), e os metabólitos discriminantes entre ambos os grupos, baseado em métodos de análises univariadas e multivariadas. As análises por GC-MS permitiram verificar que os níveis de isoleucina, ribose/lixose e ácido linoleico eram superiores no grupo tratado. Enquanto que, as análises por RPLC-MS indicaram principalmente alterações de metabólitos pertencente às classes de glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, ácidos graxos, aminoácidos, peptídeos e análogos. Adicionalmente, a análise de vias metabólicas demonstrou também que a rota referente a biossíntese de esteroides foi afetada durante o tratamento. Neste contexto, ainda que preliminarmente, visto que os ensaios ocorreram contra a forma promastigota do parasita, pode-se inferir que a mefloquina apresenta um mecanismo de atuação multialvo na morte de *L. amazonensis*.

Palavras-chave: metabolômica; *Leishmania amazonensis*; promastigotas; mefloquina; fármacos de reposição; análise estatística.

BONESS, H. V. M. **Abordagem metabolômica aplicada em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com mefloquina.** 84 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2025.

ABSTRACT

Leishmaniases comprise a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* (Trypanosomatidae), which remain a serious public health problem, mainly affecting socially and economically vulnerable populations. Among the measures for disease control and reduction of incidence, chemotherapy represents an indispensable tool; however, it faces challenges due to the emergence of resistance of *Leishmania* spp. to the main drugs currently in use. In this context, metabolomics has been applied in parasitology to investigate the mechanisms of action of drugs used in leishmaniasis treatment, as well as in the search for new anti-*Leishmania* agents. In this study, we sought to investigate the potential of mefloquine, an antimalarial agent, against *Leishmania amazonensis* promastigotes through a global metabolomic approach. This approach employed separation techniques coupled with mass spectrometry as analytical platforms, specifically reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry (RPLC-MS) in both positive and negative ionization modes, and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). After data processing, differentiation between the mefloquine-treated and untreated (control) groups was evaluated, as well as the discriminant metabolites between them, based on univariate and multivariate analyses. GC-MS analyses revealed higher levels of isoleucine, ribose/lyxose, and linoleic acid in the treated group. Meanwhile, RPLC-MS analyses indicated alterations mainly in metabolites belonging to glycerophospholipids, sphingolipids, fatty acids, amino acids, peptides, and analogs. Additionally, pathway analysis also demonstrated that the steroid biosynthesis pathway was affected during treatment. In this context, although preliminary, since the assays were performed against the promastigote form of the parasite, it can be inferred that mefloquine exhibits a multi-target mechanism of action in the death of *L. amazonensis*.

Keywords: Metabolomics; *Leishmania amazonensis*; promastigotes; mefloquine; repositioning drugs..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	15
Figura 2. Representação estrutural dos fármacos utilizados no tratamento das Leishmanioses	19
Figura 3. Representação estrutural da mefloquina	20
Figura 4. Fluxo de trabalho nas análises metabolômicas	22
Figura 5. Esquema das reações de metoximação e sililação para (a) aldeídos e cetonas e (b) açúcares	49
Figura 6. Gráfico de escores do modelo PCA das amostras do estudo metabolômico por GC-MS de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com mefloquina (amostras tratadas: ● TRT; amostras controle: ● CRT; controle de qualidade: ● QC)	55
Figura 7. Gráfico de escores do modelo PLS-DA das amostras do estudo metabolômico por GC-MS de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com mefloquina (amostras tratadas: ● TRT; amostras controle: ● CRT; controle de qualidade: ● QC). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0,96$ e $Q^2 = 0,47$	56
Figura 8. Boxplot e <i>fold change</i> TRT versus CRT dos metabólitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na avaliação metabolômica <i>untargeted</i> por GC-MS de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com mefloquina	57
Figura 9. Gráficos de escores do modelo PCA das amostras do estudo metabolômico de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com mefloquina analisadas por LC-MS fase reversa em (a) modo positivo e (b) modo negativo (amostras tratadas: ● TRT; amostras controle: ● CRT; controle de qualidade: ● QC)	59
Figura 10. Gráficos de escores do modelo PLS-DA das amostras do estudo metabolômico de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com mefloquina analisadas por LC-MS em modo positivo (a) (parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0,97$ e $Q^2 = 0,51$) e modo negativo (b) (parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0,89$ e $Q^2 = 0,48$) (amostras tratadas: ● TRT; amostras controle: ● CRT; controle de qualidade: ● QC)	60
Figura 11. Resultado da análise de via metabólica usando o algoritmo mummichog do estudo metabolômico de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com mefloquina analisadas por LC-MS	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Levantamento dos estudos em leishmaniose empregando abordagens metabolômicas	26
Tabela 2. Metabólitos anotados a partir das análises por GC-MS do estudo metabolômico de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com mefloquina	51
Tabela 3. Parâmetros aplicados no XCMS, otimizados a partir do IPO, para o processamento dos dados da análise por GC-MS	54
Tabela 4. Parâmetros aplicados no XCMS, otimizados pelo IPO, para o processamento dos dados da análise por LC-MS	58
Tabela A1 (Apêndice A). Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com mefloquina	76

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AMA = amastigota

AmB = anfotericina B

6AN = 6-aminonicotinamida

ATP = trifosfato de adenosina

Arg⁻ = arginase-suprimida

BSTFA = bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CE = eletroforese capilar

CHCl₃ = clorofórmio

FC = *fold change*

FM = fórmula molecular

GC = cromatografia gasosa

GPI = glicosilfosfatidilinositol

HCl = ácido clorídrico

HILIC = cromatografia líquida de interações hidrofílicas

IC₅₀ = concentração inibitória a 50%

ISC1 = cepas de *L. donovani* oriundo do subcontinente indiano

L. = *Leishmania*

LC = cromatografia líquida

ΔLCB2 = cepa mutante de *Leishmania* incapaz de sintetizar esfingolipídios

LRV = *Leishmania* RNA vírus

LT = leishmaniose tegumentar

LV = leishmaniose visceral

MeOH = metanol

MIL = miltefosina

MM = massa molecular

MS = espectrometria de massas

NADPH = nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OMS = Organização Mundial de Saúde

PC = glicerofosfocolina

PBS = tampão fosfato-salino

PMN = paromomicina

PRO = promastigota

QC = controle de qualidade

RMN = Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C = Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13

RMN de ^1H = Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

ROS = espécies reativas de oxigênio

RPLC = cromatografia líquida em fase reversa

RT = tempo de retenção

Sb = antimônio

SSG = estibogluconato de sódio

TCA = ácido tricarboxílico

TMCS = trimetilclorosilano

US = ultrassom

WT = tipo selvagem

ZIC = zwitteriônica

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Leishmanioses	15
1.2 Tratamento das leishmanioses	17
1.2.1 Mefloquina	20
1.3 Metabolômica	21
1.4 Metabolômica no estudo da leishmaniose	25
1.5 Abordagens metabolômicas no tratamento das leishmanioses	36
2. OBJETIVOS	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	42
3.1 Materiais e reagentes	42
3.2 Cultivo de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	42
3.3 Preparo das amostras para análise por GC-MS	43
3.4 Instrumentação e condições das análises por GC-MS	43
3.5 Preparo das amostras para análise por LC-MS	44
3.6 Instrumentação e condições das análises por LC-MS	45
3.7 Processamento e tratamento de dados	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Análise metabolômica por GC-MS	48
4.2 Análise metabolômica por LC-MS	58
4.3 Análise de vias metabólicas	61
4.4 Interpretação biológica	62
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7. APÊNDICE A	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

As Leishmanioses correspondem a um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Trypanosomatidae). Tais enfermidades estão inseridas no rol das doenças negligenciadas, as quais afigem diretamente as populações mais vulneráveis social e economicamente em países de baixa e média renda (WHO, 2025). Os parasitas causadores das leishmanioses são transmitidos através da picada de fêmeas dos flebotomíneos - insetos vetores. No Brasil, a principal espécie responsável pela transmissão é a *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae), popularmente conhecida como mosquito palha, tatuíra, birigui, entre outros. Os principais reservatórios desses protozoários são roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres, e ainda animais domésticos como cães, gatos e equinos. Os parasitas apresentam formas morfológicas e biologicamente distintas, adaptadas de acordo com o ambiente em que se encontram. No intestino do inseto vetor, o parasita apresenta-se na forma flagelada promastigota (PRO) procíclica e, através de um processo denominado metaciclogênese, transforma-se em promastigota metacíclica, a qual corresponde ao estágio infeccioso. Nos hospedeiros, o parasita se desenvolve no sistema fagocítico mononuclear para a forma não flagelada amastigota (AMA), que se multiplica levando ao rompimento da célula do hospedeiro e em seguida à infecção de outros macrófagos (Figura 1) (BRASIL, 2017). Adicionalmente, estudos recentes demonstraram também que amastigotas podem ser transferidos para macrófagos vizinhos através de conexões intercelulares mesmo antes da lise da célula hospedeira (STÖGERER *et al.*, 2023).

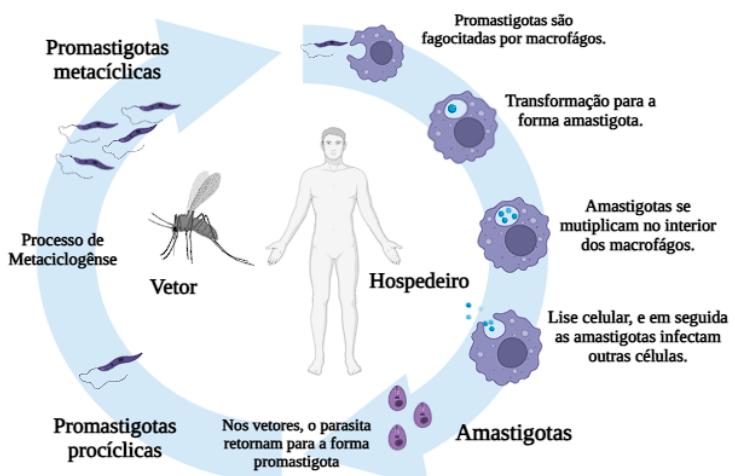


Figura 1. Representação geral do ciclo de vida de *Leishmania* spp.

As manifestações clínicas da doença podem se apresentar através das formas leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), sendo que tais manifestações dependerão da espécie causadora da enfermidade e do sistema imune do hospedeiro. A capacidade do parasita em sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos dos mamíferos, células especializadas do sistema imunológico do organismo hospedeiro, demonstra sua aptidão em contornar tais defesas. No momento inicial da infecção, a saliva do inseto vetor também contribui para o parasita contornar as defesas do organismo. Sabe-se que a saliva do mosquito contém metabólitos com atividade de vasodilatação, inibição da coagulação e efeitos imunomoduladores (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2022). Recentemente, tem se investigado também os mecanismos pelos quais ocorre uma maior virulência destas infecções nos parasitas com o vírus *Leishmania* RNA (LRV), o qual induz a autofagia e inibe a ativação do inflamassoma em macrófagos (DE CARVALHO *et al.*, 2019).

Na LV, forma mais agressiva da doença, o parasita migra para os órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea, podendo causar a morte em 90% dos casos sem tratamento. A forma mais comum, LT, caracteriza-se pela presença de lesões na pele, sendo que tais feridas podem ser únicas, múltiplas, disseminadas ou difusas, assim como também atingir as mucosas do nariz, boca e garganta. (BRASIL, 2017). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima a ocorrência de 50.000 à 90.000 novos casos anuais de LV no mundo, com apenas 25 – 45% dos casos relatados à OMS. Com relação a LT, estima-se cerca de 600 mil a 1 milhão de casos anualmente. Ademais, cerca de 1 bilhão de pessoas ainda vivem em áreas endêmicas com risco de infecção (WHO, 2023).

No Brasil, o Ministério da Saúde lançou um painel para monitoramento dos casos de leishmanioses no país. Em 2023, registrou-se aproximadamente 13 mil casos de leishmaniose tegumentar e cerca de 1.700 casos de leishmaniose visceral com surtos localizados, especialmente nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2025). Localmente, os boletins epidemiológicos emitidos pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia em 2025 registraram a ocorrência da forma visceral da doença em 57 municípios do Estado, enquanto que registraram 584 casos da forma tegumentar, dispersos em 170 municípios. Destaca-se que os principais agentes etiológicos no Brasil causadoras da leishmaniose tegumentar são as *L. amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*; e o principal causador da leishmaniose visceral a *L. infantum* (BAHIA, 2025).

1.2 Tratamento das leishmanioses

O tratamento das leishmanioses enfrenta diversos obstáculos, destacando-se os casos de resistência aos medicamentos de primeira escolha, os quais correspondem aos antimoniais (Sb). A base dos medicamentos de tal classe iniciou-se através da descoberta da ação leishmanicida do tártero emético, sob a forma do sal trivalente, pelo médico brasileiro Gaspar Viana (1912) (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). Atualmente, o tratamento das leishmanioses envolve o uso dos derivados pentavalentes, especificamente em duas formulações: o antimoniato-N-metil glucamina (antimoniato de meglumina) e o estibogluconato de sódio (SSG). O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está completamente elucidado, mas verifica-se que tal atividade envolve multialvos no parasita. Destaca-se a ação direta dos antimoniais na inibição da tripanotiona redutase, enzima chave do sistema redox do parasita, e um efeito indireto ao estimular a ação de macrófagos do hospedeiro para eliminar os invasores intracelulares (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Apesar de tais medicamentos ainda serem considerados de primeira escolha no tratamento das leishmanioses, a OMS tem recomendado o aumento progressivo das doses utilizadas devido ao surgimento de linhagens Sb-resistentes.

Outra problemática refere-se aos efeitos adversos, que incluem alterações no aparelho cardiovascular dos pacientes. Durante o tratamento, ainda existe a necessidade de o paciente realizar um acompanhamento contínuo para verificar possíveis arritmias cardíacas, caso este em que o uso do medicamento deve ser imediatamente suspenso. Desvantagens adicionais incluem a necessidade de aplicações do medicamento por via intramuscular ou intravenosa e um período de tratamento relativamente longo. Tais adversidades provocam o abandono do tratamento por muitos usuários, o que contribui para o aumento de resistência parasitária (BRASIL, 2017; SUNDAR *et al.*, 2018).

Alternativamente, considerado como tratamento de segunda linha, utiliza-se a anfotericina B (AmB), que atua tanto na forma promastigota quanto amastigota do parasita. O mecanismo de ação da AmB envolve a formação de um complexo com o ergosterol – principal componente esteroidal da membrana celular do parasita – e alterações da permeabilidade da membrana, causando um desequilíbrio iônico e, consequentemente, morte parasitária (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Ainda são raras as ocorrências de linhagens AmB-resistentes, e as principais desvantagens no tratamento correspondem à necessidade de aplicação por via intravenosa e diversos efeitos colaterais, como calafrios, febre, anorexia, náuseas, vômitos, cefaleia, mialgia, artralgia, taquipneia

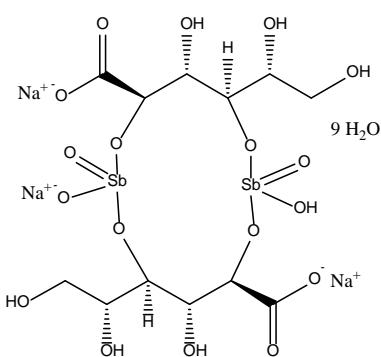
e hipotensão, além de complicações pulmonares e renais, esta última – ainda que reversíveis – com ocorrência praticamente em todos os pacientes.

A alternativa que tem sido utilizada para contornar parte destes efeitos adversos corresponde ao uso da anfotericina lipossomal, forma menos tóxica, cujo tratamento apresenta alto custo. Inseridas também como segunda escolha, estão incluídas as pentamidinas, as quais apresentam a capacidade de se ligar ao DNA do protozoário, bem como interferir na síntese de poliaminas. Uma problemática no uso de tal fármaco é a necessidade de administração via intravenosa, e em casos de aplicação de doses elevadas, pode ser observado taquicardia e hiperglicemia (SUNDAR *et al.*, 2018; BRASIL, 2018).

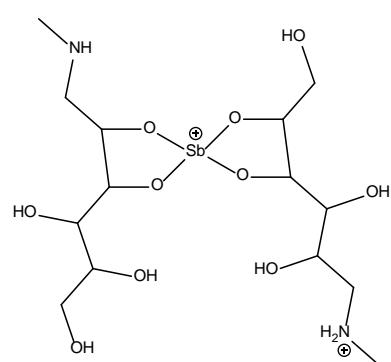
Outro tratamento corresponde ao uso de miltefosina (MIL), que apresenta como uma das principais vantagens a administração via oral. Este aspecto mostra-se essencial no tratamento de pacientes localizados em áreas de maior vulnerabilidade e/ou com difícil acesso, visto que os medicamentos com administração parenteral exigem a necessidade de um acompanhamento por profissional da saúde, assim como monitoramento das funções renais, hepática e cardíacas, exigindo um acesso a unidades de saúde com maior infraestrutura. O mecanismo de ação da MIL ainda não está totalmente elucidado, apesar de verificar-se que há uma indução a apoptose (morte parasitária programada), afetando a composição fosfolipídica e inibindo a ação do citocromo *c* oxidase do parasita. O tratamento com tal fármaco tem apresentado resultados satisfatórios em inúmeras situações, tais como em pacientes imunossuprimidos. Como desvantagem, os efeitos colaterais incluem desconfortos gastrointestinais como vômitos e diarreias, e em destaque, um efeito teratogênico (BRASIL, 2017; BRASIL 2018). Além disso, nos últimos anos, observou-se uma diminuição da eficácia da MIL após uso extensivo na Índia, assim como uma resistência natural de *L. infantum* no tratamento da LV no Brasil, conforme descrito por Carnielli *et al.* (2019).

Mais recentemente, os fármacos descritos acima estão sendo empregados em associações terapêuticas a fim de contornar os efeitos indesejáveis potencializados quando usados em doses elevadas em monoterapia. Além disso, objetiva-se diminuir o tempo de tratamento ou mesmo desacelerar o surgimento de resistência parasitária. Como exemplo, cita-se o uso da pentoxifilina, atuando como coadjuvante, em uso com o antimoniato de meglumina, cujo tratamento tem apresentado um menor tempo de cura, sendo recomendado para terapia da LT (BRASIL, 2017; SUNDAR *et al.*, 2018). Uma alternativa para o tratamento da LV inclui o uso da paromomicina (PMN) em combinação com antimoniais e MIL (MUSA *et al.*, 2022) ou, de maneira mais eficaz, usada no

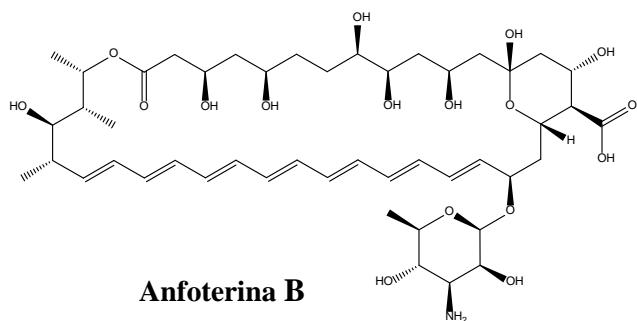
tratamento da forma cutânea, sendo administrada via intravenosa ou muscular. Alguns casos, envolvem o uso de formulações tópicas; entretanto, uma menor eficácia tem sido relatada (MATOS *et al.*, 2020). Deste modo, face às inúmeras problemáticas apresentadas pelas terapias atualmente existentes (Figura 2), a busca por novos agentes para o tratamento da leishmaniose mostra-se urgente. Assim, somente após superar tais desafios e, em conjunto com ações de promoção à saúde, poderão ser alcançadas as metas referentes às doenças negligenciadas estabelecidas pela OMS, como a redução em 90% do número de pessoas que necessitam de tratamento, durante a Assembleia Mundial de Saúde (2020).



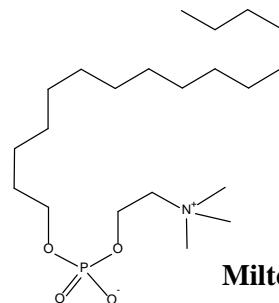
Estibogluconato de sódio



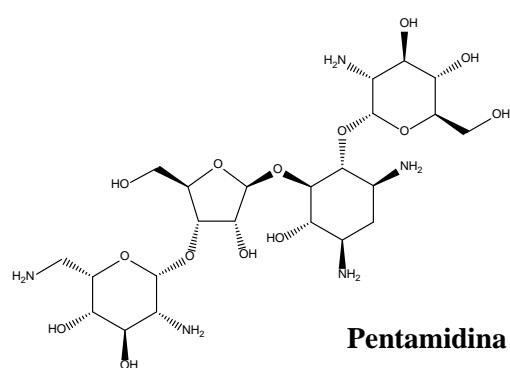
Antimoniato de meglumina



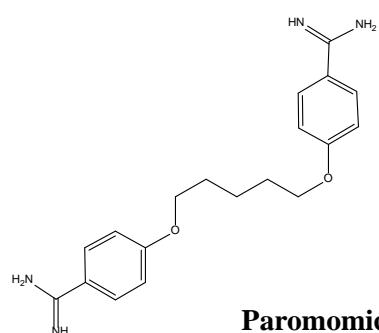
Anfoterina B



Miltefosina



Pentamidina



Paromomicina

Figura 2. Representação estrutural dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.

1.2.1 Mefloquina

Uma estratégia atualmente empregada na busca de novas opções terapêuticas, inclusive para as leishmanioses, consiste em avaliar fármacos já utilizados no tratamento de outras doenças. Tal estratégia, designada como reposicionamento de fármacos, tem sido promissora principalmente por diminuir o tempo e os custos referente às fases de investigações de dados de segurança e farmacocinéticos (ASHBURN e THOR., 2004). Vale destacar, que o uso de fármacos de reposição não é uma novidade no tratamento das leishmanioses. A miltefosina, comentada anteriormente como segunda linha de terapia, foi inicialmente desenvolvida como agente antineoplásico, mas apresentou-se adequada no tratamento das leishmanioses (VINCENT *et al.*, 2014).

Neste contexto, a mefloquina (Figura 3), um fármaco análogo do quinino, utilizado no tratamento e na profilaxia da malária desde a década de 1980, tem sido avaliado no tratamento das leishmanioses. Gomez *et al.* (1995) avaliaram o uso do fármaco em um estudo clínico preliminar com 17 pacientes portadores da leishmaniose cutânea no Equador. Os resultados demonstraram que a maioria das lesões cicatrizaram após 2-3 semanas do início do tratamento via oral com a mefloquina. Já no estudo realizado por Hendrickx *et al.* (1998), em pacientes na Colômbia com lesões cutâneas causadas por *L. panamensis*, o tratamento não se mostrou tão eficaz, visto que o fármaco curou apenas 30,8% dos pacientes tratados enquanto que, os pacientes que receberam placebo tiveram uma taxa de cura de 27,9%, e os pacientes tratados com antimoniato de meglumina apresentaram uma taxa de cicatrização de 86,3%.

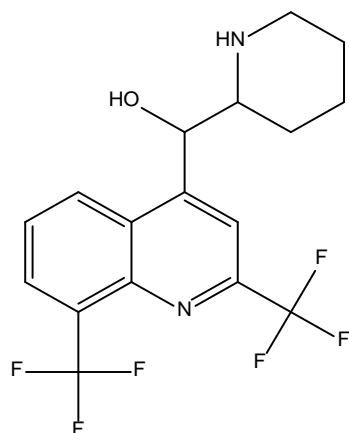


Figura 3. Representação estrutural da mefloquina.

Laguna-Torres *et al.* (1999) avaliaram o uso da mefloquina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (Viannia) braziliensis* no Estado da Bahia (Brasil). Neste estudo, não foram observadas melhoras evidentes com o uso da mefloquina, visto que somente um paciente apresentou cicatrização da lesão, ao passo que, os outros quatro pacientes avaliados permaneceram com as úlceras não cicatrizadas. Vale ressaltar ainda que, em um dos pacientes, houve o surgimento de uma nova lesão durante o tratamento. Em um estudo adicional envolvendo o uso da mefloquina no tratamento da leishmaniose cutânea em três pacientes no Estado de Minas Gerais (Brasil), Correia *et al.* (1999) também não observaram uma melhora, e então descontinuaram as investigações deste junto a novos pacientes.

Por sua vez, Galvão *et al.* (2000) realizaram um estudo comparativo da mefloquina e a aminosidine utilizando 182 camundongos da linhagem C57BL/6, inoculados com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Os resultados demonstraram que não houve diferença histológica entre o grupo tratado com mefloquina e o grupo controle; assim como não houve diferença de extensão das áreas de necrose e do nível da fibrose tecidual entre os grupos tratados. Deste modo, os autores indicaram um papel reduzido do efeito terapêutico da mefloquina. Em um estudo mais recente, Rocha *et al.* (2013) avaliaram a mefloquina em modelos *in vitro* e *in vivo* frente a *Leishmania amazonensis*. Neste estudo, a mefloquina apresentou uma IC₅₀ (concentração inibitória a 50%) = 8.4 ± 0.7 mmol L⁻¹ frente ao parasita na forma promastigota, e um IC₅₀ = 1.56 ± 0.19 mmol L⁻¹ frente a forma amastigota intracelular em macrófagos infectados. No modelo *in vivo*, os camundongos CBA infectados e tratados com a mefloquina por via oral e tópica apresentaram uma redução da lesão, apesar de não causar uma redução da carga parasitária, conforme análise dos linfonodos de drenagem.

Desta forma, face aos resultados ora divergentes em tais estudos, visto tratar-se do uso da mefloquina em diferentes contextos e frente a diferentes espécies de *Leishmania*, o presente trabalho buscou aprofundar as investigações de tal droga como um potencial leishmanicida, especificamente frente a *L. amazonensis*, o qual tem sido um dos principais agentes etiológicos causador da LT no Brasil.

1.3 Metabolômica

A metabolômica, termo criado por Oliver Fiehn (2001), corresponde a uma análise abrangente e quantitativa do metaboloma, conjunto de todos os metabólitos de um sistema biológico. Tal definição atualmente corresponde a uma análise abrangente de

todos os compostos, com massa molecular (MM) inferior a 1.500 Da, presentes em uma amostra biológica, como uma cultura de células, biofluído ou organismo vivo (KUEHNBAUM e BRITZ-MCKIBBIN, 2013). Ressalta-se que esta definição se distingue das avaliações de perfil químico ou perfil metabólico, pois em uma análise metabolômica realiza-se uma avaliação comparativa entre, minimamente, dois grupos de amostras, objetivando-se investigar os metabólitos produzidos e/ou alterados em função de modificações genéticas ou intervenções externas (ambiental, tratamento, etc).

Uma análise metabolômica pode ser conduzida por duas abordagens: metabolômica alvo (do inglês, *targeted metabolomics*), a qual corresponde a uma análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados, de determinada classe química, ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas; e metabolômica global ou metabolômica não direcionada (do inglês, *untargeted metabolomics*), a qual refere-se a uma análise qualitativa ou semiquantitativa do maior número possível de metabólitos, pertencentes a diversas classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo (CANUTO *et al.*, 2018).

O fluxo de trabalho da metabolômica envolve minimamente as seguintes etapas: i) seleção do material biológico; ii) pré-tratamento e extração da amostra; iii) aquisição de dados; iv) processamento dos dados, v) análise estatística; e vi) interpretação biológica. Cada uma destas etapas deve ser planejada cuidadosamente, visto que poderá influenciar nas subsequentes e, consequentemente, nas interpretações e hipóteses geradas no estudo (Figura 4) (CANUTO *et al.*, 2018).

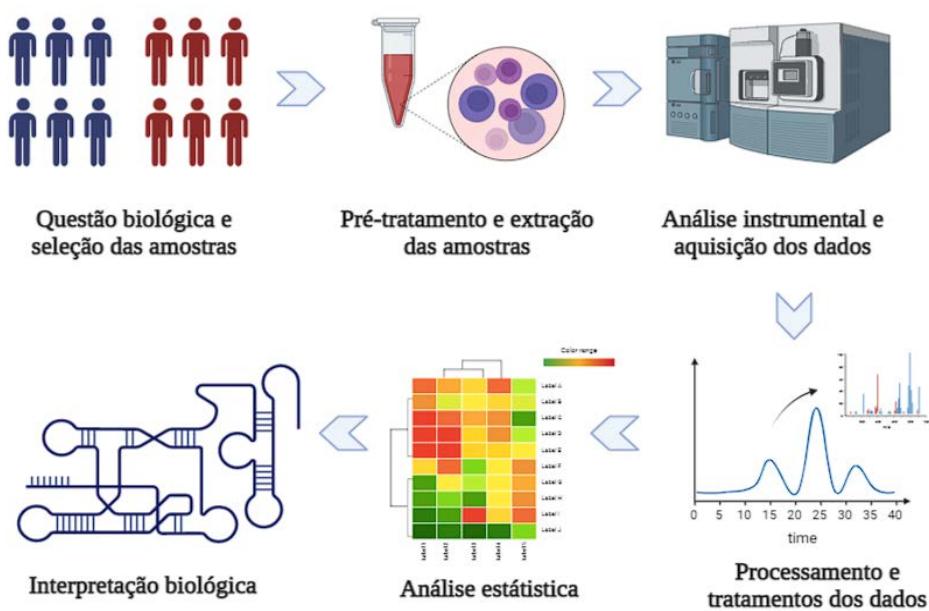


Figura 4. Fluxo de trabalho nas análises metabolômicas.

A escolha do material biológico é a primeira etapa deste fluxo de trabalho e deve garantir uma representatividade amostral, com o objetivo de não gerar resultados tendenciosos. Tais amostras podem englobar células, tecidos e biofluidos tais como sangue, urina, saliva, entre outros. Na segunda etapa é fundamental a interrupção de qualquer atividade enzimática (chamado *quenching* metabólico), para evitar alterações no metaboloma do organismo em estudo. Esta etapa também envolve uma extração eficiente dos metabólitos, através de procedimentos que podem envolver a lise celular e uso de diferentes sistemas de solventes para extração do metaboloma intracelular, métodos de precipitação de proteínas, remoção de sais e ainda, incluir procedimentos de adequação das amostras de acordo o(s) método(s) analítico(s) a serem empregados, tais como etapas de lavagem ou derivações (CANUTO *et al.*, 2018).

A análise das amostras apresenta-se complexa face a diversidade química dos metabólitos presentes nos organismos vivos, suas propriedades físico-químicas intrínsecas (hidro- ou lipofilicidade, volatilidade, etc.), assim como sua variável faixa de concentração (WATSON, D. G., 2009). Deste modo, objetivando-se abranger um amplo perfil do metaboloma destes organismos, recomenda-se que a terceira etapa seja realizada em multiplataformas de análise, tendo como principais ferramentas a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (MS), sendo esta última usualmente associada a técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC) e eletroforese capilar (CE).

A RMN tem como vantagem ser uma técnica não destrutiva, robusta, reprodutível e com preparo de amostras mais simples. Porém, apresenta como desvantagem uma baixa sensibilidade analítica e usualmente espectros complexos para amostras biológicas, dificultando a identificação e determinação dos metabólitos. Com relação a MS, destaca-se a alta sensibilidade analítica como principal vantagem, e versatilidade quando acopladas às técnicas de separação (LC-MS, GC-MS e CE-MS) (CREEK *et al.*, 2012, KUEHNBAUM e BRITZ-MCKIBBIN, 2013). A separação prévia dos metabólitos presentes nos extratos permite a obtenção de uma maior qualidade dos dados brutos (caracterizados como *molecular features*, informações tridimensionais incluindo a relação m/z , tempo de retenção e sinal analítico extraído), assim como facilita a identificação dos metabólitos através da associação de informações espectrais e tempos de retenção. Tais técnicas de separação apresentam características distintas e são aplicadas de acordo com as propriedades dos metabólitos a serem determinados. A cromatografia líquida, por exemplo, apresenta-se adequada para compostos que não seriam facilmente volatilizáveis

ou termicamente estáveis, os quais seriam requisitos para análises por cromatografia gasosa. Assim, a LC foi inicialmente aplicada aos estudos metabolômicos pela possibilidade de se analisar compostos com propriedades lipofílicas, através da cromatografia líquida em fase reversa (RPLC), a qual consiste em uma fase estacionária hidrofóbica, usualmente formada por grupos alquílicos do tipo C8 ou C18 quimicamente ligados às partículas de sílicas, tendo como fase móvel misturas de água, metanol e acetonitrila.

Apesar de amplamente utilizada, a RPLC apresenta como desvantagem uma baixa capacidade em separar compostos iônicos ou de maior polaridade. Alternativamente, desenvolveu-se nas últimas décadas a análise de compostos polares através da cromatografia líquida de interações hidrofílicas (HILIC), a qual apresenta uma fase estacionária com maior afinidade por compostos hidrofílicos e que permite também o uso de fases móveis tais como água, acetonitrila e metanol. Em função da RPLC e HILIC apresentarem mecanismos de separação com características distintas e ortogonais, se apresentam como técnicas complementares, com a vantagem de se utilizar o mesmo aparato instrumental.

Adicionalmente, emprega-se também a CE, a qual permite a separação de compostos iônicos ou ionizáveis utilizando colunas capilares preenchidas com um eletrólito condutor submetido a ação de um campo elétrico (KUEHNBAUM e BRITZ-MCKIBBIN, 2013). Apesar das inúmeras aplicações, as técnicas de separação acopladas a MS apresentam algumas desvantagens. Pode-se citar, por exemplo, a necessidade de reações de derivação, no caso das análises por GC-MS, visto que muitos metabólitos não são volatilizados nas temperaturas de trabalho dos métodos. No caso do acoplamento LC-MS e CE-MS, a ausência de bibliotecas espectrais dificulta a acurácia na identificação dos metabólitos, fazendo-se necessário a aquisição de padrões analíticos autênticos e análise em tandem (MS/MS). Além dos pontos citados, destaca-se ainda, o fato de que todas estas são técnicas destrutivas.

Nos estudos metabolômicos, verifica-se a necessidade de um processo de gestão da qualidade, a fim de avaliar e garantir que o desempenho e a estabilidade instrumental atendam a critérios de confiança e resultem em dados de alta qualidade (BROADHURST *et al.*, 2018). Usualmente, este processo é realizado com base em uma mistura de todas as amostras em igual volume, os QCs (controle de qualidade), injetados no início, fim e no decorrer da sequência analítica. Através de tal mecanismo, observa-se então a variância dos dados obtidos (CANUTO *et al.*, 2012; BERG *et al.*, 2013).

Após a aquisição instrumental, os dados metabolômicos são processados em softwares dedicados que servem para extrair informações a partir dos sinais analíticos obtidos (os *molecular features*). Os dados são então avaliados por ferramentas estatísticas, através de análises multi- e univariada, a fim de determinar as espécies alteradas na comparação entre os grupos estudados (XIA e WISHART, 2011). Em posse dos sinais discriminantes e relevantes estatisticamente, os metabólitos são anotados, seja com base em seu íon molecular/aduto formado ou padrão de fragmentação espectral, utilizando bases de dados e bibliotecas públicas ou *in-house*. Por último, a interpretação biológica deve ser realizada com base nas alterações do metaboloma observadas do organismo nas condições em estudo, buscando uma explicação bioquímica para tais alterações e/ou levantando-se hipóteses (PATTI *et al.*, 2012; LAMICHHANE *et al.*, 2018).

1.4 Metabolômica no estudo da leishmaniose

A metabolômica tem sido aplicada na área de parasitologia, mais especificamente no estudo da leishmaniose, utilizando diferentes plataformas analíticas, tais como RMN e MS acopladas às técnicas de separações. A Tabela 1 sintetiza os trabalhos na área, publicados até 2025, com destaque para os objetivos e plataformas analíticas empregadas.

Tabela 1. Levantamento dos estudos em leishmaniose empregando abordagens metabolômicas.

Organismo/Tipo	Objetivo	Técnica	Referência
<i>L. (L.) infantum</i> PRO	Otimizar um protocolo para análise metabolômica não direcionada utilizando GC-MS.	GC-MS	Canuto <i>et al.</i> (2025)
<i>L. infantum</i> PRO	Avaliar o perfil lipídico de vesículas extracelulares de <i>Leishmania</i> resistente a medicamentos.	RPLC-MS	Kim <i>et al.</i> (2024)
<i>L. infantum</i> PRO	Avaliar a influência da exclusão da enzima proteína quinase de gotículas lipídicas (LDK) no metaboloma <i>L. infantum</i> .	RPLC-MS	Ribeiro <i>et al.</i> (2024)
Urina de hamsters	Avaliar o metaboloma da urina de hamsters na presença ou ausência de leishmaniose visceral.	RPLC-MS	Yuan <i>et al.</i> (2023)
<i>L. mexicana</i> Macrófagos	Avaliar as vias metabólicas antinociceptivas em camundongos infectados por promastigotas <i>L. mexicana</i> .	RPLC-MS	Volpedo <i>et al.</i> (2023)
<i>L. lainsoni</i> PRO e AMA	Avaliar o metaboloma de promastigotas e amastigotas na condição de quiescência sob pressão por Sb ou mudanças para fase estacionária.	HILIC-MS	Jara <i>et al.</i> (2022)*
<i>L. tropica</i> PRO	Identificar biomarcadores de resistência ao antimônio através da análise dos metabólitos intracelulares e extracelulares.	RMN de ¹ H	Guarnizo <i>et al.</i> (2021)*
<i>L. major</i> AMA	Avaliar o mecanismo de ação do extrato de <i>Xanthium strumarium</i> frente amastigotas de <i>L. major</i> .	RMN de ¹ H	Ahmadi <i>et al.</i> (2021)

Tabela 1. Levantamento dos estudos em leishmaniose empregando abordagens metabolômicas.

Organismo/Tipo	Objetivo	Técnica	Referência
<i>L. amazonensis</i> Macrófagos	Avaliar o metaboloma de macrófagos C57BL/6 durante a infecção inicial com <i>L. amazonensis</i> .	CE-MS	Mamani-Huasca <i>et al.</i> (2021)
<i>L. major</i> e <i>L. tropica</i> PRO	Comparar o metaboloma de promastigotas metacíclicas de <i>L. major</i> e <i>L. tropica</i> .	RMN de ^1H	Tabrizi <i>et al.</i> (2021)
<i>L. donovani</i> Tecidos e biofluído	Verificar as alterações metabólicas em tecidos e biofluído de camundongos infectados com <i>L. donovani</i> .	GC-MS	Das <i>et al.</i> (2021)
<i>L. major</i> Tecidos	Avaliar o metaboloma do tecido da orelha e patas de camundongos infectados com <i>L. major</i> .	RPLC-MS	Parab <i>et al.</i> (2021)
<i>L. donovani</i> PRO	Avaliar o efeito da PMN no metaboloma de cepas de <i>L. donovani</i> com diferentes suscetibilidades a antimoniais.	HILIC-MS	Shaw <i>et al.</i> , (2020)*
<i>L. major</i> PRO	Avaliar as alterações metabólicas da ação do extrato de <i>Xanthium strumarium</i> frente a promastigotas de <i>L. major</i> .	RMN de ^1H	Ahmadi <i>et al.</i> (2019)
<i>L. amazonensis</i> Macrófagos	Avaliar o perfil metabólico de macrófagos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> tipo selvagem e arginase-suprimida.	CE-MS	Muxel <i>et al.</i> (2019)
<i>L. mexicana</i> PRO	Avaliar as diferenças no metabolismo entre as linhagens AmB-resistente e selvagem de <i>L. mexicana</i> .	HILIC-MS	Pountain <i>et al.</i> (2019)*

Tabela 1. Levantamento dos estudos em leishmaniose empregando abordagens metabolômicas.

Continuação.

Organismo/Tipo	Objetivo	Técnica	Referência
<i>L. amazonenses</i> PRO	Descrever um protocolo para análise do perfil metabólico do gênero <i>Leishmania</i> por CE-MS.	CE-MS	Rojo <i>et al.</i> (2019)
<i>L. amazonensis</i> PRO	Avaliar o perfil metabólico de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> submetido a sucessivas passagens <i>in vitro</i> .	GC-MS, CE-MS e RPLC-MS	Crepaldi <i>et al.</i> (2019)
Plasma	Avaliar o perfil metabólico de pacientes com leishmaniose tegumentar em tratamento com antimoniato de meglumina.	HILIC-MS	Vargas <i>et al.</i> (2019)
<i>L. donovani</i> PRO	Investigar a dinâmica de resistência ao antimonial de cepas de <i>L. donovani</i> oriundas do subcontinente indiano.	HILIC-MS	Dumetz <i>et al.</i> (2018)*
<i>L. donovani</i> e <i>L. major</i> AMA e PRO	Avaliar as alterações metabólicas de AMA de <i>L. donovani</i> e PRO de <i>L. major</i> durante tratamento com MIL.	RPLC-MS e CE-MS	Armitage <i>et al.</i> (2018)*
<i>L. mexicana</i> e <i>L. infantum</i> PRO	Avaliar a ação da 6-aminonicotinamida, um análogo da nicotinamida, frente a promastigotas de <i>L. mexicana</i> e <i>L. infantum</i> .	HILIC-MS	Almugadam <i>et al.</i> (2018)*
<i>L. donovani</i> PRO	Avaliar o perfil genômico e metabólico de um novo grupo genético do subcontinente indiano.	HILIC-MS	Cuypers <i>et al.</i> (2018)
<i>L. infantum</i> PRO	Avaliar o mecanismo de ação da sertralina frente a <i>L. infantum</i> .	RPLC-MS e CE-MS	Lima <i>et al.</i> (2018)*

Tabela 1. Levantamento dos estudos em leishmaniose empregando abordagens metabolômicas.

Continuação.

Organismo/Tipo	Objetivo	Técnica	Referência
<i>L. infantum</i> PRO	Avaliar o mecanismo de ação do metildeidrodieugenol B frente a promastigotas de <i>L. infantum</i> .	GC-MS e RPLC-MS	Canuto <i>et al.</i> (2017)*
<i>L. mexicana</i> PRO	Avaliar as alterações metabólicas da linhagem fenotípica de <i>L. major</i> deficiente na captação de glicose.	HILIC-MS	Akpunarlieva <i>et al.</i> (2017)
<i>L. donovani</i> PRO	Analizar as mudanças associadas à seleção de resistência a MIL de duas cepas de <i>L. donovani</i> com diferentes resistências a antimoniais.	HILIC-MS	Shaw <i>et al.</i> (2016)*
<i>L. major</i> PRO	Avaliar o metaboloma da fase estacionária e logarítmica de promastigotas de <i>L. major</i> .	RMN de ¹ H	Arjmand <i>et al.</i> (2016)
<i>L. donovani</i> , <i>L. major</i> e <i>L. mexicana</i> PRO	Comparar o metaboloma de promastigotas de <i>L. donovani</i> , <i>L. major</i> e <i>L. mexicana</i> .	HILIC-MS	Westrop <i>et al.</i> (2015)
<i>L. donovani</i> PRO	Avaliar as mudanças metabólicas em linhagens resistentes usando combinação de drogas (Sb ^{III} , AmB, MIL e PMM).	HILIC-MS	Berg <i>et al.</i> (2015)*
<i>L. amazonensis</i> PRO	Avaliar o perfil metabolômico de linhagens do tipo selvagem e arginase-suprimida submetido à privação de L-arginina.	CE -MS	Castilho-Martins <i>et al.</i> (2015)

Tabela 1. Levantamento dos estudos em leishmaniose empregando abordagens metabolômicas.

Continuação.

Organismo/Tipo	Objetivo	Técnica	Referência
<i>L. infantum</i> PRO	Avaliar o mecanismo de ação e resistência ao Sb ^{III} de promastigotas na fase exponencial de <i>L. infantum</i> .	GC-MS, CE-MS e RPLC-MS	Rojo <i>et al.</i> (2015)*
<i>L. braziliensis</i> PRO	Avaliar o metaboloma de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> obtidos a partir de isolados de lesões cutâneas e mucocutâneas.	GC-MS, CE-MS e RPLC-MS	Alves-Ferreira <i>et al.</i> (2015)
<i>L. (L.) donovani</i> PRO	Avaliar as mudanças metabólicas envolvidas no mecanismo de ação e resistência da MIL em <i>L. donovani</i> .	GC-MS, CE-MS e RPLC-MS	Canuto <i>et al.</i> (2014)*
<i>L. mexicana</i> PRO e AMA	Investigar o metabolismo de carbono de promastigotas e amastigotas de <i>L. mexicana</i> .	RMN de ¹³ C	Saunders <i>et al.</i> (2014)
<i>L. major</i> PRO	Otimizar as condições de análise utilizando HILIC-MS.	HILIC-MS	Zhang <i>et al.</i> (2014)
<i>L. infantum</i> PRO	Comparar o metaboloma de promastigotas de <i>L. infantum</i> tipo-selvagem e linhagens resistentes frente ao tratamento com MIL.	HILIC-MS	Vincent <i>et al.</i> (2014)*
<i>L. infantum</i> Pelos de cães	Comparar os compostos orgânicos voláteis emitidos por cães sadios e infectados com leishmaniose visceral.	GC-MS	Magalhães <i>et al.</i> (2014)

Tabela 1. Levantamento dos estudos em leishmaniose empregando abordagens metabolômicas.

Continuação.

Organismo/Tipo	Objetivo	Técnica	Referência
<i>L. donovani</i> PRO	Avaliar as diferenças metabólicas entre cepas geneticamente semelhantes com diferentes suscetibilidades ao estibogluconato de sódio.	HILIC-MS	Berg <i>et al.</i> (2013)*
<i>L. donovani</i> PRO	Avaliar métodos de normalização de dados oriundos de experimentos metabolômicos baseados em LC-MS.	HILIC-MS	Ejigu <i>et al.</i> (2013)
<i>L. major</i> PRO	Avaliar o meio de crescimento, o extrato obtido a partir do parasita e o metaboloma de macrófagos na presença e ausência de <i>L. major</i> .	RMN de ¹ H	Lamour <i>et al.</i> (2012)
<i>L. infantum</i> PRO	Comparar o metaboloma de cepas de <i>L. infantum</i> tratadas com antimoniais.	CE-MS	Canuto <i>et al.</i> (2012)*
<i>L. mexicana</i> PRO	Acompanhar a incorporação de várias fontes de carbono marcadas com ¹³ C nos metabólitos intracelulares e excretados de <i>L. mexicana</i> .	GC-MS e RMN de ¹³ C	Saunders <i>et al.</i> (2011)
<i>L. donovani</i> PRO	Avaliar as mudanças no perfil metabólico das promastigotas de <i>L. donovani</i> durante a fase logarítmica e estacionária.	HILIC-MS	Silva <i>et al.</i> (2011)
<i>L. donovani</i> PRO	Otimizar um protocolo de extração para <i>Leishmania</i> e otimizar uma abordagem analítica utilizando HILIC acoplado a Orbitrap MS.	HILIC-MS	t'Kindt <i>et al.</i> (2010)
Soro sanguíneo -	Comparar o soro sanguíneo de pacientes com leishmaniose e pacientes saudáveis.	RMN de ¹ H	Mohsen <i>et al.</i> (2010)

Tabela 1. Levantamento dos estudos em leishmaniose empregando abordagens metabolômicas.

Continuação.

Organismo/Tipo	Objetivo	Técnica	Referência
<i>L. donovani</i> PRO	Avaliar uma abordagem para filtragem e identificação dos picos de isótopos, adutos, fragmentos e espécies de cargas múltiplas.	HILIC-MS	Scheltema <i>et al.</i> (2009)
<i>L. mexicana</i> PRO	Avaliar uma abordagem para alinhamento de picos em GC-MS.	GC-MS	Robinson <i>et al.</i> (2007)
<i>L. major</i> PRO	Investigar o papel da enzima gliconeogênica frutose-1,6-bisfosfatase.	GC-MS	Nareder <i>et al.</i> (2006)
<i>L. mexicana</i> PRO	Avaliar uma abordagem para o agrupamento de picos oriundos de dados de GC-MS.	GC-MS	De Souza <i>et al.</i> (2006)

* Trabalhos cuja temática envolve estudo metabolômico envolvendo ação e/ou resistência de fármacos ou compostos ativos, para compreensão de alterações metabólicas em função de tratamento da leishmaniose.

Dentre estes trabalhos, alguns abordam comparações entre espécies de *Leishmania* como, por exemplo, o estudo realizado por Westrop *et al.* (2015) que avaliaram o metaboloma de promastigotas de *L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana*, e que revelaram diferenças no metabolismo de aminoácidos entre as espécies. Já em um recente estudo de Tabrizi *et al.* (2021) foi possível observar que o metaboloma de *L. major* e *L. tropica* apresenta diferença em oito vias metabólicas, com destaque para alterações nos níveis de metionina, aspartato, betaína, acetilcarnitina, asparagina, 3-hidroxibutirato, L-prolina e quinurenina.

Investigando o perfil metabolômico das fases de crescimento *in vitro* de PRO de *L. donovani*, Silva *et al.* (2011) observaram um aumento nos níveis de esfingolipídios e glicerolipídios quando as células progrediram da fase logarítmica para a fase estacionária. Similarmente, Arjmand *et al.* (2016) também observaram alterações entre estas fases em *L. major*, e destacaram o ácido citracônico, ácido isopropilmálico, L-leucina, ornitina, ácido caprílico, ácido cáprico e ácido acético como principais metabólitos alterados. Em outro trabalho, Crepaldi *et al.* (2019) avaliaram a impressão digital metabólica de PRO de *L. amazonensis* após sucessivas passagens *in vitro*, pois estudos prévios indicaram uma atenuação da virulência do parasita após a manutenção das cepas por longos períodos. De fato, os autores observaram que as culturas tardias foram mais sensíveis ao antimônio, e observaram ainda alterações no metabolismo energético, lipídico e redox do parasita.

Alves-Ferreira *et al.* (2015), por sua vez, investigaram as diferenças metabólicas da forma PRO obtidas a partir dos isolados clínicos de sítios mucosos e cutâneos de pacientes infectados com *L. braziliensis*, e destacaram que os principais metabólitos alterados estavam correlacionados a processos inflamatórios. Em outro estudo, Cuypers *et al.* (2018) avaliaram o perfil metabolômico de cepas de um novo grupo genético de *L. donovani*, oriundo do subcontinente indiano em comparação com o genótipo principal da região. Os autores observaram diferenças no metabolismo lipídico e ciclo da ureia, destacando-se as alterações nos níveis de glicerofosfolipídios, assim como, uma maior concentração de citrulina, uma menor concentração de argininosuccinato, e uma maior eficiência na via de recuperação de nucleotídeos em ISC1.

No contexto de avaliação de cepas mutantes, o perfil metabolômico da forma PRO de *L. amazonensis* das linhagens tipo-selvagem (*La-WT*) e arginase-suprimida (*La-arg⁻*), na presença ou ausência de L-arginina, aminoácido essencial no metabolismo de *Leishmania*, foram avaliados por Castilho-Martins *et al.* (2015). Os autores observaram que, tanto os parasitas *La-WT* privados de arginina quanto os parasitas *La-arg⁻*,

apresentaram níveis mais baixos de prolina, o que indicaria a existência de uma via alternativa para produção dos precursores da via das poliaminas, que desempenham um papel essencial na replicação celular do parasita. Akpunarlieva *et al.* (2017), por sua vez, avaliaram uma linhagem mutante de *L. mexicana* deficiente na captação de glicose, e verificaram uma redução da defesa oxidativa do organismo e uma diminuição do anabolismo de glicoconjugados, ainda que o parasita utilize aminoácidos glicogênicos como fonte alternativa de carbono. Anteriormente, Naderer *et al.* (2006) indicaram tais aminoácidos como a principal fonte de carbono do parasita na forma AMA visto que os fagolisossomos dos macrófagos corresponderiam a um ambiente pobre em glicose. Aspectos adicionais do metabolismo central do carbono também foram investigados através da incorporação de várias fontes de carbono tanto nas formas PRO quanto AMA (SAUNDERS *et al.*, 2011, SAUNDERS *et al.*, 2014).

No estudo realizado por Kim *et al.* (2024), os autores observaram que as cepas de *L. infantum* resistentes a anfotericina B exibiram níveis reduzidos de fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG), enquanto que, as cepas resistentes a AmB apresentaram níveis reduzidos de espécies de esterol e glicerolipídios. Já Ribeiro *et al.* (2024) verificaram que a exclusão da enzima proteína quinase de gotículas lipídicas (LDK) em *L. infantum* resultou na alteração dos níveis de 39 metabólitos das classes dos esteróis, ácidos graxos e conjugados, ceramidas, glicerofosfocolina e derivados, e glicerofosfoetanolamina e derivados.

Lamour *et al.* (2012) realizaram uma ampla investigação dos processos metabólicos *in vitro* ao avaliarem o meio de crescimento celular, o extrato do parasita na fase estacionária tardia, assim como o metaboloma de macrófagos não infectados e infectados com *L. major* submetidos a ativação clássica, ativação alternativa e não ativação por citocinas. Neste trabalho, os autores observaram uma diferenciação no metaboloma entre o estado de infecção e ativação dos macrófagos, e destacaram a presença do acetato, alanina e succinato como metabólitos derivados diretamente do parasita. O metaboloma de macrófagos de camundongos infectados com as linhagens *La-WT* e *La-arg⁻* também foi investigado por Muxel *et al.* (2019). Os resultados indicaram um aumento nos níveis de prolina, ácido glutâmico, glutamina, L-arginina, ornitina e putrescina nos macrófagos *La-WT* infectados, enquanto que, níveis reduzidos de ornitina, prolina e tripanotiona foram observados em macrófagos BALB/c infectados com a cepa mutante. Em outro estudo, Mamani-Huanca *et al.* (2021) avaliaram as mudanças no metaboloma dos macrófagos C57BL/6 também infectados com *La-WR* e *La-agr⁻*. De modo semelhante ao

estudo de Muxel *et al.* (2019), os autores observaram níveis aumentados de L-arginina, ornitina e putrescina nos macrófagos infectados com a linhagem selvagem, enquanto que, a infecção por *La-arg*⁻ resultou em um aumento dos níveis de arginina, NO, produção de poliaminas, glutatonia e tripanotiona.

Adicionalmente, a investigação metabolômica de tecidos e biofluidos de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* foram avaliadas por Das *et al.* (2021). Os autores observaram que as principais alterações metabólicas em camundongos infectados ocorreram no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e nas vias da glicólise, ácidos graxos, purina e pirimidina, ao passo que, as alterações metabólicas em camundongos tratados ocorreram nos níveis de arginina, ácido fumárico, ácido orótico e succinato de colina. Ao final, indicaram potenciais biomarcadores nas diferentes amostras, tais como arginina e ácido fumárico no cérebro, colina no fígado, 9-(10) EpOME no baço e medula óssea, e N-acetil putrescina na medula óssea. Entre os biofluidos, os autores indicaram o ácido glutâmico no soro, a hidrazina e a desoxirribose na urina e o ácido 3-metil-2-oxopentanóico nas fezes. Parab *et al.* (2021), por sua vez, avaliaram o metaboloma dos tecidos das orelhas e patas de camundongos infectados com *L. major*, e observaram um aumento dos níveis de glicerofosfocolinas (PCs) de maior MM derivados do hospedeiro, enquanto que as PCs de menor MM diminuíram no local da lesão. No estudo realizado por Yuan *et. al* (2023), no qual os autores avaliaram a urina de hamsters na presença ou ausência de leishmaniose visceral, observou-se uma distinção no metabolismo de aminoácidos, bem como distinções de acordo com o nível do estágio de progressão da doença nos animais. A investigação das vias metabólicas antinociceptivas de camundongos infectados por *L. mexicana* foi realizada por Volpedo *et al.* (2023), e os autores observaram que os níveis de purinas nos macrófagos infectados estavam elevados quando comparados ao controle.

A busca por biomarcadores da resposta terapêutica ao antimoniato de meglumina através do perfil metabolômico do plasma de pacientes com leishmaniose tegumentar da forma cutânea durante o tratamento foi realizada por Vargas *et al.* (2019). Um aumento nos níveis de alantoína, N-acetilglutamina, taurina e piruvato nas amostras dos pacientes que responderam positivamente ao tratamento foram observadas. Os autores reforçaram a importância dos metabólitos que atuam nos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo e nos processos de cicatrização das feridas. Mohsen *et al.* (2010), por sua vez, compararam o soro sanguíneo de pacientes com leishmaniose e indivíduos saudáveis. Os autores observaram que os níveis de selênio, treonina, lipídios, lactato e alanina

diferenciaram ambos os grupos. Em outro estudo, Magalhães *et al.* (2014) buscaram identificar biomarcadores da doença através da análise dos compostos orgânicos voláteis emitidos por cães infectados com *L. infantum*. Os autores observaram que os níveis de octanal, nonanal, undecano, éter β -hidroxilfenílico, decanal, tetradecano, nonilciclopentano, 8-pentadecanona, heptadecano e 2-etylhexil-salicilato se diferenciavam entre os grupos de cães sadios e de cães infectados, e assim indicaram que os compostos emitidos pelos animais podem ser utilizados no diagnóstico da doença.

Face a importância da metabolômica para o estudo e compreensão da leishmaniose, um protocolo, objetivando descrever a etapa de preparo de amostras e análise por HILIC-MS, foi desenvolvido por t'Kindt *et al.* (2010). Os autores indicaram que as condições otimizadas poderiam detectar aproximadamente 20% do metaboloma do parasita. Em outro estudo, Zhang *et al.* (2014) avaliaram as condições cromatográficas (pH, fase móvel e colunas HILIC) para análise de extratos de *Leishmania*. Os autores indicaram que a condição otimizada correspondeu ao uso de uma coluna ZIC-pHILIC com uma fase móvel de carbonato de amônio e pH 9,2. Mais recentemente, Canuto *et al.* (2025), publicaram um protocolo para a determinação de metabólitos intracelulares em promastigotas de *Leishmania* por GC-MS. Neste trabalho, os autores avaliaram a curva de crescimento de promastigotas de *L. infantum* e observaram uma maior quantidade de *molecular features* e metabólitos detectados em 72 h (fase logarítmica de crescimento). Adicionalmente, métodos de processamento de dados após análises instrumentais também têm sido avaliados utilizando dados de *Leishmania* como modelo para tais estudos (ROBINSON *et al.*, 2007 SCHELTEMA *et al.*, 2009; EJIGU *et al.*, 2013).

1.5 Abordagens metabolômicas no tratamento da leishmaniose

A metabolômica tem sido empregada em diversas investigações buscando o entendimento dos mecanismos de ação e resistência à fármacos comumente utilizados no tratamento das leishmanioses, assim como na busca por novos agentes anti-*Leishmania*. Entre os trabalhos compilados na Tabela 1, 16 (destacados com * na coluna “referência”) abordam tal temática. Os estudos investigando a ação dos antimoniais têm sido majoritários, ao passo que, poucos tratam do uso de novas formulações empregando tal abordagem. Canuto *et al.* (2012), por exemplo, compararam o metaboloma de cepas promastigotas de *L. infantum* com diferentes suscetibilidades ao antimônio (sensíveis e resistentes). As principais alterações metabólicas ocorreram em aminoácidos sulfurados e vias biossintéticas de poliaminas. Os autores destacaram a importância destes

compostos face a deterioração do metabolismo redox dependente de tiol em *Leishmania* tratadas com o antimonial. Similarmente, Berg *et al.* (2013) avaliaram cepas de *L. donovani* em diferentes fases de crescimento e com diferentes suscetibilidades ao estibogluconato de sódio. A partir dos resultados observados, os autores indicaram que os parasitas resistentes apresentaram maior capacidade de proteção contra o estresse oxidativo, e um aumento nos nucleosídeos purínicos no estágio estacionário, os quais atuam como blocos de construção para iniciar a diferenciação e divisão como amastigotas na entrada do hospedeiro.

Investigando o tratamento de *L. infantum* associado a metabolômica em fluxo, Rojo *et al.* (2015) enfatizaram que o fármaco apresenta um mecanismo de ação com multialvos, e destacaram as alterações provocadas no sistema redox do parasita e no metabolismo de aminoácidos. Em outro trabalho, Dumetz *et al.* (2018) investigaram o desenvolvimento de resistência ao antimonial usando cepas de *L. donovani* presentes no continente indiano. Em conjunto com dados genômicos, os autores indicaram que a cepa principal presente no continente seria pré-adaptada à resistência ao antimônio. Corroborando estudos prévios, a análise metabolômica permitiu observar um aumento nos níveis de prolina e arginina, bem como um aumento nos níveis de glicerofosfolipídios durante a seleção experimental de resistência ao antimonial. Guarnizo *et al.* (2021), por sua vez, buscaram potenciais biomarcadores de resistência ao antimônio ao avaliar a composição dos metabólitos nos meios intracelular e extracelular em PRO de *L. tropicalis*. Os autores destacaram que os níveis de prolina em ambos os casos foram responsáveis por diferenciar os parasitas sensíveis e resistentes, e que tal observação indicaria o papel deste metabólito como um robusto biomarcador indicativo de resistência ao antimônio. A resistência ao fármaco estaria correlacionada a uma resposta do parasita ao estresse osmótico e oxidativo, assim como a capacidade de produção de energia por meio de vias alternativas, como o TCA. Adicionalmente, Jara *et al.* (2022) investigaram as adaptações metabólicas de PRO e AMA axênicas de *L. (Viannia) lainsoni* durante a quiescência, estágio em que a célula apresenta uma lenta ou não proliferação e uma regulação negativa nos processos biossintéticos. Sob pressão do antimonial, ambos os estágios apresentaram uma redução nos níveis dos metabólitos nas condições quiescentes. Em contrapartida, os autores observaram um aumento de fontes de carbono, como sacarose e 3 hexose-mutímeros (marcados como celopentaose, celohexaose e celoheptaose), que são indicados como derivadas do manogênio, uma reserva de carboidrato usada por *Leishmania*, que é alternativa à glicose.

O metaboloma de PRO de *L. infantum* sob tratamento com miltefosina foi avaliado por Vincent *et al.* (2014), e os autores observaram que as cepas selvagens (WT) e Sb-resistentes apresentaram alterações metabólicas semelhantes, enquanto que, a cepa MIL-resistente não internalizou o fármaco. O aumento dos níveis de alcanos de cadeia curta, espécies reativas de oxigênio (ROS), tióis e poliaminas, assim como sinais de dano ao DNA, indicaram que o mecanismo de ação da MIL também apresenta múltiplos alvos. Empregando *L. donovani* como modelo, Canuto *et al.* (2014) compararam o metaboloma entre as cepas MIL-resistente e suscetível. Os autores observaram que o tratamento com o fármaco resultou em um comprometimento da via arginina → poliamina/tripanotiona e um aumento na produção de ROS nos parasitas tratados com MIL. Já nos parasitas resistentes, um aumento dos níveis de aminoácidos foi destacado. Shaw *et al.* (2016), por sua vez, investigaram as alterações metabólicas associadas a seleção de resistência à MIL em cepas de *L. donovani* Sb-resistentes e Sb-sensíveis. Os autores também destacaram o baixo acúmulo da droga nos parasitas MIL-resistentes; e entre os metabólitos afetados em ambas as cepas, prolina, fosfato de colina, fosfodimetiletolamina e fosfato de estearoilglicerona demonstraram níveis aumentados. A prolina está associada aos processos de proteção contra ROS, os demais metabólitos estão envolvidos no metabolismo lipídico, mais especificamente na via Kennedy, a qual corresponde a principal via para síntese de fosfatidilcolina e fosfodimetiletolamina. No geral, os autores não observaram uma provável sinergia no mecanismo de resistência a MIL por parte das cepas Sb-resistentes.

Ampliando os estudos, Armitage *et al.* (2018) avaliaram o metaboloma da forma AMA axênicas de *L. donovani* e PRO de *L. major*, incluindo uma cepa mutante PRO incapaz de sintetizar esfingolipídios (Δ LCB2). Os autores observaram uma diminuição drástica em fosfolipídios de membrana e *pools* de aminoácidos, além de aumento nos níveis dos esfingolipídios e esteróis em AMA. Estas alterações estariam correlacionadas com o comprometimento pela MIL no transporte de diferentes metabólitos. Adicionalmente, verificou-se que a cepa Δ LCB2 apresentou um menor nível de ergosterol, ao contrário dos seus precursores, o que permite supor que a etapa final de síntese do esteroide foi reduzida na cepa mutante. Como esta cepa foi menos sensível ao fármaco, tal fato é um indicativo da importância dos esfingolipídios e ergosterol para a sensibilidade à MIL.

O processo de indução de resistência à paromomicina (PMN) foi avaliado por SHAW *et al.*, (2020) utilizando como modelo cepas de PRO de *L. donovani* com diferentes

suscetibilidades aos antimoniais, descritas como Sb-susceptível PMN-resistente, Sb-intermediária PMN-resistente e Sb-resistente PMN-resistente. As alterações metabólicas observadas não permitiram indicar um potencial marcador associado ao processo de resistência a PMN. Ademais, os autores destacaram que a PMN não exerce efeito significativo sobre o metabolismo da glicose do parasita, e que a prolina não está associada ao processo de resistência ao fármaco. Por fim, concluem que a PMN possui um mecanismo de ação com uma menor quantidade de alvos quando comparada à MIL, por exemplo.

Pountain *et al.* (2019), por sua vez, avaliaram as alterações metabólicas associadas à resistência a AmB usando como modelo linhagens distintas de PRO de *L. mexicana*. Neste trabalho, os autores não identificaram uma correlação entre as alterações no metabolismo e o processo de resistência, apesar de observarem uma diminuição nos níveis de várias oligohexoses e um aumento no *pool* de tióis reduzidos e glutationa reduzida. No geral, as mudanças ocorreram em pequena magnitude e de forma estocástica. Também não observaram alterações significativas no metabolismo de carbono e nos níveis de prolina. Ao final, destacam que o aumento nos níveis de tripanotirona pode ser um indicativo de que a resistência ao fármaco esteja associada ao processo de proteção contra ROS ou às mudanças relacionadas a composição de esteróis.

Em um estudo realizado por Berg *et al.* (2015), os autores avaliaram as alterações metabólicas de linhagens resistentes a combinação de fármacos e linhagens monoresistentes. A investigação foi realizada usando PRO de *L. donovani* e os fármacos Sb, AmB, MIL, PMN, e suas associações. Os resultados demonstraram que as linhagens de parasitas monoresistentes ou resistentes a terapias combinadas apresentaram adaptações metabólicas distintas, correspondentes a mecanismos contra o estresse oxidativo e alterações na fluidez da membrana.

No contexto de estudo de fármacos de reposição, Lima *et al.* (2018) avaliaram o antidepressivo sertralina frente a PRO de *L. infantum*. Os resultados de um estudo *untargeted* apontam para uma diminuição nos níveis dos intermediários biossintéticos das vias tiol-redox e poliamina, e a escassez dos aminoácidos aspartato e prolina. Deste modo, os autores indicaram que a sertralina atua através de um mecanismo multialvo ao atacar vias metabólicas essenciais do parasita. Em uma estratégia empregando um antimetabólito, ou seja, uma substância com capacidade de inibir uma via metabólica de um organismo por competição, Almugadam *et al.* (2018) avaliaram a ação da 6-aminonicotinamida (6AN) frente a PRO de *L. mexicana* e *L. infantum*. Este composto é

um análogo da nicotinamida e atua inibindo a via da pentose fosfato produtora de NADPH (PPP), o que torna as células mais suscetíveis ao estresse oxidativo. A partir das alterações metabólicas observadas, os autores concluem que o alvo mais provável do fármaco é a enzima nicotinamidase, que catalisa a produção do nicotinato a partir da nicotinamida e, através deste processo, interfere na biossíntese de NAD⁺ do parasita.

Em outra estratégia, a busca por compostos bioativos a partir de produtos naturais continua sendo essencial para a descoberta de protótipos e novos fármacos. Uma revisão realizada por Newman e Cragg (2020) demonstrou que cerca de 65% dos fármacos antiparasitários são oriundos ou inspirados em metabólitos secundários. Neste contexto, estudos avaliaram as alterações metabólicas na forma PRO e AMA de *L. major* após tratamento com extratos brutos e frações de *Xanthium strumarium* (Asteraceae), as quais apresentam lactonas sesquiterpênicas como principais constituintes. (AHMADI *et al.*, 2019; AHMADI *et al.*, 2021). O extrato bruto afetou o metabolismo do ácido aspártico e asparagina em PRO, bem como a biossíntese do pantotenato e coenzima A, e o metabolismo de açúcares (pentoses e glucuranato), aminoácidos (leucina e isoleucina) e amino açúcares e amino nucleotídeos. Em outro estudo, Canuto *et al.* (2017) investigaram o mecanismo de ação do metildehidrodieugenol B, uma neolignana isolada de folhas da *Nectandra leucantha* (Lauraceae), frente a PRO de *L. infantum*. Os resultados indicaram que o composto bioativo apresenta um mecanismo multialvo, destacando-se as alterações nas fontes de energia celular e na composição lipídica da membrana do parasita.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial anti-*Leishmania* do fármaco mefloquina por meio de uma abordagem metabolômica global utilizando como plataformas analíticas a cromatografia líquida em fase reversa acoplada a espectrometria de massas (RPLC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

2.2 Objetivos específicos

1. Aquisição de dados metabolômicos por RPLC-MS (ESI+ e ESI-) e GC-MS.
2. Otimização dos parâmetros de processamento de dados.
3. Anotação dos metabólitos estatisticamente significativos.
4. Análise de vias metabólicas e correlação dos efeitos bioquímicos em função do tratamento com mefloquina.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e reagentes

Heptano (grau MS, Merck, Alemanha), metanol (grau MS, Sigma-Aldrich, Alemanha), 2-propanol (grau MS, Sigma-Aldrich, Alemanha), ácido fórmico (88%, J. T. Baker, Mexico), dimetilssufóxido (Sigma-Aldrich, Alemanha), N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-Aldrich, Alemanha), cloridrato de O-metoxiamina (99%, Sigma Aldrich, Alemanha), C13 méthil ester tridecanoato de metila (Sigma-Aldrich, Alemanha), leucina-encefalina (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e hidróxido de sódio (Merck, Alemanha). Água deionizada ultrapura foi obtida a partir de um sistema MilliQ (Millipore, Brasil). Meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) acrescido de meio Schneider (Sigma-Aldrich, Alemanha) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco Laboratories) e 50 µg/mL de gentamicina (Hipolabor). Mefloquina (Farmanguinhos, FIOCRUZ, Brasil). Argônio gasoso (99,9999%, Air Liquide) e Hélio gasoso (99,9999%, White Martins).

Agitador vortex modelo K45-2810 (KASVI), banho ultrassônico modelo SSBu 6L (SolidSteel), estufa modelo LUCA 81/42 (LUCADEMA), ultrassom com microponteira (Sonics), disruptor mecânico de células TissueLyser III (TissueLyser®, Qiagen), SpeedVac (Christ, RVC 2-18 CD plus, Alemanha), centrifuga microprocessada 5500D (Cientec), liofilizador Lyoquest (Telstar).

3.2 Cultivo de promastigotas de *L. amazonensis*

O cultivo de promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi realizado no Instituto de Tecnologia em Saúde (SENAI CIMATEC) sob supervisão do Dr. Vinícius Pinto Costa Rocha e da Prof.^a Dr.^a Milena Botelho Pereira Soares (ROCHA *et al*, 2013). De forma resumida, os parasitas de *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125) foram obtidos a partir do linfonodo poplíteo de camundongos C57BL/6 resistentes e cultivados em meio Novy-Nicolle-MacNeal (NNN) contendo meio de inseto de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina a 24° C. Os promastigotas obtidos foram transferidos para o meio de inseto de Schneider e cultivados até que a fase estacionária de crescimento atingisse uma densidade de 8×10^7 promastigotas/mL. Os parasitas foram posteriormente incubados com mefloquina ($IC_{50} = 8,4 \pm 0,70 \mu\text{mol.L}^{-1}$), denominado grupo tratado (TRT), ou sem o fármaco, denominado grupo controle (CRT). Após o

tratamento por 48h, as amostras foram resfriadas a 4 °C, centrifugadas para remover o meio de cultura e lavadas com tampão PBS frio. Em seguida, as células foram divididas em alíquotas contendo 1×10^8 promastigotas, liofilizadas e armazenadas a -80 °C até o momento de extração e análise instrumental.

3.3 Preparo das amostras para análise por GC-MS

O estudo iniciou-se a partir de replicatas biológicas de 30 amostras pertencentes ao grupo TRT e 15 amostras pertencentes ao grupo CRT. A extração dos metabólitos intracelulares para as análises por GC-MS ocorreu através da adição de 500 µL de metanol:água (1:1, v/v) frio às amostras e posterior agitação em um Tissuelyser utilizando 3 esferas de aço à uma frequência de 50 Hz por 5 min para lise celular. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min e 4 °C e a solução sobrenadante foi coletada. Um branco foi preparado usando o solvente extrator sob as mesmas condições de preparação das amostras. Uma alíquota de 150 µL de cada amostra foi transferida para um frasco individual, e outros 200 µL foram reunidos e usados para preparar os Controles de Qualidade (QCs). Quarenta amostras foram obtidas: 10 amostras pertencente ao grupo CRT, 19 amostras pertencentes ao grupo TRT, 10 amostras pertencentes ao grupo QC e uma amostra branca. A redução do n amostral se deu por perdas das amostras durante o processo de extração.

Previamente à análise por GC-MS, as amostras foram liofilizadas e submetidas a um protocolo de derivação. Na primeira etapa, 10µL de O-metoxiamina (15 mg.mL^{-1}) em piridina foram adicionados aos frascos contendo as amostras, agitados por 10 s e sonicados por 5 min. Em seguida, as amostras foram mantidas no escuro à temperatura ambiente por 90 min. Posteriormente, 10 µL de BSTFA contendo 1% de TMCS (v/v), foram adicionados aos frascos, e novamente agitados por 10 s e sonicados por 5 min. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 min a 40 °C. Ao final, 100 µL de heptano contendo 10 mg.mL^{-1} de C13 mítíl ester tridecanoato de metila (padrão interno) foram adicionados às amostras e homogeneizadas por vótex.

3.4 Instrumentação e condições das análises por GC-MS

As análises por GC-MS foram realizadas no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) localizado no Instituto de Geociências (IGEO) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) em um cromatógrafo gasoso (modelo 7820A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (modelo

5977E MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna DB5-MS (comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0.32 mm, filme de 0.25 μ m de 95% dimetilpolisiloxano/5% difenil polisiloxano, Agilent Technologies). Gás hélio (99,9999%) foi utilizado como fase móvel em uma vazão de 1 mL/min. A injeção das amostras ocorreu através do modo split na razão 1:10 a 10 L/min de He em uma temperatura de 250 °C. A separação dos metabólitos ocorreu através de uma programação de temperatura: temperatura inicial do forno a 60 °C, mantida por 1 min, e aumento até 350 °C a uma taxa de 10 °C/min, em um tempo total de análise de 30 min. As temperaturas da linha de transferência do detector, do filamento da fonte e do quadrupolo foram mantidas à 290 °C, 230 °C e 150 °C, respectivamente. A fonte de ionização por impacto de elétrons utilizou uma voltagem de -70 eV, e o espectrômetro de massas foi operado em modo scan na faixa de 50 – 600 m/z . O software MassHunter Qualitative Analysis B.07.01 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) foi utilizado para operação do equipamento e aquisição dos dados. As condições de análise seguiram a metodologia descrita por Canuto *et al.* (2017) para posterior anotação dos metabólitos com base nos dados presentes nas bibliotecas Fiehn e NIST.

3.5 Preparo das amostras para análise por LC-MS

O estudo iniciou-se a partir de replicatas biológicas de 15 amostras pertencentes ao grupo TRT e 15 amostras pertencentes ao grupo CRT. A extração dos metabólitos intracelulares para as análises por LC-MS ocorreu através da adição de 500 μ L de metanol frio às amostras e posterior sonicação utilizando um ultrassom, equipado com uma microssonda, operado em modo contínuo com potência de 20% (100 W) na frequência de 20 kHz por 1 min para a lise celular. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min e 4 °C e a solução sobrenadante foi coletada. Um branco foi preparado usando o solvente extrator sob as mesmas condições de preparação das outras amostras. Uma alíquota de 150 μ L de cada amostra foi transferida para um frasco individual, e outros 200 μ L foram reunidos para preparar as amostras classificadas como Controles de Qualidade (QCs). Trinta e nove amostras foram obtidas: 13 amostras pertencentes ao grupo TRT, 15 amostras pertencentes ao grupo CRT, 10 amostras pertencentes ao grupo QCs e uma amostra branco. Destaca-se novamente que a redução do n amostral se deu por perdas das amostras durante o processo de extração.

3.6 Instrumentação e condições das análises por LC-MS

As análises por LC-MS foram realizadas no Laboratório de Análises Cromatográficas e Espectrométricas (LACE) localizado no Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) em um cromatógrafo líquido de ultra performance (modelo ACQUITY H-Class, Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplado a um espectrômetro de massas por tempo de voo (TOF) (modelo Xevo G2-XS, Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI).

As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna C18 (1.7 μ m, 2.1 x 50 mm, ACQUITY BEH, Waters Corporation, Milford, MA, USA) a uma temperatura de 40 °C. Acetonitrila (eluente B) e água ultrapura (eluente A) acidificadas com 0,1% de ácido fórmico foram utilizadas como eluentes em uma vazão igual a 0,6 mL/min. A separação dos metabólitos ocorreu através de um gradiente de eluição: 25 - 75% de B por 20 min, 75% de B até 25 min, 75 - 90% de B por 5 min, 90% de B por 10 min, 90 - 95% de B por 5 min, e posterior recondicionamento da coluna, 95 - 25 % de B por 1 min e 25% de B por 9 min. O tempo total de cada análise correspondeu a 55 min. As amostras foram injetadas em um volume correspondente a 7,0 μ L através do injetor automático do sistema cromatográfico.

O MS foi operado em modos positivo e negativo de ionização, e a voltagem do capilar de ionização correspondeu a +/- 3kV. O analisador do MS atuou no modo resolução. Nitrogênio gasoso foi utilizado como gás de dessolvatação e argônio gasoso foi utilizado como gás para a célula de colisão. A temperatura da fonte foi mantida a 150 °C, temperatura de dessolvatação a 600 °C, fluxo do gás do cone a 50 L/h, e fluxo do gás de dessolvatação a 1000,0 L/h. Os espectros foram adquiridos na faixa de 50 – 1200 m/z , tempo de aquisição igual a 1 s, e dados adquiridos em formato centroide. Formiato de sódio (0,5 mmol.L⁻¹) e leucina-encefalina (200,0 pg.mL⁻¹) foram utilizados como padrões, respectivamente, para o processo de calibração e referência de massa do espectrômetro. O software MassLynx (versão 1.65.2022, Waters Corporation, Milford, MA, USA) foi utilizado para operação do equipamento e aquisição dos dados.

3.6 Processamento e tratamento de dados

Os dados obtidos a partir das análises de GC-MS e LC-MS foram convertidos no formato *.mzXML utilizando o software ProteoWizard versão 3.0. Em seguida, os dados foram processados através do XCMS (versão 3.18.0) executado na plataforma R (versão

4.2.0). Através do pacote IPO ('Isotopologue Parameter Optimization'), otimizou-se previamente os parâmetros utilizados durante o processamento dos dados através do XCMS. Os sinais obtidos a partir do MS referente a um determinado intervalo de *m/z* relacionado a um intervalo de tempo de retenção foram caracterizados como *molecular features*.

Os dados das análises por GC-MS foram processados através do método "matchedFilter" utilizando-se os seguintes parâmetros no XCMS: largura de pico (fwhm) = 44, relação sinal/ruído (snthresh) = 5.8, largura de banda (bw) = 0.879, largura das faixas sobrepostas de *m/z* (mzwid) = 0.0614, fração mínima de amostras necessária em pelo menos um dos grupos de amostra para que seja um grupo válido (minfrac) = 0.885, número máximo de picos por cromatograma de íon extraído (max = 50). A correção do tempo de retenção foi realizada através do método "obiwarp".

Os dados das análises por LC-MS foram processados através do método "centWave" no XCMS. No modo positivo de ionização, utilizou-se os seguintes parâmetros: snthresh = 10, largura de pico (min, max) = 17.9 a 79.6, erro de massa = 20 ppm, mzwid = 0.0133, bw = 0.879, minfrac = 1. No modo negativo de ionização, utilizou-se: snthresh = 10, largura de pico (min, max) = 13.1 a 28.5, erro de massa = 20 ppm, mzwid = 0.0133, bw = 0.879, minfrac = 0.962. A correção do tempo de retenção foi realizada através do método "obiwarp" e a análise foi restrita a faixa de 0,1 à 50 min, excluindo-se os analitos eluidos no volume morto, lavagem e condicionamento da coluna cromatográfica.

Após alinhamento e correção dos tempos de retenção dos *molecular features* em ambas as análises, aplicou-se o método 'fillPeaks' para gerar valores de intensidades para os picos ausentes ao integrar os dados brutos na região do grupo de picos, e assim eliminar os "missing values". Após o processamento, as matrizes foram exportadas em formato *.tsv com base nas áreas dos *molecular features* dos dados de LC-MS e com base na intensidade dos *molecular features* dos dados de GC-MS.

Posteriormente, os dados foram normalizados utilizando o software Origin Pro 2018 versão SR1 a partir dos valores da biomassa (massa dos pellets de cada amostra), e adicionalmente, para os dados das análises por GC-MS, estes foram também normalizados pela mediana. Em seguida, os dados foram submetidos às análises multivariadas na plataforma MetaboAnalyst (versão 6.0) utilizando-se dos métodos de Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Adicionalmente, aplicou-se um filtro baseado na

repetibilidade técnica dos dados avaliados nos QC's durante o processamento dos dados de LC-MS, excluindo-se os *molecular features* com desvios maiores que 30% nesse conjunto de amostras, e um auto-escalonamento; enquanto que se aplicou uma transformação de Raiz Quadrada e escalonamento Pareto para os dados de GC-MS. *Molecular features* discriminantes foram selecionados a partir dos modelos de PLS-DA com base no valor de VIP score (do inglês, *Variable Importance on Projection*) superior a 1,0. A análise univariada dos *molecular features* foi realizada na plataforma R seguindo a árvore de decisões, no qual aplicou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk, associado ao Teste U de Mann-Whitney para os dados não paramétricos e teste t de variância homogênea ou heterogênea para dados paramétricos, com corte de *p*-valor < 0,05, após avaliação da Taxa de Falsas Descobertas (FDR).

A anotação dos metabólitos por GC-MS foi realizada através do processamento dos dados utilizando o software AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, versão 2.71) e comparação com a biblioteca Fiehn RT Library (FiehnLib) (KIND *et al.*, 2009). Em tal processamento, realizou-se a deconvolução dos espectros, análise dos índices de retenção (RI) e análise e correção dos tempos de retenção (RT) dos analitos, definindo-se um fator de correspondência mínimo igual a 60, modo reverso e largura do componente igual a 15. A correlação dos *molecular features* estatisticamente significativos baseou-se na correspondência com o sinal do fragmento de maior intensidade no espectro em uma janela de tempo de 60 s.

A anotação dos metabólitos por LC-MS baseou-se na busca das relações *m/z* e possíveis adutos ($[M+H]^+$, $[2M+H]^+$, $[M+Na]^+$, para ESI+ e $[M-H]^-$, $[M+HCOOH-H]^-$, para ESI-) com um erro de massa inferior a 10 ppm em base de dados públicas como o HMDB (*Human Metabolome Database*), LipidMaps (*Lipid Metabolites and Pathways Strategy*), Metlin (*Metabolite and Chemical Entity Database*), KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), através da ferramenta de busca CEU Mass Mediator (<https://ceumass.eps.uspceu.es/>). Adicionalmente, a análise de vias/análise funcional foi realizada na plataforma MetaboAnalyst 6.0 através do algoritmo Mummichog, no qual inseriu-se as informações referente aos *molecular features* (*m/z*, *p*-valor, *t-score* e tempo de retenção) dos dados das análises por LC-MS. Selecionou-se a via KEGG referente ao organismo *Leishmania major* e o valor de corte de *p* <0,05 para esta análise de vias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise metabolômica por GC-MS

A análise metabolômica *untargeted* de promastigotas de *L. amazonensis* por GC-MS abrangeu 19 amostras tratadas com a droga mefloquina (TRT = 19) na concentração correspondente ao IC₅₀ (ROCHA *et al.*, 2013) e 10 amostras não tratadas com o referido fármaco (CRT = 10). Conforme descrito anteriormente, o estudo incluiu 10 QCs a fim de avaliar a estabilidade instrumental durante a sequência analítica, assim como também incluiu a análise de uma amostra “branco”, a fim de identificar possíveis contaminantes originados a partir de materiais e reagentes utilizado durante o preparo das amostras, subprodutos da derivação ou mesmo contaminantes presentes na coluna e no instrumento de análise.

A lise celular e extração dos metabólitos intracelulares foram adaptadas de metodologias descritas na literatura. Conforme otimizações indicadas por Canuto *et al.* (2025), usou-se uma solução MeOH:H₂O (1:1, v/v) para uma maior eficiência de extração dos metabólitos a serem analisados por GC-MS. Alternativamente ao método de ruptura celular, no qual os autores descreveram o uso de um ultrassom com sonda, o presente trabalho utilizou um disruptor mecânico Tissuelyser com esferas de aço, similar ao descrito por Crepaldi *et al.* (2019). O uso do equipamento apresentou a vantagem de submeter todas as amostras simultaneamente ao procedimento de lise celular, garantindo assim uma maior rapidez e homogeneidade durante tal etapa, algo importante em estudos metabolômicos que compreendem dezenas ou centenas de amostras.

Previamente à análise por GC-MS, em função do fato de que a maior parte dos metabólitos presentes nas amostras biológicas não serem facilmente volatilizados ou termicamente estáveis nas condições de análises, as amostras foram submetidas a um protocolo de derivação, seguindo metodologia descrita por Canuto *et al.* (2025). Tal processo envolve duas etapas de reações, sendo a primeira uma oximação, com o objetivo de proteger grupos carbonílicos e a redução de açúcares, seguida da etapa de sililação, na qual hidrogênios ativos de grupos funcionais tais como álcoois, ácidos carboxílicos, aminas e tióis são substituídos por grupos alquilsilanos. A Figura 5 apresenta os esquemas genéricos das reações envolvidas no processso de derivação química.

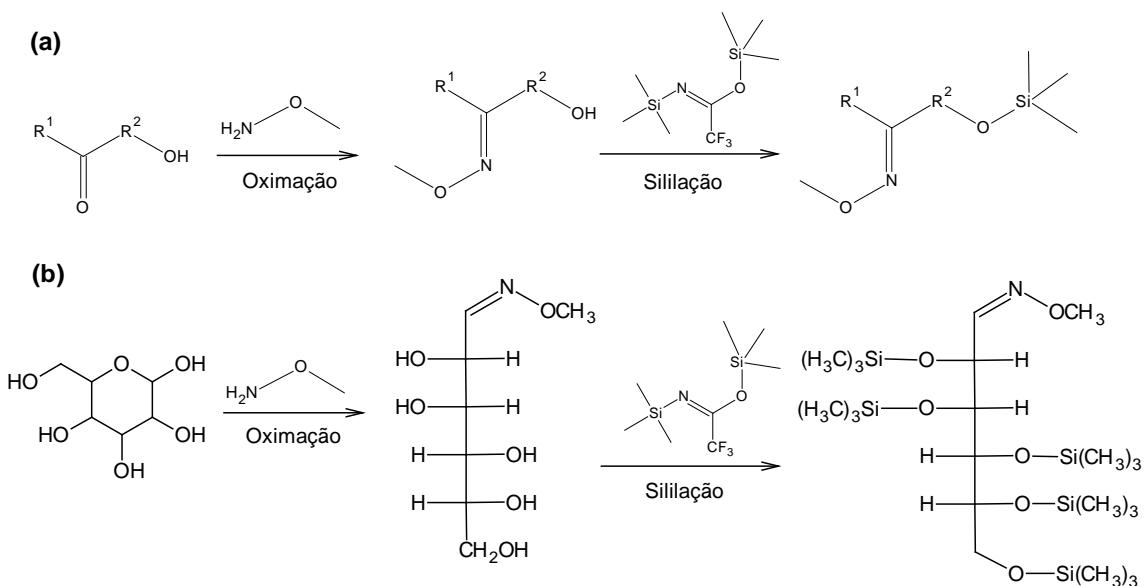


Figura 5. Esquema das reações de metoximação e sililação para (a) aldeídos e cetonas e (b) açúcares.

O método elaborado por Fiehn para análises metabolômicas por GC-MS foi adotado neste estudo, pois tal estratégia permite uma maior confiabilidade na anotação dos metabólitos ao basear-se nas informações referente ao tempo de retenção dos compostos aliado ao padrão de fragmentação observada nos espectros de massas. Apesar do uso de um analisador MS de baixa resolução, as análises por GC-MS utilizando uma fonte de ionização por impacto de elétrons apresenta uma maior robustez, e permite a comparação dos dados com as bibliotecas espectrais, especificamente neste estudo, a biblioteca Fiehn FiehnLib e NIST (KIND *et al.*, 2009), sendo que esta última foi utilizada para ampliação da quantidade de metabólitos anotados tomando-se como base apenas o padrão de fragmentação espectral. Os resultados obtidos a partir das análises por GC-MS foram inicialmente avaliados no software do equipamento, e sem qualquer anormalidade preliminarmente detectada, os dados brutos foram exportados e convertidos para o formato *mzXML.

A anotação dos metabólitos foi realizada no software AMDIS, o qual tem sido utilizado em vários trabalhos na área de metabolômica (CANUTO *et al.*, 2014; MASTRANGELO *et al.*, 2015). Inicialmente, o software realizou uma deconvolução dos sinais baseando-se na similaridade dos espectros resultantes com os espectros das bibliotecas. Em seguida, criou-se uma lista de calibração formada por metabólitos que apresentaram um alto valor de correspondência espectral (NET > 80). Após a calibração, realizou-se uma primeira anotação dos metabólitos baseada no índice de retenção (RI)

dos compostos, na qual foi possível criar uma nova lista de metabólitos, correspondendo a uma biblioteca *in house*, na qual registrou-se os tempos de retenção (RT) corrigidos em função de adaptações do método original ao instrumento utilizado, bem como os íons mais intensos de cada composto. Após correção dos tempos de retenção, realizou-se uma nova análise das amostras, utilizando a função RT, a qual permitiu a anotação final de 54 metabólitos, já se excluindo os compostos detectados na amostra branco (Tabela 2). Da anotação global deste trabalho, destacam-se os metabólitos pertencentes à classe dos aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos, sendo condizentes sua determinação pela técnica instrumental utilizada, solvente extrator e método de derivação.

Tabela 2. Metabólitos anotados a partir das análises por GC-MS do estudo metabolômico de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

Metabólitos*	FM	MM	Íon	RT (min)	Classificação
N-ethylglycine	C ₄ H ₉ NO ₂	103,0633	58	6,84	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Norvaline	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,0790	120	7,29	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,0790	89	7,29	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	89,0477	116	7,51	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,0946	86	8,36	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Sarcosine	C ₃ H ₇ NO ₂	89,0477	147	8,38	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,0946	241	8,67	Aminoácidos, peptídeos e análogos
N-methylalanine	C ₄ H ₉ NO ₂	103,0633	130	8,72	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Norleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,0946	86	8,82	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Malonic acid	C ₃ H ₄ O ₄	104,0109	147	8,90	Ácidos carboxílicos e derivados
2-Butyne-1,4-diol	C ₄ H ₆ O ₂	86,0368	147	9,52	Álcoois e polióis
Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	122,0368	105	9,74	Ácidos carboxílicos e derivados
Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	105,0426	73	9,84	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Caprylic acid	C ₈ HO ₂	144,1150	75	9,97	Ácidos graxos e conjugados
4-Vinylphenol	C ₈ H ₁₆ 8O	120,0575	73	10,04	Alquilfenóis
Pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129,0790	55	10,14	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Allothreonine	C ₄ H ₉ NO ₃	119,058	73	10,21	Aminoácidos, peptídeos e análogos

Tabela 2. Metabólitos anotados a partir das análises por GC-MS do estudo metabolômico de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

Metabólitos*	FM	MM	Íon	RT (min)	Classificação
Maleic acid	C ₄ H ₄ O ₄	116,0110	147	10,29	Ácidos carboxílicos e derivados
Glycine	C ₂ H ₅ NO ₂	75,0320	174	10,51	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Itaconic acid	C ₅ H ₆ O ₄	130,0266	73	10,87	Ácidos carboxílicos e derivados
Citraconic acid	C ₅ H ₆ O ₄	130,0266	147	11,17	Ácidos carboxílicos e derivados
Fumaric acid	C ₄ H ₄ O ₄	116,0110	75	11,17	Ácidos carboxílicos e derivados
Beta-alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	89,0477	174	12,19	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Capric acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172,1463	73	12,62	Ácidos graxos e conjugados
<i>trans</i> -3-Hydroxy-L-proline	C ₅ H ₉ NO ₃	131,0582	132	12,63	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Homoserine	C ₄ H ₉ NO ₃	119,0582	218	12,73	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	134,0215	233	12,96	Ácidos carboxílicos e derivados
Threitol	C ₄ H ₁₀ O ₄	122,0579	217	13,17	Álcoois e polióis
C12	C ₁₂ H ₂₆	170,2034	74	13,50	Alcanos
Lauric acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200,1776	73	15,04	Ácidos graxos e conjugados
Ribose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150,0528	103	15,21	Carboidratos e conjugados
Lyxose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150,0528	73	15,21	Carboidratos e conjugados
Methyl myristate	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242,2246	74	15,88	Ácidos graxos e conjugados
Putrescine	C ₄ H ₁₂ N ₂	88,1000	174	15,94	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Gentisic acid	C ₇ H ₆ O ₄	154,0266	147	16,39	Ácidos carboxílicos e derivados
Hippuric acid	C ₉ H ₉ NO ₃	179,0582	206	17,19	Ácidos carboxílicos e derivados

Tabela 2. Metabólitos anotados a partir das análises por GC-MS do estudo metabolômico de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

Metabólitos*	FM	MM	Íon	RT (min)	Classificação
Myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228,2089	285	17,21	Ácidos graxos e conjugados
Allose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,0634	205	17,60	Carboidratos e conjugados
Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	182,0790	73	17,99	Carboidratos e conjugados
Galactose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,0634	217	18,00	Carboidratos e conjugados
6-Methylmercaptopurine	C ₆ H ₆ N ₄ S	166,0313	166	18,28	Purinas e análogos
Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,2402	117	19,22	Ácidos carboxílicos e derivados
3,4-Dihydroxyphenyl glycol	C ₈ H ₁₀ O ₄	170,0579	355	19,32	Álcoois e polióis
Sphingosine	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	299,2824	204	19,50	Esfingolipídeos e derivados
Glucoheptonic acid	C ₇ H ₁₄ O ₈	226,0689	217	19,52	Carboidratos e conjugados
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,0634	73	19,52	Carboidratos e conjugados
N-acetyl-D-glucosamine	C ₈ H ₁₅ NO ₆	221,0899	319	19,52	Carboidratos e conjugados
L-DOPA	C ₉ H ₁₁ NO ₄	197,0688	218	19,53	Catecolaminas
Methyl linolenate	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292,2402	67	19,71	Ácidos graxos e conjugados
Methyl oleate	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,2715	55	19,77	Ácidos graxos e conjugados
Norepinephrine	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169,0739	73	19,88	Catecolaminas
Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,2402	174	20,75	Ácidos graxos e conjugados
Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,2559	75	20,80	Ácidos graxos e conjugados
Stearic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,2715	117	21,03	Ácidos graxos e conjugados

* Nomes dos metabólitos mantidos em inglês para reduzir a probabilidade de erros por tradução equivocada da nomenclatura.

Após anotação dos metabólitos no AMDIS, iniciou-se o processamento dos dados brutos utilizando o software XCMS. Nesta etapa, os parâmetros de processamento aplicados foram inicialmente otimizados através do pacote de processamento IPO ('Isotopologue Parameter Optimization') (LIBISELLER. *et al.*, 2015). Face a grande quantidade de dados nos estudos em metabolômica originados a partir de análises cromatográficas acopladas a espectrometria de massas, esta ferramenta permite automatizar tal etapa, e para além disso, comparado a uma otimização manual, evita-se resultados tendenciosos através das configurações dos parâmetros por parte do analista. Conforme avaliado por dos Santos *et al.* (2023), a aplicação do IPO para processamento de dados de GC-MS mostrou-se uma boa alternativa, principalmente por permitir otimizar vários parâmetros de forma simultânea em um intervalo de tempo razoável (poucas horas). Desta forma, seguindo tal metodologia, obteve-se os parâmetros de extração da matriz de dados a partir do IPO, para posterior aplicação durante as etapas de detecção dos picos, agrupamento e correção dos tempos de retenção durante o processamento no XCMS (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros aplicados no XCMS, otimizados a partir do IPO, para o processamento dos dados da análise por GC-MS.

Parâmetro	Valor
frwhm	44
snthresh	5.8
bw	0.879
minfrac	0.885
mzwid	0.0614
max	100

* Aplicou-se o *default* presente no pacote XCMS para os demais parâmetros.

Através da função 'fillPeaks', o algoritmo gerou valores de intensidades para os picos ausentes (*missing values*) ao integrar os dados brutos na região do grupo de picos. A matriz de dados obtida após processamento resultou em 771 *molecular features*, e uma quantidade de *missing values* correspondente a 1,58%. Usualmente, tais valores ausentes podem estar associados a diversos fatores, a saber: *i*) problemas durante a etapa de derivação das amostras, *ii*) sensibilidade instrumental, na qual a concentração de um metabólito é inferior ao limite de detecção, *iii*) efeito de matriz, o qual pode ser responsável, por exemplo, por uma supressão iônica, e *iv*) processamento inadequado dos

dados, causado, por exemplo, devido a uma falha no agrupamento do *molecular feature* (GROMSKI *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2017).

Em seguida, os dados foram normalizados no software Origin com base na mediana e na biomassa de cada amostra. Especificamente no caso dos QC, utilizou-se o valor médio da biomassa de todas as amostras. A matriz de dados normalizada foi então submetida a análise multivariada na plataforma MetaboAnalyst aplicando-se aos dados uma Transformação de Raiz Quadrada e auto escalonamento. Através da Análise de Componentes Principais (PCA), avaliou-se a qualidade dos dados com base no agrupamento das amostras QC (Figura 6). Através da inspeção da Figura 6 é possível verificar certo agrupamento dos QC, avaliados durante toda a sequência analítica, indicando que não houve intercorrências durante o funcionamento do equipamento. Adicionalmente, se observa também uma distinção entre as amostras do grupo TRT e CRT, e visto tratar-se de um modelo não supervisionado, ou seja, um modelo construído sem a informação do pertencimento das amostras aos dois grupos avaliados, tal separação reflete as diferenças do perfil metabólico entre ambos os grupos.

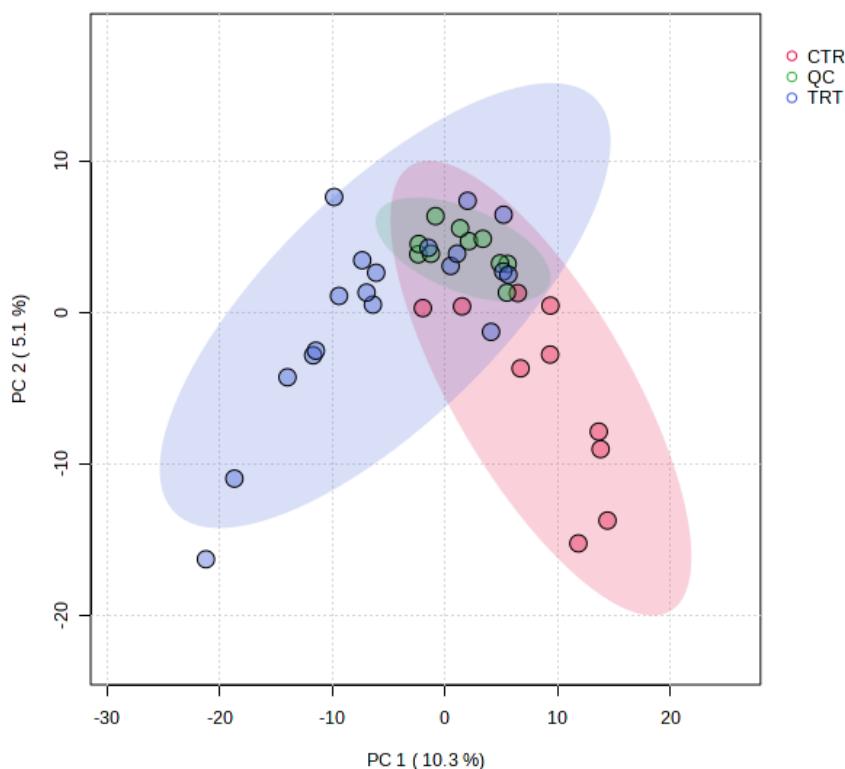


Figura 6. Gráfico de escores do modelo PCA das amostras do estudo metabolômico por GC-MS de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina (amostras tratadas: ● TRT; amostras controle: ● CRT; controle de qualidade: ● QC).

Em seguida, os dados foram submetidos a uma análise multivariada através da construção do modelo PLS-DA, um modelo supervisionado, no qual são fornecidas as informações sobre quais grupos as amostras pertencem (Figura 7).

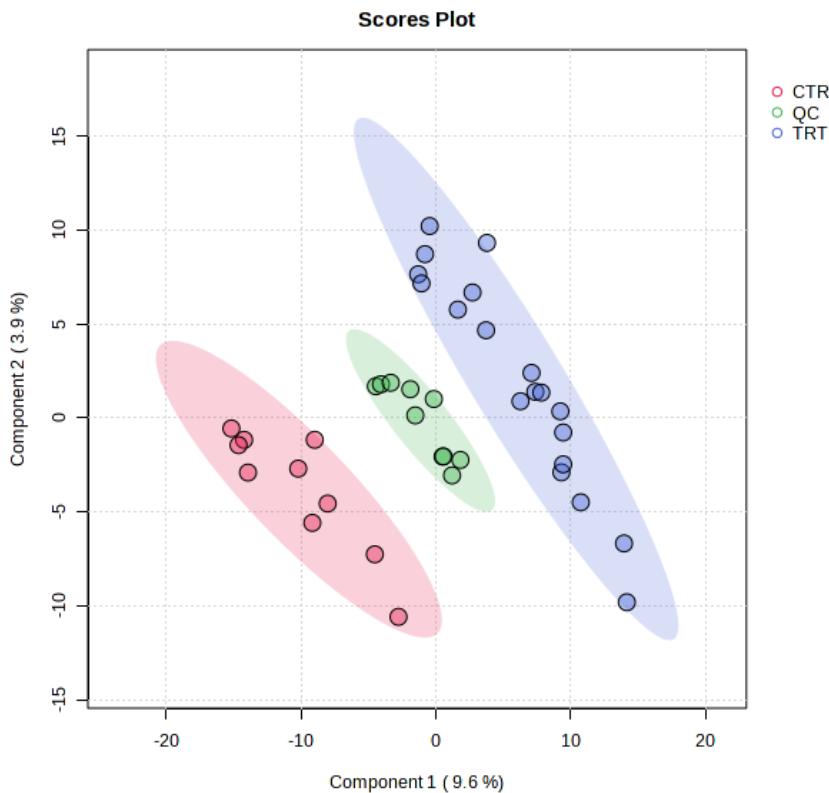


Figura 7. Gráfico de escores do modelo PLS-DA das amostras do estudo metabolômico por GC-MS de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina (amostras tratadas: ● TRT; amostras controle: ● CTR; controle de qualidade: ● QC). Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0,96$ e $Q^2 = 0,47$.

A qualidade do modelo foi avaliada com base nos parâmetros R^2 , o qual representa uma correlação linear entre os dados; e Q^2 , o qual indica a capacidade preditiva do modelo. A proximidade destes parâmetros do valor 1,0 indica um melhor ajuste do modelo. Adicionalmente, enquanto que para dados químicos usualmente sejam aceitáveis valores de $R^2 > 0,8$ e $Q^2 > 0,5$; em estudos metabolômicos, nos quais amostras biológicas apresentam intrinsecamente uma alta variabilidade, os valores de $R^2 > 0,7$ e $Q^2 > 0,4$ são considerados aceitáveis (GODZIEN *et al.*, 2013). Deste modo, o modelo construído apresentou-se satisfatório visto que os valores de $R^2 = 0,96$ e $Q^2 = 0,47$. Adicionalmente, buscou-se validar o modelo através de testes de permutação, conforme descrito por Szymańska *et al.* (2012). Ainda que não seja consenso, relaciona-se ao menos 100 permutações a uma significância estatística correspondente a um valor $p < 0,01$. Porém,

no presente estudo, o resultado do teste de permutação falhou, o que pode ser justificado pelo número limitado de amostras ou quantidade de *molecular features* utilizado no modelo. Desse modo, não foi possível obter o resultado de significância estatística da análise multivariada.

Adicionalmente, correlacionou-se os metabólitos anotados através do AMDIS e os *molecular features* presentes na matriz de dados extraída a partir do XCMS, baseando-se no fragmento *m/z* médio e tempo de retenção médio, e realizou-se uma análise univariada dos metabólitos anotados, com o objetivo de verificar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CRT e o grupo TRT. A análise univariada foi realizada no R aplicando-se inicialmente o teste de normalidade Shapiro-Wilk, o qual indicou uma distribuição não normal, característico de dados em metabolômica (VINAIXA et al., 2012; GUO et al., 2022a). Em seguida, aplicou-se o Teste U de Mann-Whitney em conjunto com a correção de falsas descobertas para comparações múltiplas (*False Discovery Rate*). Os resultados demonstraram que as taxas médias dos metabólitos isoleucina, ribose/lixose e ácido linoleico são significativamente diferentes comparando-se os grupos (Figura 8). Avaliando o valor de *fold change* (FC) destes metabólitos, o qual é calculado com base na razão entre a média da intensidade do metabólito no grupo TRT e no grupo CRT, observou-se que estes metabólitos estavam aumentados no grupo TRT.

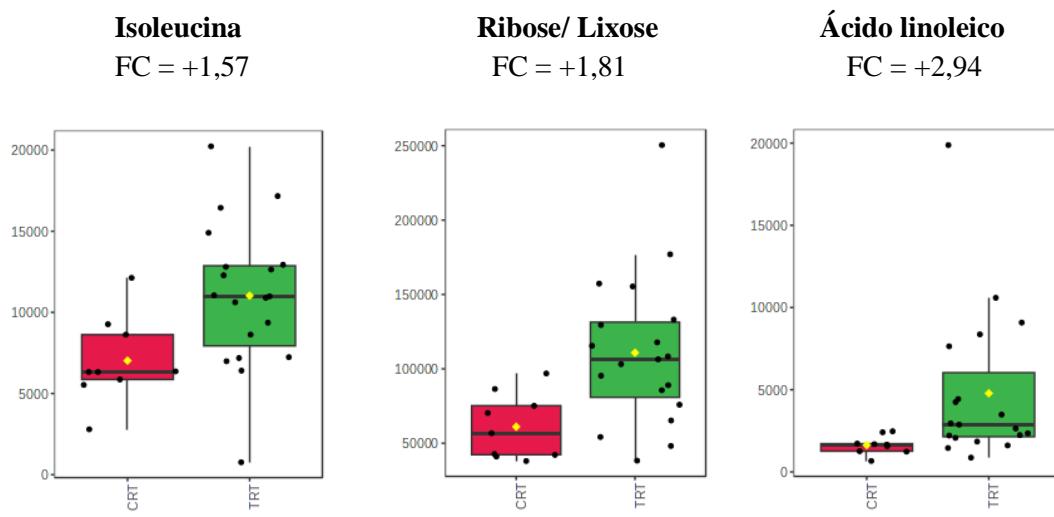


Figura 8. Boxplot e *fold change* dos grupos TRT (■) versus CRT (■) dos metabólitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na avaliação metabolômica *untargeted* por GC-MS de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

4.2 Análise metabolômica por LC-MS

A análise metabolômica *untargeted* de promastigotas de *L. amazonensis* por LC-MS abrangeu 13 amostras tratadas com o fármaco mefloquina (TRT = 13) na concentração correspondente ao IC₅₀ (ROCHA *et al.*, 2013) e 15 amostras não tratadas (CRT = 15). Conforme descrito anteriormente, o estudo incluiu 10 QCs a fim de avaliar a estabilidade instrumental durante a análise por LC-MS, assim como também incluiu a análise de uma amostra “branco”.

A lise celular e extração dos metabólitos intracelulares foram realizadas conforme as otimizações indicadas por Canuto *et al.* (2017), na qual usou-se MeOH (100%) para uma maior eficiência de extração dos metabólitos a serem analisados por LC-MS em fase reversa. Para este procedimento de extração, utilizou-se um ultrassom com sonda para o processo de ruptura celular, equipamento que estava disponível no momento da realização dos experimentos. Adicionalmente, os dados de LC-MS foram adquiridos no modo de ionização positivo (ESI+) e negativo (ESI-), com o objetivo de abranger uma maior cobertura dos metabólitos analisados por esta plataforma analítica.

Similarmente ao tratamento dos dados das análises por GC-MS, os dados brutos das análises por LC-MS foram convertidos no formato ‘.mzXML’ para processamento através do XCMS sendo que os parâmetros aplicados também foram previamente otimizados pelo IPO (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros aplicados no XCMS, otimizados pelo IPO, para o processamento dos dados da análise por LC-MS.

Parâmetro	Valor	
	Modo positivo	Modo negativo
peakwidth	17.9896 – 79.6	13.1 – 28.5
snthresh	10	10
bw	0.879	0.879
minfrac	1	0.962
mzwid	0.0113	0.0113
max	100	50

* Aplicou-se o *default* presente no pacote XCMS para os demais parâmetros.

Desta forma, obteve-se uma matriz de dados contendo 16.012 *molecular features* a partir das análises em modo positivo, e um valor de *missing values* igual a 0,29%, e 3.187 *molecular features* a partir das análises em modo negativo. A grande quantidade de *molecular features* identificados pode ser correlacionada a fatores como a alta resolução e alta sensibilidade do espectrômetro de massas por tempo de voo (MS-ToF), a

possibilidade de formação de diferentes adutos através do modo de ionização por ESI (MARSHALL *et al.*, 2008; NORDSTRÖM *et al.*, 2008) e, de maneira mais proeminente devido a detecção de picos que não são reais, correspondentes ao ruído de fundo, ou artefatos instrumentais (TAUTENHAHN *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2022b).

Em seguida, os valores de intensidade dos *molecular features* de cada amostra foram normalizados com base na biomassa. E então, os dados foram submetidos às análises multivariadas na plataforma MetaboAnalyst. Preliminarmente, aplicou-se um filtro baseado na repetibilidade técnica dos QCs (RSD > 20%) durante o processamento dos dados para remoção de *molecular features* que não seriam úteis para a construção dos modelos, visto que tais dados, por exemplo, são oriundos de ruídos da linha de base (Hackstadt e Hess, 2009). Após esta etapa, aplicou-se um autoescalonamento nos dados, com o objetivo de eliminar a influência de grandes diferenças de intensidades entre as variáveis (WORLEY e POWERS, 2013).

Através do modelo de PCA é possível observar (Figura 9) que as amostras QC estão próximas entre si nas análises por LC-MS em modo positivo e negativo, o que indica que a análise instrumental ocorreu sem intercorrências. Adicionalmente, observa-se também uma prévia distinção entre as amostras pertencentes aos grupos CTR e TRT.

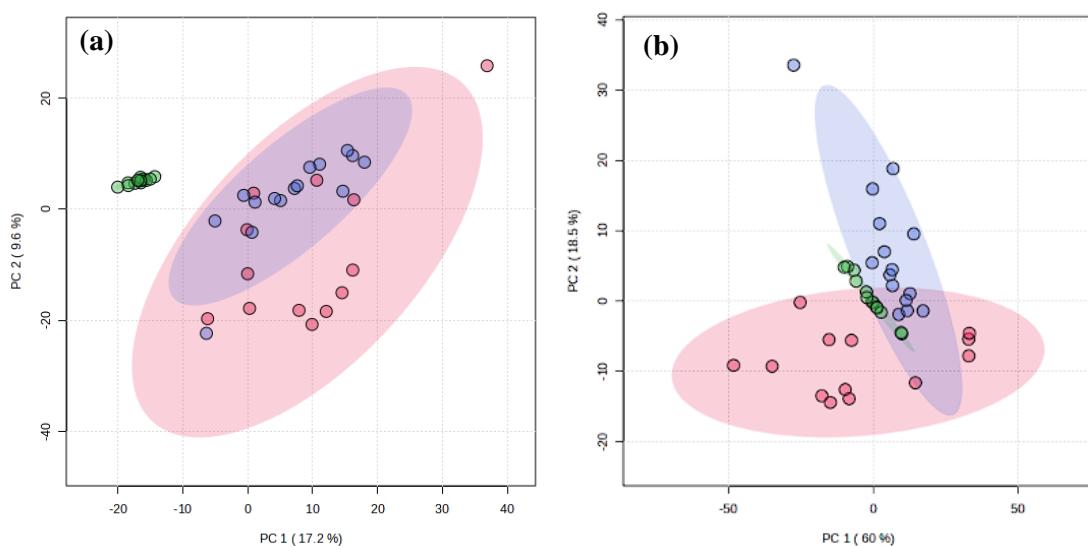


Figura 9. Gráficos de escores do modelo PCA das amostras do estudo metabolômico de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina analisadas por LC-MS fase reversa em (a) modo positivo e (b) modo negativo (amostras tratadas: ● TRT; amostras controle: ● CRT; controle de qualidade: ● QC).

Em seguida, através do modelo supervisionado de PLS-DA, avaliou-se a separação entre os grupos e os parâmetros da qualidade do modelo (Figura 10). Em ambas as análises, os modelos construídos apresentaram valores de R^2 e Q^2 satisfatórios, acima de 0,89 e 0,45 respectivamente. Adicionalmente, os modelos também foram validados através de testes de permutação (1.000 permutações), cujos resultados indicaram $p < 0,05$.

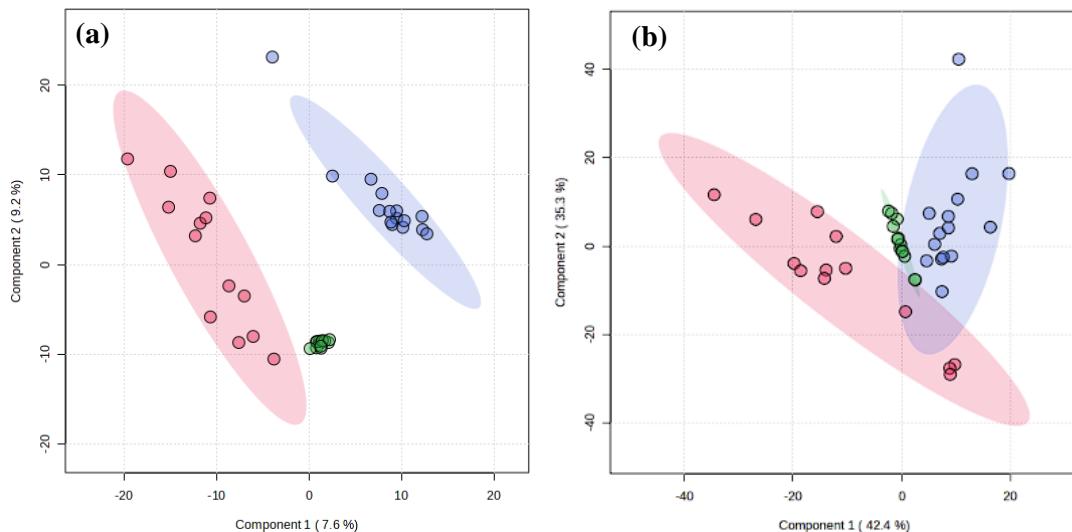


Figura 10. Gráficos de escores do modelo PLS-DA das amostras do estudo metabolômico de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina analisadas por LC-MS em modo positivo (a) (parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0,97$ e $Q^2 = 0,51$) e modo negativo (b) (parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0,89$ e $Q^2 = 0,48$) (amostras tratadas: ● TRT; amostras controle: ● CTR; controle de qualidade: ● QC).

Uma vez que os modelos supervisionados foram válidos, buscou-se os *molecular features* responsáveis pela separação entre grupos TRT e CTR, através da análise de VIP (*Variable Importance on Projection*), na qual foram considerados significativos os MF com VIP score $> 1,0$. Adicionalmente, realizou-se também a análise univariada, aplicando-se inicialmente o teste Shapiro-Wilk, constatando que os dados não apresentavam uma distribuição normal, e em seguida aplicou-se Teste U de Mann-Whitney em conjunto com a correção de falsas descobertas para comparações múltiplas (*False Discovery Rate*). A partir destas avaliações, foram obtidos 145 e 104 *molecular features* com significância estatística para modo positivo e negativo, respectivamente. Em seguida, realizou-se a busca por tais *m/z* através do CEU *Mass Mediator*, uma plataforma de busca online e gratuita que integra dados das bases HMDB, KEGG, LipidMaps e Metlin. Na busca, foram considerados erro de massa de 10 ppm e os possíveis adutos formados durante o processo de ionização dos metabólitos, descritos na parte

experimental desta. A partir da lista de compostos gerada, realizou-se uma análise criteriosa de cada metabólito considerando a estrutura química e a técnica analítica empregada, bem como fonte e ocorrência dos compostos, e possível correlação com rotas bioquímicas no gênero *Leishmania*. Deste modo, 190 metabólitos foram anotados (Tabela A1, Apêndica A) com significância estatística, os quais predominantemente pertenciam às classes de glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, ácidos graxos, aminoácidos, peptídeos e análogos. Avaliando os valores de *fold change*, observa-se que houve predominantemente uma diminuição da concentração relativa destes metabólitos no grupo tratado comparado ao grupo controle.

4.3 Análise de vias metabólicas

Para auxiliar na interpretação das alterações biológicas provocadas pela ação da mefloquina, uma análise de vias metabólicas foi realizada no MetaboAnalyst utilizando o algoritmo Mummichog, que foi desenvolvido para ser aplicado a dados oriundos de análises metabolômicas *untargeted* por espectrometria de massas (LI *et al.*, 2013). Tal algoritmo baseia-se em todos *molecular features* presentes no estudo, ou seja, todos os *m/z*'s extraídos a partir do processamento no XCMS, e não somente nos metabólitos significativos anotados. Durante o processamento, o algoritmo mapeia as possíveis correspondências dos *molecular features* com as redes e vias metabólicas de forma conjunta, e a significância estatística dos resultados é avaliada através do teste exato de Fisher. Os resultados demonstraram que a biossíntese de esteroides foi a rota metabólica mais afetada durante o tratamento com valor de $P(\text{Fisher}) = 0,0016$ e $P(\text{Gamma}) = 6,6098 \times 10^{-4}$ (Figura 11). Tal análise indicou uma correspondência significativa de 18 compostos nesta rota metabólica, sendo eles: delta7-Avenasterol; Lathosterol; Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3beta-ol; Episterol; fecosterol; Obtusifoliol; delta8,14-Sterol; Cycloartenol; (S)-2,3-Epoxyisqualene; 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol; Zymosterol intermediate 2; Lanosterol; 5-Dehydroavenasterol; 7-Dehydrocholesterol; Ergosterol; 5-Dehydroepisterol; 4alpha-Methylfecosterol; e 4,4-Dimethyl-5a-cholesta-8,24-dien-3-beta-ol. Em *Leishmania*, destaca-se que os esteroides desempenham funções essenciais para a integridade e fluidez das membranas biológicas (ALMEIDA-AMARAL *et al.*, 2014).

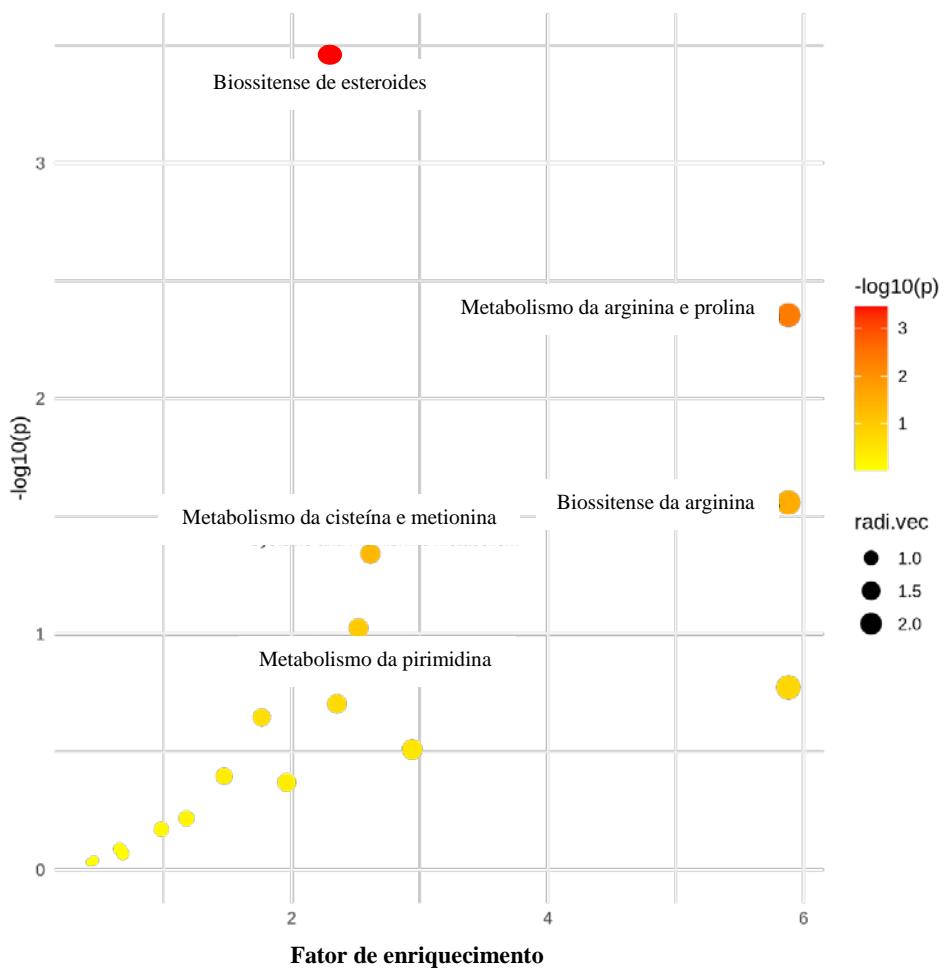


Figura 11. Resultado da análise de via metabólica usando o algoritmo mummichog do estudo metabolômico de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina analisadas por LC-MS.

4.4 Interpretação biológica

A análise metabolômica de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina permitiu diferenciar os grupos TRT e CTR, e a partir da variação dos níveis dos metabólitos em ambos os grupos, baseando-se no *fold change* (FC), inferir correlações do mecanismo de atuação da droga. Vale notar, por exemplo, que a internalização da mefloquina ($C_{17}H_{16}F_6N_2O$) pelas promastigotas de *L. amazonensis*, foi possível ser constatada ao observar a presença do *molecular feature* m/z 423.1134 (correspondente ao aduto $[M+HCOOH-H]^-$) através da análise por LC-MS em modo negativo (Tabela A1, Apêndice).

Adicionalmente, foi possível verificar alterações nos níveis de aminoácidos entre os grupos TRT e CTR. A isoleucina, por exemplo, um dos aminoácidos essenciais para a

biossíntese de proteínas, além de ser uma fonte de energia através das vias glicogênica e cetogênica, apresentou um aumento no grupo TRT (FC = +1,57, Figura 8) (AKPUNARLIEVA *et al.*, 2017; NADERER *et al.*, 2006). A cistationina (FC = 0,43) por sua vez, um intermediário envolvido na biossíntese da produção de cisteína através da via de transulfuração reversa, apresentou uma diminuição no grupo TRT (WILLIAMS *et al.*, 2009).

Neste estudo também foi possível observar uma alteração significativa no conteúdo de glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos, os quais desempenham diversas funções para a sobrevivência do parasita, em destaque a atuação destes metabólitos como componentes estruturais das membranas celulares em *Leishmania* (ALMEIDA-AMARAL *et al.*, 2014; ARMITAGE *et al.*, 2018). Buscando avaliar o mecanismo antiparasitário em nível molecular de atuação da mefloquina como agente antimalárico, Goto e Caseli (2023) investigaram a interação do fármaco com modelos de membrana celular representados por monocamadas de Langmuir de lipídios selecionados. Os autores observaram interações significativas, o que pode implicar em como o fármaco atua em sítios específicos da membrana do protozoário.

Verificou-se também um aumento nos níveis do ácido linoleico (FC = +2,94, Figura 8) no grupo TRT. Sabe-se que os ácidos graxos são essenciais para a sobrevivência do parasita, e promastigotas de *Leishmania* spp são capazes de sintetizá-los por vias convencionais, como através do sistema enzimático ácido graxo sintase do tipo II (AGS2), ou mesmo por vias não convencionais, como através de enzimas chamadas elongases (ELOs). Neste último sistema, os ácidos graxos são utilizados, por exemplo, para a síntese de glicosilfosfatidilinositois (GPIs) – glicolipídeos presentes na superfície de *Leishmania*. Tais composto desempenham um papel importante no mecanismo de evasão da resposta imune, inclusive na forma promastigotas do parasita. Os ácidos graxos também se relacionam ao metabolismo energético do parasita ao atuar como fonte de energia através do processo de β -oxidação (FERGUSON, 1999; ALMEIDA-AMARAL *et al.*, 2014; LEROUX, *et al.* 2023).

O metabolismo de açúcares do tipo pentose também sofreu alteração. Observa-se que os níveis de ribose/lixose (FC = 1,81, Figura 8), apresentaram-se mais elevados no grupo TRT. Está estabelecido que em *Leishmania*, a via das pentoses-fosfato apresenta importante papel na produção de NADPH, produção de ATP e na síntese de nucleotídeos (ALVES-FERREIRA, M, 2014).

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, buscamos investigar o potencial da mefloquina frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis* através de uma abordagem metabolômica global utilizando como plataformas analíticas a cromatografia líquida em fase reversa acoplada a espectrometria de massas (RPLC-MS) em modo positivo e modo negativo, e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Face a complexidade do metabolismo de *L. amazonensis* e as especificidades de cada técnica analítica, a aplicação de ambas as plataformas permitiu abranger um amplo perfil do metaboloma do organismo em estudo. Os resultados encontrados indicaram diferenciação entre o grupo de amostras tratadas com a mefloquina e o grupo controle, e permitiram verificar os *molecular features* discriminantes entre os grupos. A correlação dos *molecular features* com dados presentes em bibliotecas espectrais e base de dados públicos permitiram a anotação de metabólitos pertencentes a diferentes classes químicas. As análises por GC-MS permitiram verificar que os níveis de isoleucina, ribose/lixose e ácido linoleico eram superiores no grupo tratado. Enquanto que as análises por RPLC-MS indicaram principalmente alterações de metabólitos pertencentes às classes de glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, ácidos graxos, responsáveis pela composição estrutural da membrana plasmática parasitária; bem como aminoácidos, peptídeos e análogos, fortemente associados ao metabolismo energético. Adicionalmente, uma análise de vias metabólicas também demonstrou que a biossíntese de esteroides foi a rota mais afetada pelo tratamento. A mefloquina apresenta ação contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* atuando por diferentes mecanismos, que precisam de maiores elucidações. O uso de plataformas complementares, como HILIC-MS, bem como a elucidação estrutural dos metabólitos por análises MS/MS podem servir para confirmar tais alterações e ampliar a resposta metabólica. Estudos complementares *in vivo* poderão ainda servir de base para buscar uma futura aplicação deste fármaco como tratamento alternativo para leishmaniose tegumentar, ampliando o arsenal terapêutico contra a doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, M.; AKBARI, Z.; ALIKHANI, M.; HAJHOSSIANI, M.; ZAMANI, Z. **Metabolomics Based Study of the Antileishmanial Activity of *Xanthium strumarium* Leaf Extract on Promastigotes Phases of *Leishmania major* by Proton NMR Spectroscopy.** Iran J. Parasitol., 14, p. 258-268, 2019.

AHMADI, M.; AKBARI, Z.; ZAMANI, Z.; HOSSEINI, R. H.; ARJMAND, M. **Study the Mechanism of Antileishmanial Action of *Xanthium strumarium* Against Amastigotes Stages in *Leishmania major*: A Metabolomics Approach.** Nat. Pharm. Prod., 16 (3), 2021.

AKPUNARLIEVA, S.; WEIDT, S.; LAMASUDIN, D.; NAULA, C.; HENDERSON, D.; BARRETT, M.; BURGESS, K. BURCHMORE, R. **Integration of proteomics and metabolomics to elucidate metabolic adaptation in *Leishmania*.** J. Proteomics., 155, p. 85-98, 2017.

ALMUGADAM, S. H.; TRENTINI, A.; MARITATI, M.; CONTINI, C.; RUGNA, G.; BELLINI, T.; MANFRINATO, M. C.; DALLOCCHIO, F.; HANAU, S. **Influence of 6-aminonicotinamide (6AN) on *Leishmania* promastigotes evaluated by metabolomics: Beyond the pentose phosphate pathway.** Chem. Biol. Interact., 294, p. 167-177, 2018.

ALMEIDA-AMARAL, E.E., ANDRADE-NETO, V.V., CANTO-CAVALHEIRO, M.M., and TORRES-SANTOS, E.C. **Lipídeos.** In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 83-98, 2014.

ALVES-FERREIRA, M. **Metabolismo de Carboidratos em *Leishmania* spp.** In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 70-82, 2014.

ALVES-FERREIRA, E. V.; TOLEDO, J. S.; DE OLIVEIRA, A. H.; FERREIRA, T. R.; RUY, P. C.; PINZAN, C. F.; SANTOS, R. F.; BOAVENTURA, V.; ROJO, D.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, Á.; ROSA, J. C.; BARBAS, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; CRUZ, A. K. **Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal *Leishmania braziliensis* Isolates from the Same Patient.** PLoS Negl. Trop. Dis., 9(9):e0004018, 2015.

ALZAHRANI, K. J. H.; ALI, J. A. M.; EZE, A. A.; LOOI, W. L.; TAGOE, D. N. A.; CREEK, D. J.; BARRETT, M. P.; DE KONING, H. P. **Functional and genetic evidence that nucleoside transport is highly conserved in *Leishmania* species: Implications for pyrimidine-based chemotherapy.** Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist., 2, p. 206-226, 2017.

ARJMAND, M.; MADRAKIAN, A.; KHALILI, G.; NAJAFI, A.; ZAMANI, Z.; AKBARI Z. **Metabolomics based study of logarithmic and stationary phases of promastigotes in *Leishmania major* by ¹H NMR spectroscopy.** Iran Biomed. J., 20, p. 77-83, 2016.

ARMITAGE, E. G.; ALQAISI, A. Q. I.; GODZIEN, J.; PEÑA, I.; MBEKEANI, A. J.; ALONSO-HERRANZ, V.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, Á.; MARTÍN, J.; GABARRO, R.; DENNY, P. W.; BARRETT, M. P.; BARBAS, C. **Complex Interplay between Sphingolipid and Sterol Metabolism Revealed by Perturbations to the *Leishmania* Metabolome Caused by Miltefosine.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 62(5):e02095-17, 2018.

ASHBURN, T.; THOR, K. **Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs.** *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 3, 673–683, 2004.

BERG, M.; VANAERSCHOT, M.; JANKEVICS, A.; CUYPERS, B.; MAES, I.; MUKHERJE, S.; KHANAL, B.; RIJAL, S.; ROY, S.; OPPERDOES, F.; BREITLING, R.; DUJARDIN, J.C. **Metabolic adaptations of *Leishmania donovani* in relation to differentiation, drug resistance, and drug pressure.** *Mol. Microbiol.*, v. 90, p. 428-442, 2013.

BERG, M.; VANAERSCHOT, M.; JANKEVICS, A.; CUYPERS, B.; BREITLING, R.; DUJARDIN, J. C. **LC-MS metabolomics from study design to data-analysis – using a versatile pathogen as a test case.** *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 4, e201301002, 2013.

BERG, M.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; CUYPERS, B.; VANAERSCHOT, M.; MANZANO, J. I.; POVEDA, J. A.; FERRAGUT, J. A.; CASTANYS, S.; DUJARDIN, J. C.; GAMARRO, F. **Experimental resistance to drug combinations in *Leishmania donovani*: metabolic and phenotypic adaptations.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 59, p. 2242-2255, 2015.

BAHIA. Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. Disponível em: <https://www.saude.ba.gov.br/agravo/leishmaniose/>. Acessado em 01/09/2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar/** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 189 p.:il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar.** Relatório de recomendação n. 365, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/saude-lanca-paineis-para-monitorar-leishmanioses-no-brasil>. Acessado em 01/09/2025.

BROADHURST, D.; GOODACRE, R.; REINKE, S. N.; KULIGOWSKI, J.; WILSON, I. D.; LEWIS, M. R.; DUNN, W. B. **Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies.** *Metabolomics*, 14:72, 2018.

CANUTO, G. A. B.; CASTILHO-MARTINS, E. A.; TAVARES, M.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, A.; RIVAS L.; BARBAS, C. **CE-ESI-MS metabolic fingerprinting of *Leishmania* resistance to antimony treatment.** Electrophoresis., 33, p. 1901-10, 2012.

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

CANUTO, G. A. B.; DÖRR, F.; LAGO, J. H. G.; TEMPONE, A. G.; PIMENTA, D. A.; ALVES, M. J. M.; TAVARES, M. F. M. **New insights into the mechanistic action of methyldehydroeugenol B towards *Leishmania* (L.) infantum via a multiplatform based untargeted metabolomics approach.** Metabolomics, 13, 56, 2017.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. **Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas.** Química Nova, 41, p. 75-91, 2018.

CANUTO, G. A. B.; DÖRR, F.; PINTO, E.; ALVES, M. J. M.; FARAH, J. P. S.; TAVARES, M. F. M. **Collection of optimizations for untargeted metabolomics analysis of *Leishmania* promastigotes using gas chromatography-mass spectrometry.** Talanta, 287, 127603, 2025.

CARNIELLI, J. B. T.; MONTI-ROCHA, R.; COSTA, D. L.; SESANA, A. M.; PANSINI, L. N. N.; SEGATTO, M.; MOTTRAM, J. C.; COSTA, C. H. N.; CARVALHO, S. F. G.; DIETZE, R. **Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 101, p. 789-794, 2019.

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

CORREIA, D.; SILVA, C. A. C.; MATTHES, A. G. Z. **Mefloquine in the treatment of cutaneous leishmaniasis.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 32, 585, 1999.

COSTA-DA-SILVA, A. C; NASCIMENTO, D. O.; FERREIRA, J. R. M.; GUIMARÃES-PINTO, K.; FREIRE-DE-LIMA, L.; MORROT, A.; DECOTÉ-RICARDO, D.; FILARDY, A. A., FREIRE-DE-LIMA, C. G. **Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview.** Trop Med Infect Dis., 7, 54, 2022.

CREEKA, D. J.; ANDERSON, J.; MCCONVILLE, M. J.; BARRETT., M. P. **Metabolomic analysis of trypanosomatid protozoa.** Molecular & Biochemical Parasitology, 181, p. 73– 84, 2012.

CREPALDI, F.; DE TOLEDO, J. S.; DO CARMO, A. O.; FERREIRA, L. M. M.; DE BRITO, D. D. V.; SERUFO, A. V.; ALMEIDA, A. P. M.; DE OLIVEIRA, L. G.; RICOTTA, T. Q. N.; MOREIRA, D. D. S.; MURTA, S. M. F.; DINIZ, A. B.; MENEZES, G. B.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, Á.; BARBAS, C.; FERNANDES, A. P. **Mapping Alterations Induced by Long-Term Axenic Cultivation of *Leishmania amazonensis***

Promastigotes with a Multiplatform Metabolomic Fingerprint Approach. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 9, p. 403, 2019.

CUYPERS, B.; BERG, M.; IMAMURA, H.; DUMETZ, F., I.; MUYLDER, G. D.; DOMAGALSKA, M. A.; RIJAL, S.; BHATTARAI, N. R.; MAES, I.; SANDERS, M.; COTTON, J. A. MEYSMAN, P. LAUKENS, K. DUJARDIN, J. C. **Integrated genomic and metabolomic profiling of ISC1, an emerging *Leishmania donovani* population in the Indian subcontinent.** *Infection, Genetics and Evolution*, 62, p. 170-178, 2018.

DAS, S.; SAHA, T.; SHAHA, C. **Tissue/Biofluid Specific Molecular Cartography of *Leishmania donovani* Infected BALB/c Mice: Deciphering Systemic Reprogramming.** *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 11:694470, 2021.

DE CARVALHO, R. V. H.; LIMA-JUNIOR, D. S.; DA SILVA, M. V. G.; DILUCCA, M.; RODRIGUES, T. S.; HORTA, C. V.; SILVA, A. L. N.; DA SILVA, P. F.; FRANTZ, F. G.; LORENZON, L. B.; SOUZA, M. M.; ALMEIDA, F.; CANTANHÊDE, L. M.; FERREIRA, R. G. M.; CRUZ, A. K.; ZAMBONI, D. S. ***Leishmania* RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition.** *Nat. Commun.*, 10, 5273, 2019.

DE SOUZA, D. P.; SAUNDERS, E. C.; MCCONVILLE, M. J.; LIKIĆ, V. A. **Progressive peak clustering in GC-MS Metabolomic experiments applied to *Leishmania* parasites.** *Bioinformatics*, 22, p. 1391-1396, 2006.

DUMETZ, F.; CUYPERS, B.; IMAMURA, H.; ZANDER, D.; D'HAENENS, E.; MAES, I.; DOMAGALSKA, M. A.; CLOS, J.; DUJARDIN, J. C.; DE MUYLDER, G. **Molecular Preadaptation to Antimony Resistance in *Leishmania donovani* on the Indian Subcontinent.** *mSphere*, 3, e00548-17, 2018.

EJIGU, B. A.; VALKENBORG, D.; BAGGERMAN, G.; VANAERSCHOT, M.; WITTERS, E.; DUJARDIN, J. C.; BURZYKOWSKI, T.; BERG, M. **Evaluation of normalization methods to pave the way towards large-scale LC-MS-based metabolomics profiling experiments.** *OMICS*, 17, p. 473-85, 2013.

FERGUSON, M. A. J. **The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research.** *Journal of Cell Science*, 112, p. 2799-2809, 1999.

FIEHN, O. **Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks.** *Comparative and Functional Genomics*, 2, p. 155-168, 2001.

GALVÃO, L. O.; JÚNIOR, S. M.; JÚNIOR, P. M.; LEMOS, G. J. P.; CUNHA, N. F.; ANTONINO, R. M. P.; FILHO, B. S. S.; MAGALHÃES, A. V. **Therapeutic trial in experimental tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. A comparative study between mefloquine and aminosidine.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33, p. 377-382, 2000.

GODZIEN, J.; CIBOROWSKI, M.; ANGULO, S.; BARBAS, C. **From numbers to a biological sense: How the strategy chosen for metabolomics data treatment may**

affect final results. A practical example based on urinefingerprints obtained by LC-MS. Electrophoresis, 34, p. 2812–2826, 2013.

GÓMEZ, L. E.; ANDRIAL, M.; HOSOKAWA, A.; NONADE, S.; HASHIGUCHI, Y. **Oral treatment of new world cutaneous leishmaniasis with mefloquine and artesunate in Ecuador: a preliminary clinical trial.** Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 23, p. 151-157, 1995.

GOTO, T. E.; CASELI, L. **The interaction of mefloquine hydrochloride with cell membrane models at the air–water interface is modulated by the monolayer lipid composition.** Journal of Colloid and Interface Science, 431, p. 24-30, 2014.

GROMSKI, P. S.; XU, Y.; KOTZE, H. L.; CORREA, E.; ELLIS, D. I.; ARMITAGE, E. G.; TURNER, M. L.; GOODACRE, R. **Influence of Missing Values Substitutes on Multivariate Analysis of Metabolomics Data.** Metabolites, 4, p. 433-452, 2014.

GUARNIZO S. A. G.; KARAMYSHEVA Z. N.; GALEANO E.; MUSKUS C. E. **Metabolite Biomarkers of *Leishmania* Antimony Resistance.** Cells, 10(5):1063, 2021.

GUO, J.; HUAXU, Y.; XING, S.; HUAN, T. **Addressing big data challenges in mass spectrometry-based metabolomics,** Chemical Communications, 58, 72, p. 9979-9990, 2022a.

GUO, J.; SHEN, S.; LIU, M.; WANG, C.; LOW, B.; CHEN, Y.; HU, Y.; XING, S.; YU, H.; GAO, Y.; FANG, M.; HUAN, T. **JPA: Joint Metabolic Feature Extraction Increases the Depth of Chemical Coverage for LC-MS-Based Metabolomics and Exposomics.** Metabolites. 12, 212, 2022b.

GUPTA, N.; GOYAL, N.; SINGHA, U.; BHAKUNI, V.; ROY, R.; ASTOGI, A. **Characterization of intracellular metabolites of axenic amastigotes of *Leishmania donovani* by ¹H NMR spectroscopy.** Acta Tropica, 73, p. 121-133, 1999.

GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI, A. K. **In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*.** Trends Parasitol., 17 , p. 150-153, 2001.

HACKSTADT, A. J.; HESS, A. M. **Filtering for increased power for microarray data analysis.** BMC Bioinformatics 10, 11, 2009.

HAN, T. L.; YANG, Y.; ZHANG, H.; LAW, K. P. **Analytical challenges of untargeted GC-MS-based metabolomics and the critical issues in selecting the data processing strategy.** F1000Research, 6, 967, 2017.

HENDRICKX, E. P.; AGUDELO, S. D. P.; MUÑOZ, D. L.; PUERTA, J. A.; BERNAL, I. D. V. **Lack of efficacy of mefloquine in the treatment of new world cutaneous leishmaniasis in colombia.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 59 (6), p. 889–892, 1998.

JARA, M.; BERG, M.; CALJON, G.; DE MUYLDER, G.; CUYPERS, B.; CASTILLO D.; MAES, I.; OROZCO, M. D. C.; VANAERSCHOT, M.; DUJARDIN, J. C.; AREVALO, J. **Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage.** PLoS One., 12(7):e0180532, 2017.

JARA, M.; BARRETT, M.; MAES, I.; REGNAULT, C.; IMAMURA, H.; DOMAGALSKA, M. A.; DUJARDIN, J. C. **Transcriptional Shift and Metabolic Adaptations during *Leishmania* Quiescence Using Stationary Phase and Drug Pressure as Models.** *Microorganisms*, 10 (1):97, 2022.

KIM, S.; IBARRA-MENESES, A. V.; FERNANDEZ-PRADA, C.; HUAN, T. **Global Lipidomics Reveals the Lipid Composition Heterogeneity of Extracellular Vesicles from Drug-Resistant *Leishmania*.** *Metabolites*, 14, 658, 2024.

KIND, T.; WOHLGEMUTH G.; LEE, D. Y.; LU, Y.; PALAZOGLU, M.; SHAHBAZ, S.; FIEHN, O. **FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry.** *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 24, p. 10038–10048, 2009.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. **New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era.** *Chemical Reviews*, v. 113 (4), p. 2437-2468, 2013.

LAGUNA-TORRES, V. A.; SILVA C. A. C.; CORREIA, D.; CARVALHO, E. M.; MAGALHÃES, A. V.; MACEDO, V. O. **Mefloquina no tratamento da leishmaniose cutânea em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32 (5), p. 529-532, 1999.

LAMICHHANE, S.; SEN, P.; DICKENS, A. M.; HYOTYLAINEN, T.; OREŠIĆ, M. **An Overview of Metabolomics Data Analysis: Current Tools and Future Perspectives.** *Comprehensive Analytical Chemistry*, 82, p. 387-413, 2018.

LAMOUR, S. D.; CHOI, B-S.; KEUN, H. C.; MÜLLER, I.; SARIC, J. **Metabolic characterization of *Leishmania major* infection in activated and nonactivated macrophages.** *J. Proteome Res.*, v. 11, p. 4211-4222, 2012.

LEROUX, M.; LUQUAIN-COSTAZ, C.; LAWTON, P.; AZZOUZ-MAACHE, S.; DELTON, I. **Fatty Acid Composition and Metabolism in *Leishmania* Parasite Species: Potential Biomarkers or Drug Targets for Leishmaniasis?** *Int J Mol Sci.*, 24, 4702, 2023.

LIBISELLER, G.; DVORZAK, M.; KLEB, U. **IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters.** *BMC Bioinformatics*, 16, 118, 2015.

LIMA M. L.; ABENGÓZAR, M. A.; NÁCHER-VÁZQUEZ, M.; MARTÍNEZ-ALCÁZAR, M. P.; BARBAS, C.; TEMPONE, A. G.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, Á.; RIVAS, L. **Molecular basis of the leishmanicidal activity of the antidepressant sertraline as a drug repurposing candidate.** *Antimicrob Agents Chemother*, 62:e01928-18, 2018.

LI, S.; PARK, Y.; DURAISINGHAM, S.; STROBEL, F. H.; KHAN, N.; SOLTOW. Q. A.; JONES, D. P.; PULENDRA, B. **Predicting network activity from high throughput metabolomics.** *PLoS Comput Biol.*, 9, e1003123, 2013.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T.; MESQUITA, P. R.; OLIVEIRA, W. F.; OLIVEIRA, F. S.; FRANKE, C. R.; RODRIGUES, F. DE M.; DE ANDRADE, J. B.; BARROUIN-

MELO, S. M. **Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis.** Anal Bioanal Chem., v. 406 (26), p. 6691-700, 2014.

MAMANI-HUANCA, M.; MUXEL, S. M.; ACUÑA, S. M.; FLOETER-WINTER, L. M.; BARBAS, C.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, Á. **Metabolomic Reprogramming of C57BL/6-Macrophages during Early Infection with *L. amazonensis*.** Int. J. Mol. Sci., 22(13):6883, 2021.

MARSHALL A. G.; HENDRICKSON, C. L. **High-resolution mass spectrometers.** Annu Rev Anal Chem, 1, p. 579–99, 2008.

MATOS, A. P. S; VIÇOSA, A. L.; RÉ, M. I.; RICCI-JÚNIOR, E.; HOLANDINO, C. A **review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, 57, 101664, 2020.

MESHRAM, R. J.; JANGLE, S. N. **Comparative metabolomic investigation of *Leishmania major* and homosapiens: an in-silico technique to discover and develop novel drug targets.** Pharmacophore, 2, p. 98-107, 2011.

MISRA B. B. **Data normalization strategies in metabolomics: Current challenges, approaches, and tools.** Eur. J. Mass Spectrom., 26 , p. 165-174, 2020.

MOHSEN, T.; FARIBA, F.; FATEMEH, D.; ZAMANI, Z.; FATEMEH, P. A. **Metabonomic Study on Samples of Cutaneous Leishmaniasis and its Correlation with the Selenium Level in the Blood Serum.** J. Mol. Biomark. Diagn., 1, 101, 2010.

MUXEL, S. M.; MAMANI-HUANCA, M.; AOKI, J. I.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, A.; BARBAS, C. **Metabolomic Profile of BALB/c Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*: Deciphering L-Arginine Metabolism.** Int. J. Mol. Sci., 20, 6248, 2019.

MUSA, A. M.; MBUI, J.; MOHAMMED, R.; OLOBO, J.; RITMEIJER, K.; ALCOBA, G.; OUATTARA, G. M.; EGONDI, T.; NAKANWAGI, P.; OMOLLO, T.; WASUNNA, M.; VERREST, L.; DORLO, T. P. C.; YOUNIS B. M.; NOUR, A.; ELMUKASHFI, E. T. A.; HAROUN, A. I. O.; KHALIL, E. A. G.; NJENGA, S.; FIKRE, H.; MEKONNEN, T.; MERSHA, D.; SISAY, K.; SAGAKI, P.; ALVAR, J.; SOLOMOS, A.; ALVES, F. **Paromomycin and Miltefosine Combination as an Alternative to Treat Patients With Visceral Leishmaniasis in Eastern Africa: A Randomized, Controlled, Multicountry Trial.** Clin Infect Dis., ciac643, 2022.

MWENECHANYA, R.; KOVÁŘOVÁ, J.; DICKENS, N. J.; MUDALIAR, M.; HERZYK, P.; VINCENT, I. M.; WEIDT, S. K.; BURGESS, K. E.; BURCHMORE, R. J. S.; POUNTAIN, A.W.; SMITH, T. K.; CREEK, D. J.; KIM, D. H.; LEPESHEVA, G. I.; BARRETT, M. P. **Sterol 14 α -demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*.** PLoS Negl Trop Dis., 11, e0005649, 2017.

NADERER T.; ELLIS M. A.; SERNEE M. F.; DE SOUZA D. P.; CURTIS J.; HANDMAN E.; MCCONVILLE M. J. **Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase.** Proc Natl Acad. Sci. USA, 103, p. 5502-5507, 2006.

NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019.** *J. Nat. Prod.*, v. 83 (3) p. 770-80, 2020.

NORDSTRÖM, A.; WANT. E.; NORTHEN. T.; LEHTIÖ. J.; SIUZDAK., G.; **Multiple ionization mass spectrometry strategy used to reveal the complexity of metabolomics.** *Anal Chem.*, 80, p. 421-429, 2008.

PARAB, A. R.; THOMAS, D.; LOSTRACCO-JOHNSON, S.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; MCKERROW, J. H.; DORRESTEIN, P. C.; MCCALL, L. I. **Dysregulation of Glycerophosphocholines in the Cutaneous Lesion Caused by *Leishmania major* in Experimental Murine Models.** *Pathogens*, 10, 593, 2021.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. **Metabolomics: the apogee of the omics trilogy.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, p. 263–269, 2012.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J. C.; BARRETT, M. P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOLOU, B. **Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge.** *PLoS Negl Trop Dis.*, 11, e0006052, 2017.

POUNTAIN, A. W.; BARRETT, M. P. **Untargeted metabolomics to understand the basis of phenotypic differences in amphotericin B-resistant *Leishmania* parasites.** *Wellcome Open Research*, 4, 176, 2019.

RIBEIRO, J. M.; CANUTO, G. A. B.; CALDEIRA, A. S. P.; DE SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L.; MURTA, S. M. F; DE ALMEIDA ALVES, T. M. **Untargeted Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry Metabolomic Investigation Reveals Altered Lipid Content in *Leishmania infantum* Lacking Lipid Droplet Protein Kinase.** *Trop Med Infect Dis.*, 9, 208, 2024.

ROCHA, V. P. C.; NONATO, F. R.; GUIMARÃES, E. T.; RODRIGUES DE FREITAS, L. A.; SOARES, M. B. P. **Activity of antimalarial drugs in vitro and in a murine model of cutaneous leishmaniasis.** *J. Med. Microbiol.* 62, p. 1001-1010, 2013.

ROJO, D.; CANUTO, G. A. B.; CASTILHO-MARTINS, E. A.; TAVARES, M. F. M.; BARBAS, C.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, Á.; RIVAS, L. A **Multiplatform Metabolomic Approach to the Basis of Antimonial Action and Resistance in *Leishmania infantum*.** *PLoS ONE* 10, e0130675, 2015.

SAUNDERS, E. C.; NG, W. W.; KLOEHN, J.; CHAMBERS, J. M.; NG, M.; MCCONVILLE, M. J. **Induction of a Stringent Metabolic Response in Intracellular Stages of *Leishmania mexicana* Leads to Increased Dependence on Mitochondrial Metabolism.**, 10, e1003888, 2014.

SCHELTEMA, R. A.; DECUYPERE, S.; T'KINDT, R.; DUJARDIN, J. C.; COOMBS, G. H.; BREITLING, R. **The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era.** *Parasitology*, 137, p. 1291-302, 2010.

SHAW, C. D. J.; LONCHAMP, J.; DOWNING, T.; IMAMURA, H.; FREEMAN, T. M.; COTTON, J. A.; SANDERS, M.; BLACKBURN, G.; DUJARDIN, J. C.; RIJAL, S.; KHANAL, B.; ILLINGWORTH, C. J. R.; COOMBS, G. H.; CARTER, K. C. *In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of Leishmania donovani from Nepal: genomic and metabolomic characterization.* Molecular Microbiology, 99, p. 1134–1148, 2016.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. **Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 40, p. 139-149, 2004

SILVA, A. M.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; COOMBS, G. H. **Metabolic Variation during Development in Culture of Leishmania donovani Promastigotes.** PLoS Negl. Trop. Dis., 5, e1451, 2011.

STÖGERER, T.; SILVA-BARRIOS, S.; CARMONA-PÉREZ, L.; SWAMINATHAN, S.; MAI, L. T.; LEROUX, L. P.; JARAMILLO, M.; DESCOTEAUX, A.; STÄGER, S. **Leishmania donovani Exploits Tunneling Nanotubes for Dissemination and Propagation of B Cell Activation.** Microbiol Spectr., 11, 4, e05096-22, 2023.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. **Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies.** Expert Opinion on Orphan Drugs, 7, p. 1-10, 2018.

SZYMAŃSKA, E.; SACCENTI, E.; SMILDE, A. K.; WESTERHUIS, J. A. **Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies.** Metabolomics, 8, p. 3-16, 2012.

TABRIZI, F.; TABAEI, S. J. S.; AHMADI, N. A.; OSKOUIE, A. A. **A Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Study to Identify Metabolite Differences between Iranian Isolates of Leishmania major and Leishmania tropica.** Iranian Journal of Medical Sciences, 46, 1, p. 43-51, 2021.

TAUTENHAHN, R., BÖTTCHER, C.; NEUMANN, S. **Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS.** BMC Bioinformatics, 9, 504, 2008.

T'KIND, R.; JANKEVICS, A.; SCHELTEMA, R. A.; ZHENG, L.; WATSON, D. G.; DUJARDIN, J.C.; BREITLING, R.; COOMBS, G. H.; DECUPYPERE, S. **Towards an unbiased metabolic profiling of protozoan parasites: optimisation of a Leishmania sampling protocol for HILIC-orbitrap analysis.** Anal. Bioanal Chem., 398, p. 2059-2069, 2010.

VARGAS, D. A.; PRIETO, M. D.; MARTÍNEZ-VALENCIA, A. J.; COSSIO, A.; BURGESS, K. E. V.; BURCHMORE, R. J. S.; GÓMEZ, M. A. **Pharmacometabolomics of Meglumine Antimoniate in Patients with Cutaneous Leishmaniasis.** Front. Pharmacol., 10, 657, 2019.

VINAIXA, M.; SAMINO, S.; SAEZ, I.; DURAN, J.; GUINOVART, J. J.; YANES O. **A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data.** Metabolites, 2, p. 775-95, 2012.

VINCENT, I. M.; WEIDT, S.; RIVAS, L.; BURGESS, K.; SMITH, T. K.; OUELLETTE, M. **Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in Leishmania infantum**

reveals changes to the internal lipid metabolism. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 4, p. 20–27, 2014.

VOLPEDO, G.; OLJUSKIN, T.; COX, B.; MERCADO, Y.; ASKWITH, C.; AZODI, N.; BERNIER, M.; NAKHASI, H. L.; GANNAVARAM, S.; SATOSKAR, A. R. ***Leishmania mexicana* promotes pain-reducing metabolomic reprogramming in cutaneous lesions.** iScience., 26, 108502, 2023.

WATSON, D. G. **The potential of mass spectrometry for the global profiling of parasite metabolomes.** Parasitology, 137, p. 1409–1423, 2010.

WESTROP G. D.; WILLIAMS, R. A.; WANG, L.; WATSON, D. G.; SILVA, A. M.; COOMBS, G. H. **Metabolomic analyses of *Leishmania* reveal multiple species differences and large differences in amino acid metabolism.** PloS One, 10, e0136891, 2015.

WILLIAMS, R. A. M.; WESTROP, G. D.; COOMBS, G. H. **Two pathways for cysteine biosynthesis in *Leishmania major*.** Biochem. J., 420, p. 451–462, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em janeiro/2025.

WORLEY, B.; POWERS, R. **Multivariate Analysis in Metabolomics.** Curr Metabolomics, 1, p. 92–107, 2013.

XIA, J.; WISHART, D. S. **Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst.** Nature Protocols, 6, p. 743 – 760, 2011.

YUAN, D.; CHEN, J.; ZHAO, Z.; QIN, H. **Metabolomics analysis of visceral leishmaniasis based on urine of golden hamsters.** Parasit. Vectors., 16, 304, 2023.

APÊNDICE A

Tabela A1. Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

<i>m/z</i>	Aduto	MM	Metabólito*	FC**	Classe
1030,3505	M+H	1029,3449	(10Z,12Z)-octadeca-10,12-dienoyl-CoA	0,51	Ácidos graxos
1054,3595	M+H	1053,3471	(11Z,14Z)-icosa-11,14-dienoyl-CoA	0,42	Ácidos graxos
915,5230	M+Na	892,5337	(2S,2'S)-Oscillol 2,2'-di(alpha-L-fucoside)	0,64	Glicerofosfolipídios
524,3716	M+Na	501,3818	(9Z,12Z,15Z,18Z,21Z)-Tetracosa-9,12,15,18,21-pentaenoylcarnitine	0,89	Acil carnitinas
503,4460	M+Na	480,4542	(S)-25-Hydroxy-14,16-hentriacontanedione	0,61	Beta-dicetonas
549,5441	2M+H	274,2661	1,3Z,6Z,9Z-Eicosatetraene	1,23	Ácidos graxos
283,2416	M+Na	260,2504	1,3Z,6Z,9Z-Nonadecatetraene	0,47	Ácidos graxos
291,2322	M+H	290,2246	10,13-nonadecadiynoic acid	0,52	Ácidos graxos
753,5617	2M+H	376,2766	10'-Apo-beta-caroten-10'-al	0,50	Lipídios prenol
729,5276	2M+H	364,2614	11-deoxy-16,16-dimethyl-PGE2	0,44	Ácidos graxos
524,3716	M+H	523,3638	2-Lysophosphatidylcholine	0,89	Glicerofosfolipídios
450,3340	M+H	449,3270	3alpha,7alpha,12alpha-trihydroxy-5beta-cholestanate	0,43	Esteroides e derivados
509,3801	2M+H	254,1882	7-Drimene-11,12,14-triol	2,58	Álcoois e polióis
509,3801	2M+H	254,1882	8-Hydroxy-4(6)-lactarene-5,14-diol	2,58	Álcoois e polióis
810,4775	M+Na	787,4848	all-trans-nonaprenyl diphosphate	0,57	Lipídios prenol
1054,3595	M+H	1053,3449	Arachidonyl-CoA	0,42	Ácidos graxos
650,4757	M+Na	627,4863	Cer 39:7	0,44	Esfingolipídios
1167,7505	M+H	1166,7375	CL 51:2	0,51	Glicerofosfolipídios
1030,3505	M+H	1029,3449	CoA 18:2	0,51	Ácidos graxos
245,0573	M+Na	222,0674	Cystathionine	0,43	Aminoácidos, peptídeos e análogos
1054,3595	M+H	1053,3449	Eicosatetraenoyl coenzyme A	0,42	Ácidos graxos

Tabela A1. Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

<i>m/z</i>	Aduto	MM	Metabólito*	FC**	Classe
409,3830	M+Na	386,3913	Ergostane	0,86	Esteroides e derivados
884,6100	M+Na	861,6177	Galabiosylceramide 44:1	1,58	Esfingolipídios
1121,7622	M+H	1120,7597	GalNAcbeta1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer (d18:1/20:0)	0,54	Esfingolipídios
1121,7622	M+Na	1098,7671	GlcNalpha1-6Ins-1-P-Cer(t18:0/26:0)	0,54	Esfingolipídios
617,5829	M+Na	594,5951	Hydroxyphthioceranic acid (C39)	0,82	Ácidos graxos
1030,3505	M+H	1029,3449	Linoleic coenzyme A	0,51	Ácidos graxos
1030,3505	M+H	1029,3449	Linoleoyl-CoA	0,51	Ácidos graxos
509,3801	2M+H	254,1882	Methyl 7-oxo-11E-tetradecenoate	2,58	Hidrocarbonetos alifáticos insaturados
743,5774	2M+H	371,2824	n-docosahexaenoylethanolamine	0,52	Ácidos graxos
914,5906	M+Na	891,5989	OS 44:6	2,11	Glicerofosfolipídios
881,5861	M+Na	858,5986	PA 24:0/PGD1	0,39	Ácidos graxos
633,4543	M+H	632,4417	PA 31:1	1,16	Glicerofosfolipídios
761,5075	M+Na	738,5200	PA 39:2	0,48	Glicerofosfolipídios
785,5637	M+H	784,5618	PA 41:3	0,81	Glicerofosfolipídios
857,5856	M+H	856,5830	PA 44:4	0,34	Glicerofosfolipídios
769,4963	M+H	768,4941	PA(19:0/PGJ2)	0,64	Glicerofosfolipídios
742,5739	M+H	741,5672	PC 34:2	2,79	Glicerofosfolipídios
792,5156	M+Na	769,5258	PC 34:3	0,80	Glicerofosfolipídios
786,5065	M+Na	763,5152	PC 35:6	0,67	Glicerofosfolipídios
810,5961	M+Na	787,6091	PC 36:1	0,53	Glicerofosfolipídios
810,5707	M+H	809,5571	PC 37:4	2,98	Glicerofosfolipídios

Tabela A1. Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

<i>m/z</i>	Aduto	MM	Metabólito*	FC**	Classe
878,5668	M+Na	855,5778	PC 42:9	1,91	Glicerofosfolipídios
786,5065	M+Na	763,5152	PC 48:6	0,67	Glicerofosfolipídios
828,5505	M+Na	805,5622	PC 48:6	0,95	Glicerofosfolipídios
650,4757	M+H	649,4683	PC(10:0/16:0)	0,44	Glicerofosfolipídios
742,5739	M+Na	719,5829	PC(16:0/O-16:0)	2,79	Glicerofosfolipídios
914,5906	M+H	913,5833	PC44:10	2,11	Glicerofosfolipídios
884,6100	M+Na	861,6248	PC44:6	1,58	Glicerofosfolipídios
936,6088	M+Na	913,6197	PC44:8	0,46	Glicerofosfolipídios
742,5739	M+H	741,5672	PE 37:2	2,79	Glicerofosfolipídios
810,5707	M+H	809,5571	PE 40:4	2,98	Glicerofosfolipídios
786,5061	M+H	785,4996	PE 40:9	0,43	Glicerofosfolipídios
866,4975	M+Na	843,5050	PE 42:10	0,40	Glicerofosfolipídios
650,4757	M+H	649,4683	PE(13:0/16:0)	0,44	Glicerofosfolipídios
742,5739	M+Na	719,5829	PE(O-20:0/15:0)	2,79	Glicerofosfolipídios
810,5961	M+H	809,5935	PE-Nme 40:4	0,53	Glicerofosfolipídios
828,5505	M+H	827,5465	PE-NMe 42:9	0,95	Glicerofosfolipídios
884,6100	M+Na	861,6248	PE-NMe 44:6	1,58	Glicerofosfolipídios
650,4757	M+H	649,4683	PE-NMe(14:0/14:0)[U]	0,44	Glicerofosfolipídios
769,4963	M+Na	746,5098	PG 34:2	0,49	Glicerofosfolipídios
785,5637	M+Na	762,5775	PG 36:1	0,81	Glicerofosfolipídios
769,5008	M+H	768,4941	PG 36:5	0,64	Glicerofosfolipídios

Tabela A1. Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

<i>m/z</i>	Aduto	MM	Metabólito*	FC**	Classe
849,5595	M+Na	826,5724	PG 40:4	0,41	Glicerofosfolipídios
857,5856	M+H	856,5830	PG 41:3	0,34	Glicerofosfolipídios
881,5861	M+Na	858,5986	PG 41:3	0,39	Glicerofosfolipídios
879,4836	M+Na	856,4891	PG 42:10	3,39	Glicerofosfolipídios
873,5571	M+Na	850,5724	PG 42:6	3,52	Glicerofosfolipídios
939,4691	M+H	938,4558	PGP 18:3/6 keto-PGF1alpha	2,21	Ácidos graxos
891,4692	M+Na	868,4867	PGP 36:3	1,64	Glicerofosfolipídios
955,5690	M+H	954,5598	PGP 41:3	2,14	Glicerofosfolipídios
915,5230	M+H	914,5157	PI 18:1/PGJ2	0,64	Glicerofosfolipídios
851,4667	M+Na	828,4789	PI 34:5	0,78	Glicerofosfolipídios
891,4692	M+Na	868,4738	PI 36:6	1,64	Glicerofosfolipídios
915,5230	M+H	914,5157	PI 38:6	0,64	Glicerofosfolipídios
1027,6388	M+H	1026,6256	PIM1 36:1	0,74	Glicerofosfolipídios
1157,6259	M+H	1156,6158	PIM2 44:3	0,63	Glicerofosfolipídios
1157,6259	M+Na	1134,6315	PIM2(16:0/16:0)	0,63	Glicerofosfolipídios
1033,4803	M+H	1032,4741	PIP2 37:4	0,51	Glicerofosfolipídios
792,5156	M+Na	769,5258	PS36:4	0,80	Glicerofosfolipídios
718,4705	M+H	717,4581	PS38:2	0,81	Glicerofosfolipídios
831,5634	M+Na	808,5731	SM 20:1/PGJ2	0,69	Esfingolipídios
811,6025	M+H	810,5887	SM 40:5	0,47	Esfingolipídios
831,5634	M+Na	808,5731	SM 40:6	0,69	Esfingolipídios

Tabela A1. Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

<i>m/z</i>	Aduto	MM	Metabólito*	FC**	Classe
816,5523	M+HCOOH-H	771,5567	1-(6-[5]-ladderane-hexanyl)-2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glycerophosphocholine	0,52	Glicerofosfolipídios
590,3452	M+HCOOH-H	545,3481	LysoPC(20:3)	1,28	Glicerofosfolipídios
423,1134	M+HCOOH-H	378,1167	Mefloquine	378	Quinolina
830,5902	M+HCOOH-H	785,5935	1,2-Dioleoyl PC	0,44	Glicerofosfolipídios
445,2371	M-H	446,2451	10-cys-9-nitro-octadecenoic acid	1,15	Ácidos graxos
700,5256	M-H	701,5359	PnE(16:0/18:1(9Z))	0,59	Glicerofosfolipídios
774,7380	M-H	775,7418	1-O-myristoyl-Cer(d18:1/18:0)	299,30	Esfingolipídios
346,0542	M-H	347,0631	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	0,36	Nucleotídeos e análogos
346,0542	M-H	347,0631	7-alpha-D-Ribosyladenine 5'-phosphate	0,36	Nucleotídeos e análogos
346,0542	M-H	347,0631	Adenosine 2'-phosphate	0,36	Nucleotídeos e análogos
346,0542	M-H	347,0631	Adenosine 5'-monophosphate	0,36	Nucleotídeos e análogos
303,2318	M-H	304,2402	Arachidonic acid	0,69	Ácidos graxos
572,4811	M+Cl	537,5121	Cer 34:1	0,76	Esfingolipídios
600,5196	M+HCOOH-H	555,5227	Cer(t18:0/16:0)	0,89	Esfingolipídios
878,5892	M+HCOOH-H	833,5864	LacCer 32:1	0,47	Esfingolipídios
773,5304	M-H	774,5411	LBPA 36:2	1,21	Glicerofosfolipídios
590,3452	M+HCOOH-H	545,3481	LysoPC 20:3	1,28	Glicerofosfolipídios
526,2924	M-H	527,3012	LysoPE 22:5	2,17	Glicerofosfolipídios
346,0542	M+HCOOH-H	301,0563	N-acetyl-alpha-D-galactosamine 1-phosphate	0,36	Carboidratos
486,2954	M+HCOOH-H	441,2991	N-arachidonoyl histidine	2,02	Aminoácidos, peptídeos e análogos
405,2764	M-H	406,2832	N-linolenoyl-glutamine	0,61	Aminoácidos, peptídeos e análogos

Tabela A1. Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

<i>m/z</i>	Aduto	MM	Metabólito*	FC**	Classe
464,3132	M+HCOOH-H	419,3148	N-oleoyl histidine	1,15	Aminoácidos, peptídeos e análogos
466,3271	M+HCOOH-H	421,3304	N-stearoyl histidine	0,65	Aminoácidos, peptídeos e análogos
562,3139	M-H	563,3223	OOB-PE	0,60	Aminoácidos, peptídeos e análogos
593,3637	M-H-H2O	612,3791	PA 30:4	1,77	Glicerofosfolipídios
773,5304	M+HCOOH-H	728,5356	PA 38:2	1,21	Glicerofosfolipídios
715,5091	M-H-H2O	734,5250	PA 40:5	0,95	Glicerofosfolipídios
805,5757	M-H	806,5826	PA 44:5	0,38	Glicerofosfolipídios
801,5458	M-H	802,5513	PA 44:7	0,42	Glicerofosfolipídios
829,5758	M-H	830,5826	PA 46:7	0,28	Glicerofosfolipídios
445,2371	M-H	446,2433	PA 19:3	1,15	Glicerofosfolipídios
562,3139	M+HCOOH-H	517,3168	PC 18:3	0,60	Glicerofosfolipídios
556,3391	M-H	557,3481	PC 21:4	0,93	Glicerofosfolipídios
830,5902	M+HCOOH-H	785,5935	PC 36:2	0,44	Glicerofosfolipídios
716,5571	M-H	717,5672	PC(14:0/P-18:0)	0,53	Glicerofosfolipídios
858,6205	M+HCOOH-H	813,6248	PC 38:2	0,40	Glicerofosfolipídios
768,5522	M-H	769,5622	PC 35:3	0,46	Glicerofosfolipídios
790,5359	M-H	791,5465	PC 37:6	0,47	Glicerofosfolipídios
702,5419	M-H	703,5516	PC(15:0/P-16:0)	0,77	Glicerofosfolipídios
728,5583	M-H	729,5672	PC 33:1	0,62	Glicerofosfolipídios
592,3612	M-H	593,3693	PC(16:0/5:0(CHO))	1,90	Glicerofosfolipídios
816,5523	M-H	817,5622	PC 39:7	0,52	Glicerofosfolipídios

Tabela A1. Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

<i>m/z</i>	Aduto	MM	Metabólito*	FC**	Classe
814,5380	M-H	815,5465	PC 39:8	0,55	Glicerofosfolipídios
874,5588	M+HCOOH-H	829,5622	PC 40:8	0,31	Glicerofosfolipídios
818,4951	M+HCOOH-H	773,4996	PC 46:8	0,16	Glicerofosfolipídios
902,5893	M+HCOOH-H	857,5935	PC 42:8	0,57	Glicerofosfolipídios
590,3452	M+HCOOH-H	545,3481	PC 20:3	1,28	Glicerofosfolipídios
856,6048	M+HCOOH-H	811,6091	PC 38:3	0,41	Glicerofosfolipídios
620,3914	M+HCOOH-H	575,3951	PC 22:2	1,34	Glicerofosfolipídios
880,6044	M+HCOOH-H	835,6091	PC 40:5	0,67	Glicerofosfolipídios
876,5738	M+HCOOH-H	831,5778	PC 40:7	0,42	Glicerofosfolipídios
924,5737	M+HCOOH-H	879,5778	PC 44:11	0,63	Glicerofosfolipídios
750,5271	M+HCOOH-H	705,5309	PC(9:0/21:0)	0,32	Glicerofosfolipídios
752,5578	M-H	753,5672	PC 35:4	0,93	Glicerofosfolipídios
592,3612	M+HCOOH-H	547,3638	PC 20:2	1,90	Glicerofosfolipídios
522,3917	M-H	523,4002	PC(O-19:0/0:0)	1,25	Glicerofosfolipídios
700,5256	M-H	701,5359	PC 31:1	0,59	Glicerofosfolipídios
670,4801	M-H	671,4890	PE 32:2	1,41	Glicerofosfolipídios
818,4951	M+HCOOH-H	773,4996	PE 39:8	0,16	Glicerofosfolipídios
858,6205	M+HCOOH-H	813,6248	PE 42:2	0,40	Glicerofosfolipídios
816,5523	M-H	817,5622	PE 42:7	0,52	Glicerofosfolipídios
814,5380	M-H	815,5465	PE 42:	0,55	Glicerofosfolipídios
856,6048	M+HCOOH-H	811,6091	PE 41:3	0,41	Glicerofosfolipídios

Tabela A1. Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

<i>m/z</i>	Aduto	MM	Metabólito*	FC**	Classe
828,4831	M+HCOOH-H	783,4839	PE 40:10	0,79	Glicerofosfolipídios
436,2820	M-H	437,2906	PE(P-16:0/0:0)	1,18	Glicerofosfolipídios
702,5419	M-H	703,5516	PE(P-20:0/14:0)	0,77	Glicerofosfolipídios
700,5256	M-H	701,5359	PE 34:1	0,59	Glicerofosfolipídios
716,5571	M-H	717,5672	PE(P-20:0/15:0)	0,53	Glicerofosfolipídios
728,5583	M-H	729,5672	PE 36:1	0,62	Glicerofosfolipídios
878,5892	M-H	879,5989	PE-NMe(11D3/13M5)	0,47	Glicerofosfolipídios
750,5271	M+HCOOH-H	705,5309	PE-NMe(14:0/18:0)	0,32	Glicerofosfolipídios
880,6044	M+HCOOH-H	835,6091	PE-NMe 42:5	0,67	Glicerofosfolipídios
876,5738	M+HCOOH-H	831,5778	PE-NMe 42:7	0,42	Glicerofosfolipídios
874,5588	M+HCOOH-H	829,5622	PE-NMe 42:8	0,31	Glicerofosfolipídios
902,5893	M+HCOOH-H	857,5935	PE-NMe 44:8	0,57	Glicerofosfolipídios
768,5522	M-H	769,5622	PE-NMe2 36:3	0,46	Glicerofosfolipídios
790,5359	M-H	791,5465	PE-NMe2 38:6	0,47	Glicerofosfolipídios
814,5380	M-H	815,5465	PE-NMe2 40:10	0,55	Glicerofosfolipídios
830,5902	M+HCOOH-H	785,5935	PE-NMe2 37:2	0,44	Glicerofosfolipídios
864,5524	M-H	865,5622	PE-NMe2 44:11	0,62	Glicerofosfolipídios
553,3118	M-H	554,3220	PG(10:0/10:0)	1,34	Glicerofosfolipídios
773,5304	M-H	774,5411	PG 36:2	1,21	Glicerofosfolipídios
799,4737	M+HCOOH-H	754,4785	PG 35:5	0,86	Glicerofosfolipídios
395,2425	M+HCOOH-H	350,2457	PGA1 methyl ester	0,94	Glicerofosfolipídios
395,2425	M-H	396,2512	PGF2alpha-11-acetate	0,94	Glicerofosfolipídios

Tabela A1. Metabólitos significativos anotados e suas características obtidos a partir do estudo metabolômico por LC-MS em modo positivo e negativo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com mefloquina.

<i>m/z</i>	Aduto	MM	Metabólito*	FC**	Classe
569,2716	M+HCOOH-H	524,2750	1-hexadecanoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphate	1,69	Glicerofosfolipídios
851,5620	M-H	852,5728	PI(13:0/22:0)	0,31	Glicerofosfolipídios
891,5270	M+HCOOH-H	846,5258	PI 35:3	0,75	Glicerofosfolipídios
879,5925	M-H	880,6041	PI(15:0/22:0)	0,37	Glicerofosfolipídios
877,5774	M-H	878,5884	PI 37:1	0,54	Glicerofosfolipídios
569,2716	M-H	570,2805	PI 16:1	1,69	Glicerofosfolipídios
903,5923	M-H	904,6041	PI 39:2	0,58	Glicerofosfolipídios
901,5773	M-H	902,5884	PI 39:3	0,44	Glicerofosfolipídios
599,3188	M-H	600,3275	PI(18:0/0:0)	1,17	Glicerofosfolipídios
915,5931	M-H	916,6041	PI 40:3	1,17	Glicerofosfolipídios
923,4928	M-H	878,4945	PI 38:8	4,05	Glicerofosfolipídios
627,3494	M-H	628,3588	PI(20:0/0:0)	0,80	Glicerofosfolipídios
700,5256	M-H	701,5359	PnE 34:1	0,59	Glicerofosfolipídios
592,3612	M-H	593,3693	PC(16:0/5:0(CHO)	1,90	Glicerofosfolipídios
830,5902	M-H	831,5989	PS 39:1	0,44	Glicerofosfolipídios
828,4831	M-H	829,4894	PS 40:9	0,79	Glicerofosfolipídios
858,6205	M-H	859,6302	PS 42:1	0,40	Glicerofosfolipídios
856,6048	M-H	857,6146	PS 42:2	0,41	Glicerofosfolipídios
876,5738	M-H	877,5833	PS 43:6	0,42	Glicerofosfolipídios
778,5230	M-H	733,5258	PS 33:1	1,20	Glicerofosfolipídios
786,5628	M-H	787,5727	PS 37:2	0,82	Glicerofosfolipídios

*Nomes dos metabólitos mantidos em inglês para reduzir a probabilidade de erros por tradução equivocada da nomenclatura.

***Fold change* calculado pela razão da média de intensidades do metabólito anotado, considerando TRT *versus* CTR (destaque em vermelho sinaliza metabólito aumentado no grupo TRT *versus* CTR).