

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Joane Mariela Miari Corrêa

**Otimização de Protocolos de Extração de Metabólitos de *Brucella abortus* e
Estudo Metabolômico *Untarget* de seus Biovares**

Belo Horizonte

2023

UFMG/ICEX/DQ. 1.568

T. 714

Joane Mariela Miari Corrêa

**Otimização de Protocolos de Extração de Metabólitos de *Brucella abortus* e
Estudo Metabolômico *Untarget* de seus Biovares**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências – Química.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Ferreira Faria

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Nori de Macedo

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

C824o
2023
T

Corrêa, Joane Mariela Miari.
Otimização de protocolos de extração de metabólitos de *Brucella abortus* e estudo metabolômico untarget de seus biovares [manuscrito] / Joane Mariela Miari Corrêa. 2023.
152 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Adriana Ferreira Faria.
Coorientadora: Adriana Nori de Macedo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Bibliografia: f. 132-148.
Anexos: f. 150-152.

1. Química analítica – Teses. 2. Metabolômica – Teses. 3. *Brucella abortus* – Teses. 4. Brucelose em bovino – Teses. 5. Metabolismo microbiano – Teses. 6. Preparação de amostra (Química) – Teses. 7. Análise de componentes principais – Teses. I. Faria, Adriana Ferreira, Orientadora. II. Macedo, Adriana Nori de, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**"Otimização de Protocolos de Extração de Metabólitos de *Brucella abortus* e Estudo Metabolômico *Untarget* de seus Biovares"**

Joane Mariela Miari Corrêa

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Adriana Ferreira Faria - Orientadora
UFMGProf. Adriana Nori de Macedo - Coorientadora
UFMGProf. Fábio Neves dos Santos
UFBAProf. Rafael Garrett da Costa
UFRJProf. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta
UFMGProf. Ricardo Mathias Orlando
UFMG

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2023.

Documento assinado eletronicamente por **Rafael Garrett da Costa**, Usuário Externo, em 30/08/2023, às 20:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mathias Orlando**, Professor do Magistério Superior, em 30/08/2023, às 20:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo**, Professora do Magistério Superior, em 30/08/2023, às 20:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Fábio Neves dos Santos**, Usuário Externo, em 31/08/2023, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucia Pinheiro Santos Pimenta, Professora do Magistério Superior**, em 31/08/2023, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Ferreira Faria, Professora do Magistério Superior**, em 31/08/2023, às 21:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2580235** e o código CRC **83D33FAB**.

À memória de minha mãe Virgínia e de meu pai Ernani.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a execução e conclusão desse trabalho após um período pandêmico tão devastador.

Ao meu marido Vítor pela parceria nessa jornada.

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Ferreira Faria e coorientadora Profa. Dra. Adriana Nori de Macedo por todo apoio, suporte e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos colaboradores da pesquisa Dr. Mauro Lúcio Gonçalves de Oliveira, Dra. Patrícia Gomes de Souza e Dr. Paulo Martins Soares Filho por todo suporte dado ao longo da pesquisa.

Ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA/MG) por ter aceitado a parceria para realização da pesquisa.

Aos membros da banca Prof. Dr. Fábio Neves dos Santos, Profa. Dra. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta, Prof. Dr. Rafael Garrett da Costa, Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando.

Aos membros suplentes da banca Profa. Dra. Brenda Lee Simas Porto e Prof. Dr. Diego Gomes Rocha.

Às minhas colegas Mariana e Tássia pelo auxílio e conversas.

Ao Departamento de Química (DQ) e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas; isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para encontrar as que estão certas. A ciência é um processo autocorretivo. Para serem aceitas, novas ideias devem sobreviver aos mais rigorosos padrões de evidência e escrutínio”.

Carl Sagan (Cosmos, 1980)

RESUMO

Um estudo exploratório para comparar e encontrar alterações no metabolismo entre os biovares da bactéria *Brucella abortus* foi realizado. A abordagem metabolômica *untarget* foi a ferramenta utilizada para compreender os mecanismos envolvidos a nível molecular devido à condição genética. Duas plataformas analíticas de alta resolução (GC-QTOF-MS e UHPLC-Q-Orbitrap) foram utilizadas para as análises químicas. Alguns procedimentos do fluxo de trabalho do estudo metabolômico foram otimizados e a pesquisa foi dividida em três etapas. A primeira foi dedicada ao desenvolvimento do protocolo para o preparo e coleta das amostras bacterianas da *Brucella abortus*. O protocolo otimizado definiu tempo de crescimento das colônias, biomassa a ser coletada, lavagem e tempo de decantação da biomassa, e inativação bacteriana para coleta. Na segunda etapa, métodos de extração foram avaliados para as duas plataformas analíticas, sendo selecionadas as soluções extratoras de composições metanol/água/clorofórmio para GC-QTOF-MS e acetonitrila/isopropanol/água para UHPLC-Q-Orbitrap. A estabilidade analítica foi avaliada utilizando controles de qualidade e padrões internos, trifenilmetano para GC-QTOF-MS e *p*-fluoro-*DL*-fenilalanina e sulfadiazina para UHPLC-Q-Orbitrap. Na terceira etapa, a interpretação dos resultados e associação biológica foram realizadas. As plataformas XCMS Online e MetaboAnalyst foram utilizadas para processamento dos dados e tratamento estatístico (uni e multivariado), respectivamente. Os resultados obtidos em ambas as plataformas analíticas demonstraram que há diferenças a nível metabólico entre os biovares da *Brucella abortus*, e que os metabólitos alterados e identificados estão relacionados com a membrana celular da bactéria. Esses resultados são muito promissores para o desenvolvimento de tecnologias preventivas, diagnósticas e terapêuticas, pois a virulência da bactéria *Brucella abortus* está relacionada com a membrana celular.

Palavras-chave: *Brucella abortus*; metabolômica microbiana; preparo de amostra bacteriana; extração de metabólitos intracelulares; multiplataformas analíticas.

ABSTRACT

An exploratory study to compare and find alterations in the metabolism among biovars of the bacterium *Brucella abortus* was carried out. An untargeted metabolomics approach was the tool used to understand the mechanisms involved at the molecular level due to the genetic condition. Two high resolution analytical platforms (GC-QTOF-MS and UHPLC-Q-Orbitrap) were used for chemical analyses. Some procedures of the metabolomics study workflow were optimized and the research was divided into three steps. The first step was dedicated to the development of the protocol for the preparation and collection of bacterial samples from *Brucella abortus*. The optimized protocol defined colony growth time, biomass to be collected, washing and biomass decantation time, and bacterial inactivation for collection. In the second step, extraction methods were evaluated for the two analytical platforms, selecting the extraction solutions composed by: methanol/water/chloroform for GC-QTOF-MS and acetonitrile/isopropanol/water for UHPLC-Q-Orbitrap. Analytical stability was evaluated using quality controls and internal standards, triphenylmethane for GC-QTOF-MS and *p*-fluoro-*DL*-phenylalanine and sulfadiazine for UHPLC-Q-Orbitrap. In the third step, the interpretation of results and biological association were performed. The XCMS Online and MetaboAnalyst platforms were used for data processing and statistical treatment (uni and multivariate analysis), respectively. The results obtained in both analytical platforms showed that there are differences at the metabolic level between the *Brucella abortus* biovars and that the altered and identified metabolites are related to the bacterial cell membrane. These results are very promising for the development of preventive, diagnostic and therapeutic technologies, since the virulence of the *Brucella abortus* bacteria is related to the cell membrane.

Keywords: *Brucella abortus*; microbial metabolomics; bacterial sample preparation; extraction of intracellular metabolites; analytical multiplatforms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Percentual de faturamento de carne bovina exportada pelo Brasil, dividido pelos principais países de destino no ano de 2022.....	22
Figura 2 – Hospedeiros naturais da <i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. ovis</i> e o potencial zoonótico dessas cepas.....	24
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas.....	27
Figura 4 – Relação de publicações em genômica, proteômica e metabolômica aplicada à bactéria <i>B. abortus</i>	36
Figura 5 – Distribuição de algumas das técnicas instrumentais mais utilizadas em estudos metabolômicos nos últimos 10 anos.....	38
Figura 6 – Alguns algoritmos utilizados no processamento dos dados brutos nos estudos metabolômicos.....	41
Figura 7 – Fluxograma das etapas do processamento dos dados no software XCMS e os algoritmos utilizados.....	44
Figura 8 – UFCs desenvolvidas na Placa de Petri.....	53
Figura 9 – a) Procedimento de coleta, b) Procedimento de lavagem em água gelada ultrapura, c) Contêiner de congelamento utilizado para armazenar as amostras.....	53
Figura 10 – <i>Pellet</i> sedimentado após centrifugação a 7000 xg.....	54
Figura 11 – Diluição seriada realizada a partir de 1 mL da suspensão bacteriana mais densa, ou seja, com valor de DO superior a 0,4.....	56
Figura 12 – Fluxograma do preparo de amostras bacterianas do gênero <i>Brucella</i> desenvolvido nessa pesquisa.....	58
Figura 13 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M1.....	60
Figura 14 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M2.....	61
Figura 15 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M3.....	62
Figura 16 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M4.....	63
Figura 17 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M5.....	64
Figura 18 – Fluxograma do processamento de dados da plataforma GC-MS.....	68
Figura 19 – Gráfico de controle de <i>Shewhart</i> utilizado para avaliar o desempenho do equipamento ao longo das injeções (eixo y) do PI trifenilmetano.....	71

Figura 20 – Pico cromatográfico gerado para o PI nas triplicatas biológicas obtidos nos cinco métodos de extração avaliados	74
Figura 21 – TICs dos cinco métodos de extração nas análises por GC-QTOF-MS.....	76
Figura 22 – Diagrama de Venn construído a partir dos <i>features</i> com RSD da área dos picos cromatográficos inferior a 30%, obtidos para os diferentes métodos de extração avaliados ...	78
Figura 23 – A) Gráfico de escores da PC1 <i>versus</i> PC2 para os métodos de extração avaliados, em que as elipses representam o intervalo de confiança de 95% (n = 3). B) Dendrograma gerado na HCA, com base na distância euclidiana e no algoritmo de agrupamento <i>ward.D</i> , utilizando as triplicatas biológicas de cada método	79
Figura 24 – Comparação das áreas de pico obtidas para os metabólitos extraídos para as quatro classes: ácidos graxos, glicérideos, carboidratos e compostos aromáticos	81
Figura 25 – Picos cromatográficos gerados, com valores de <i>bw</i> de 1 e 5, para os PIs nas amostras e nos QCs.....	91
Figura 26 – Diagrama de Venn dos <i>features</i> extraídos nos três métodos avaliados	92
Figura 27 – Gráfico de escores da PC1 <i>versus</i> PC2 para os métodos de extração avaliados, em que as elipses representam o intervalo de confiança de 95% (n = 3)	93
Figura 28 – Dendrograma gerado com base na distância euclidiana e algoritmo de agrupamento <i>ward.D</i> utilizando as triplicatas biológicas de cada método	94
Figura 29 – Placas de petri divididas em 3 regiões, em que as culturas bacterianas dos bvs da espécie <i>B. abortus</i> em estudo atingiram seu crescimento ideal (regiões amareladas)	98
Figura 30 – Gráfico da densidade de kernel	102
Figura 31 – Gráfico de escores do modelo de PCA	103
Figura 32 – Dendrograma gerado com base na distância euclidiana e algoritmo de agrupamento <i>ward.D</i> utilizando as triplicatas biológicas de cada bv	104
Figura 33 – Gráfico de Volcano apresenta os <i>features</i> discriminantes aumentados (pontos vermelhos), diminuídos (pontos azuis) e os não significativos (pontos cinza), selecionados pelo modelo univariado de comparação	106
Figura 34 – Cromatogramas e fragmentos dos bvs obtidos no UHPLC-Q-Orbitrap no modo positivo de ionização e no modo de aquisição combinado FS-PRM	109
Figura 35 – Distribuição isotópica obtida no Compound Discoverer para os íons de <i>m/z</i> de 467,20492 (bv1) e <i>m/z</i> de 118,06536 (bv3).....	120
Figura 36 – Boxplot dos compostos identificados putativamente obtidos no tratamento estatístico no MetaboAnalyst.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos metabolômicos realizados com diferentes tipos de microrganismos	32
Tabela 2 – Softwares de pré-processamento utilizados para tratamento de dados metabolômicos com os respectivos endereços eletrônicos e tipos de licença.....	39
Tabela 3 – Softwares de licenças comerciais e gratuitas utilizados para tratamento estatístico de dados metabolômicos com os respectivos endereços eletrônicos e tipos de licença.....	42
Tabela 4 – Alternativas para pré-tratamento dos dados metabolômicos no MetaboAnalyst ...	46
Tabela 5 – Níveis de confiança de anotação de compostos utilizados em metabolômica.....	48
Tabela 6 – Relação e descrição dos materiais utilizados na presente pesquisa.....	51
Tabela 7 – Soluções alcoólicas e tempos de exposição utilizadas em cada experimento no estudo de inativação bacteriana.....	55
Tabela 8 – Condições utilizadas no GC-QTOF-MS para análise de metabólitos intracelulares	67
Tabela 9 – Valores dos parâmetros otimizados em cada etapa do planejamento experimental realizado pelo IPO	72
Tabela 10 – Parâmetros utilizados no XCMS para processamento dos dados de GC-QTOF-MS	75
Tabela 11 – Pontuação atribuída a cada método baseada nos valores de RSD dos <i>features</i> detectados nas triplicatas biológicas.....	77
Tabela 12 – Valores de pKa e logP dos metabólitos e suas respectivas classes.....	83
Tabela 13 – Condições utilizadas no UHPLC-Q-Orbitrap para análise de metabólitos intracelulares no modo positivo de ionização.....	88
Tabela 14 – Programa de eluição empregado para separação dos metabólitos intracelulares .	89
Tabela 15 – Parâmetros utilizados no XCMS para processamento dos dados de UHPLC-Q-Orbitrap.....	90
Tabela 16 – Pontuação atribuída aos valores de RSD dos <i>features</i> obtidos por XCMS	92
Tabela 17 – Índice de polaridade e logP dos solventes utilizados no estudo	95
Tabela 18 – Valores de <i>m/z</i> do íon precursor, <i>t_R</i> e <i>m/z</i> dos íons produtos obtidos no modo positivo de ionização e no modo de aquisição FS-PRM dos bvs	107
Tabela 19 – Identificação putativa dos <i>features</i> discriminantes de cada bv.....	118
Tabela 20 – Informações sobre o sequenciamento das proteínas encontradas na <i>B. abortus</i> bv 1 – cepa C2308	127

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1).....	56
Equação (2).....	76
Equação (3).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ¹H NMR – Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (*Proton Nuclear Magnetic Resonance*)
- 2-ME – 2-Mercaptoetanol
- ACN – Acetonitrila
- BLAST – Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (*Basic Local Alignment Search Tool*)
- bv – Biovar
- C18 – Octadecil silano
- CCS – Seção Transversal de Colisão (*Collision Cross Section*)
- CDC – Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)
- CE – Electroforese capilar (*Capillary Electrophoresis*)
- CFM – Modelagem de Fragmentação Competitiva (*Competitive Fragmentation Modeling*)
- DDB – Diagnóstico de Doenças Bacterianas
- DI – Injeção Direta (*Direct Injection*)
- DO – Densidade Ótica
- DoE – Delineamento Experimental (*Design of Experiments*)
- DVB/CAR/PDMS – Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano
- EI – Ionização Eletrônica (*Electron Ionization*)
- EPC – Controle Pneumático Eletrônico (*Electronic Pneumatic Control*)
- EtOAc – Acetato de etila
- ESI – Ionização por Eletrospray (*Electrospray ionization*)
- FC – *Fold change*
- FD – Fator de Diluição
- FDR – Taxa de Falsa Descoberta (*False discovery rate*)
- F-Phe – *p*-fluoro-*DL*-fenilalanina
- FS – *Full Scan*
- FT-IR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*)
- GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)
- GC×GC – Cromatografia Gasosa Bidimensional (*Two-Dimensional Gas Chromatography*)
- GP – Glicerofosfolipídios

HCA – Análise Hierárquica de Agrupamentos (*Hierarchical Cluster Analysis*)

HMDB – Banco de Dados de Metaboloma Humano (*Human Metabolome Database*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

HS – *Headspace*

IR – Infravermelho (*Infrared*)

ISO – Isopropanol

IQR – Intervalo Interquartil (*Interquartile Range*)

JSF – *Java Server Faces*

KEGG – Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

LC – Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)

LFDA/MG – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Minas Gerais

LPS – Lipopolissacarídeos

MAD – Desvio Mediano Absoluto (*Median Absolute Deviation*)

MALDI – Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

MoNA – MassBank da América do Norte (*MassBank of North America*)

MSI – Iniciativa de Padrões Metabolômicos (*Metabolites Standard Initiaves*)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS – Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry*)

MSTFA – *N*-metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoroacetamida

MTBE – Éter metil terc-butílico

m/z – Razão massa/carga

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

NCE – Energia de Colisão Normalizada (*Normalized Collision Energy*)

NMR – Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*)

PFTBA – Perfluorotributilamina

PI – Padrão Interno

PIB – Produto Interno Bruto

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal

PRM – Monitoramento de Reação Paralela (*Parallel Reaction Monitoring*)

PSI – Ionização por Spray em Papel (*Paper Spray Ionization*)

QC – Controle de Qualidade (*Quality Control*)

Q-Orbitrap – Quadrupolo-Orbitrap (*Quadrupole-Orbitrap*)

QS – Sensor de Quórum (*Quorum Sensing*)

Q-TOF – Quadrupolo-Tempo de Voo (*Quadrupole-Time-of-Flight*)

Q-TRAP – Quadrupolo-Armadilha de Íon (*Quadrupole-ion Trap*)

RCA – Resíduos e Contaminantes em Alimentos

REI – Ionização Evaporativa Rápida (*Rapid Evaporative Ionization*)

RSD – Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*)

t_R – Tempo de Retenção (*Retention Time*)

SD – Desvio Padrão (*Standard Deviation*)

SDZ – Sulfadiazina

sp. – Espécie

SPME – Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction*)

TIC – Cromatograma de Íons Totais (*Total Ion Chromatogram*)

u.a. – unidade arbitrária

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)

UV-Vis – Ultravioleta-Visível (*Ultraviolet-Visible*)

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS METABOLÔMICOS DA BRUCELOSE BOVINA.....	20
1.1 PANORAMA DA PECUÁRIA BRASILEIRA	21
1.2 BRUCELOSE.....	22
1.3 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.....	26
1.4 MEIOS DE CULTURA	27
1.5 ISOLAMENTO BACTERIANO E SEMEADURA DE CULTURAS PURAS.....	28
1.6 METABOLÔMICA	28
1.7 METABOLÔMICA MICROBIANA.....	31
1.8 PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISES METABOLÔMICAS.....	37
1.9 TRATAMENTO DOS DADOS EM METABOLÔMICA	39
1.10 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS E INTERPRETAÇÃO BIOLÓGICA.....	47
2 ESTUDO PILOTO PARA OTIMIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE METABOLÔMICA <i>UNTARGET</i> DE METABÓLITOS INTRACELULARES DA <i>BRUCELLA ABORTUS</i> POR GC-HRMS	49
2.1 INTRODUÇÃO.....	50
2.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	50
2.2.1 Materiais e Equipamentos do Preparo de Amostra.....	50
2.2.2 Reagentes	51
2.2.3 Randomização dos Processos no Preparo de Amostras.....	52
2.2.4 Otimização do Preparo de Amostras Bacterianas do Gênero <i>Brucella</i>	52
2.2.4.1 Crescimento das Unidades Formadoras de Colônias.....	52
2.2.4.2 <i>Quenching</i> , Coleta e Lavagem das Amostras Bacterianas.....	53
2.2.4.3 Inativação Bacteriana	54
2.2.4.4 Determinação da Concentração.....	55
2.2.4.5 Método Otimizado para o Preparo de Amostras Bacterianas do Gênero <i>Brucella</i>	57
2.2.5 Otimização da Extração dos Metabólitos Intracelulares de <i>Brucella abortus</i>	59
2.2.6 Procedimentos de Derivatização para Análise por GC-QTOF-MS.....	65
2.2.6.1 Metoximação	65

2.2.6.2 Sililação.....	65
2.2.7 Instrumentação e Condições Operacionais do sistema GC-QTOF-MS.....	66
2.2.8 Processamento dos Dados.....	68
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	69
2.3.1 Otimização do Preparo de Amostras Bacterianas do Gênero <i>Brucella</i>	69
2.3.2 Verificação da Qualidade dos Dados Obtidos no Sistema GC-QTOF-MS	70
2.3.3 Tratamentos dos Dados.....	71
2.3.3.1 Seleção dos Algoritmos e Parâmetros de Processamento dos Dados	71
2.3.3.2 Otimização da Extração dos Metabólitos Intracelulares de <i>Brucella abortus</i> – Número de <i>Features</i> Extraídos e Repetibilidade.....	75
2.3.3.3 Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamento Hierárquico	78
2.3.2.4 Classes de Metabólitos Extraídos.....	80
2.4 CONCLUSÃO.....	84
3 OTIMIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS INTRACELULARES DE <i>BRUCELLA ABORTUS</i> PARA ANÁLISE METABOLÔMICA <i>UNTARGET</i> POR LC-HRMS	85
3.1 INTRODUÇÃO.....	86
3.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	86
3.2.1 Otimização da Extração dos Metabólitos Intracelulares de <i>B. abortus</i> para Análise por LC-HRMS.....	86
3.2.2 Instrumentação e Condições Operacionais do Sistema UHPLC-Q-Orbitrap	87
3.2.3 Tratamento dos Dados	89
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	89
3.3.1 Tratamentos dos Dados.....	89
3.3.1.1 Seleção dos Algoritmos e Parâmetros de Processamento dos Dados	89
3.3.1.2 Otimização da Extração dos Metabólitos Intracelulares de <i>Brucella abortus</i> – Número de <i>Features</i> Extraídos e Repetibilidade.....	91
3.3.1.3 Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamento Hierárquico	93
3.4 CONCLUSÃO.....	95
4 ESTUDO METABOLÔMICO DOS BIOVARES DA <i>BRUCELLA ABORTUS</i> UTILIZANDO LC-HRMS.....	96

4.1 INTRODUÇÃO.....	97
4.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	98
4.2.1 Preparo de Amostras.....	98
4.2.2 Análise Instrumental.....	99
4.2.3 Tratamento dos Dados.....	99
4.2.4 Identificação Putativa dos Metabólitos.....	100
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	101
4.3.1 Tratamento dos Dados e Comparação entre os Biovares.....	101
4.4 CONCLUSÃO.....	129
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	131
REFERÊNCIAS.....	132
APÊNDICE A – Valores das biomassas aferidos para cada bv.....	149
ANEXO A – Fórmulas estruturais dos PIs.....	150
ANEXO B – Fórmulas estruturais dos metabólitos identificados putativamente nas análises por GC-QTOF-MS.....	151
ANEXO C – Fórmulas estruturais dos metabólitos identificados putativamente nas análises por UHPLC-Q-Orbitrap.....	152

CAPÍTULO 1

CONTEXTUALIZAÇÃO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS METABOLÔMICOS DA BRUCELOSE BOVINA

1.1 PANORAMA DA PECUÁRIA BRASILEIRA

Atualmente, o Brasil destaca-se no mercado global como o maior exportador de carne bovina, detentor do mais numeroso rebanho bovino comercial, segundo maior produtor e terceiro maior consumidor desse alimento (USDA, 2023). De acordo com o mais recente levantamento da Pesquisa da Pecuária Municipal realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a partir de 2019, identificou-se um acelerado crescimento do rebanho bovino no país, atingindo aproximadamente 224,6 milhões de cabeças em 2021, o maior número da série histórica dessa pesquisa que é realizada desde 1973 (IBGE, 2021).

Conforme a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes e a Secretaria de Comércio Exterior (Secex), em 2022, a quantidade de carne bovina exportada pelo Brasil ultrapassou a registrada no ano anterior em 22,6%, alcançando um recorde anual tanto de exportação quanto de faturamento, que se elevou 40,8%. Além disso, de acordo com dados do *Beef Report*, o Brasil produziu 10,79 milhões de toneladas de carne bovina no ano de 2022, das quais 72,1% foram destinadas ao abastecimento do mercado interno e 27,9% a outros países, o que representou 27,7% das exportações mundiais no período (ABIEC, 2023).

Embora seja o segundo maior produtor global, atrás apenas dos Estados Unidos, em comparação com os principais países do setor pecuário, o Brasil foi o que apresentou o maior crescimento em produtividade na última década, com um acréscimo de 1,7 milhão de toneladas (ABIEC, 2023). Segundo o relatório semestral do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a pecuária brasileira segue em direção a um novo pico em 2023. O cenário previsto é de um crescimento de 1,3% da produção, cerca de 48,5 milhões de cabeças de gado, e de 2,8% do abate devido à crescente demanda dos países importadores e do mercado interno (Nogueira, 2023). Na Figura 1, estão representados os principais países de destino da carne exportada pelo Brasil no ano de 2022.

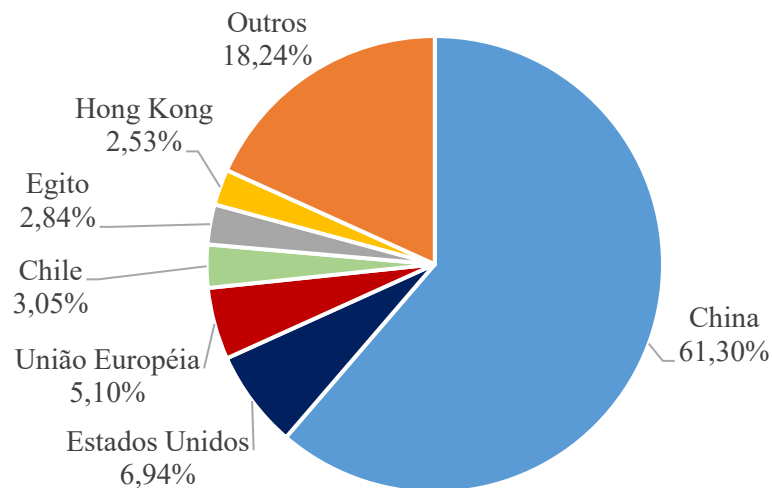


Figura 1 – Percentual de faturamento de carne bovina exportada pelo Brasil, dividido pelos principais países de destino no ano de 2022

Fonte: ABIEC (2023).

O destaque brasileiro nesse setor se deve aos anos de investimentos e desenvolvimento de tecnologias para melhoria, aumento e segurança da produção, o que contribuiu para que o país alcançasse a comercialização com mais de 150 países. Uma das condições fundamentais para manter o destaque desse importante setor da economia brasileira é garantir a saúde humana e animal (ABIEC, 2023; EMBRAPA, 2016; Gomes; Feijó; Chiari, 2017).

Certas doenças podem acometer os rebanhos gerando elevadas perdas financeiras aos produtores, além de transmitirem doenças aos seres humanos através do consumo de carne ou pela manipulação de produtos e animais contaminados (Souza *et al.*, 2016). Dentre as doenças, destaca-se a brucelose, que compõe o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) implantado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2001, por meio da Instrução Normativa nº 02/2001, e revisado pela Instrução Normativa SDA nº 10, de 3 de março de 2017 (Andrade *et al.*, 2023; Seagri-DF, 2018).

1.2 BRUCELOSE

A brucelose é uma zoonose grave causada por bactérias Gram-negativas do gênero *Brucella* (*B.*) e estão listadas como agentes/doenças de bioterrorismo, categoria B, pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC – *Centers for Disease Control and*

Prevention) do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos. Segundo o CDC, os patógenos dessa categoria são moderadamente fáceis de disseminar, ocasionam moderadas taxas de morbidade e baixas taxas de mortalidade. Além disso, as bactérias desse gênero possuem resistência ambiental e tratamento terapêutico difícil. Quando ocorre em animais, essa zoonose é conhecida também como aborto contagioso, aborto infeccioso e doença de Bang. Nos humanos, essa doença pode ser denominada como: doença das mil faces, febre de Bang, febre de Gibraltar, febre de Malta, febre napolitana, febre intermitente do Mediterrâneo, febre ondulante e melitococia (Azevedo; Cohen; Cardoso, 2020; CDC, 2018; Lawinsky *et al.*, 2010; El-Sayed; Awad, 2018).

A brucelose é uma doença prevalente em todo o mundo e muito recorrente em regiões menos desenvolvidas ou em desenvolvimento, tais como: América do Sul e Central, África, Ásia, Bacia do Mediterrâneo e do Caribe e Oriente Médio. Mundialmente, ao menos 500 mil casos são registrados anualmente em seres humanos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a ocorrência real da doença deve ser cerca de cinco ou mais vezes maior que o registrado, em razão de falhas na notificação e no diagnóstico (El-Sayed; Awad, 2018; Oliveira *et al.*, 2017; Pal *et al.*, 2017; Paraná, 2015).

A OMS listou a brucelose entre as vinte doenças a serem priorizadas em seu Plano Global de Combate às Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) de 2008 a 2015, publicado em 2007, devido à sua expressiva ocorrência e riscos à saúde. Contudo, oito DTNs prioritárias, entre elas a brucelose, foram classificadas como “deficientes em ferramentas” (*tool-deficient*) por exigirem recursos menos acessíveis, estratégias mais complexas e maiores custos para controle, prevenção e erradicação. Com isso, as outras doze doenças classificadas como “ferramentas prontas” (*tool-ready*) receberam mais investimentos, agravando a situação de negligência de zoonoses, como a brucelose. Desde o primeiro relatório sobre as DTNs de 2010, a OMS abandonou esses termos para classificação e retirou a brucelose da lista de doenças prioritárias, restringindo ainda mais as medidas de combate em escala global (Pastrana *et al.*, 2020; Suárez-Esquível *et al.*, 2020b).

As bactérias do gênero *Brucella* são patógenos intracelulares e, atualmente, onze espécies são conhecidas. Porém, estudos genéticos de paridade DNA-DNA demonstraram que todas as espécies dessa bactéria possuem uma similaridade no DNA acima de 95%, representando uma única espécie (gênero monoespecífico). Entretanto, por convenção, a separação por “espécies” e biovars (bv), que são antígenos diferentes apresentados em uma linhagem, foi mantida devido às diferenças fenotípicas, particularidades na interação com

hospedeiro e virulências distintas (Al Dahouk *et al.*, 2012; Tortora; Funke; Case, 2017; Pessegueiro; Barata; Correia, 2003; Roop II; Caswell, 2017; Roset *et al.*, 2013; Suárez-Esquivel *et al.*, 2020).

Dentre as onze espécies, cinco são importantes patógenos dos seres humanos e animais (Figura 2). Elas são muito infecciosas aos hospedeiros e responsáveis pelo aborto e infertilidade em ovelhas, camelos e cabras (*B. melitensis*, bv 1-3), bovinos e outros bovídeos (*B. abortus*, bv 1-7 e 9), suínos, renas e pequenos ruminantes (*B. suis*, bv 1-5), cães (*B. canina*) e ovelhas (*B. ovis*). A espécie *B. melitensis* é a mais patogênica e invasiva em seres humanos, sendo capaz de infectar com poucas bactérias (10-100). Já a *B. ovis* provoca inflamação do epidídimo (epididimite) em carneiros ocasionando infertilidade, porém não há relatos de contaminação de seres humanos por essa espécie (Al Dahouk *et al.*, 2010; Celli, 2019; Lawinsky *et al.*, 2010; Pessegueiro, Barata; Correia, 2003; Roop II; Caswell, 2017).

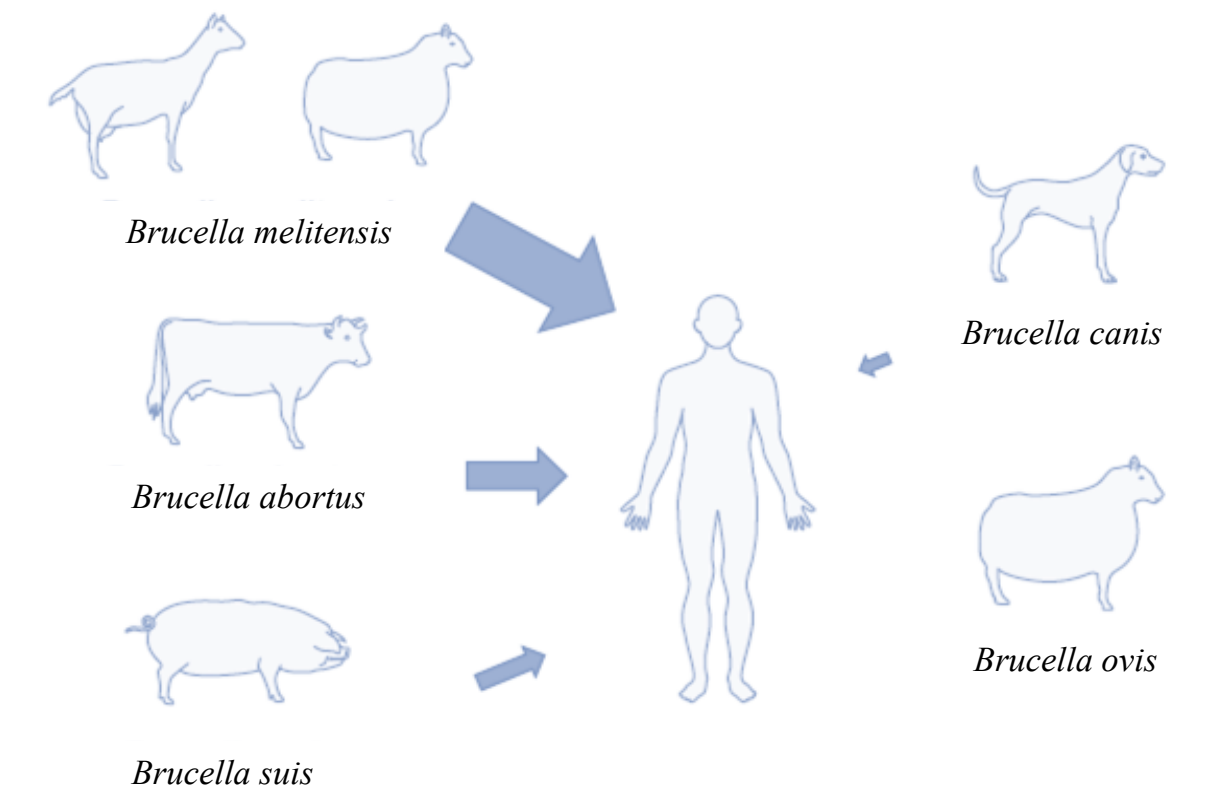


Figura 2 – Hospedeiros naturais da *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e o potencial zoonótico dessas cepas

Fonte: Roop II e Caswell (2017, p. 2).

A largura da seta indica a propensão relativa de cada espécie do gênero *Brucella* causar doenças em seres humanos.

A bactéria *B. abortus* em bovinos é uma espécie que recebe expressiva atenção de especialistas, sendo responsável por abortos em animais infectados. A doença pode ser transmitida aos animais sadios via contato com feto, carcaça, ingestão de água e/ou alimentos contaminados. A contaminação humana ocorre através do contato direto com secreções de animais contendo a bactéria, ou pela ingestão de alimentos crus oriundos de animais infectados, além de produtos derivados de leite contaminado (El-Sayed; Awad, 2018; Paraná, 2015).

Os sintomas da doença em seres humanos são febres, artrites com deformações, artralgia (dor articular), fraqueza, esplenomegalia (aumento de tamanho do baço), hepatomegalia (aumento no tamanho do fígado), linfadenopatia (aumento do tamanho dos gânglios linfáticos), mialgia (dor muscular), sudorese e, pode causar osteomielite (infecção óssea). Em homens ocorre epididimites (inflamação do epidídimo - ducto no interior dos testículos), orquites (infecção dos testículos) e endocardite (doença que acomete o endocárdio). Nas mulheres o aborto não é característico da doença, mas sim lombalgia, mialgia e sudorese, entre outros (Pal *et al.*, 2017; Varella, 2023).

A brucelose está entre as doenças que contribuíram para a criação das regras de biossegurança devido aos casos de transmissão por aerossol na manipulação de amostras de *Brucella* em laboratórios bacteriológicos, relatados no trabalho de Meyer e Eddie (1941). Posteriormente, a publicação de Sulkin e Pike (1951), seguida por muitas outras, alertou que a brucelose era a infecção de maior ocorrência de contaminação nos laboratórios à frente do tifo, tuberculose e tularemia (Lawinsky *et al.*, 2010).

Conforme a Portaria n.º 1.339/GM, de 18 de novembro de 1999, a brucelose faz parte das doenças infecciosas e parasitárias relacionadas ao trabalho, já que é uma doença provocada pela sujeição do trabalhador nos diversos processos realizados nos abatedouros, frigoríficos, ordenha, atividades em indústrias de laticínios, entre outras relacionadas com o contato e manipulação do animal contaminado. A vacina contra essa zoonose ainda não está disponível ao ser humano (Brasil, 1999; Lawinsky *et al.*, 2010; Paraná, 2015).

Doenças emergentes, como a brucelose, têm a capacidade de estender a infecção além do âmbito local, sendo rapidamente transmitidas entre rebanhos (doença epizootica) e dos animais aos seres humanos. Desse modo, essas doenças infecciosas proliferam-se aceleradamente por outras localidades, afetando a saúde pública e a economia. Assim, é fundamental realizar um diagnóstico microbiano correto, eficaz e rápido para promover o tratamento e conter o avanço da doença (Pereira; Petrechen, 2011).

Além disso, o diagnóstico da brucelose, de acordo com o PNCEBT é realizado utilizando o teste antígeno acidificado tamponado para triagem, e em caso positivo, outros testes confirmatórios devem ser realizados, tais como: 2-mercaptoetanol, teste de fixação de complemento e teste da polarização fluorescente. Entretanto, mesmo os testes confirmatórios podem ser inconclusivos ou incorretos. Desse modo, o diagnóstico de brucelose pode envolver várias etapas, sendo um processo relativamente longo e nem sempre conclusivo. A falta de um método de diagnóstico totalmente eficaz demonstra a necessidade de pesquisas voltadas à melhoria do diagnóstico da doença. Apesar dos diferentes tipos de testes diagnósticos para brucelose, há um conhecimento incompleto sobre os antígenos e as respostas imunológicas causadas. Desse modo, estudos na área das ômicas podem contribuir para a exploração e ampliação do entendimento para combater e prevenir a doença (Ducrotoy *et al.*, 2016; Seagri-DF, 2018).

1.3 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

A parede celular bacteriana é constituída de um mucocomplexo conhecido como glicopeptídeo, mucopeptídeo, mureína ou peptidoglicano. Ela tem a função de evitar o rompimento celular devido à pressão osmótica, dar forma e rigidez à estrutura da bactéria, além de proteger a membrana plasmática (Tortora; Funke; Case, 2017; Nogueira; Miguel, 2014).

Nas bactérias Gram-negativas, a parede celular possui uma composição química mais complexa, com quantidade de lipídeos e aminoácidos superiores às Gram-positivas, sendo assim uma parede mais permeável (Figura 3). Entretanto, as Gram-negativas possuem poucos peptideoglicanos, o que as torna passíveis de ruptura mecânica. A parte externa da parede celular possui composição assimétrica, sendo composta por fosfolipídeos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS), que determinam a antigenicidade e a toxigenicidade da bactéria. Essa membrana celular dupla, composta por uma membrana externa carregada negativamente e uma outra membrana interna hidrofóbica, dificulta a ação de compostos com alvos intracelulares. Essas duas porções possuem propriedades físico-químicas bem distintas, desse modo, os compostos alvos também precisam apresentar diversidade físico-química para interagir e atravessar as barreiras da membrana (Glowacka *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2020; Nogueira; Miguel, 2014; Pereira; Petrechen, 2011; Tortora; Funke; Case, 2017).

Esse tipo de membrana externa age como barreiras e possuem permeabilidade seletiva, sendo considerada uma barreira antibiótica em evolução, dificultando as alternativas para

tratamento das infecções. Também possuem canais especializados e bombas de efluxo para transporte e secreção de moléculas para o exterior da célula. Entender o processo que mantém essa assimetria da membrana externa é promissor para a criação de novos medicamentos que possam agir em bactérias resistentes, pois o estudo da membrana celular de bactérias Gram-negativas ainda tem sido muito pouco explorado nessas áreas (Dombach *et al.*, 2020; Le Brun *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2022; Powers; Trent, 2018).

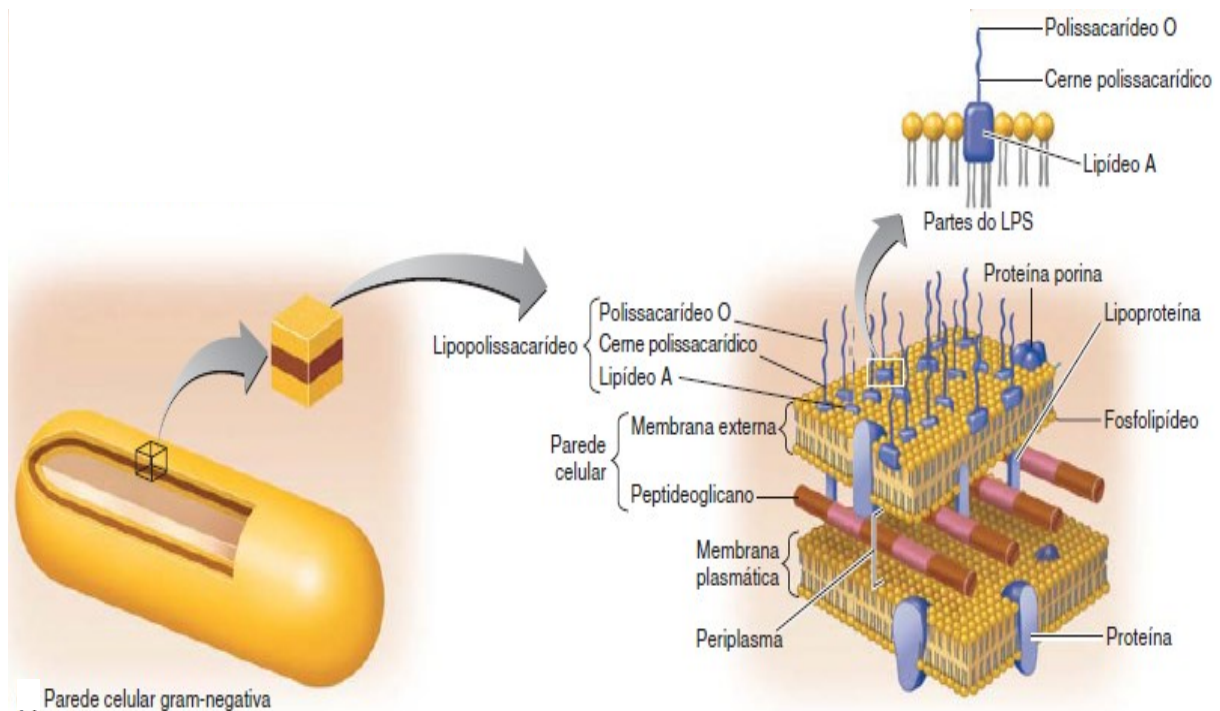


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas

Fonte: Tortora, Funke e Case (2017, p. 82).

1.4 MEIOS DE CULTURA

Para cultivar microrganismos, é fundamental conhecer as suas necessidades tanto nutritivas quanto físicas, para, dessa forma, escolher um meio de cultura com composição adequada que favoreça o crescimento e desenvolvimento das bactérias. O meio de cultura pode ser líquido, conhecido como caldo, utilizado para crescimento bacteriano; semissólido para observação da motilidade do microrganismo; ou sólido para formação de unidades formadoras de colônias (UFC), indicado para isolamento. Os meios de cultura podem ser meios complexos, cuja composição não é completamente conhecida, ou meios sintéticos, nos quais a composição química é totalmente conhecida (Nogueira; Miguel, 2014; Pereira; Petrechen, 2011).

Conforme o propósito, diferentes meios podem ser utilizados: a) meios básicos que possuem uma composição simples para uso geral, frequentemente utilizados como bases para o preparo de outros meios; b) meios enriquecidos ou ricos para crescimento de organismo mais exigentes; c) meios seletivos que favorecem o crescimento de um determinado grupo microbiano; d) diferenciais ou indicadores para discriminar microrganismos por meio de uma atividade bioquímica específica do patógeno; e) meios de dosagem utilizados para dosar compostos; f) meios para contagem que indicam a composição bacteriana de materiais; g) meios de estocagem ou manutenção quando a cultura exige um meio diferente do recomendado; e h) meios de transporte indicados para culturas sensíveis à coleta que necessitam ser transferidas para um meio (transporte) antes de serem inoculadas para semeadura (Nogueira; Miguel, 2014).

É importante também fornecer condições ambientais favoráveis que correspondam às necessidades de cada tipo de microrganismo. Essas condições físicas são: pH apropriado, temperatura controlada, pressão osmótica, umidade, quantidade de CO₂ (atmosfera, atm) entre outros fatores físicos particulares a cada patógeno (Nogueira; Miguel, 2014; Pereira; Petrechen, 2011).

1.5 ISOLAMENTO BACTERIANO E SEMEADURA DE CULTURAS PURAS

Naturalmente, diferentes espécies de microrganismos compõem populações microbianas de um determinado ambiente (habitat). Dessa forma, faz-se necessário o isolamento para adquirir um conjunto populacional puro, homogêneo, composto por uma única espécie, ou seja, uma cultura pura. O isolamento bacteriano é uma etapa importante no preparo das amostras, pois permite a classificação e caracterização do patógeno obtido em uma cultura pura a partir de uma cultura mista. O processo de isolamento requer algumas considerações: ter conhecimento da origem da matriz utilizada, estimar a espécie microbiana presente e conhecer as necessidades do organismo que pretende isolar (Caitano *et al.*, 2014; Soares Filho *et al.*, 2012; Nogueira; Miguel, 2014; Pereira; Petrechen, 2011).

1.6 METABOLÔMICA

O metaboloma é o conjunto de todos os metabólitos de um organismo, que são compostos químicos de baixa massa molecular (<1500 Da) presentes em amostras biológicas (biofluidos, tecidos, células, órgãos, organismos) como precursores, intermediários ou produtos

do metabolismo, originados de fontes endógenas ou exógenas (dieta, medicamentos, meio ambiente), e podem se apresentar de forma alterada ou inalterada (Belinato *et al.*, 2019; Canuto *et al.*, 2018; Pilon *et al.*, 2020).

Os primeiros trabalhos a apresentar o termo metaboloma foram publicados em 1998, por Oliver e colaboradores que pesquisaram, juntamente com outras técnicas ômicas (genômica, proteômica e transcriptômica), a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. E por Tweeddale, Notley-McRobb e Ferenci no estudo do metaboloma da *Escherichia coli* (*E. coli*) para compreender o metabolismo celular (Kell; Oliver, 2016; Oliver *et al.*, 1998; Pilon *et al.*, 2020, Tweeddale; Notley-McRobb; Ferenci, 1998).

Posteriormente, Nicholson e colaboradores utilizaram, em 1999, o termo metabonômica como sendo “a medição quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica dinâmica de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética” (Nicholson; Lindon; Holmes, 1999, p. 1181, tradução nossa).

As autoras Downs e Escalante-Semerena (2000) ressaltaram em seu trabalho que as pesquisas sobre metabolismo são importantes por diversos motivos, tanto que se trata de um campo consolidado na bioquímica. No ano seguinte, o autor Gavin H. Thomas destacou, em seu artigo “*Metabolomics breaks the silence*”, a capacidade de pesquisas, como a de Raamsdonk e colaboradores, em identificar fenótipos de mutações “silenciosas” por meio do metaboloma e que não foram identificados por genômica. Esses genes não possuem nenhum fenótipo manifesto (em termos de taxa de crescimento ou outros fluxos) quando alterados no sistema e, por isso, recebem o nome de silenciosos (Downs; Escalante-Semerena, 2000; Raamsdonk *et al.*, 2001; Thomas, 2001). Em 2001, Fiehn publicou um artigo definindo metabolômica como “uma análise abrangente e quantitativa de todos os metabólitos”, ou seja, “uma análise que revela o metaboloma do sistema biológico em estudo” (Fiehn, 2001, p. 157, tradução nossa). Esse conceito é inatingível atualmente, pois propõe medir todos os metabólitos presentes em um sistema, o que inviabilizaria uma pesquisa metabolômica de ser executada por falta de tecnologias avançadas. Ambos os termos, metabonômica e metabolômica, representam o mesmo fluxograma de trabalho e são utilizados pela comunidade científica (Nicholson; Lindon, 2008; Tang, 2011).

A metabolômica faz parte das tecnologias ômicas que englobam a genômica, a transcriptômica e a proteômica, sendo uma área que tem emergido, nos últimos anos, na biologia sistêmica. Os estudos metabolômicos têm ajudado a melhorar a compreensão do funcionamento de processos metabólicos frente a alterações causadas por uma doença, um

tratamento específico, uma determinada exposição ambiental ou por modificações genéticas de um sistema biológico. Essas vias metabólicas de resposta permitem identificar biomarcadores e entender o mecanismo bioquímico de ação, que podem auxiliar na interpretação biológica tanto no diagnóstico precoce e acompanhamento de doenças quanto no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (Belinato *et al.*, 2019; Mastrangelo *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*, 2012).

A investigação desses metabólitos em amostras biológicas, de forma qualitativa e/ou quantitativa, pode complementar os dados obtidos nas outras ômicas, como genômica, por exemplo, caracterizando uma abordagem multiômica muito utilizada para desvendar a complexidade de um organismo a partir de informações cruzadas (Pinu *et al.*, 2019; van Gulik, 2010).

A abordagem em metabolômica pode ser: metabolômica alvo (*target metabolomics*), quando é focada na análise de uma classe de metabólitos ou numa rota metabólica específica, e metabolômica não direcionada ou global (*untarget metabolomics*), que visa analisar o maior número de metabólitos presentes na amostra, ou seja, é uma análise mais global para traçar o perfil metabólico (Belinato *et al.*, 2019; Canuto *et al.*, 2018; Gao; Xu, 2015).

Para uma pesquisa metabolômica completa, o fluxograma de trabalho deve ser estruturado da seguinte forma:

- a) definir a pergunta biológica que norteia o estudo para escolher o tipo de abordagem (*target* ou *untarget*) e/ou levantar a(s) hipótese(s) iniciais da pesquisa;
- b) realizar um delineamento experimental para definir tipo de matriz, número de amostras que represente o sistema, procedimento de coleta, armazenamento e técnica(s) analítica(s) a ser(em) aplicada(s);
- c) interromper a atividade metabólica das amostras, sem causar danos ou perdas metabólicas (*quenching*) para realizar a amostragem e o preparo de amostra, sendo que nessa etapa é importante definir como o *quenching* será realizado;
- d) efetuar a análise instrumental para aquisição dos dados *untarget* e/ou *target*, randomizando as amostras e intercalando os controles de qualidades (QCs – *Quality Controls*), que são amostras obtidas a partir de um *pool* preparado com alíquotas de mesmo volume de todas as amostras do estudo, nas bateladas para monitorar a estabilidade do sistema analítico aplicado;
- e) realizar o processamento dos dados utilizando softwares específicos para desconvolução e alinhamento dos picos, e análises estatísticas em plataformas para análises uni e multivariadas dos dados processados para determinar os metabólitos discriminantes;

- f) para metabolômica *untarget*, fazer a identificação/anotação dos metabólitos e procurar em plataformas como Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas (KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), Banco de Dados de Metaboloma Humano (HMDB – *Human Metabolome Database*), CEU Mass Mediator, entre outras, rotas bioquímicas que expliquem as alterações observadas no sistema e respondam à pergunta biológica da pesquisa (Belinato *et al.*, 2019; Borges *et al.*, 2022; Canuto *et al.*, 2018; Doran *et al.*, 2017; Hendriks *et al.*, 2011; Mastrangelo *et al.*, 2015; Pilon *et al.*, 2020).

1.7 METABOLÔMICA MICROBIANA

Em pesquisas metabolômicas microbianas, os metabólitos estudados podem ser do metaboloma extracelular, que são metabólitos excretados pelos microrganismos, ou do metaboloma intracelular, constituído pelos metabólitos presentes no interior das células. A metabolômica microbiana se diferencia da metabolômica de outros sistemas por três características: 1) flexibilidade amostral, já que permite que a biomassa de organismos seja definida e cultivada conforme a necessidade do estudo; 2) menor complexidade celular, pois os microrganismos são unidades mais simples quando comparados com sistemas pluricelulares; 3) disponibilidade de informações nos repositórios de genômica, já que muitos foram sequenciados (Belinato *et al.*, 2019; Canuto *et al.*, 2018; Gao; Xu, 2015).

A metabolômica microbiana tem aplicação em diversos campos, tais como: biotecnologia, bioenergia, biogeoquímica, agroquímicos, interações no meio ambiente, identificação de organismos, compreensão de doenças, tratamentos, mutações, entre outras. Assim, esses estudos microbianos têm desvendado as interações desses microrganismos com diferentes ecossistemas (Belinato *et al.*, 2019; Canuto *et al.*, 2018; Tang, 2011).

Uma pesquisa bibliográfica buscando por estudos metabolômicos de microrganismos foi realizada, e algumas informações como tipo de abordagem, solvente extrator e técnica instrumental utilizados estão apresentadas na Tabela 1. Entre as espécies microbianas, estão as bactérias Gram-negativas, como a *B. abortus*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, entre outras.

Para a *B. abortus* foi encontrado apenas o trabalho de Tang e colaboradores (2021), aplicado ao estudo de biofilme e células planctônicas. Esse levantamento, apresentado na Tabela 1, demonstra a carência de estudos metabolômicos que envolvam a bactéria do gênero *Brucella*.

Tabela 1 – Estudos metabolômicos realizados com diferentes tipos de microrganismos (continua)

Abordagem	Espécie	Solvente de Extração	Instrumentação	Referência
Target	<i>Streptomyces venezuelae</i>	MeOH (100%)	LC-MS/MS	Sekurova <i>et al.</i> (2022)
Untarget	<i>Escherichia colium</i>	MeOH:H ₂ O (4:1)	GC-MS	Yu <i>et al.</i> (2022)
Untarget	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ACN:MeOH:H ₂ O (2:2:1)	LC-MS/MS	Xiao <i>et al.</i> (2022)
Untarget	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc (1:1)	UHPLC-MS/MS e FTICR-MS	Perruchon <i>et al.</i> (2021)
Untarget	<i>E. coli</i>	MeOH:CH ₃ COOH: H ₂ O (2:2:1)	UHPLC-QTOF-MS	Ma <i>et al.</i> (2020)
Untarget	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (1:3:1)	HPLC-Q-Exactive Orbitrap	Han <i>et al.</i> (2019)
Untarget	<i>Leishmania mexicana</i>	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (1:3:1)	HPLC-Q-Exactive Orbitrap	Pountain e Barrett (2019)
Target/Untarget	<i>E. coli</i>	MeOH (60% e 80%)	GC- MS e UPLC-Q- Orbitrap	AlRabiah <i>et al.</i> (2018)
Untarget	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (1:3:1)	GC×GC-TOF-MS	Koen, van Breda e Loots (2018)

Tabela 1 – Estudos metabolômicos realizados com diferentes tipos de microrganismos (continuação)

Abordagem	Espécie	Solvente de Extração	Instrumentação	Referência
Untarget	<i>B. abortus</i>	MeOH:ACN: H ₂ O: (2:2:1)	UPLC- QTOF-MS	Tang <i>et al.</i> (2021)
Untarget	<i>Pseudomonas syringae</i>	H ₂ O:MeOH:CH ₃ CN (1:2:2)	LC-MS e LC-MS/MS e NMR	Jousse <i>et al.</i> (2018)
Untarget	<i>Leishmania infantum</i>	MeOH:H ₂ O (1:1)	GC-MS e RPLC-MS	Canuto <i>et al.</i> (2018)
Target/Untarget	<i>Metarhizium brunneum</i>	ACN:H ₂ O (2:98)	UPLC-QTRAP-MS	Szewczyk, Kuśmierska e Bernat (2018)
Untarget	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	CHCl ₃ :MeOH (2:1)	LC-QTOF-MS	Herman <i>et al.</i> (2017)
Target	<i>E. coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	MeOH (100%)	HPLC-MS/MS	Li e Zhu (2017)
Untarget	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MeOH:H ₂ O: CHCl ₃ (2,5:2,5:3,5)	CE-TOF-MS e LC-TOF-MS	Ortiz-Villanueva <i>et al.</i> (2017)
Untarget	<i>Clostridium difficile</i>	HS-SPME - 2 cm de DVB/CAR/PDMS	GC×GC-TOF-MS	Rees, Shen e Hill (2016)
Untarget	<i>Salmonella enterica serovar</i> <i>Typhimurium</i>	ACN:MeOH:H ₂ O (4:4:2)	LC-Orbitrap	Rempe <i>et al.</i> (2017)

Tabela 1 – Estudos metabolômicos realizados com diferentes tipos de microrganismos (continuação)

Abordagem	Espécie	Solvente de Extração	Instrumentação	Referência
Target/Untarget	<i>Streptomyces sp.</i>	EtOAc (100%)	HPLC-MS/MS e NMR	Shi <i>et al.</i> (2017)
Untarget	<i>Leishmania major</i>	HClO ₄ (1,8 mol L ⁻¹ e pH 6,8)	¹ H NMR	Arjmand <i>et al.</i> (2016)
Untarget	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>Streptococcus milleri</i>	HS-SPME 50/30 µm (DVB/CAR/PDMS)	GC×GC-TOF-MS	Nizio <i>et al.</i> (2016)
Untarget	<i>E. coli</i>	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (1:3:1)	HPLC-Q-Exactive Orbitrap	Vincent <i>et al.</i> (2016)
Untarget	<i>Leishmania amazonensis</i>	MeOH:H ₂ O (1:1)	CE-MS	Castilho-Martins <i>et al.</i> (2015)
Untarget	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H ₂ O: MeOH:ACN (1:2:2)	UHPLC-QTOF-MS	Lau <i>et al.</i> (2015)
Untarget	<i>Salinispora sp.</i>	EtOAc (100%)	UHPLC-QTOF-MS	Bose <i>et al.</i> (2014)

Tabela 1 – Estudos metabolômicos realizados com diferentes tipos de microrganismos (conclusão)

Abordagem	Espécie	Solvente de Extração	Instrumentação	Referência
<i>Untarget</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	MeOH; MeOH: CHCl ₃ (2:1); ACN:H ₂ O (1:1, 0,1% ácido fórmico)	UHPLC-QTOF-MS	Li <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: ACN: acetonitrila; CH₂Cl₂: diclorometano; CHCl₃: clorofórmio; EtOAc: acetato de etila; MeOH: metanol; HClO₄: ácido perclórico; HS: Headspace; SPME: solid phase microextraction; (DVB/CAR/PDMS): Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane); UHPLC: Ultra-high Performance Liquid Chromatography; HPLC: High Performance Liquid Chromatography; ¹H NMR: Proton Nuclear Magnetic Resonance; CE: Capillary Electrophoresis; GC×GC: two-dimensional gas chromatography; Q-TOF: quadrupole-Time-of-Flight; Q- Orbitrap: quadrupole-Orbitrap; Q-TRAP: quadrupole-ion Trap; sp.: espécie.

Um outro levantamento bibliográfico foi realizado, exclusivamente para a *B. abortus* envolvendo genômica, proteômica e metabolômica, para o período de 2000 até agosto de 2023 (PubMed, 2023). A busca foi realizada pelo estudo ômico desejado e a *B. abortus*, ambos os termos em inglês e entre aspas. De acordo com a Figura 4, observa-se que os estudos genômicos para a bactéria *B. abortus* são os que apresentaram maior volume de pesquisas nas áreas ômicas na última década, apresentando um pico em 2012, e seguindo com números significativos de publicações nos anos posteriores. O número de publicações referentes à proteômica é bem inferior quando comparado à genômica, mas tem sido expressivo nos últimos anos.

No período delimitado, apenas três publicações em metabolômica aplicada à *B. abortus* foram identificadas, duas no ano de 2021, uma sobre metabolômica global do sangue de camundongos infectados (Vu *et al.*, 2021), outra sobre metabolômica e proteômica para avaliação de biofilme de células planctônicas de *B. abortus* (Tang *et al.*, 2021). Em 2023, a única publicação foi sobre um protocolo de extração de metabólitos intracelulares da *B. abortus*, que é produto de uma etapa desta tese (Corrêa *et al.*, 2023). Esse outro levantamento corrobora com os dados evidenciados na Tabela 1 sobre a falta de estudos metabolômicos para *B. abortus*.

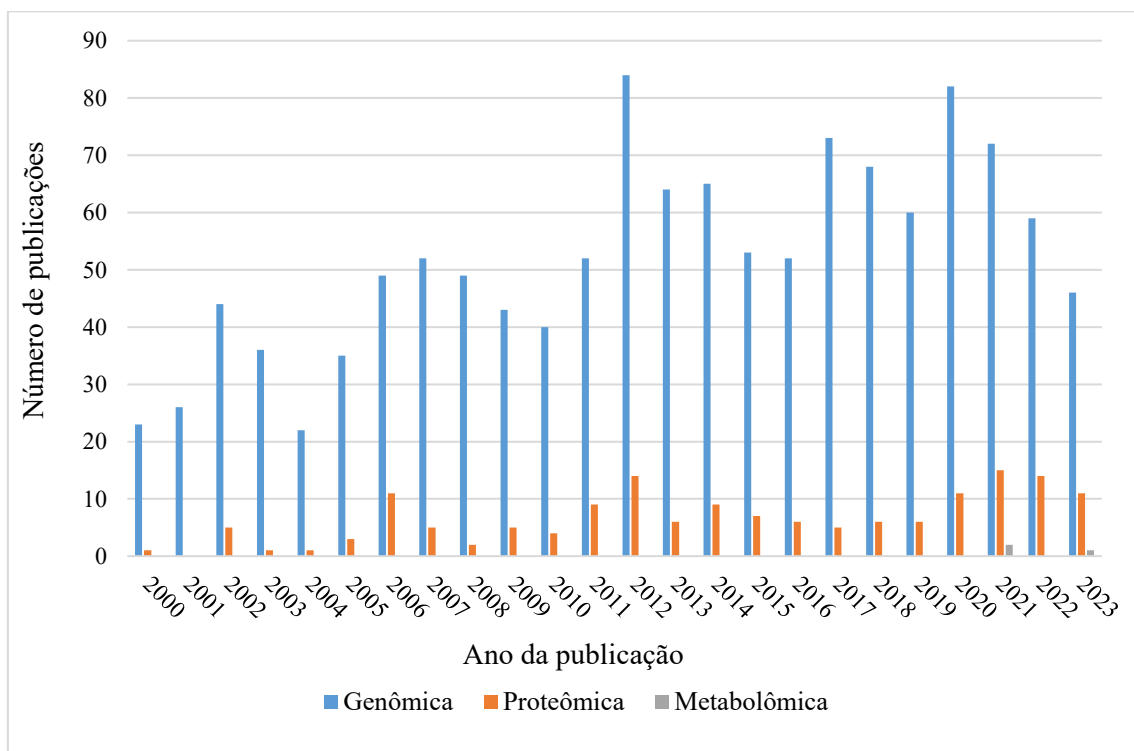


Figura 4 – Relação de publicações em genômica, proteômica e metabolômica aplicada à bactéria *B. abortus*

Fonte: Adaptada de PubMed (2023).

1.8 PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISES METABOLÔMICAS

Estudos metabolômicos de amostras biológicas têm sido muito explorados pelos pesquisadores para descoberta de biomarcadores que possam ajudar na compreensão de doenças, no tratamento e no diagnóstico precoce. As amostras biológicas (células, fluidos, saliva, soro, tecido, plantas, etc.) são complexas e possuem uma variedade de classes de metabólitos presentes em diferentes concentrações, tais como: ácidos carboxílicos, ácidos graxos, açúcares, álcoois, aminas, aminoácidos, bases nitrogenadas, carboidratos, drogas, esteroides, fosfolipídios, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, hormônios, lipídios, peptídeos, polióis, toxinas e outros (Belinato *et al.*, 2019; Canuto *et al.*, 2017; Fiehn, 2016; Gromski *et al.*, 2015; Hendriks *et al.*, 2011).

As pesquisas metabolômicas podem ser realizadas utilizando diferentes técnicas analíticas, sendo que muitos trabalhos utilizam uma combinação de várias técnicas (multiplataformas). A combinação de diferentes técnicas de separação e detecção permite medir diferentes concentrações e polaridades, assim, um maior número de classes de metabólitos é detectado, uma vez que cada plataforma possui seletividade e sensibilidade específicas. Dessa forma, é possível obter uma diversidade de dados que se complementam, contribuindo para uma interpretação mais acertada em resposta problemas biológicos levantados na pesquisa (Belinato *et al.*, 2020; Canuto *et al.*, 2018; Dudzik *et al.*, 2018; Ortiz-Villanueva *et al.*, 2017; Pilon *et al.*, 2020; Saric, *et al.*, 2012).

A espectroscopia no infravermelho (IR – *Infrared*), espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis – *Ultraviolet-Visible*), NMR e MS são técnicas de detecção aplicadas em estudos metabolômicos, sendo as duas últimas amplamente utilizadas (Frag *et al.*, 2022; Martens *et al.*, 2017; Pilon *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2019).

Para MS, ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e infusão direta (DI – *Direct Infusion*) têm sido usadas nos estudos metabolômicos e outras técnicas mais recentes como ionização evaporativa rápida (REI – *Rapid Evaporative Ionization*) e a espectrometria de massas por ionização por spray em papel (PSI – *Paper Spray Ionization*) que demandam pouco preparo de amostra. Estudos metabolômicos envolvendo técnicas metabolômicas espaciais, ou seja, imagem por espectrometria de massa (MSI – *Mass Spectrometry Imaging*) têm sido relatadas principalmente por MALDI-MSI e por ionização de dessorção por eletrospray (DESI-MS – *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*). As técnicas de separação, como

eletroforese capilar (CE – *Capillary Electrophoresis*), GC e LC, podem ser acopladas à MS para amenizar a supressão de íons, melhorar os sinais e permitir a detecção de um maior número de metabólitos. As medições nesses instrumentos podem apresentar alterações durante a análise, como: variações no tempo de retenção ou migração, desvio da linha de base, artefatos, ruídos, flutuações, entre outros que podem ocorrer durante a aquisição dos dados nos equipamentos. Desse modo, utilizar os QCs ao longo da análise permite avaliar essas alterações, sendo possível, por meio do padrão interno (PI), fazer a correção dos dados (Belinato *et al.*, 2019; Canuto *et al.*, 2017; Fiehn, 2016; Gromski *et al.*, 2015; He *et al.*, 2022; Hendriks *et al.*, 2011; Pilon *et al.*, 2020; Simionato; Santos; Hernandez, 2017).

Um levantamento foi realizado na plataforma Pubmed para verificar a distribuição das técnicas supracitadas em publicações de estudos metabolômicos nos últimos dez anos. Os 15.778 artigos retornados resultaram de buscas com os nomes em inglês de cada técnica de detecção mais a palavra *metabolomics*, ambas entre aspas. Como pode ser observado na Figura 5, LC e GC são responsáveis por cerca de 58,6%, e NMR por 33,0%, sendo as técnicas mais citadas.

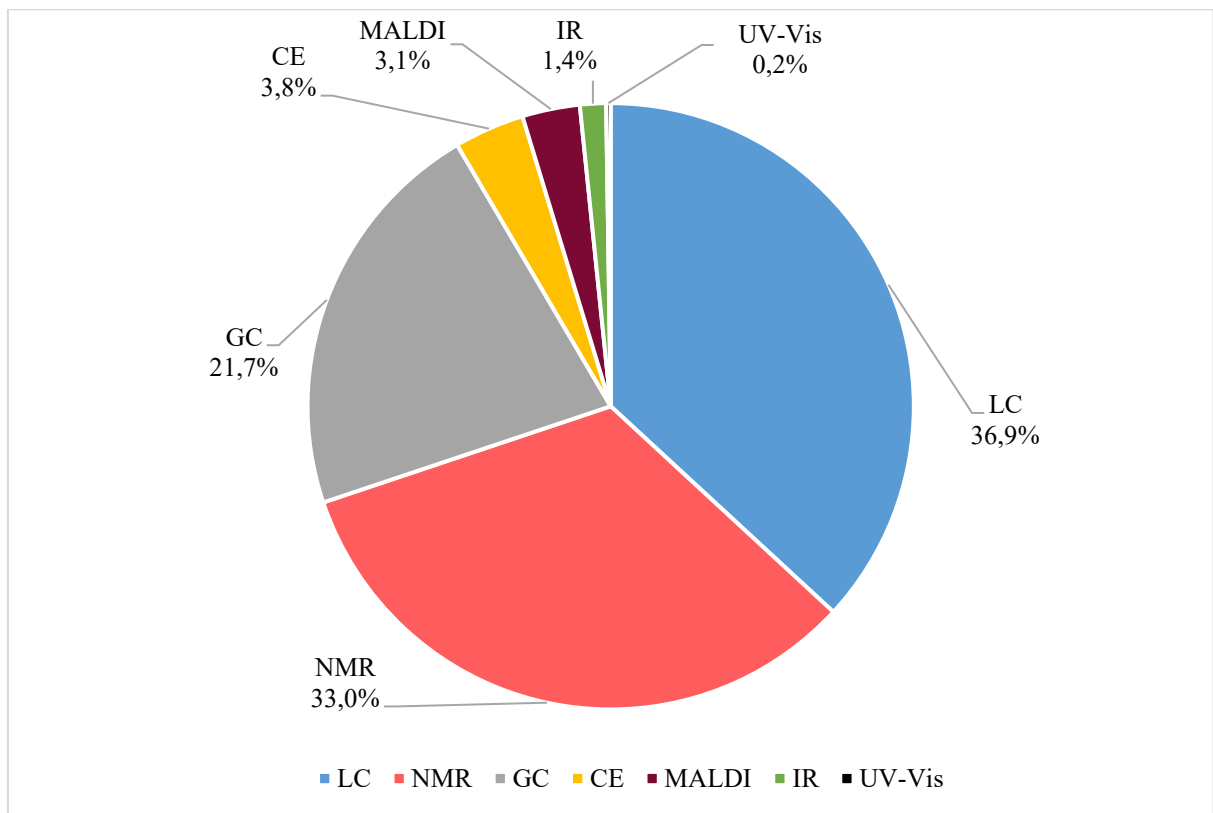


Figura 5 – Distribuição de algumas das técnicas instrumentais mais utilizadas em estudos metabolômicos nos últimos 10 anos

Fonte: Adaptada de PubMed (2023).

1.9 TRATAMENTO DOS DADOS EM METABOLÔMICA

Segundo Fiehn (2016), para se obter dados metabolômicos *untarget* com resultados de alta qualidade, um tempo muito superior, cerca de dez vezes mais, será consumido no pré-processamento e tratamento dos dados, se comparado ao gasto nos ensaios laboratoriais.

Diferentemente dos métodos tradicionais, os estudos metabolômicos com abordagem *untarget* geram, nas plataformas analíticas, um alto e complexo volume de dados que necessitam de um pré-processamento antes de realizar os estudos estatísticos (Tautenhahn; Bottcher; Neumann, 2008; Yang *et al.*, 2019).

O pré-processamento de dados é realizado para encontrar *molecular features* ou apenas *features* que são sinais bidimensionais, ou seja, com determinado tempo de retenção (t_R - *Retention Time*) e razão massa-carga (m/z) nas amostras. A extração dos íons (*features*) ocorre por meio de algoritmos específicos que são capazes de: a) filtrar o ruído, b) corrigir a linha de base, c) detectar os íons medidos (*Peak Picking*), d) desconvoluir sinais, e) alinhar os picos, f) corrigir o tempo de retenção, g) agrupar os picos, h) normalizar os sinais, i) preencher os picos ausentes e outros. Esse tratamento dos dados pode ser realizado em softwares de acesso livre ou comerciais, descritos na Tabela 2, e os algoritmos para tratamento podem variar significativamente, sendo que alguns programas juntam diferentes algoritmos em uma única função numa etapa do processamento (Borges *et al.*, 2022; Hendriks *et al.*, 2011; Lange *et al.*, 2008; Pilon *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2006; Tautenhahn; Bottcher; Neumann, 2008; Yang *et al.*, 2019).

Os trabalhos de Morales *et al.* (2017) e de Niu *et al.* (2014) compararam cinco e oito softwares, respectivamente, para tratamento dos dados, e observaram resultados diferentes para as mesmas amostras analisadas. Dessa forma, é importante realizar a otimização de alguns parâmetros para evitar falsos positivos, duplicidade ou supressão dos sinais.

Tabela 2 – Softwares de pré-processamento utilizados para tratamento de dados metabolômicos com os respectivos endereços eletrônicos e tipos de licença (continua)

Software	Endereço eletrônico	Licença
Compound Discoverer (Thermo Fisher)	https://www.thermofisher.com/	Comercial
GAVIN	https://www.researchgate.net/	Gratuita
Global Natural Products Network (GNPS)	https://gnps.ucsd.edu/	Gratuita

Tabela 2 – Softwares de pré-processamento utilizados para tratamento de dados metabolômicos com os respectivos endereços eletrônicos e tipos de licença (conclusão)

Software	Endereço eletrônico	Licença
Mass Profile Professional (MPP, Agilent)	https://www.agilent.com/	Comercial
MeltDB	https://meltdb.cebitec.uni-bielefeld.de/	Comercial
MetaboAnalyst	https://www.metaboanalyst.ca/	Gratuita
Metabolite Detector (Bruker)	http://metabolitedetector.tu-bs.de/	Comercial
MetaboScape	https://www.bruker.com/	Gratuita
MetAlign	https://www.wur.nl/	Gratuita
MET-IDEA	http://bioinfo.noble.org/	Gratuita
MetSign	http://metaopen.sourceforge.net/	Gratuita
MS-DIAL	http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html	Gratuita
MSFACTs	http://www.noble.org/	Gratuita
MultAlign	http://multalin.toulouse.inra.fr/	Gratuita
MZmine	https://sourceforge.net/	Gratuita
OpenMS	https://www.openms.de/	Gratuita
Profiling Solution (Shimadzu)	https://www.shimadzu.eu/	Comercial
Skyline	https://skyline.ms/project/home/begin.view	Gratuita
SpecArray	https://sourceforge.net/	Gratuita
SpectConnect	http://spectconnect.mit.edu/	Gratuita
Tag Finder	https://sourceforge.net/	Gratuita
XAlign	http://www.bionmr.ualberta.ca/	Gratuita
XCMS Online	https://xcmsonline.scripps.edu/	Gratuita
XCMS (desktop)	https://www.bioconductor.org/	Gratuita

Fonte: Adaptada de Belinato *et al.* (2019) e Lange *et al.* (2008).

Para trabalhar com a maioria dos softwares apresentados no Tabela 2, é necessária a conversão dos dados brutos obtidos nos equipamentos para arquivos de formato aberto que possam ser exportados para os programas. O programa gratuito MSConvert GUI (ProteoWizard), com codificação binária de 32 ou 64 *bit*, é um dos mais utilizados pelos pesquisadores, o qual utiliza o filtro *Peak Picking* na conversão dos dados brutos para diferentes formatos de saída, sendo *.mzML e *.mzXML os mais utilizados. No programa, também é possível aplicar alguns filtros, como *Scan Time* que permite delimitar a faixa de tempo, em segundos, dos dados de aquisição analítica (Holman; Tabb; Mallick, 2014).

A extração dos íons ocorre de forma independente em cada amostra. A Figura 6 ilustra como são realizados os seguintes algoritmos: a) *Peak Picking* faz a detecção de regiões de interesse (ROI-Regions of Interest) em que os sinais são encontrados, b) desconvolução para diferenciar íons coeluídos nas análises, de GC-MS e c) alinhamento dos picos. Esses processamentos são aplicados aos dados brutos para corrigir pequenas variações ocorridas durante a aquisição instrumental e diminuir a complexidade do conjunto amostral (Belinato *et al.*, 2019; Pilon *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2006; Tautenhahn; Bottcher; Neumann, 2008).

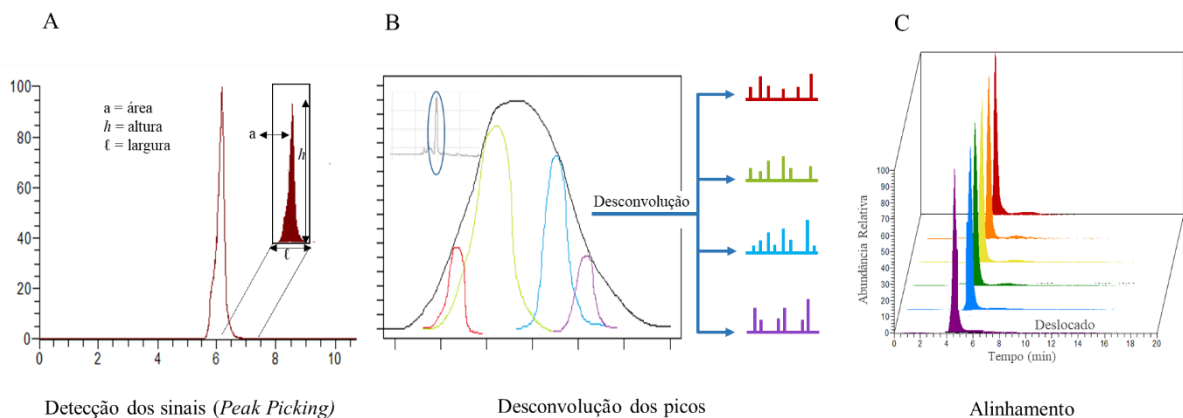


Figura 6 – Alguns algoritmos utilizados no processamento dos dados brutos nos estudos metabolômicos

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A) detecção dos sinais (*Peak Picking*), B) desconvolução e C) alinhamento dos picos.

Após o processamento, uma matriz de dados bidimensional é fornecida contendo informações dos *features* detectados e seus respectivos sinais medidos (intensidades ou áreas). Essa matriz contém dados metabolômicos em um formato que permite a realização do tratamento estatístico para determinar os metabólitos discriminantes entre os grupos estudados. Como os metabólitos são produtos finais de processos das outras ômicas, investigar o

metaboloma torna a abordagem metabolômica mais complexa que as demais ciências ômicas. Essa complexidade de dados, de alta dimensão, faz com que a etapa de tratamento estatístico seja um grande desafio e consuma muito tempo. Assim, a escolha por métodos estatísticos robustos capazes de extrair e identificar os metabólitos que apresentam alterações significantes entre as amostras é fundamental. Existem várias plataformas disponíveis de licenças gratuitas ou comerciais para análises estatísticas uni e multivariadas dos dados metabolômicos, algumas delas estão apresentadas no Tabela 3 (Gromski *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2009; Xia; Wishart, 2011).

Tabela 3 – Softwares de licenças comerciais e gratuitas utilizados para tratamento estatístico de dados metabolômicos com os respectivos endereços eletrônicos e tipos de licença

Software – Tratamento Estatístico	Endereço eletrônico	Licença
Compound Discoverer (Thermo Fisher)	https://www.thermofisher.com/	Comercial
Mass Profile Professional (MPP, Agilent)	https://www.agilent.com/	Comercial
MatLab	https://la.mathworks.com/	Comercial
MeltDB	https://meltdb.cebitec.uni-bielefeld.de/	Comercial
MetaboAnalyst	https://www.metaboanalyst.ca/	Gratuita
MetaP-server	https://www.helmholtz-muenchen.de/	Gratuita
MS-Excel	https://www.microsoft.com/	Comercial
Python	https://www.python.org/downloads/	Gratuita
R	https://cran.r-project.org/	Gratuita
SAS	https://www.sas.com/	Comercial
SigmaPlot	https://systatsoftware.com/	Comercial
SIMCA-P	https://www.sartorius.com/	Comercial
The Unscrambler X	https://software.com.br/p/the-unscrambler-x	Comercial

Fonte: Adaptada de Xia *et al.* (2009) e Xia e Wishart (2011).

Dentre os softwares para pré-processamento de dados metabolômicos, XCMS é um software de código aberto muito utilizado pela comunidade científica. A sigla do nome se refere a diferentes (X) cromatografias (C) acopladas à espectrometria de massas (MS). As etapas do pré-processamento são: 1^a) detecção dos picos, 2^a) agrupamento, 3^a) correção do tempo de retenção, 4^a) reagrupamento, 5^a) preenchimento dos picos ausentes, 6^a) exportação dos dados (Liu *et al.*, 2012, Smith *et al.*, 2006).

Na primeira etapa (detecção dos picos) avalia-se a faixa de tempo da análise e a faixa de massa dos picos cromatográficos. O algoritmo utilizado é o *xcmsSet*, que possui dois métodos de extração: *matchedFilter*, utilizado para dados obtidos por espectrometria de massas de baixa resolução, e *centWave*, indicado para alta resolução. Nessa etapa, os seguintes parâmetros são utilizados: desvio máximo tolerado em partes por milhão da razão m/z (ppm), limite de corte da razão sinal/ruído (*snthresh*), largura do pico cromatográfico (*peakwidth*), filtro de ruído (*noise*), diferença mínima de m/z de picos coeluídos (*mzdiff*), intensidade dos picos em certo número de *scans* (*prefilter*) e método de limites de pico (*integrate*).

Na segunda etapa (agrupamento), o algoritmo *group* utiliza o método *density* que detecta grupo de picos cromatográficos, encontrando regiões de alta densidade e identificando os picos com t_R semelhantes. Os parâmetros dessa etapa são: metade da largura do pico cromatográfico medida à meia altura (*bandwidth – bw*), utilizada para definir o intervalo de tempo de retenção para agrupamento dos picos; fração mínima de amostras necessárias para um grupo ser considerado válido (*minfrac*); largura das fatias de m/z (*slices*) sobrepostas (*mzwid*) e número máximo de grupos para identificar em uma única fatia m/z (*max*).

Na terceira etapa (correção do tempo de retenção) realiza-se um alinhamento dos dados, pois as amostras podem apresentar pequenas variações de t_R durante a corrida cromatográfica. O algoritmo *retcor* é aplicado e os dois métodos de alinhamento do tempo de retenção mais utilizados são: *peakgroups* e *obiwarp*. No caso do *obiwarp*, o agrupamento é aplicado somente após a etapa de correção do tempo, já para *peakgroups* um novo agrupamento é realizado (4^a etapa – reagrupamento). Os parâmetros dessa etapa são: modo de alinhamento (*smooth*) que pode ser linear e não linear (*Loess*); modificação do grau de suavização (*span*); ajuste gaussiano ou simétrico.

Na quinta etapa (preenchimento dos picos ausentes), o algoritmo *fillPeaks* é aplicado para substituir valores ausentes ou perdidos, durante a detecção dos picos, para manter a estrutura de dados. Esse preenchimento dos picos ausentes ocorre sem comprometer os dados, é realizado apenas para não ter uma matriz contendo muitas linhas e colunas zeradas. Por fim,

a matriz de dados é exportada utilizando o algoritmo *diffreport*. As etapas descritas acima estão apresentadas no fluxograma da Figura 7 (Di Guida *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2006; Tautenhahn; Bottcher; Neumann, 2008).

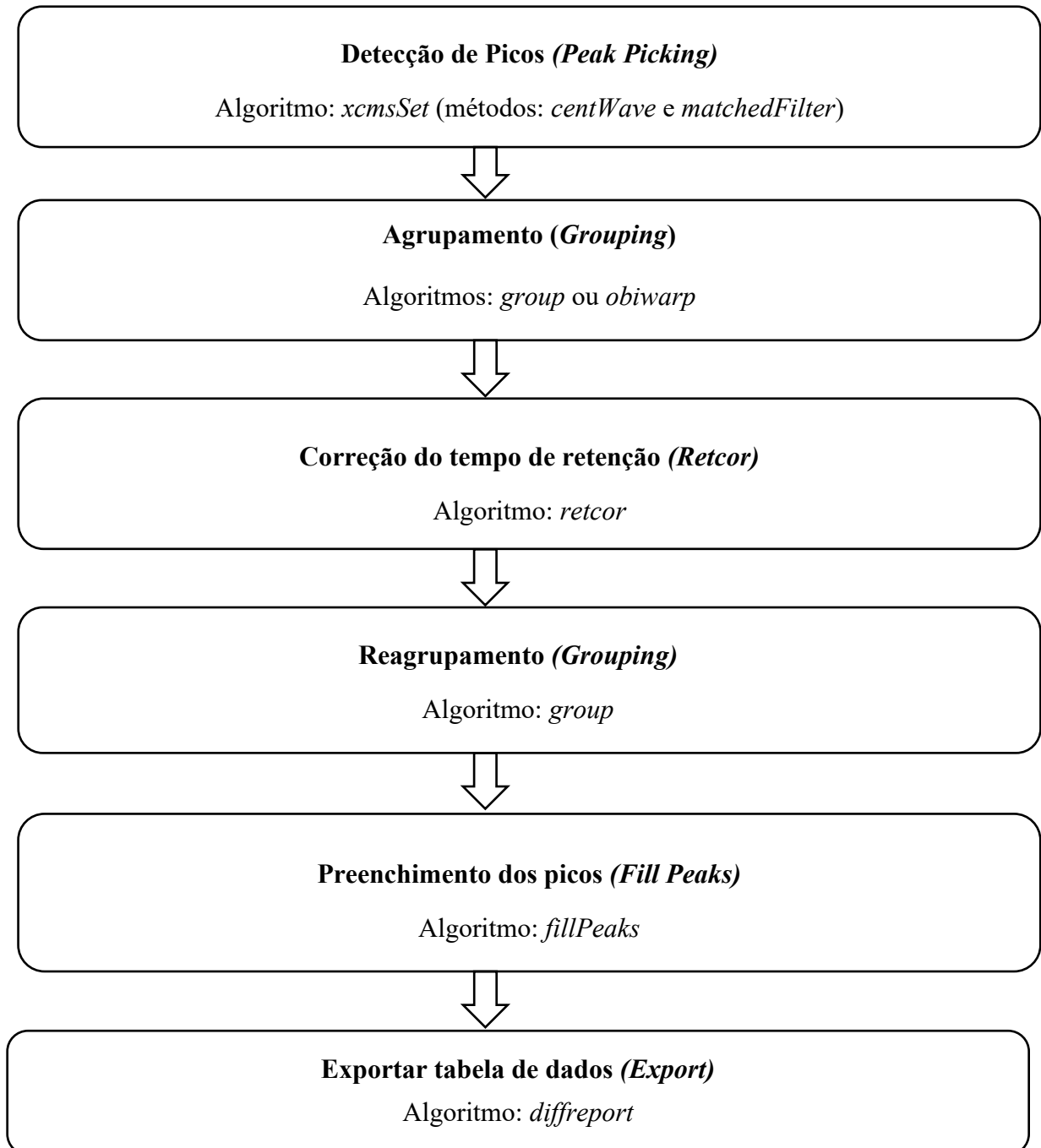


Figura 7 – Fluxograma das etapas do processamento dos dados no software XCMS e os algoritmos utilizados

Fonte: Elaborada pela autora.

Para tratamento estatístico dos dados, o MetaboAnalyst é uma plataforma muito utilizada, disponibilizada em 2009, inicialmente, por um único módulo para tratamento estatístico. Possui uma interface gráfica que foi produzida com a tecnologia *Java Server Faces* (JSF), de criação de aplicativos da *web*, e suas bases computacionais estatísticas e gráficas são executadas por pacotes *Bioconductor* e R instalados. Toda função utilizada dentro do MetaboAnalyst, função *Bioconductor*, é executada por meio de *scripts* no R que são registrados e disponibilizados para *download* ao final do processo (Chong *et al.*, 2018; Pang *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2015).

MetaboAnalyst 5.0 é a versão de atualização mais recente, composta por doze módulos, sendo o módulo *Statistical Analysis* para análises estatísticas uni e multivariadas. Os formatos de entrada são *.txt, ou *.csv, e os tipos de dados aceitos são intensidade ou áreas dos picos, concentrações (metabolômica *target*) e dados de espectros de NMR (*bins*). Após carregar a tabela de dados na plataforma, deve ser realizado um pré-processamento para verificar o padrão de distribuição amostral para, então, seguir com o tratamento estatístico metabolômico (Pang *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2009; Xia; Wishart, 2011).

A primeira etapa consiste em filtrar os dados obtidos no XCMS, ou qualquer outro software de pré-processamento (Tabela 2), para eliminar as alterações que não contribuirão na análise, por exemplo, ruídos de linha de base presentes no conjunto. Os filtros utilizados podem ser: desvio padrão relativo (RSD – *Relative Standard Deviation*), intervalo interquartil (IQR – *Interquartile Range*), desvio padrão (SD – *Standard Deviation*), desvio absoluto mediano (MAD – *Median Absolute Deviation*), RSD não paramétrico, média e mediana (Hackstadt; Hess, 2009).

A normalização é a etapa posterior composta por três categorias: normalização, transformação e escalonamento (Tabela 4), essas categorias possuem diferentes ajustes que podem ou não serem utilizados no conjunto de dados.

Tabela 4 – Alternativas para pré-tratamento dos dados metabolômicos no MetaboAnalyst

Categoria	Ajuste Aplicado	Objetivo
Normalização	Normalização específica da amostra (peso, volume, etc.)	Eliminar alterações sistemáticas.
	Normalização por soma	
	Normalização por mediana	
	Normalização por amostra de referência	
	Normalização por QC	
Transformação	Normalização por <i>feature</i>	Corrigir para heterocedasticidade.
	Transformação de log	
	Transformação da raiz cúbica	
Escalonamento	Centralização da média	Considerar as diferenças apresentadas e não as semelhanças dos dados.
	Autoescalonamento	Comparar os <i>features</i> com base em correlações, todos se tornam igualmente importantes.
	Escalonamento por Pareto	Proporcionar uma redução de importância dos picos mais intensos e aumentar os picos menos intensos que podem ter maior relevância biológica.
	Escalonamento de alcance	Comparar os <i>features</i> em relação à resposta biológica, todos se tornam igualmente importantes, está relacionado à biologia.

Fonte: Adaptada de van den Berg *et al.* (2006) e Pilon *et al.* (2020).

Aplicados os ajustes necessários, um gráfico é gerado para a verificação visual da distribuição dos dados, permitindo confirmar se os filtros selecionados foram adequados para o conjunto de amostras e, assim, iniciar os tratamentos uni e multivariados fornecidos na plataforma.

1.10 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS E INTERPRETAÇÃO BIOLÓGICA

Para identificação dos *features* discriminantes, são realizadas buscas utilizando o valor de m/z em bancos de dados públicos, tais como CEU Mass Mediator, MassBank of North America (MoNA), Human Metabolome Database (HMDB), PubChem, DrugBank, Metlin, LipidMaps, MassBank, entre outros. O espectro de fragmentação (MS^2) do *feature* pode ser utilizado para identificação em plataformas gratuitas como Competitive Fragmentation Modeling-ID (CFM-ID) e MetFrag, ambos com fragmentação *in silico*. Para interpretação biológica, são utilizadas plataformas como KEGG, BioCyc, MetaCyc, Reactome etc. Essas plataformas correlacionam o metabólito ou conjunto de metabólitos alterados a rotas metabólicas envolvidas (Allen *et al.*, 2016; Canuto *et al.*, 2018; Djoumbou-Feunang *et al.*, 2019; Ruttkies; Neumann; Posch, 2019; Wang *et al.*, 2021b).

A identificação de compostos possui cinco níveis de confiabilidade, de 0 a 4 (Tabela 5). Inicialmente, em 2007, o grupo de trabalho de Análise Química da Iniciativa de Padrões Metabolômicos (MSI – *Metabolites Standard Initiaves*) propôs os níveis de 1 a 4. Em 2017, essa escala foi aprimorada com a inclusão do nível 0 pelo grupo de trabalho de Identificação de Composto durante o encontro anual da Sociedade Metabolômica, realizado na cidade de Brisbane, Austrália (Blaženović *et al.*, 2018; Pilon *et al.*, 2020; Sumner *et al.*, 2007; Viant *et al.*, 2017).

Tabela 5 – Níveis de confiança de anotação de compostos utilizados em metabolômica

Nível de confiabilidade	Descrição	Exigência básica
0	Estrutura 3D inequívoca: composto puro e isolado com estereoquímica completa.	Conforme as diretrizes de produtos naturais, determinação de 3D.
1	Estrutura 2D confiável: correspondência com padrão de referência ou elucidação completa da estrutura 2D.	Pelo menos duas técnicas ortogonais que estruturam 2D com segurança, como MS ² e t _R ou CCS.
2	Estrutura provável: combinação com dados da literatura ou bancos de dados por evidências diagnósticas.	Informações de pelo menos duas partes ortogonais com evidências que excluem todos os outros candidatos.
3	Estrutura ou classe possível: estrutura mais provável com isômeros possíveis, classe de substância ou combinação de estrutura.	Um ou vários candidatos possíveis com pelo menos uma parte de informação de apoio ao candidato proposto.
4	<i>Feature</i> desconhecido de interesse.	Presença na amostra.

Fonte: Adaptada de Blaženović *et al.* (2018).

Legenda: CCS (*Collision Cross Section*).

Posteriormente, um estudo metabolômico *target* pode ser realizado, ou seja, um novo desenho experimental pode ser delineado, voltado para a análise quantitativa de uma ou mais classes de metabólitos, a partir dos resultados obtidos no estudo *untarget* que se mostrarem promissores para compreensão da questão biológica inicialmente proposta.

Neste contexto, a presente tese teve como objetivo determinar o perfil metabólico dos bvs da bactéria *B. abortus*, utilizando uma abordagem metabolômica *untarget* com multiplataformas analíticas, a fim de identificar potenciais diferenças metabólicas relacionadas ao fenótipo bacteriano e os metabólitos associados à ocorrência de brucelose.

CAPÍTULO 2

**ESTUDO PILOTO PARA OTIMIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO
PARA ANÁLISE METABOLÔMICA *UNTARGET* DE METABÓLITOS
INTRACELULARES DA *BRUCELLA ABORTUS* POR GC-HRMS**

2.1 INTRODUÇÃO

Estudar o metaboloma de organismos necessita de uma série de considerações práticas a serem executadas, pois trata-se de um sistema complexo e bem heterogêneo. O metaboloma microbiológico possui diversas classes químicas em diferentes concentrações, sendo que essa variação pode indicar uma alteração no metabolismo. Entender o mecanismo de ação permitirá avançar no entendimento de doenças e também dos patógenos, além de contribuir para o desenvolvimento e melhoria de tratamentos, prevenção e até mesmo diagnóstico precoce de doenças. Portanto, desenvolver um protocolo específico que possibilite a extração de metabólitos intracelulares de um determinado microrganismo é um passo importante para obter um conjunto de dados metabolômicos mais abrangente, confiável e que permita uma interpretação biológica de forma eficiente (Duportet *et al.*, 2012; Pappas *et al.*, 2006; Pinu *et al.*, 2019; Shin *et al.*, 2010; Vishnu *et al.*, 2017; Vu *et al.*, 2021). Desse modo, um estudo piloto para otimização de um protocolo para extração de metabólitos intracelulares da *B. abortus*, utilizando a plataforma analítica GC-HRMS (HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*), foi realizado e será discutido neste capítulo.

Neste capítulo será descrita a otimização das etapas de preparo, coleta e inativação das culturas bacterianas do gênero *Brucella*. Também será apresentada a otimização de um protocolo de extração de metabólitos intracelulares para análise por GC-QTOF-MS.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

Toda parte experimental foi desenvolvida nos laboratórios dos setores de Diagnóstico de Doenças Bacterianas (DDB) e de Resíduos e Contaminantes em Alimentos (RCA), pertencentes ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA/MG), localizado na cidade de Pedro Leopoldo.

2.2.1 Materiais e Equipamentos do Preparo de Amostra

Os materiais e equipamentos utilizados para o preparo das amostras bacterianas e extração dos metabólitos intracelulares estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6 – Relação e descrição dos materiais utilizados na presente pesquisa

Materiais/Equipamentos	Descrição
Agitador tipo vortex e acessórios	Labnet, modelo VX-200
Balança analítica	Shimadzu, modelo AUW220D, capacidade de 220 g e precisão de 0,01mg
Banho de ultrassom	Elma, linha P
Banho termostaticado	Yamato, modelo BT-25, faixa de 20 – 110 °C
Centrífuga com refrigeração	Thermo Fisher Scientific, modelo Megafuge 40R
Espectrofotômetro	Thermo Fisher Scientific, modelo Genesys 10 uv
Microcentrífuga	Yamato, modelo BT-25, faixa de 20 – 110 °C
SpeedVac	Labconco, modelo Acid-Resistant
Contêiner de congelamento	Mr. Frosty™, Thermo Scientific™
Criotubos esterilizados	Scientific Specialtes Inc., 2 mL, transparente
Preparo das cepas	Alças de coleta, alça de Drigalski, placas de Petri, <i>swab</i>
Cabine de Segurança Biológica Classe II, Tipo A2	Thermo Fisher Scientific, modelo 1300
Estufa de CO ₂	Biovera
Banho-maria	Fisher Scientific, Versa-Bath®, modelo 113

Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.2 Reagentes

Acetonitrila (ACN) (grau HPLC, Tedia, EUA), ácido clorídrico (37%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), cloridrato de *O*-metoxiamina (Sigma-Aldrich, Buchs, Suíça), cloreto de sódio (Synth, Diadema, Brasil), clorofórmio anidro (CHCl₃) (≥ 99%, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), etanol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), éter metil-*terc*-butílico (MTBE) (99,8%, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), isopropanol (grau HPLC, Honeywell, Charlotte, EUA), meio de cultivo triptose ágar (Difco) contendo 5 a 10% de soro bovino, metanol (MeOH) (grau MS, J.T.Baker, Allentown, EUA), *N*- Metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida ativada I

(MSTFA I) – (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), piridina ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), trifenilmetano (99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

2.2.3 Randomização dos Processos no Preparo de Amostras

A ordem para manipulação das amostras foi randomizada, utilizando a função de geração de números aleatórios do Excel (Microsoft Office), para garantir a aleatoriedade no processo de preparo. A randomização foi aplicada aos ensaios biológicos e químicos. Os ensaios biológicos foram preparados em triplicata biológica.

2.2.4 Otimização do Preparo de Amostras Bacterianas do Gênero *Brucella*

2.2.4.1 Crescimento das Unidades Formadoras de Colônias

Todo o preparo para cultivos das culturas bacterianas do gênero *Brucella* foi realizado em Cabine de Segurança Biológica Classe II, Tipo A2, no laboratório de biossegurança nível 3 (NB-3) do DDB. O estricto padrão de segurança e o treinamento oferecido à pesquisadora pelos colaboradores do LFDA/MG se devem à classificação dos agentes biológicos manipulados, classe de risco 3. Conforme a Portaria GM/MS nº 3.398, de 7 de dezembro de 2021, essa classe representa alto risco individual e moderado à comunidade (Brasil, 2021).

As culturas puras da bactéria *B. abortus*, obtidas da bacterioteca do LFDA, foram cuidadosamente espalhadas com auxílio de alça de Drigalski, esterilizada, nas superfícies das placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultivo enriquecido, triptose ágar (Difco) contendo 5 a 10% de soro bovino. As placas ficaram sob atmosfera de 5% de CO₂ e com temperatura controlada (37 °C). O desenvolvimento das colônias foi acompanhando a cada 24 h, durante cinco dias (Figura 8).



Figura 8 – UFCs desenvolvidas na Placa de Petri

Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.4.2 *Quenching*, Coleta e Lavagem das Amostras Bacterianas

Antes de iniciar a coleta, as placas de Petri, contendo as colônias crescidas, foram colocadas sobre gelo seco e mantidas refrigeradas para interromper a atividade enzimática (*quenching*) das bactérias.

O procedimento de coleta foi realizado raspando três alçadas do cultivo, as quais foram transferidas para um tubo criogênico (2 mL) contendo 1 mL de água ultrapura gelada (4 °C), utilizada para realizar a lavagem das amostras bacterianas, conforme Figura 9.

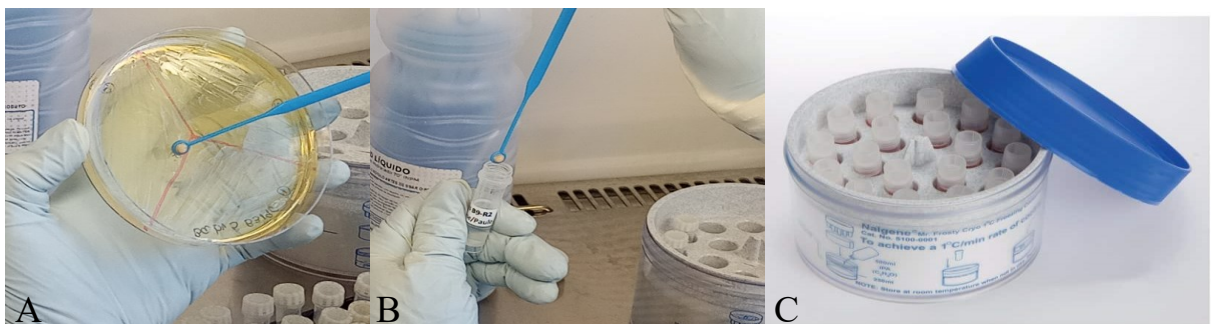


Figura 9 – A) Procedimento de coleta, B) Procedimento de lavagem em água gelada ultrapura, C) Contêiner de congelamento utilizado para armazenar as amostras

Fonte: Elaborada pela autora.

Essa suspensão bacteriana, de concentração aproximada de 10^{11} UFC mL⁻¹, foi agitada levemente por 5 s, com auxílio da própria alça de coleta, e centrifugada posteriormente a 7000 xg. A otimização para o tempo de sedimentação da biomassa em suspensão foi realizada avaliando os tempos de centrifugação de 1, 2 e 3 min. Após a sedimentação dos particulados bacterianos (*pellet*), conforme Figura 10, descartou-se cuidadosamente o sobrenadante.

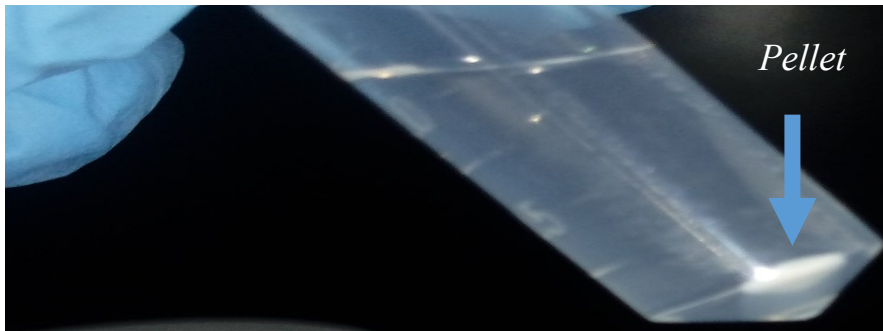


Figura 10 – *Pellet* sedimentado após centrifugação a 7000 xg

Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.4.3 Inativação Bacteriana

Um estudo de inativação bacteriana foi realizado testando duas soluções alcoólicas: (1) 70% v/v de álcool etílico e (2) 70% v/v de MeOH, ambas preparadas em água ultrapura. Foram também testados diferentes tempos de exposição das bactérias a essas soluções: (a) 0, (b) 15, (c) 30, (d) 60 e (e) 90 min, totalizando 10 ensaios, conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Soluções alcoólicas e tempos de exposição utilizadas em cada experimento no estudo de inativação bacteriana

Experimento	Solução de Inativação	Tempo de Exposição (min)
1a	Etanol 70% v/v	0
1b		15
1c		30
1d		60
1e		90
2a	Metanol 70% v/v	0
2b		15
2c		30
2d		60
2e		90

Fonte: Elaborada pela autora.

Para cada ensaio, três alçadas do cultivo (aproximadamente 10^{11} UFC) foram coletadas e transferidas para tubos criogênicos (2 mL) contendo 1 mL da solução alcoólica em estudo.

Em cada experimento, as bactérias permaneceram em contato com a solução nos tempos citados na Tabela 7, sendo posteriormente distribuídas nas placas com meio enriquecido (triptose ágar contendo 5 a 10% de soro bovino) e incubadas a 37 ± 2 °C, no período de 96 h, para verificar o desenvolvimento de colônias.

2.2.4.4 Determinação da Concentração

Após a inativação, realizou-se uma diluição seriada, para as suspensões mais densas, ou seja, com valor de densidade ótica (DO) superior a 0,4, seguida de análise espectrofotométrica para determinação da concentração bacteriana.

Inicialmente, três alçadas do cultivo foram raspadas das placas de Petri e transferidas para tubo criogênico (2 mL) contendo 1 mL da solução metanólica 70% v/v, conforme descrito na seção 2.2.4.2. Em seguida, a suspensão bacteriana inativada foi agitada levemente por 5 s em vortex, e 100 µL foram pipetados e transferidos para um tubo criogênico contendo 1,9 mL

de água ultrapura gelada (4 °C). A leitura da absorbância, que corresponde à DO, foi realizada nessa solução diluída em um espectrofotômetro, modelo Genesys 10 UV da Thermo Fisher Scientific. O comprimento de onda (λ) utilizado foi de 540 nm. O cálculo da concentração bacteriana utilizado para esse λ está indicado na Equação (1).

$$C = \frac{(A - 0,0357)}{1,3147 \times 10^{-10}} \times \text{FD} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde,

A = absorbância

C = concentração (UFC mL⁻¹)

FD = fator de diluição

Para leitura de DO superior a 0,4 foram realizadas novas diluições, pipetando 100 μ L da suspensão bacteriana, preparada na diluição anterior, e transferindo para um tubo criogênico contendo 1,9 mL de água ultrapura gelada (4 °C). Apenas uma etapa de diluição foi necessária, pois os valores obtidos foram inferiores a 0,5. O processo de diluição seriada descrito anteriormente está representado na Figura 11.

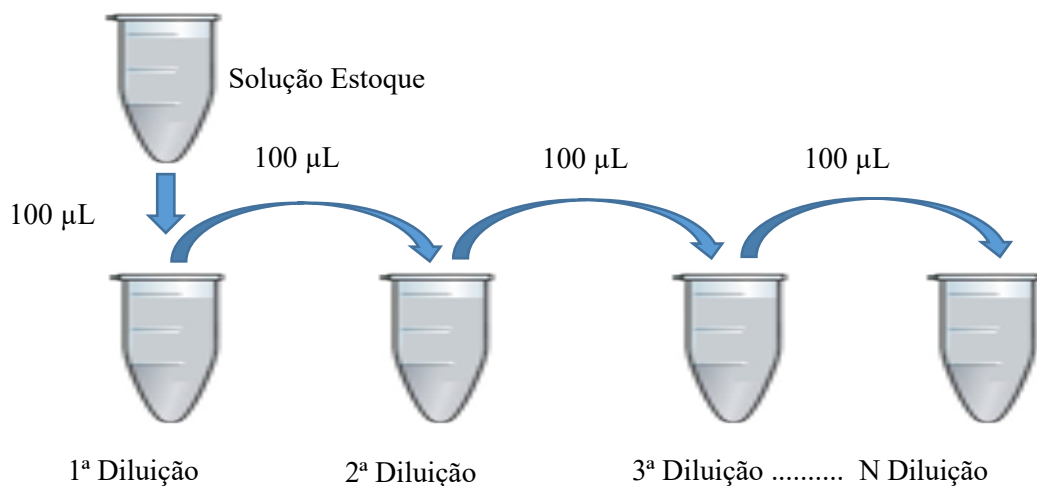


Figura 11 – Diluição seriada realizada a partir de 1 mL da suspensão bacteriana mais densa, ou seja, com valor de DO superior a 0,4

Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.4.5 Método Otimizado para o Preparo de Amostras Bacterianas do Gênero *Brucella*

O crescimento das bactérias depende das condições ambientais de cultivo. Desse modo, um protocolo de preparo de amostras bacterianas do gênero *Brucella* foi otimizado para estudo metabolômico. Esse protocolo consistiu em cinco etapas, conforme descrito a seguir:

- 1) Cultivo das UFCs: espalhar as culturas puras nas placas de Petri contendo meio de cultivo enriquecido, triptose ágar (Difco) contendo 5 a 10% de soro bovino. Usar um mesmo lote de meio de cultivo para preparar todas as placas do estudo.
- 2) Crescimento das UFCs: submeter as placas cultivadas à atmosfera controlada de 5% de CO₂ à 37 °C por 48 h.
- 3) *Quenching*, coleta e lavagem: colocar as placas de Petri sobre gelo seco, manter refrigerada até o início da coleta de três alçadas das UFCs, transferir as três alçadas coletadas para tubo criogênico estéril contendo 1 mL de água ultrapura gelada (4 °C), centrifugar a 7000 xg (durante 1 min) e descartar o sobrenadante.
- 4) Inativação bacteriana: adicionar 1 mL de solução metanólica 70% v/v gelada (-20 °C) e agitar suavemente por 5 s.
- 5) Contagem bacteriana: diluir 100 µL da suspensão bacteriana inativada anteriormente em 1,9 mL de água ultrapura, realizar a leitura da DO no espectrofotômetro em 540 nm e estimar a concentração da suspensão utilizando a Equação (1). Realizar diluição seriada, conforme descrição da Figura 11, para leituras de DO > 0,4.

Todo o processo de otimização foi realizado em triplicata biológica e foi realizada a coleta do meio de cultivo para elaboração dos brancos. O fluxograma desse protocolo otimizado está apresentado na Figura 12.

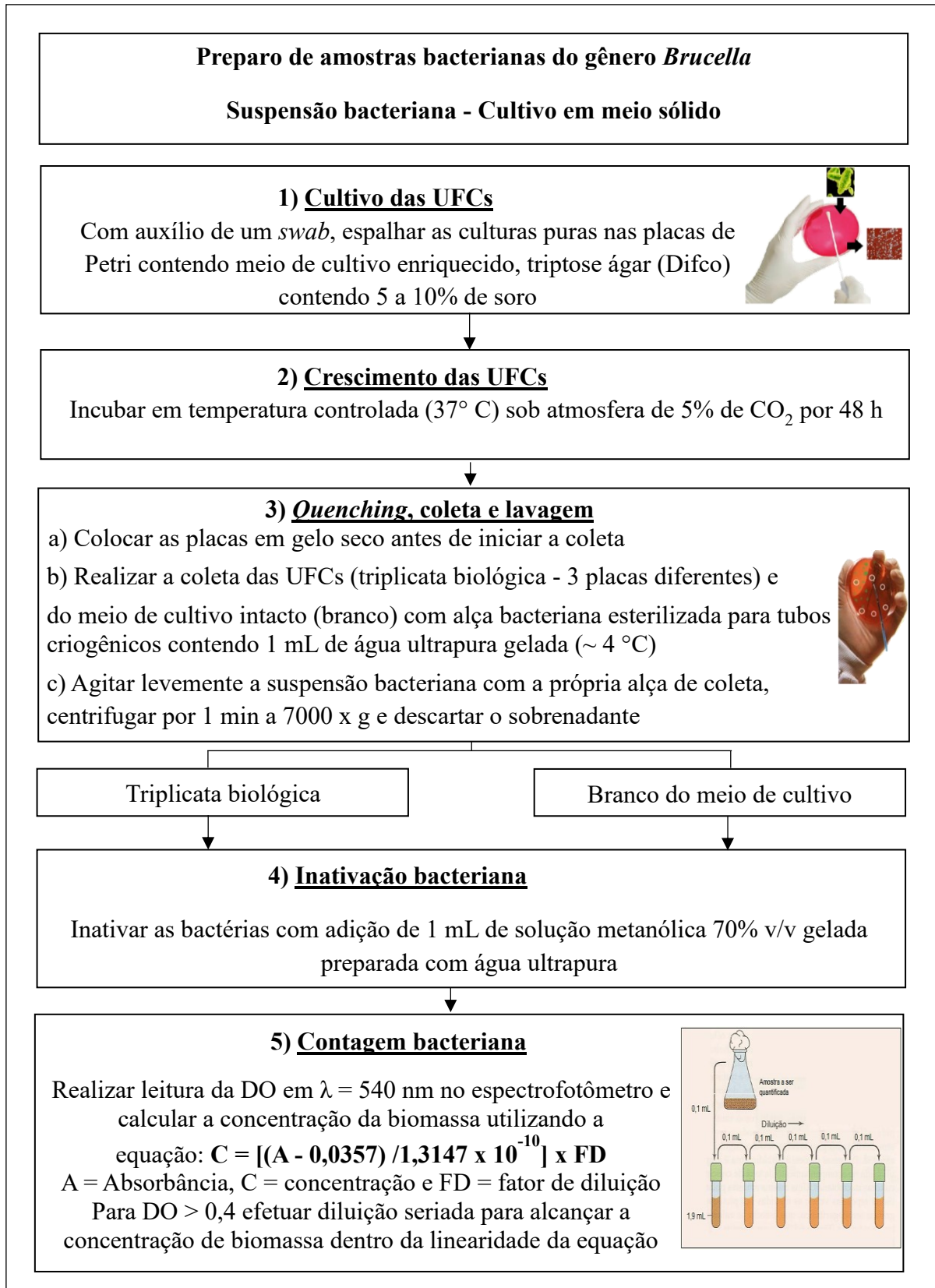


Figura 12 – Fluxograma do preparo de amostras bacterianas do gênero *Brucella* desenvolvido nessa pesquisa

Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.5 Otimização da Extração dos Metabólitos Intracelulares de *Brucella abortus*

Cinco diferentes métodos descritos na literatura foram adaptados e executados para otimização da extração dos metabólitos intracelulares das bactérias do gênero *Brucella*. Neste estudo piloto foram utilizadas amostras da bactéria *B. abortus* (B19).

Inicialmente, as triplicatas biológicas das soluções bacterianas de concentração 1×10^{11} UFC mL⁻¹, preparadas conforme fluxograma da Figura 12, foram diluídas em água ultrapura para concentração final de 6×10^9 UFC mL⁻¹. Dessa solução diluída, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos criogênicos previamente identificados. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 7000 xg, durante 10 min, a -10 °C, para sedimentação dos *pellets* e os sobrenadantes foram secos em evaporador centrífugo do tipo SpeedVac, em temperatura ambiente por aproximadamente 60 min. Os *pellets* secos foram submetidos aos métodos de extração em estudo, descritos nos fluxogramas apresentados nas Figuras 13 a 17. Os brancos de extração foram preparados replicando as etapas de extração sem a presença das bactérias para os métodos descritos a seguir.

O primeiro método (Método 1, M1) foi adaptado do protocolo de Fiehn (2016), cujo estudo foi feito com cultura celular na concentração de 10^7 células mL⁻¹. Nesse método, o solvente de extração utilizado foi uma solução de acetonitrila:isopropanol:água (3:3:2 v/v/v). A ruptura celular foi realizada através de agitação em banho ultrassônico, no qual foram adicionados cubos de gelo, por 1 min e em vortex durante 5 min. As etapas realizadas no método M1 estão detalhadas no fluxograma apresentado na Figura 13.

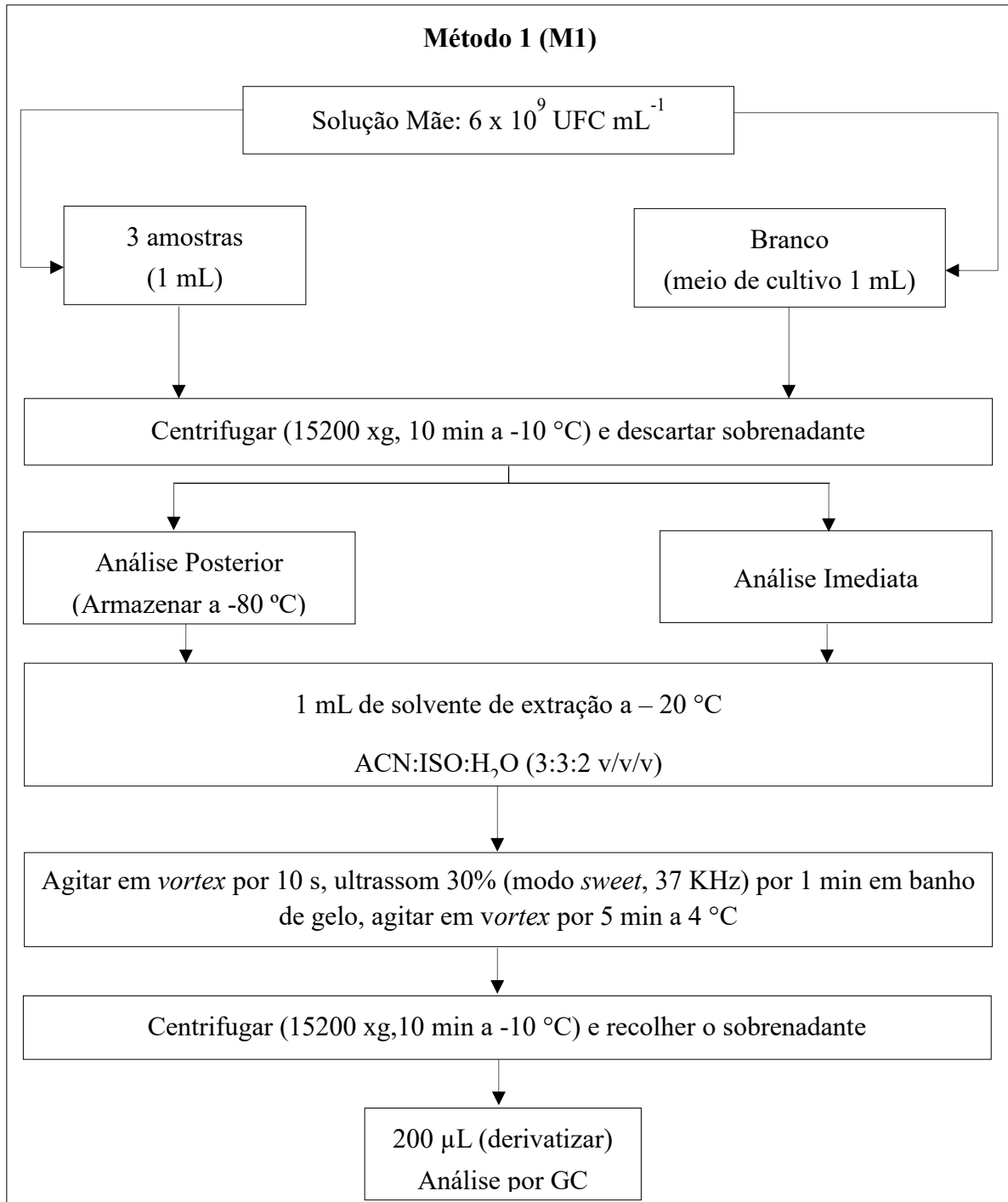


Figura 13 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M1

Fonte: Elaborada pela autora.

O fluxo de trabalho do segundo método (Método 2, M2) baseou-se no *Standard Operating Procedures* (SOP-6) de Goodacre *et al.* (2013), para células em suspensão na concentração de 2×10^6 células mL^{-1} . No M2, solução metanólica 80% v/v gelada ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) foi utilizada como solvente extrator. A extração intracelular foi realizada através de

duas sequências de três ciclos de congelamento/descongelamento em banho de nitrogênio líquido, com posterior coleta e armazenamento do sobrenadante. Todas as etapas executadas no M2 estão detalhadas no fluxograma de trabalho apresentado na Figura 14.

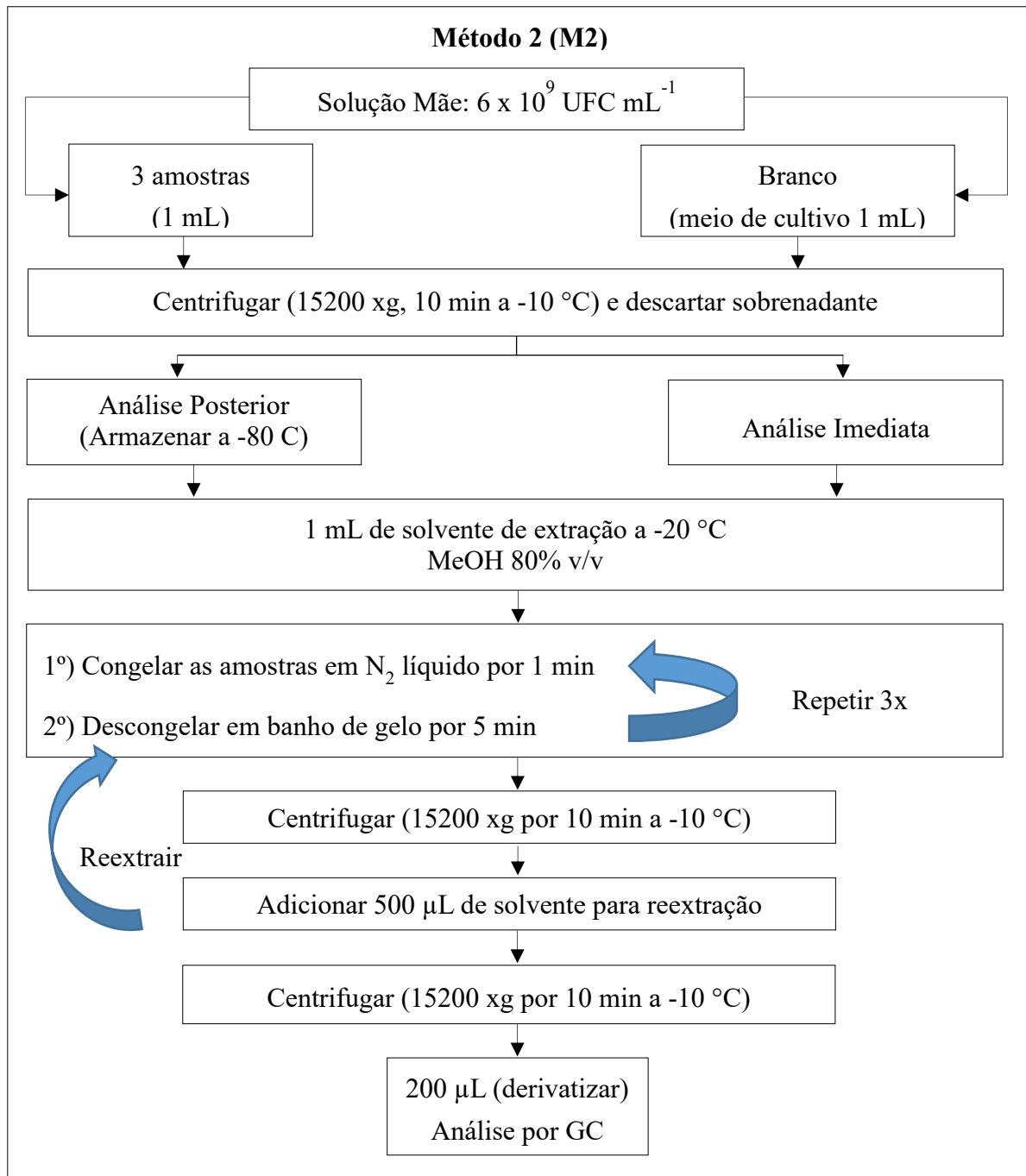


Figura 14 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M2

Fonte: Elaborada pela autora.

O terceiro método (Método 3, M3) foi baseado no trabalho de t'Kindt e colaboradores (2010), que trabalharam com a quantidade de 4×10^7 parasitas. No M3, o solvente de extração

utilizado foi metanol:água:clorofórmio (3:1:1 v/v/v) e a ruptura celular foi realizada por quatro ciclos de congelamento/descongelamento, intercalando agitação simultânea em vortex por 15 min durante as etapas de descongelamento. Todos os ensaios realizados no M3 estão detalhados no fluxograma apresentado na Figura 15.

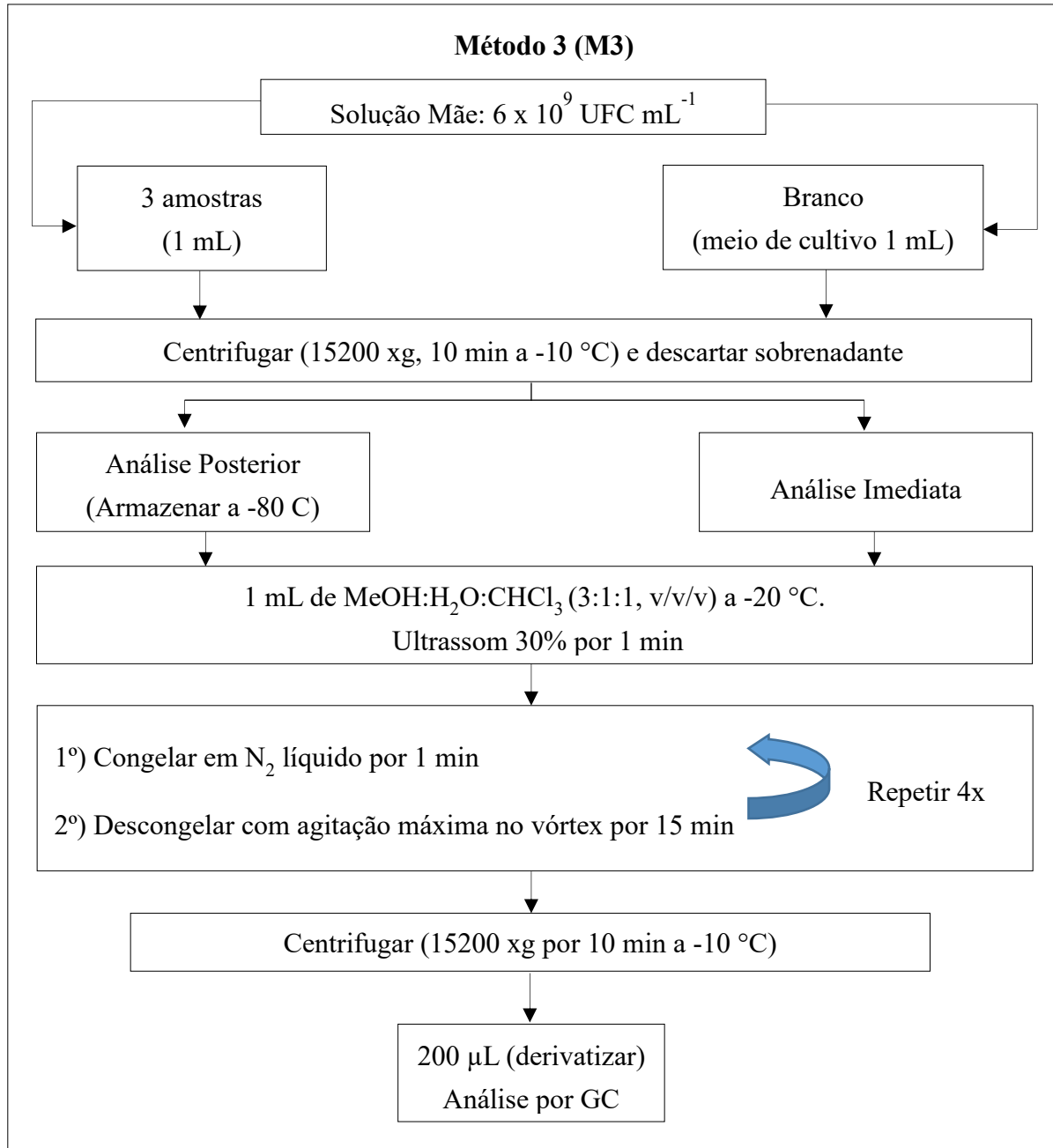


Figura 15 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M3

Fonte: Elaborada pela autora.

O quarto método (Método 4, M4) foi baseado no método de Matyash *et al.* (2008) para extração de $5,4 \times 10^{10}$ células, o solvente extrator utilizado foi metanol:éter metil terc-

butílico:água (10:3:2,5 v/v/v) com separação de duas fases: aquosa (Método 4a, M4a) e orgânica (Método 4o, M4o). Os procedimentos de extração do M4 estão detalhados no fluxograma apresentado na Figura 16.

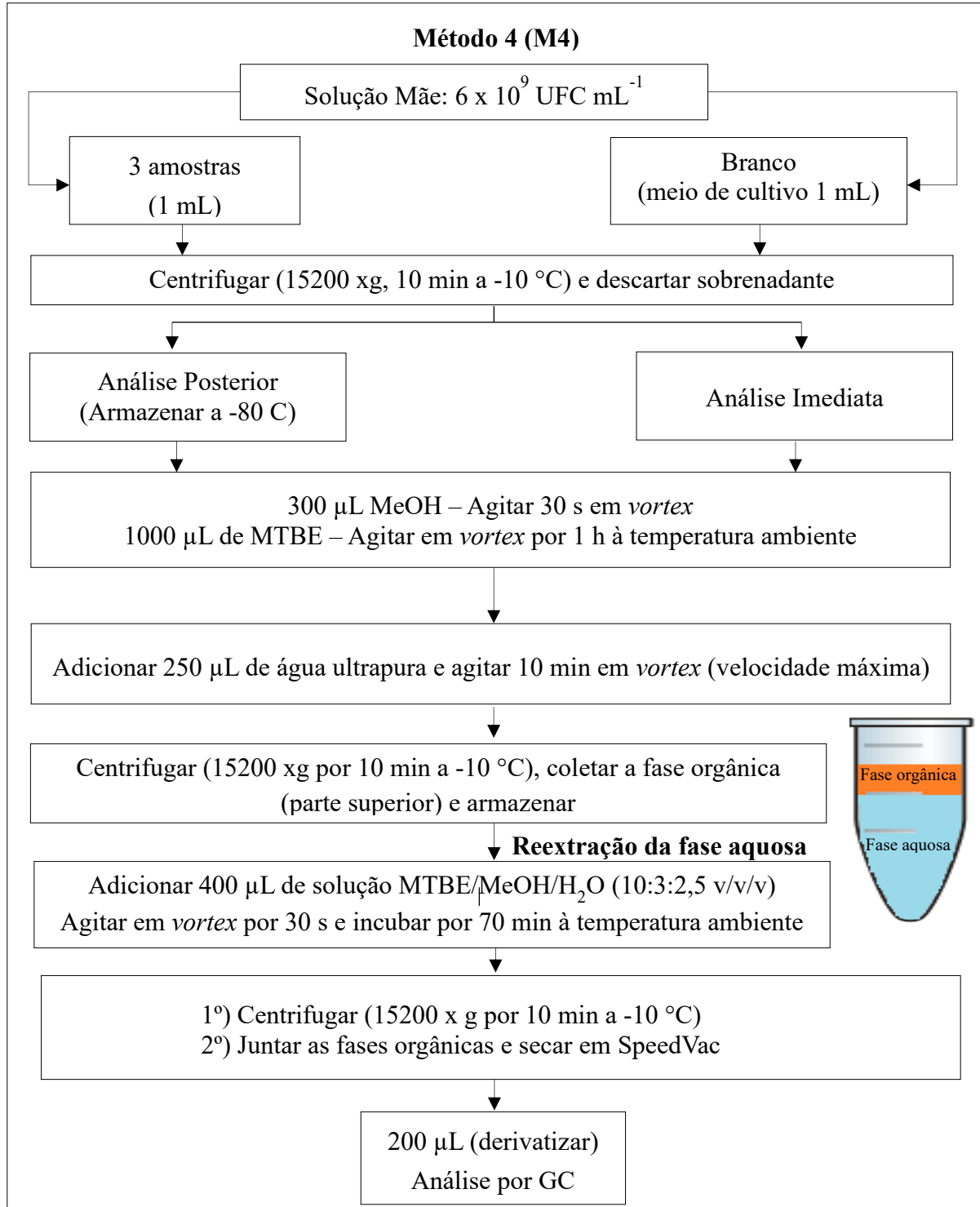


Figura 16 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M4

Fonte: Elaborada pela autora.

O Método 5 (M5) utilizou metanol:água:éter metil *terc*-butílico (3:1:1 v/v/v) como solvente extrator. O procedimento de extração foi similar ao utilizado no M3 e as etapas realizadas estão apresentadas na Figura 17.

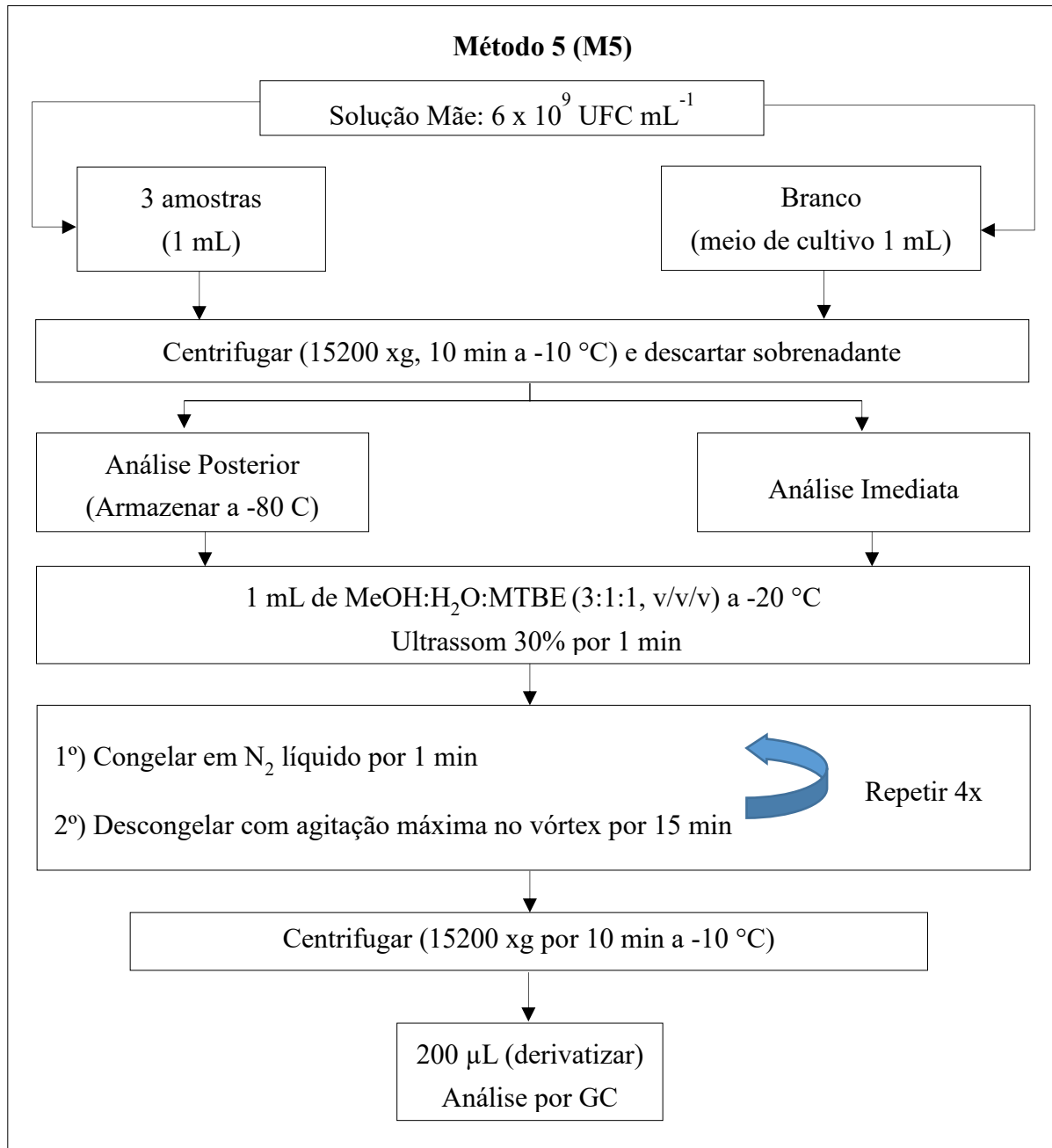


Figura 17 – Fluxograma de extração de metabólitos intracelulares – M5

Fonte: Elaborada pela autora.

Os solventes extratores utilizados nos estudos foram preparados no dia da extração e mantidos refrigerados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até sua adição às amostras. A etapa de agitação em *vortex* foi realizada utilizando um suporte de espuma para agitação simultânea de todas as amostras.

2.2.6 Procedimentos de Derivatização para Análise por GC-QTOF-MS

A etapa de derivatização é necessária para análise no GC-QTOF-MS (*Gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry*), pois permite ampliar a faixa de classes de compostos que podem ser detectados (Koek *et al.*, 2011). Assim, 200 μL de extrato foram adicionados aos *vials* âmbar, para evitar a fotodegradação dos compostos, e secos em SpeedVac, sem aquecimento, pois a água ou solventes próticos são incompatíveis com os reagentes de derivatização. Esses cuidados na execução dos procedimentos garantem uma derivatização mais completa (Agilent Technologies, 2013a).

2.2.6.1 Metoximação

Essa etapa deve ser realizada antes da sililação para proteção dos grupos carbonílicos nas cetoses e aldoses, além de evitar a formação de anéis de açúcares e obtenção de picos múltiplos (Liu *et al.*, 2011, Pasikanti; Ho; Chan, 2008). O processo de metoximação foi realizado adicionando 20 μL de *O*-metoxiamina em piridina ($10,18\text{ mg mL}^{-1}$) nos extratos secos. Em seguida, os *vials* foram agitados em *vortex* por 10 s, na velocidade máxima, e transferidos para um banho de ultrassom por 90 min protegidos da luz. A cada 15 min de ultrassom, os *vials* eram agitados em *vortex* simultaneamente, durante 30 s, e retornados ao banho ultrassônico. Este ciclo foi realizado 6 vezes. As condições de operação do ultrassom foram: frequência de 37 kHz, intensidade de 100%, modo *sweet* e temperatura controlada de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Canuto *et al.*, 2017; Fiehn, 2016).

2.2.6.2 Sililação

A derivatização por sililação é mais utilizada por ter maior versatilidade e por ser mais universal, diferentes reagentes são utilizados para uma cobertura mais abrangente. Assim, a derivatização utilizando o reagente MSTFA para conversão de moléculas polares em moléculas voláteis e termicamente estáveis, foi utilizada no presente estudo de abordagem *untarget*.

Após a etapa de metoximação, os *vials* foram resfriados até temperatura ambiente para evitar a perda de voláteis durante o procedimento de sililação. A estes *vials* foram adicionados 70 µL de MSTFA ativado I e 30 µL de piridina, seguido de agitação em *vortex* na velocidade máxima, por 10 s. Posteriormente, os *vials* foram mantidos no banho de ultrassom durante 30 min, a 40 °C e os demais modos operacionais do ultrassom foram similares aos utilizados na etapa de metoximação da seção 2.2.6.1 (Canuto *et al.*, 2017; Fiehn, 2016; Yi *et al.*, 2014).

2.2.7 Instrumentação e Condições Operacionais do sistema GC-QTOF-MS

Para detecção dos metabólitos intracelulares nos extratos bacterianos, foi utilizado um GC-QTOF-MS, modelo 7200B da Agilent Technologies. A separação dos compostos no GC foi realizada usando uma coluna capilar modelo Rtx-OPPesticides2 (Rtx-OPP2) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme, com uma composição de filme de 5% difenil/ 95% dimetilpolissiloxano (Restek, Bellefonte, EUA) localizada na saída do injetor. Essa coluna foi conectada a um capilar sem filme de 0,8 m x 0,10 mm, marca Agilent, para permitir aplicar a tecnologia de fluxo capilar (*Purged Ultimate Union*) para realização da retrolavagem (*backflushing*) ao final da separação. Hélio (99,99%) foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1 mL min⁻¹. Uma solução de 0,60 µg mL⁻¹ de trifenilmetano foi preparada em piridina para ser utilizada como PI, a fim de avaliar o desempenho do sistema ao longo das injeções. Além disso, a calibração interna do sistema MS (*MassCal*) foi realizada a cada cinco injeções, esse procedimento utiliza o calibrante perfluorotributilamina (PFTBA) e faz um número controlado de leituras para determinar a massa exata dos fragmentos na faixa de 69 a 614 *m/z* (Agilent Technology, 2013b). Em seguida, corrige a correlação para que as massas exatas médias fiquem o mais perto possível do menor erro de massas, garantindo a reprodutibilidade da alta resolução. A amostra foi injetada com velocidade de injeção de 25 µL min⁻¹, usando o amostrador automático no modo *Solvent Vent* com fluxo de purga *Split Vent* de 250 mL min⁻¹, 5 psi até 1 min. A injeção foi realizada no modo sanduíche (PI/ar/amostra), ou seja, numa mesma injeção foram aliquoteados 1 µL do PI trifenilmetano, seguido de 1 µL de ar e 5 µL do extrato derivatizado. As condições operacionais do sistema GC-QTOF-MS estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 – Condições utilizadas no GC-QTOF-MS para análise de metabólitos intracelulares

Cromatógrafo a gás	
Injetor	
Modo	<i>Solvente vent</i>
Volume de injeção	5 μ L
Temperatura	260 °C
Forno da coluna	
Coluna capilar 1	Rtx-OPP2 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)
Fase estacionária	5% difenil/95% dimetilpolisiloxano
Coluna auxiliar	Capilar Agilent (0,8 m x 0,10 mm)
Fase estacionária	Sem filme
Rampa de temperatura	40 °C por 1 min; 40 – 60 °C a 70 °C/min; 60 °C por 0,5 min; 60 – 170 °C a 40 °C/min; 170 – 290 °C a 10 °C/min; 290 °C por 10 min
Fase móvel	
Gás de arraste	Hélio
Vazão	1 mL min ⁻¹
Fluxo da purga <i>Split Vent</i>	60 mL min ⁻¹
<i>Vent</i>	250 mL min ⁻¹ , 5 psi até 1 min
<i>Backflush</i>	0,10 min
Espectrômetro de massas	
Modo de ionização	Ionização por elétrons
Energia de ionização	70 eV
Modo de aquisição	<i>Scan</i>
Faixa de aquisição	45 – 1000 <i>m/z</i>
Taxa de varredura	5 espectros/s
Resolução	25.000
Autotune	PFTBA
Tipo de analisador de massas	Tempo de voo
Voltagem do detector	1,3 kV
Temperatura da fonte de ionização	250 °C
Temperatura da interface	280 °C
Temperatura do quadrupolo	180 °C
Softwares	
<i>Conditioning e MassHunter B.07.00</i>	

Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.8 Processamento dos Dados

O fluxograma das etapas envolvidas no processamento de dados é apresentado na Figura 18. Inicialmente, os dados brutos obtido no equipamento (Figura 18A) foram convertidos para o formato *.mzXML utilizando o programa MSConvert GUI (Figura 18B), com codificação binária de 64 bit, e aplicando o filtro *Peak Picking* para reduzir o tamanho do arquivo de dados (Holman; Tabb; Mallick, 2014).

Os dados convertidos foram processados na plataforma XCMS Online (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) com parâmetros selecionados para dados de GC (Figura 18C) e otimizados utilizando o pacote IPO. Esse pacote foi baixado do repositório Bioconductor (<https://www.bioconductor.org>) e instalado no R, para ser utilizado, de forma complementar, nos dados de alta resolução (Libiseller *et al.*, 2015).

Após o tratamento, a tabela contendo as amostras dispostas em colunas (extensão *.csv), (Figura 18D) foi enviada para análise estatística dentro da plataforma online MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst>), conforme Figura 18E. Na plataforma, foi realizado um pré-tratamento dos dados para remover sinais não significativos (ruídos, linha de base, etc.) ou nulos. Em seguida, prosseguiu-se com as análises estatísticas multivariadas (Hackstadt; Hess, 2009; Xia *et al.*, 2009; Xia; Wishart, 2011).

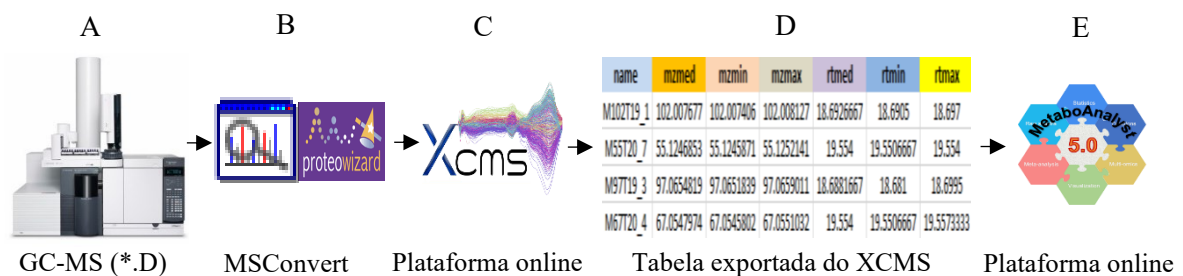


Figura 18 – Fluxograma do processamento de dados da plataforma GC-MS

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A) dados brutos gerados no GC-MS (formato *. D); B) conversão dos dados (*. mzXML) utilizando o programa MSConvert (Proteowizard); C) plataforma XCMS Online utilizada para processamento dos dados convertidos; D) tabela de dados gerada pelo XCMS; E) plataforma online MetaboAnalyst 5.0 utilizada para tratamento estatístico dos dados processados.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Otimização do Preparo de Amostras Bacterianas do Gênero *Brucella*

Em metabolômica, o preparo das amostras biológicas envolve muitas etapas críticas que podem afetar a qualidade dos dados. Sendo assim, é fundamental realizar um estudo piloto para avaliar as etapas envolvidas e padronizar os ensaios para alcançar uma pesquisa bem delineada, capaz de fornecer bons resultados (Canuto *et al.*, 2018; Villas-Bôas; Koulman; Lane, 2007).

Para elaboração do protocolo de preparo das amostras bacterianas do gênero *Brucella* foram otimizados: (a) tempo de crescimento das colônias; (b) quantidade de biomassa a ser coletada; (c) tempo para sedimentação da biomassa, realizado na etapa de lavagem para retirada do meio de cultura; (d) composição da solução e tempo de contato eficazes para a inativação bacteriana.

A primeira etapa otimizada foi o período de desenvolvimento e crescimento das colônias a partir de culturas puras, cultivadas em placas de Petri com meio de cultivo enriquecido. O desenvolvimento das colônias foi acompanhado visualmente a olho nu, durante 120 h, e o período de 48 h foi o que apresentou as UFCs com aspecto mais homogêneo e distribuição uniforme. Nessa etapa, é fundamental que todas as amostras sejam preparadas igualmente, para não ocorrer alterações metabólicas, devido ao tratamento diferenciado na execução do preparo. Assim, os mesmos lotes de materiais, dos reagentes para preparo das soluções e dos meios de cultivo foram utilizados para garantir maior homogeneidade das amostras.

Como o metabolismo é dinâmico e contínuo, antes de realizar a coleta, o procedimento de *quenching* foi realizado com gelo seco para inativar as enzimas e interromper a renovação dos metabólitos. O *quenching* garante a homogeneidade e estabilidade de todo o conjunto, já que representa o estado metabólico no momento da coleta (Canuto *et al.*, 2018; Doran *et al.*, 2017; Hernandez; Barbas; Dudzik, 2017).

O número de alçadas para coleta foi definido após avaliar os pesos das biomassas obtidos de uma, duas e de três alçadas de colônias coletadas das placas de cultivo e transferidas para tubos criogênicos contendo 1 mL de solução metanólica 70% v/v. Os pesos da biomassa foram 2,43 mg; 5,15 mg; e 10,06 mg para uma, duas e três alçadas, respectivamente. O número de três alçadas foi selecionado, pois forneceu uma massa aproximada de 10 mg que correspondeu a um peso de biomassa de células bacterianas suficiente para realizar os ensaios

químicos e ter uma reserva para realizar alguma repetição, pois a biomassa utilizada no presente estudo foi cerca de 5 mg como sugerido no protocolo de Freiwald e Sauer (2009).

Para retirar o meio de cultura e possíveis interferentes, as amostras coletadas foram lavadas com 1 mL de água ultrapura gelada (4 °C). Nesse procedimento, também foram avaliados os tempos de 1, 2 e 3 min para sedimentação da biomassa com centrifugação a 7000 xg após a lavagem. Os três tempos avaliados propiciaram boa sedimentação da biomassa, portanto, 1 min foi selecionado. As bactérias foram inativadas imediatamente à adição das soluções alcoólicas de 70% v/v. Desse modo, o tempo para inativação bacteriana (Tabela 7), selecionado foi de 0 s e ambas as soluções alcoólicas foram eficazes, assim, metanol foi selecionado para esta pesquisa por apresentar menor custo. Após a inativação, a concentração da suspensão bacteriana foi estimada através da DO em 540 nm (Equação 1). O protocolo otimizado para o preparo das culturas bacterianas do gênero *Brucella* aplicado a estudos metabolômicos está apresentado na Figura 12.

2.3.2 Verificação da Qualidade dos Dados Obtidos no Sistema GC-QTOF-MS

A qualidade dos dados adquiridos no sistema GC-QTOF-MS foi avaliada ao longo da sequência analítica usando a área de pico do PI trifenilmetano obtida em cada injeção. Um gráfico de controle de *Shewhart* (Figura 19) revelou uma distribuição aleatória das áreas de pico do PI em torno do valor médio, com todos os pontos ficando dentro dos limites aceitáveis recomendados por Gika *et al.* (2016), que se baseiam nas regras de *Westgard* (WESTGARD *et al.*, 1981). Os limites do gráfico foram construídos utilizando o desvio padrão (s), apenas dois pontos não consecutivos ultrapassaram o limite superior de alerta ($\bar{x} \pm 2s$), enquanto nenhum dos pontos atingiu o limite ($\bar{x} \pm 3s$). O perfil do gráfico indica uma estabilidade analítica em que o sistema GC-QTOF-MS estava operando de forma adequada, sem variações significativas ao longo das injeções.

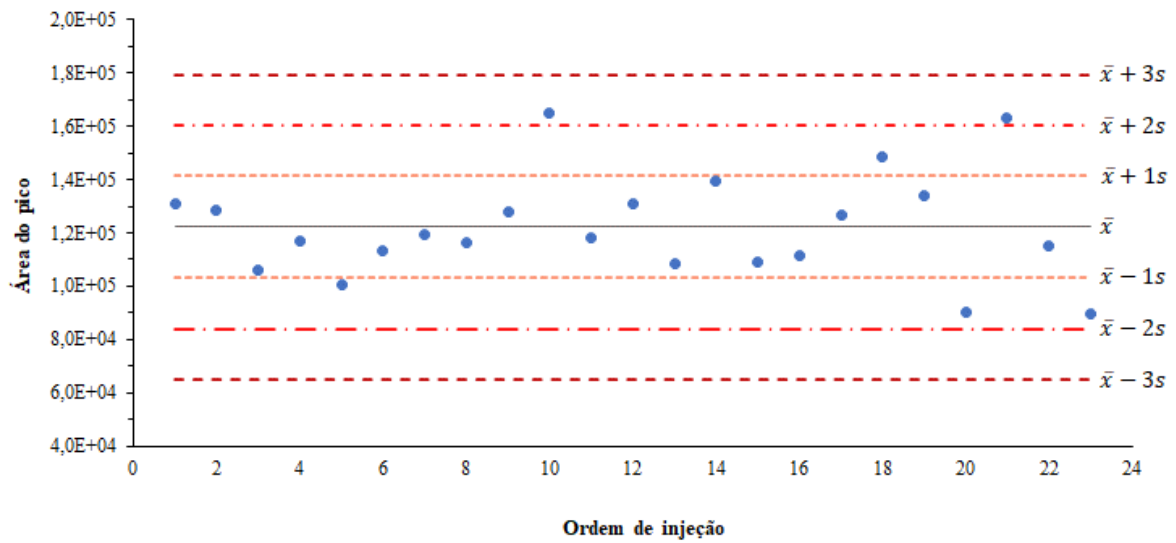


Figura 19 – Gráfico de controle de *Shewhart* utilizado para avaliar o desempenho do equipamento ao longo das injeções (eixo y) do PI trifenilmetano

Fonte: Elaborada pela autora.

2.3.3 Tratamentos dos Dados

2.3.3.1 Seleção dos Algoritmos e Parâmetros de Processamento dos Dados

As condições de processamento das amostras no XCMS foram otimizadas através do pacote IPO, que utiliza um planejamento experimental para otimização de cada parâmetro (Libiseller *et al.*, 2015). As etapas, bem como o método utilizado e os parâmetros otimizados são descritos na Tabela 9 e foram subsequentemente avaliados de forma individual, para confirmar sua adequação no tratamento dos dados do presente estudo.

Tabela 9 – Valores dos parâmetros otimizados em cada etapa do planejamento experimental realizado pelo IPO

Etapa	Método	Parâmetro*
Detecção dos Picos (<i>Peak Picking</i>)	<i>CentWave</i>	$mzdiff = 0,005$ $peakwidth = (4 \text{ a } 80 \text{ s})$ $ppm = 30$
	<i>Obiwarp</i>	$gapExtend = 2,1$ $gapInt = 0,8$ $profSep = 0,7$
Correção do Tempo de Retenção (<i>Retcor</i>)	<i>Peakgroups</i>	$bw = 1$ $minfrac = 0,8$ $mzdiff = 0,005$

Fonte: Elaborada pela autora.

* Todos os valores foram arredondados, exceto *peakwidth*.

A detecção dos picos (*Peak Picking*) é a primeira etapa do processamento, sendo o método *centWave* utilizado para dados obtidos em alta resolução de massas, como no GC-QTOF-MS. Nessa etapa, o algoritmo determina regiões de traços de massas ou ROI para detectar os picos cromatográficos presentes na amostra. Dessa forma, é importante avaliar a precisão do espectrômetro de massas (ppm) e a largura do pico (*peakwidth*). Os valores de erro de massa estimados pelo IPO foram 30 ppm e *peakwidth* na faixa de 4 a 80 s. Para uma comparação, foram avaliados os valores de 20 ppm e *peakwidth* na faixa de 5 a 20 s. O gráfico com menores desvios na correção do t_R foi na condição de 20 ppm e *peakwidth* na faixa de 5 a 20 s, sendo assim selecionados.

Em seguida foram avaliados os parâmetros *prefilter*, *sntresh* e *span*, que não foram avaliados durante o planejamento experimental realizado pelo IPO. Nessa etapa, observando os ruídos nos cromatogramas, optou-se por utilizar o valor de *prefilter* entre 3 e 1000, esse filtro descarta regiões de baixa intensidade. A relação sinal/ruído (*sntresh*) foi outro parâmetro avaliado, pois permite diferenciar os *features* de ruídos analíticos, bem como garantir que *features* de baixa intensidade sejam diferenciados e detectados pelo algoritmo *centWave*. O valor de *sntresh* igual a 6 (*default*) foi comparado com o valor de 3, sendo o valor de 3 escolhido para o processamento de dados de GC devido à grande quantidade de fragmentos gerados na ionização por elétrons e, assim, evitar perdas de informações significativas.

O alinhamento dos picos é realizado na etapa de correção do t_R , *Retcor*, na qual o método *obiwarp* (*default*) foi comparado com o método *peakgroups*, sendo o parâmetro *span* avaliado

nos valores 0,2 (*default*) e 0,5 para *peakgroups*. Como o XCMS apresentou erro durante a análise para *span* igual a 0,2, assim, o valor 0,5 foi selecionado para processamento utilizando o método *peakgroups*. Para *obiwarp* foram utilizados os parâmetros otimizados no IPO.

No agrupamento, o método utilizado foi *density* e o parâmetro estudado foi a largura da banda (*bw*) nos valores 1 (otimizado pelo IPO) e 5. Para o método *peakgroups*, selecionado na etapa de *Retcor*, dois agrupamentos foram realizados, um antes da correção do t_R e outro após a correção. Para o primeiro agrupamento foi utilizado um valor de 40 para *bw* (mais abrangente), e para o agrupamento após a correção do t_R foram avaliados os valores de 1 e 5, pois esse segundo agrupamento (reagrupamento), como os picos estão mais alinhados, é mais eficiente que o primeiro. O pico cromatográfico é delineado por esse parâmetro, portanto, a escolha correta do valor de *bw* pode influenciar na detecção correta do mesmo. A Figura 20 mostra a distribuição dos íons do PI (pontos coloridos), nas triplicatas de cada método, para os dois valores de *bw* estudados. O valor de *bw* igual a 1 (Figura 20A) otimizado pelo IPO foi selecionado por apresentar uma correta separação do PI no conjunto de dados. Observa-se em *bw* igual a 5 (Figura 20B) que, além do PI, o pico cromatográfico gerado selecionou outros íons com t_R próximos ao do PI, atribuindo inadequadamente o pico detectado ao composto investigado. Dessa forma, é importante verificar o parâmetro selecionado para não processar de forma errada e, assim, obter conclusões equivocadas por falta de ajustes durante o processamento dos dados. *Obiwarp* foi o método selecionado, para a etapa *Retcor*, por ter apresentado um menor desvio na correção dos t_R .

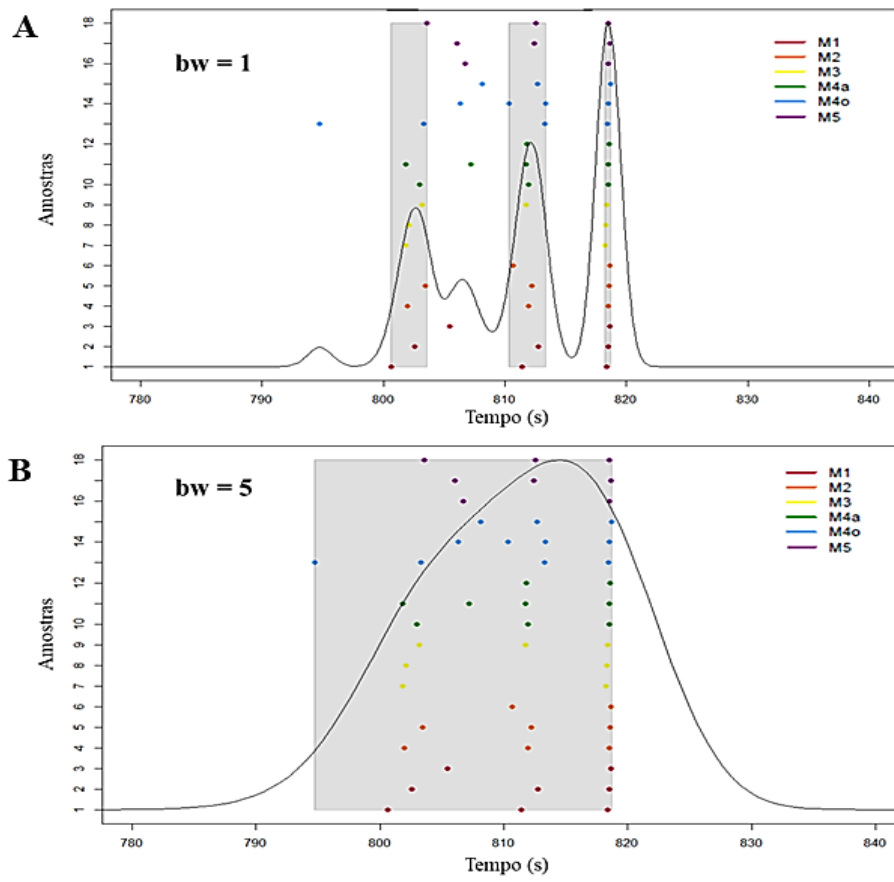


Figura 20 – Pico cromatográfico gerado para o PI nas triplicatas biológicas obtidos nos cinco métodos de extração avaliados

Fonte: XCMS (desktop) e programa R.

Legenda: A) $bw = 1$ e B) $bw = 5$.

Finalizado o reagrupamento, a etapa de preenchimento dos picos ausentes ou não detectados (*missing values*) foi efetuada. Nessa etapa, o algoritmo cria um novo pico a partir da integração dos sinais de todos os picos detectados no grupo de amostras que ele pertence (Gromski *et al.*, 2014).

Os parâmetros otimizados pelo IPO e manualmente durante o processamento dos dados de GC-MS no XCMS estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros utilizados no XCMS para processamento dos dados de GC-QTOF-MS

Etapas	Parâmetros
Detecção dos Picos (<i>Peak Picking</i>)	<i>sntresh</i> = 3 <i>ppm</i> = 20 <i>peakwidth</i> = (4* a 20 s) <i>mzdiff</i> = 0,005* <i>prefilter</i> = (3 a 1000)
Correção do Tempo de Retenção (<i>Retcor</i> , método <i>Obiwarn</i>)	<i>bw</i> = 40 <i>span</i> = 0,5
Reagrupamento (<i>Grouping</i>)	<i>bw</i> = 1* <i>mzwid</i> = 0,02*

Fonte: Elaborada pela autora.

* Valores otimizados utilizando o pacote IPO. Para os parâmetros não apresentados, foram utilizados os valores *default* do XCMS.

Vale ressaltar que os pacotes XCMS, IPO, entre outros que são disponibilizados para rodar dados de estudos metabolômicos (*big data*) no programa R consomem elevada memória do computador, portanto, apenas alguns dados dessa pesquisa foram processados no R para conferência, comparação e avaliação dos resultados obtidos (Tabela 9 e Figura 20). Os dados foram pré-processados na plataforma XCMS Online.

2.3.3.2 Otimização da Extração dos Metabólitos Intracelulares de *Brucella abortus* – Número de *Features* Extraídos e Repetibilidade

Os cromatogramas de íons totais (TICs – *Total Ion Chromatograms*) obtidos no GC-QTOF-MS, durante o estudo dos cinco procedimentos de extração de metabólitos intracelulares das bactérias do gênero *Brucella*, estão apresentados isoladamente na Figura 21. Apenas observando os TICs, não é possível concluir sobre a quantidade de compostos detectados, pois muitos compostos não ficam evidentes nesse tipo de cromatograma, além disso, no caso do GC-MS é comum ocorrer coeluição. O TIC da fração orgânica do M4o apresentou um perfil com menos picos indicando que a extração, provavelmente, foi menos eficiente. O M3 apresentou um cromatograma mais complexo que é um indicativo de que a extração foi a mais efetiva.



Figura 21 – TICs dos cinco métodos de extração nas análises por GC-QTOF-MS

Fonte: Elaborada pela autora.

Para selecionar um método de extração dentre os procedimentos estudados para plataforma analítica GC-QTOF-MS um sistema de pontuação foi proposto na Equação (2). Nele foram avaliados o número de *features* extraídos por cada método, bem como a repetibilidade da extração para a triplicata biológica. Esse sistema de pontuação atribuiu peso igual a 3 para *features* com RSD para área dos picos menor ou igual a 20% (G1), peso igual a 2 para *features* com RSD entre 20 e 30% (G2), e peso igual a -1 para *features* com RSD maior que 30% (G3). Essa divisão de pesos foi baseada na orientação de limite de 20% para dados de LC-MS, e de 30% para dados de GC-MS que sofrem maior variação devido à etapa de derivatização (Hackstadt; Hess, 2009). Portanto, o método com maior pontuação seria aquele com o maior número de *features* e os menores valores de RSD para as áreas desses picos. O número de *features* obtidos em cada método de extração avaliado, bem como a respectiva pontuação calculada, estão apresentados na Tabela 11.

$$\text{Pontuação} = (3 \times G1) + (2 \times G2) - G3$$

$$\text{Equação (2)}$$

Tabela 11 – Pontuação atribuída a cada método baseada nos valores de RSD dos *features* detectados nas triplicatas biológicas

Método	^a G1	^b G2	^c G3	Pontuação
M1	5531	2031	4670	15985
M2	5142	2320	4669	15397
M3	5339	2447	4446	16465
M4a	4887	2342	5003	14342
M4o	1047	993	10192	-5065
M5	3629	2389	6214	9451

Fonte: Elaborada pela autora.

^aG1 (grupo 1) representa o número de *features* com $RSD \leq 20\%$.

^bG2 (grupo 2) representa o número de *features* com $20\% < RSD \leq 30\%$.

^cG3 (grupo 3) representa o número de *features* com $RSD > 30\%$.

Outra avaliação foi realizada por meio da construção de um diagrama de Venn (Figura 22), recurso disponível na plataforma Bioinformática e Genômica Evolutiva (*Bioinformatics & Evolutionary Genomics* – <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), utilizando os *features* com RSD de área dos picos menor que 30% para cada método (ou seja, G1+G2). Neste diagrama é possível verificar o número de *features* que foram extraídos unicamente por um método. A fase orgânica do M4o não foi utilizada porque recebeu uma pontuação negativa de acordo com a Equação (2). Como pode ser visto na Tabela 9, o M3 obteve a maior pontuação e também foi a condição que extraiu o maior número de *features* únicos, ou seja, 470 (Figura 22). Ao contrário do M3, o M5 obteve a mais baixa pontuação, desconsiderando o M4o, e o menor número de *features* únicos, ou seja, 177 (Tabela 9 e Figura 22). Ambos os métodos, M3 e M5, utilizaram os mesmos processos físicos para rompimento da membrana celular, diferindo apenas na composição do solvente de extração. Portanto, a natureza do solvente de extração é o fator que explica a diferença na quantidade de *features* extraídos por esses dois métodos. O clorofórmio, usado no M3, tem um índice de polaridade maior (4,1) do que o MTBE (2,5), que foi usado no M5 (Lalman; Bagley, 2004). Além disso, o valor do coeficiente de partição do clorofórmio ($\log P = 1,97$) é praticamente o dobro do MTBE ($\log P = 0,94$) (Haynes, 2017). Assim, provavelmente, essas propriedades físico-químicas conferem as diferenças de seletividade entre os métodos de extração, garantindo ao clorofórmio maior poder de extração quando comparado ao MTBE (Cajka; Fihen, 2016; Duportet *et al.* 2012).

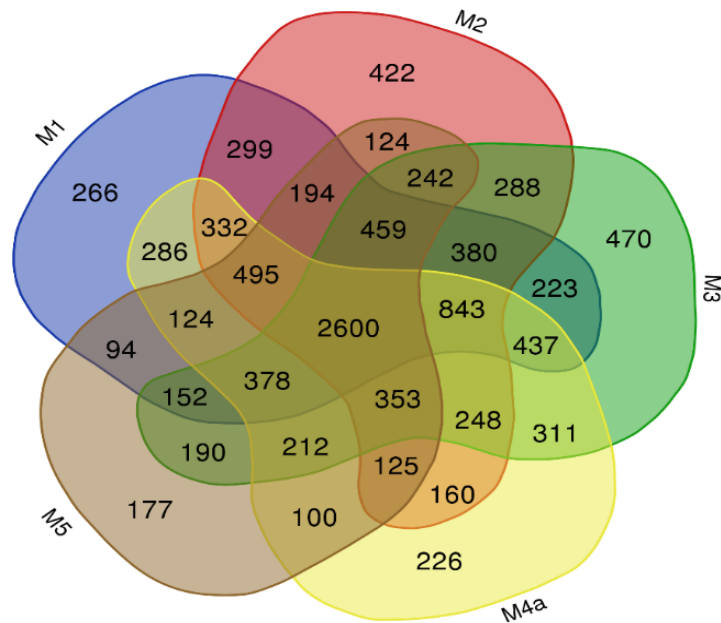


Figura 22 – Diagrama de Venn construído a partir dos *features* com RSD da área dos picos cromatográficos inferior a 30%, obtidos para os diferentes métodos de extração avaliados

Fonte: Bioinformática e Genômica Evolutiva.

2.3.3.3 Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamento Hierárquico

Para os *features* extraídos por cada método, foram realizados dois tratamentos estatísticos, utilizando análise multivariada não supervisionada: análise de componentes principais (PCA – *Principal component analysis*) e análise de agrupamento hierárquico (HCA – *Hierarchical cluster analysis*). Esses tratamentos foram realizados no MetaboAnalyst 5.0, no qual também foram realizadas as etapas de pré-processamento, incluindo filtragem de dados utilizando $RSD \leq 30\%$, normalização pela mediana, transformação pelo \log_{10} , para melhorar a distribuição dos dados, e escalonamento por Pareto. Esses filtros foram aplicados afim de se obter um conjunto de dados mais equilibrado dos metabólitos extraídos, evitando que compostos com concentrações mais baixas sejam ignorados (Knoll *et al.*, 2021; Shen; Zhu, 2019).

Pelo gráfico de *scores* (Figura 23A) é possível ter uma visão geral da distribuição dos métodos de extração, as componentes principais um e dois (PC1 e PC2) explicaram 56,9% da variação do sistema. O M3 foi claramente separado dos demais métodos pela PC2, mostrando um perfil consideravelmente diferente. O M4o mostrou a maior variabilidade para a triplicata, o que pode ser explicado pela dificuldade em coletar um pequeno volume de solvente extrator em um sistema bifásico. Uma redução de cinco vezes no volume coletado foi uma adaptação

feita em relação ao método original (Matyash *et al.*, 2008), a fim de utilizar o mesmo volume de extrato em todos os métodos avaliados.

Na HCA, um dendrograma foi gerado com base na distância euclidiana, que mede a similaridade entre as amostras e o algoritmo de agrupamento *ward.D*, assim grupos foram formados (*clusters*) de acordo com o grau de similaridade entre as amostras. O resultado do agrupamento (Figura 23B), na distância euclidiana de 60, mostra uma subdivisão do conjunto de dados em quatro grandes agrupamentos. O grupo **a** compreendeu as réplicas 01 e 03 de M4o; o grupo **b** agrupou a triplicata do M3; o grupo **c** foi formado pela triplicata do M5 e pela réplica 02 de M4o; e o grupo **d** incluiu todas as repetições dos métodos 1, 2 e 4a. Portanto, a separação entre os métodos observada no gráfico de scores da PCA foi consistente com a distribuição das amostras na HCA. Ao observar o agrupamento da triplicata biológica de cada método de extração, observa-se que apenas M3, M4a e M5 tiveram suas triplicatas agrupadas; as amostras de M1 e M2 foram intercaladas entre si, e as replicatas do M4o ficaram bastante dispersas no dendrograma. Entretanto, o M3 foi o único que agrupou todas as suas triplicatas sem a presença de amostras de outros métodos (grupo **b**), evidenciando uma diferenciação na extração em relação aos demais e uma boa repetibilidade dos ensaios realizados.

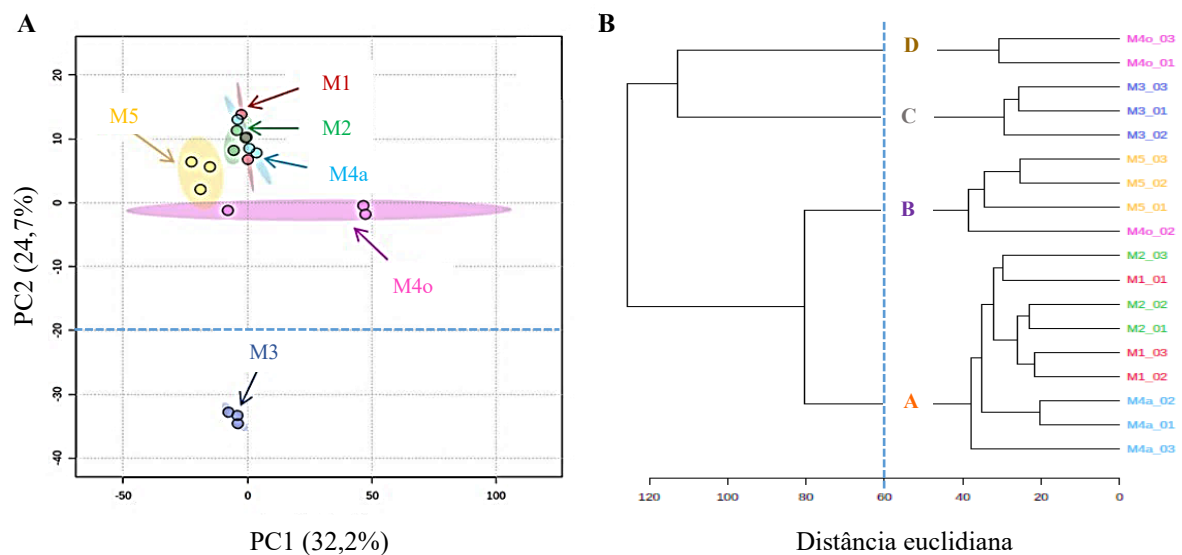


Figura 23 – A) Gráfico de escores da PC1 *versus* PC2 para os métodos de extração avaliados, em que as elipses representam o intervalo de confiança de 95% ($n = 3$). B) Dendrograma gerado na HCA, com base na distância euclidiana e no algoritmo de agrupamento *ward.D*, utilizando as triplicatas biológicas de cada método

Fonte: MetaboAnalyst 5.0.

Portanto, a mistura de solventes composta por metanol:água:clorofórmio (3:1:1 v/v/v) foi a mais eficiente para extração de metabólitos intracelulares das células de *B. abortus*. A maior eficiência de extração obtida para a mistura contendo clorofórmio (M3), deve-se provavelmente a sua maior polaridade e maior coeficiente de partição, quando comparado ao MTBE (M5). Assim, essa condição foi adotada para a extração de metabólitos intracelulares das espécies da bactéria do gênero *Brucella* para análise metabolômica *untarget* por GC-HRMS.

2.3.2.4 Classes de Metabólitos Extraídos

Os *features* com RSD das áreas dos picos cromatográficos inferiores a 30% foram tratadas no software Unknowns Analysis (Agilent Technologies), para identificação dos *features* com pontuação mínima de correspondência espectral de 70% ao usar a biblioteca NIST (versão 17.L). A pesquisa espectral revelou a presença de alguns *features* com relevância biológica conhecida, que podem auxiliar na compreensão do ciclo infeccioso da brucelose. Treze metabólitos representativos de quatro classes (ácidos graxos, glicerídeos, carboidratos e compostos aromáticos) foram identificados. A Figura 24 apresenta as áreas de picos desses metabólitos identificados e o respectivo desvio padrão da triplicata biológica para cada método de extração estudado.

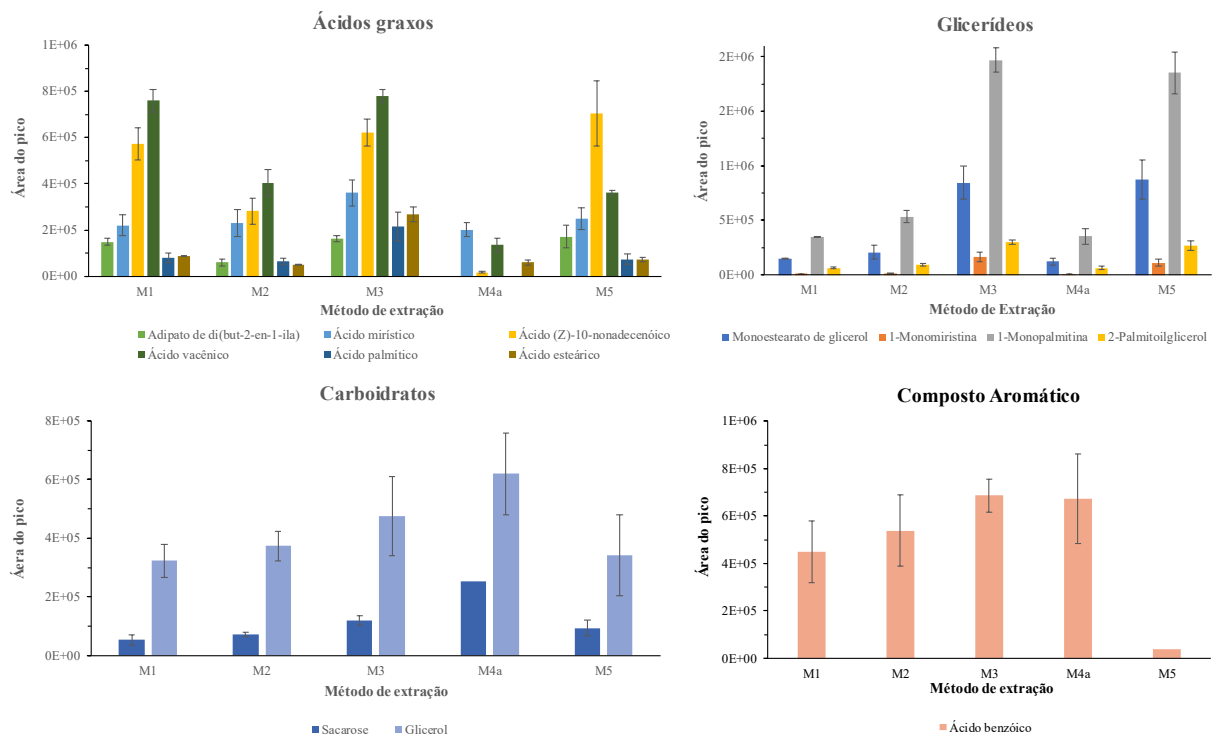


Figura 24 – Comparação das áreas de pico obtidas para os metabólitos extraídos para as quatro classes: ácidos graxos, glicerídeos, carboidratos e compostos aromáticos

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: As barras de erro indicam o desvio padrão da área média de triplicatas biológicas.

Para as quatro classes de metabólitos identificados, os ácidos graxos de cadeia longa (Figura 24) foram os que tiveram o maior número de compostos extraídos, dentre os quais o ácido (Z)-10-nonadecênico e o ácido vacênico foram os metabólitos com áreas de pico mais intensas. Todos os métodos foram capazes de extrair ácidos graxos, mas o M3 apresentou melhor desempenho para os seis metabólitos identificados nesta classe. Vale destacar que o ácido vacênico (C18:1, ácido 11-octadecênico, $C_{18}H_{34}O_2$) foi relatado em culturas de *B. abortus* e *B. melitensis* (Thiele; Lacave; Asselineau, 1969); enquanto o ácido (Z)-10-nonadecênico (C19:1, $C_{19}H_{36}O_2$), embora não relatado anteriormente em *Brucella*, foi encontrado em outras bactérias Gram-negativas, como *Salmonella* (Zhang *et al.*, 2014). Os ácidos mirístico, palmítico e esteárico são outros ácidos graxos de cadeia longa que estão presentes em vários organismos, incluindo *Brucella* e/ou outras bactérias (Thiele; Lacave; Asselineau, 1969; Li *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 1979). Os glicerídeos, mais especificamente os monoacilgliceróis, foram a segunda classe com maior número de metabólitos extraídos (Figura 24). Segundo Knoll *et al.*, os triacilgliceróis presentes na parede celular bacteriana podem ser metabolizados durante a transição induzida pelo estresse para a fase não replicada e

durante a infecção. Assim, alterações nos níveis de monoacilgliceróis, como 1-monomiristina e 2-monopalmitina, podem indicar alterações no envelope celular por meio das vias de glicerolipídios e triacilgliceróis (Knoll *et al.*, 2021). Os métodos M3 e M5 apresentaram melhores performances para a extração dos glicerídeos, sendo a 1-monopalmitina, o metabólito que obteve maior área do pico cromatográfico para esta classe. Para a classe dos carboidratos, formada por sacarose e glicerol, maiores áreas para os picos dos metabólitos foram obtidas para o M4a, seguido do M3 (Figura 24). O glicerol é um substrato importante para a biossíntese de fosfolipídios em microrganismos, incluindo algumas bactérias Gram-negativas (Doi, 2019). A sacarose, embora até recentemente relacionada apenas a organismos fototróficos, foi relatada como parte do metabolismo de vários tipos de bactérias, incluindo algumas proteobactérias Gram-negativas, filo ao qual também pertence a *Brucella* (But *et al.*, 2015). Para o ácido benzoico, único representante da classe dos compostos aromáticos, a maior área e o menor desvio padrão foram alcançados na extração realizada pelo M3 (Figura 24). O ácido benzoico tem sido relatado como um metabólito degradado por bactérias ruminais (Fu *et al.*, 2022), bem como um subproduto do metabolismo da fenilalanina na bactéria derivada de sedimentos *Streptomyces maritimus* (Moore *et al.*, 2002).

Portanto, considerando essas quatro classes de metabólitos, o M3 forneceu a condição mais eficiente para extração, resultando em picos cromatográficos com maiores áreas e boa repetibilidade para a triplicata biológica. Informações sobre o pKa e o logP dos treze metabólitos identificados são apresentados na Tabela 12, as estruturas químicas estão apresentadas no Anexo B.

Tabela 12 – Valores de pKa e logP dos metabólitos e suas respectivas classes

Metabólitos	pKa	logP	Classes
ácido benzoico	4,19	1,87	compostos aromáticos
glicerol	13,61	1,80	carboidratos
sacarose	12,60	-3,70	
adipato de di(but-2-en-1-ila)	-	2,30	ácidos graxos
ácido mirístico	4,95	5,37	
ácido (Z)-10-nonadecenóico	5,02	7,10	
ácido vacênico	4,95	6,78	
ácido palmítico	4,95	6,26	
ácido esteárico	4,95	7,15	
monoestearato de glicerol	13,62	5,97	
1-monomiristina	13,62	4,19	
1-monopalmitina	13,62	5,08	
2-palmitoilglicerol	14,28	5,08	

Fonte: PubChem (2023) e DrugBank Online (2023).

A *Brucella* é uma bactéria Gram-negativa, cuja membrana externa é formada por uma bicamada fosfolipídica contendo partes polares (fosfatos e glicerol) e apolares (ácidos graxos e lipídios), lipoproteínas e LPS, que determinam a antigenicidade e toxigenicidade bacteriana (Cheng *et al.*, 2021; Głowacka *et al.*, 2018; Moore *et al.*, 2002; Tortora; Funke; Case, 2017). O LPS é formado por três partes: (a) uma região lipídica presente na porção superior composta pelo lipídeo A; (b) um núcleo de polissacarídeo contendo diferentes tipos de açúcares; (c) um alongamento do polissacarídeo O. O lipídeo A fixa-se na parede da membrana celular, sendo liberado em caso de morte celular, o que o caracteriza como uma endotoxina de bactérias Gram-negativas. Este composto presente no LPS é responsável pela resposta inflamatória durante o período de infecção, podendo levar ao choque séptico e infecções graves (Banai; Corbel, 2010; Bishop *et al.*, 2000; Tortora; Funke; Case, 2017). Conforme já relatado por Vu *et al.* (2021), alterações nos níveis de compostos oriundos da membrana celular podem indicar infecção por *B. abortus*. A maioria dos metabólitos identificados (Tabela 12) estão relacionados com a

composição da membrana celular, assim, o monitoramento dos níveis desses metabólitos tem potencial para auxiliar a compreensão do metabolismo da bactéria *B. abortus*.

2.4 CONCLUSÃO

Como não há estudos metabolômicos sobre a bactéria do gênero *Brucella*, a realização de um estudo piloto fez-se necessária com vistas a conhecer a amostra, otimizar as etapas de preparo e extração de metabólitos intracelulares, bem como de análise e tratamento dos dados. Um protocolo para o preparo de amostras bacterianas do gênero *Brucella* foi otimizado avaliando-se o tempo de sedimentação na lavagem, a solução de inativação, a quantidade de biomassa, além do tempo de crescimento bacteriano e o *quenching*. A extração de metabólitos intracelulares foi otimizada, e o método selecionado para análises por GC-QTOF-MS empregou como solução de extração metanol:água:clorofórmio (3:1:1 v/v/v). Essa condição apresentou número de *features* superior aos demais, maior pontuação para o RSD entre as triplicatas biológica, maiores áreas para maioria dos metabólitos extraídos, além de exibir um bom agrupamento no HCA e uma significativa separação do M3 pela PC2 em relação aos outros métodos avaliados na PCA. Treze metabólitos representativos, incluindo seis ácidos graxos, quatro glicerídeos, dois carboidratos e um composto aromático, foram identificados usando o software Unknowns Analysis. Estudos futuros monitorando esses metabólitos podem, por exemplo, contribuir para aumentar o conhecimento sobre o metabolismo e o ciclo de infecção da *B. abortus*, permitindo um melhor entendimento sobre os mecanismos de infecção celular e sobrevivência dentro das células hospedeiras. Logo, pode vir a contribuir para avanços clínicos importantes, não apenas no combate à doença, mas também em novas estratégias de prevenção e erradicação da brucelose (Cheng *et al.*, 2021).

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados no *Brazilian Journal of Microbiology* (Corrêa *et al.*, 2023 – DOI: 10.1007/s42770-023-01001-6).

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS INTRACELULARES DE *BRUCELLA ABORTUS* PARA ANÁLISE METABOLÔMICA *UNTARGET* POR LC-HRMS

3.1 INTRODUÇÃO

As amostras de estudos metabolômicos são complexas, com grande variedade de compostos, o que pode causar efeitos de supressão iônica na análise por MS, especialmente quando é utilizada a fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Desse modo, técnicas de separação são acopladas ao MS para minimizar tais efeitos e melhorar a detecção de compostos em menores concentrações na amostra. Nesse trabalho, a cromatografia líquida de ultra alta performance (UHPLC) em fase reversa foi utilizada a fim de ampliar a cobertura metabólica obtida inicialmente por GC.

Protocolos de extração adequados devem extrair maior quantidade de metabólitos de diferentes classes químicas, com a maior precisão possível nos sinais analíticos. Dessa forma, estudar as etapas envolvidas na extração dos metabólitos é muito relevante, pois refletirão na qualidade dos dados. Os três procedimentos de extração de metabólitos intracelulares da bactéria *B. abortus*, que forneceram melhores resultados na análise por GC-HRMS, foram avaliados por LC-HRMS e serão discutidos neste capítulo.

Neste capítulo, um procedimento de extração de metabólitos intracelulares da *B. abortus* para análise por UHPLC-Q-Orbitrap foi otimizado.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Otimização da Extração dos Metabólitos Intracelulares de *B. abortus* para Análise por LC-HRMS

Os métodos M1, M3 e M5, adaptados e avaliados para GC-HRMS, também foram estudados por LC-HRMS. Essa seleção foi realizada para comparar o método M1 com os métodos M3 e M5, que se diferenciaram apenas do solvente clorofórmio (M3) pela substituição do MTBE (M5) na composição ternária do solvente extrator. O método M4, cuja adaptação foi realizada com baixo volume de extrator, não foi aplicada para essa plataforma analítica por não ser um método de execução simples, pois necessita coletar as fases em volumes baixos. Os extratos foram preparados como descrito nos fluxogramas das Figuras 13 a 17 (seção 2.2.5, Capítulo 2), sendo 200 μL de extrato secos em SpeedVac (temperatura ambiente) e todas as amostras foram solubilizadas em 200 μL de solução contendo 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos PI, *p*-fluoro-*DL*-fenilalanina (F-Phe) e sulfadiazina (SDZ), preparados em solução (MeOH:H₂O, 1:1 v/v), mesma composição da fase móvel. Em seguida, 10 μL das amostras foram injetados no sistema

UHPLC-Q-Orbitrap, de forma randomizada. Amostras QC foram obtidas a partir de um *pool* de todas as amostras, ou seja, uma mistura de alíquotas de mesmo volume de cada amostra extraída em cada um dos três métodos. Os QCs foram injetados de forma intercalada com as amostras ao longo de toda a análise, para avaliar a performance do equipamento. Cinco amostras QC foram analisadas no início, a cada 5 amostras e no final da sequência.

3.2.2 Instrumentação e Condições Operacionais do Sistema UHPLC-Q-Orbitrap

Para separação e detecção dos metabólitos intracelulares nos extratos bacterianos, um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas com analisador híbrido do tipo quadrupolo-Orbitrap (UHPLC-Q-Orbitrap), modelo UHPLC Accela e espectrômetro modelo Q Exactive, ambos da Thermo Fisher Scientific, foram utilizados. Para separação das diversas classes de metabólitos, uma coluna C18 Synchronis (1,7 μm , 2,1 x 100 mm), da Thermo Fisher Scientific, na qual é possível utilizar fase móvel com 100% de água, foi empregada. As condições otimizadas para o sistema UHPLC-Q-Orbitrap estão descritas na Tabela 13. A fase móvel utilizada foi composta por água ultrapura (fase A) e metanol (fase B), ambos contendo 0,1% v/v de ácido fórmico, e o gradiente de eluição está mostrado na Tabela 14.

A verificação da estabilidade do sistema UHPLC-Q-Orbitrap foi realizada através da injeção de 10 μL de solução 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos PI, F-Phe e SDZ, preparados em solução (MeOH:H₂O, 1:1 v/v). Os PIs e as amostras foram monitorados no modo positivo de ionização: F-Phe ($m/z - 184,07683$) e SDZ ($m/z - 251,05972$).

Tabela 13 – Condições utilizadas no UHPLC-Q-Orbitrap para análise de metabólitos intracelulares no modo positivo de ionização

Cromatógrafo líquido	
Temperatura do forno	40 °C
Volume de injeção	10 µL
Vazão de fase móvel	300 µL min ⁻¹
Pré-coluna	VanGuard™ BEH C18 1,7 µm (2,1 x 5 mm), Waters
Coluna	Synchronis aQ (1,7 µm, 2,1 x 100 mm), Thermo Fisher Scientific
Forno para coluna	Column Oven 200 com controlador de temperatura
Bomba do cromatógrafo	Accela 1250 Pump
Espectrômetro de massas	
Fonte de ionização	Eletrospray
Modo de ionização	Positivo
Tipo de analisador	Orbitrap
Faixa de aquisição	80 – 1000 m/z
Posição da probe	D
Pressão do gerador de N ₂	800 ± 30 kPa
Voltagem modo positivo	4,20 kV
Resolução máxima	140.000
Modo de aquisição	Full Scan (FS)
Resolução <i>Full Scan</i>	70.000
Tempo máximo de injeção (<i>Maximum IT</i>)	100 ms
Controle automático de ganho (AGC, <i>Automatic Gain Control</i>)	1x10 ⁶ u.a.
Modo de aquisição	<i>Parallel Reaction Monitoring (PRM)</i>
Resolução PRM	17.500
<i>Maximum IT</i>	200 ms
AGC	5x10 ⁵ u.a.
Valores de energia de colisão normalizada (NCE, <i>Normalized Collision Energy</i>)	20, 40 e 60 u.a.
Softwares	
<i>Tune, Xcalibur e ExactFinder</i>	

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 14 – Programa de eluição empregado para separação dos metabólitos intracelulares

Tempo (min)	A%	B%
0,00	99,9	0,1
2,00	99,9	0,1
15,00	0,1	99,9
17,00	0,1	99,9
17,01	99,9	0,1
22,00	99,9	0,1

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.3 Tratamento dos Dados

O fluxograma das etapas envolvidas no processamento de dados seguiu o mesmo fluxo apresentado na Figura 18. Inicialmente, os dados brutos (*.RAW) obtidos no equipamento UHPLC-Q-Orbitrap foram convertidos para o formato *.mzXML, utilizando o programa MSConvert GUI, com codificação binária de 64 bit. Os filtros utilizados foram *Peak Picking* e *Scan Time* de 10 a 1020 s. Os dados convertidos foram processados na plataforma XCMS Online e os parâmetros selecionados foram da opção UPLC/Q-Exactive.

Para os dados de LC, também foi realizada a avaliação e seleção de alguns parâmetros pelo IPO utilizando o programa R, conforme descrito na seção 2.3.3.1 do Capítulo 2. Os *features* com RSD de área do pico cromatográfico maior que 20% para as triplicatas foram excluídos da tabela de dados (extensão *.csv) gerada pelo programa (Smith *et al.*, 2006). Para análise estatística, os resultados obtidos foram tratados na plataforma MetaboAnalyst 5.0 e os parâmetros selecionados no pré-tratamento dos dados (normalização, transformação e escalonamento) foram os mesmos utilizados no processamento dos dados de GC-MS apresentados na Tabela 10 do Capítulo 2.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Tratamentos dos Dados

3.3.1.1 Seleção dos Algoritmos e Parâmetros de Processamento dos Dados

Os parâmetros utilizados no processamento dos dados na plataforma XCMS Online estão listados na Tabela 15. O procedimento de otimização no IPO pelo R foi similar ao apresentado no Capítulo 2.

Tabela 15 – Parâmetros utilizados no XCMS para processamento dos dados de UHPLC-Q-Orbitrap

Etapas	Parâmetros
	<i>sntresh</i> = 3
	ppm = 5
Detecção dos Picos (<i>Peak Picking</i>)	<i>peak width</i> = (5 a 20) <i>mzdiff</i> = 0,008 <i>prefilter</i> = (3 a 5000)
Alinhamento do tempo de retenção (<i>Retention time correction</i>)	<i>Obiwarp</i>
Agrupamento (<i>Grouping</i>)	<i>bw</i> = 1* <i>mzwid</i> = 0,02*

Fonte: Elaborada pela autora.

* Os valores otimizados no IPO e aplicados ao processamento.

As amostras QC foram avaliadas no software de acesso livre XCMS (versão 3.6.2), rodado dentro do programa R (versão 3.6.1) com interface Rstudio (versão 1.2.5001) para comparar o *bw* otimizado pelo IPO (1) com o sugerido no XCMS Online (5). Assim, foi avaliado o delineamento dos picos cromatográficos dos PIs para os valores de *bw* de 1 e 5. A Figura 25 mostra a distribuição dos íons dos PIs (bolinhas coloridas), nos QCs e nas triplicatas biológicas de cada método, para os dois valores de *bw* avaliados. O valor de 1 otimizado pelo IPO para o parâmetro *bw* mostrou-se mais adequado, tendo apresentado um pico com menor largura de base.

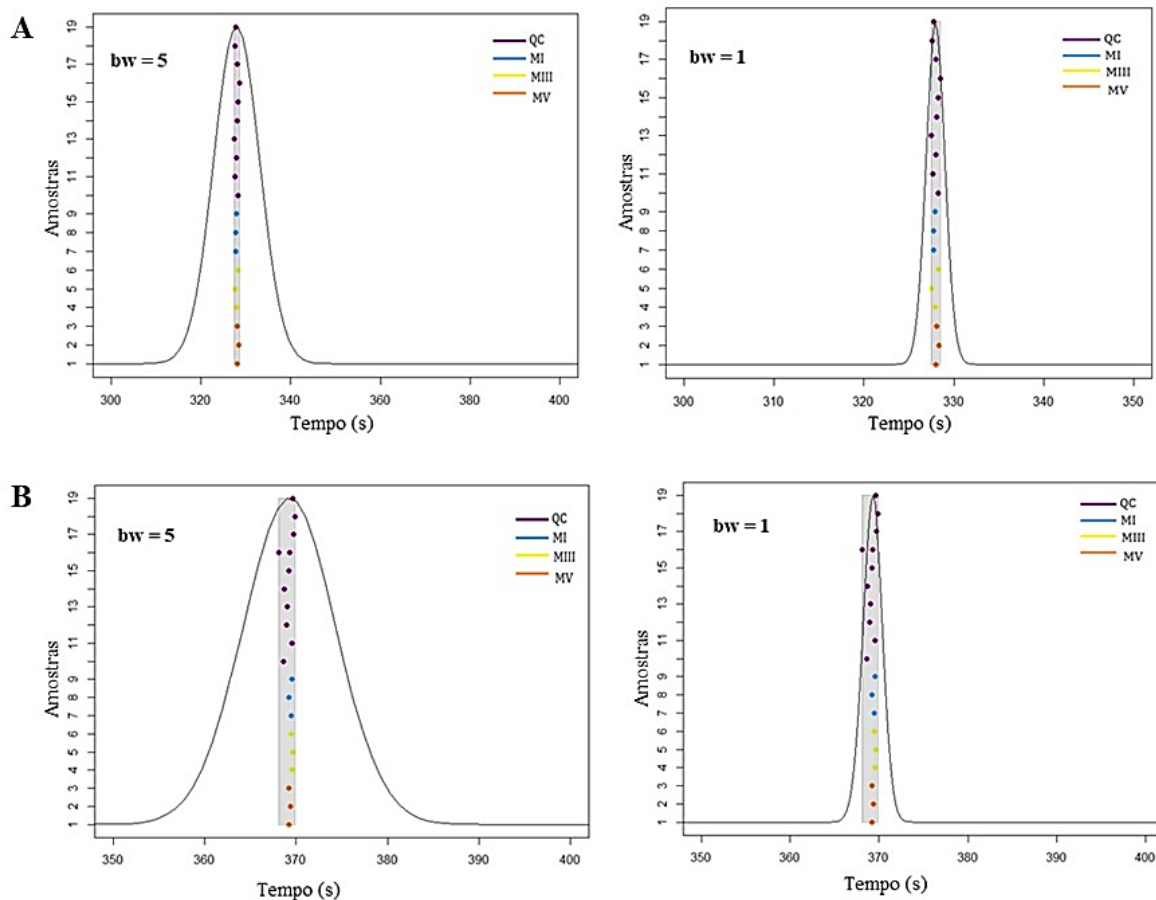


Figura 25 – Picos cromatográficos gerados, com valores de *bw* de 1 e 5, para os PIs nas amostras e nos QCs

Fonte: XCMS (desktop) e programa R.

Legenda: A) *p*-fluoro-*DL*-fenilalanina (F-Phe); B) sulfadiazina (SDZ).

3.3.1.2 Otimização da Extração dos Metabólitos Intracelulares de *Brucella abortus* – Número de *Features* Extraídos e Repetibilidade

Para avaliar o número de *features* extraídos por cada método, bem como a repetibilidade da extração, um sistema de pontuação, semelhante ao utilizado por GC-HRMS, foi utilizado. Para os dados de LC-HRMS, a pontuação foi atribuída ao RSD da área do pico cromatográfico de cada *feature* detectado nos QCs, conforme Equação (3). Esse sistema de pontuação atribuiu peso igual a 3 para *features* com RSD da área do pico menor e igual a 20% (G1), e peso igual a 2 para *features* com RSD maior que 20% (G2), seguindo a recomendação de limite de 20% para dados de LC-MS (Hackstadt; Hess, 2009).

$$\text{Pontuação} = (3 \times G1) + (2 \times G2)$$

$$\text{Equação (3)}$$

O M1 foi o que apresentou a maior quantidade de *features* com RSD inferior a 20% e o menor número de *features* com RSD da área do pico cromatográfico superior a esse valor, resultando na melhor pontuação dentre os três métodos estudados (Tabela 16).

Tabela 16 – Pontuação atribuída aos valores de RSD dos *features* obtidos por XCMS

Métodos	Modo de ionização positivo		Pontuação
	^a G1	^b G2	
M1	2278	467	6367
M3	893	1852	827
M5	1266	1479	2319

Fonte: Elaborada pela autora.

^aG1 (grupo 1) representa o número de *features* com RSD \leq 20%.

^bG2 (grupo 2) representa o número de *features* com RSD $>$ 20%.

Outro recurso utilizado para a comparação dos *features* extraídos, com RSD menor que 20% entre as triplicatas, pelos três métodos de extração foi a construção de um diagrama de Venn (Figura 26). O M1 apresentou um número de *features* exclusivos da sua extração muito superior aos outros dois métodos, ou seja, 1056. Portanto, o sistema de pontuação (Tabela 16) e o diagrama de Venn (Figura 26) indicaram o M1 como mais eficiente para extração de metabólitos intracelulares para posterior detecção por LC.

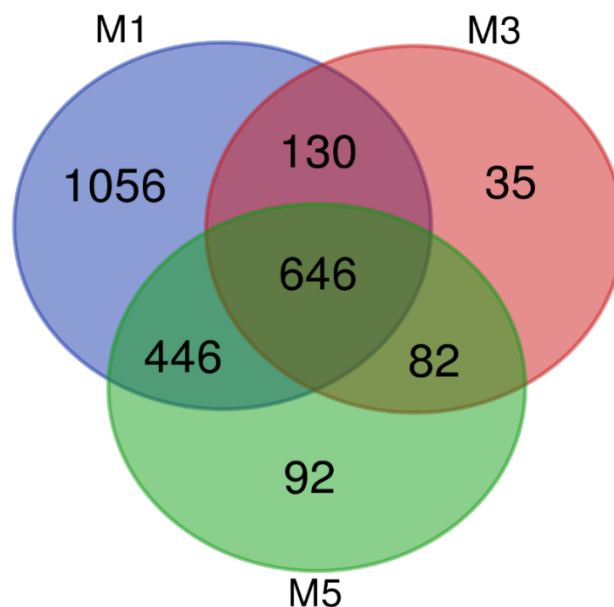


Figura 26 – Diagrama de Venn dos *features* extraídos nos três métodos avaliados

Fonte: Bioinformática e Genômica Evolutiva.

3.3.1.3 Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamento Hierárquico

Para os *features* extraídos por cada método, dois tratamentos estatísticos de análise multivariada não supervisionada foram realizados: PCA e HCA. Esses tratamentos foram realizados no MetaboAnalyst 5.0, em que também foram realizadas as etapas de pré-processamento, incluindo filtragem de dados utilizando RSD menor e igual a 20% para as áreas dos picos das replicatas, normalização pela mediana, transformação pelo log10 e escalonamento por Pareto. PCA foi aplicada aos dados para análise exploratória do conjunto de amostras QC. As componentes principais um (PC1) e dois (PC2) explicaram 41,1% da variação do sistema em estudo. É possível verificar que não ocorreu problemas instrumentais na aquisição dos dados observando a distribuição dos QCs no gráfico de escores, pois estão juntos e distribuídos ao centro do gráfico (Figura 27). Também foi possível verificar separação das triplicatas biológicas obtidas nos três métodos de extração, sendo que no M1 as amostras apresentaram menor dispersão (Figura 27).

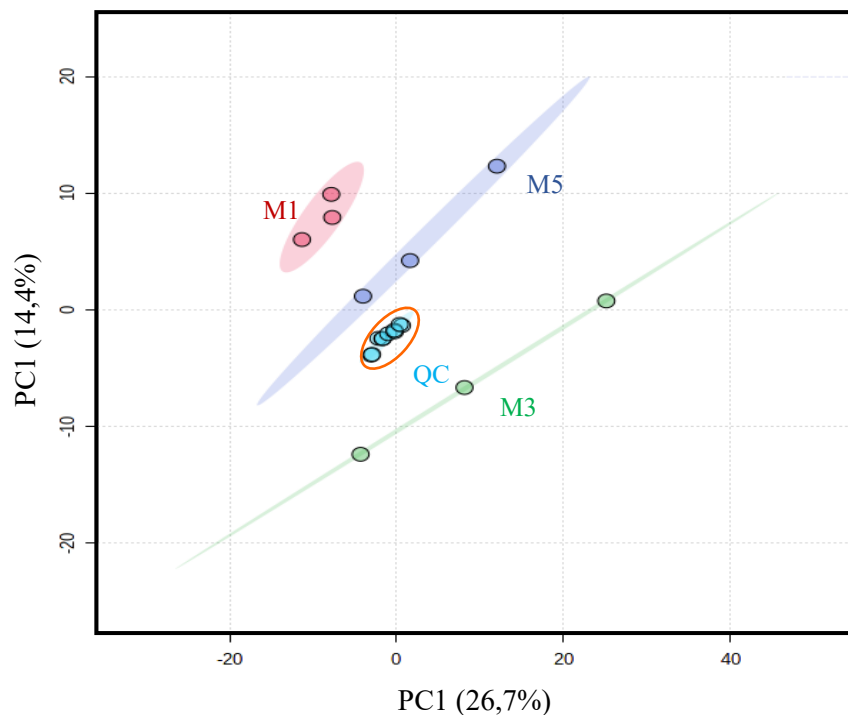


Figura 27 – Gráfico de escores da PC1 *versus* PC2 para os métodos de extração avaliados, em que as elipses representam o intervalo de confiança de 95% ($n = 3$)

Fonte: MetaboAnalyst 5.0.

Na HCA, em que um dendrograma foi gerado com base na distância euclidiana com algoritmo de agrupamento *ward.D*, foi possível visualizar a distribuição das amostras e observar os seus graus de semelhança. Assim, observa-se na Figura 28, que o resultado do agrupamento, na distância euclidiana de 30, foi uma subdivisão das amostras em três, em que apenas o M1 apresentou suas amostras agrupadas e isoladas dos demais métodos. As amostras dos M3 e M5 distribuíram entre si, o que indica que há maior semelhança entre os *features* extraídos por esses dois métodos.

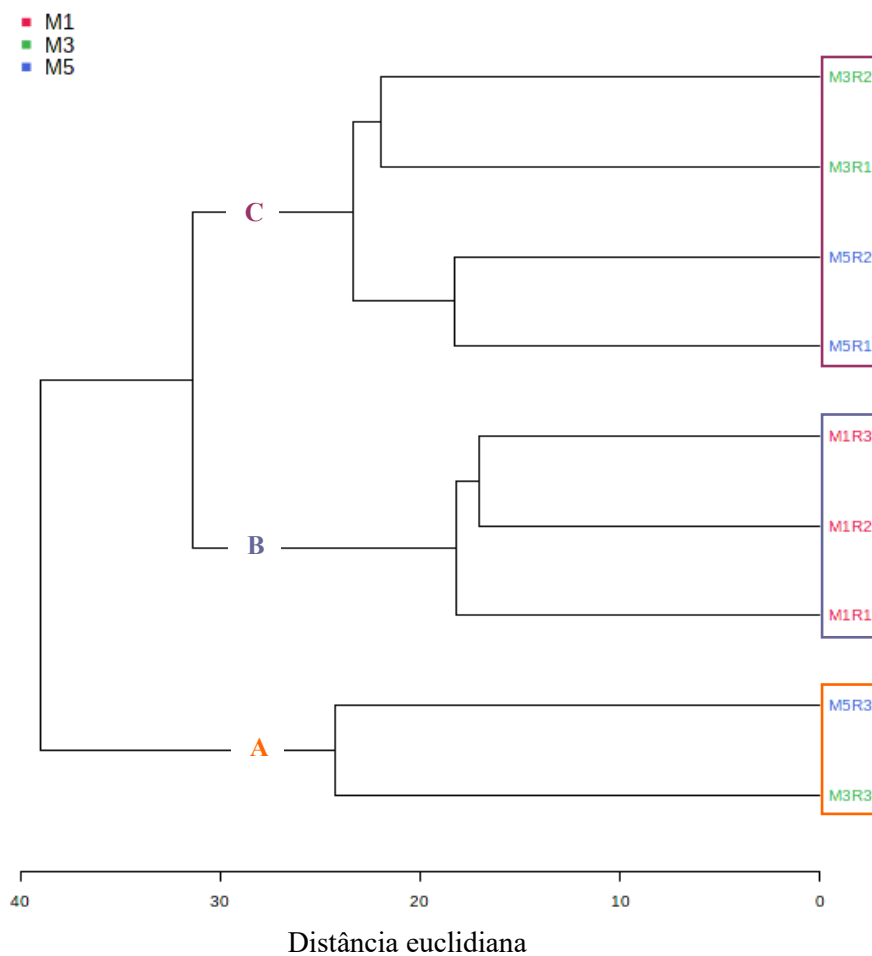


Figura 28 – Dendrograma gerado com base na distância euclidiana e algoritmo de agrupamento *ward.D* utilizando as triplicatas biológicas de cada método

Fonte: MetaboAnalyst 5.0.

Os resultados da análise estatística multivariada também indicaram o M1 como melhor condição para extração de metabólitos intracelulares das células de *B. abortus* para análise por LC.

As amostras de estudos metabolômicos são complexas e a escolha do solvente extrator impacta no resultado final, pois as amostras biológicas possuem diferentes classes de compostos. Comparando as composições dos sistemas ternários dos métodos M1 e M3, as soluções acetonitrila:isopropanol:água (3:3:2 v/v/v) para M1 e metanol:água:clorofórmio (3:1:1, v/v/v) para M3, observa-se que os índices de polaridades dos dois sistemas são bem próximos (Tabela 17). Entretanto, avaliando o valor do coeficiente de partição (logP) verifica-se uma maior variação entre esses dois sistemas ternários (Tabela 17), pois o clorofórmio (logP = 1,97) possui afinidade por compostos de baixa polaridade muito superior ao isopropanol (logP= 0,05) (Tabela 17). Portanto, a solução extratora acetonitrila:isopropanol:água (3:3:2 v/v/v) tem maior capacidade de extração de compostos de polaridade média, o que corrobora o artigo de revisão de Cajka e Fiehn (2016). Cajka e Fiehn (2016) realizaram uma revisão sobre o poder de extração de diferentes solventes e misturas de solventes, dentre as soluções revisadas, a mistura acetonitrila:isopropanol:água (3:3:2 v/v/v) mostrou-se uma boa para extração de metabólitos intracelulares numa abordagem *untarget*.

Tabela 17 – Índice de polaridade e logP dos solventes utilizados no estudo

Solvente	Índice de polaridade	LogP
Isopropanol	3,9	0,05
Clorofórmio	4,1	1,97
Metanol	5,1	-0,77
Acetonitrila	5,8	-0,34
Água	9	0

Fonte: Finar (2023) e PubChem (2023).

3.4 CONCLUSÃO

O método que utilizou a solução de extração acetonitrila:isopropanol:água (3:3:2 v/v/v) apresentou os melhores resultados em todas as etapas de avaliação, sendo selecionado para extração de metabólitos intracelulares da *B. abortus* para estudos metabolômicos *untarget*, utilizando LC-HRMS como plataforma analítica. Esse protocolo de extração foi empregado no estudo metabolômico *untarget* dos biovares bacterianos 1, 3, 4, 5, 6 e 9 da espécie *B. abortus*, que será discutido no Capítulo 4.

CAPÍTULO 4

ESTUDO METABOLÔMICO DOS BIOVARES DA *BRUCELLA ABORTUS* UTILIZANDO LC-HRMS

4.1 INTRODUÇÃO

O grau de virulência da brucelose, ou seja, a capacidade da doença se propagar nas células hospedeiras, é diferente de outras doenças virulentas, pois ela não está relacionada com variáveis habituais, tais como cápsulas, fagos lisogênicos ativos, plasmídeos, flagelos, citolisinas, exotoxinas e transferência horizontal de DNA. Para a *Brucella*, a capacidade de evolução da doença está relacionada com a adaptação da bactéria para sobreviver por longos períodos de tempo às mudanças no meio intracelular, ocorridas no período de interação patógeno-hospedeiro. Um dos principais fatores de virulência refere-se ao sistema de secreção tipo IV, codificado pelo locus VirB, esse complexo macromolecular envolve as membranas interna e externa, a replicação intracelular e a entrega de proteínas efetoras no citoplasma do hospedeiro. A espécie *B. abortus* está entre as mais patogênicas para os seres humanos, bem como a *B. melitensis* e *B. suis*. Doze espécies da bactéria do gênero *Brucella* já foram descritas na literatura e há, nos repositórios do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI – *National Center for Biotechnology Information* – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 642 conjuntos de genoma disponíveis. Uma nova espécie foi descoberta recentemente na região da floresta tropical de Costa Rica. Essa nova espécie é um patógeno de morcegos e foi denominada *B. nosferati* sp. Nov. (Altamirano-Silva *et al.*, 2021; Głowacka *et al.*, 2018; Hernández-Mora *et al.*, 2023; Luizet *et al.*, 2021; Moreno; Cloeckart; Moriyón, 2002; Poester; Samartino; Santos, 2013; Poetsch; Marchesini, 2020; Seleem *et al.*, 2008; Suárez-Esquivel *et al.*, 2020a; Zhong *et al.*, 2012).

A *Brucella* é reconhecida como um gênero monoespecífico por apresentar um genoma característico e limitado, sendo que as espécies desse gênero possuem uma alta proximidade na correlação genética, acima de 95% de similaridade dos genes. Apesar da similaridade genética, as espécies se diferem pelo grau de virulência, tipo de hospedeiro e potencial da zoonose (Banai; Corbel, 2010; Suárez-Esquivel *et al.*, 2020a). A elevada similaridade entre os genes torna a separação dos diferentes bvs um grande desafio. Nesse capítulo, será descrito um estudo metabolômico dos seis bvs, 1, 3, 4, 5, 6 e 9, da *B. abortus*, com o objetivo de identificar metabólitos discriminantes que permitam classificar o bv.

Neste capítulo, o processamento dos dados e análises estatísticas uni e multivariadas foram realizadas. Assim, alguns metabólitos e grupo de metabólitos discriminantes, para cada bv, foram identificados putativamente (anotação).

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 Preparo de Amostras

Os seis bvs da *B. abortus* foram obtidos da Bacterioteca do LFDA de Pedro Leopoldo e cultivados no setor de DDB. Os bvs cultivados foram: bv 1 (cepa 2308), bv 3 (cepa Tulya), bv 4 (cepa 292), bv 5 (cepa B3196), bv 6 (cepa 870) e bv 9 (cepa C68).

O cultivo dos bvs foi realizado pela técnica do tapete bacteriano, em que as culturas de referência, após descongeladas, foram espalhadas sobre o meio de cultivo das placas de petri, conforme descrito na seção 2.2.4.1 *Crescimento das Unidades Formadoras de Colônias* do Capítulo 2. As placas de petri foram divididas em 3 regiões (marcadas em vermelho) para o cultivo em triplicata de cada bv, e todas as placas utilizadas pertenciam ao mesmo lote. Após atingir o crescimento ideal (preenchimento de toda a área delimitada – coloração amarelada), as culturas (Figura 29) foram coletadas, conforme descrição da seção 2.2.4.2 *Quenching, Coleta e Lavagem das Amostras Bacterianas* do Capítulo 2. Um branco foi preparado em uma placa de petri de mesmo lote para avaliação de todo o processo, utilizando apenas o meio de cultura.

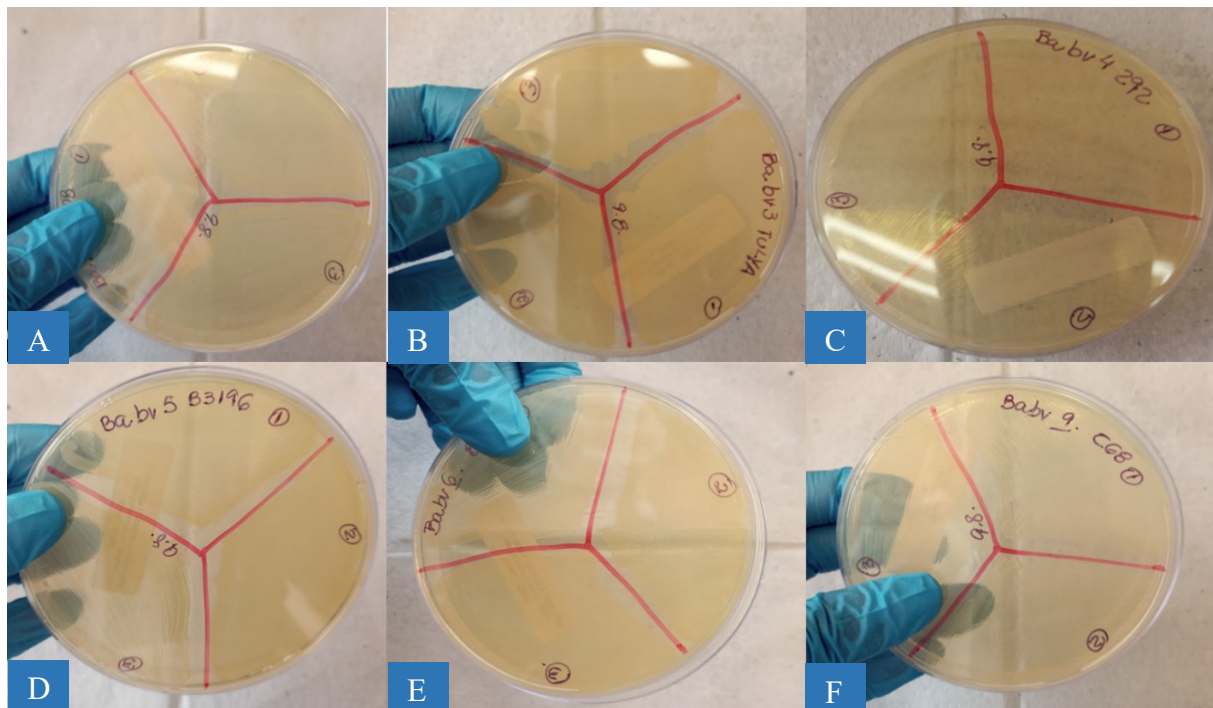


Figura 29 – Placas de petri divididas em 3 regiões, em que as culturas bacterianas dos bvs da espécie *B. abortus* em estudo atingiram seu crescimento ideal (regiões amareladas)

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A) bv 1, B) bv 3, C) bv 4, D) bv 5, E) bv 6 e F) bv 9.

A etapa de inativação bacteriana (seção 2.2.4.3, Capítulo 2) foi aplicada logo após as lavagens das amostras coletadas, utilizando solução gelada (- 20° C) de metanol 70% v/v, resfriada em freezer e mantida em banho de gelo durante o procedimento. Posteriormente, a suspensão bacteriana inativada foi seca em SpeedVac, em temperatura ambiente.

Para cada amostra de bv inativada e seca, foram coletados aproximadamente 5 mg de biomassa, o valor medido foi utilizado na normalização no processamento dos dados para reduzir a variabilidade entre as replicatas (Freiwald; Sauer, 2009; Smart *et al.*, 2010). Os valores das biomassas coletadas dos bvs estão apresentados no Apêndice A.

O M1 descrito na seção 2.2.5 do Capítulo 2 foi utilizado para extração dos metabólitos intracelulares dos seis bvs da espécie *B. abortus*.

As amostras QC foram preparadas a partir da mistura (*pool*) de 70 µL de extrato, de cada triplicata dos seis bvs.

4.2.2 Análise Instrumental

O sistema UHPLC-Q-Orbitrap, descrito na seção 3.2.2 do Capítulo 3, também foi utilizado para separação e detecção dos metabólitos intracelulares dos seis bvs da *B. abortus*. As condições operacionais do sistema UHPLC-Q-Orbitrap foram as mesmas descritas na Tabela 13 do Capítulo 3. As amostras foram injetadas de acordo com a sequência: 3 injeções do solvente utilizado para solubilizar os extratos bacterianos e condicionar a coluna, seguidas pela injeção do branco, de 9 amostras QC e, então, pela injeção dos extratos de forma randomizada. Outras 7 amostras QC foram injetadas intercaladas com as amostras de extratos bacterianos, totalizando 16 amostras QC.

Para avaliar, de forma geral, a qualidade dos dados obtidos, foi realizada uma inspeção dos perfis dos PIs e dos respectivos valores de t_R , além do cálculo do RSD das áreas apresentadas em cada amostra.

4.2.3 Tratamento dos Dados

Os dados brutos passaram por um pré-processamento para conversão dos dados do formato *.RAW para *.mzXML utilizando o programa MSConvert. Durante a conversão foi utilizado o filtro *Scan Time* de 10 a 1020 s para eliminar o tempo de condicionamento da coluna (Holman; Tabb; Mallick, 2014).

Os dados brutos foram carregados e processados na plataforma XCMS Online (conforme seção 3.3.1.1 do Capítulo 3), em que foram realizadas a detecção de *features*, correção de tempo de retenção e alinhamento. Após esse processamento, a tabela bruta foi tratada e depois convertida para extensão *.csv e submetida à análise estatística multivariada no site MetaboAnalyst 5.0, em que foi possível identificar os *features* discriminantes (VIP Score) (Pang *et al.*, 2022).

4.2.4 Identificação Putativa dos Metabólitos

A etapa de identificação putativa dos metabólitos foi realizada para os *features* selecionados pelo VIP Score (MetaboAnalyst 5.0) e que apresentaram, no software Xcalibur (versão 4.2.28.14, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA), bons perfis de fragmentação, fornecendo fragmentos e t_R s bem definidos. Dessa forma, as massas exatas e os espectros de fragmentação desses *features* foram utilizados para comparar com os bancos de dados e bibliotecas espectrais públicos das plataformas CEU Mass Mediator (versão 3.0 – <http://ceumass.eps.uspceu.es/>), HMDB (versão 5.0 – <https://hmdb.ca/spectra/ms/search>), CFM-ID (versão 3.0 – <https://cfmid3.wishartlab.com/>), MetFrag (<https://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>) e do software Compound Discoverer (versão 3.3).

Para auxiliar na identificação putativa dos *features* selecionados no VIP score (seção 4.3.1), realizou-se a fragmentação desses íons precursores (Tabela 18) utilizando a combinação dos experimentos de varredura completa e monitoramento de reações paralelas (FS-PRM) para aquisição de íons produtos. Os parâmetros utilizados para os modos FS e PRM estão apresentados na Tabela 13. O modo FS foi utilizado para verificação do t_R e do aspecto do cromatograma do íon precursor nas amostras fragmentadas.

Cada espectro de fragmentação, com tolerância de exatidão de massa de 5 ppm, foi carregado nas plataformas CFM-ID 3.0 e MetFrag para identificação dos compostos. Os espectros de fragmentação obtidos foram tratados nessas duas plataformas, nas quais foram definidos os parâmetros utilizados para fragmentação, além de selecionar os possíveis adutos.

O software Compound Discoverer 3.3 foi utilizado para processar os dados brutos de forma complementar. Como o presente estudo é *untarget*, o workflow *LC/Metabolomics/Max ID – Detect Unknowns with ID Using Online Database Search* foi selecionado para análise dos dados. O software foi utilizado para atribuir uma fórmula molecular mais provável a partir da

distribuição isotópica e para comparar os espectros de fragmentação com bibliotecas espectrais das plataformas *mzCloud*, *mzVault*, *ChemSpider* e *MassList*.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 Tratamento dos Dados e Comparação entre os Biovares

Inicialmente, os dados adquiridos foram tratados no software do equipamento (Xcalibur) para uma avaliação inicial dos PIs. Valores de RSD das áreas dos picos cromatográficos menores que 10% foram observados, o que demonstrou que o instrumento foi consistente durante a análise.

No processamento dos dados na plataforma XCMS Online, a qualidade do tratamento aplicado ao sistema em estudo foi avaliada através do gráfico do desvio do t_R . Nesse gráfico, observou-se que os desvios obtidos na correção do t_R foram muito baixos, mostrando que o processamento foi adequado. Desse modo, a tabela de resultados exportada do programa XCMS Online foi tratada no Excel, no qual foi realizada a normalização da matriz de dados pela biomassa de cada amostra (Apêndice A). Os dados normalizados foram carregados na plataforma MetaboAnalyst 5.0 para tratamento estatístico.

No MetaboAnalyst foram aplicados dois filtros de dados, sendo que um deles realizou a remoção dos *features* cujo RSD das áreas dos picos nos QCs foi superior a 20%, valor recomendado para dados obtidos por LC-MS. O outro filtro realizou a remoção de 40% dos dados com menor RSD entre as áreas dos picos dos diferentes bvs, a fim de remover *features* que não seriam consideravelmente diferentes nas comparações entre os grupos em estudo, e que poderiam prejudicar o desempenho da análise multivariada (Hackstadt; Hess, 2009). Posteriormente, a normalização foi aplicada pela mediana, a transformação dos dados pelo \log_{10} e o escalonamento por Pareto. O gráfico da densidade de kernel, antes e depois da normalização aplicada, está representado na Figura 30. O formato da gaussiana, após o tratamento (Figura 30B), é um indicativo que os dados seguem uma distribuição relativamente normal e, portanto, deu-se seguimento ao tratamento estatístico multivariado.

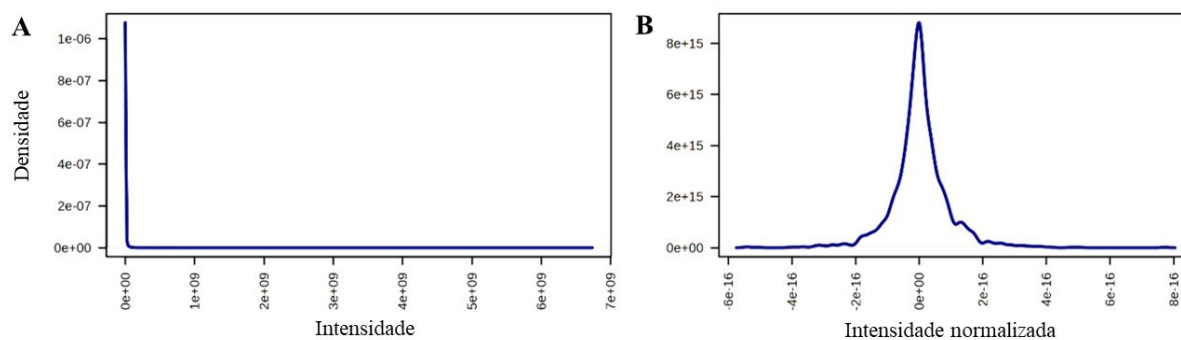


Figura 30 – Gráfico da densidade de kernel

Fonte: MetaboAnalyst 5.0.

Legenda: A) antes e B) após a normalização pela mediana, transformação por log10 e escalonamento por Pareto.

A primeira avaliação feita dentro da plataforma MetaboAnalyst 5.0 foi observar a distribuição dos QCs com as amostras no modelo de PCA (Figura 31A), para verificar a variabilidade analítica dos dados e avaliar a qualidade dos resultados obtidos. Comparando a distribuição das triplicatas biológicas e dos QCs, observa-se que os QCs estão distribuídos numa mesma região do gráfico com uma variabilidade menor do que das amostras (Figura 31A). Essa distribuição é esperada, pois os QCs são alíquotas de um mesmo *pool*, a diferença entre eles se deve à variação instrumental. Desse modo, eles permitiram avaliar a performance do equipamento, após essa avaliação, seguiu-se com os tratamentos estatísticos das amostras do estudo sem utilizá-los no conjunto de dados.

Para analisar os dados adquiridos para os seis bvs e selecionar os metabólitos discriminantes, um processamento estatístico foi realizado utilizando os mesmos parâmetros da normalização da análise dos QCs. Pela distribuição das amostras no gráfico de escores da PCA (Figura 31B), observa-se uma separação evidente entre o bv 3 e os demais bvs. As componentes principais PC1 e PC2 explicaram 50,9% da variabilidade do conjunto de dados, o bv 3 teve a separação delimitada pela PC1. Os bvs 1, 4, 5, 6 e 9 foram agrupados na análise, o que indica semelhança entre os resultados obtidos no estudo.

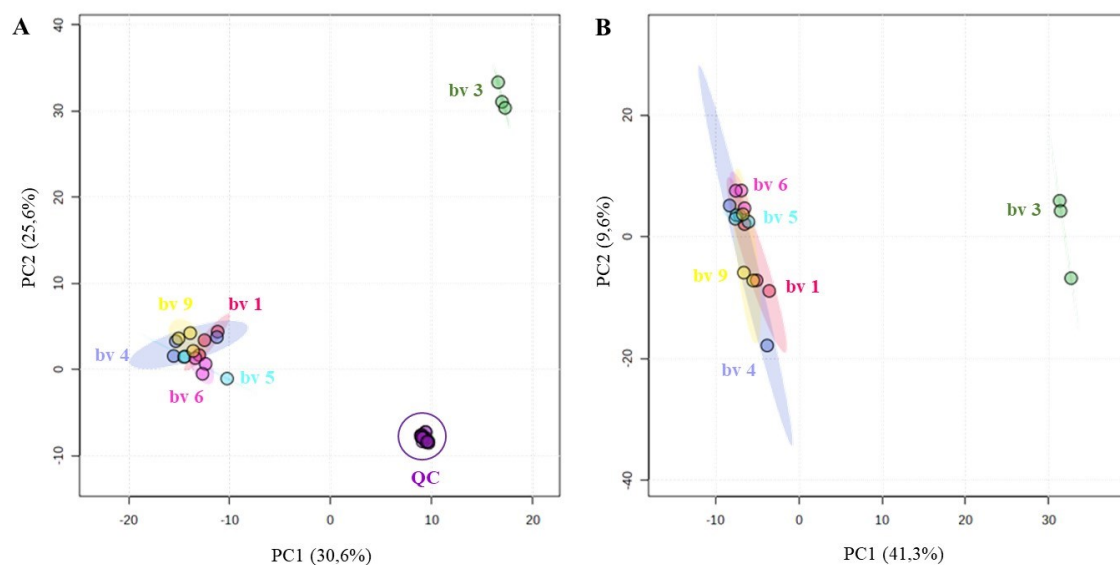


Figura 31 – Gráfico de escores do modelo de PCA

Fonte: MetaboAnalyst 5.0.

Legenda: A) amostras dos bvs e QCs; B) amostras dos bvs sem os QCs.

Um dendrograma foi gerado, com base na distância euclidiana com algoritmo de agrupamento *ward.D*, para visualizar a distribuição dos bvs e observar os níveis de semelhança. A Figura 32 mostra uma separação dos bvs em 3 grupos (A, B e C). Nesse modelo, nota-se a discriminação entre o bv 3 (grupo A, verde) dos demais bvs, além do agrupamento dos bvs 5 e 6 no grupo B (roxo). Tal separação está coerente com o dendrograma condensado de genótipos MLVA-16 agrupados de espécies de *Brucella*, apresentado por Al Dahouk e colaboradores (2012), em que suas amostras apresentaram os bvs 1, 2 e 4 agregados, assim como os bvs 5, 6 e 9 e o bv 3 isolado dos demais. O MLVA-16 foi a técnica de genotipagem utilizada pelos autores para avaliar um total de 344 isolados de *Brucella*, sendo identificados 340 genótipos diferentes. Desse modo, a nível metabólico, também foi observada separação semelhante entre os bvs.

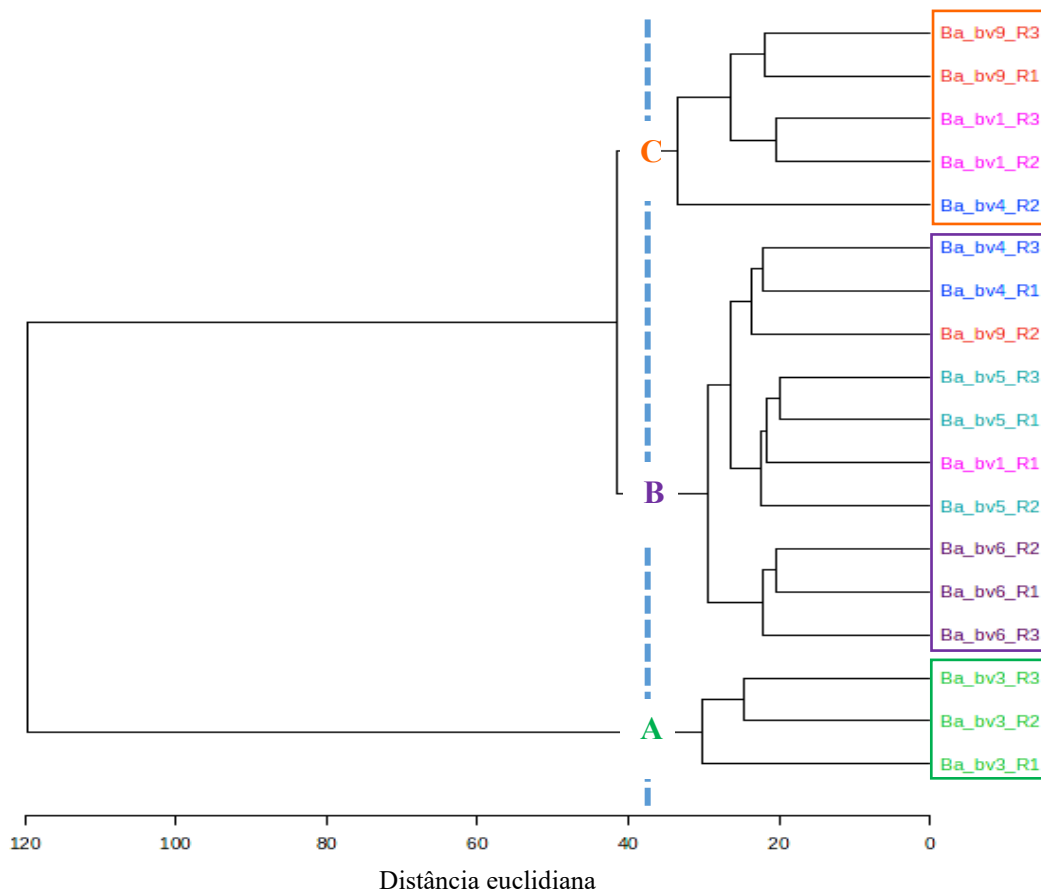


Figura 32 – Dendrograma gerado com base na distância euclidiana e algoritmo de agrupamento *ward.D* utilizando as triplicatas biológicas de cada bv

Fonte: MetaboAnalyst 5.0.

Para selecionar os *features* significativos para cada bv, construiu-se gráficos de Volcano que mostra uma combinação do *p*-valor obtido por análise univariada (teste t de *Student*) com o valor de *fold change* (FC), indicando a magnitude da mudança de intensidade média ou mediana entre os grupos. Esse gráfico permite a identificação visual dos *features* que foram estatisticamente significativos através da comparação de dois conjuntos de dados, e o FC possibilita observar as variações relativas dos metabólitos nos grupos (Li, 2012).

Para realizar essa avaliação aos pares, o bv 5 foi selecionado como grupo padrão de comparação com os demais bvs, pois foi um conjunto com posição intermediária entre os demais (Figura 33). Os parâmetros utilizados foram: seleção de testes não paramétricos; direção de comparação (bv 5 no denominador); variância dos grupos desigual, pois a variância entre os grupos deve ser admitida por serem bvs diferentes; limite de *p*-valor menor que 0,05 aplicando taxa de falsas descobertas (FDR – *False Discovery Rate*) e limite de FC acima de 2,0. A escolha

desses valores permite modular o nível de exigência para separação dos pares, desse modo, optou-se por um método mais rigoroso e seletivo na seleção desses valores. Os *features* discriminantes dos bvs 1, 3, 4, 6 e 9 (Tabela 18) foram obtidos da análise univariada do gráfico de Volcano nas comparações dois a dois de cada biovar com o biovar 5, e os *features* considerados mais relevantes foram selecionados utilizando os parâmetros citados acima. Esses *features* foram utilizados para iniciar o processo de identificação putativa, selecionando os *features* com expressão afetada. Os gráficos de Volcano obtidos nessa etapa estão dispostos na Figura 33, os pontos na cor cinza são *features* que estão abaixo da linha de corte, os pontos em azul correspondem aos *features* com regulação diminuída e os pontos em vermelho foram os *features* com regulação aumentada. A separação entre *features* que estão em níveis aumentados ou diminuídos é realizada em função do valor p corrigido (FDR) e do FC ao comparar dois grupos (Li, 2012).

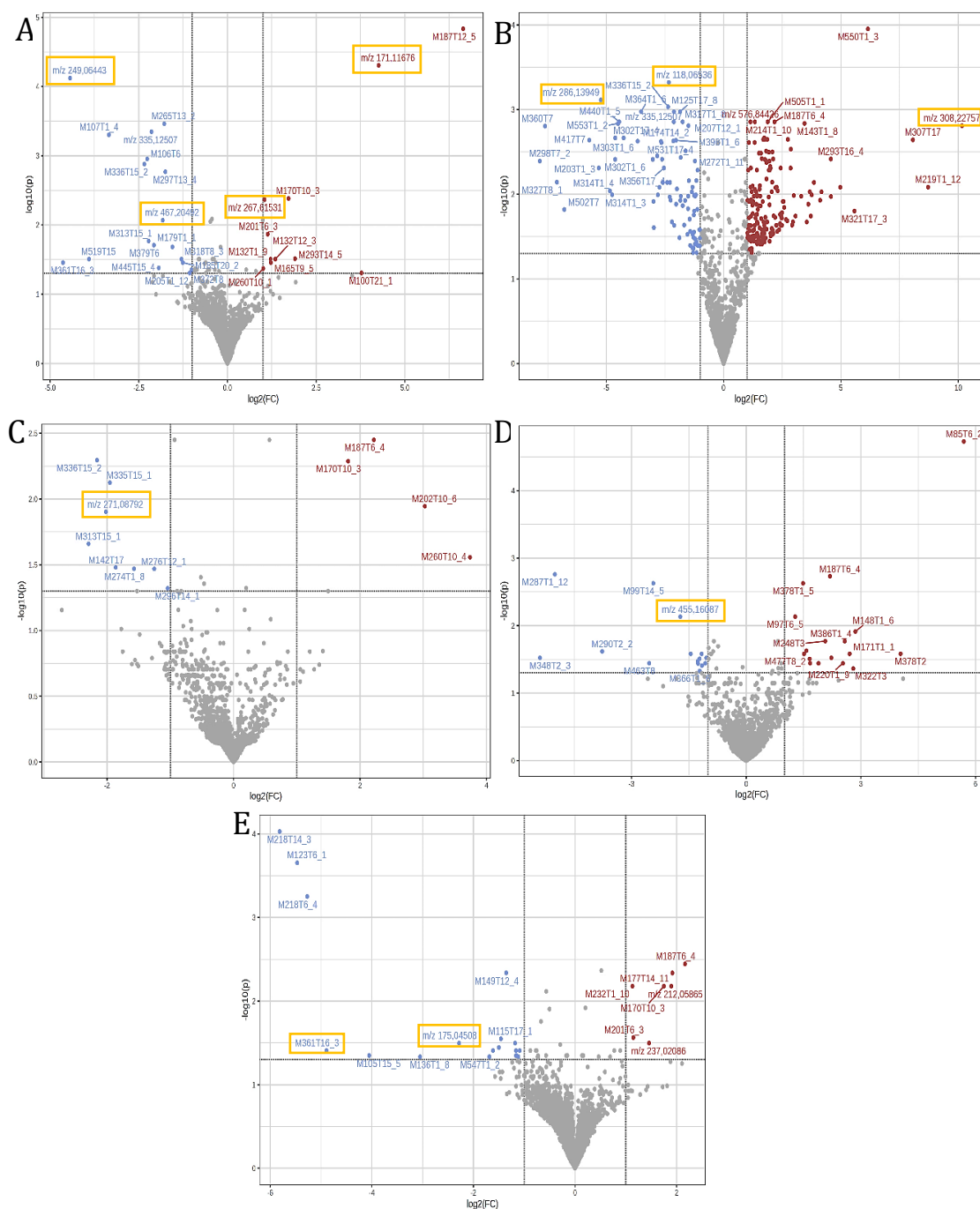


Figura 33 – Gráfico de Volcano apresenta os *features* discriminantes aumentados (pontos vermelhos), diminuídos (pontos azuis) e os não significativos (pontos cinza), selecionados pelo modelo univariado de comparação

Fonte: MetaboAnalyst 5.0.

Legenda: A) seleção da comparação do bv 1 com bv 5; B) seleção da comparação do bv 3 com bv 5; C) seleção da comparação do bv 4 com bv 5; D) seleção da comparação do bv 6 com bv 5; E) comparação do bv 9 com bv 5. Os *features* discriminantes estão marcados com caixa laranja.

5.3.2 Identificação Putativa dos Compostos

Após a seleção dos *features* e avaliação dos respectivos cromatogramas, realizou-se a fragmentação dos íons precursores utilizando o modo de aquisição combinado FS-PRM para obtenção dos espectros MS². Os espectros de fragmentação foram utilizados no processo de identificação putativa dos metabólitos discriminantes, selecionando os íons produtos mais intensos e utilizando o branco para verificação. A Tabela 18 exhibe os resultados obtidos para a fragmentação dos *features* selecionados para cada bv.

Tabela 18 – Valores de m/z do íon precursor, t_R e m/z dos íons produtos obtidos no modo positivo de ionização e no modo de aquisição FS-PRM dos bvs (continua)

Biovar 1			
<i>Features</i>	Íon precursor (m/z)	t_R (min)	Íons produtos (m/z)
M171T14_3	171,11676	14,04	81,06989
			138,63956
			142,13148
M249T11_2	249,06443	10,76	60,78240
			78,63844
			121,15230
			152,22120
			189,14640
M268T10_1	267,61531	9,85	217,10660
			58,65001
			72,08134
			74,13518
			102,15790
			120,79200
M467T15_2	467,20492	14,98	236,11090
			62,98235
			198,96450
			242,95390
			311,08960
			355,07874

Tabela 18 – Valores de m/z do íon precursor, t_R e m/z dos íons produtos obtidos no modo positivo de ionização e no modo de aquisição FS-PRM dos bvs (conclusão)

Biovar 3			
<i>Features</i>	Íon precursor (m/z)	t_R (min)	Íons produtos (m/z)
M118T7_2	118,06536	7,08	63,08582
			80,33710
			94,94374
			112,44930
M286T1	286,13949	0,88	70,06572
			86,06050
			114,09156
			202,93976
M308T17_2	308,22757	16,68	89,40213
			116,88580
			131,82570
			232,21530
			264,03300
			300,42100
Biovar 9			
<i>Features</i>	Íon precursor (m/z)	t_R (min)	Íons produtos (m/z)
M175T1_11	175,04508	0,90	76,98861
			84,96093
			96,20053
			164,96637
M361T16_3	361,27103	15,63	173,98697
			227,91353

Fonte: Elaborada pela autora.

Abaixo, estão os cromatogramas obtidos a partir da fragmentação de cada íon precursor apresentado na Tabela 18.

A

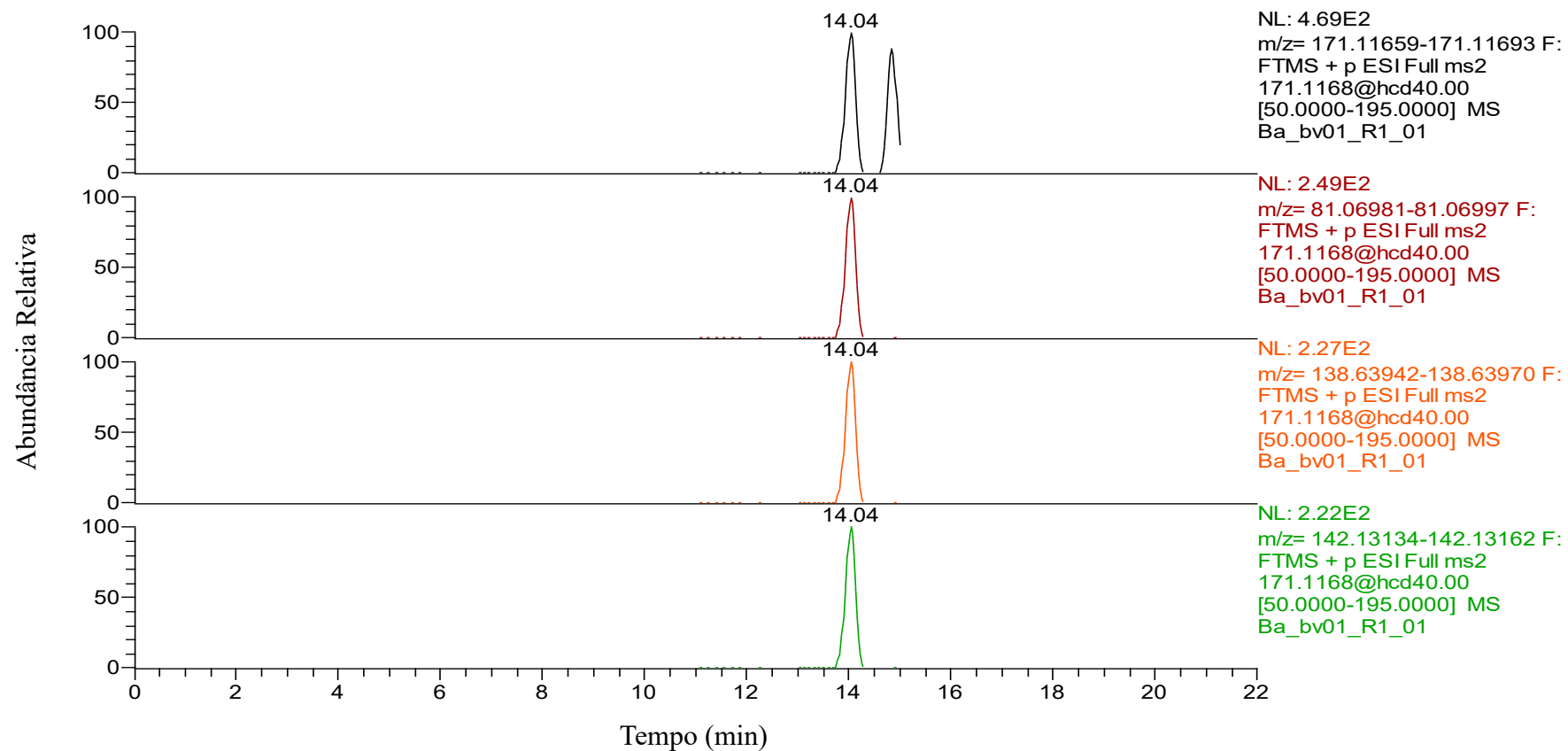


Figura 34 – Cromatogramas e fragmentos dos bvs obtidos no UHPLC-Q-Orbitrap no modo positivo de ionização e no modo de aquisição combinado FS-PRM (continua)

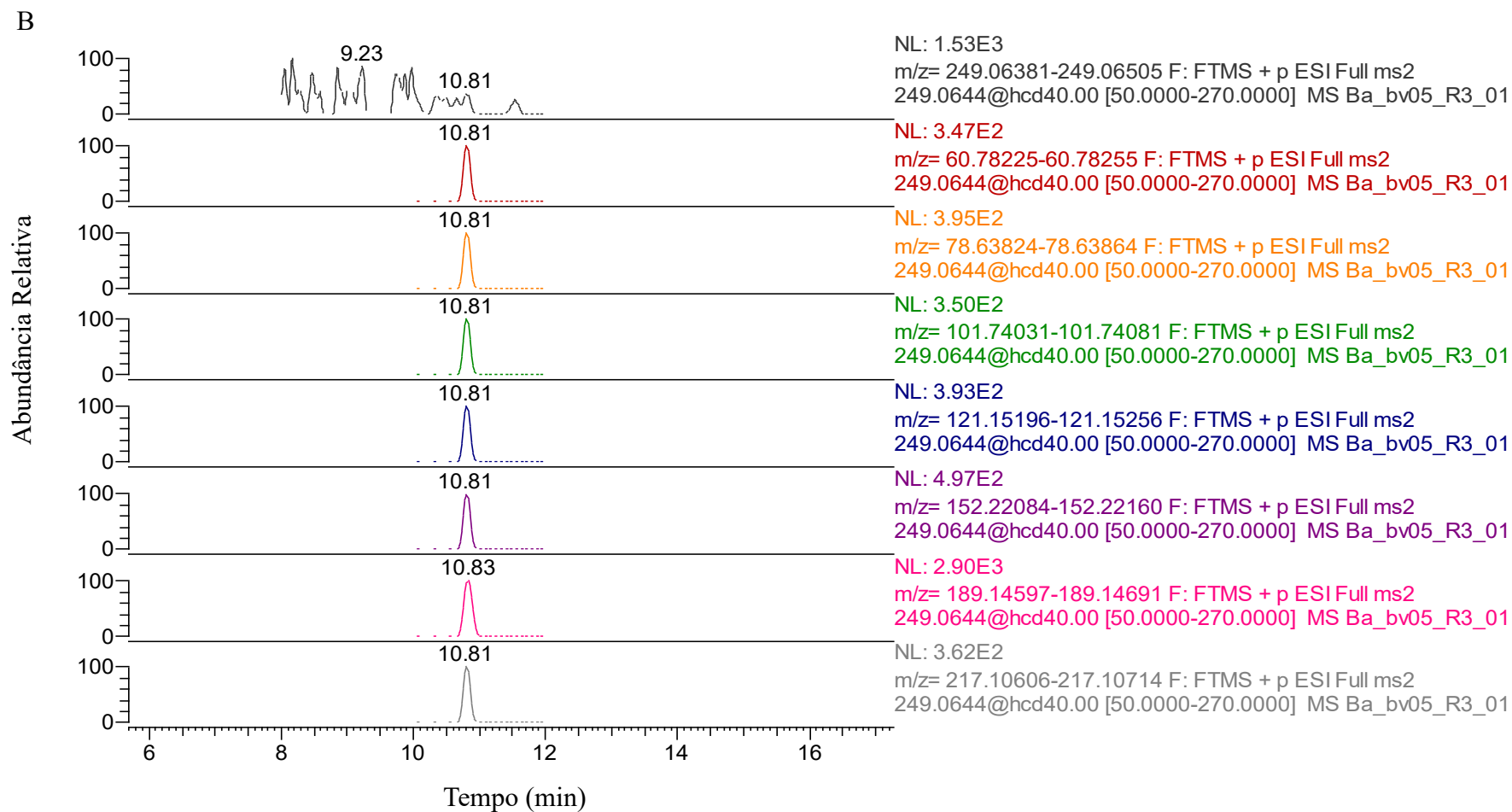


Figura 34 – Cromatogramas e fragmentos dos bvs obtidos no UHPLC-Q-Orbitrap no modo positivo de ionização e no modo de aquisição combinado FS-PRM (continuação)

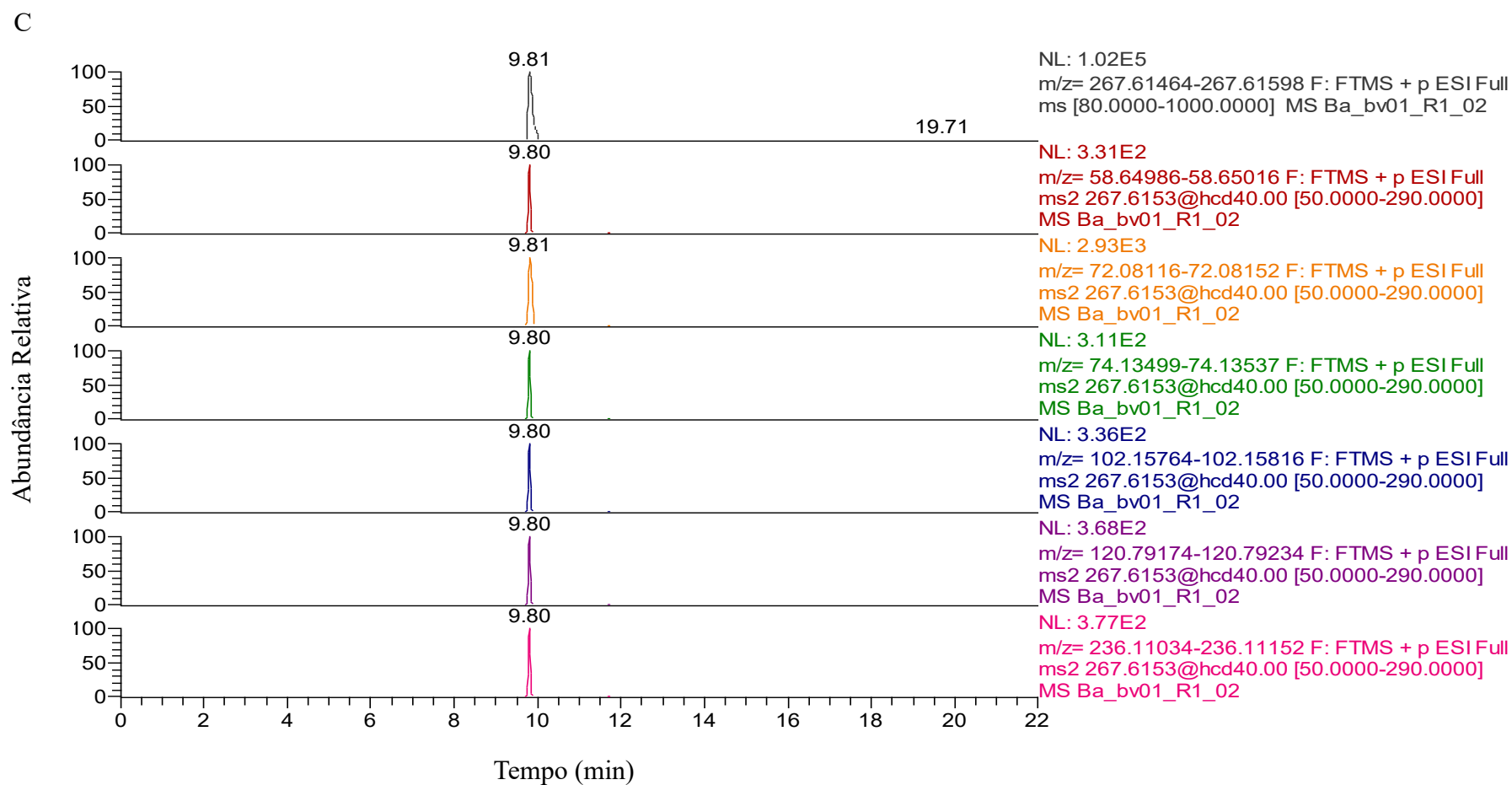


Figura 34 – Cromatogramas e fragmentos dos bvs obtidos no UHPLC-Q-Orbitrap no modo positivo de ionização e no modo de aquisição combinado FS-PRM (continuação)

D

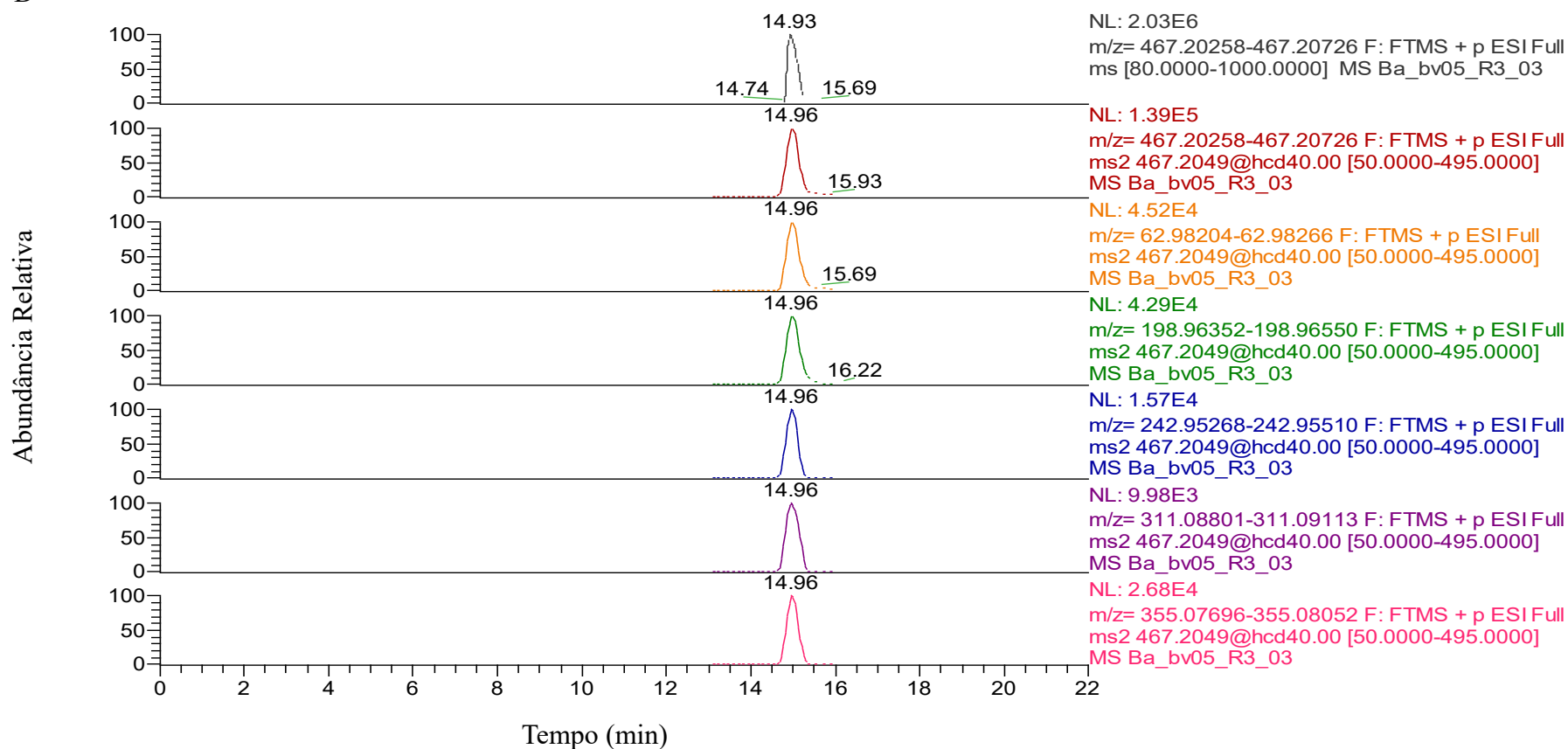


Figura 34 – Cromatogramas e fragmentos dos bvs obtidos no UHPLC-Q-Orbitrap no modo positivo de ionização e no modo de aquisição combinado FS-PRM (continuação)

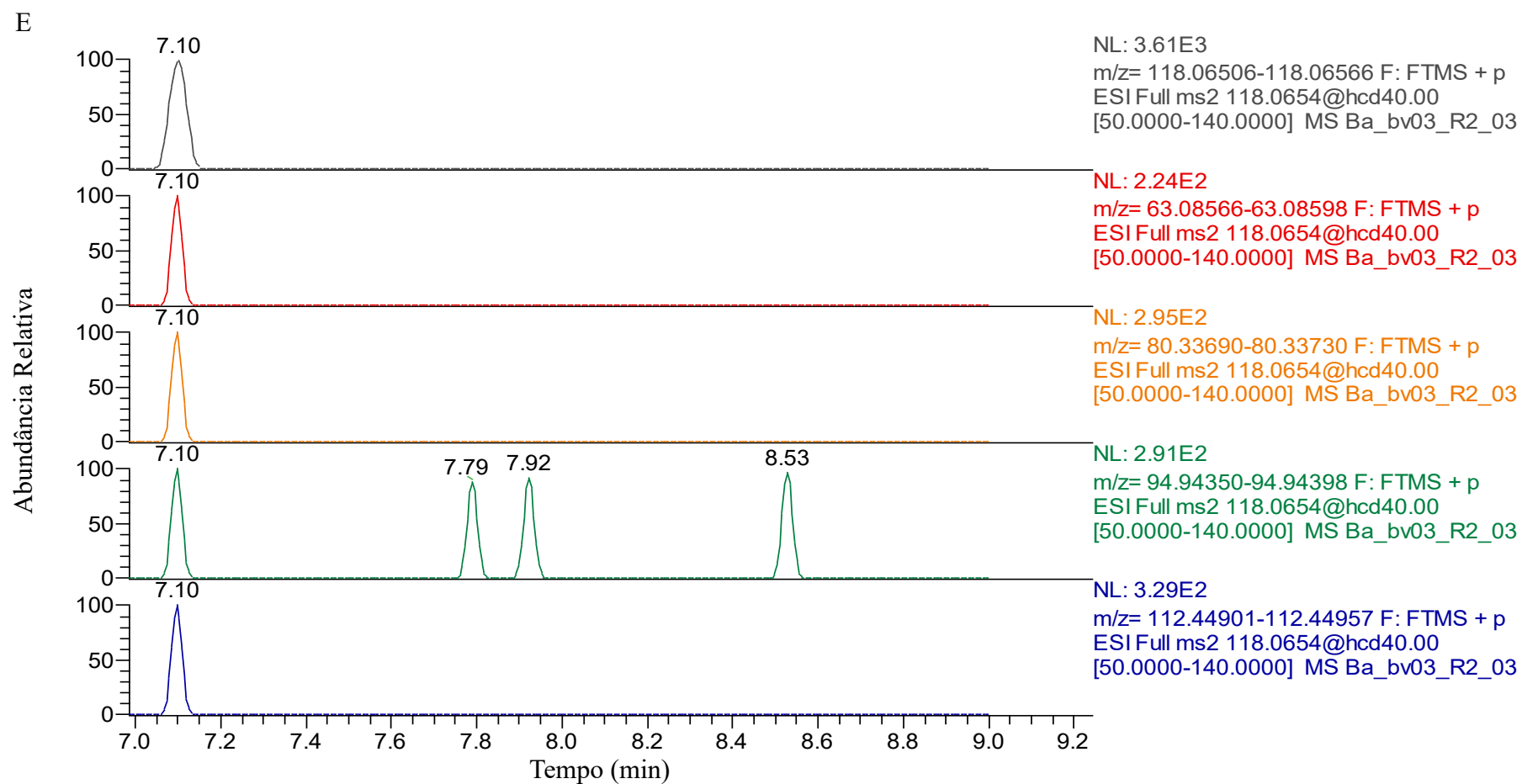


Figura 34 – Cromatogramas e fragmentos dos bvs obtidos no UHPLC-Q-Orbitrap no modo positivo de ionização e no modo de aquisição combinado FS-PRM (continuação)

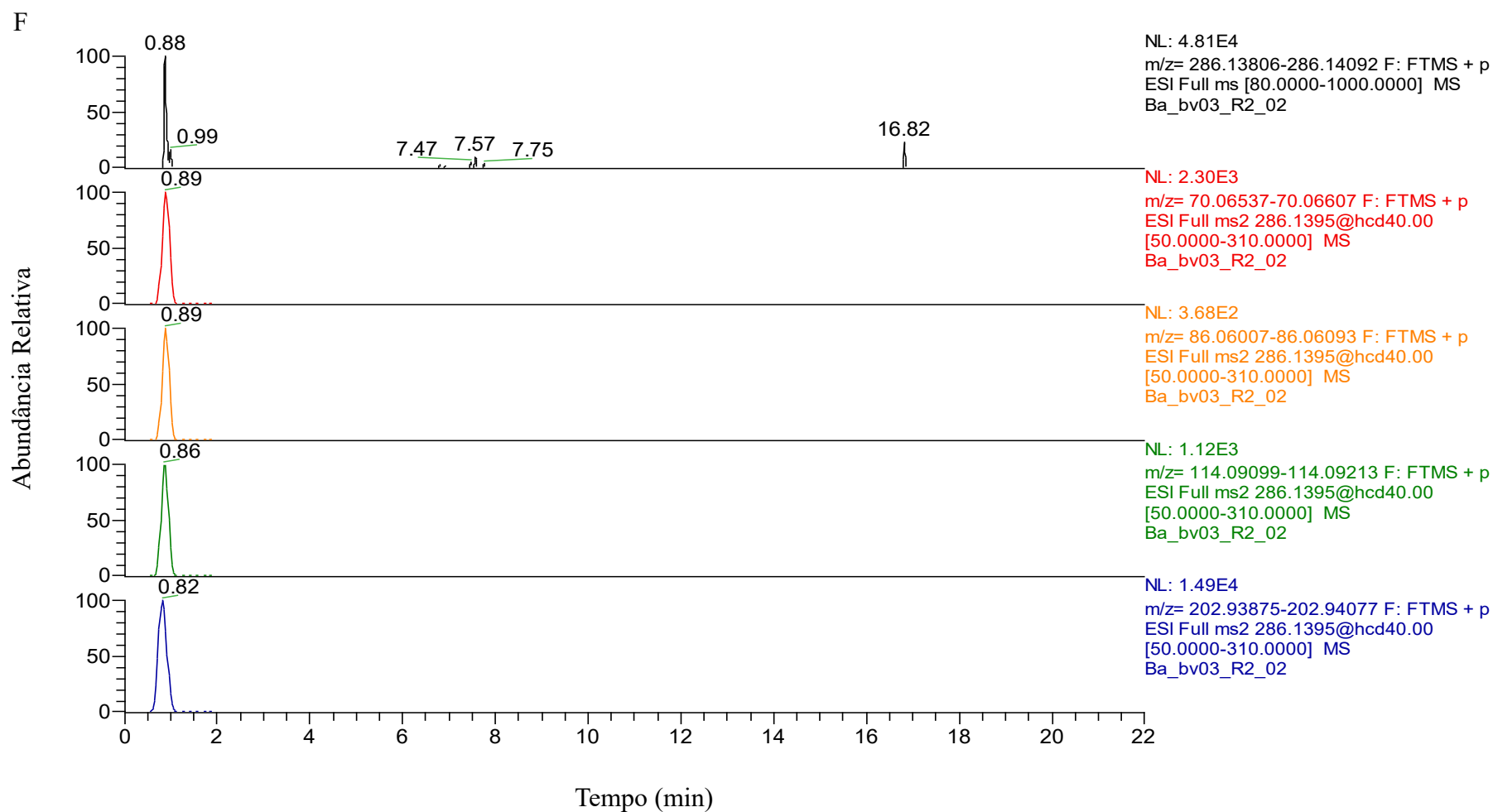


Figura 34 – Cromatogramas e fragmentos dos bvs obtidos no UHPLC-Q-Orbitrap no modo positivo de ionização e no modo de aquisição combinado FS-PRM (continuação)

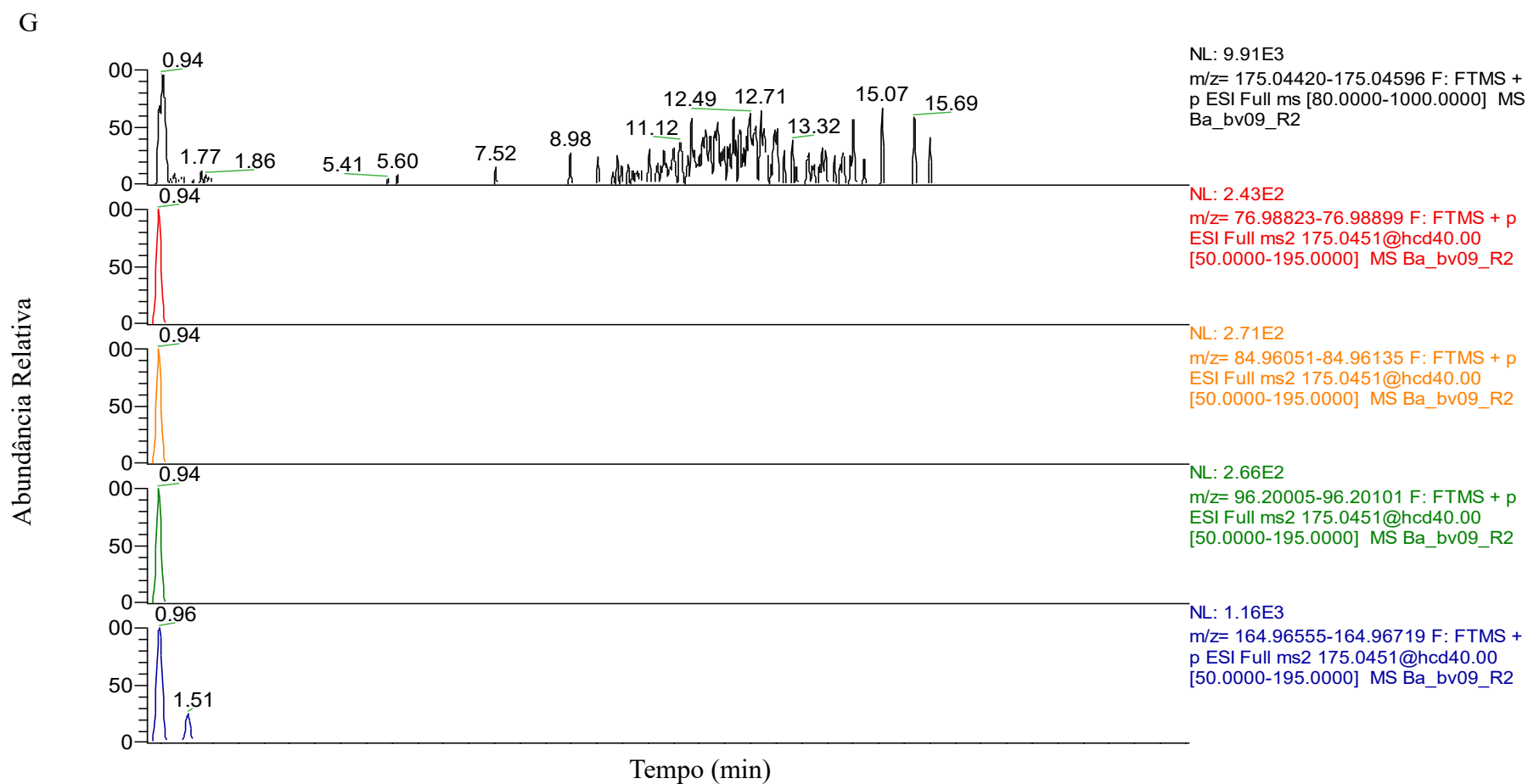


Figura 34 – Cromatogramas e fragmentos dos bvs obtidos no UHPLC-Q-Orbitrap no modo positivo de ionização e no modo de aquisição combinado FS-PRM (continuação)

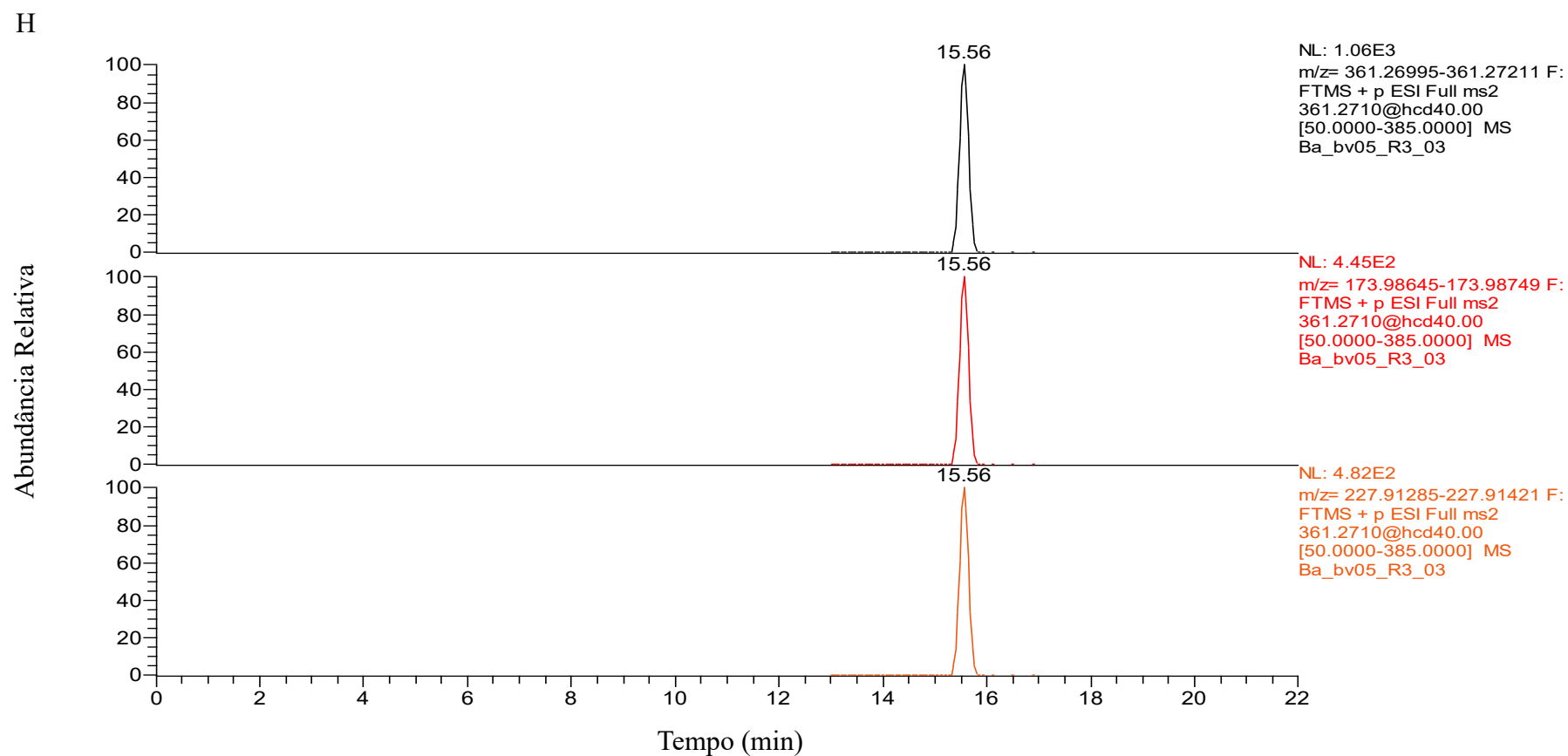


Figura 34 – Cromatogramas e fragmentos dos bvs obtidos no UHPLC-Q-Orbitrap no modo positivo de ionização e no modo de aquisição combinado FS-PRM (conclusão)

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A) Íon precursor (m/z) 171,11676; B) Íon precursor (m/z) 249,06443; C) Íon precursor (m/z) 267,61531; D) Íon precursor (m/z) 467,20492; E) Íon precursor (m/z) 118,06536; F) Íon precursor (m/z) 286,13949; G) Íon precursor (m/z) 175,04508; H) Íon precursor (m/z) 361,27103.

Para anotação dos compostos nos estudos metabolômicos *untarget* é muito importante realizar uma verificação cuidadosa dos dados obtidos das plataformas analíticas tais como m/z , t_R , MS^2 , perfil do cromatograma, bem como avaliar os resultados das correspondências dos compostos obtidos dos bancos de dados. Tal avaliação não pode ser simplista, pois ocasiona na anotação de compostos sem sentido biológico para o organismo em estudo, levando a erros tanto na construção de hipóteses para trabalhos futuros, quanto para respostas biológicas sem sentido (Theodoridis *et al.*, 2023). Desse modo, nessa etapa do trabalho, algumas plataformas que possibilitam correlacionar os valores de m/z dos metabólitos discriminantes, determinados na combinação de uni e multianálises estatísticas, com banco de dados públicos foram utilizadas. O *CEU Mass Mediator* é um recurso eletrônico que utiliza vários bancos de dados (KEGG, HMDB, LipidMaps, Metlin, NP Atlas, KNApSAcK, MINE, além de uma biblioteca interna) para realizar pesquisa de metabólitos. A plataforma HMDB também possui outros bancos de dados (KEGG, PubChem, MetaCyc, ChEBI, PDB, UniProt e GenBank) para encontrar correspondência com compostos. Ambos realizam as buscas utilizando os valores de m/z obtidos na análise por MS. Nessa pesquisa, os *features* significativos foram identificados putativamente utilizando os íons de m/z , adquiridos em equipamento de alta resolução, para realizar buscas no banco de dados dessas duas plataformas. Os resultados obtidos por meio dessas plataformas estão dispostos na Tabela 19.

As plataformas CFM-ID e MetFrag foram utilizadas para realizar a anotação dos metabólitos discriminantes pela correlação dos espectros MS^2 , obtidos na fragmentação experimental, com os espectros presentes em suas bibliotecas espectrais *in silico*. Os resultados das buscas nessas plataformas estão apresentados na Tabela 19.

O programa Compound Discoverer foi utilizado para complementar e reforçar alguns dos resultados obtidos anteriormente. Aos dados foi aplicado um recurso para avaliação da distribuição isotópica (Figura 35) para auxiliar na identificação putativa dos compostos. Os resultados adquiridos nesse software também estão exibidos na Tabela 19.

Tabela 19 – Identificação putativa dos *features* discriminantes de cada bv (continua)

Biovar 1						
Íon (<i>m/z</i>)	Aduto	Erro <i>m/z</i> (ppm)	Nível de identificação	Nome	Fórmula molecular	Plataforma
171,11676	M+H	0,39	3	1,6,7-trimetilnaftaleno Aethusin	C ₁₃ H ₁₄	HMDB e CFM-ID CEU Mass Mediator, CFM-ID, MetFrag e Compound Discoverer
249,06443	M+H	3,80	3	Piridoxamina-5-fosfato	C ₈ H ₁₃ N ₂ O ₅ P	CEU Mass Mediator, HMDB, CFM-ID e MetFrag
267,61531	M+H+2Na	1,06	3	Glicerofosfolipídios (GP)	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ P	CEU Mass Mediator e HMDB
	M+Na	1,92	4	Austalide J	C ₂₅ H ₃₂ O ₇	CEU Mass Mediator e HMDB
467,20492				carapin-8 (9)-eno		CEU Mass Mediator e CFM-ID
	M+H	3,23	4	eriotrioquina pumilaisoflavona C	C ₂₇ H ₃₀ O ₇	CEU Mass Mediator e MetFrag

Tabela 19 – Identificação putativa dos *features* discriminantes de cada bv (conclusão)

Biovar 3						
Íon (<i>m/z</i>)	Aduto	Erro <i>m/z</i> (ppm)	Nível de identificação	Nome	Fórmula molecular	Plataforma
118,06536	M+H	1,99	3	Indol	C ₈ H ₇ N	CEU Mass Mediator, HMDB, CFM-ID, MetFrag e Compound Discoverer
286,13949	M+H	0,90	4	Classe de oligopeptídeos	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₅	CEU Mass Mediator, HMDB
	M+H-H ₂ O	2,95		Classe de peptídeos	C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₆	
308,22757	M+3Na	7,53	3	Glicerofosfolipídios	C ₅₀ H ₉₈ NO ₇ P	CEU Mass Mediator e HMDB
Biovar 9						
Íon (<i>m/z</i>)	Aduto	Erro <i>m/z</i> (ppm)	Nível de identificação	Nome	Fórmula molecular	Plataforma
175,04508	M+H-H ₂ O	8,00	3	6-(aliltio)purina	C ₈ H ₈ N ₄ S	CEU Mass Mediator
361,27103	M+2H	4,18	3	Glicerofosfolipídios	C ₃₉ H ₇₇ O ₉ P	HMDB

Fonte: Elaborada pela autora.

O perfil isotópico (Figura 35), gerado pelo programa Compound Discoverer, foi utilizado para auxiliar na identificação putativa de dois íons. A Figura 35A corresponde à distribuição isotópica do íon de m/z de 467,20492 e a 35B ao íon de m/z de 118,06536. As colunas em azul indicam que os isótopos dos íons precursores foram detectados e as colunas verdes menores indicam sinais correspondentes à massa exata dos isotopólogos que foram detectados.

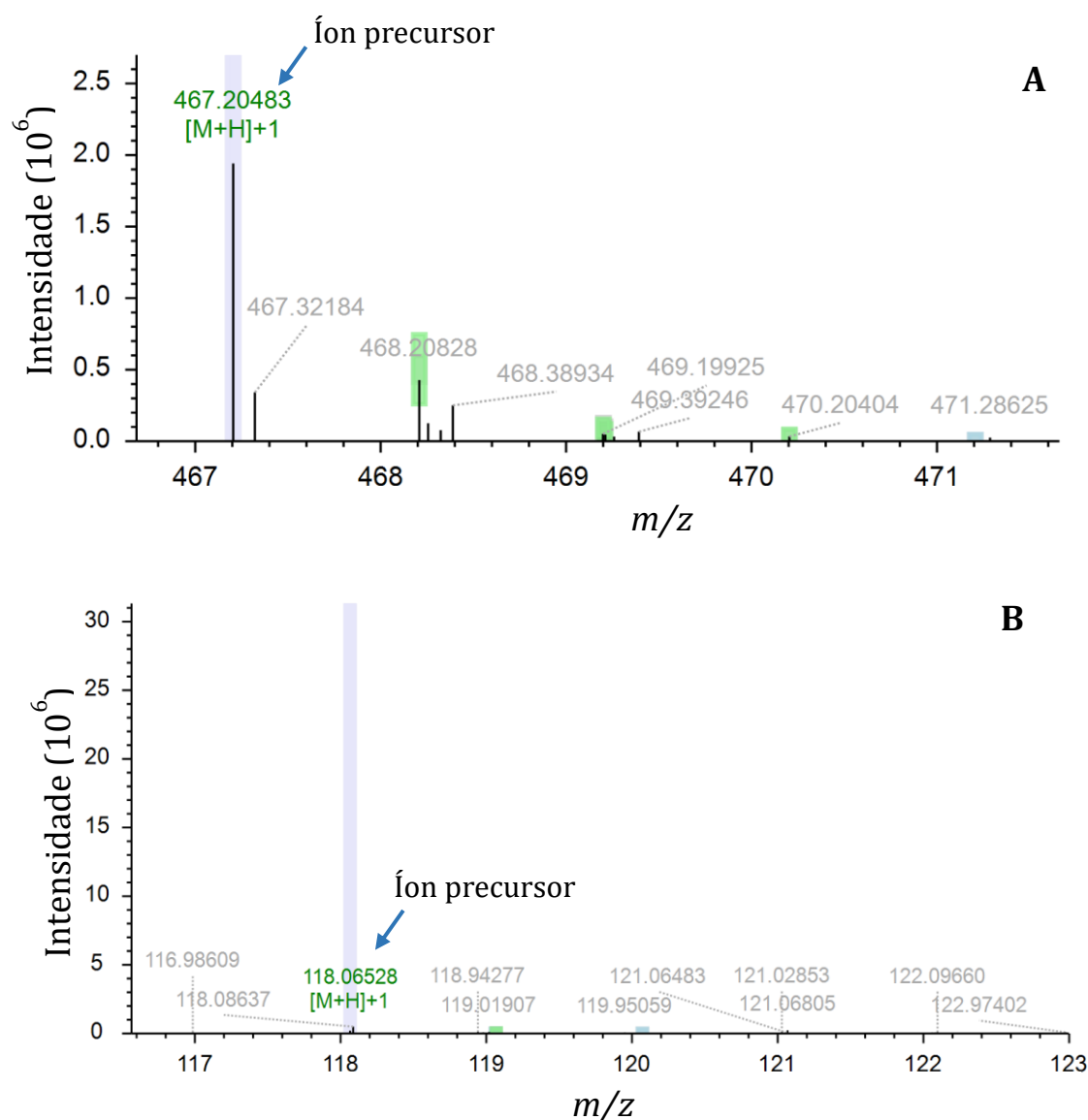


Figura 35 – Distribuição isotópica obtida no Compound Discoverer para os íons de m/z de 467,20492 (bv1) e m/z de 118,06536 (bv3)

Fonte: Compound Discoverer.

Uma outra ferramenta empregada para identificação putativa dos metabólitos foi o sequenciamento de proteínas. A plataforma do NCBI possui um banco de dados com sequências de proteínas identificadas em vários estudos, por meio das quais foram obtidas informações funcionais relacionadas à proteína de interesse, utilizando a Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* – <https://www.uniprot.org/blast>). A BLAST realiza comparações de sequências tanto de nucleotídeos quanto de proteínas com bancos de dados, além de cálculos de significância estatística dos resultados. Nessas plataformas, também foi possível encontrar informações sobre proteínas expressas pelo genoma de algumas cepas da bactéria *Brucella*, e correlacioná-las com os resultados dos compostos identificados putativamente. As informações sobre o sequenciamento das proteínas estão dispostas na Tabela 20. Todas as informações sobre as proteínas foram extraídas dos dados fornecidos pelo sequenciamento da *B. abortus* bv 1 da cepa de referência 2308, frequentemente utilizada em pesquisas (Al Dahouk *et al.*, 2017).

Da comparação entre *B. abortus* bv 1 (cepa 2308) e bv 5 (cepa B3196), o íon de m/z de 249,06443 apresentou-se diminuído no bv 1 em relação ao bv 5 (Figura 36). Esse *feature* alterado foi identificado putativamente como piridoxamina 5'-fosfato. O composto piridoxal 5'-fosfato é um cofator fundamental em diversos processos enzimáticos e corresponde a uma das espécies interconvertíveis da vitamina B6, piridoxal, piridoxina, piridoxamina e suas formas 5'-fosfato. É um metabólito produzido por plantas, bactérias, arqueobactérias, fungos e protistas, sendo relacionado tanto à sobrevivência quanto à virulência de bactérias patógenas.

Na conferência da sequência de proteínas da cepa de referência 2308 na BLAST, a sequência da proteína piridoxina/piridoxamina 5'-fosfato oxidase foi descrita para *B. abortus* bv 1 (cepa 2308). Essa proteína catalisa a oxidação de piridoxina 5'-fosfato ou piridoxamina 5'-fosfato em piridoxal 5'-fosfato e está envolvida no metabolismo de cofatores, recuperação de piridoxal 5'-fosfato e piridoxal 5'-fosfato de piridoxamina 5'-fosfato (Belitsky, 2004; Denise *et al.*, 2023; Nodwell *et al.*, 2014; UniProt, 2023; Wetzal *et al.*, 2004). As células empregam uma via de recuperação em que a coenzima piridoxal liberada da renovação enzimática é utilizada novamente, ou seja, ocorre um processo de reciclagem (Belitsky, 2004; Denise *et al.*, 2023; Nodwell *et al.*, 2014). De acordo com tais pesquisas, nossos estudos apontam que o bv 5 pode ter essa via metabólica de produção de cofatores com maior expressão desse composto, ou que o bv 1 possui um processo de reciclagem da coenzima piridoxal mais acentuado, causando a redução desse composto no metabolismo de cofatores.

Na pesquisa de Nodwell e colaboradores (2014), estudos bioquímicos da enzima *Staphylococcus aureus* riboquinase (SaThiD) foram relatados, demonstrando uma atividade significativa para piridoxal e para o precursor de tiamina HMP. A pesquisa indicou que essa riboquinase possuía uma função dupla de resgate de piridoxal e de biossíntese de tiamina. Os apontamentos sobre a elucidação de estrutura e mecanismo bioquímicos oferecem oportunidades para encontrar um inibidor que prejudique a via bacteriana de recuperação da vitamina B6 e para um novo alvo (Nodwell *et al.*, 2014).

As bactérias Gram-negativas, como *B. abortus*, possuem em seu genoma genes responsáveis pela codificação de enzimas similares às encontradas em uma via de síntese *de novo* de piridoxal 5'-fosfato, apresentada pelo autor Belitsky (2004).

No período de 1935 a 1945, o papel essencial do cofator piridoxal 5'-fosfato nas reações enzimáticas e no crescimento dos organismos foi determinado. Após cerca de 80 anos, a descoberta de novas doenças relacionadas à homeostase do piridoxal 5'-fosfato ainda despertam a atenção da comunidade científica, por preencherem lacunas da área metabólica. Muitas questões nessa área clássica precisam ser desvendadas, por exemplo, descobrir quais são os transportadores da vitamina B6 para grande maioria das espécies. Esses transportadores são desconhecidos até mesmo para microrganismos mais estudados, como *Bacillus subtilis* e *coli*. Tais estudos demonstram a relevância de estudos metabolômicos, que ajudem a entender mecanismos bioquímicos de microrganismos e a direcionar novas estratégias para coibir a ação desses patógenos, evitando a evolução da doença e permitindo até mesmo a sua prevenção (Belitsky, 2004; Denise *et al.*, 2023; Nodwell *et al.*, 2014).

Baseando-se nesses dados, os resultados apontam que os bvs da *B. abortus* possuem vias metabólicas relacionadas ao piridoxal e demonstram que existem alterações significativas do composto piridoxamina 5'-fosfato nessas vias. Como o metabólito anotado foi discriminante na separação dos bvs 1 e 5, pesquisas futuras dessas vias podem auxiliar no desenvolvimento de vacinas ou medicamentos voltados para cada bv.

Da comparação entre o bv 3 (cepa Tulya) e o bv 5 (cepa B3196), o íon de m/z de 118,06536 teve os níveis diminuídos no bv 3 em relação ao bv 5 (Figura 36), sendo o composto indol anotado para esse íon. Para verificar a possibilidade da presença desse metabólito no sistema em estudo, foi realizada na BLAST a busca por sequências de proteínas relacionadas a esse metabólito. A presença da proteína indol-3-glicerol fosfato sintase na cepa de referência *B. abortus* bv 1 (cepa 2308) contribui para anotação desse composto. Essa proteína é responsável pela biossíntese do aminoácido L-triptofano de corismato, que é convertido em

indol pela enzima triptofanase. O indol é um metabólito produzido e secretado por diversas bactérias, como *E. coli*, e descrito como responsável pela sinalização intra e intercelular. Além disso, Bommarius *et al.* (2013) avaliaram a relação de uma família de indóis com a regulação da virulência e produção de toxina pela *E. coli* patogênica, causadora de diarreia (Shiga), e os resultados revelaram que os compostos de indol são responsáveis por regularem vários processos bacterianos relacionados à patogenicidade (Bommarius *et al.*, 2013; Nikaido *et al.*, 2012; UniProt, 2023; Zarkan *et al.*, 2020).

Existe um fenômeno que ocorre nas bactérias, conhecido como *quorum sensing* (QS), em que as bactérias utilizam sinais químicos auto indutores para se comunicarem, monitorando e coordenando a expressão do genoma. Esse mecanismo depende da densidade celular (população), que é medida pelo acúmulo de sinais no meio de crescimento, e determinante para que as reações ocorram entre as bactérias, ou seja, o QS funciona como um sistema regulador. Esse sistema de comunicação é fundamental para expressão de genes e de fenótipos capazes de controlar a patogenicidade da doença, revertendo a resposta imune do hospedeiro. O QS controla diferentes processos, tais como: transferência de DNA, conjugação, esporulação, diferenciação, bioluminescência, motilidade, maturação de biofilme, produção de fatores de virulência e de defesa. Em estudos sobre *E. coli* patogênica, o metabólito indol revelou ser uma importante molécula de sinalização celular no processo de resistência a antibióticos expresso na população (Biswas *et al.*, 2015; Bommarius *et al.*, 2013; Nikaido *et al.*, 2012; Zarkan *et al.*, 2020). Estudos como de Biswas e colaboradores (2015) sugerem, como alternativa ao combate de doenças bacterianas, a interferência ou o bloqueio do QS para evitar a formação de biofilmes ou interferir na virulência, utilizando indol como inibidor de QS (Biswas *et al.*, 2015).

Estudos evidenciaram que as bactérias da espécie *B. abortus*, em condições microaeróbicas, como no seu nicho de replicação, são capazes de formar biofilme. O biofilme é um processo de sobrevivência pelo qual bactérias recalcitrantes são capazes de sobreviver em ambientes mais hostis, tornando-se mais tolerantes. A formação do biofilme é complexa e sofre diferenciações devido a fatores ambientais e à comunicação celular que provocam alterações no seu estágio de crescimento. Por ser um mecanismo de sinalização celular, o QS é fundamental para produção de biofilme, mas existem outros sistemas de sinalização que favorecem o desenvolvimento do biofilme (Dubois-Brissonnet, 2018; Kim; Lee, 2016; Tang *et al.*, 2020, 2021; Yin *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos por esse estudo possibilitam a elaboração de novas hipóteses a serem testadas e aprimoradas, focadas em entender as vias metabólicas envolvidas na produção

do indol e como essas vias influenciam na formação de biofilme. Esse entendimento permitirá compreender com mais detalhamento a virulência das bactérias desse gênero e o seu processo de sobrevivência, contribuindo para novos tratamentos para brucelose com relevância clínica, para a produção mais segura de antimicrobianos e de vacinas que não tenham restrições para aplicação em fêmeas bovinas prenhas e que não apresentem virulência residual em seres humanos (Biswas *et al.*, 2015; Bommarius *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2020; Poetsch; Marchesini, 2020; Zarkan *et al.*, 2020).

Outro metabólito discriminante da comparação e anotado para o *B. abortus* bv 9 (cepa C68) foi 6-(aliltio)purina, cujo íon de m/z de 175,04508 teve os níveis diminuídos no bv 9 em relação ao bv 5. Ele está relacionado à proteína de biossíntese de purina bifuncional, responsável pelo metabolismo das purinas sequenciadas na *B. abortus* bv 1 (cepa 2308), por meio da BLAST (UniProt, 2023).

As bactérias realizam biossíntese de ácido fólico (folato), que está relacionado com vias bioquímicas de vários metabólitos, tais como purina, timina, metionina, glicina e com processos de tradução. O metabolismo das purinas está envolvido em múltiplos processos biológicos, incluindo produção de biofilme, virulência no período de infecção, tolerância ao estresse externo ou alterações ambientais, além de atuar para resistência do microrganismo aos antibióticos. O metabolismo das purinas desperta o interesse dos pesquisadores por atuar em várias vias importantes relacionadas com o desenvolvimento da infecção nos hospedeiros. (Nolan *et al.*, 2022; Stepanek *et al.*, 2016; Wang; Bian; Wang, 2022; Wang *et al.*, 2021a).

Os íons de m/z de 267,6153 (*B. abortus* bv 1), 308,22757 (*B. abortus* bv 3) e 361,27103 (*B. abortus* bv 9) foram associados à classe de lipídios, glicerofosfolípido. A sequência da proteína fosfatidilglicerol:prolipoproteína diacilgliceriltransferase também está presente na *B. abortus* bv 1 (cepa 2308). Ela possui a função de catalisar a transferência do grupo diacilgliceril do fosfatidilglicerol para o grupo sulfidrilo da cisteína *N*-terminal de uma prolipoproteína, sendo a primeira etapa responsável pela formação de lipoproteínas maduras (UniProt, 2023).

As bactérias possuem uma membrana composta por vários lipídios hidrofóbicos de diferentes categorias, tais como ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolípídios, esfingolipídios, lipídios esteróis, lipídios prenol, sacarolipídios e policetídeos. Essa classificação foi realizada pela plataforma LipidMaps, de acordo com as origens relacionadas à biossíntese e à estrutura química do lipídio. Porém, existem algumas bactérias que conseguem produzir glicerofosfolípídios como glicerofosfocolinas, as fosfatidilcolinas, e glicerofosfoinoistóis, os fosfatidilinositóis. As moléculas de glicerofosfolípídios possuem um

grupo fosfato (ou fosfonato) e existe uma grande diversidade de glicerofosfolipídios com diferentes grupos de cabeça, que são sintetizados por bactérias distintas (Ryan; Joyce; Clarke, 2023).

A grande maioria dos lipídios possuem importante papel na estrutura das membranas bacterianas. Entretanto, estudos mostraram que alguns lipídios (glicerofosfolipídios, *N*-acil aminas e esfingolipídios), sintetizados por microrganismos presentes no intestino humano, se comportaram como ligantes para receptores do hospedeiro, tais interações podem auxiliar no entendimento da interação hospedeiro-patógeno, pois o conhecimento de todas as funções dos lipídios nas bactérias ainda é muito restrito (Ryan; Joyce; Clarke, 2023).

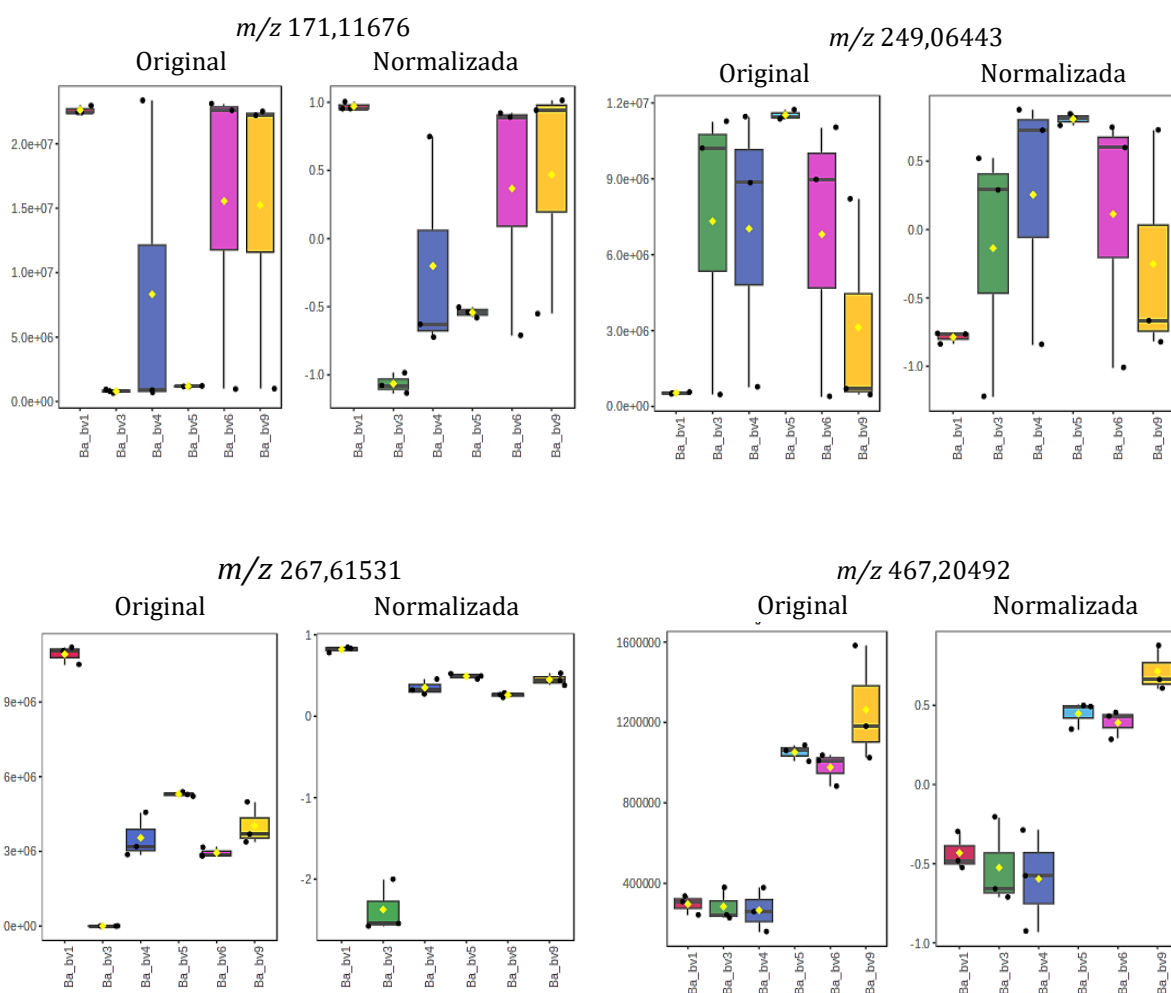


Figura 36 – Boxplot dos compostos identificados putativamente obtidos no tratamento estatístico no MetaboAnalyst (continua)

Fonte: MetaboAnalyst.

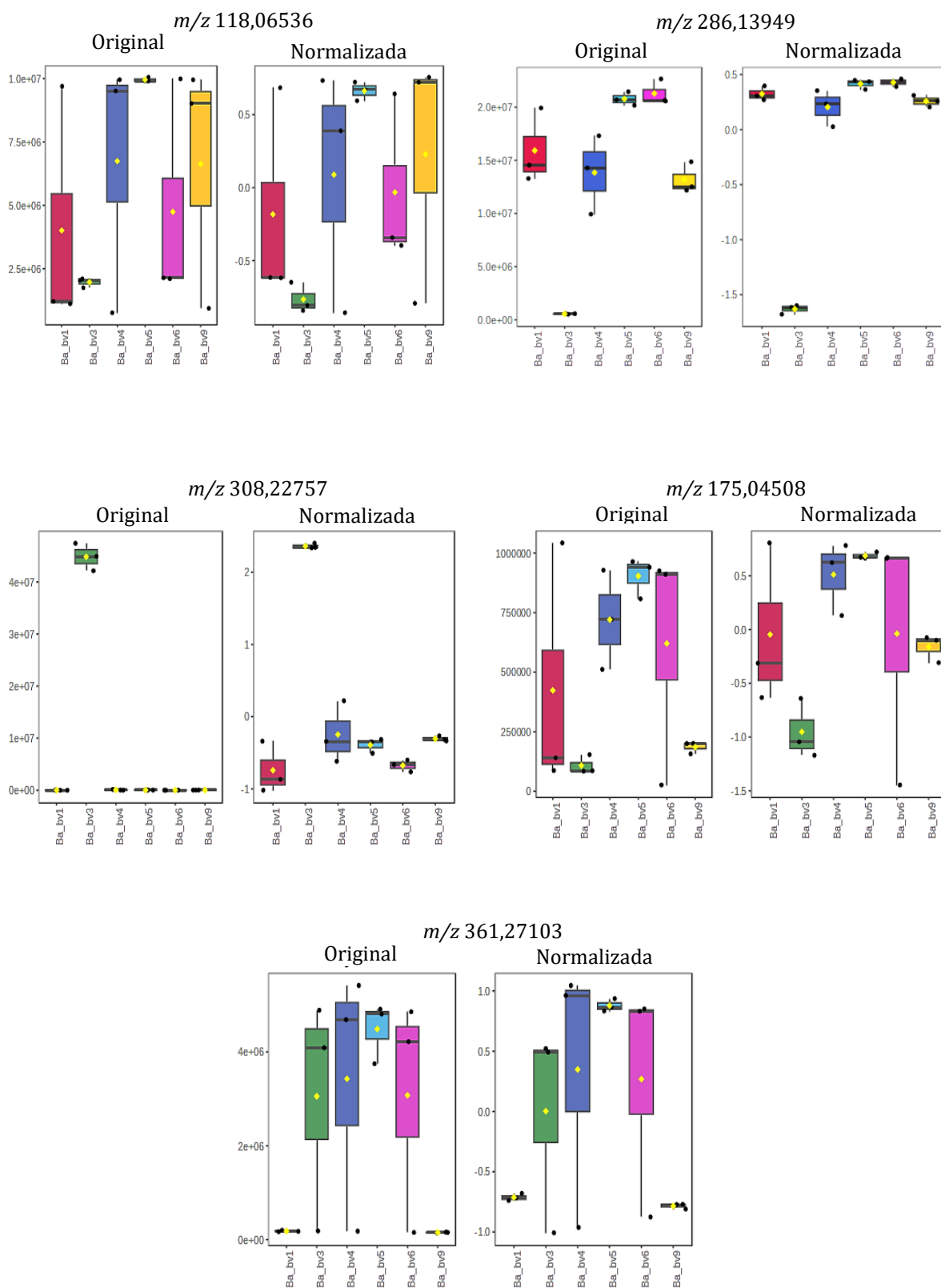


Figura 36 – Boxplot dos compostos identificados putativamente obtidos no tratamento estatístico no MetaboAnalyst (conclusão)

Fonte: MetaboAnalyst.

Tabela 20 – Informações sobre o sequenciamento das proteínas encontradas na *B. abortus* bv 1 – cepa C2308 (continua)

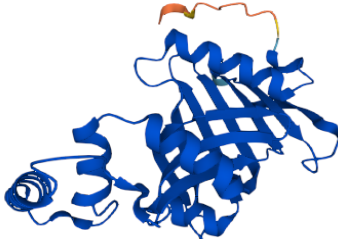
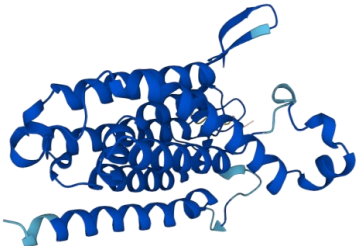
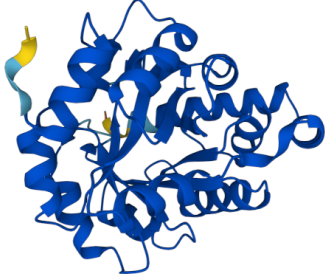
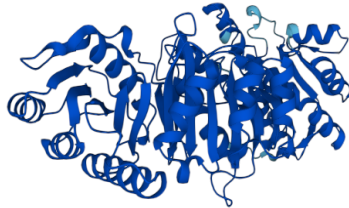
Metabólito putativo	Nome da Proteína	^a Gene/Lócus	Organismo	^b Estrutura
Piridoxamina 5'-fosfato	Piridoxina/piridoxamina 5'-fosfato oxidase	pdxH/BAB1_0444	<i>B. abortus</i> , bv 1 (cepa 2308)	
Glicerofosfolípidios	Fosfatidilglicerol–prolipoproteína diacilgliceriltransferase	Lgt/BAB1_1544	<i>B. abortus</i> , bv 1 (cepa 2308)	
Indol	Indol-3-glicerol fosfato sintase	trpC/BAB1_1164	<i>B. abortus</i> , bv 1 (cepa 2308)	

Tabela 20 – Informações sobre o sequenciamento das proteínas encontradas na *B. abortus* bv 1 – cepa C2308 (conclusão)

Metabólito putativo	Nome da Proteína	^a Gene/Lócus	Organismo	^b Estrutura
6-(alíltio)purina	Proteína de biossíntese de purina bifuncional PurH	purH/BAB1_1824	<i>B. abortus</i> , bv 1 (cepa 2308)	

Fonte: UniProt (2023) e AlphaFold (2023).

^aDados referentes ao cromossomo I.

^bConfiança no modelo: ■ Muito alto (pLDDT > 90); ■ Confiante (90 > pLDDT > 70); ■ Baixo (70 > pLDDT > 50); ■ Muito baixo (pLDDT < 50). AlphaFold produz uma pontuação de confiança por resíduo (pLDDT) entre 0 e 100. Algumas regiões com baixo pLDDT podem ser desnaturadas isoladamente.

4.4 CONCLUSÃO

O protocolo de extração otimizado associado a detecção por UHPLC-Q-Orbitrap, nesse estudo pioneiro, permitiram a extração de metabólitos intracelulares e a identificação putativa dos *features* utilizando dados de alta resolução e espectros de MS². Diferentes plataformas para processamento e tratamento dos dados foram utilizadas de forma complementar, para obter uma boa cobertura de resultados. As informações foram cruzadas para comparar e selecionar os compostos com sentido biológico para o sistema bacteriano em estudo, possibilitando a anotação dos compostos com nível de identificação de 3 e 4 (Tabela 19). Desse modo, vários compostos com sequência de proteínas descritas, na cepa de referência 2308 da *B. abortus* bv 1, foram selecionados e discutidos nesse estudo.

Com base nos resultados obtidos, esse estudo metabolômico *untarget* permitiu perceber que as atividades metabólicas são diferentes entre os bvs e que o bv 3 apresentou uma discriminação distinta. Pela análise dos gráficos de boxplot (Figura 36) foi possível observar as alterações nos níveis dos metabólitos nos bvs. O presente estudo permitiu uma avaliação preliminar da atividade metabólica, e poderá ajudar a realizar uma identificação sem equívocos dos bvs da *B. abortus*, superando as limitações dos métodos bioquímicos convencionais. Essa diferenciação também promoverá a identificação de metabólitos alterados envolvidos nos processos de virulência, resistência e crescimento bacteriano, podendo contribuir para o desenvolvimento de medicamentos e de ferramentas para diagnóstico e combate da doença.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Até o momento, pouco se sabe sobre as alterações metabólicas da bactéria do gênero *Brucella*, a maioria dos estudos são na área da genômica, transcriptômica ou proteômica. O presente estudo utilizou a metabolômica *untarget*, geradora de hipóteses e exploratória, por fornecer uma nova abordagem para investigar os processos metabólicos. Desse modo, um estudo piloto foi desenvolvido para conhecer a amostra bacteriana, otimizar as etapas de preparo e extração de metabólitos intracelulares, bem como de análise química, tratamento dos dados e interpretação biológica do sistema. Protocolos para preparo e coleta de cepas do gênero *Brucella* e para extração de metabólitos intracelulares, adequados para análises nas plataformas analíticas GC-QTOF-MS e UHPLC-Q-Orbitrap, foram otimizados. Os dados obtidos foram processados em plataformas adequadas para conjuntos complexos e abundantes, e os resultados desses processamentos foram tratados estatisticamente utilizando análises uni e multivariadas. Para identificação/anotação dos *features*, plataformas que possuem bancos de dados públicos foram utilizadas. A interpretação biológica foi realizada com o cruzamento dos dados sobre o sequenciamento de proteínas e posição no gene, que permitiram avaliar os metabólitos anotados e obter informações das vias metabólicas de destaque, envolvidas em diferentes processos dos bvs investigados.

A presente pesquisa apontou que existem diferenças entre os bvs a nível metabólico. Os resultados apresentados são o ponto inicial para outros estudos bacterianos do gênero *Brucella* utilizando abordagem metabolômica. Outras pesquisas para complementarem e definirem os biomarcadores e as vias metabólicas relacionados tanto com a virulência da doença quanto com a diferenciação dos bvs são necessárias. A OMS já citou a brucelose como uma zoonose carente em estratégias tecnológicas e, conseqüentemente, com poucos investimentos para o combate à doença.

Diante disso, esse trabalho mostra-se ainda mais relevante por contribuir para o aprofundamento do conhecimento sobre a brucelose, e fornecer informações que podem contribuir para novos estudos de tecnologias preventivas, diagnósticas e terapêuticas.

Como etapas futuras, a presente pesquisa possui dados analisados no sistema UHPLC-Q-Orbitrap, no modo de ionização negativo, para *B. abortus* e, nos modos positivo e negativo, para as espécies *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis* para serem processados e avaliados. Assim, após o tratamento desses dados, espera-se obter uma melhor compreensão do metaboloma das bactérias do gênero *Brucella*.

REFERÊNCIAS

AGILENT TECHNOLOGIES. **Agilent G1676AA Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library**. User Guide. Santa Clara: Agilent Technologies, 2013a.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Capillary Flow Technology: Backflush**. Reduce run time and increase laboratory throughput. Santa Clara: Agilent Technologies, 2013b.

AL DAHOUK, S.; HOFER, E.; TOMASO, H.; VERGNAUD, G.; LE FLÈCHE, P.; CLOECKAERT, A.; KOYLASS, M. S.; WHATMORE, A. M.; NÖCKLER, K.; SCHOLZ, H. C. Intraspecies Biodiversity of the Genetically Homologous Species *Brucella microti*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1534-1543, 2012.

AL DAHOUK, S.; KÖHLER, S.; OCCHIALINI, A.; BAGÜÉS, M. P. J.; HAMMERL, J. A.; EISENBERG, T.; VERGNAUD, G.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; MELZER, F.; DREES, K. P.; FOSTER, J. T.; WATTAM, A. R.; SCHOLZ, H. C. *Brucella* spp. Of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-17, 2017.

AL DAHOUK, S.; SCHOLZ, H. C.; TOMASO, H.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; KARGES, W.; APPEL, B.; HENSEL, A.; NEUBAUER, H.; NÖCKLER, K. Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 269, p. 1-12, 2010.

ALLEN, F.; PON, A.; GREINER, R.; WISHART, D. Computational Prediction of Electron Ionization Mass Spectra to Assist in GC/MS Compound Identification. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 7689-7697, 2016.

ALPHAFOLD PROTEIN STRUCTURE DATABASE – ALPHAFOLD. **AlphaFold**, 2023. Disponível em: <https://alphafold.ebi.ac.uk/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

ALRABIAH, H.; ALLWOOD, J. W.; CORREA, E.; XU, Y.; GOODACRE, R. pH plays a role in the mode of action of trimethoprim on *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1-20, 2018.

ALTAMIRANO-SILVA, P.; CORDERO-SERRANO, M.; MÉNDEZ-MONTOYA, J.; CHACÓN-DÍAZ, C.; GUZMÁN-VERRI, C.; MORENO, E.; CHAVES-OLARTE, E. Intracellular Passage Triggers a Molecular Response in *Brucella abortus* That Increases Its Infectiousness. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 7, p. 1-13, 2021.

ANDRADE, R. S.; PEREIRA, C. R.; SOARES FILHO, P. M.; SOUZA, P. G.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; MINHARRO, S.; COSTA, M.; DORNELES, E. M. S.; LAGE, A. P. Phenotypic and genotypic characterization of *Brucella abortus* biovar 4 isolates from cattle in Brazil. **Ciência Rural**, v. 53, n. 6, p. 1-10, 2023.

ARIFUZZAMAN, M.; ISLAM, M. M.; RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. A.; KAWSAR, S. M. A. An Efficient Approach to the Synthesis of Thymidine Derivatives Containing Various

Acyl Groups: Characterization and Antibacterial Activities. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 56, n. 4, p. 7-22, 2018.

ARJMAND, M.; MADRAKIAN, A.; KHALILI, G.; DASTNAEE, A. N.; ZAMANI, Z.; AKBARI, Z. Metabolomics-Based Study of Logarithmic and Stationary Phases of Promastigotes in *Leishmania major* by ¹H NMR Spectroscopy. **Iranian Biomedical Journal**, v. 20, n. 2, p. 77-83, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC. Beef Report 2023: Perfil da Pecuária no Brasil. **ABIEC**, 2023. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

AZEVEDO, A. P. C. B.; COHEN, S. C.; CARDOSO, T. A. O. Bioterrorismo: capacitar para responder. **Saúde em Debate**, v. 43, n. spe 3, p. 181-189, 2020.

BANAI, M.; CORBEL, M. Taxonomy of Brucella. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 85-101, 2010.

BELINATO, J. R.; BAZIOLI, J. M.; SUSSULINI, A.; AUGUSTO, F.; FILL, T. P. Metabolômica microbiana: inovações e aplicações. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 546-559, 2019.

BELITSKY, B. R. Physical and Enzymological Interaction of *Bacillus subtilis* Proteins Required for De Novo Pyridoxal 5'-Phosphate Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 4, p. 1191-1196, 2004.

BIJLANI, S.; SINGH, N. K.; EEDARA, V. V. R.; PODILE, A. R.; MASON, C. E.; WANG, C. C. C.; VENKATESWARAN, K. *Methylobacterium ajmalii* sp. Nov., Isolated From the International Space Station. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-14, 2021.

BISHOP, R. E.; GIBBONS, H. S.; GUINA T.; TRENT, M. S.; MILLER, S. I.; RAETZ, C. R. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of Gram-negative bacteria. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 19, p. 5071-5080, 2000.

BISWAS, N. N.; KUTTY, S. K.; BARRAUD, N.; ISKANDER, G. M.; GRIFFITH, R.; RICE, S. A.; WILLCOX, M.; BLACK, D. S.; KUMAR, N. Indole-based novel small molecules for the modulation of bacterial signalling pathways. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, p. 925-937, 2015

BLAŽENOVIC, I.; KIND, T.; JI, J.; FIEHN, O. Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. **Metabolites**, v. 8, n. 31, p. 1-23, 2018.

BOMMARIUS, B.; ANYANFUL, A.; IZRAYELIT, Y.; BHATT, S.; CARTWRIGHT, E.; WANG, W.; SWIMM, A. I.; BENIAN, G. M.; SCHROEDER, F. C.; KALMAN, D. A Family of Indoles Regulate Virulence and Shiga Toxin Production in Pathogenic *E. coli*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2013.

BORGES, R. M.; RESENDE, J. V. M.; MORAES, A. O.; PEREIRA, A. K.; GARRETT, R.; BAUERMEISTER, A.; SILVA, A. J. R. Guia para processamento de dados de cromatografia acoplada a espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 45, n. 5, p. 608-620, 2022.

BOSE, U.; HEWAVITHARANA, A. K.; VIDGEN, M. E.; NG, Y. K.; SHAW, P. N.; FUERST, J. A.; HODSON, M. P. Discovering the Recondite Secondary Metabolome Spectrum of *Salinispora* Species: A Study of Inter-Species Diversity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1-11, 2014.

BRASIL. Gabinete do Ministro. Ministério da Saúde. **Portaria GM/MS n.º 1.339, de 18 de novembro de 1999**. Institui a Lista de Doenças relacionadas ao Trabalho. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1999/prt1339_18_11_1999.html. Acesso em: 15 jun. 2023.

BRASIL. Gabinete do Ministro. Ministério da Saúde. **Portaria GM/MS n.º 3.398, de 7 de dezembro de 2021**. Aprova a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos e dá outras providências. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt3398_29_12_2021.html. Acesso em: 15 jun. 2023.

BUT, S. Y.; KHMELENINA, V. N.; RESHETNIKOV, A. S.; MUSTAKHIMOV, I. I.; KALYUZHAYAYA, M. G.; TROTSENKO, Y. A. Sucrose metabolism in halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. **Archives of Microbiology**, v. 197, p. 471-480, 2015.

CAITANO, A. B. M.; SOARES, C. O.; RAMOS, C. A. N.; FERRAZ, A. L. J.; SANCHES, C. C.; ROSINHA, G. M. S. Detecção de *Brucella abortus* em tecidos bovinos utilizando ensaios de PCR e qPCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 497-502, 2014.

CAJKA, T.; FIEHN, O. Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 524-545, 2016.

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**, v. 41 n. 1, p. 75-91, 2018.

CANUTO, G. A. B.; DÖRR, F.; LAGO, J. H. G.; TEMPONES, A. G.; PINTO, E.; PIMENTA, D. C.; FARAH, J. P. S.; ALVES, M. J. M.; TAVARES, M. F. M. New insights into the mechanistic action of methyldehydrodieugenol B towards *Leishmania (L.) infantum* via a multiplatform based untargeted metabolomics approach. **Metabolomics**, v. 13, n. 56, p. 1-14, 2017.

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

CELLI, J. The intracellular lifecycle of *Brucella* spp. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 1-11, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Bioterrorism Agents/Diseases. **United States Department of Health & Human Services**, 4 abr. 2018. Disponível em: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>. Acesso em: 15 jun. 2023.

CHENG, Z.; LI, Z.; YIN, Y.; LIAN, Z.; ABDELGAWAD, H. A.; HU, H.; GUAN, X.; ZUO, D.; CAI, Y.; DING, C.; WANG, S.; LI, T.; QI, J.; TIAN, M.; YU, S. Characteristics of *Brucella abortus* vaccine strain A19 reveals its potential mechanism of attenuated virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 254, p. 1-8, 2021.

CHONG, J.; SOUFAN, O.; LI, C.; CARAUS, I.; LI, S.; BOURQUE, G.; WISHART, D. S.; XIA, J. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. 486-494, 2018.

CORRÊA, J. M. M.; OLIVEIRA, M. L. G.; SOUZA, P. G.; SOARES FILHO, P. M.; MACEDO, A. N.; FARIA, A. F. Optimization of the first extraction protocol for metabolomic studies of *Brucella abortus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 1-10, 2023.

DENISE, R.; BABOR, J.; GERLT, J. A.; CRECY-LAGARD, V. Pyridoxal 5'-phosphate synthesis and salvage in Bacteria and Archaea: predicting pathway variant distributions and holes. **Microbial Genomics**, v. 9, p. 1-13, 2023.

DI GUIDA, R.; ENGEL, J.; ALLWOOD, J. W.; WEBER, R. J. M.; JONES, M. R.; SOMMER, U.; VIANT, M. R.; DUNN, W. B. Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalization, missing value imputation, transformation and scaling. **Metabolomics**, v. 12, n. 93, p. 1-14, 2016.

DJOUMBOU-FEUNANG, Y.; PON, A.; KARU, N.; ZHENG, J.; LI, C.; ARNDT, D.; GAUTAM, M.; ALLEN, F.; WISHART, D. S. CFM-ID 3.0: Significantly Improved ESI-MS/MS Prediction and Compound Identification. **Metabolites**, v. 9, n. 72, p. 1-23, 2019.

DOMBACH, J. L.; QUINTANA, J. L. J.; NAGY, T. A.; WAN, C.; CROOKS, A. L.; YU, H.; SU, C. C.; YU, E. W.; SHEN, J.; DETWEILER, C. S. A small molecule that mitigates bacterial infection disrupts Gram-negative cell membranes and is inhibited by cholesterol and neutral lipids. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 12, p. 1-33, 2020.

DORAN, M. L.; MYKYTCZUK, N.; BIENIEK, A.; METHÉ, A.; MERRITT, T. J. S. Evaluation of quenching and extraction procedures for performing metabolomics in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Metabolomics**, v.13, n. 156, p. 1-10, 2017.

DOWNS, D. M.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Impact of Genomics and Genetics on the Elucidation of Bacterial Metabolism. **Methods**, v. 20, p. 47-54, 2000.

DRUGBANK ONLINE. **DrugBank Online – version 5.1.10**, 2023. Disponível em: <https://go.drugbank.com/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

DUBOIS-BRISSONNET, F. Characterization of Bacterial Membrane Fatty Acid Profiles

for Biofilm Cells. In: BRIDIER, A. (Ed.). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Humana New York, 2018. P. 165-170.

DUCROTOY, M. J.; CONDE-ÁLVAREZ, R.; BLASCO, J. M.; MORIYÓN, I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant Brucellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 81-102, 2016.

DUPORTET, X.; AGGIO, R. B. M.; CARNEIRO, S.; VILLAS-BÔAS, S. G. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. **Metabolomics**, v. 8, p. 410-421, 2012.

EL-SAYED, A.; AWAD, W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. 31-35, 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Carne bovina. **Portal Embrapa**, Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina>. Acesso em: 15 jun. 2023.

ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Conversion of Cobinamide into Adenosylcobamide in Bacteria and Archaea. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4555-4560, 2007.

FANG, H.; LI, D.; KANG, J.; JIANG, P.; SUN, J.; ZHANG, D. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for de novo biosynthesis of vitamin B₁₂. **Nature Communications**, v. 9, p. 1-12, 2018.

FARAG, M.A.; ABDELWARETH, A.; ZAYED, A.; EISSA, T. F.; DOKALAHY, E.; FROLOV, A.; WESSJOHANN, L. A. A Comparative Metabolomics Approach for Egyptian Mango Fruits Classification Based on UV and UPLC/MS and in Relation to Its Antioxidant Effect. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 1-16, 2022.

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

FIEHN, O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. **Current Protocols in Molecular biology**, v. 114, p. 30.4.1-32, 2016.

FINAR. HPLC Solvent Properties. **Finar**, 26 abr. 2023. Disponível em: https://www.finarchemicals.com/assets/pdf/hplc_solvent_properties_solvent_miscibility_table.pdf. Acesso em: 15 jun. 2023.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, n. 5, p. 732-742, 2009.

FU, X.; ZHANG, Y.; SHI, B.; WU, X.; ZHAO, H.; XIN, Z.; YANG, J. Benzoic Acid Metabolism and Lipopolysaccharide Synthesis of Intestinal Microbiome Affects the Health of Ruminants under Free-Range and Captive Mode. **Life**, v. 12, p. 1-14, 2022.

GAO, P.; XU, G. Mass-spectrometry-based microbial metabolomics: recent developments and applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 669–680, 2015.

GIKA, H. G.; ZISI, C.; THEODORIDIS, G.; WILSON, I. D. Protocol for quality control in metabolic profiling of biological fluids by U(H)PLC-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1008, p. 15-25, 2016.

GLOWACKA, P.; ZAKOWSKA, D.; NAYLOR, K.; NIEMCEWICZ, M.; BIELAWSKA-DRÓZD, A. *Brucella* – Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 151-161, 2018.

GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Nota técnica – Evolução e qualidade da pecuária brasileira. **Embrapa Gado de Corte**, Campo Grande, 24 mar. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/10180/21470602/EvolucaoQualidadePecuaria.pdf/64e8985a-5c7c-b83e-ba2d-168ffaa762ad>. Acesso em: 15 jun. 2023.

GOODACRE, R.; ELLIS, D.; HOLLYWOOD, K.; TRIVEDI, D.; MUHAMADALI, H. **Laboratory Guide for Metabolomics Experiments**. Manchester Institute of Biotechnology. 2013. Disponível em: <http://www.biospec.net/wordpress/wp-content/uploads/Metabolomics-laboratory-handbook.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2023.

GROMSKI, P. S.; MUHAMADALI, H.; ELLIS, D. I.; XU, Y.; CORREA, E.; TURNER, M. L.; GOODACRE, R. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 10-23, 2015.

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**, v. 4, p. 433-452, 2014.

HACKSTADT, A. J.; HESS, A. M. Filtering for increased power for microarray data analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 11, p. 1-12. 2009.

HAN, M. L.; ZHU, Y.; CREEK, D. J.; LIN, Y. W.; GUTU, A. D.; HERTZOG, P.; PURCELL, T.; SHEN, H. H.; MOSKOWITZ, S. M.; VELKOV, T.; LIA, J. Comparative Metabolomics and Transcriptomics Reveal Multiple Pathways Associated with Polymyxin Killing in *Pseudomonas aeruginosa*. **mSystems**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2019.

HAYNES, W. M. (Ed.). **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. Boca Raton: CRC Press, 2017.

HENDRIKS, M. M. W. B.; VAN EEUWIJK, F. A.; JELLEMA, R. H.; WESTERHUIS, J. A.; REIJMERS, T. H.; HOEFSLOOT, H. C. J.; SMILDE, A. K. Data-processing strategies for metabolomics studies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1685-1698, 2011.

HERMAN, N. A.; KIM, S. J.; LI, J. S.; CAI, W.; KOSHINO, H.; ZHANG, W. The industrial anaerobe *Clostridium acetobutylicum* uses polyketides to regulate cellular differentiation. **Nature Communications**, v. 8, p. 1-11, 2017.

HERNANDES, V. V.; BARBAS, C.; DUDZIK, D. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. **Electrophoresis**, v. 38, n. 18, p. 2232-2241, 2017.

HERNÁNDEZ-MORA, G.; CHACÓN-DÍAZ, C.; MOREIRA-SOTO, A.; BARRANTES-GRANADOS, O.; SUÁREZ-ESQUIVEL, M.; VIQUEZ-RUIZ, E.; BARQUERO-CALVO, E.; RUIZ-VILLALOBOS, N.; HIDALGO-MONTEALEGRE, D.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; DEMETER, E. A.; ESTRELLA-MORALES, J.; ZÚÑIGA-PEREIRA, A. M.; QUESADA-GÓMEZ, C.; CHAVES-OLARTE, E.; LOMONTE, B.; GUZMÁN-VERRI, C.; DREXLER, J. F.; MORENO, E. Virulent *Brucella nosferati* infecting *Desmodus rotundus* has emerging potential due to the broad foraging range of its bat host for humans, wild and domestic animals. **mSphere**, p. 1-20, 2023.

HOLMAN, J. D.; TABB, D. L.; MALLICK, P. Employing ProteoWizard to Convert Raw Mass Spectrometry Data. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 46, p. 13.24.1-9, 2014.

HU, Y.; SHI, H.; ZHOU, M.; REN, Q.; ZHU, W.; ZHANG, W.; ZHANG, Z.; ZHOU, C.; LIU, Y.; DING, X.; SHEN, H. C.; YAN, S. F.; DEY, F.; WU, W.; ZHAI, G.; ZHOU, Z.; XU, Z.; JI, Y.; LV, H.; JIANG, T.; WANG, W.; XU, Y.; VERCRUYSE, M.; YAO, X.; MAO, Y.; YU, X.; BRADLEY, K.; TAN, X. Discovery of Pyrido[2,3-b]indole Derivatives with Gram-Negative Activity Targeting Both DNA Gyrase and Topoisomerase IV. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 9623-9649, 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal – PPM 2021. **Produção de Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 49, p. 1-12, 2021. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2021_v49_br_informativo.pdf Acesso em: 15 jun. 2023.

JOUSSE, C.; DALLE, C.; CANET, I.; LAGRÉE, M.; TRAÏKIA, M.; LYAN, B.; MENDES, C.; SANCELME, M.; AMATO, P.; DELORT, A. M. Metabolomic study of the response to cold shock in a strain of *Pseudomonas syringae* isolated from cloud water. **Metabolomics**, v. 14, n. 11, p. 1-13, 2018.

KELL, D. B.; OLIVER, S. G. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. **Metabolomics**, v. 12, n. 148, p. 1-8, 2016.

KIM, S. K.; LEE, J. H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 71-85, 2016.

KNOLL, K. E.; LINDEQUE, Z.; ADENIJI, A. A.; OOSTHUIZEN, C. B.; LALL, N.; LOOTS, D. T. Elucidating the Antimycobacterial Mechanism of Action of Ciprofloxacin Using Metabolomics. **Microorganisms**, v. 9, p. 1-16, 2021.

KOEK, M. M.; JELLEMA, R. H.; VAN DER GREEF, J.; TAS, A. C.; HANKEMEIER, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7, p. 307-328, 2011.

KOEN, N.; VAN BREDA, S. V.; LOOTS, D. T. Elucidating the antimicrobial mechanisms of colistin sulfate on *Mycobacterium tuberculosis* using metabolomics. **Tuberculosis**, v. 111, p. 14-19, 2018.

LALMAN, J. A.; BAGLEY, D. M. Extracting Long-Chain Fatty Acids from a Fermentation Medium. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 2, p. 105-110, 2004.

LANGE, E.; TAUTENHAHN, R.; NEUMANN, S.; GRÖPL, C. Critical assessment of alignment procedures for LC-MS proteomics and metabolomics measurements. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 375, p. 1-19, 2008.

LAU, S. K. P.; LAM, C. W.; CURREEM, S. O. T.; LEE, K. C.; LAU, C. C. Y.; CHOW, W. N.; NGAN, A. H. Y.; TO, K. K. W.; CHAN, J. F. W.; HUNG, I. F. N.; YAM, W. C.; YUEN, K. Y.; WOO, P. C. Y. Identification of specific metabolites in culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis* using metabolomics: exploration of potential biomarkers. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2015.

LAWINSKY, M. L. J.; OHARA, P. M.; ELKHOURY, M. R.; FARIA, N. C.; CAVALCANTE, K. R. L. J. Estado da arte da brucelose em humanos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p.75-84, 2010.

LE BRUN, A. P.; CLIFTON, L. A.; HALBERT, C. E.; LIN, B.; MERON, M.; HOLDEN, P. J.; LAKEY, J. H.; HOLT, S. A. Structural Characterization of a Model Gram-Negative Bacterial Surface Using Lipopolysaccharides from Rough Strains of *Escherichia coli*. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 2014-2022, 2013.

LI, H.; XIA, X.; LI, X.; NAREN, G.; FU, Q.; WANG, Y.; WU, C.; DING, S.; ZHANG, S.; JIANG, H.; LI, J.; SHEN, J. Untargeted Metabolomic Profiling of Amphenicol-Resistant *Campylobacter jejuni* by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 14, p. 1060-1068, 2015.

LI, H.; ZHU, J. Targeted metabolic profiling rapidly differentiates *Escherichia coli* and

LI, W. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 10, n. 6, p. 1-24, 2012.

LI, Y.; WU, S.; WANG, L.; LI, Y.; SHI, F.; WANG, X. Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1380-1383, 2010.

LIBISELLER, G.; DVORZAK, M.; KLEB, U.; GANDER, E.; EISENBERG, T.; MADEO, F.; NEUMANN, S.; TRAUSINGER, G.; SINNER, F.; PIEBER, T.; MAGNES, C. IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 118, p. 1-10, 2015.

LIU, Q.; SHI, Y.; GUO, T.; WANG, Y.; CONG, W.; ZHU, J. Metabolite discovery of helicidum in rat urine with XCMS based on the data of ultra performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 907, p. 146-153, 2012.

LIU, Y.; YANG, K.; JIA, Y.; SHI, J.; TONG, Z.; WANG, Z. Thymine Sensitizes Gram-Negative Pathogens to Antibiotic Killing. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-9, 2021.

- LUIZET, J. B.; RAYMOND, J.; LACERDA, T. L. S.; BARBIEUX, E.; KAMBAREV, S.; BONICI, M.; LEMBO, F.; WILLEMART, K.; BORG, J. P.; CELLI, J.; GÉRARD, F. C. A.; MURAILLE, E.; GORVEL, J. P.; SALCEDO, S. P. The *Brucella* effector BspL targets the ER-associated degradation (ERAD) pathway and delays bacterial egress from infected cells. **PNAS**, v. 118, n. 32, p. 1-10, 2021.
- MA, Z.; LI, R.; HU, R.; DENG, X.; XU, Y.; ZHENG, W.; YI, J.; WANG, Y.; CHEN, C. *Brucella abortus* BspJ Is a Nucleomodulin That Inhibits Macrophage Apoptosis and Promotes Intracellular Survival of *Brucella*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-16, 2020.
- MARTENS, J.; BERDEN, G.; VAN OUTERSTERP, R. E.; KLUIJTMANS, L. A. J.; ENGELKE, U. F.; VAN KARNEBEEK, C. D. M.; WEVERS, R. A.; OOMENS, J. Molecular identification in metabolomics using infrared ion spectroscopy. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-5, 2017.
- MASTRANGELO, A.; FERRARINI, A.; REY-STOLLE, F.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 900, p. 21-35, 2015.
- MATYASH, V.; LIEBISCH, G.; KURZCHALIA, T. V.; SHEVCHENKO, A.; SCHWUDKE, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. **Journal of Lipid Research**, v. 49, p. 1137-1146, 2008.
- MEYER, K. F.; EDDIE, B. Laboratory Infections Due to *Brucella*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 68, n. 1, p. 24-32, 1941.
- MOORE, B. S.; HERTWECK, C.; HOPKE, J. N.; IZUMIKAWA, M.; KALAITZIS, J. A.; NILSEN, G.; O'HARE, T.; PIEL, J.; SHIPLEY, P. R.; XIANG, L.; AUSTIN, M. B.; NOEL, J. P. Plant-like Biosynthetic Pathways in Bacteria: From Benzoic Acid to Chalcone. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 12, p. 1956-1962, 2002.
- MORALES, M. L.; CALLEJÓN, R. M.; ORDÓNEZ, J. L.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Comparative assessment of software for non-targeted data analysis in the study of volatile fingerprint changes during storage of a strawberry beverage. **Journal of Chromatography A**, v. 1522, p. 70-77, 2017.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 209-227, 2002.
- MORENO, E.; PITT, M. W.; JONES, L. M.; SCHURIG, G. G.; BERMAN, D. T. Purification and Characterization of Smooth and Rough Lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 2, p. 361-369, 1979.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181-1189, 1999.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 23, p. 1054-1056, 2008.

NIKAIDO, E.; GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; YAMASAKI, S.; WIEDEMANN, A.; OKAMOTO, K.; TAKAGI, T.; YAMAGUCHI, A.; CLOECKAERT, A.; NISHINO, K. Effects of indole on drug resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium revealed by genome-wide analyses. **Gut Pathogens**, v. 4, n. 5, p. 1-13, 2012.

NIU, W.; KNIGHT, E.; XIA, Q.; MCGARVEY, B. D. Comparative evaluation of eight software programs for alignment of gas chromatography-mass spectrometry chromatograms in metabolomics experiments. **Journal of Chromatography A**, v. 1374, p. 199-206, 2014.

NIZIO, K. D.; PERRAULT, K. A.; TROOBNIKOFF, A. N.; UELAND, M.; SHOMA, S.; IREDELL, J. R.; MIDDLETON, P. G.; FORBES, S. L. *In vitro* volatile organic compound profiling using GC×GC-TOFMS to differentiate bacteria associated with lung infections: a proof-of-concept study. **Journal of Breath Research**, v. 10, p. 1-12, 2016.

NODWELL, M. B.; KOCH, M. F.; ALTE, F.; SCHNEIDER, S.; SIEBER, S. A. A Subfamily of Bacterial Ribokinases Utilizes a Hemithioacetal for Pyridoxal Phosphate Salvage. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 4992-4999, 2014.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S. Bacteriologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Volume 4. Rio de Janeiro: Escola Politécnica em Saúde Joaquim Venâncio; Instituto Oswaldo Cruz, 2014. p. 221-397.

NOGUEIRA, S. Brazil: Livestock and Products Semi-annual. **United States Department of Agriculture**, Global Agriculture Information Network, 3 mar. 2023. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Livestock%20and%20Products%20Semi-annual_Brasilia_Brazil_BR2023-0004.pdf. Acesso em: 15 jun. 2023.

NOLAN, A. C.; ZEDEN, M. S.; KVIATKOVSKI, I.; CAMPBELL, C.; URWIN, L.; CORRIGAN, R. M.; GRÜNDLING, A.; O'GARA, J. P. Purine Nucleosides Interfere with c-di-AMP Levels and Act as Adjuvants To Re-Sensitize MRSA To β -Lactam Antibiotics. **mBio**, v. 14, n. 1, p. 1-21, 2023.

OLIVEIRA, S. C. Host Immune Responses and Pathogenesis to *Brucella* spp. Infection. **Pathogens**, v. 10, n. 288, p. 1-3, 2021.

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998.

ORTIZ-VILLANUEVA, E.; BENAVENTE, F.; PIÑA, B.; SANZ-NEBOT, V.; TAULER, R.; JAUMOT, J. Knowledge integration strategies for untargeted metabolomics based on MCR-ALS analysis of CE-MS and LC-MS data. **Analytica Chimica Acta**, v. 978, p. 10-23, 2017.

PAL, M; GIZAW, F.; FEKADU, G.; ALEMAYEHU, G.; KANDI, V. Public Health and Economic Importance of Bovine Brucellosis: An Overview. **American Journal of Epidemiology and Infectious Disease**, v. 5, n. 2, p. 27-34, 2017.

PANG, Z.; ZHOU, G.; EWALD, J.; CHANG, L.; HACARIZ, O.; BASU, N.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. **Nature Protocols**, v. 17, p. 1735-1761, 2022.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 91-99, 2006.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – SESA. Superintendência de Vigilância em Saúde – SVS. Centro Estadual de Vigilância Ambiental – CEVA. **Protocolo de manejo clínico e vigilância em saúde para brucelose humana no Estado do Paraná**. Curitiba: SESA/SVS/CEVA, 2015.

PASIKANTI, K. K.; HO, P. C.; CHAN, E. C. Y. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. **Journal of Chromatography B**, v. 871, p. 202-211, 2008.

PASTRANA, N. A.; BERAN, D.; SOMERVILLE, C.; HELLER, O.; CORREIA J. C.; SUGGS, L. S. The process of building the priority of neglected tropical diseases: A global policy analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1-22, 2020.

PEREIRA, R. E. P.; PETRECHEN, G. G. Principais métodos diagnósticos bacterianos – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n. 16, p. 1-12, 2011.

PERRUCHON, O.; SCHMITZ-AFONSO, I.; GRONDIN, C.; CASAREGOLA, S.; AFONSO, C.; ELOMRI, A. Combination of UHPLC-MS/MS-molecular networking approach and FTICR-MS for the metabolic profiling of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 195, p. 1-11, 2021.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; CARNEVALE NETO, F.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Metabolômica de plantas: métodos e desafios. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 329-354, 2020.

PINU, F. R.; BEALE, D. J.; PATEN, A. M.; KOUREMENOS, K.; SWARUP, S.; SCHIRRA, H. J.; WISHART, D. Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. **Metabolites**, v. 9, n. 76, p. 1-31, 2019.

POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; SANTOS, R. L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Revue Scientifique et Technique / Office International des Epizooties**, v. 32, n. 1, p. 105-115, 2013.

POETSCH, A.; MARCHESINI, M. I. Proteomics of Brucella. **Proteomes**, v. 8, n. 8, p. 1-17, 2020.

POUNTAIN, A. W.; BARRETT, M. P. Untargeted metabolomics to understand the basis of phenotypic differences in amphotericin B-resistant *Leishmania* parasites. **Wellcome Open Research**, v. 4, n. 176, p. 1-13, 2019.

POWERS, M. J.; TRENT, M. S. Phospholipid retention in the absence of asymmetry strengthens the outer membrane permeability barrier to last-resort antibiotics. **PNAS**, v. 115, n. 36, p. E8518-E8527, 2018.

PUBCHEM. **National Institutes of Health**, 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

PUBMED. **Center for Biotechnology Information**, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

RAAMSDONK, L. M.; TEUSINK, B.; BROADHURST, D.; ZHANG, N.; HAYES, A.; WALSH, M. C.; BERDEN, J. A.; BRINDLE, K. M.; KELL, D. B.; ROWLAND, J. J.; WESTERHOFF, H. V.; VAN DAM, K.; OLIVER, S. G. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 45-50, 2001.

REES, C. A.; SHEN, A.; HILL, J. E. Characterization of the *Clostridium difficile* volatile metabolome using comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1039, p. 8-16, 2016.

REMPE, C. S.; LENAGHAN, S. C.; BURRIS, K. P.; STEWART JR., C. N. Metabolomic analysis of the mechanism of action of yerba mate aqueous extract on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Metabolomics**, v. 13, n. 16, p. 1-13, 2017.

RODIONOV, D. A.; VITRESCHAK, A. G.; MIRONOV, A. A.; GELFAND, M. S. Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 11., p. 3340-3353, 2004.

ROOP II, R. M.; CASWELL, C. C. (Ed.). **Metals and the Biology and Virulence of *Brucella***. Cham: Springer, 2017.

ROSET, M. S.; FERNÁNDEZ, L. G.; DELVECCHIO, V. G.; BRIONES, G. Intracellularly Induced Cyclophilins Play an Important Role in Stress Adaptation and Virulence of *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 2, p. 521-530, 2013.

RUTTKIES, C.; NEUMANN, S.; POSCH, S. Improving MetFrag with statistical learning of fragment annotations. **BMC Bioinformatics**, v. 20, n. 376, p. 1-14, 2019.

RYAN, E.; JOYCE, S. A.; CLARKE, D. J. Membrane lipids from gut microbiome-associated bacteria as structural and signalling molecules. **Microbiology**, v. 169, n. 3, p. 1-13, 2023.

SARIC, J.; WANT, E. J.; DUTHALER, U.; LEWIS, M.; KEISER, J.; SHOCKCOR, J. P.; ROSS, G. A.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TAVARES, M. F. M. Systematic Evaluation of Extraction Methods for Multiplatform-Based Metabotyping: Application to the *Fasciola hepatica* Metabolome. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 6963-6972, 2012.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO E DESENVOLVIMENTO RURAL DISTRITO FEDERAL – SEAGRI-DF. Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – SANTUB. **Seagri-DF**, 7 maio 2018. Disponível em: <https://www.agricultura.df.gov.br/controle-e-erradicacao-da-brucelose-e-tuberculose-santub/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

SEKUROVA, Olga N.; ZEHL, M.; PREDL, M.; HUNYADI, P.; RATTEI, T.; ZOTCHEVA, S. B. Targeted Metabolomics and High-Throughput RNA Sequencing-Based Transcriptomics Reveal Massive Changes in the *Streptomyces venezuelae* NRRL B-65442 Metabolism Caused by Ethanol Shock. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, p. 1-19, 2022.

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. *Brucella*: A pathogen without classic virulence genes. **Veterinary Microbiology**, v. 129, p. 1-14, 2008.

SHEN, X.; ZHU, Z. J. MetFlow: an interactive and integrated workflow for metabolomics data cleaning and differential metabolite discovery. **Bioinformatics**, v. 35, n. 16, p. 2870-2872, 2019.

SHI, Y.; PAN, C.; AUCKLOO, B. N.; CHEN, X.; CHEN, C. T. A.; WANG, K.; WU, X.; YE, Y.; WU, B. Stress-driven discovery of a cryptic antibiotic produced by *Streptomyces* sp. WU20 from Kueishantao hydrothermal vent with an integrated metabolomics strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 1395-1408, 2017.

SHIN, M. H.; LEE, D. Y.; LIU, K. H.; FIEHN, O.; KIM, K. H. Evaluation of Sampling and Extraction Methodologies for the Global Metabolic Profiling of *Saccharophagus degradans*. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 15, p. 6660-6666, 2010.

SIMIONATO, A. V. C.; SANTOS, F. N.; HERNANDES, V. V. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): aspectos teóricos, práticos e aplicações no campo da metabolômica. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 4, p. 228-244, 2017.

SINGARAPU, K. K.; OTTE, M. M.; TONELLI, M.; WESTLER, W. M.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C.; MARKLEY, J. L. Solution Structural Studies of GTP: Adenosylcobinamide-Phosphateguanylyl Transferase (CobY) from *Methanocaldococcus jannaschii*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1-15, 2015.

SMART, K. F.; AGGIO, R. B. M.; HOUTTE, J. R. V.; VILLAS-BÔAS, S. G. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 10, p. 1709-1729, 2010.

SMITH, C. A.; WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; ABAGYAN, R.; SIUZDAK, G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 779-787, 2006.

SOARES FILHO, P. M.; WANDERLEY, R. P. B.; FARIA, G. C.; PENNA, A. G.; RIBEIRO, D. B. C. L.; ASSIS, R. A.; LEITE, R. C.; FONSECA JUNIOR, A. A.; RIBEIRO, A. C. C. L. Confirmação de infecção por *Brucella abortus* em um rebanho bovino certificado livre em Minas Gerais: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1133-1136, 2012.

SOUZA, M. A.; BOMBONATO, N. G.; SOARES, P. M.; RAMOS, G. B.; CASTRO, I. P.; MEDEIROS, A. A.; LIMA, A. M. C. Comparison of complementary diagnostic methods of bovine tuberculosis on skin-test reactive cattle. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-8, 2016.

STEPANEK, J. J.; SCHÄKERMANN, S.; WENZEL, M.; PROCHNOW, P.; BANDOW, J. E. Purine biosynthesis is the bottleneck in trimethoprim-treated *Bacillus subtilis*. **Proteomics – Clinical Applications**, v. 10, n. 9-10, p. 1036-1048, 2016.

SUÁREZ-ESQUIVEL, M.; CHAVES-OLARTE, E.; MORENO, E.; GUZMÁN-VERRI, C. *Brucella* Genomics: Macro and Micro Evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1-23, 2020a.

SUÁREZ-ESQUIVEL, M.; HERNÁNDEZ-MORA, G., RUIZ-VILLALOBOS, N.; BARQUERO-CALVO, E.; CHACÓN-DÍAZ, C.; LADNER, J. T.; OVIEDO-SÁNCHEZ, G.; FOSTER, J. T.; ROJAS-CAMPOS, N.; CHAVES-OLARTE, E.; THOMSON, N. R.; MORENO, E.; GUZMÁN-VERRI, N. Persistence of *Brucella abortus* lineages revealed by genomic characterization and phylodynamic analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. 1-18, 2020b.

SUMNER, L. W.; AMBERG, A.; BARRETT, D.; BEALE, M. H.; BEGER, R.; DAYKIN, C. A.; FAN, T. W.; FIEHN, O.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L.; HANKEMEIER, T.; HARDY, N.; HARNLY, J.; HIGASHI, R.; KOPKA, J.; LANE, A. N.; LINDON, J. C.; MARRIOTT, P.; NICHOLLS, A. W.; REILY, M. D.; THADEN, J. J.; VIANT, M. R. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211-221, 2007.

SUN, L.; ZHANG, Y.; CAI, T.; LI, X.; LI, N.; XIE, Z.; YANG, F.; YOU, X. CrrAB regulates PagP-mediated glycerophosphoglycerol palmitoylation in the outer membrane of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Lipid Research**, v. 63, n. 9, p. 1-12, 2022.

SZEWCZYK, R.; KUSMIERSKA, A.; BERNAT, P. Ametryn removal by *Metarhizium brunneum*: Biodegradation pathway proposal and metabolic background revealed. **Chemosphere**, v. 190, p. 174-183, 2018.

SZYMANSKA, E.; SACCENTI, E.; SMILDE, A. K.; WESTERHUIS, J. A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, v. 8, S3-S16, 2012.

TANG, J. Microbial Metabolomics. **Current Genomics**, v. 12, n. 6, p. 391-403, 2011.

TANG, T.; CHEN, G.; GUO, A.; XU, Y.; ZHAO, L.; WANG, M.; LU, C.; JIANG, Y.; ZHANG, C. Comparative proteomic and genomic analyses of *Brucella abortus* biofilm and planktonic cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 21, p. 731-743, 2020.

TANG, T.; XU, Y.; WANG, J.; TAN, X.; ZHAO, X.; ZHOU, P.; KONG, F.; ZHU, C.; LU, C.; LIN, H. Evaluation of the differences between biofilm and planktonic *Brucella abortus*

via metabolomics and proteomics. **Functional & Integrative Genomics**, v. 21, p. 421-433, 2021.

TAUTENHAHN, R.; BOTTCHEER, C.; NEUMANN, S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 504, p. 1-16, 2008.

THEODORIDIS, G.; GIKA, H.; RAFTERY, D.; GOODACRE, R.; PLUMB, R. S.; WILSON, I. D. Ensuring Fact-Based Metabolite Identification in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry-Based Metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 95, p. 3909-3916, 2023.

THIELE, O. W.; LACAVE, C.; ASSELINEAU, J. On the Fatty Acids of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 7, p. 393-396, 1969.

T'KINDT, R.; SCHELTEMA, R. A.; JANKEVICS, A.; BRUNKER, K.; SUMAN RIJAL, S.; DUJARDIN1, J. C.; BREITLING, R.; WATSON, D. G.; GRAHAM H. COOMBS, G. H.; DECUYPERE, S. Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. 1-12, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TWEEDDALE, H.; NOTLEY-MCROBB, L.; FERENCI, T. Effect of Slow Growth on Metabolism of *Escherichia coli*, as Revealed by Global Metabolite Pool (“Metabolome”) Analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 19, p. 5109-5116, 1998.

THOMAS, G. H. Metabolomics breaks the silence. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 126-127, 2001.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. **USDA**, 11 abr. 2023. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf. Acesso em: 15 jun. 2023.

UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE – UNIPROT. **UniProt Knowledgebase**, 2023. Disponível em: <https://www.uniprot.org/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J., WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, n. 142, p. 1-15, 2006.

VAN GULIK, W. M. Fast sampling for quantitative microbial metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 27-34, 2010.

VIAANT, M. R.; KURLAND, I. J.; JONES, M. R.; DUNN, W. B. How close are we to complete annotation of metabolomes? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 36, p. 64-69, 2017.

VILLAS-BÔAS, S. G.; KOULMAN, A.; LANE, G. A. Analytical methods from the perspective of method standardization. **Metabolomics**, v.18, p. 11-52, 2007.

VINCENT, I. M.; EHMANN, D. E.; MILLS, S. D.; PERROS, M.; BARRETT, M. P. Untargeted Metabolomics To Ascertain Antibiotic Modes of Action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2281-2291, 2016.

VISHNU, U. S.; SANKARASUBRAMANIAN, J.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Identification of potential antigens from non-classically secreted proteins and designing novel multipeptide vaccine candidate against *Brucella melitensis* through reverse vaccinology and immunoinformatics approach. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, p. 151-158, 2017.

VU, S. H.; KIM, B.; REYES, A. W. B.; HUYNH, T. X. N.; LEE, J. H.; KIM, S.; KIM, H. J. Global metabolomic analysis of blood from mice infected with *Brucella abortus*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 83, n. 3, p. 482-486, 2021.

WANG, D.; LI, H.; MA, X.; TANG, Y.; TANG, H.; HUANG, D.; LIN, M.; LIU, Z. Hfq Regulates Efflux Pump Expression and Purine Metabolic Pathway to Increase Trimethoprim Resistance in *Aeromonas veronii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-8, 2021a.

WANG, F.; LIIGAND, J.; TIAN, S.; ARNDT, D.; GREINER, R.; WISHART, D. S. CFM-ID 4.0: More Accurate ESI-MS/MS Spectral Prediction and Compound Identification. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 34, p. 11692-11700, 2021b.

WANG, Y.; BIAN, Z.; WANG, Y. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, p. 6365-6381, 2022.

WESTGARD, J. O.; BARRY, P. L.; HUNT, M. R.; GROTH, T. A Multi-Rule Shewhart Chart for Quality Control in Clinical Chemistry. **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 493-501, 1981.

WETZEL, D. K.; EHRENSHAFT, M.; DENSLOW, S. A.; DAUB, M. E. Functional complementation between the *PDX1* vitamin B6 biosynthetic gene of *Cercospora nicotianae* and *pdxJ* of *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, v. 564, p. 143-146, 2004.

XIA, J.; PSYCHOGIOS, N.; YOUNG, N.; WISHART, D. S. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 652-660, 2009.

XIA, J.; SINELNIKOV, I. V.; HAN, B.; WISHART, D. S. MetaboAnalyst 3.0 – making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 251-257, 2015.

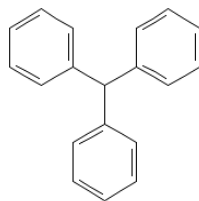
XIA, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature Protocols**, v. 6, p. 743-760, 2011.

XIAO, G.; ZHANG, S.; ZHANG, L.; LIU, S.; LI, G.; OU, M.; ZENG, X.; WANG, Z.; ZHANG, G.; LU, S. Untargeted metabolomics analysis reveals *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv specifically induces tryptophan metabolism in human macrophages. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 249, p. 1-10, 2022.

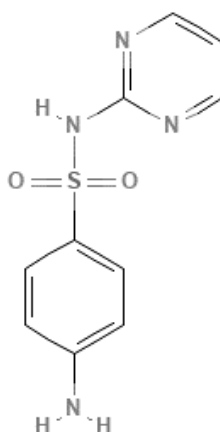
- XU, X.; ZANG, Q.; ZHANG, R.; LIU, J.; HE, J.; ZHANG, R.; ABLIZ, Z. Systematic optimization and evaluation of sample pretreatment methods for LC-MS-based metabolomics analysis of adherent mammalian cancer cells. **Analytical Methods**, v. 11, p. 3014-3022, 2019.
- YANG, Q.; ZHANG, A.; MIAO, J.; SUN, H.; HAN, Y.; YAN, G.; WU, F.; WANG, X. Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review. **RSC Advances**, v. 9, p. 37245-37257, 2019.
- YI, L.; SHI, S.; YI, Z.; HE, R.; LU, H.; LIANG, Y. MeOx-TMS derivatization for GC-MS metabolic profiling of urine and application in the discrimination between normal C57BL/6J and type 2 diabetic KK-Ay mice. **Analytical Methods**, v. 6, p. 4380-4387, 2014.
- YIN, W.; WANG, Y.; LIU, L.; HE, J. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1-18, 2019.
- YOSHIDA, M.; HATANO, N.; NISHIUMI, S.; IRINO, Y.; IZUMI, Y.; TAKENAWA, T.; ASUMA, T. Diagnosis of gastroenterological diseases by metabolome analysis using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Gastroenterology**, V. 47, p. 9-20, 2012.
- YU, X.; JIN, X.; TANG, J.; WANG, N.; YU, Y.; SUN, R.; DENG, F.; HUANG, C.; SUN, J.; ZHU, L. Metabolomic analysis and oxidative stress response reveals the toxicity in *Escherichia coli* induced by organophosphate flame retardants tris (2-chloroethyl) phosphate and triphenyl phosphate. **Chemosphere**, v. 291, p. 1-11, 2022.
- ZARKAN, A.; MATUSZEWSKA, M.; TRIGG, S. B.; ZHANG, M.; BELGAMI, D.; CROFT, C.; LIU, J.; EL-OUISI, S.; GREENHALGH, J.; DUBOFF, J. S.; RAHMAN, T.; SUMMERS, D. K. Inhibition of indole production increases the activity of quinolone antibiotics against *E. coli* persisters. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-10, 2020.
- ZHANG, J. L.; WANG, D.; LIANG, Y. W.; ZHONG, W. Y.; MING, Z. H.; TANG, D. J.; TANG, J. L. The Gram-negative phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* employs a 5'UTR as a feedback controller to regulate methionine biosynthesis. **Microbiology**, v. 164, p. 1146-1155, 2018.
- ZHANG, P.; XING, X.; WANG, X.; YANG, B.; FU, C.; LIU, D.; GUO, C. Comparison of Fatty Acid Analysis with Serotype and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing *Salmonella* Isolated from Retail Foods and Human. **Journal of Food Safety**, v. 34, p. 388-395, 2014.
- ZHI, F.; ZHOU, D.; CHEN, J.; FANG, J.; ZHENG, W.; LI, J.; HAO, M.; SHI, Y.; JIN, Y.; WANG, A. An ArsR Transcriptional Regulator Facilitates *Brucella* sp. Survival via Regulating Self and Outer Membrane Protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 1-18, 2021.
- ZHONG, Z.; WANG, L.; CHEN, Y.; WANG, Z.; WANG, Y.; CUI, M.; LI, T.; KE, Y.; YUAN, X.; WANG, D.; CHEN, Z.; PENG, G. Complete Genome Sequence of *Brucella abortus* Strain BCB034, a Strain of Biovar 2 Isolated from Human. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6943, 2012.

APÊNDICE A – Valores das biomassas aferidos para cada bv

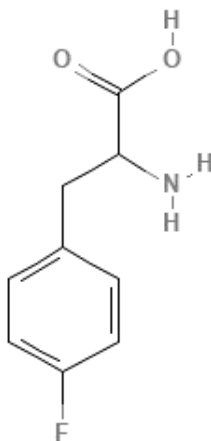
Triplicata biológica	Biomassa (g)					
	bv 1	bv 3	bv 4	bv 5	bv 6	bv 9
R1	0,00508	0,00511	0,00483	0,00509	0,00501	0,00500
R2	0,00513	0,00513	0,00487	0,00546	0,00520	0,00496
R3	0,00499	0,00501	0,00495	0,00548	0,00531	0,00504

ANEXO A – Fórmulas estruturais dos PIs

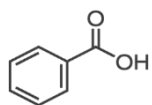
Trifenilmetano



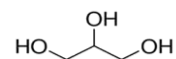
Sulfadiazina

*p*-fluoro-*DL*-fenilalanina

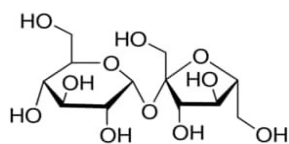
ANEXO B – Fórmulas estruturais dos metabólitos identificados putativamente nas análises por GC-QTOF-MS



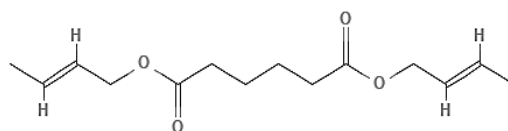
Ácido benzoico



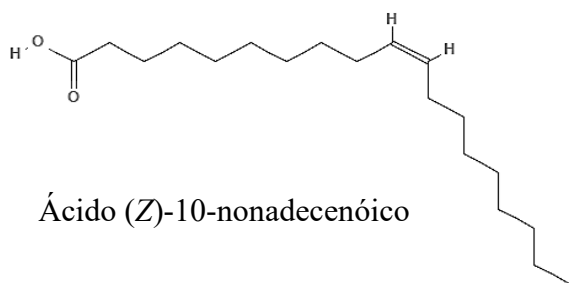
Glicerol



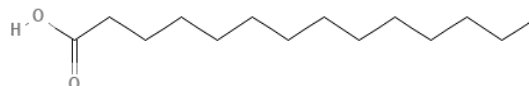
Sacarose



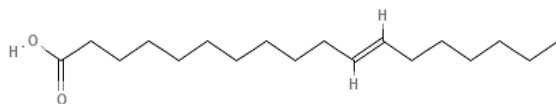
Adipato de di(but-2-en-1-ila)



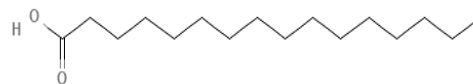
Ácido (Z)-10-nonadecenóico



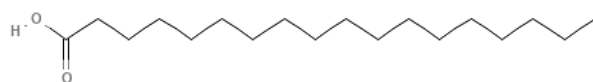
Ácido mirístico



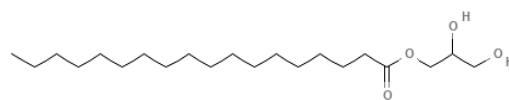
Ácido vacênico



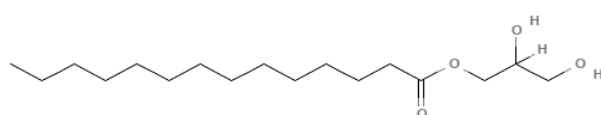
Ácido palmítico



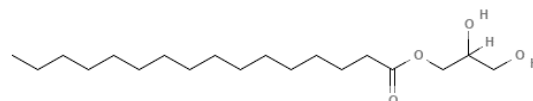
Ácido esteárico



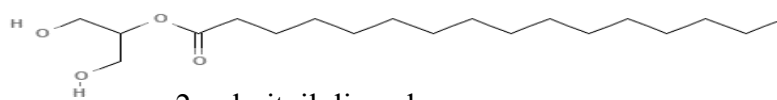
Monoestearato de glicerol



1-monomiristina

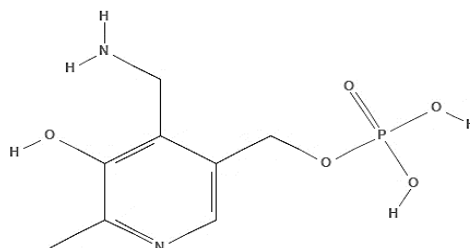


1-monopalmitina

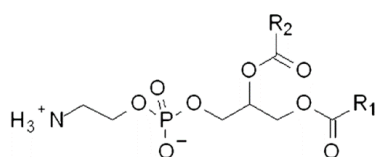


2-palmitoilglicerol

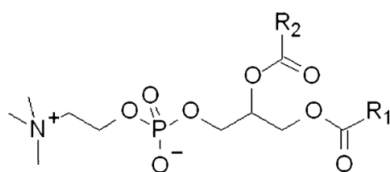
ANEXO C – Fórmulas estruturais dos metabólitos identificados putativamente nas análises por UHPLC-Q-Orbitrap



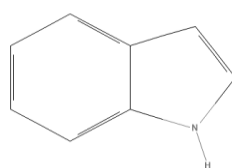
Piridoxamina-5-fosfato



Glicerofosfolípidios - Fosfatidilcolina (PC)



Glicerofosfolípidios - Fosfatidiletanolamina (PE)



Indol