



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química- Doutorado

Paola Dias de Oliveira

**Estudo do mecanismo de ação antibiótica de ω -
aminoalcoxilxantonas sobre *S. aureus* utilizando análise
metabolômica por RMN e Quimiometria**

Orientadora: Dra. Ana Camila Micheletti

Coorientadora: Dra. Glauca Braz Alcantara

Coorientador: Dr. Adilson Beatriz

Campo Grande, MS

2022



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química- Doutorado

Paola Dias de Oliveira

**Estudo do mecanismo de ação antibiótica de ω -
aminoalcoxilxantonas sobre *S. aureus* utilizando análise
metabolômica por RMN e Quimiometria**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química – Nível de Doutorado
– da Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul.

Orientadora: Dra. Ana Camila Micheletti
Coorientadora: Dra. Gláucia Braz Alcantara
Coorientador: Dr. Adilson Beatriz

Campo Grande, MS
2022



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATA DE DEFESA DE TESE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO

Aos vinte e um dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e dois, às oito horas, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Ana Camila Micheletti (UFMS), Aline Lima de Oliveira Paterno (UnB), Elenilson de Godoy Alves Filho (UFC), Fernanda Rodrigues Garcez (UFMS) e Nídia Cristiane Yoshida (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: PAOLA DIAS DE OLIVEIRA, CPF 04382330181, do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIBIÓTICA DE ω -AMINOALCOXILXANTONAS SOBRE *S. aureus* UTILIZANDO ANÁLISE METABOLÔMICA POR RMN E QUIMIOMETRIA" e orientação de Ana Camila Micheletti. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	AValiação
Dra. Ana Camila Micheletti (Interno)	APROVADA
Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno (Externo)	APROVADA
Dra. Deisy dos Santos Freitas (Externo) (Suplente)	
Dr. Dênis Pires de Lima (Interno) (Suplente)	
Dr. Elenilson de Godoy Alves Filho (Externo)	APROVADA
Dra. Fernanda Rodrigues Garcez (Interno)	APROVADA
Dra. Nídia Cristiane Yoshida (Interno)	APROVADA

RESULTADO FINAL:

Aprovação	X
Aprovação com revisão	
Reprovação	

OBSERVAÇÕES: Acatar as sugestões/ correções da banca examinadora.

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna



Documento assinado eletronicamente por **Ana Camila Micheletti, Professora do Magistério Superior**, em 21/02/2022, às 12:27, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nidia Cristiane Yoshida, Professora do Magistério Superior**, em 21/02/2022, às 12:27, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Rodrigues Garcez, Professora do Magistério Superior**, em 21/02/2022, às 12:28, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Lima de Oliveira Paterno, Usuário Externo**, em 22/02/2022, às 08:38, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elenilson de Godoy Alves Filho, Usuário Externo**, em 22/02/2022, às 11:17, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **PAOLA DIAS DE OLIVEIRA, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 10:22, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3064534** e o código CRC **AE84E706**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&codigo_verificador=3064534&codigo_crc=AE84E706&hash_downloa...

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e saúde durante toda essa caminhada;

Aos meus pais, Sebastião e Aldirene, e minha irmã Paloma pelo apoio e carinho;

Aos meus avós, pelo incentivo e entusiasmo pelos meus estudos;

A minha orientadora, Ana Camila Micheletti, pelos ensinamentos, disponibilidade e dedicação durante todo meu doutorado. Também por estar presente durante toda minha iniciação científica e mestrado, contribuindo com seus conhecimentos;

Ao meu coorientador, Adilson Beatriz, que sempre acreditou no meu crescimento. Foi um privilégio ter seu apoio durante toda minha vida acadêmica;

A minha coorientadora, Glaucia Braz Alcantara, que sempre paciente e com uma alegria contagiante, propiciou-me muita sabedoria.

Aos amigos desde de quando eu era IC, Tatiana, Nathalia e Rosângela, e aos que eu conheci no mestrado, Daiane, Neimar e Rosane, pelos momentos de descontrações, apoio e carinho.

Aos professores da banca por toda contribuição do trabalho;

Aos técnicos Joaquim, pelo suporte na liofilização das amostras, Luciana pelo suporte nas análises de RMN e Jacqueline, que além do suporte no RMN, se tornou uma grande amiga, rendendo vários momentos de risadas.

À PROPP – UFMS e FUNDECT pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa concedida.

Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino [...] Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade

Paulo Freire

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Antibacterianos: uma breve revisão	18
1.2 Mecanismo de ação dos antibióticos na célula bacteriana.....	25
1.2.1 Inibição da síntese de parede celular	28
1.2.2. Inibição da síntese proteica.....	30
1.2.3 Interferência na síntese de ácido nucleico	32
1.3 Derivados xantônicos: ω -aminoalcoxilxantonas	33
1.4. O uso da Ressonância Magnética Nuclear e Metabolômica no avanço contra a resistência bacteriana	35
2. Objetivos.....	38
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Materiais e equipamentos	39
3.2. Métodos.....	40
3.2.1. Obtenção das ω -aminoalcoxilxantonas (MICHELETTI et al, 2011).....	40
3.2.2. Procedimento para obtenção dos metabólitos intracelulares	42
3.2.3. Preparo das amostras para análise de RMN.....	43
3.2.4. Parâmetros para aquisição das análises de RMN.....	44
3.2.5. Tratamento quimiométrico.....	44

3.2.6. Modelagem molecular	45
3.2.6.1. Seleção de alvos e simulações de acoplamento molecular	45
3.2.7 Análise de variância	46
4. Resultados e discussão	47
4.1 Síntese das ω -aminoalcoxilxantonas	47
4.2 Aquisição dos espectros de RMN de para análise metabolômica e caracterização dos metabólitos intracelulares.....	54
4.3. Uso da quimiometria para sugerir o mecanismo de ação das ω -aminoalcoxilxantonas	62
4.4 Modelagem molecular	74
5. CONCLUSÃO	81
Referências	82
ANEXOS	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural dos primeiros quimioterápicos sintetizados	19
Figura 2. Representação estrutural do prontossil e sulfanilamida, obtida após ser metabolizada no organismo	20
Figura 3. Representação estrutural da penicilina obtida do fungo <i>Penicillium notatum</i>	20
Figura 4. Representação estrutural dos antibióticos disponíveis nos anos de 1940 e 1980	22
Figura 5. Representação estrutural dos antibióticos disponíveis nos anos de 2000 a 2010	23
Figura 6. Estrutura básica de células procarióticas	27
Figura 7. Estrutura da parede celular de a) bactérias Gram-positivas; b) Bactérias Gram-negativas.....	27
Figura 8. Alvos dos principais agentes antibacterianos.....	28
Figura 9. Representação esquemática do peptidoglicano	29
Figura 10. Ação dos β - lactâmicos	30
Figura 11. Etapa de tradução para a síntese de proteínas.....	32
Figura 12. Representação estrutural das ω -aminoalcoxilxantonas	35
Figura 13. Representação esquemática da obtenção de ω -aminoalcoxilxantonas a partir da liquexantona (1)	40
Figura 14. Esquema geral para obtenção da norliquexantona	47
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H da liquexantona (1) (CDCl_3 , 500 MHz) e norliquexantona (2) (DMSO-d_6 , 500 MHz).....	48
Figura 16. Esquema geral para obtenção das ω -bromoalcooxilxantonas	49
Figura 17. Estrutura das ω -aminoalcoxilxantonas.....	51
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H com ampliação na faixa de 3,8 – 2,4 ppm da: A) substância 4 (^1H , 500 MHz, CDCl_3); B) substância S7 (^1H , 500 MHz, MeOD-d_4); C) substância S8 (^1H , 500 MHz, CDCl_3).....	52
Figura 19. A) Espectro de RMN de ^1H do grupo controle (^1H , 500 MHz; $\text{D}_2\text{O/TMSP-d}_4$); B) Expansão de -0,6-3,06 ppm do espectro de RMN de ^1H do grupo controle; C)	

Expansão de 3,5-4,5 ppm do espectro de RMN de ^1H do grupo controle; D) Expansão de 6,5-9,0 ppm do espectro de RMN de ^1H do grupo controle.....	55
Figura 20. A) Espectro de RMN de ^1H referentes aos sinais do aspartato na região de 2,90 – 2,60 ppm e 3,90- 3,80 ppm); B) Mapa de correlação Jres dos sinais do aspartato (^1H , 500 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$).....	56
Figura 21. Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H (COSY) na faixa de 4,00-2,50 ppm referente aos sinais do aspartato (^1H , 500 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$).....	57
Figura 22. Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H (TOCSY) do grupo controle referente aos sinais do aspartato (^1H , 500 MHz; $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$).....	58
Figura 13. Mapa de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) do grupo controle referente aos sinais do aspartato (^1H , 500 MHz; $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$).....	58
Figura 24. Representação estrutural dos metabólitos identificados nos grupos tratados com antibióticos, derivados xantônicos e no grupo controle.....	61
Figura 25. Gráfico de escores PCA obtido a partir dos dados de RMN de ^1H da cultura de <i>S. aureus</i> após tratamento com antibióticos.....	63
Figura 26. Gráfico de escores PLS- DA obtido a partir dos dados de RMN de ^1H da cultura de <i>S. aureus</i> após tratamento com antibióticos.....	66
Figura 27. Gráfico de escores PLS- DA obtido a partir dos dados de RMN de ^1H da cultura de <i>S. aureus</i> após tratamento com os seguintes antibióticos e o branco (grupo controle): a) ampicilina e canamicina; b) ampicilina e tetraciclina; c) ampicilina e ciprofloxacina; d) canamicina e tetraciclina; e) ciprofloxacina e tetraciclina; f) ciprofloxacina e canamicina.....	65
Figura 28. Gráfico de escores PCA obtido a partir dos dados de RMN de ^1H da cultura de <i>S. aureus</i> após tratamento com antibióticos e derivados xantônicos.....	646
Figura 29. Gráfico de- a) escores b) loadings- PLS-DA obtido a partir dos dados de RMN de ^1H da cultura de <i>S. aureus</i> após tratamento com antibióticos e derivados xantônicos.....	68
Figura 30. Proporção relativa dos metabólitos intracelulares de <i>S. aureus</i> após tratamento com cada antibiótico, derivados xantônicos e o branco (grupo controle)..	69
Figura 31. Representação esquemática do Ciclo de Krebs.....	71
Figura 32. Compostos testados na análise de <i>docking</i> molecular.....	76

Figura 33. Interação da ciprofloxacina e das substâncias S6, S7 e S8 no sítio ativo da topoisomerase IV.....	77
Figura 34 Representação das interações de aminoácidos com a Novobiocina.....	79
Figura 35 Interações dos aminoácidos com a ciprofloxacina e compostos S6 (6) , S7 (7) e S8 (8)	80
Figura A1. Espectro de RMN de ¹ H da liquexantona (1) (CDCl ₃).....	92
Figura A2. Espectro de RMN de ¹ H da norliquexantona (2) (DMSO-d ₆)	93
Figura A3. Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (CDCl ₃)	94
Figura A4. Espectro de RMN de ¹ H da substância 4 (CDCl ₃)	95
Figura A5. Espectro de RMN de ¹ H da substância 5 (CDCl ₃)	96
Figura A6. Espectro de RMN de ¹ H da substância S6 (MeOD- d ₄)	97
Figura A7. Espectro de RMN de ¹ H da substância S7 (MeOD- d ₄)	98
Figura A8. Espectro de RMN de ¹ H da substância S8 (CDCl ₃)	99
Figura A9. Gráfico de <i>loadings</i> - PLS-DA da cultura de <i>S. aureus</i> sem e após tratamento com ampicilina e tetraciclina (Fig. 25a).....	100
Figura A10. Gráfico de <i>loadings</i> - PLS-DA da cultura de <i>S. aureus</i> sem e após tratamento com ampicilina e canamicina (Fig. 25b).....	100
Figura A11. Gráfico de <i>loadings</i> - PLS-DA da cultura de <i>S. aureus</i> sem e após tratamento com ampicilina e ciprofloxacina (Fig. 25c).....	101
Figura A12. Gráfico de <i>loadings</i> - PLS-DA da cultura de <i>S. aureus</i> sem e após tratamento com canamicina e tetraciclina (Fig. 25d)	101
Figura A13. Gráfico de <i>loadings</i> - PLS-DA da cultura de <i>S. aureus</i> sem e após tratamento com ciprofloxacina e tetraciclina (Fig. 25e).....	102
Figura A14. Gráfico de <i>loadings</i> - PLS-DA da cultura de <i>S. aureus</i> sem e após tratamento com canamicina e ciprofloxacina (Fig. 25f).....	102

INDICE DE TABELAS

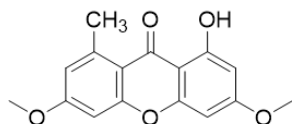
Tabela 1. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H dos compostos ω -bromoalcoxilxantonas.....	50
Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H dos compostos ω -aminoalcoxilxantonas	53
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos metabólitos identificados nos grupos tratados com antibióticos, derivados xantônicos e no grupo controle	59
Tabela 4 . Energias das interações do complexo ligante- receptor com a topoisomerase IV (cristalizada) (afinidade de ligação (Kcal/mol)).	75

INDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

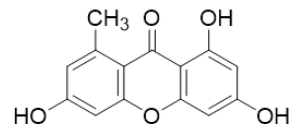
δ	Deslocamento químico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
Aq	<i>Acquisition time</i> (Tempo de aquisição)
CMI	Concentração mínima inibitória
COSY	Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de Correlação)
d	Dupleto
dl	Dupleto largo
d1	<i>Delay</i> (Tempo de espera antes de cada aquisição)
D ₂ O	Óxido de deutério
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DS	<i>Dummy scan</i>
Gli	Glicina
Glu	Glutamato
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Correlação Heteronuclear a Ligação Direta)
Hz	Hertz
Jres	<i>J-Resolved Spectroscopy</i>
LB	<i>Line Broadening</i> (Multiplicação exponencial aplicada no FID)
Lis	Lisina
LV	Latent variables (latentes variáveis)
m	Multiplete
MCE	Éster Celulose Misto Hidrofílico
MDR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente
Met	Metionina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NAG	<i>N</i> -acetilglicosamina

NAM	Ácido <i>N</i> - acetilmurâmico
NS	Número de scans
OMS	Organização mundial da saúde
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
PC	<i>Principal component</i> (Componente principal)
PCA	Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (Mínimos Quadrados Parciais)
PLS- DA	<i>Partial Least Squares – Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)
ppm	Partes por milhão
quint	Quinteto
Pro	Prolina
RG	Ganho do receptor
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _r	RNA ribossômico
RNA _t	RNA transportador
RPM	Rotação por minuto
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
SW	Spectral width (janela espectral)
t	Tripleto
TD	Size of FID (número de pontos utilizados para digitalização do FID)
TMSP-d ₄	3-(trimetilsilil)-2,2,3,3-d ₄ -propionato de sódio
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de correlação total)

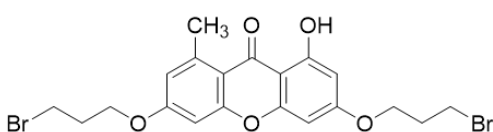
Estruturas químicas de materiais de partida e compostos sintetizados



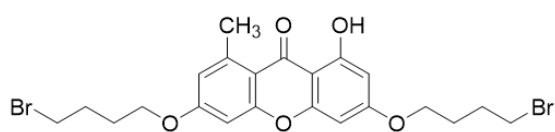
Liqueixantona
1



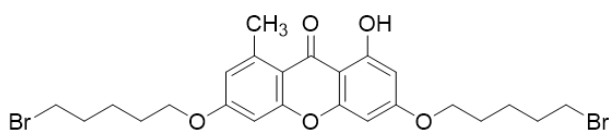
Norliqueixantona
2



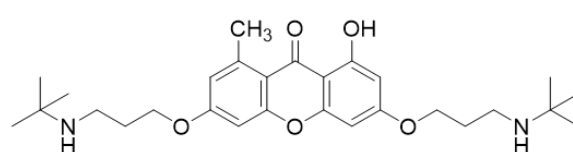
3,6-bis(3-bromopropóxi) - 1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona
(3)



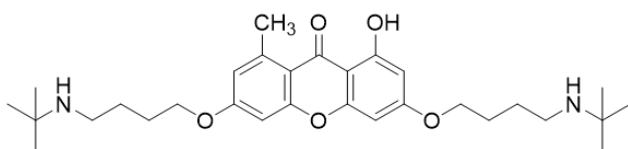
3,6-bis(3-bromobutóxi) - 1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona
(4)



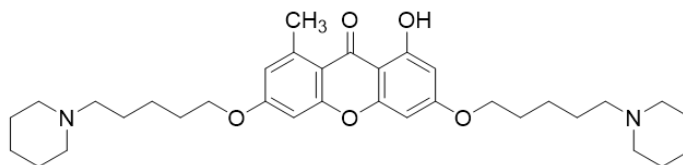
3,6-bis(3-bromopentóxi) - 1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona
(5)



3,6-bis[3-(t-butilamino)propóxi]-1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona
(S6)



3,6-bis[4-(t-butilamino)butóxi]-1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona
(S7)



1-hidróxi-8-metil-3,6-bis(3-piperidin-1-ilpentil)oxi]-9H-xanten-9-ona
(S8)

RESUMO

Devido à resistência que algumas bactérias adquirem aos medicamentos, é essencial a utilização de técnicas analíticas para identificar o mecanismo de ação de substâncias que apresentam potencial para atuar como antibacterianos. Nesse sentido, a metabolômica baseada em RMN tornou-se uma alternativa poderosa para fornecer respostas importantes sobre a estrutura bacteriana e apoiar o entendimento sobre o modo de ação dos antibióticos, com base nas alterações metabólicas causadas nas bactérias. Em nosso estudo, a RMN foi usada para investigar as respostas metabólicas de uma cepa de *S. aureus* contra quatro antibióticos com diferentes modos de ação e três substâncias sintetizadas da classe das xantonas. Observamos por análises quimiométricas uma distinção entre o grupo controle e antibióticos com alvos extracelulares, como ampicilina, e alvos intracelulares, como canamicina, tetraciclina e ciprofloxacina. A partir do perfil químico, identificamos 21 metabólitos, entre esses, os aminoácidos e precursores importantes para diferenciar os grupos foram a betaína, acetamida, glutamato, lisina, alanina, isoleucina/ leucina, acetato, treonina, prolina e etanol. Assim, verificamos uma forte tendência de semelhança entre os grupos S6, S7 e S8 (derivados xantônicos) e ciprofloxacina, que tem como alvo a replicação do DNA bacteriano. Foi também realizada a análise de *docking* molecular dos compostos sintetizados com o sítio ativo da enzima topoisomerase IV, enzima alvo da ciprofloxacina, que mostrou uma alta afinidade das substâncias S6, S7 e S8 com a enzima topoisomerase IV, consolidando os resultados obtidos nas análises quimiométricas. Assim, a metabolômica baseada em RMN se mostrou uma técnica útil para acessar o perfil metabólico de *S. aureus* após algum tratamento com substâncias com atividade antimicrobiana, ajudando-nos a investigar seus mecanismos de ação.

Palavras-chaves: mecanismo de ação antibacteriana; xantonas; metaboloma; RMN; *docking* molecular.

Abstract

Due to the resistance that some bacteria acquire to drugs, it is essential to use analytical techniques to identify the mechanism of action of substances that have the potential to act as antibacterials. In this regard, NMR-based metabolomics has become a powerful alternative to provide important answers on the bacterial structure and to support the understanding about mode of action of antibiotics on bacterial structure using the bacterial metabolic changes. In our study, NMR was used to investigate the metabolic responses of one *S. aureus* strains against four antibiotics with different modes of action and three synthesized substances from xanthone class. We observed by chemometric analysis a distinction between control group and antibiotics with extracellular targets, such as ampicillin, and intracellular targets, such as kanamycin, tetracycline and ciprofloxacin. From the chemical profile of the metabolites, we identified that the amino acids and important precursors to differentiate the groups were betaine, acetamide, glutamate, lysine, alanine, isoleucine/leucine, acetate, threonine, proline and ethanol. Thus, we verified a strong tendency for the S6, S7 and S8 (xanthonic derivatives) group to be similar to the ciprofloxacin group, which target bacterial DNA replication. The molecular docking analysis of the compounds synthesized with the active site of the topoisomerase IV enzyme, the target enzyme of ciprofloxacin, the target enzyme of ciprofloxacin, which showed a high affinity of substances S6, S7 and S8 with the enzyme topoisomerase IV, consolidating the results obtained in the chemometric analysis. Therefore, NMR-based metabolomics proved to be a useful technique to access the metabolic profile of *S. aureus* after some treatment with substances that have antimicrobial activity, helping us to investigate the mechanism of action of the synthesized substances.

Keywords: antibacterial mechanism of action; xanthenes; metabolome; NMR; molecular Docking

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIBIÓTICA DE Ω -AMINOALCOXILXANTONAS SOBRE *S. AUREUS* UTILIZANDO ANÁLISE METABOLÔMICA POR RMN E QUIMIOMETRIA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antibacterianos: uma breve revisão

Antimicrobianos são substâncias capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de microrganismos, como bactérias, fungos e parasitas. Quando os antimicrobianos são utilizados contra bactérias, são chamados de antibacterianos e podem receber duas classificações de acordo com sua forma de obtenção: antibióticos ou quimioterápicos (CRAIG; STITZEL, 2003; SIQUEIRA- BATISTA; GOMES, 2010).

O termo quimioterápico é erroneamente relacionado na internet como drogas exclusivas para o tratamento anticâncer (MAARTENS et al, 2011). A definição de quimioterápico é mais ampla, se referindo ao uso de qualquer composto químico sintético que atue seletivamente sobre microrganismos ou células cancerígenas (PARASCANDOLA, 1981; CRAIG; STITZEL, 2003; MAARTENS et al, 2011). Já antibióticos são substâncias químicas produzidas por organismos vivos, como microrganismos, que causam a morte ou inibem o crescimento de outros microrganismos (MADIGAN et al, 2009). Ainda existem as substâncias de fontes naturais modificadas em laboratório, denominadas semissintéticas, que também pode apresentar atividade antimicrobiana (ROLINSON, 1979; MAARTENS et al, 2011)

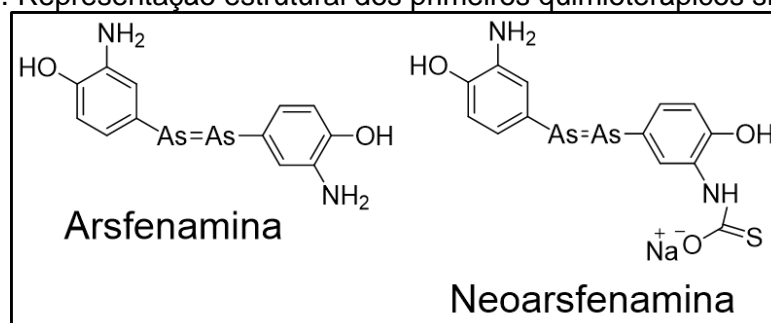
Comumente na literatura, o termo antibiótico é utilizado tanto para as substâncias sintéticas quanto naturais, e por isso, nesse trabalho, adotaremos o termo antibiótico para ambos. Outro termo usado nesse trabalho é relativo à atividade antimicrobiana: bactericida ou bacteriostático (SANTO et al, 2018), sendo os agentes antimicrobianos bactericidas aqueles que causam a morte da bactéria e os bacteriostáticos aqueles que promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES, MOMESSO; PUPO, 2010).

O pioneiro em síntese de substâncias com atividade antimicrobiana foi Paul Ehrlich, conhecido como “pai da quimioterapia” pela síntese em 1907 do medicamento

arsfenamina e descoberta de sua atividade sobre a bactéria *Treponema pallidum*, posteriormente comercializado com Salvarsan para o tratamento da sífilis (**Fig. 1**). Apesar da sua atividade, o Salvarsan apresentava alguns fatores negativos, como a baixa solubilidade em água e outros solventes, requeria proteção para evitar a oxidação e sua administração era intravenosa (PARASCANDOLA, 2001).

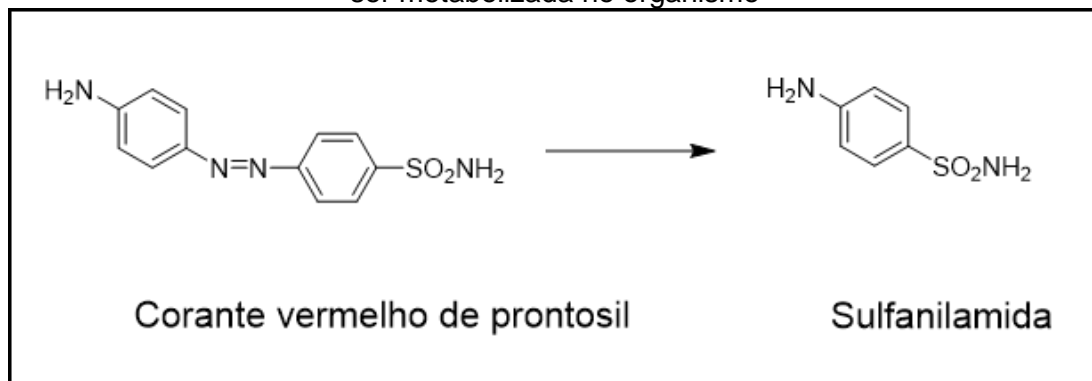
Em 1912, Paul Ehrlich também sintetizou um derivado do Salvarsan, a Neoarsenamina (Neosalvarsan, **Fig. 1**), que era mais solúvel e apresentava uma toxicidade menor, e estes foram usados durante 20 anos como os únicos antibióticos usados no tratamento de infecções bacterianas (**Fig. 1**) (PARASCANDOLA, 2001). No entanto, essas duas substâncias apresentavam alta toxicidade para tratamento de infecções sistêmicas, aumentando a necessidade de novas substâncias ativas (PATRICK, 2013).

Figura 1. Representação estrutural dos primeiros quimioterápicos sintetizados



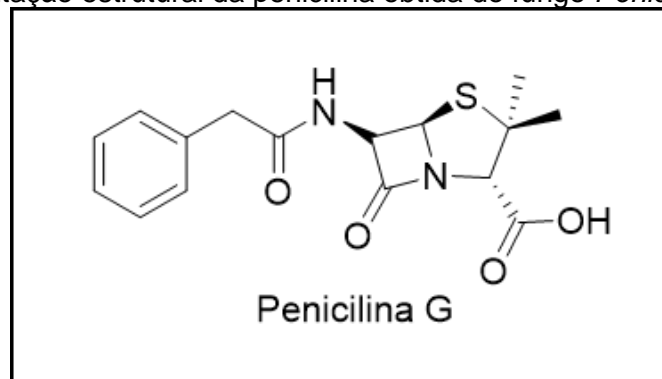
Gerhard Domagk, em 1935, descobriu que o corante vermelho prontossil (sulfamidocicloidina) apresentava atividade *in vivo* contra infecções causadas por espécies de *Streptococcus* (RUBIN, 2007). O prontossil agia como um pró- fármaco para uma nova classe de agentes antibacterianos, as sulfas ou sulfonamidas, que constituíram a primeira classe de agentes efetivos contra infecções sistêmicas introduzida no início dos anos 1940 (**Fig. 2**) (GUIMARÃES, MOMESSO; PUPO, 2010; PATRICK, 2013).

Figura 2. Representação estrutural do prontossil e sua parte ativa sulfanilamida, obtida após ser metabolizada no organismo



O descobrimento da penicilina é datado de 1928, quando Alexander Fleming, ao retornar de suas férias, observou que em placas de Petri contendo culturas de *S. aureus* não havia crescimento de colônias em áreas contaminadas acidentalmente pelo mofo de *Penicillium notatum*. Ele isolou a substância ativa produzida pelo fungo e a chamou de penicilina (**Fig. 3**), atribuindo a ela um efeito antibacteriano. No entanto, a instabilidade do composto dificultava a purificação, fazendo com que Fleming tentasse durante anos obter a substância pura, mas não teve sucesso (GAYNES, 2017).

Figura 3. Representação estrutural da penicilina obtida do fungo *Penicillium notatum*



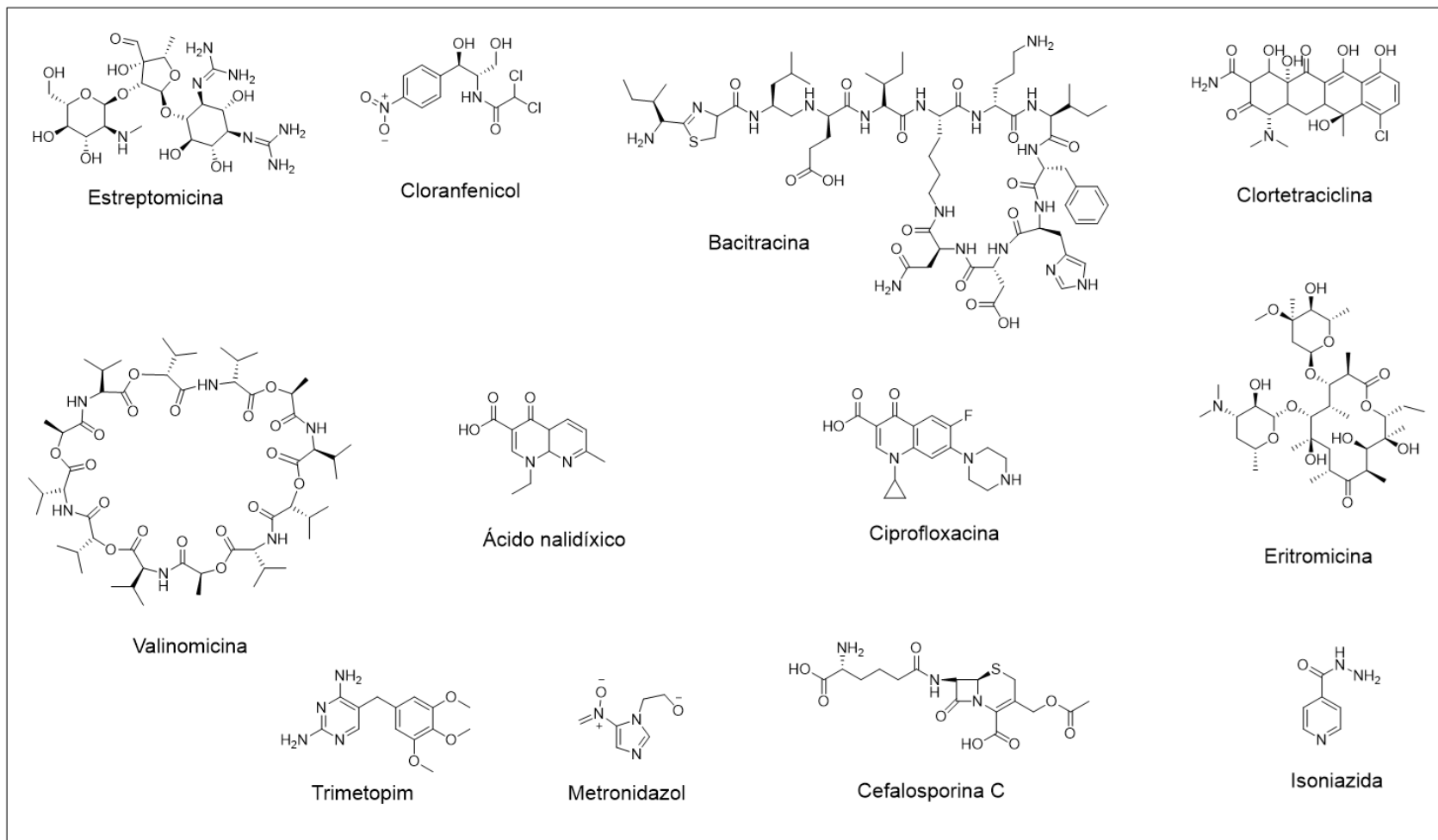
Foi então que 1939, Ernst Chain, da Universidade de Oxford, se interessou pela descoberta de Alexander Fleming e, junto com seu supervisor Howard Florey, conseguiram purificar a penicilina. Em 1940 publicaram a produção, purificação e demais resultados da penicilina, que apresentava uma alta potencialidade de combater infecções causadas por *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e

Clostridium septique. Os efeitos da penicilina foram tão extraordinários que em 1945 foi concedido o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia a Fleming, Chain e Florey (GAYNES, 2017).

Em 1944, pesquisas de organismos do solo levaram à descoberta do primeiro composto da classe dos aminoglicosídeos utilizado no tratamento da tuberculose e uma variedade de doenças causadas por bactérias Gram-negativas, a estreptomicina. (PATRICK, 2013; KRAUSE et al., 2016). Após a Segunda Guerra Mundial, as pesquisas avançaram na descoberta de novas drogas, como cloranfenicol (1947), bacitracina (1945, antibiótico peptídico), clortetraciclina (1948, tetraciclina), eritromicina (1952, macrolídeo), valinomicina (peptídico ciclíco), a cefalosporina C (1955, β -lactâmico), o ácido nalidíxico (1962, o primeiro dos agentes antibacterianos da classe das quinolonas) e a segunda geração dessa classe, a ciprofloxacina (1987) (**Fig. 4**) (HUTCHINGS, TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Entre 1940 a 1980 apenas três antibacterianos sintéticos foram disponibilizados no mercado, a isoniazida, trimetropima e o metronidazol (**Fig. 4**). Em meados de 1980, ocorreu a introdução de derivados das fluoroquinolonas e análogos das substâncias pertencentes às classes dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina (GUIMARÃES, MOMESSO; PUPO, 2010).

Figura 4. Representação estrutural dos antibióticos disponíveis nos anos de 1940 e 1980



A partir dos anos 2000, poucos antibacterianos foram introduzidos no mercado, a linezolida (2001), tigeciclina-tetraciclina de última geração (2005), retapamulina, pleuromutilina (2008), telavancina- um glicopeptídeo (2009), ceftarolina, (GUIMARÃES, MOMESSO; PUPO, 2010; BRITO; CORDEIRO, 2012) dalbavancina, oritavancina, tedizolida (2014), ceftazidima-avibactam (2015) plazomicina, eravaciclina, sareciclina, omadaciclina (2018), relebactam , pretomanida, lefamulina e cefiderocol (2019) (ANDREI, DROC; STEFAN, 2019) (Fig. 5).

Figura 5. Representação estrutural dos antibióticos disponíveis de 2000 a 2019 (continua)

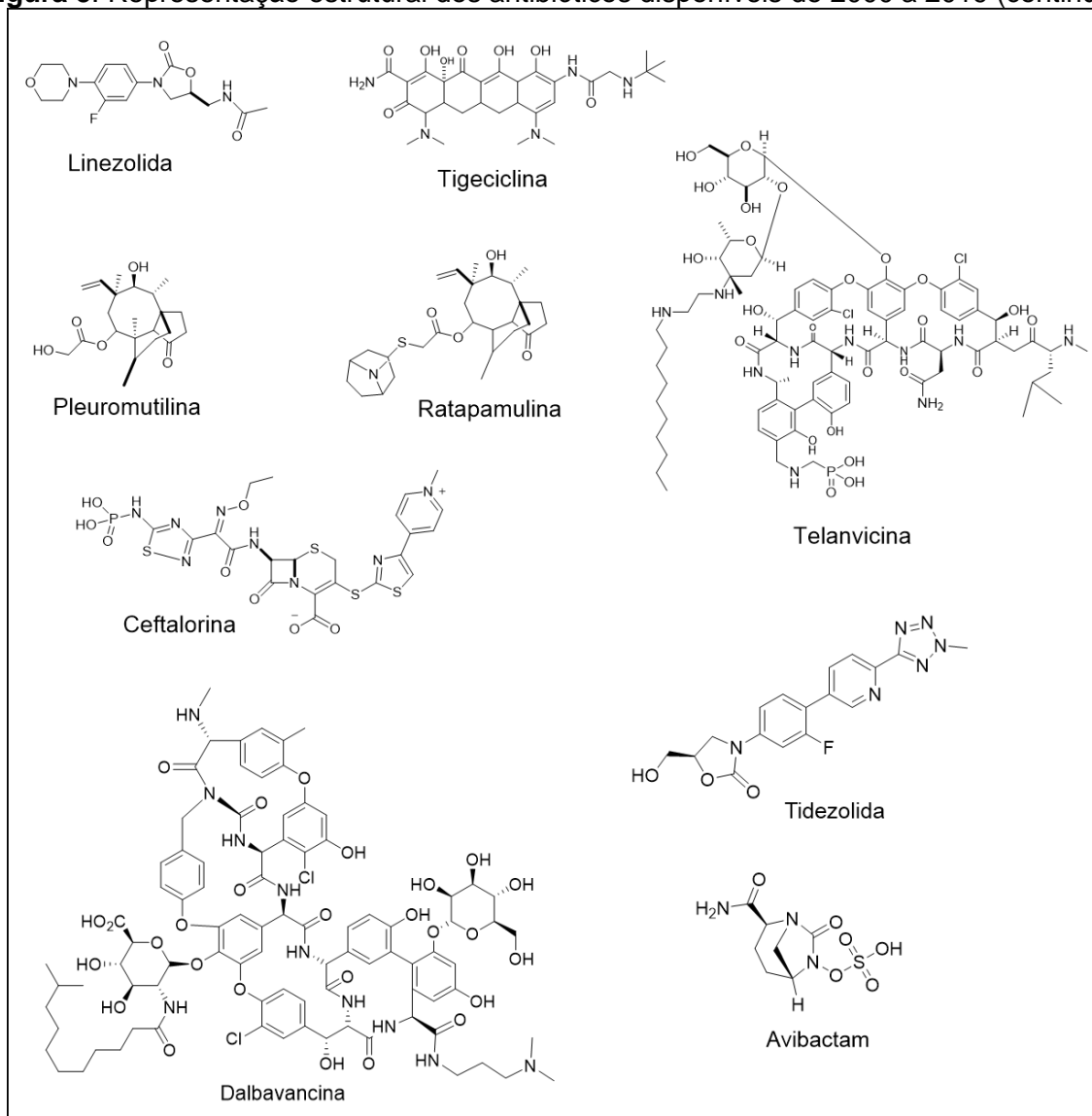
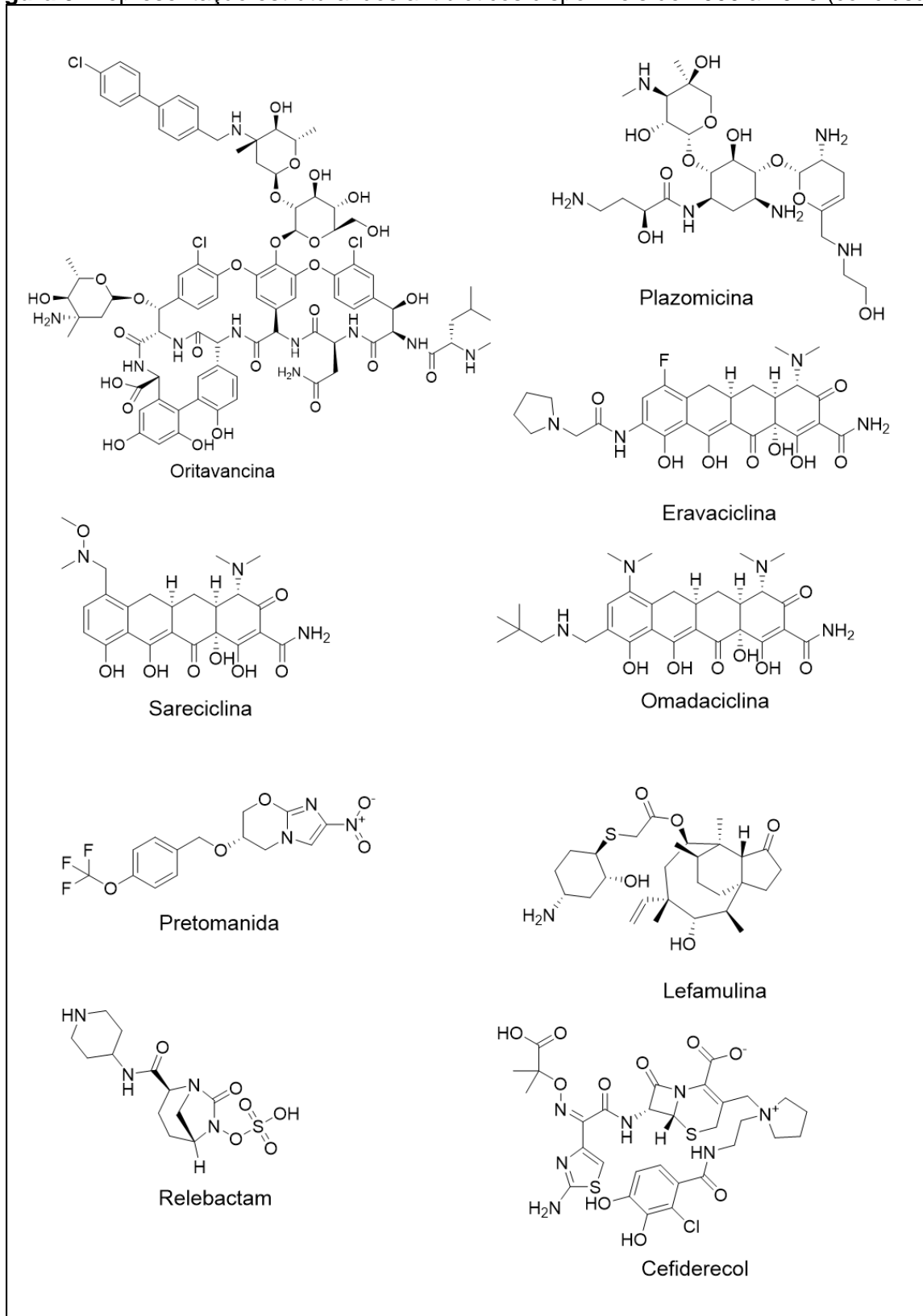


Figura 5. Representação estrutural dos antibióticos disponíveis de 2000 a 2019 (conclusão)



É notório que o desenvolvimento dos fármacos revolucionou o tratamento de infecções bacterianas, levando a uma drástica redução da mortalidade causada por bactérias. Entretanto, alguns fatores fizeram com que os microrganismos desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos e, conseqüentemente, começaram a aparecer resistência das bactérias perante os fármacos (SILVEIRA et al, 2006).

1.2 Mecanismo de ação dos antibióticos na célula bacteriana

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema mundial de saúde pública que se encontra em crescimento constante, diminuindo as possibilidades de cura clínica, aumentando os custos de tratamento e causando morbidade e mortalidade das pessoas (WHO, 2020; SERRA-BURRIE et al, 2020). Os primeiros registros de microrganismos resistentes surgiram em meados dos anos 1950, quando foram relatados os primeiros surtos por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina em ambiente hospitalar (OLIVEIRA; SILVA, 2008).

Com o decorrer dos anos, novas cepas resistentes foram surgindo, como a disseminação mundial de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e glicopeptídeos (GRE), *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (MDR), *Pneumococcus* resistentes à penicilina e macrolídeos, *Acinetobacter baumannii* resistente ao imipenem e *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, resistentes à cefalosporina de terceira geração, causando centenas de milhares de mortes anualmente (CORNAGLIA; ROSSOLINI, 2009; ABEBE, TEGENE; TIBETU, 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência bacteriana está entre as dez maiores ameaças à saúde pública global. Se medidas não forem tomadas, estima-se que até 2050 o problema causará a perda de 10 milhões de vidas em todo o mundo, anualmente, além de gerar um enorme prejuízo para a economia, calculado em 100 trilhões de dólares (ANVISA, 2019).

O surgimento de bactérias resistentes pode ser explicado como um mecanismo que as bactérias desenvolvem para se defender da nocividade causada pelos

antibióticos (ANVISA, 2016; ANVISA, 2018). Essa resistência pode surgir por alterações genéticas, causadas pela troca de material genético com outros organismos, ou através da mutagênese de seu próprio DNA, o que permite que as bactérias superem a ação dos antibióticos (HOERR et al, 2016; LARSSON; FLACH, 2021).

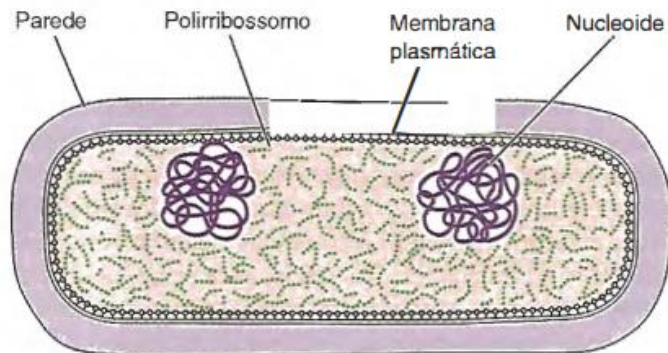
Além disso, é importante citar outros fatores que também contribuem para o surgimento de superbactérias, como o uso de antibióticos por tempo inadequado ou para tratar doenças que não são causadas por infecções bacterianas, utilização de antibióticos de forma inadequada na área da veterinária, falta de controle para doenças causadas por bactérias nos serviços de saúde, descarte inadequado dos antibióticos e a falta de saneamento básico (ANVISA, 2018).

Com relação à resistência aos antimicrobianos, podemos citar três principais mecanismos comuns de resistência:

- Destruição do antibiótico, onde as enzimas bacterianas catalisam a degradação ou causam modificação dos grupos funcionais da estrutura dos antibióticos, (SILVEIRA et al, 2006);
- Efluxo do antibiótico do meio intracelular para o extracelular, diminuindo a concentração adequada do medicamento dentro da célula e conseqüentemente, a ação ineficiente do mesmo (SILVEIRA et al, 2006);
- Reprogramação e modificação da estrutura-alvo, que consiste em modificar o alvo do antibiótico, diminuindo sua eficácia (DUBEI, INDU; SHARMA, 2020).

Bactérias são seres procarióticos, unicelulares e, estruturalmente, bastante simples. São compostas por uma membrana plasmática, que separa o meio externo do meio interno, uma parede celular que confere resistência a célula, ribossomos que sintetizam as proteínas e o material genético, que fica concentrado na região nuclear, chamado de nucleóide (**Fig. 6**) (TORTORA, FUNKE; CASE, 2012; REECE et al., 2015).

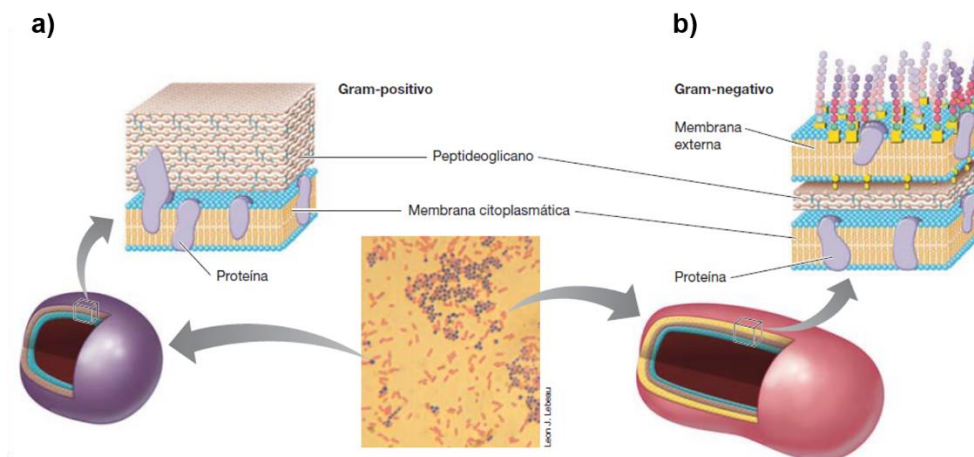
Figura 6. Estrutura básica de células procarióticas



Fonte: Junqueira; Carneiro (2012, p.4)

As bactérias podem ser amplamente classificadas em células Gram-positivas (**Fig. 7, a**) e Gram-negativas (**Fig.7, b**) com base na presença de uma membrana externa e da espessura da parede celular. A parede celular das bactérias Gram-negativas é formada de uma membrana externa constituída de lipopolissacarídeos (LPS) e uma fina camada de peptideoglicano, que se encontra entre a membrana plasmática e a membrana externa. Já as bactérias Gram-positivas não possuem membrana externa, e apresentam uma camada bastante espessa de peptideoglicano, o que facilita sua diferenciação das Gram-negativas quando usamos a coloração de Gram, onde as bactérias Gram-negativas adquirem uma coloração rosa e as Gram-positivas ficam com uma coloração roxa (AUER; WEIBEL, 2017).

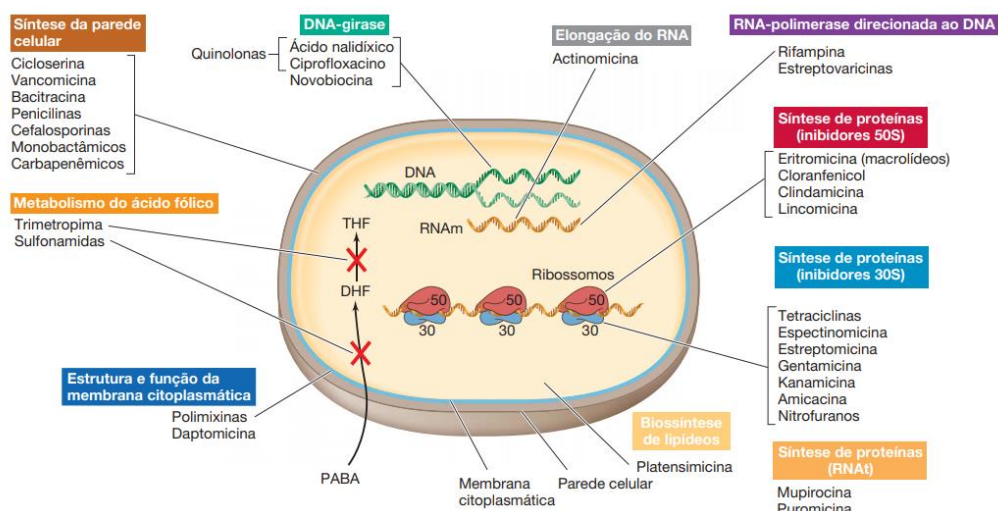
Figura 7. Estrutura da parede celular de a) bactérias Gram-positivas; b) Bactérias Gram-negativas



Fonte: Madigan et al (2016, p. 42)

Devido à simplicidade da estrutura bacteriana, são poucos os alvos de ação dos antibióticos: **1)** inibição da síntese da parede celular; **2)** inibição da síntese proteica; **3)** destruição da membrana da célula bacteriana; **4)** interferência na síntese de ácido nucleico e **5)** inibição da síntese de folato (**Fig. 8**) (NOGUEIRA et al, 2016).

Figura 8. Alvos dos principais agentes antibacterianos



Fonte: Madigan et al (2016, p. 812)

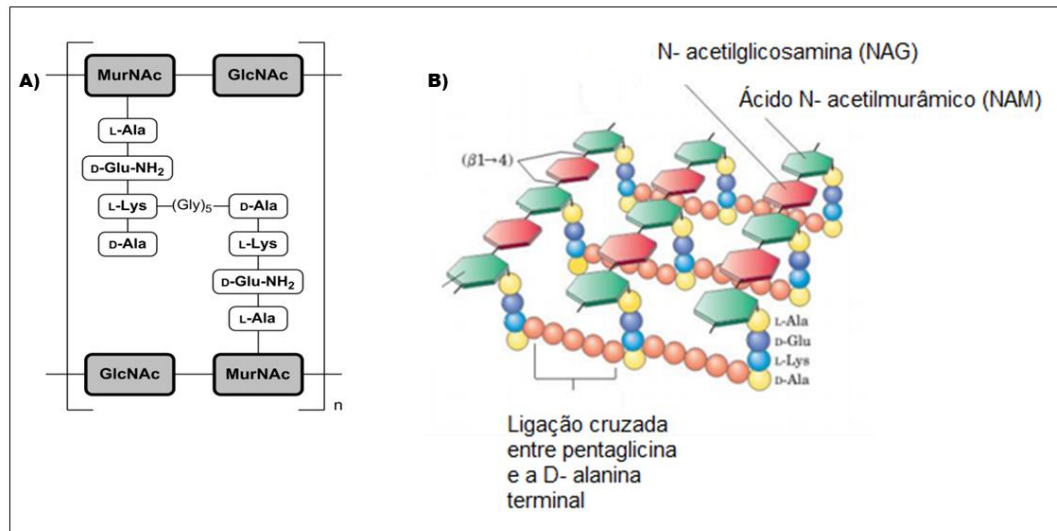
Neste trabalho, foram usados 4 antibióticos de amplo espectro e três mecanismos de ação diferentes, sendo eles: **(a)** ampicilina, do grupo das penicilinas, que age na síntese de parede celular; **(b)** canamicina (bactericida) e **(c)** tetraciclina (bacteriostático) que agem no ribossomo, inibindo a síntese proteica e a **(d)** ciprofloxacina, bactericida, que age inibindo a replicação do DNA, através da inibição da DNA girase. O mecanismo de ação desses 4 fármacos será descrito a seguir.

1.2.1 Inibição da síntese de parede celular

A parede celular bacteriana é constituída de uma rede macromolecular denominada peptideoglicano, que consiste em uma rede macromolecular, constituída de monômeros de açúcar e peptídeos, denominada peptideoglicano. A porção dissacarídica do monômero é constituída por *N*-acetilglucosamina (NAG) e o ácido *N*-acetilmurâmico (NAM), unidos por ligações β (1 \rightarrow 4). A parte peptídica está ligada ao

NAM, numa sequência de quatro aminoácidos (L-Ala, D-Glu, L-Lis, D-Ala e D-Ala) e uma cadeia de pentaglicina ligada a L-Lis. Esses monômeros estão unidos pela pentaglicina com a D-Ala terminal, via ligação peptídica, formando ligações cruzadas, estabelecidas com auxílio da enzima transpeptidase (**Fig. 9**) (TORTORA, FUNKE; CASE, 2012).

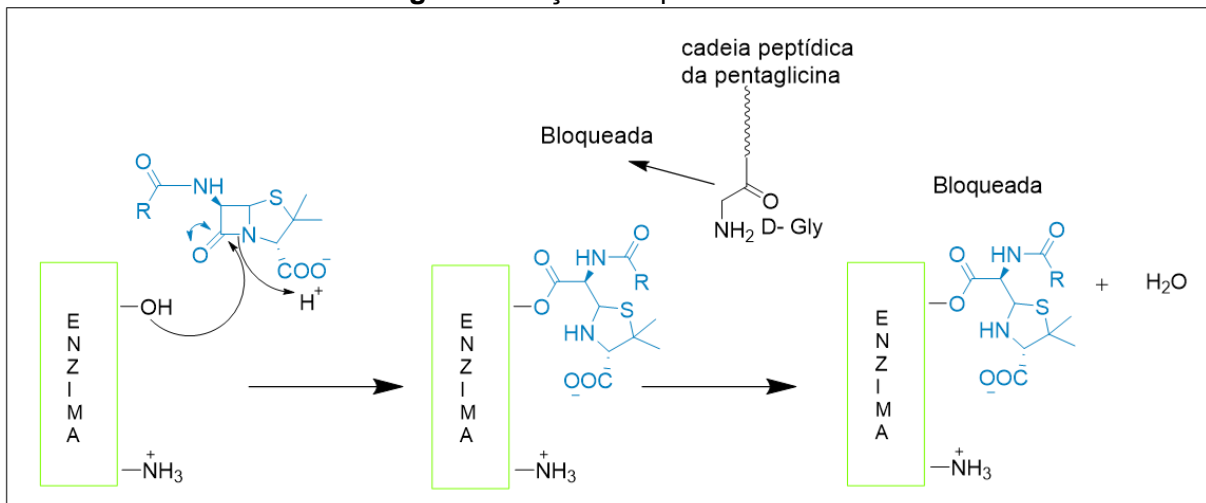
Figura 9. Representação esquemática do peptideoglicano



Fonte: Nelson; Cox, 2014, p. 823

É justamente impedindo a formação da ponte cruzada entre um peptídeo e outro que agem os β -lactâmicos. O papel dos antibióticos β -lactâmicos é ligar-se as enzimas transpeptidases ou as enzimas de síntese da parede celular, conhecidas como proteínas de ligação à penicilina (PBPs), inibindo a síntese da parede celular, enfraquecendo-a e resultando assim, na inibição do crescimento celular e, frequentemente, na morte celular (**Fig. 10**) (RICE, 2012).

Figura 10. Ação dos β - lactâmicos



Fonte: Oliveira et al (2009, p. 2149)

No entanto, algumas cepas de bactérias adquiriram resistências aos β -lactâmicos, produzindo β -lactamases. As β -lactamases são enzimas que agem no anel β -lactâmico, abrindo-o e deixando-o inativo. Outra estratégia de resistência aos antibióticos β -lactâmicos adquirida pelas bactérias é centrada na PBP, onde cepas *S. aureus* sintetizam uma nova enzima, chamada de PBP2a. Esta PBP2a completa a síntese do peptidoglicano de *S. aureus* quando as outras PBPs são desativadas por β -lactâmicos. Assim, a síntese da parede celular continua ocorrendo (FISHER; MOBASHERY, 2016).

1.2.2. Inibição da síntese proteica

O ribossomo bacteriano é formado por uma subunidade menor 30S e uma subunidade maior 50S, formando o ribossomo 70S. Ele é responsável por converter a informação genética contida no RNA mensageiro (RNAm) em proteínas (MOAT, FOSTER; SPECTOR, 2002; ARENS; WILSON, 2016). Para síntese de proteínas, os RNAs desempenham um papel eminente, de forma direta com o RNA mensageiro (RNAm), RNA ribossômico (RNAr) e RNA transportador (RNAt) com movimentos perfeitamente coordenados através de 3 sítios: sítio A, sítio P e sítio E (CHUKWUDI, 2016).

A síntese de proteínas se inicia com a chegada do RNAm, formado no núcleo, que traz consigo a informação de qual proteína será sintetizada. Ele se complexa a subunidade 30S, que faz a leitura correta na sequência 5'–3' até encontrar o códon de iniciação AUG e a subunidade 50S, onde se encontram os 3 sítios. A primeira etapa, chamada etapa de tradução ocorre no sítio A, onde os RNAt trazem as trincas de bases complementares ao códon do RNAm. Cada códon codifica para 1 aminoácido, que se liga no sítio A e depois é transposto para o sítio P (etapa de alongação). Quando finalizada a leitura, a proteína formada é liberada (etapa de término) (**Fig. 11**) (ALBERTS et al, 2017).

Os antibióticos das classes dos aminoglicosídeos, como as canamicina, das tetraciclinas e macrolídeos são conhecidos por inibir a síntese de proteínas pelas interações com os ribossomos bacterianos. O mecanismo de ligação ao RNA é muito complexo, mas, sabe-se que o alvo da maioria dos antibióticos é o RNAr, a fim de inibir a etapa de tradução (CHUKWUDI, 2016).

A tetraciclina e a canamicina são dois fármacos que tem como alvo a etapa de tradução. As tetraciclinas (bacteriostático) agem inibindo a ligação do aminoacil-RNAt ao complexo do RNAm, impedindo que a leitura ocorra (CHUKWUDI, 2016). Já a canamicina (bactericida) age induzindo a ligação do complexo aminoacil-RNAt de forma errônea, resultando na síntese de proteínas falsas (LÜLLMANN et al, 2005).

É nesse ponto que agem as quinolonas. Enquanto em uma das extremidades está ocorrendo o rompimento das ligações de hidrogênio da fita dupla do DNA para que haja replicação, na outra extremidade as enzimas girase ou topoisomerase são impedidas de realizar o giro negativo (contrário ao enrolamento da fita da extremidade que está sendo rompida) pelas quinolonas, e assim, nessa extremidade começa a acontecer um superenovelamento, levando a quebras na fita de DNA (ALDRED, KERNS; OSHEROFF, 2014).

A resistência adquirida pelas bactérias a esta classe de medicamentos se dá principalmente por mutações nas enzimas girase e topoisomerase, diminuindo as interações dos medicamentos com as enzimas, e também pela diminuição da concentração do antibiótico pela bomba de efluxo (HOOPER; JACOBY, 2015).

Nesse contexto, com a perigosa adaptação incessante das bactérias sobre os antibióticos, a busca de novos compostos ativos deve ser frequente. Visando isso, neste estudo utilizamos compostos sintetizados da classe das xantonas, as ω -aminoalcoxilxantonas, descritas na literatura com excelentes atividades biológicas.

1.3 Derivados xantônicos: ω -aminoalcoxilxantonas

O interesse por essa classe de substâncias está nas propriedades bioativas que elas apresentam. Derivados xantônicos apresentam atividades contra malária (KE et al, 2017; PORTELA et al, 2004), antioxidante, analgésica, antidiabética, antiproliferativa, quimiopreventiva (JYOTSHNA, KHARE; SHANKER, 2016), antiarrítmica, antitumoral, anticonvulsivante, anestésica local, antifúngica, antibacteriana (MICHELETTI et al, 2011; FERNANDES et al, 2012), vasorelaxante, inibição da agregação plaquetária (PINTO et al., 2021) e inibição da enzima acetilcolinesterase (LOH, et al., 2021)

Essas propriedades devem-se ao esqueleto das xantonas, que permite uma série de modificações estruturais, e assim, gera uma multiplicidade estrutural de seus derivados que propicia uma excelente interação com alvos biológicos, trazendo uma grande diversidade de propriedades biológicas e farmacológicas (FERNANDES et al, 2012; FERNANDES, TIRITAN; PINTO, 2015; PINTO et al, 2021).

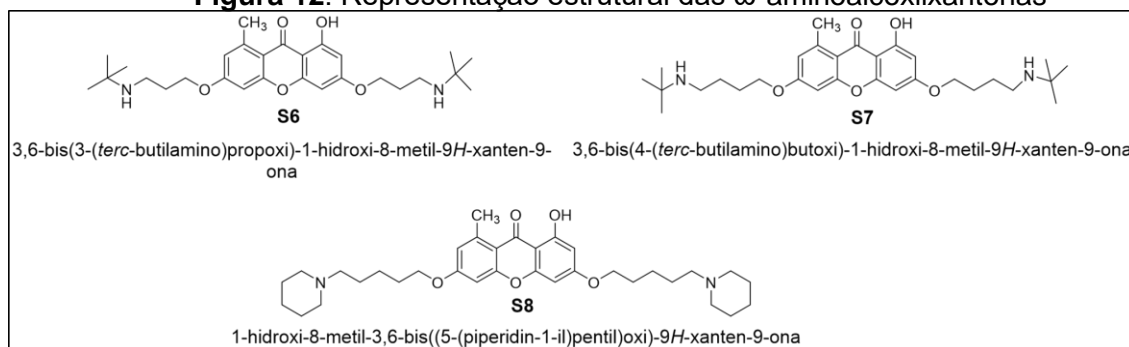
Dos derivados xantônicos, destacamos as ω -aminoalcoxilxantonas, substâncias que possuem cadeias alquílicas nitrogenadas, que apresentam diversas atividades biológicas de interesse, como inibição da enzima acetilcolinesterase (PIAZZI et al., 2007), inibição da agregação plaquetária (LIN et al., 2009), antioxidante (CHENG et al., 2011), anticonvulsivante (MARONA et al., 2008), hipotensiva, antiarrítmica (MARONA et al., 2009a), antifúngica e antibiótica (MARONA et al., 2009b, MICHELETTI et al., 2009).

Micheletti e colaboradores (2011) sintetizaram uma série de 15 ω -aminoalcoxilxantonas derivadas da liquexantona com diferentes substituintes, e avaliaram suas propriedades bacterianas *in vitro* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MICHELETTI et al., 2011). Destas 15 substâncias, três foram selecionadas (compostos **S6**, **S7** e **S8**, **FIG. 12**), baseadas em seu rendimento sintético e valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 7,8 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ e 4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente contra uma cepa padrão *S. aureus* e também contra cepas de *S. aureus* resistentes. Essas três ω - aminoalcoxilxantonas foram utilizadas nesse estudo, na tentativa de obter informações sobre seu mecanismo de ação, usando as técnicas de RMN, metabolômica e quimiometria.

A identificação do mecanismo de ação tradicionalmente consiste na combinação de vários ensaios fenotípicos para considerar efeitos na membrana celular, DNA ou ribossomo, por meio das técnicas de citometria de fluxo, microscopia eletrônica, ensaios colorimétricos, análise de expressão gênica, entre outros. No entanto, esses métodos demandam tempo, pessoal e equipamento especializado e grandes quantidades de compostos, deixando os custos mais elevados (SANTOS et al, 2016).

Nesse cenário, a metabolômica se apresenta como uma alternativa mais rápida e menos onerosa a esse processo, podendo identificar o modo de ação de fármacos cujos efeitos são mediados por alterações metabólicas (VINCENT et al, 2016).

Figura 12. Representação estrutural das ω -aminoalcoxilxantonas



1.4. O uso da Ressonância Magnética Nuclear e Metabolômica no avanço contra a resistência bacteriana

As ciências ômicas buscam ampliar o conhecimento do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. Fazem parte deste conjunto de ciências, a genômica (estudo da alteração dos genes), a transcriptômica (estudo das alterações dos RNA), a proteômica (estudo das alterações das proteínas) e a metabolômica (estudo das alterações dos metabólitos) (CANUTO et al., 2018).

O termo metabolômica refere-se ao estudo qualitativo e quantitativo de metabólitos presentes em sistemas biológicos, que visa, dentre outros objetivos, relacionar as variações dos metabólitos com as mudanças genéticas ou perturbações nas condições ambientais (BADDINI, NETTO; TEIXEIRA, 2014; BUENO, 2015). O conjunto de todos os metabólitos presentes ou alterados em um sistema biológico, como aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos, cofatores, bem como medicamentos e metabólitos associados a medicamentos, célula, tecido, órgão ou organismo examinados sob a forma de extrato celular ou biofluido é chamado de metaboloma (ZHANG; POWERS, 2012; BUENO, 2015; CANUTO et al, 2018).

Uma técnica amplamente utilizada na metabolômica é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), pois permite a identificação e quantificação de uma ampla gama de metabólitos celulares simultaneamente, com alta resolução e capacidade de detecção global. Além do mais, a RMN tem uma série de vantagens na análise do metaboloma, como a facilidade de preparação da amostra e não necessitar de isolamento dos metabólitos, além de ter uma boa reprodutibilidade (TREMAROLI et al., 2009; ZHANG et al., 2015).

No entanto, devido à quantidade de dados químicos gerados da análise metabolômica, a sua interpretação torna-se complexa, fazendo-se necessária a utilização de análise estatística multivariada (SANTOS, 2014), denominada quimiometria, que é a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e modelagens computacionais para resolver dados químicos.

Dos diferentes métodos matemáticos e estatísticos usados na quimiometria, podemos dividi-los em dois grupos: supervisionados e não-supervisionados. Dos métodos não-supervisionados, podemos citar a Análise das Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) e dos supervisionados, os Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*, PLS) e suas variantes ortogonais (OPLS) e também a Análise Discriminante (DA), conhecidas como PLS-DA (*Partial Least Squares – Discriminant Analysis*) e OPLS-DA (*Discriminant Analysis by Orthogonal to Partial Least Squares Projections*) (HÉRBERGER, 2008).

Ambos os métodos, supervisionados e não supervisionados, são técnicas de redução de dimensionalidade, trazendo as informações em gráficos bidimensionais ou tridimensionais, chamados gráficos de escores (informação entre as amostras) e os gráficos de *loadings* (informações sobre as variáveis). Os métodos não-supervisionados, como PCA, são análises exploratórias que ajudam a avaliar de fato quais variáveis são importantes (VERBEECK, CAPRIOLI; PLAS, 2020). Em outras palavras, a PCA separa os grupos por similaridade entre as variáveis.

Já os métodos supervisionados, como PLS e PLS-DA, são mais robustos e lidam melhor com ruídos e a falta de linearidade do modelo. A PLS-DA permite que o algoritmo busque diferenças entre os grupos, e dessa forma, melhore a separação entre eles (WORLEY; POWERS, 2015).

Halouska e colaboradores (2012) estudaram o mecanismo de ação de doze antibióticos em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, utilizando a análise de RMN e metabolômica. Para análise estatística multivariada, eles realizaram a OPLS-DA, onde observaram uma boa separação dos grupos e dessa forma, conseguiram identificar o mecanismo de ação de três substâncias de mecanismos desconhecidos.

Hoerr e colaboradores (2016) realizaram um estudo para prever o mecanismo de ação dos antibióticos sobre *E. coli*, utilizando a análise do metaboloma por RMN. Eles utilizaram a análise de PLS-DA para estudar o perfil metabólico intra e

extracelular de *E. coli*, utilizando cinco classes de antibióticos diferentes, e por meio da separação dos grupos, concluíram que o modo de ação dos antibióticos pode ser predito, utilizando essas técnicas.

Assim, nosso objetivo foi utilizar a análise metabolômica por RMN de uma cepa de bactéria Gram-positiva *S. aureus* submetida ao tratamento com diferentes antibióticos, a fim de diferenciar as mudanças metabólicas causadas pelas diferentes classes de fármacos e usar a quimiometria para identificar o mecanismo de ação das ω - aminoalcoxilxantonas sintetizadas. Dessa forma, buscamos colaborar com o desenvolvimento da área de pesquisa de compostos com potencial antibiótico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a análise metabolômica de uma cepa da bactéria *S. aureus* na presença de quatro antibióticos comerciais e derivados de ω -aminoalcoxilxantonas, a fim de analisar as mudanças metabólicas causadas pelos antibióticos e avaliar a possibilidade de inferir o mecanismo de ação dos derivados xantônicos.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar três ω -aminoalcoxilxantonas derivadas da liquexantona com atividade antibiótica sobre *S. aureus*;
- Submeter as culturas bacterianas de *S. aureus* (NEWP0023) ao tratamento com quatro antibióticos de uso comercial (ampicilina, canamicina, tetraciclina e ciprofloxacina) e com as ω -aminoalcoxilxantonas;
- Identificar e quantificar os metabólitos intracelulares das células bacterianas utilizando a análise por ressonância magnética nuclear;
- Realizar análise estatística multivariada dos dados;
- Contribuir com o entendimento do mecanismo de ação dos compostos sintetizados sobre a bactéria selecionada.
- Realizar estudos *in silico* para complementar e apoiar os resultados obtidos através da análise metabolômica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e equipamentos

As reações de síntese foram realizadas com aparelhagem usual de laboratório de síntese orgânica.

Os solventes utilizados foram adquiridos comercialmente, com grau de pureza PA (marca Merck). Todos foram destilados e secos com Na₂SO₄ antes do uso. O solvente tolueno foi tratado com sódio metálico sob refluxo por 12 horas e destilado, segundo PERRIN; ARMAREGO (1998). Os reagentes dibromados usados foram da marca Sigma-Aldrich e a *terc*-butilamina (Merck) foi destilada antes do uso.

A purificação das substâncias foi realizada por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel (70- 230 mesh) em proporção de 1:50 (g amostra: g de sílica). Os solventes utilizados como eluentes foram misturas de hexano: acetato de etila em gradiente de polaridade.

As substâncias obtidas foram caracterizadas em espectrômetro de ressonância magnética nuclear da marca Bruker, modelo AVANCE NEO 500, de 11,75 T (500 MHz para a frequência do hidrogênio). Foi utilizada sonda de 5 mm de diâmetro interno (Smartprobe®), utilizado o TMSP-d₄ como sinal referência de deslocamento de químico.

Os meios de cultura e antibióticos (ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina e canamicina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os materiais e meios de cultura utilizados para extração e análise biológica foram autoclavados, em autoclave vertical a 121°C por 15 min.

A cepa de *S. aureus* (NEWP0023) foi adquirida comercialmente (Newprov) liofilizada, e o procedimento para ressuspensão seguiu as recomendações do fabricante. Para preparação das suspensões bacterianas foi utilizado turbidímetro digital portátil TB- 1000P da marca TecnoPON.

Para o processo de filtração, foi utilizado um sistema asséptico *Steril* para filtração a vácuo em polisulfona, com diâmetro de 47 mm e capacidade de 250 mL (Millipore), com membranas de filtração em Éster Celulose Misto Hidrofílico (MCE), com 0,22 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro (Merck) para retirada de

macromoléculas no preparo das amostras para RMN foram utilizados filtros de proteínas Amicon ® Ultra de 0.5mL, 3KDa (Merck).

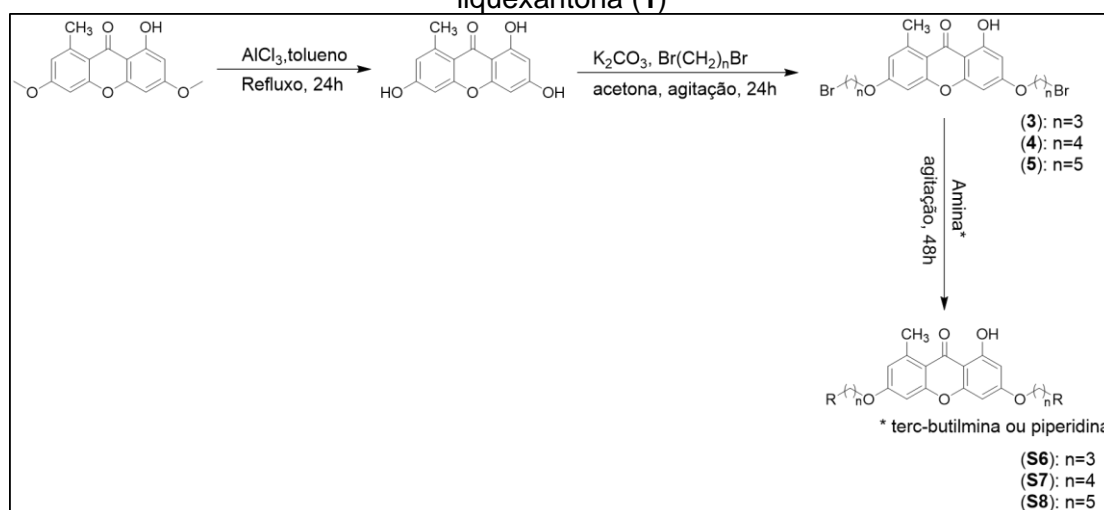
Para análise quimiométrica, foram utilizados os programas de quimiometria AMIX 3.8 Bruker e MetaboAnalyst 5.0 (disponível em <https://www.metaboanalyst.ca>).

Para análise de modelagem molecular, o protocolo virtual, incluindo *docking* molecular, foi realizado pelo programa HyperChem 7 (<http://www.hyper.com>), PyRx e *software* AutoDock Vina.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção das ω -aminoalcoxilxantonas (MICHELETTI et al, 2011)

Figura 13. Representação esquemática da obtenção de ω -aminoalcoxilxantonas a partir da liquexantona (1)



A primeira etapa consistiu na obtenção da norliquexantona (2). Em um balão, foram adicionados 0,1 mmol de liquexantona (1) e 0,75 mmol de AlCl_3 em 15 mL de tolueno seco. A solução foi mantida sob agitação e refluxo por 24 horas em atmosfera inerte. Após este período, a reação foi interrompida com adição de uma solução de HCl 10%, e em seguida, submetida à extração, primeiramente com tolueno e depois com acetato de etila.

A purificação ocorreu por fracionamento cromatográfico em coluna, utilizando sílica gel e a mistura de hexano/ acetato de etila como eluente, em modo gradiente de

polaridade. A norliquesantona (**2**) foi isolada das frações mais polares, com aproximadamente 80% de rendimento.

RMN de ^1H (δ em ppm, CDCl_3) (1**):** 2,85 (3H, s), 3,87 (3H, s), 3,90 (3H, s), 6,30 (1H, d, $J= 2,3$ Hz), 6,33 (1H, d, $J= 2,3$ Hz), 6,67 (1H, dl), 6,69 (1H, d, $J= 2,2$ Hz), 13,53 (1H, s).

RMN de ^1H (δ em ppm, DMSO-d_6) (2**):** 2,77 (3H, s), 6,15 (1H, d, $J= 2,0$ Hz), 6,30 (1H, d, $J= 2,0$ Hz), 6,67 (2H, sl), 13,53 (1H, s).

Para obter os compostos de cadeias laterais bromadas, foram dissolvidos em um balão 0,19 mmol de norliquesantona e 0,4 mmol de K_2CO_3 em 5 mL de acetona. A solução foi mantida sob agitação por 30 min e em seguida foram adicionados 100 μL do ω -dibromoalcano (1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano e 1,5-dibromopentano) e a agitação mantida por 24h. A solução foi filtrada e a mistura reacional foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna, utilizando como eluente: hexano: acetato de etila em gradiente de polaridade, sendo as ω -bromoalcoxilxantonas isoladas das frações mais apolares.

3,6-bis (3-bromopropóxi) - 1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona (3**):** **RMN de ^1H (δ em ppm, CDCl_3):** 2,28 (2H, quint, $J= 6,0$ Hz), 2,30 (2H, quint, $J= 6,0$ Hz), 2,78 (3H, s), 3,54 (2H, t, $J= 6,2$ Hz), 3,55 (2H, t, $J= 6,2$ Hz), 4,11 (2H, t, $J= 6,0$ Hz), 4,14 (2H, t, $J= 6,0$ Hz), 6,23 (1H, d, $J= 2,3$ Hz), 6,27 (1H, d, $J= 2,3$ Hz), 6,60 (1H, dl), 6,63 (1H, d, $J= 2,2$ Hz), 13,30 (1H, s).

3,6-bis (3-bromobutóxi) - 1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona (4**):** **RMN de ^1H (δ em ppm, CDCl_3):** 1,87-2,06 (8H, m), 2,77 (3H, s), 3,43 (2H, t, $J= 6,4$ Hz), 3,44 (2H, t, $J= 6,4$ Hz), 4,00 (2H, t, $J= 6,0$ Hz), 4,02 (2H, t, $J= 6,0$ Hz), 6,21 (1H, d, $J= 2,2$ Hz), 6,24 (1H, d, $J= 2,2$ Hz), 6,59 (2H, dl), 13,31 (1H, s).

3,6-bis (3-bromopentóxi) - 1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona (5**):** **RMN de ^1H (δ em ppm, CDCl_3):** 1,48-1,63 (4H, m), 1,72-1,83 (4H, m), 1,84-1,95 (4H, m), 2,77 (3H, s), 3,38 (2H, t, $J= 6,4$ Hz), 3,39 (2H, t, $J= 6,4$ Hz), 3,93-4,03 (4H, m), 6,21 (1H, d, $J= 2,2$), 6,24 (1H, d, $J= 2,2$), 6,59 (2H, dl), 13,32 (1H, s).

A última etapa consistiu na obtenção das ω -aminoalcoxilxantonas. Cada ω -bromoalcoxilxantona (**3**, **4** e **5**) (0,04 mmol) foi adicionada a um balão de fundo redondo juntamente com 0,5 mL da amina correspondente (*terc*-butilamina (substância **3** e **4**) ou piperidina (substância **5**)). Foram adicionados 5 mL de acetona,

sendo deixados em agitação por 48h em temperatura ambiente. O solvente foi evaporado e a mistura foi dissolvida em uma solução aquosa de HCl (10%) e submetida à extração com acetato de etila. O pH da fase aquosa foi ajustado para 12 com uma solução aquosa de KOH (10%), extraída novamente com acetato de etila. Desta forma foram obtidas as substâncias **S6**, **S7** e **S8**.

3,6-bis[3-(*t*-butilamino)propóxi]-1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona (S6): RMN de ^1H (δ em ppm, metanol- d_4): 1,43 (18H, s), 2,19 (3H, s), 2,20-2,27 (4H, m), 2,79-2,87 (4H, m), 4,20-4,28 (4H, m), 6,32 (1H, sl), 6,46 (1H, sl), 6,74 (1H, sl), 6,84 (1H, sl).

3,6-bis[4-(*t*-butilamino)butóxi]-1-hidróxi-8-metil-9H-xanten-9-ona (S7): RMN de ^1H (δ em ppm, metanol- d_4): 1,25 (18 H, s), 1,74-1,80 (8H, m), 2,77-2,81 (4H, m), 2,82 (3H, s), 4,10-4,18 (4H, m), 6,28 (1H, d, $J= 2,2$ Hz), 6,44 (1H, d, $J= 2,2$ Hz), 6,74 (1H, d, $J= 2,0$ Hz), 6,83 (1H, d, $J= 2,2$ Hz).

1-hidróxi-8-metil-3,6-bis(3-piperidin-1-ilpentil)oxi]-9H-xanten-9-ona (S8): RMN de ^1H (δ em ppm, CDCl_3): 1,42-1,52 (8H, m), 1,55-1,64 (12H, m), 1,79-1,88 (4H, m), 2,31-2,47 (12 H, m), 2,84 (3H, s), 3,99-4,06 (4H, m), 6,27 (1H, d, $J= 2,2$ Hz), 6,30 (1 H, d, $J= 2,2$ Hz), 6,65 (1H, dl), 6,66 (1H, d, $J= 2,3$ Hz).

3.2.2. Procedimento para obtenção dos metabólitos intracelulares

Solução estoque: Foram preparadas soluções de 100 μM , utilizando água deuterada como solvente, para cada antibiótico comercial e para as substâncias sintetizadas. Essas soluções foram preparadas no dia do uso.

Solução tampão: A solução tampão, utilizada no preparo das amostras para a RMN, foi preparada em balão volumétrico contendo 9×10^{-2} mol/L de fosfato de potássio (KH_2PO_4), $6,73 \times 10^{-2}$ mol/L fosfato de sódio (NaHPO_4) e $2,9 \times 10^{-3}$ mol/L do sal 3-(trimetilsilil)-2,2,3,3- d_4 -propionato de sódio tetradeuterado (TMSP- d_4). O pH final dessa solução foi de 6,71.

Foram realizadas, rigorosamente, 10 replicatas de cada grupo: branco, ampicilina, ciprofloxacina, canamicina e tetraciclina, e 10 replicatas das três substâncias sintetizadas (**S6**, **S7** e **S8**), como detalhado a seguir (HOERR et al., 2016).

1. Em um Erlenmeyer de 150 mL, foram adicionados 50 mL de caldo Muller-Hinton e com auxílio de uma alça estéril, foi adicionado, aos poucos, o inóculo de *S. aureus*, constituído de uma cultura bacteriana de 24h. A densidade ótica a 600 nm foi medida em turbidímetro até obter uma concentração de 0,6 na escala McFarland;
2. Em cada Erlenmeyer, foram adicionados 500µL da solução estoque de antibiótico ou composto sintetizado (descrito acima) e deixado sob agitação por 1h à temperatura de 37°C;
3. As amostras foram filtradas à vácuo, em um sistema de filtração “Milipore Steril”, utilizando filtros de membrana 0,22 µm, diâmetro de 47 mm hidrofílico-MCE;
4. Os filtros foram retirados do sistema e colocados em tubos tipo Falcon, onde foi adicionado N₂ líquido, sendo macerados com ajuda de um bastão de vidro. Em seguida, foram adicionados 5 mL de água destilada e realizados 5 ciclos de congelamento/descongelamento;
5. As amostras foram centrifugadas a 4500 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Falcon e as amostras foram congeladas e liofilizadas;
6. Após a liofilização, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento das análises de RMN.

O branco foi obtido seguindo o mesmo procedimento, sem adição dos antibióticos.

3.2.3. Preparo das amostras para análise de RMN

Para preparar as amostras, os filtros de proteínas foram lavados com óxido de deutério (D₂O) e centrifugados para retirada do glicerol, da seguinte forma:

- 2x 500 µL de D₂O centrifugado a 14.000 rpm/15 min.
- 1x sem D₂O, com filtro invertido – 1000 rpm /2 min.

Após esse procedimento, as amostras foram solubilizadas com 350 µL de D₂O e adicionadas aos filtros, centrifugadas a 14.000 rpm/30 min. O filtro foi lavado com

mais 200 µL de D₂O e centrifugados por mais 30 min a 14.000 rpm. Em seguida, 500 µL de cada amostra foram transferidos para os tubos de RMN, onde foram adicionados 100 µL de tampão fosfato deuterado (pH 6,71, com TMSP-d₄).

3.2.4. Parâmetros para aquisição das análises de RMN

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE NEO 500 (11,75 T), operando a 500 MHz para a frequência de ¹H. Os espectros unidimensionais de ¹H, do conteúdo intracelular de *S. aureus* após tratamento dos antibióticos e derivados xantônicos, foram adquiridos usando a sequência de pulsos noesygppr1d com supressão do sinal residual da água em 4,70 ppm, 512 varreduras (NS), largura do espectro (SW) de 30 ppm, tempo de espera (d1) de 3,0 s, tempo de aquisição (AQ) de 2,23 s, números de pontos de dados amostrados (TD) de 65536, ganho do receptor (RG) de 101 e DS de 4. Cada espectro teve duração de 45 minutos.

Posteriormente, os dados foram processados utilizando multiplicação exponencial (LB) de 0,30 Hz e correções manuais de fase e linha de base. O sinal do TMSP-d₄ foi utilizado como referência interna para calibração dos espectros em 0,00 ppm. Também foram realizados experimentos bidimensionais, como TOCSY, HSQC, COSY e Jres para auxiliar na identificação dos metabólitos intracelulares.

3.2.5. Tratamento quimiométrico

Os dados de RMN de ¹H foram analisados por algoritmos não-supervisionados (*Principal Component Analysis*, PCA) e supervisionados (*Partial Least Squares – Discriminant Analysis*, PLS-DA), utilizando dois programas: AMIX 3.8 Bruker e MetaboAnalyst 5.0.

No programa AMIX 3.8 Bruker foram construídas as *bucket tables*, utilizando a forma retangular simples, com tamanho do *bucket* de 0,04 ppm e os dados foram integrados pela soma da intensidade total e normalizados pela intensidade total. A região analisada foi de 0,7–8,5 ppm, com exclusões das áreas de ruídos entre 4,5–

6,84 ppm e 7,46–7,94 ppm. Os arquivos das *bucket tables* foram abertos no programa Excel e salvos no formato csv.

Essas matrizes de dados foram usadas no programa MetaboAnalyst 5.0 para o tratamento das amostras. Não foi utilizada nenhuma normalização adicional sobre as amostras, mas, para as variáveis, o método de pré-processamento aplicado foi Pareto. As análises de PLS-DA foram obtidas com os mesmos parâmetros descritos acima.

3.2.6. Modelagem molecular

A análise de modelagem molecular foi realizada sob supervisão do professor Dr. Roberto Gomes, da North Dakota State University (NDSU).

O conjunto das substâncias S6, S7 e S8 foi construído no programa ChemDraw (<https://www.perkinelmer.com/product/chemdraw-professional-chemdrawpro>) a partir das estruturas 2D da série. Todas as geometrias foram virtualmente construídas e otimizadas em mecânica molecular (MM+) e métodos semi-empíricos *Austin Model 1* (AM1) usando o programa HyperChem 7 (<http://www.hyper.com>). Os arquivos de saída foram convertidos em arquivos de entrada.mol2 do programa PyRx (<https://pyrx.sourceforge.io>), utilizando o Open Babel (http://openbabel.org/wiki/Main_Page).

Para prever *in silico* a melhor orientação e conformação dos compostos na proteína topoisomerase IV, foi utilizado o programa PyRx, que utiliza AutoDock Vina como software de *docking*.

3.2.6.1. Seleção de alvos e simulações de acoplamento molecular

A estrutura cristalizada da proteína DNA topoisomerase IV foi obtida através do RSCB PDB sob o código 4URN (<https://www.rcsb.org/structure/4URN>). Em seguida, simulações de acoplamento foram realizadas para cada inibidor no alvo correspondente. Este procedimento foi realizado usando o *software* AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010). O protocolo de *docking* usou os seguintes parâmetros: uma amostra dos 3 compostos e ciprofloxacina como referência de energia de ligação; a

caixa de grade com dimensões de 25 Angstroms (Å), 40 repetições por exaustão e foi centralizada com base nas coordenadas da novobiocina. Assim, a energia de afinidade de ligação foi avaliada.

As estruturas do sítio da proteína (.pdb) e dos ligantes (mol2) foram inseridas no programa PyRx e, além de detalhar os aminoácidos participantes, foram realizadas pelo visualizador BIOVIA Discovery Studio.

3.2.7 Análise de variância

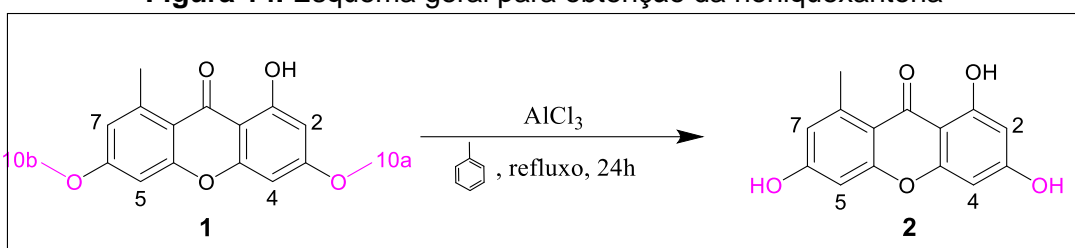
Todos os dados das integrações dos metabólitos responsáveis por separarem os grupos nos eixos 1 e 2 na análise PLS-DA foram analisados no software Origin 2021, usando a análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, com $P < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese das ω -aminoalcoxilxantonas

Para a síntese das ω -aminoalcoxilxantonas, primeiro realizou-se uma reação de desmetilação na liquexantona (**1**), utilizando AlCl_3 e tolueno como solvente, deixando em refluxo por 24h sob agitação. Após esse período e separação cromatográfica em coluna, foi obtido a norliquexantona (**2**) com 80% de rendimento (**Fig. 14**).

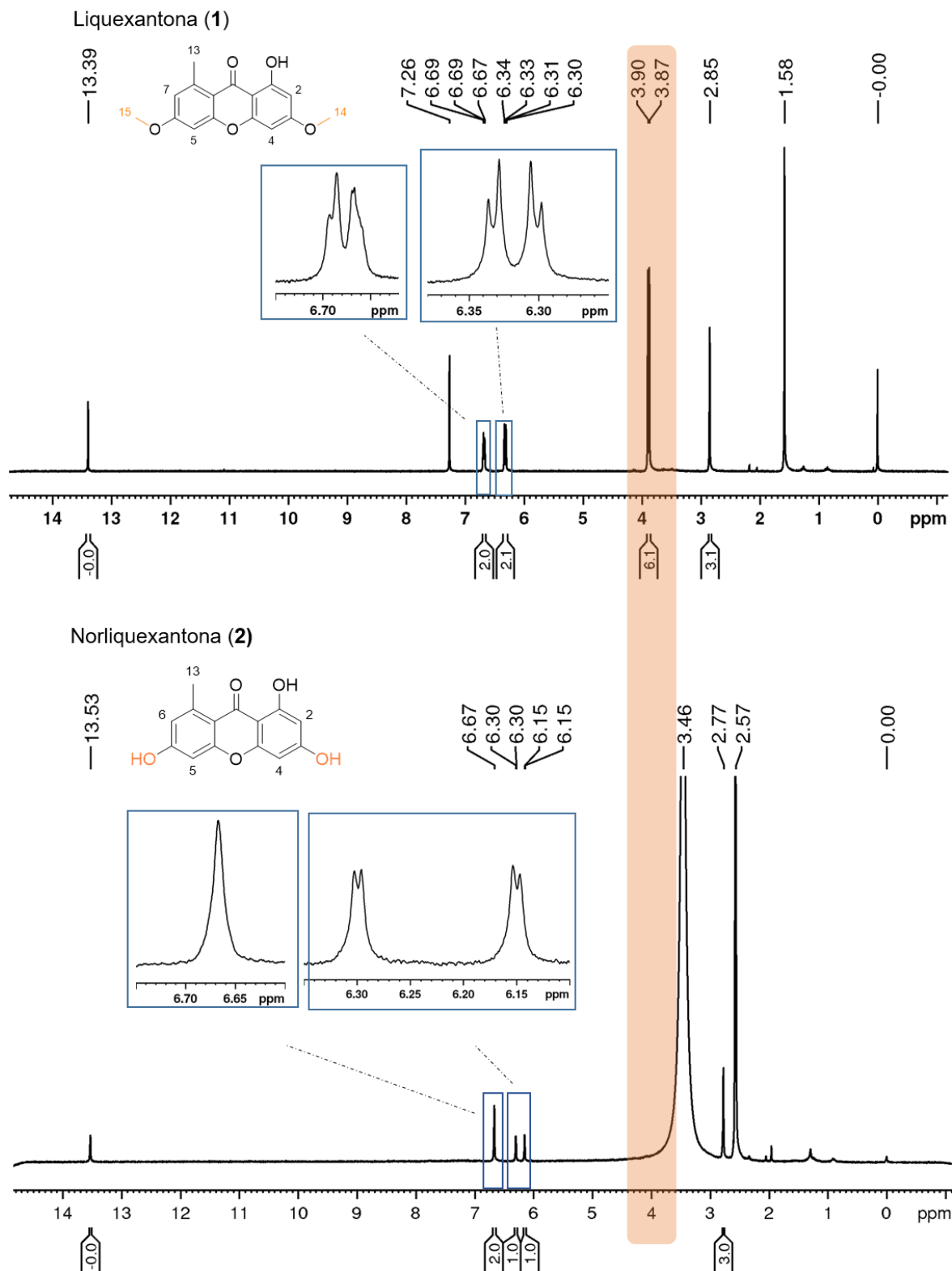
Figura 14. Esquema geral para obtenção da norliquexantona



O espectro de RMN de ^1H da liquexantona (**1**) apresentou sinais condizentes a sua estrutura, tais como: um simpleto em 2,85 ppm referente aos hidrogênios da metila ligada ao anel aromático; dois simpletos em 3,87 e 3,90 ppm referentes aos hidrogênios das metoxilas; os hidrogênios do anel aromático foram observados em 6,30 e 6,33 ppm (d, $J = 2,3$ Hz) e 6,67 e 6,69 ppm (d, $J = 2,2$ Hz) e um simpleto em 13,39 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila fenólica (**Fig. 15**).

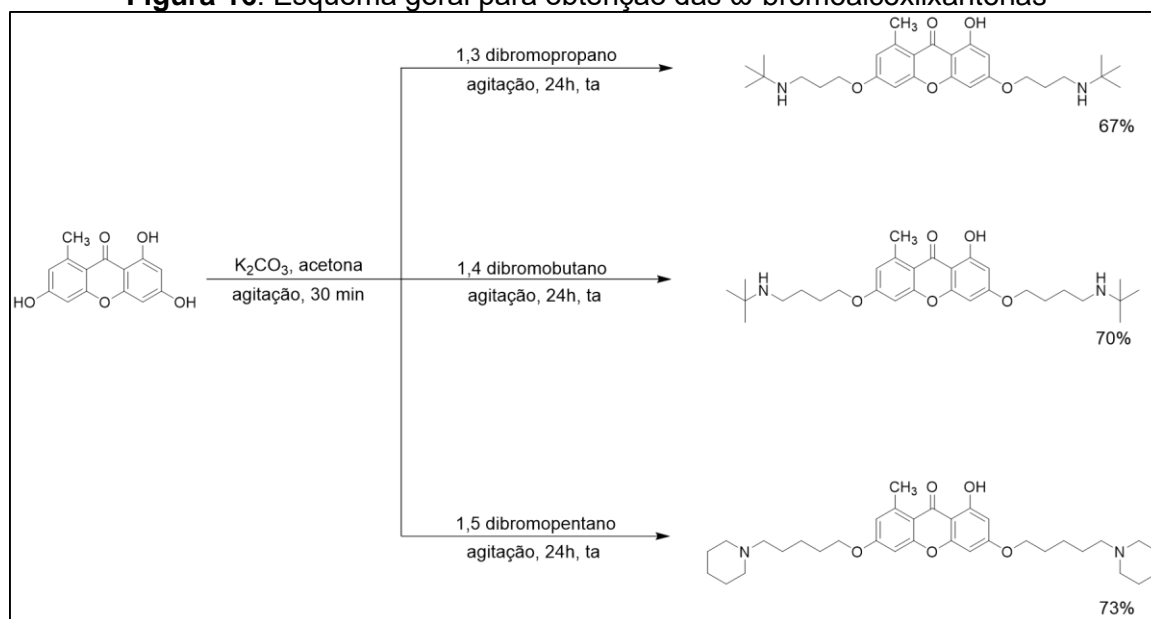
A estrutura da norliquexantona (**2**) foi confirmada por RMN de ^1H , pela ausência dos sinais referentes aos hidrogênios das metoxilas. Os demais sinais se mantiveram em ambos os espectros, como pode ser observado na **Fig 15**. Todos os sinais estão condizentes com a literatura (MICHELETTI et al., 2011)

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H da liquexantona (1) (CDCl_3 , 500 MHz) e norliquexantona (2) (DMSO-d_6 , 500 MHz)



Com a norliquesantona sintetizada, a etapa seguinte foi a obtenção das ω -bromoalcoxilxantonas. Para isso, foram utilizados três dibromoalcanos: 1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano e 1,5-dibromopentano, sendo possível sintetizar as substâncias **3**, **4** e **5** (Fig. 16).

Figura 16. Esquema geral para obtenção das ω -bromoalcoxilxantonas



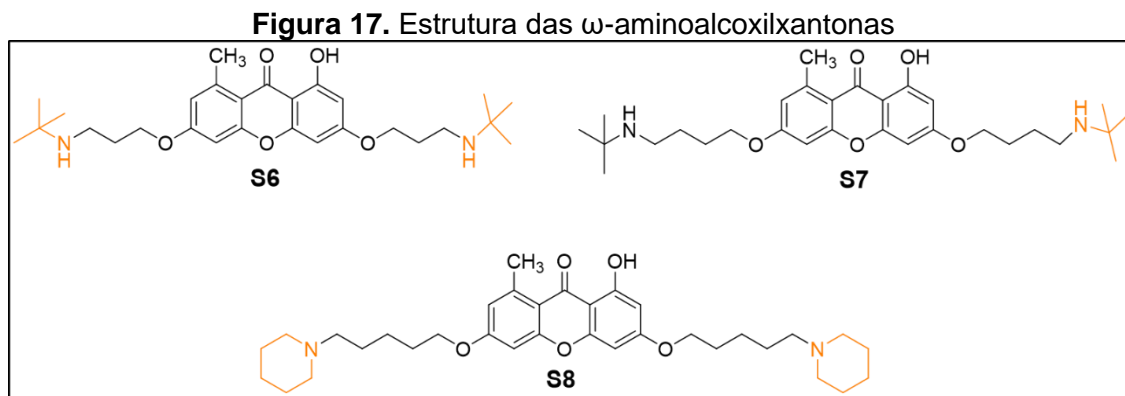
Os espectros de RMN de 1H das substâncias **3**, **4** e **5** são muito semelhantes entre si. Notamos nos espectros de RMN de 1H dessas substâncias dois tripletos em 4,11 e 4,14 (**3**), 4,00 e 4,02 (**4**) e um multiplete na região de 4,03-3,93 (**5**) ppm referentes aos hidrogênios dos grupos metilênicos ligados aos oxigênios ($O-CH_2$) e dois tripletos em 3,54 e 3,55 (**3**), 3,43 e 3,44 (**4**), 3,38 e 3,39 (**5**) ppm referentes aos hidrogênios dos grupos metilênicos ligados aos átomos de bromo (CH_2-Br). Os demais sinais referentes aos hidrogênios do esqueleto xantônico se mantiveram. Na **Tabela 1** encontram-se os deslocamentos químicos dos sinais encontrados para as substâncias **3**, **4** e **5** (MICHELETTI et al., 2011).

Tabela 1. Deslocamentos químicos de RMN de ¹H dos compostos ω-bromoalcoxilxantonas (500 MHz; CDCl₃)

H	3	4	5
2	6,23 [1H, d, <i>J</i> = 2,3 Hz]	6,21 [1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz]	6,21 [1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz]
4	6,27 [1H, d, <i>J</i> = 2,3 Hz]	6,24 [1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz]	6,24 [1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz]
5	6,60 [1H, dl, <i>J</i> = 2,2 Hz]		
7	6,63 [1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz]	6,59 [2H, sl]	6,59 [1H, sl]
10a	4,11 [2H, t, <i>J</i> = 6,0 Hz]*	4,00 [2H, t, <i>J</i> = 6,0 Hz]*	3,93- 4,03 [4H, m]
10b	4,14 [2H, t, <i>J</i> = 6,0 Hz]*	4,02 [2H, t, <i>J</i> = 6,0 Hz]*	
11a	2,28 [2H, quint, <i>J</i> = 6,0 Hz]*		1,84-1,95 [4H, m]
11b	2,30 [2H, quint, <i>J</i> = 6,0 Hz]*	1,87-2,06 [8H, m]	
12a	3,54 [2H, t, <i>J</i> = 6,2 Hz]*		1,48- 1,63 [4H, m]
12b	3,55 [2H, t, <i>J</i> = 6,2 Hz]*		
13a	-	3,43 [2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz]*	1,72-1,83 [4H, m]
13b	-	3,44 [2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz]*	
14a	-	-	3,38 [2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz]*
14b	-	-	3,39 [2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz]*
CH ₃ -Ar	2,78 [3H, s]	2,77 [3H, s]	2,77 [3H, s]
OH	13,30 [1H, s]	13,31 [1H, s]	13,32 [1H, s]

*Os valores para os hidrogênios "a" e "b" em uma mesma coluna podem estar trocados.

As substâncias **3**, **4** e **5** foram utilizadas como material de partida para a obtenção das ω -aminoalcoxilxantonas, por meio da reação de aminação, apresentadas na **Fig. 17**. Para os compostos **S6** e **S7** foi utilizada a *tert*-butilamina e no composto **S8** foi utilizada a piperidina.



Assim como para as ω -bromoalcoxilxantonas, os espectros de RMN de ^1H dos compostos aminados **S6**, **S7** e **S8** foram bem semelhantes aos dos compostos bromados. A confirmação da substituição do átomo de bromo pelo grupo amino é dada pela presença dos multipletos entre 2,79-2,87 e 2,77-2,81 ppm (**S6 e S7**) e 2,31-2,47 ppm (**S8**) referentes aos hidrogênios metilênicos ligados ao nitrogênio e o desaparecimento dos dois tripletos 3,54 e 3,55 (**3**), 3,43 e 3,44 (**4**), 3,38 e 3,39 (**5**) como pode ser observado na **Fig. 18**, referentes aos hidrogênios metilênicos ligados ao átomo de bromo. A **Tabela 2** contém os demais sinais de RMN de ^1H das 3 substâncias.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H com ampliação na faixa de 3,8–2,4 ppm da: **A)** substância 4 (^1H , 500 MHz, CDCl_3); **B)** substância S7 (^1H , 500 MHz; MeOD-d_4); **C)** substância S8 (^1H , 500 MHz; CDCl_3)

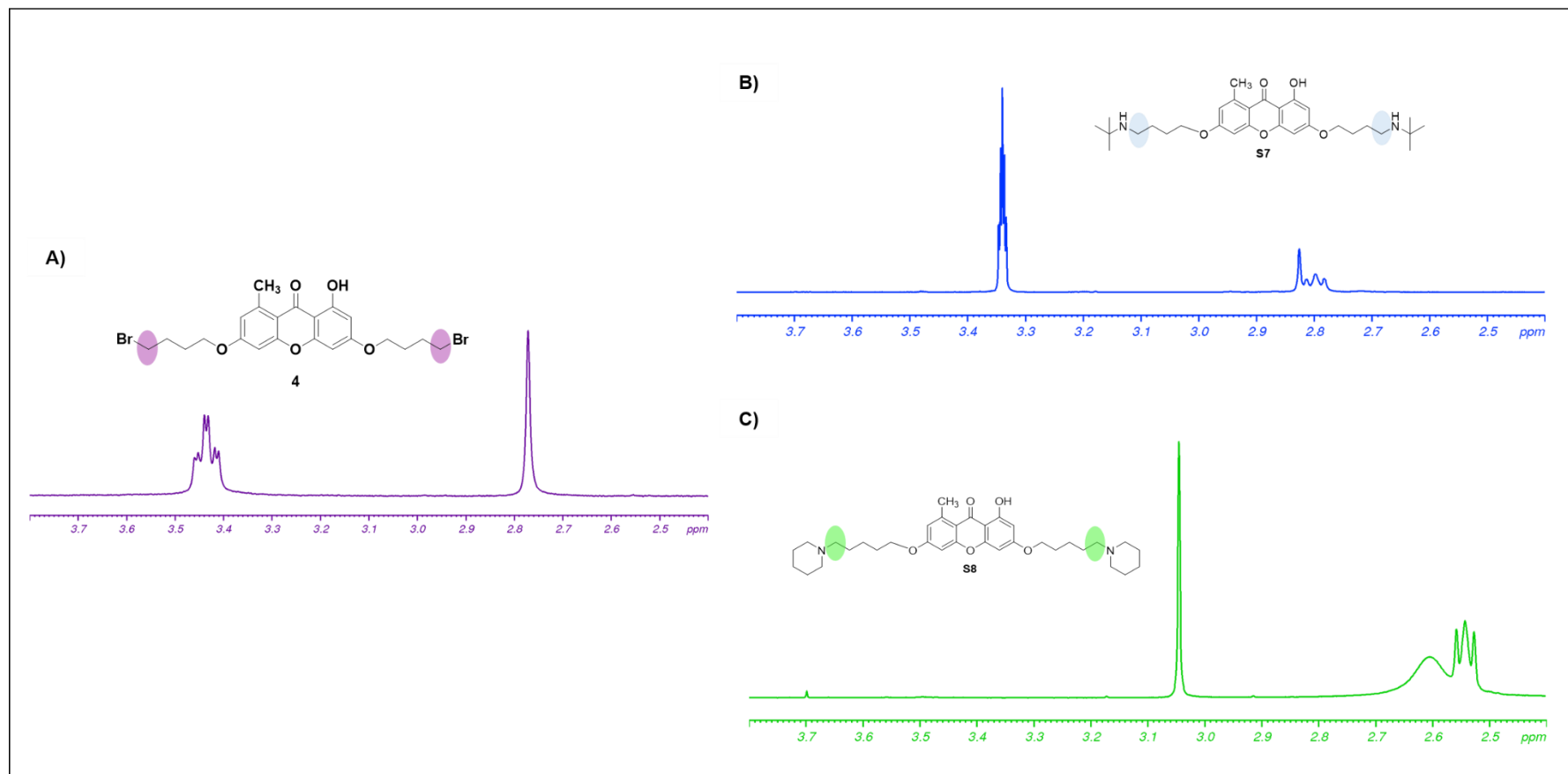


Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN de ¹H dos compostos ω-aminoalcoxilxantonas (500 MHz)

H	S6	S7	S8
2	6,32 [1H, sl]	6,28 [1H, d, J= 2,2 Hz]	6,27 [1H, d, J= 2,2 Hz]
4	6,46 [1H, sl]	6,44 [1H, d, J= 2,2 Hz]	6,30 [1H, d, J= 2,2 Hz]
5	6,74 [1H, sl]	6,74 [1H, d, J= 2,0 Hz]	6,65 [1H, dl, J= 2,3 Hz]
7	6,84 [1H, sl]	6,83 [1H, d, J= 2,0 Hz]	6,66 [1H, d, J= 2,3 Hz]
10a	4,20-4,28 [4H, m]	4,14 [2H, t, J=6,3 Hz]*	4,02 [2H, t, J=6,5 Hz]*
10b		4,16 [2H, t, J=6,3 Hz]*	4,04 [2H, t, J=6,5 Hz]*
11a	2,20-2,27 [4H, m]		1,55-1,64 [4H, m]
11b		1,74-1,80 [8H, m]	
12a	2,79-2,87 [4H, m]		1,42-1,52 [4H, m]
12b			
13a	1,43 [18H, s]	2,77-2,81 [4H, m]	1,79- 1,88 [4H, m]
13b			
14a	-	1,25 [18H, s]	
14b			
15a			2,31-2,47 [12H, m]
15b			
16a			1,55-1,64 [8H, m]
16b			
17a			1,42-1,52 [4H, m]
17b			
CH ₃ -Ar	2,19 [3H, s]	2,82 [3H, s]	2,84 [3H, s]

As análises de RMN das substâncias S6 e S7 foram feitas em metanol-d₄ e a substância S8 em CDCl₃, em espectrômetro de RMN de 500 MHz.

*Os valores para os hidrogênios "a" e "b" podem estar trocados;

4.2. Aquisição dos espectros de RMN para a análise metabolômica e caracterização dos metabólitos intracelulares

Para a análise dos metabólitos intracelulares em diferentes tratamentos das culturas de *S. aureus* com os quatro antibióticos comerciais de diferentes modos de ação (ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina e canamicina) e com os três derivados xantônicos sintetizados, realizamos um teste para selecionar as melhores condições para obter informações referentes aos metabólitos.

Para os parâmetros da análise de RMN de ^1H , foram testadas as seguintes as sequências:

- ZG
- ZGPPR
- ^1H com supressão de HOD (NOESYGPPR1d)
- ^1H com supressão de HOD + filtro de T2 (macromoléculas) (CPMGPR1d)

A principal vantagem de usar a sequência CPMGPR1d é eliminar os sinais alargados das moléculas com tempo de T2 curto, como exemplo, moléculas de proteínas. Esses sinais alargados podem causar sobreposição com outros sinais e diminuir a quantidade de informação contida nos espectros para análise quimiométrica (TAVARES, 2007).

No entanto, não foi observado benefício no uso dessa sequência, pois, os filtros de proteínas usados nos preparos das amostras foram eficientes. Das sequências citadas, os melhores resultados foram obtidos com a sequência NOESYGPPR1D (conforme denominação Bruker). O perfil espectral pode ser visualizado na **Figura 19**.

Escolhida a sequência, o próximo passo foi realizar a análise do perfil espectral dos metabólitos. Para elucidação dos metabólitos, verificamos os experimentos de RMN de ^1H (**Fig. 19**), bidimensionais e dados da literatura (TIAN et al., 2013; WANG et al., 2018; ZHANG; POWERS, 2012; BHARTI et al., 2011; SOBOLEV et al., 2005; FAN, 1996). A multiplicidade do sinal a ser identificado no espectro de RMN de ^1H foi confirmada pelo experimento de Jres, como exemplificado para o aspartato (**Fig. 20**), e em seguida analisada a correlação de ^1H - ^1H pelos experimentos COSY (**Fig. 21**).

Figura 19. A) Espectro de RMN de ^1H do grupo controle (^1H , 500 MHz; $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$); **B)** Expansão de -0,6-3,06 ppm do espectro de RMN de ^1H do grupo controle; **C)** Expansão de 3,5-4,5 ppm do espectro de RMN de ^1H do grupo controle; **D)** Expansão de 6,5-9,0 ppm do espectro de RMN de ^1H do grupo controle

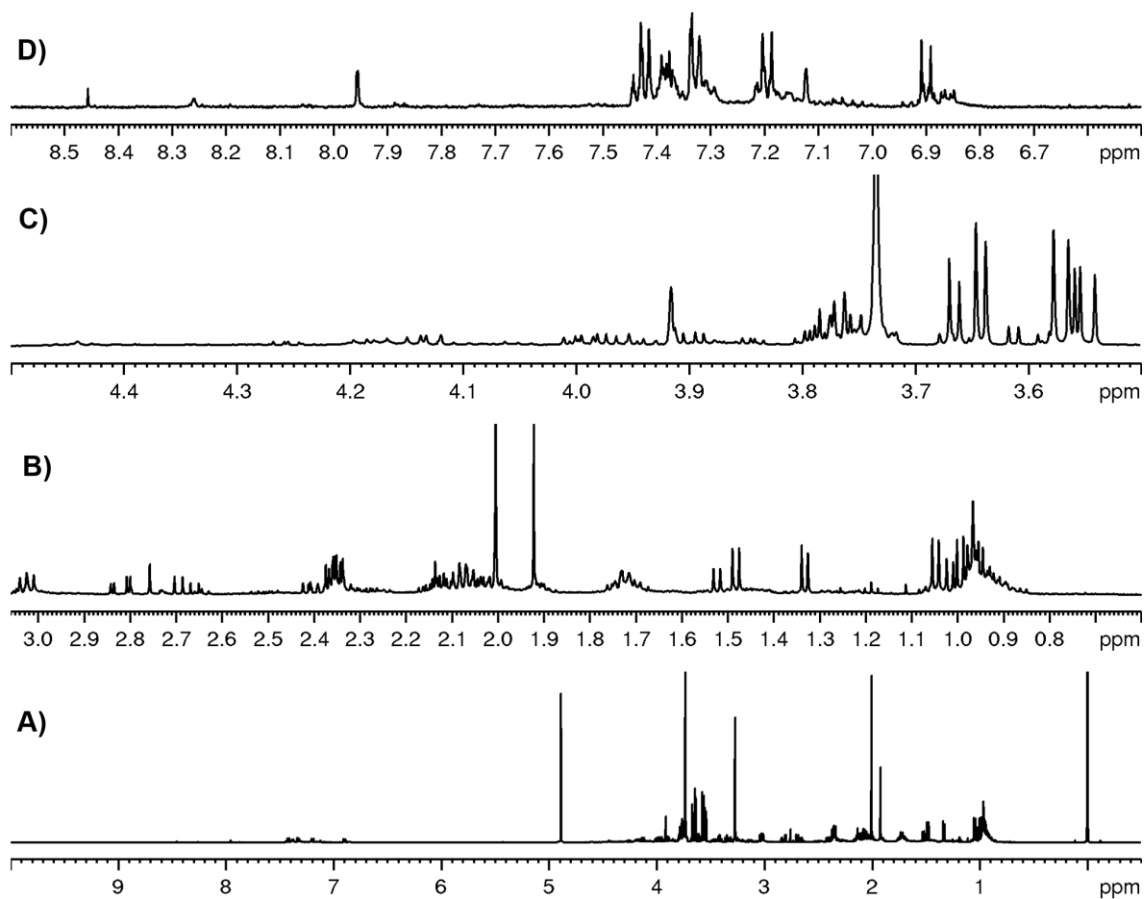


Figura 20. A) Espectros de RMN de ^1H do grupo controle referentes aos sinais do aspartato na região de 2,90–2,60 ppm e 3,90-3,80 ppm); **B)** Mapa de correlação Jres referente aos sinais do aspartato (^1H , 500 MHz; $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$)

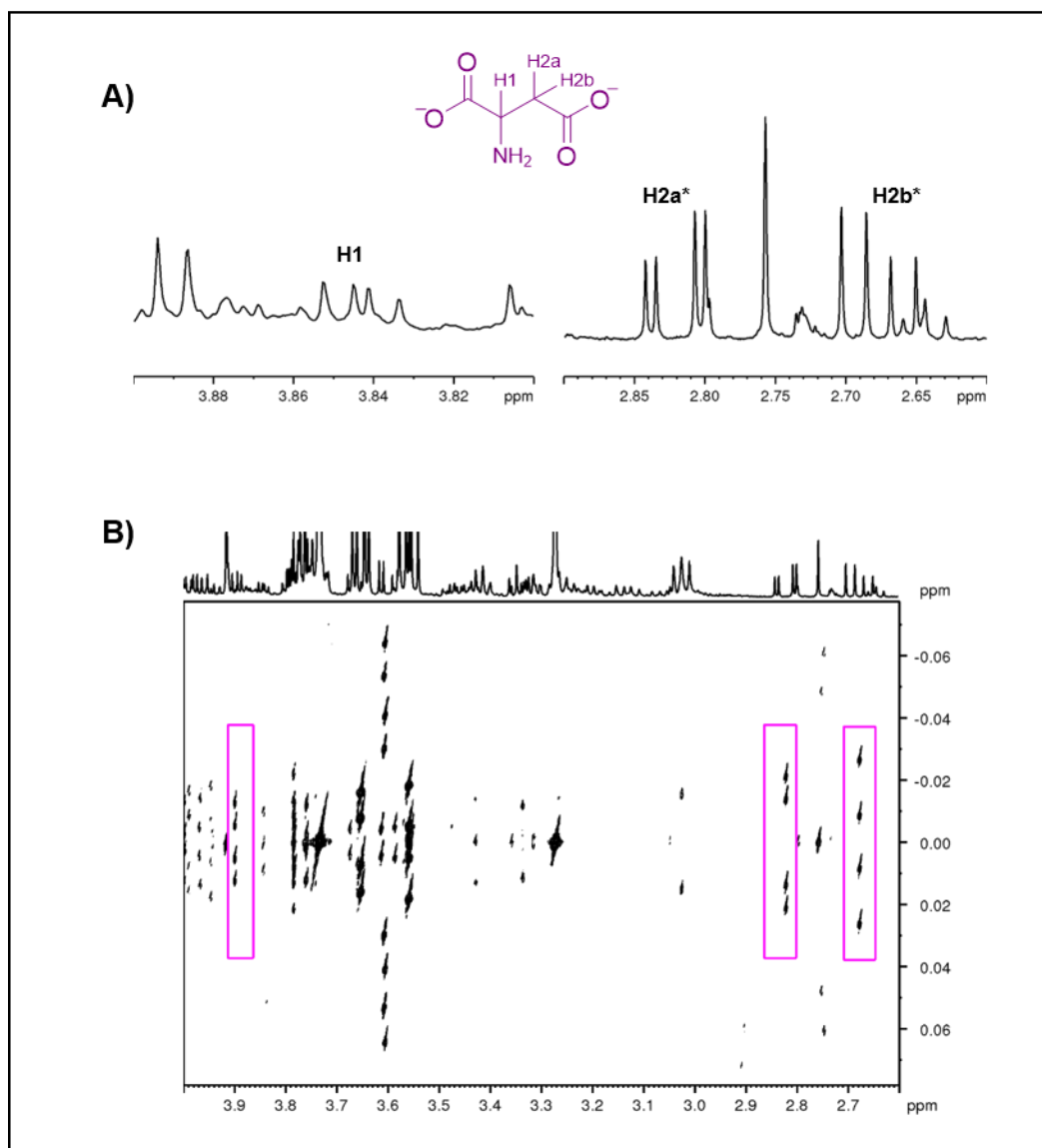
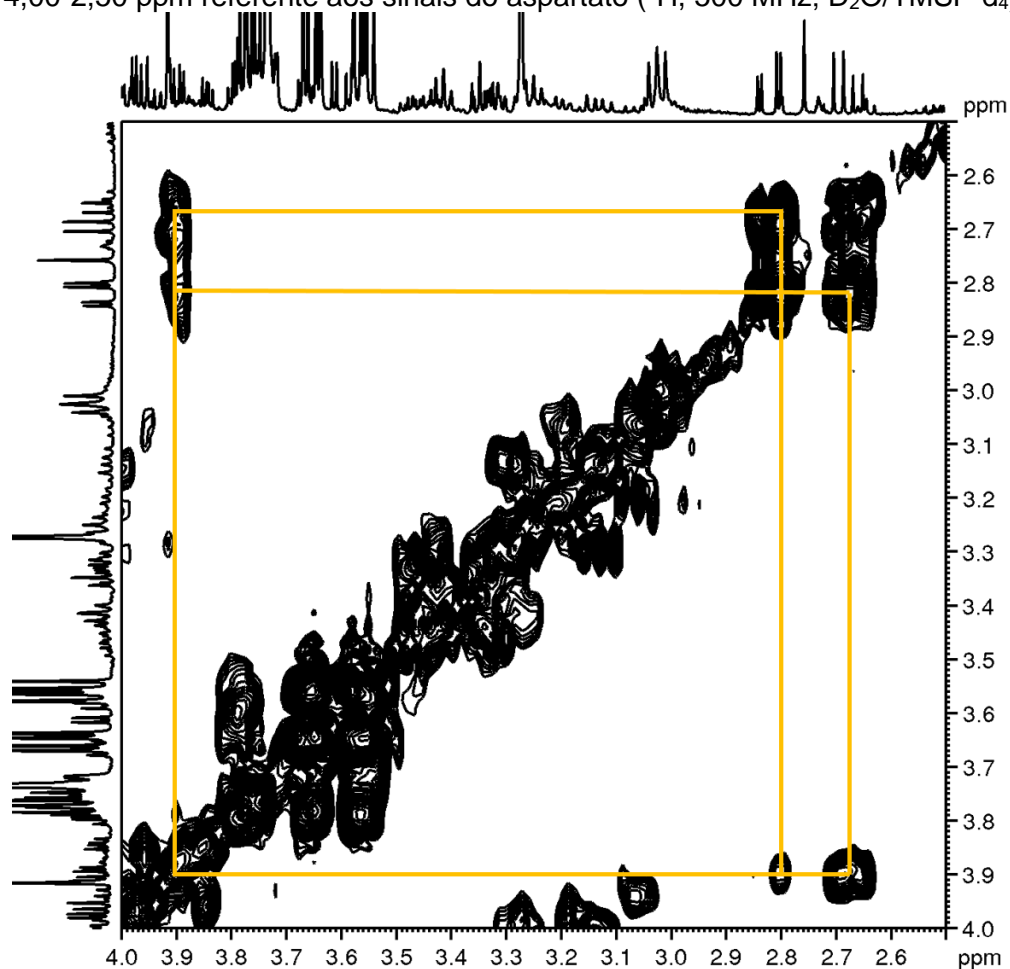


Figura 21. Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H (COSY) do grupo controle na faixa de 4,00-2,50 ppm referente aos sinais do aspartato (^1H , 500 MHz; $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$)



O experimento TOCSY (**Fig. 22**) foi utilizado para confirmar o esqueleto estrutural dos metabólitos, pois mostra as correlações dos prótons num determinado sistema de spins, o que ajuda em análises de multipletos sobrepostos ou sinais com deslocamentos químicos muito parecidos. O HSQC (**Fig. 23**) foi utilizado para identificar o deslocamento do ^{13}C ligado a cada um dos ^1H dos metabólitos. Seguindo esse procedimento e juntamente com os dados da literatura (TIAN et al., 2013; WANG et al., 2018; ZHANG; POWERS, 2012; BHARTI et al., 2011; SOBOLEV et al., 2005; FAN, 1996), foram identificados 21 metabólitos intracelulares nos espectros de RMN de ^1H , relatados na **Tabela 3**. Na **Fig. 24**, temos a representação estrutural dos metabólitos encontrados.

Figura 22. Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H (TOCSY) do grupo controle referente aos sinais do aspartato (^1H , 500 MHz; $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$)

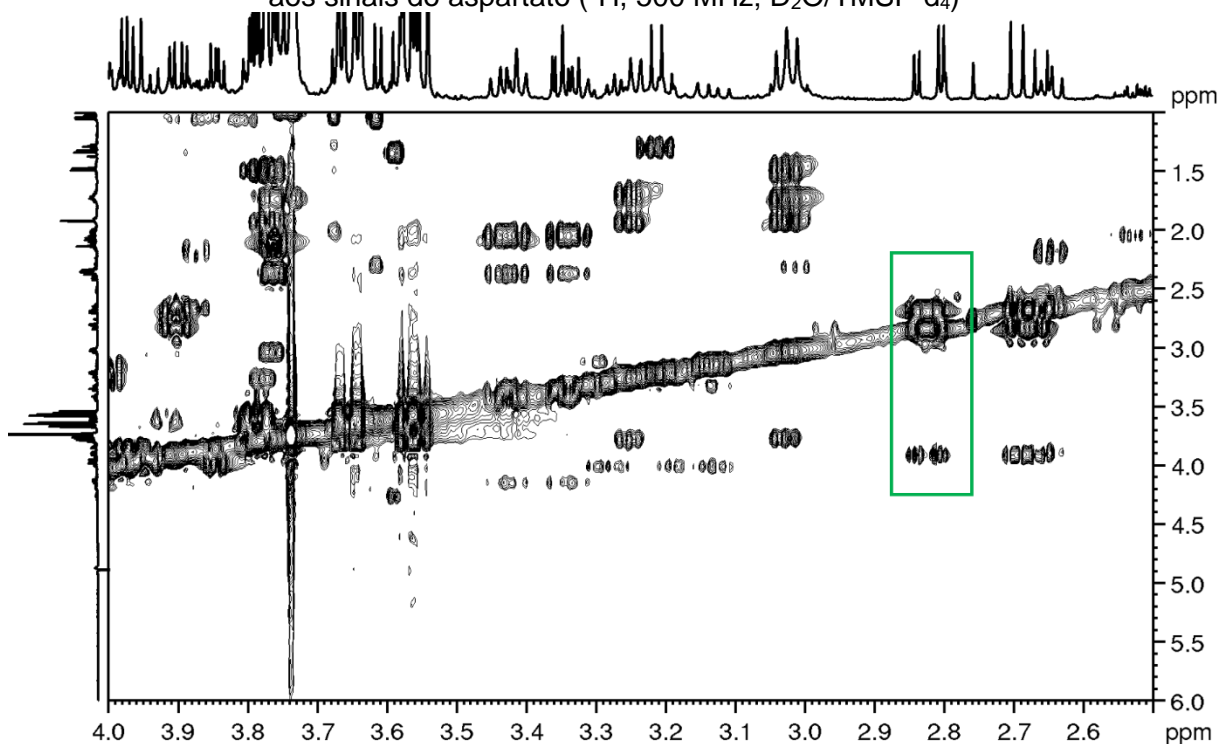


Figura 23. Mapa de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) do grupo controle referente aos sinais do aspartato (^1H , 500 MHz; $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$)

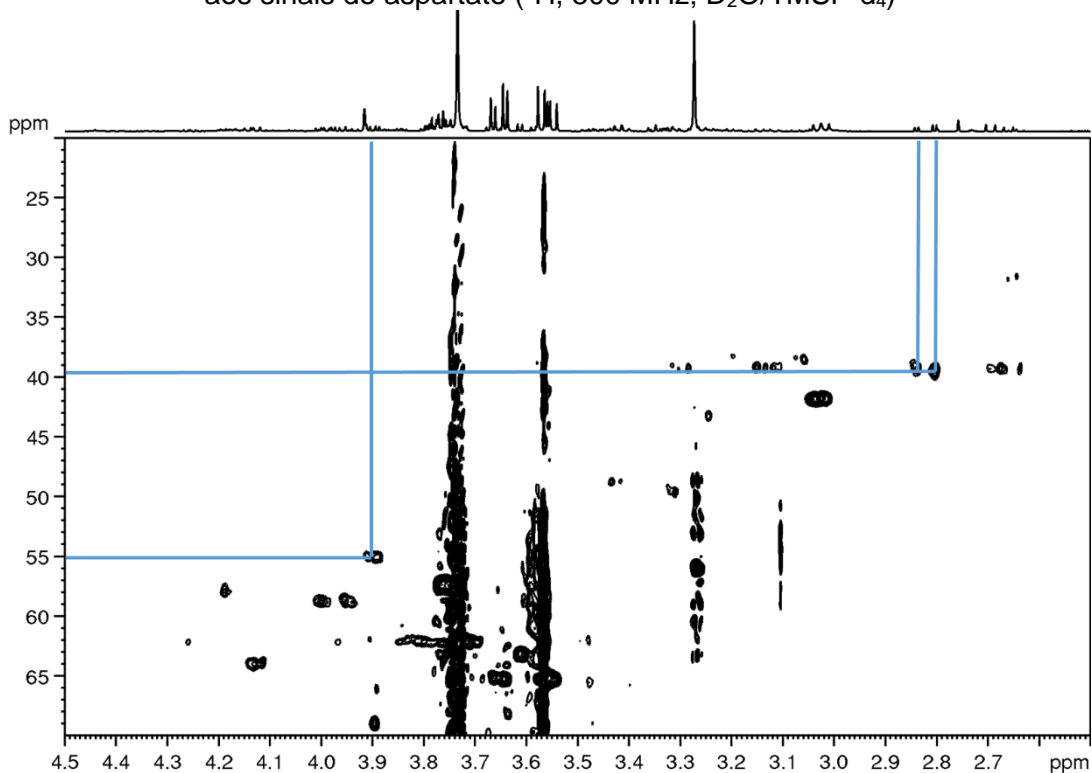


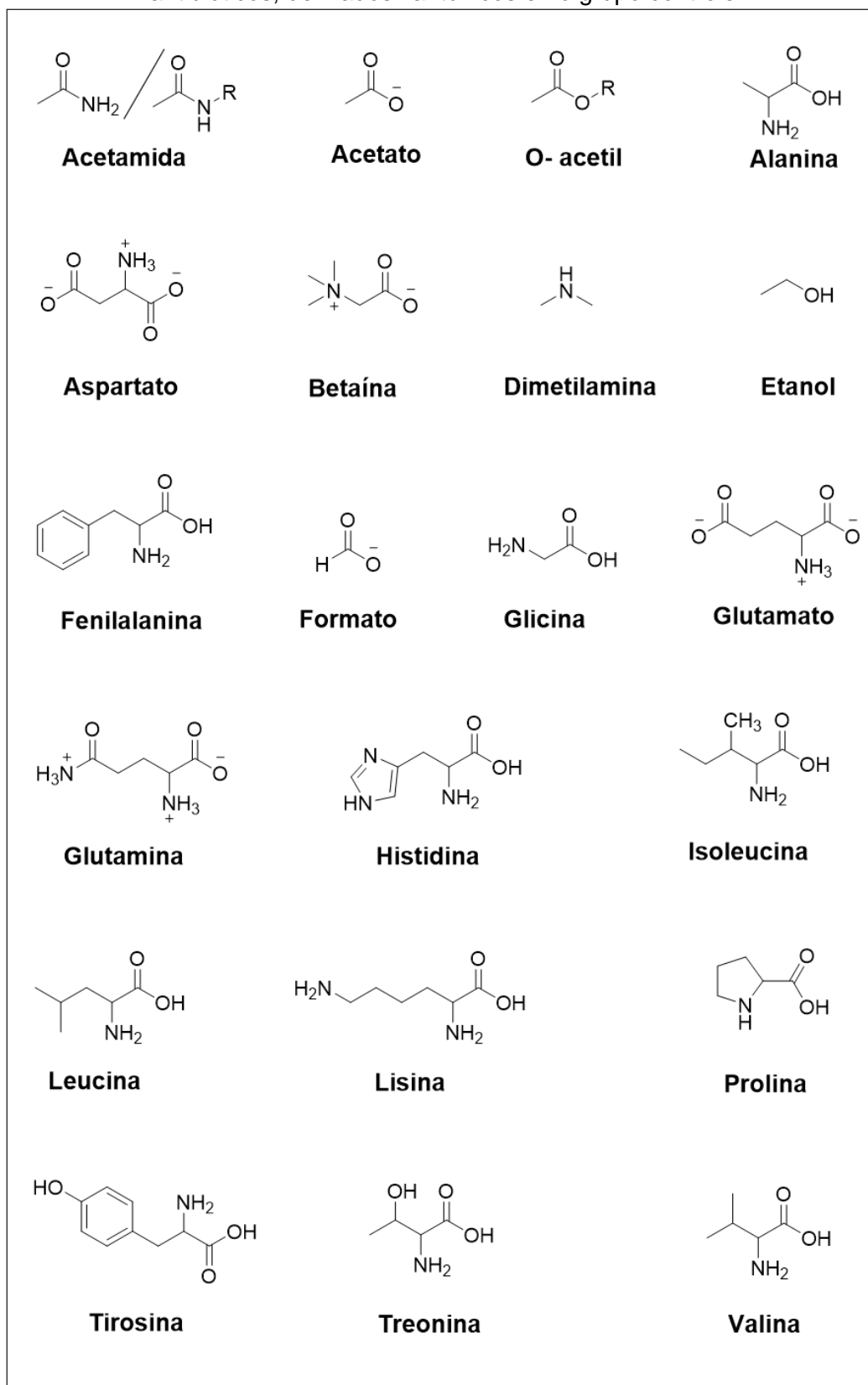
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos metabólitos identificados nos grupos tratados com antibióticos, derivados xantônicos e no grupo controle ($\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$, 500 MHz) (continua)

Metabólito	Deslocamento químico (ppm)		Multiplicidade (J, em Hz)	Atribuição
	^1H	^{13}C		
Acetamida/ <i>N</i> -acetil	2,00		s	CH_3
Acetato	1,92	26,0	s	CH_3
<i>O</i> -acetil	2,14		s	CH_3
Alanina	1,48	19,0	d (7,2)	CH_3
	3,75- 3,77	57,3	s	CH
Aspartato	2,68	39,5	dd (9,0 ; 17,5)	β -CH
	2,82	39,5	dd (3,6; 17,5)	β' -CH
	3,90	55,1	dd (3,6; 9,0)	α -CH
Betaína	3,27	56,0	s	CH_3
	3,91	69,0	s	CH_2
Dimetilamina	2,73	2,0	s	CH_3
Etanol	1,19	19,7	t (7,1)	CH_3
	3,65	65,2	q (7,1)	CH_2
Fenilalanina	7,41- 7,45	132,1	m	H/C-3,5 anel
	7,36- 7,42	131,6	m	H/C-4- anel
	7,32- 7,34	132,3	m	H/C-2,6 anel
Formato	8,46		s	CH
Glicina	3,56	44,2	s	CH_2
	2,02 - 2,10	29,9	m	β - CH_2
	2,30 - 2,37	36,4	m	γ - CH_2
Glutamato	3,75 - 3,77	57,3	m	α -CH
	2,10- 2,17	29,9	m	β - CH_2
	2,34- 2,40	32,5	m	γ - CH_2
Glutamina	3,76- 3,80	57,1		α -CH
	7,12		sl	H-2-anel
Histidina	7,96		d (1,1)	H-4-anel
	0,94	13,7	t (7,5)	δ - CH_3
Isoleucina	1,01	17,4	d (7,0)	γ - CH_3
	1,98-2,03	38,8	m	β -CH
	3,67	62,5	d (4,0)	α -CH

Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos metabólitos identificados nos grupos tratados com antibióticos, derivados xantônicos e no grupo controle ($\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$, 500 MHz) (conclusão)

	0,96	23,7	d (6,6)	$\delta\text{-CH}_3$
	0,97	24,9	d (6,6)	$\delta'\text{-CH}_3$
Leucina	1,67 – 1,76	27,1	m	$\beta\text{-CH}_2$
	1,67 – 1,76	42,7	m	$\gamma\text{-CH}$
	3,74 - 3,77	56,3	m	$\alpha\text{-CH}$
	1,45- 1,50		m	$\gamma\text{-CH}_2$
	1,67- 1,76	29,3	m	$\delta\text{-CH}_2$
Lisina	1,89- 1,94	32,8	m	$\beta\text{-CH}_2$
	3,02	41,8	t (7,6)	$\epsilon\text{-CH}_2$
	3,76-3,80		m	$\alpha\text{-CH}$
	1,99-2,04		m	$\gamma\text{-CH}_2$
	2,00-2,07		m	$\beta\text{-CH}_2$
Prolina	2,31-2,36		m	$\beta'\text{-CH}_2$
	3,31-3,36	48,8	m	$\delta\text{-CH}_2$
	3,40-3,46	48,8	m	$\delta'\text{-CH}_2$
	4,13	63,8	dd (6,3; 6,8)	$\alpha\text{-CH}$
Tirosina	6,90- 6,91	118,8	m	CH
	7,18- 7,20	133,6	m	CH
	1,33	22,4	d (6,7)	$\gamma\text{-CH}_3$
Treonina	3,57	63,3	d (4,9)	$\alpha\text{-CH}$
	4,26	68,9	dq (4,9; 6,7)	$\beta\text{-CH}_3$
	0,99	19,2	d (7,0)	$\gamma\text{-CH}_3$
Valina	1,05	20,7	d (7,0)	$\gamma'\text{-CH}_3$
	2,26-2,30	32,0	M	$\beta\text{-CH}$
	3,61	63,1	d (4,4)	$\alpha\text{-CH}$

Figura 24. Representação estrutural dos metabólitos identificados nos grupos tratados com antibióticos, derivados xantônicos e no grupo controle



4.3. Uso da quimiometria para sugerir o mecanismo de ação das ω -aminoalcoxilxantonas

Como conhecido, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas e quinolonas agem em alvos específicos e com diferentes estratégias de perturbação para o crescimento e sobrevivência das bactérias (SCHELLI, ZHONG; ZHU, 2017). Com a análise de PCA, buscamos avaliar o comportamento dos grupos das quatro amostras tratadas com os antibióticos utilizados (ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina e canamicina), do branco e das amostras tratadas com os derivados xantônicos (**S6**, **S7** e **S8**).

Antes de adentrarmos na explicação dos gráficos de PCA e PLS-DA, vamos citar alguns problemas que encontramos durante a etapa de extração dos metabólitos. Inicialmente, nossa proposta consistia em 10 replicatas de cada antibiótico comercial, branco (grupo controle) e substâncias sintetizadas. Após preparar todas as amostras e obter todos os experimentos de RMN de ^1H , realizamos a análise de PCA para analisar o comportamento das amostras. Assim, nos deparamos com uma variação muito grande entre as amostras do mesmo grupo, sendo impossível tirar qualquer conclusão. No entanto, as substâncias sintetizadas tiveram um bom comportamento, o que nos levou a fazer uma análise visual em cada espectro de RMN obtido.

Observamos que o perfil espectral dos espectros de RMN de ^1H das amostras tratadas com os antibióticos comerciais e do branco variava muito, enquanto que, o das amostras tratadas com as substâncias sintetizadas se mantinha uniforme. Logo, suspeitamos que haveria alguma falha durante o processo, por mais que todas as etapas tenham sido realizadas cuidadosamente.

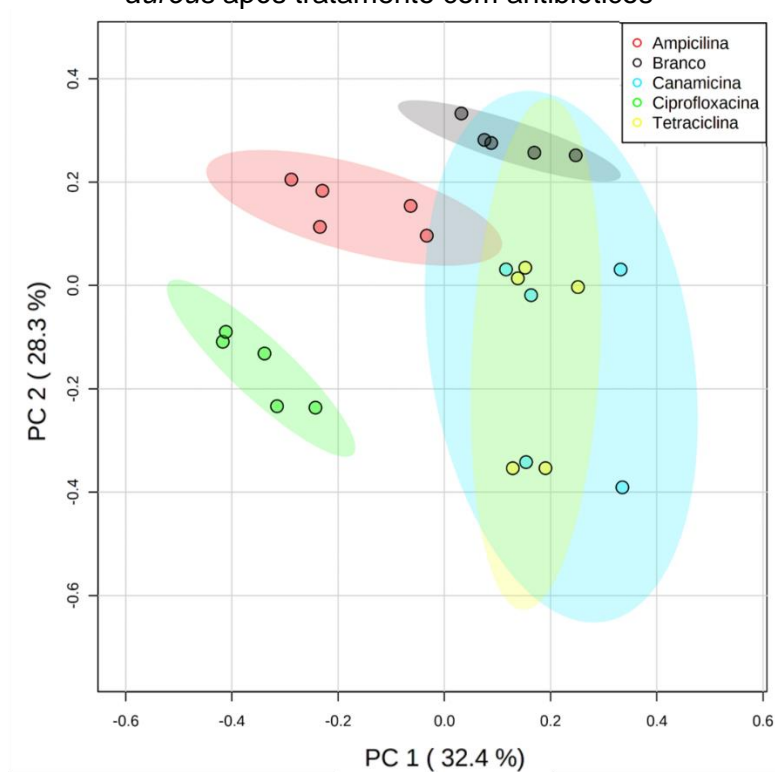
Devido à quantidade limitada de equipamentos que possuímos, as amostras tiveram tempos de espera diferentes umas das outras no início, enquanto a densidade óptica era ajustada, e também na etapa de filtração, resultando em um tempo total de incubação diferente para cada amostra.

Nas amostras das substâncias sintetizadas, o tempo de espera foi menor, porque foram feitas menos amostras durante o dia, justificando a maior uniformidade espectral entre as replicatas de um mesmo derivado xantônico. Desta forma, decidimos realizar mais 5 replicatas das culturas de *S. aureus* tratadas com cada

antibiótico e do branco, sendo realizado o procedimento completo de preparo de uma amostra por vez. Assim, garantimos que todas as amostras tivessem o mesmo tempo de incubação total.

Após obtenção dos espectros desse novo conjunto de amostras, a análise visual dos espectros revelou uma uniformidade intragrupo. Sequencialmente, realizamos uma nova PCA e o gráfico de escores está apresentado na **Fig. 25**, somente com os antibióticos comerciais que já possuem seus mecanismos de ação conhecidos e o branco para observar a separação entre eles, com 60,7% de variância nas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2).

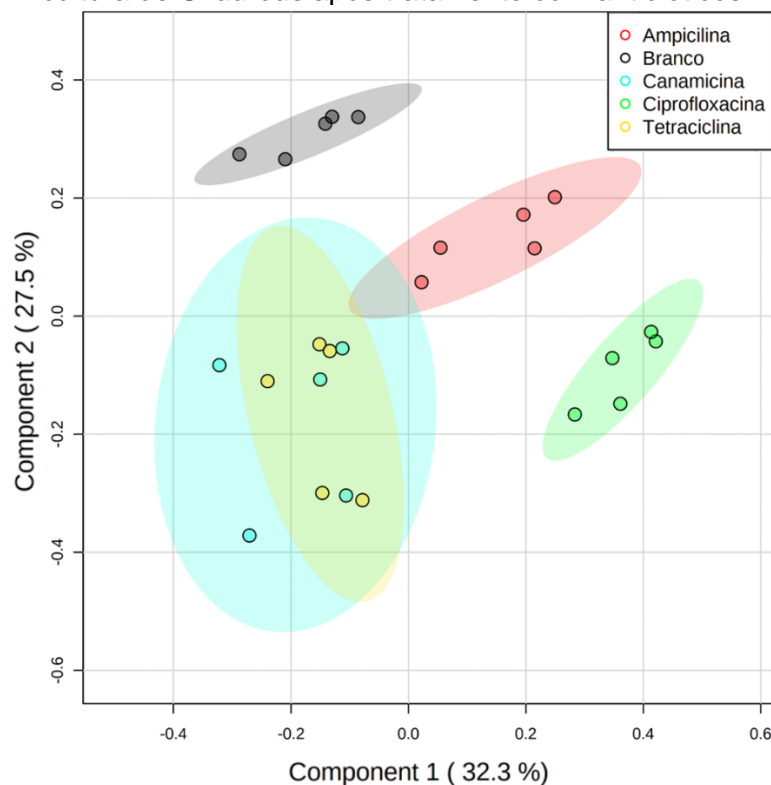
Figura 25. Gráfico de escores PCA obtido a partir dos dados de RMN de ^1H da cultura de *S. aureus* após tratamento com antibióticos



Pelo gráfico de escores da PCA acima, verificamos uma boa homogeneidade das amostras dentro de cada grupo dos antibióticos analisados, além de observar uma similaridade do grupo da canamicina e da tetraciclina em PC1 positivo. Já a ciprofloxacina se distanciou dos demais em escores negativos de PC1. O grupo da ampicilina se distanciou do grupo da tetraciclina e canamicina em escores negativos de PC1, mas, não foi possível obter uma boa separação do grupo controle, que estão

muito próximos do grupo da tetraciclina e canamicina em escores positivos de PC1. Por isso, recorreremos à análise supervisionada, PLS-DA, fim de investigar de forma mais aprofundada as similaridades e diferenças entre estes grupos (**Fig. 26**).

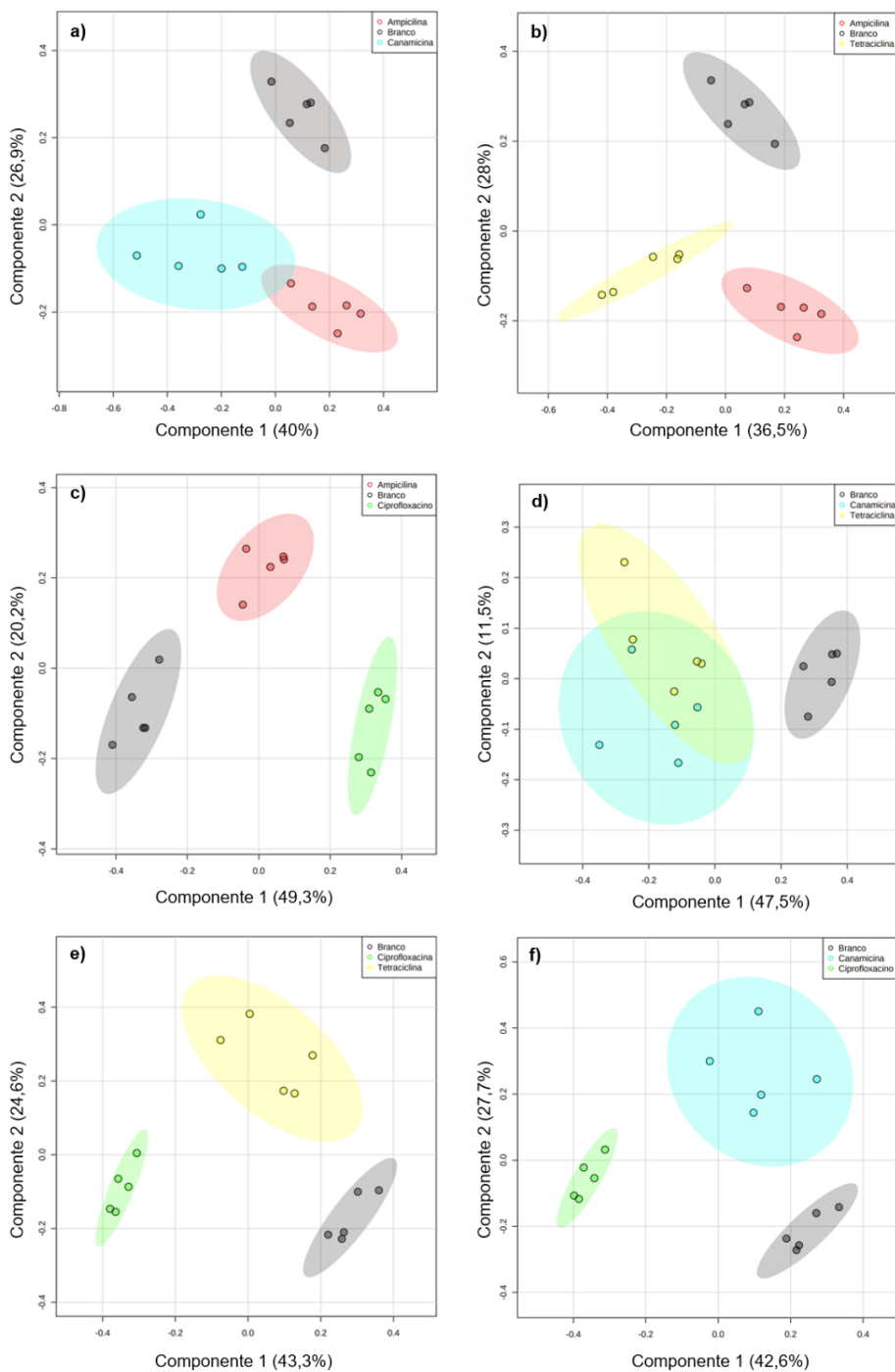
Figura 26. Gráfico de escores de PLS-DA obtido a partir dos dados de RMN de ^1H da cultura de *S. aureus* após tratamento com antibióticos



Pela análise de PLS-DA da figura acima, o grupo controle se separou dos antibióticos com alvos intracelulares, como a canamicina e a tetraciclina em escores negativos de PC1, assim como em relação à ciprofloxacina e ampicilina. Buscando aprimorar o comportamento dos grupos de antibióticos, fizemos a comparação aos pares dos antibióticos comerciais e o grupo controle (**Fig. 27**).

Nessas comparações, observamos uma boa separação deles em relação ao grupo controle, sendo o grupo da ciprofloxacina o que mais se distanciou do branco em relação aos outros (**Fig. 27c, e, f**) e também o que apresentou uma maior diferença dos grupos da ampicilina, tetraciclina e canamicina (**Fig. 27c, e, f**), o que pode confirmar seu mecanismo de ação diferente dos demais (os gráficos de *loadings* encontram-se em anexo, **Fig. A9-A14**).

Figura 27. Gráficos de escores de PLS-DA obtidos a partir dos dados de RMN de ^1H da cultura de *S. aureus* após tratamento com os seguintes antibióticos e o branco (grupo controle): **a)** ampicilina e canamicina; **b)** ampicilina e tetraciclina; **c)** ampicilina e ciprofloxacina; **d)** canamicina e tetraciclina; **e)** ciprofloxacina e tetraciclina; **f)** ciprofloxacina e canamicina

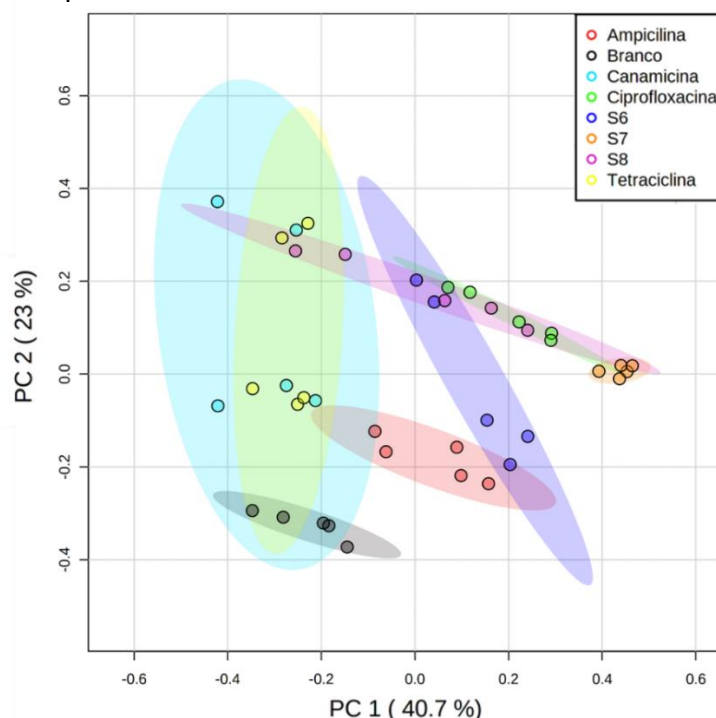


Em relação ao grupo da canamicina e tetraciclina (**Fig. 27d**), podemos notar uma proximidade entre esses grupos, corroborando o observado na **Fig. 26**. Esta proximidade pode ser justificada pela similaridade do modo de ação relatado na literatura para a canamicina e tetraciclina (inibição da síntese proteica).

Comparando a ampicilina com a canamicina (**Fig. 27a**) e a ampicilina com a tetraciclina (**Fig. 27b**), pode ser constatado que o grupo da canamicina apresenta uma maior variabilidade intragrupo, mas, quando comparado a distância da canamicina com ampicilina e tetraciclina com ampicilina, a distância é a mesma, e isso é justificado pela similaridade do modo de ação da canamicina e tetraciclina (**Fig. 27d**).

Ao inserir as três substâncias sintetizadas (**S6, S7 e S8**) na PCA, obtivemos o gráfico de escores (**Fig. 28**), com 63,7% de variância nas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2). Os grupos **S6, S7 e S8** foram parecidos com a ciprofloxacina no eixo de PC1 positivo, com uma alta variabilidade intragrupo para **S6 e S8**. No entanto, pela PCA o grupo controle não se separou dos grupos canamicina e tetraciclina ao longo das componentes 1 e 2.

Figura 28. Gráfico de escores PCA obtido a partir dos dados de RMN de ^1H da cultura de *S. aureus* após tratamento com antibióticos e derivados xantônicos



Desta forma, embora os resultados encontrados com o algoritmo supervisionado PLS-DA tenham apresentado valores baixos para acurácia, R^2 e Q^2 (0,375; 0,399; 0,217, respectivamente), o que demonstra baixa relevância preditiva, os resultados permitiram investigar melhor as respostas metabólicas de *S. aureus* frente aos antibióticos e compostos sintetizados (**Fig. 29a**). O grupo controle se separou do grupo da canamicina e tetraciclina em escores negativos de PC1 e, ao adicionar as substâncias sintetizadas **S6**, **S7** e **S8**, notamos uma forte tendência dos grupos **S6**, **S7** e **S8** a serem semelhantes ao grupo da ciprofloxacina.

Analisando o gráfico de *loadings* (**Fig. 29b**) juntamente com o perfil metabólico dos espectros de RMN de ^1H e a **Fig. 30**, que mostra as proporções relativas dos metabólitos em cada grupo, conseguimos observar como cada antibiótico e substância sintetizada afetou o metaboloma de *S. aureus*, apresentando diferenças na quantidade de aminoácidos e precursores importantes para as vias metabólicas/biossintéticas da bactéria, como, betaína, acetamida/*N*-acetil, glutamato, lisina, alanina, isoleucina/ leucina, acetato, treonina, prolina, aspartato e etanol.

A betaína e a acetamida, ambos metabólitos induzidos por estresse (HOERR et al, 2016), foram responsáveis por separar o grupo controle (branco) dos demais em valores positivos da componente 2 (**Fig. 29**), apresentando maior proporção quando comparado aos outros grupos (**Fig. 30a**) e no caso da acetamida/*N*-acetil, o grupo controle foi o único onde esse metabólito foi encontrado (**Fig. 30D**). A elevada quantidade encontrada de betaína no grupo controle em relação aos demais grupos e da acetamida/*N*-acetil (encontrada somente no grupo controle) é resposta ao estresse causado pelo choque térmico, uma vez que a betaína atua como um osmoprotetor nos microrganismos (ZHOU et al., 2016).

Uma vez que todas as amostras sofreram choque térmico, a baixa quantidade de betaína encontrada nos grupos tratados com os antibióticos sugere que esse metabólito não foi acumulado, como ocorreu no grupo controle, e sim, usado para suprir as necessidades do metabolismo afetado pelos antibióticos de cada grupo, pois, a betaína é um osmólito orgânico que possui características zwitteriônicas e age como um intermediário no metabolismo de proteínas e de energia, por ser um doador de metila e aminoácidos (ZHOU et al., 2016).

Figura 30 Proporção relativa dos metabólitos intracelulares de *S. aureus* após tratamento com cada antibiótico, derivados xantônicos e o branco (grupo controle) (continua)

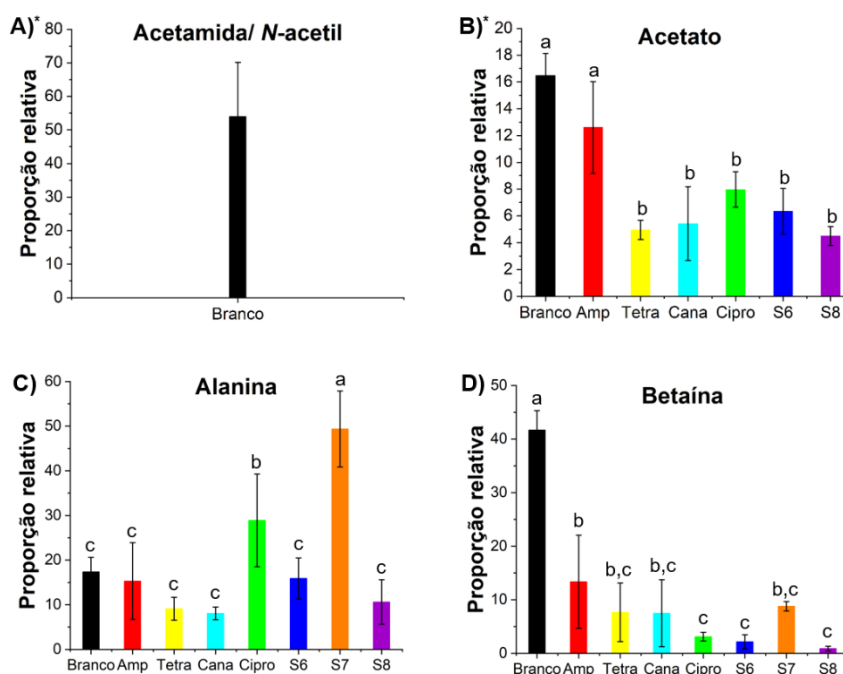
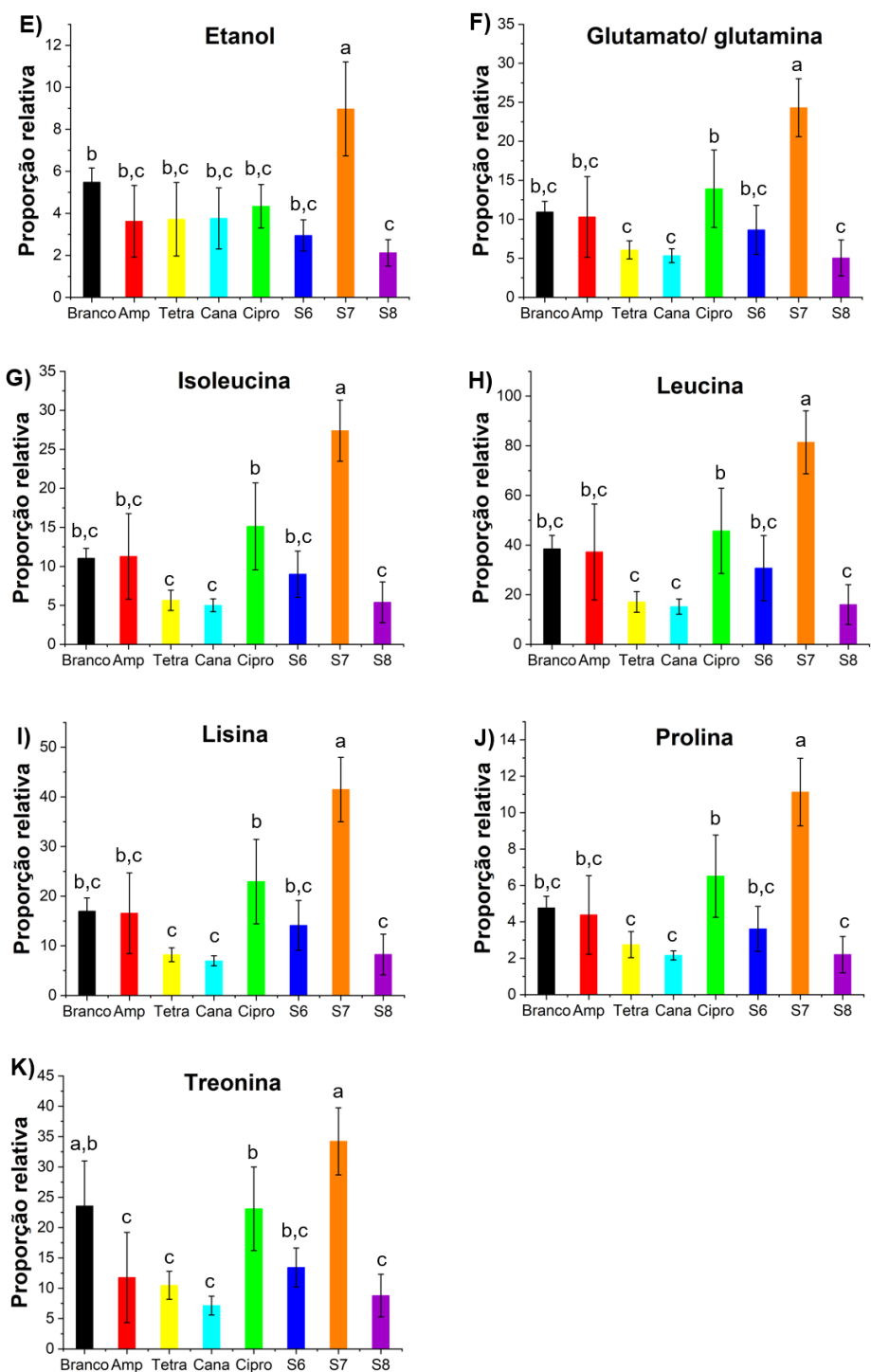


Figura 30 Proporção relativa dos metabólitos intracelulares de *S. aureus* após tratamento com cada antibiótico, derivados xantônicos e o branco (grupo controle) (conclusão)

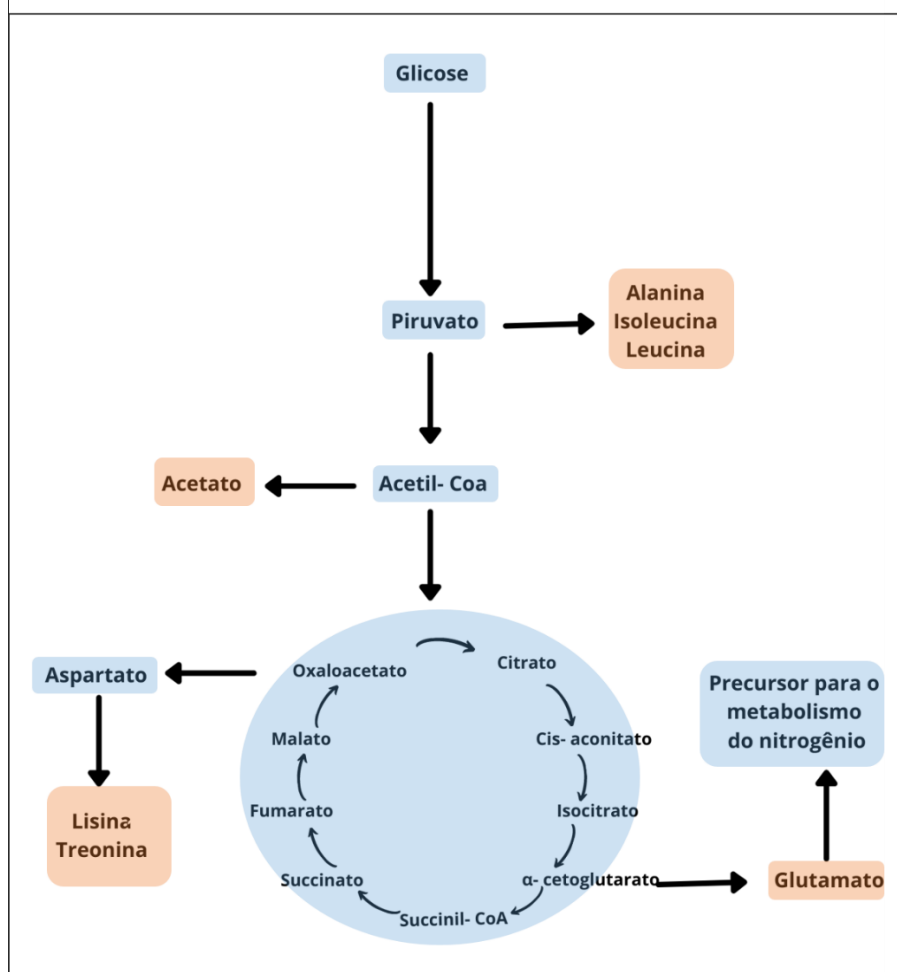


***A)** O metabólito acetamida/*N*- acetil foi encontrado apenas no grupo controle (branco); **B)** o grupo **S7** apresenta sinais de outro metabólito sobreposto, por isso não foi apresentada sua proporção relativa; a,b,c,d: grupos que não compartilham a mesma letra apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A prolina também é um osmólito de proteção em bactérias (KIAMCO et al, 2018), responsável por agrupar o grupo S7 em escore positivos de LV1 e LV2, estando em maior proporção quando comparado com os demais antibióticos e o branco (**Fig. 30J**). O etanol, metabólito de energia (HOERR et al, 2016) foi responsável por alocar o grupo da tetraciclina e canamicina nos fatores 1 e 2 negativos, estando em maior proporção no grupo S7 (**Fig. 30E**).

O ciclo de Krebs é o ponto chave para a produção de intermediários biossintéticos e no processo de respiração celular para muitos organismos (NELSON; COX, 2014). Para *S. aureus*, o ciclo de Krebs é completo (**Fig. 31**) e desempenha funções importantes nesses organismos durante a patogênese, estando envolvido na virulência, sobrevivência e persistência desses seres vivos (SOMERVILLE et al., 2003).

Figura 31. Representação esquemática do Ciclo de Krebs



*Em azul, os precursores biossintéticos produzidos no ciclo de Krebs; em laranja, os metabólitos responsáveis pela separação dos grupos

O acetato é um intermediário metabólico que serve de precursor de um grande número de produtos, consumido na via catabólica do ciclo de Krebs como fonte secundária de carbono (NELSON; COX, 2014; HALSEY et al., 2017). Dos grupos analisados, o acetato se apresentou em maiores proporções no grupo controle e no grupo da ampicilina (**Fig. 30B**). O destino catabólico do piruvato é determinado pelas condições do crescimento, e devido ao estresse que a bactéria sofreu e em resposta à ampicilina, acreditamos que a via metabólica aeróbia do ciclo de Krebs se modificou fazendo com que houvesse acúmulo de acetato através do piruvato (SOMERVILLE et al., 2003; NELSON et al., 2007).

O grupo tratado com S7 apresentaram níveis maiores de glutamato/glutamina e a ciprofloxacina apresentou maiores de proporções deste metabólito quando comparado com canamicina, tetraciclina, S6 e S8 (**Fig. 30F**). O glutamato é um dos solutos orgânicos intracelulares mais proeminentes presentes nas bactérias, além de ser o metabólito chave para interligar o metabolismo do carbono com o do nitrogênio. Em alta concentração, permite que as enzimas funcionem de forma eficiente e em resposta ao estresse, é acumulado rapidamente para manter as funções metabólicas (MOAT, FOSTER; SPECTOR, 2002; FEEHILY; KARATZAS, 2012; STANNEK et al., 2015).

A ciprofloxacina é conhecida por induzir a resposta SOS (uma das várias redes regulatórias complexas que modificam a transcrição em resposta ao estresse ambiental) bacteriana, levando a uma resposta negativa do metabolismo da biossíntese de purina e pirimidina (CIRZ et al., 2007; DÖRRIES, SCHLUETER; LALK, 2014). Segundo DÖRRIES; SCHLUETER e LALK (2014), níveis aumentados de aminoácidos, como glutamato, podem resultar da regulação negativa das partes principais do metabolismo da purina e pirimidina, pois doadores de nitrogênio, como glutamina e glutamato, são menos importantes se a biossíntese de purinas e pirimidinas forem interrompidas.

Também em resposta ao estresse, as células tendem a acumular íons potássio, resultando no aumento da síntese de glutamato para compensar o acréscimo dos íons potássio, agindo como um protetor temporário as células e como um sinal intracelular de estresse (FEEHILY; KARATZAS, 2012).

Os grupos da ciprofloxacina e da substância S7 também exibiram as maiores quantidades de alanina, isoleucina, leucina, lisina e treonina (**Fig. 30C, G, H, I e K**). No estudo realizado por Dörries e colaboradores (2014), foi observado que esses precursores da parede celular bacteriana aumentaram drasticamente, sendo apontado para uma assinatura metabólica induzida pelo estresse por ciprofloxacina.

Higgis e colaboradores (1974) já haviam observado em seu estudo com *Streptococcus faecalis*, que quando as sínteses de DNA e RNA são inibidas, ocorre um bloqueio na formação do septo e um espessamento da parede celular. Isso pode justificar a elevada quantidade de alanina, lisina e treonina encontrada no grupo tratado com ciprofloxacina, que pode estar associado a quantidades alteradas de precursores do peptídeo glicano, para os quais a lisina e a alanina são necessárias como parte da cadeia peptídica e a treonina, precursor de ancoragem da parede celular, onde o C-terminal é responsável pela ligação covalente ao peptídeo glicano da parede celular (SCHNEEWIND, FOWLER; FAULL, 1995; GEOGHEGAN; FOSTER, 2015).

A ciprofloxacina, antibiótico das classes das quinolonas, interrompe a replicação do DNA bacteriano inibindo as enzimas topoisomerases (ALDRED, KERNS; OSHEROFF, 2014). As topoisomerases, a DNA girase e a topoisomerase IV, são enzimas fundamentais para ajudar a manter o DNA celular bacteriano no estado adequado de superenrolamento nas regiões de replicação e não replicação do cromossomo. A DNA girase remove o excesso de superenrolamento positivo e a topoisomerase IV conduz a separação das moléculas de DNA-filhas ligadas após a replicação estar completa (ALDRED, KERNS; OSHEROFF, 2014).

Os derivados xantônicos se apresentam como uma potente classe inibidora de topoisomerases (SHAGUFTA, 2016), como foi encontrado no estudo por Jun e colaboradores (2011) que sintetizaram oito derivados de xantonas com diferentes heteroátomos e avaliaram a atividade inibitória sobre topoisomerases I e II. Desses compostos, o que possuía amina secundária na cadeia lateral do núcleo da xantona foi mais eficiente na inibição da topoisomerase II.

Minniti e colaboradores (2017) também sintetizaram uma série de compostos xantônicos poliaminados e observaram que esses derivados diminuíram a atividade

catalítica geral da topoisomerase II ao inibir a capacidade da enzima de realizar a passagem da fita de DNA.

As topoisomerasas humanas do tipo II desempenham papéis críticos em uma série de processos de ácido nucleico, incluindo replicação de DNA, transcrição, recombinação e segregação cromossômica. Essas enzimas clivam transitoriamente ambas as fitas da dupla hélice, permitindo a passagem da outra cadeia através desta quebra, evitando dessa forma o superenrolamento das fitas de DNA e removendo os emaranhados e nós do genoma humano para ligar novamente as extremidades clivadas (POMMIER et al, 2010; MINNITI et al, 2017).

Os derivados xantônicos aminados atuam no sítio ativo de clivagem / ligação do DNA da topoisomerase II humana e prejudicam a atividade catalítica, fazendo um bloqueio na etapa de passagem da fita de DNA do ciclo catalítico da topoisomerase II. Os derivados xantônicos e a ciprofloxacina apresentam similaridades no modo de ação sobre topoisomerasas, mostrando uma correlação com os resultados que obtivemos na análise de PLS-DA.

Assim, como os metabólitos dos derivados xantônicos apresentaram similaridades com o grupo tratado com a ciprofloxacina, foi realizado ensaio *in silico* com a enzima topoisomerase IV bacteriana, principal enzima alvo da ciprofloxacina em *S. aureus* (ALT et al, 2011), a fim de estudar a interação dos compostos com o sítio ativo da enzima.

4.4 Modelagem molecular

Para prever *in silico* a melhor orientação e conformação dos compostos sintetizados ligados à proteína topoisomerase IV (código PDB: 4URN), foi usado o programa PyRx, que usa AutoDock Vina como software de *docking*. Com base nesses perfis e estruturas dos compostos, AutoDock Vina infere as possíveis interações farmacológicas e permite que os compostos mais promissores sejam classificados de acordo com a atividade biológica estudada, utilizando a função de escore empírico para esta classificação (TROTT; OLSON, 2010).

A novobiocina foi usada como referência para estabelecer as coordenadas da caixa de encaixe. A energia de ligação dos três compostos previstos por *docking* foi analisada e classificada de acordo com a afinidade de ligação descrita em Kcal/mol. A **Tabela 4** mostra os valores das energias de interação com a topoisomerase IV (cristalizada) e de todos os compostos obtidos pelo software *Autodocking Vina*.

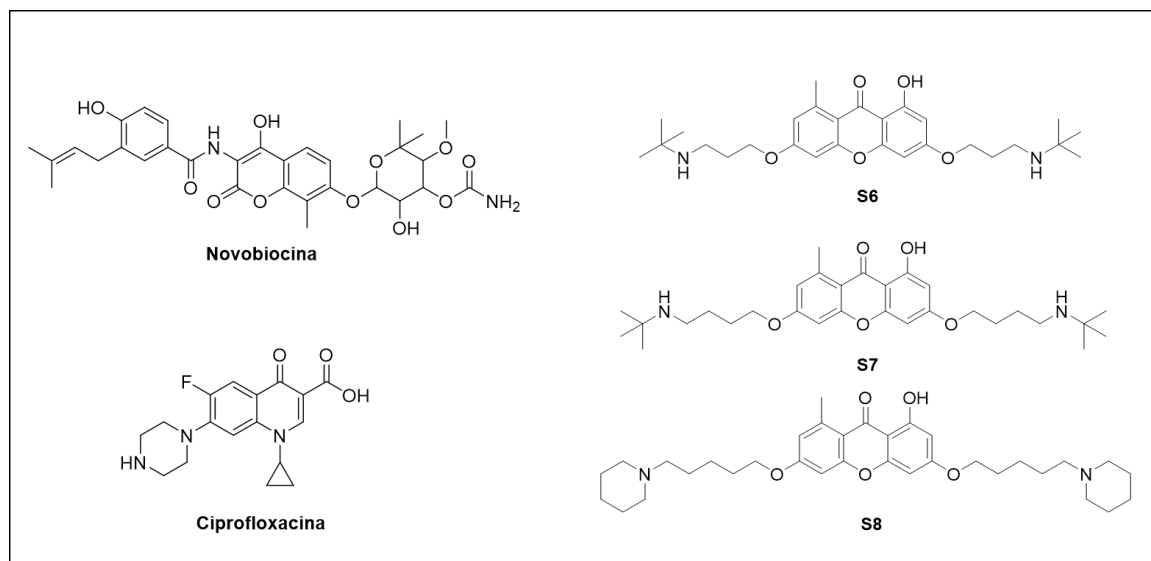
Tabela 4. Energias das interações do complexo ligante-receptor com a topoisomerase IV (cristalizada) (afinidade de ligação (Kcal/mol))

Compostos	Afinidade de ligação (kcal/mol)
Novobiocina (ref.)	-7,2
Ciprofloxacina	-7,8
S6	-7,3
S7	-6,8
S8	-7,3

A previsão da ligação da ciprofloxacina (antibiótico estabelecido) e das 3 substâncias testadas (**S6**, **S7** e **S8**) (**Fig. 32**), gerou 27 poses. Assim, as conformações com menos energia envolvida (afinidade de ligação aumentada) representam os complexos ligante-receptor e estão próximas das conformações biologicamente ativas (TROTT; OLSON, 2010).

Comparando os compostos testados, observa-se que há pouca variação da energia de ligação entre os derivados xantônicos (**S6**, **S7** e **S8**) e a ciprofloxacina. Isso indica que os compostos testados apresentam grande probabilidade de se ligarem ao sítio ativo da enzima alvo (topoisomerase IV), uma vez que, quanto menor a energia de ligação, melhor é o encaixe.

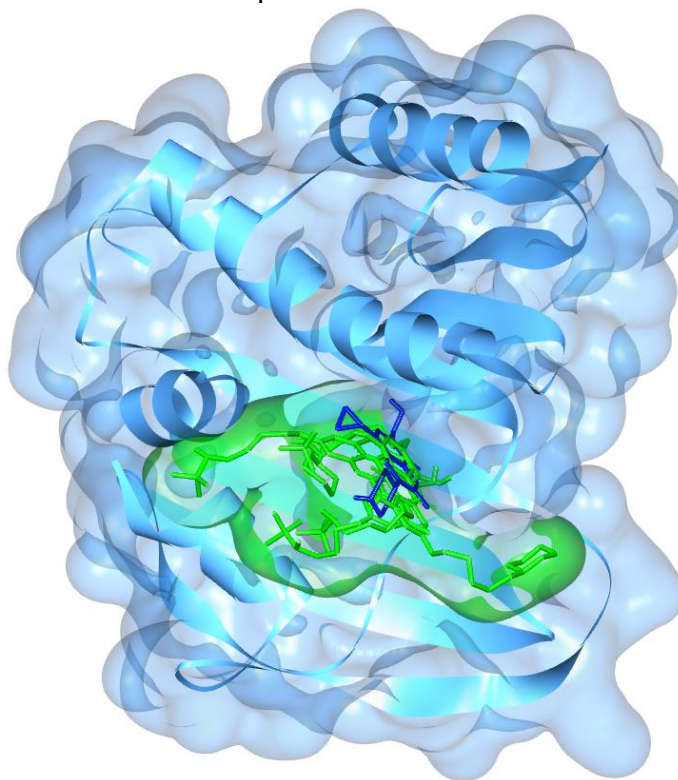
Figura 32. Compostos testados na análise de *docking* molecular



De acordo com a função de pontuação do Autodock Vina, as conformações tridimensionais mais estáveis são mostradas "datadas" na superfície da topoisomerase IV na **Fig. 33**. A análise da **Tabela 4** e das **Fig. 34** e **Fig. 35** revela a grande relevância das interações de aminoácidos para a conexão no sítio ativo da topoisomerase IV.

Em comparação com ciprofloxacina, **S6** compartilha interações via ligação de hidrogênio com Glu 53, Arg 138, Gli 80 e Arg 79. Além destas, S6 apresenta outros tipos de interações envolvendo Met 81 e Pro 82. Já **S7** compartilha com ciprofloxacina interações com os aminoácidos Glu 53, Met 81 e Pro 82 através de interações diferentes de ligação de hidrogênio. A substância **S8** apresenta interações em comum com ciprofloxacina via ligação de hidrogênio com Arg 138 e também com outras interações envolvendo Glu 53, Pro 82 e Met 81 (**Fig 35**). Essas interações são semelhantes à novobiocina, antibiótico usado como referência para realizar o *docking* neste estudo (**Fig. 34**).

Figura 33. Interação da ciprofloxacina e das substâncias S6, S7 e S8 no sítio ativo da topoisomerase IV



*O sítio da topoisomerase IV é mostrado como uma superfície da molécula do arquivo PDB 4URN. As conformações previstas no encaixe para os compostos de teste (verde) são mostradas sobrepostas no sítio da topoisomerase IV no formato de bastão. O sítio da topoisomerase IV é indicado com conformações sobrepostas previstas dos três compostos e ciprofloxacina (azul) como referência.

Na **Fig. 35**, é possível notar que a ligação dos compostos selecionados ao sítio ativo da topoisomerase IV é ancorada principalmente por interações de ligações de hidrogênio e, que são altamente relevantes para a interação e estabilidade da proteína-ligante. Além disso, todos os compostos apresentam um número considerável de interações com os aminoácidos do sítio ativo, o que estabilizaria os compostos em uma posição adequada para interagir com o sítio ativo da topoisomerase IV.

A substância **S6** apresentou mais interações por ligações de hidrogênio do que a ciprofloxacina, o que poderia explicar o valor da afinidade de ligação próxima a ela, resultando em uma possível ligação estável com a proteína. Já **S8**, apresentou somente uma interação via ligação de hidrogênio e teve o mesmo valor de afinidade de ligação de **S6**. O que pode justificar a proximidade do valor da energia de ligação

entre as substâncias **S6**, **S8** e a referência (ciprofloxacina), é a interação com o resíduo Arg 138, resíduo com o qual as três substâncias interagem. Já a substância **S7** apresenta mais interações, porém não compartilha das mesmas interações via ligações de hidrogênio que as moléculas de referência, como a novobiocina e a ciprofloxacina. Essa diferença de interação resulta no efeito em que a molécula tem sobre o sítio ativo.

As substâncias **S7** e **S8** apresentam uma quantidade significativa nas interações hidrofílicas que ocorrem entre as moléculas e os aminoácidos Gli, Arg, Tre e Asn, contribuindo para uma considerável estabilidade energética com o sítio ativo da proteína. As substâncias testadas mostram uma afinidade excelente para esta proteína com base nos resultados de energia de ligação obtidos por *docking* usando a proteína topoisomerase IV cristalizada. Eles podem ser ótimos candidatos para estudos adicionais no desenvolvimento de medicamentos.

Figura 34. Representação das interações dos aminoácidos com a novobiocina

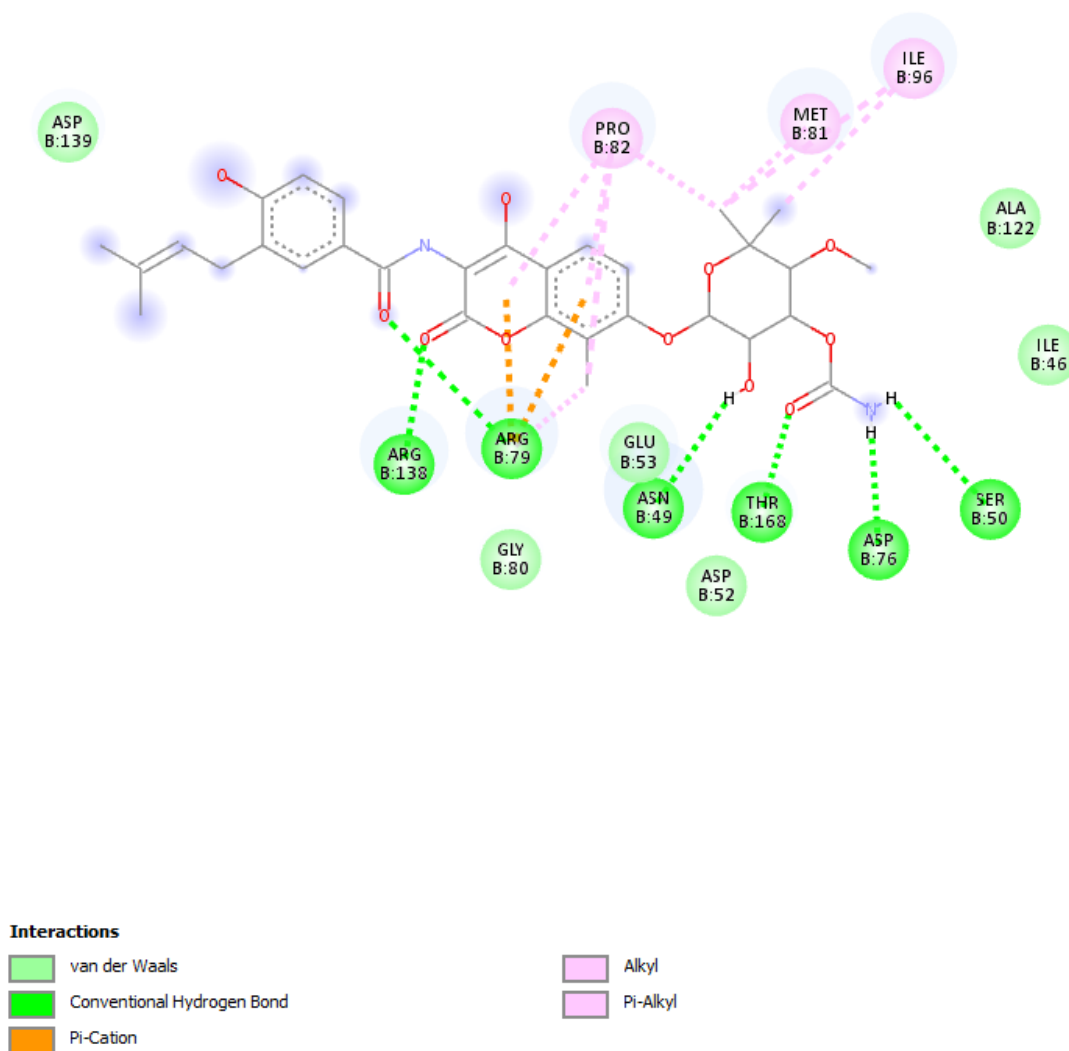
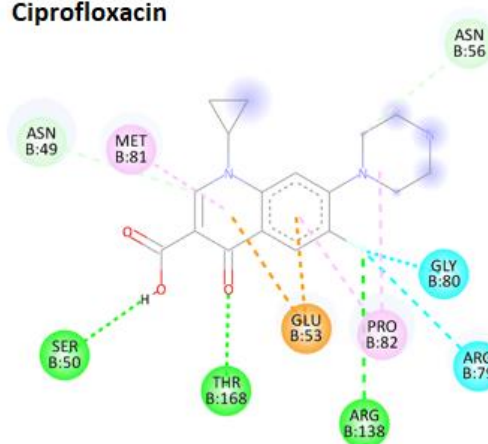


Figura 35. Interações dos aminoácidos com a ciprofloxacina e compostos **S6 (6)**, **S7 (7)** e **S8 (8)**

Ciprofloxacina

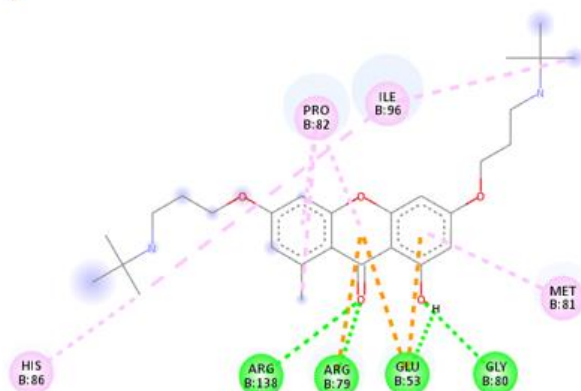


Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Halogen (Fluorine)

- Pi-Anion
- Alkyl
- Pi-Alkyl

6

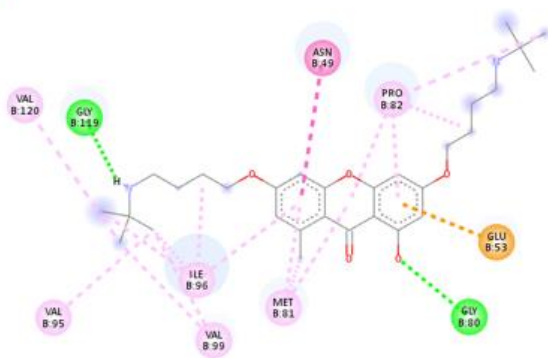


Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Cation
- Pi-Anion

- Alkyl
- Pi-Alkyl

7

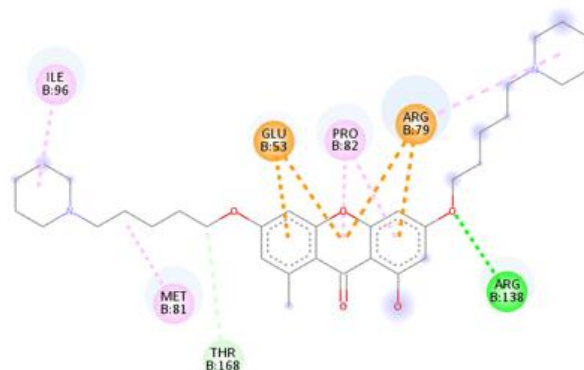


Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Anion
- Amide-Pi Stacked

- Alkyl
- Pi-Alkyl

8



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Cation

- Pi-Anion
- Alkyl
- Pi-Alkyl

5. CONCLUSÃO

Foram sintetizadas três ω -aminoalcoxilxantonas (**S6**, **S7** e **S8**), substâncias derivadas da liquexantona, que possuem atividade antibiótica sobre *S. aureus*. Culturas dessa bactéria foram tratadas com as substâncias sintetizadas e antibióticos comerciais (ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina e canamicina) e as alterações metabólicas causadas por cada tratamento foram estudadas utilizando a técnica de RMN em conjunto com quimiometria. A partir destas análises foi possível identificar as variações nos metabólitos intracelulares, sendo possível caracterizar 21 metabólitos.

As análises quimiométricas nos mostraram como o metaboloma de *S. aureus* foi afetado por cada antibiótico e substâncias sintetizadas, apontando diferenças na quantidade de aminoácidos e precursores importantes, como, betaína, acetamida, glutamato, lisina, alanina, isoleucina/leucina, acetato, treonina, prolina e etanol.

Pela análise do perfil químico, concluímos que as substâncias **S6**, **S7** e **S8** apresentaram uma similaridade com o grupo da ciprofloxacina, um antibiótico que age no DNA bacteriano, inibindo a enzima topoisomerase IV.

O teste *in silico* de modelagem molecular corroborou os resultados de PLS-DA, mostrando alta afinidade das substâncias **S6**, **S7** e **S8** com a enzima topoisomerase IV, enzima essa, alvo da ciprofloxacina.

Dessa forma, nossos resultados mostraram a importância do uso das técnicas de RMN em conjunto com a metabolômica e quimiometria, onde conseguimos extrair informações de como os compostos influenciam no metabolismo celular, e conseqüentemente, como se dá a atividade antimicrobiana, sem fazer uso de ensaios fenotípicos especializados. O uso dessas técnicas para inferir mecanismo de ação indiretamente não descarta a necessidade de ensaios posteriores, mas com certeza, podem direcionar a execução desses ensaios, reduzindo tempo e custo.

REFERÊNCIAS

ABEBE, E.; TEGEGNE, B.; TIBEBU, S. A Review on Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics. **European Journal of Applied Sciences**, v. 8, p. 301- 310, 2016.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. **Biologia molecular da célula**. 6ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, v. 53, p. 1565- 1574, 2014.

ALT, S.; MITCHENALL, L.A.; MAXWELL, A.; HEIDE, L. Inhibition of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by aminocoumarin antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2061-2069, 2011.

ANDREI, S.; DROC, G.; STEFAN, G. FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019. **Discovery journals**, v.7, p.1-11, 2019.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2016-2020), 2016. Disponível em: < http://antigo.anvisa.gov.br/en_US/resultado-de-busca > Acesso em: 20 set 2020.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Superbactérias: de onde vêm, como vivem e se reproduzem, 2018. Disponível em: < http://antigo.anvisa.gov.br/en_US/resultado-de-busca > Acesso em: 20 set 2020.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resistência antimicrobiana é ameaça global, 2019. Disponível em: < http://antigo.anvisa.gov.br/en_US/resultado-de-busca > Acesso em: 20 set 2020.

ARENZ, S.; WILSON, D. N. Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.6, p. 1- 15, 2016.

AUER, G. K.; WEIBEL, D. B. Bacterial Cell Mechanics. **Biochemistry**, v. 56, p. 3710- 3724, 2017.

BADDINI, A. L. Q.; NETTO, A. D. P.; TEIXEIRA, V. L. Metabolômica Baseada em RMN de ¹H e no Método dos Mínimos Quadrados Parciais Discriminante. **Revista Virtual de química**, v. 6, p. 396- 415, 2014.

BHARTI, S.K.; BHATIA, A.; TEWARI, S.K.; SIDHU, O.P.; ROY, R. Application of HR-MAS NMR spectroscopy for studying chemotype variations of *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 659–667, 2011.

BRITO, M. A.; CORDEIRO, B. C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 247- 249, 2012.

BUENO, J. Metabolomics in Antimicrobial Drug Discovery: The Success of the Chemical Diversity. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, p. 380-383, 2015.

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

CHEN, P.; CHEN, X.; YU, W.; ZHOU, B.; LIU, L.; YUZHOU, Y.; DU, P.; LIU, L.; LI, C. Ciprofloxacin stress changes key enzymes and intracellular metabolites of *Lactobacillus plantarum* DNZ-4. **Food Science and Human Wellness**, v.11, p.332-341, 2022.

CHENG, J.H.; HUANG, A.M.; HOUR, T.C.; YANG, S.C.; PU, Y.S.; LIN, C.N. Antioxidant xanthone derivatives induce cell cycle arrest and apoptosis and enhance cell death induced by cisplatin in NTUB1 cells associated with ROS . **European Journal of Medicinal Chemistry** , V.46, p. 1222- 1231, 2011.

CHUKWUDI, C. U. rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 4433- 4441, 2016.

CIRZ, R. T.; JONES, M.B.; GINGLES, N.A.; MINOGUE, T.D.; JARRAHI, B.; PETERSON, S.N.; ROMESBERG, F.R. Complete and SOS-Mediated Response of *Staphylococcus aureus* to the Antibiotic Ciprofloxacin. **Journal of bacteriology**, v. 189, p. 531- 539, 2007.

CORNAGLIA, G.; ROSSOLINI, G. M. Forthcoming therapeutic perspectives for infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 218- 223, 2009.

CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. **Modern pharmacology with clinical applications**. 6ed, LWW, 2003

CRUZ, E. M. C. Antibióticos vs. resistencia bacteriana. **Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta**, v. 40, 2015.

DÖRRIES, K.; SCHLUETER, R.; LALK, M. Impact of Antibiotics with Various Target Sites on the Metabolome of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 7151- 7163, 2014.

DUBEI, K.K.; INDU; SHARMA, M. Reprogramming of antibiotics to combat antimicrobial resistance. **Archiv der Pharmazie**, v.353, p. 1-15, 2020.

FAN, T.W.M. Metabolite profiling by one- and two- dimensional NMR analysis of complex mixtures. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 28, p. 161- 219, 1996.

FEEHILY, C.; KARATZAS, K. A. G. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 11- 24, 2012.

FERNANDES, C.; TIRITAN, M.E.; CASS, Q.; KAIRYS, V.; FERNANDES, M.X.; PINTO, M. Enantioseparation and chiral recognition mechanism of new chiral derivatives of xanthenes on macrocyclic antibiotic stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1241, p. 60- 68, 2012.

FERNANDES, C.; TIRITAN, M. E.; PINTO, M. M. M. Derivados xantônicos quirais: aplicações em Química Medicinal e uma nova abordagem em Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 7, p. 223- 236, 2015.

FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. b-Lactam Resistance Mechanisms: Gram-Positive Bacteria and Mycobacterium tuberculosis. **Cold Spring Harbor Laboratory Perspectives in Medicine**, v. 6, p. 1- 20, 2016.

GAYNES, R. The Discovery of Penicillin—New insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, p. 849- 853, 2017.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667- 679, 2010.

HALOUSKA, S.; FENTON, R.J.; BARLETTA, R.G.; POWERS, R. Predicting the *in Vivo* mechanism of action for drug leads using NMR metabolomics. **ACS Chemical Biology**, v.7, p.166–171, 2012.

HALSEY,C.; LEI, S.; WAX, J.K.; LEHMAN, M.K.; NUXOLL, A.S.; STEINKE, L.; SADYKOV, M.; POWERS, R.; FEY, P.D. Amino acid catabolism in *Staphylococcus aureus* and the function of carbon catabolite repression. *American Society for Microbiology*, v.8, p.1-19, 2017.

HÉBERGER, K. Chemoinformatics- multivariate mathematical- statistical methods for data evaluation. **Medical applications of mass spectrometry**, p. 141-169, 2008.

HOERR, V.; DUGGAN, G.E.; ZBYTNUK, L.; POON, K.H.; GROBE, C.; NEUGEBAUER, U.; METHLING, K.; LÖFFLER, B.; VOGEL, H.J. Characterization and prediction of the mechanism of action of antibiotics through NMR metabolomics. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 2- 14, 2016.

HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 354, p. 12- 31, 2015.

HUTCHINGS, M.I.; TRUMAN, A.W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v.51, p. 72–80, 2019

JUN, K.Y.; LEE, E.Y.; JUNG, M.J.; LEE, O.H.; LEE, E.S.; CHOO, H.Y.P.; NA, Y.; KWON, Y. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking study of 3-(30-heteroatom substituted-20-hydroxy-10-propyloxy) xanthone analogues as novel topoisomerase IIa catalytic inhibitor. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 1964- 1971, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9^a. ed. [S.I.]: Guanabara Koogan, 2012.

JYOTSHNA; KHARE, P.; SHANKER, K. Mangiferin: A review of sources and interventions for biological activities. **Biofactors**, v. 42, p. 504- 514, 2016.

KE, H.; MORRISEY, J.M.; QU, S.; CHANTARASRIWONG, O.; MATHER, M.W.; THEODORAKIS, E.A.; VAIDYA, A.B. Caged *Garcinia* xanthenes, a novel chemical scaffold with potent antimalarial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.61, p.1-14, 2017.

KIAMCO, M.M.; MOHAMED, A.; REARDON, P.N.; MAREAN-REARDON, C.L.; AFRAMEHR, W.M.; CALL, D.R.; BEYENAL, H.; RENSLOW, R.S. Structural and metabolic responses of *Staphylococcus aureus* biofilms to hyperosmotic and antibiotic stress. **Biotechnology Bioengineering**, v.115, p.1594-1603, 2018.

KRAUSE, K.M.; SERIO, A.W.; KANE, T.R.; CONNOLLY, L.E. Aminoglycosides: An OVERVIEW. **COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN MEDICINE**, V.6, P.6-18, 2016.

LARSSON, D.G.J., FLACH, CF. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, p.1-13, 2021.

LIN, K.W.; FANG, S.C.; HUNG, C.F.; SHIEH, B.J.; YANG, S.C.; TENG, C.M.; LIN, C.N. Synthesis, Antiplatelet and Vasorelaxing Activities of Xanthone Derivatives. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences**, v. 342, p. 19- 26, 2009.

LOH, Z.H.; KWONG, H.C.; LAM, K.W.; TEH, S.S.; EE, G.C.L.; QUAH, C.K.; HO, A.S.H.; MAH, S.H. New 3-O-substituted xanthone derivatives as promising acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.36, p.627-639, 2021.

LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; HEIN, L.; BIEGER, D. **Color atlas of pharmacology**. 3^a. ed. New York: Thieme , 2005.

MAARTENS, M.M.J.; SWART, C.W.; POHL, C.H; KOCK, L.J.F. Antimicrobials, chemotherapeutics or antibiotics?. **Scientific Research and Essays** , v. 6, p. 3927-3929, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. 14^a. ed., Artmed, 2016.

MARONA, H.; SZKARADEK, N.; TROJANOWSKA, D.; BUDAK, A.; BOBER, P.; PRZEPIÓRKA, W.; CEGLA, M.; SZNELER, E. Synthesis and Evaluation of Some Xanthone Derivatives for Anti-Arrhythmic, Hypotensive Properties and Their Affinity for Adrenergic Receptors. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences**, v. 341, p. 90- 98, 2008.

MARONA, H.; SZKARADEK, N.; RAPACZ, A.; FILIPEK, B.; DYBALA, M.; SIWEK, A.; CEGLA, M.; SZNELER, E. Preliminary evaluation of pharmacological properties of some xanthone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1345- 1352, 2009a.

MARONA, H.; SZKARADEK, N.; KARCZEWSKA, E.; TROJANOWSKA, D.; BUDAK, A.; BOBER, P.; PRZEPIÓRKA, W.; CEGLA, M.; SZNELER, E. Antifungal and Antibacterial Activity of the Newly Synthesized 2-Xanthone Derivatives. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences**, v. 342, p. 9- 18, 2009b.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A.; LIMA, D.P.; HONDA, N.K. Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler – isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. **Química Nova**, v. 32, p. 12- 20, 2009.

MICHELETTI, A. C.; HONDA, N.K.; LIMA, D.P.; BEATRIZ, A. Chemical modifications of a natural xanthone and antimicrobial activity against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and cytotoxicity against human tumor cell lines. **Química Nova**, v. 34, p. 1014- 1020, 2011.

MINCHIN, S.; LODGE, J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. **Essays in Biochemistry**, v. 63, p. 433- 456, 2019.

MINNITI, E.; BYL, J.A.W.; RICCARDI, L.; SISSI, C.; ROSINI, M.; DE VIVO, M.; MINARINI, A.; OSHEROFF, N. Novel xanthone-polyamine conjugates as catalytic inhibitors of human topoisomerase II α . **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 4687- 4693, 2017.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. **MICROBIAL PHYSIOLOGY**. 4^a. ed., Wiley- Liss, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6^a. ed., Artmed, 2014.

NOGUEIRA, H. S.; XAVIER, A.R.E.O.; XAVIER, M.A.S.; CARVALHO, A.A.; MONÇÃO, G.A.; BARRETO, N.A.P. ANTIBACTERIANOS: PRINCIPAIS CLASSES, MECANISMOS DE. **UNIMONTES CIENTÍFICA**, v. 18, p. 96- 108, 2016.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, p. 189- 197, 2008.

OLIVEIRA, J. H. H. L.; GRANATO, A.C.; HIRATA, D.B.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, v. 32, p. 2142- 2150, 2009.

PARASCANDOLA, J. The Theoretical Basis of Paul Ehrlich's Chemotherapy. **Journal of the History of Medicine**, v. 78, p. 19-43, 1981

PARASCANDOLA, J. History of Salvarsan (Arsphenamine). **Encyclopedia of life sciences**, p.1-2, 2001

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5^a. ed., Oxford University Press, 2013.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**, 3.ed, Pergamon Press, 1998.

PIAZZI, L.; BELLUTI, F.; BISI, A.; GOBBI, S.; RIZZO, S.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; RECANATINI, M.; RAMPA, A. Cholinesterase inhibitors: SAR and enzyme inhibitory activity of 3-[x-(benzylmethylamino)alkoxy]xanthen-9-ones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 575- 585, 2007.

PINTO, M.M.M; PALMEIRA, A.; FERNANDES, C.; RESENDE, D.I.S.P.; SOUSA, E.; CIDADE, H.; TIRITAN, M.E.; CORREIA-DA-SILVA, M.; CRAVO, S. From natural products to new synthetic small molecules: A Journey through the World of Xanthenes. **Molecules**, v.26, p.1-43, 2021.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, HL.; MARCHAND, C. DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. **Chemistry & Biology**, v. 17, p. 421- 433, 2010.

PORTELA, C.; AFONSO, C.M.M.; PINTO, M.M.M.; RAMOS, M.J. Definition of an electronic profile of compounds with inhibitory activity against hemozoin aggregation in malaria parasite. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3313- 3321, 2004.

REECE, J.B.; URRY, L.A.; CAIN, M.L.; WASSERMAN, S.A.; MINORSKY, P.V.; JACKSON, R.B. **Biologia de Campbell**. 10^a. ed., Artmed, 2015.

RICE, L.B. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 87, p. 198- 208, 2012.

ROLINSON, G. N. 6-APA and the development of the p-lactam antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 5, p.7-14, 1979.

RUBIN, R.P. A Brief History of Great Discoveries in Pharmacology: In Celebration of the Centennial Anniversary of the Founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **Pharmacological reviews**, v. 59, p. 289–359, 2007

SANTOS, F.A. **Quimiometria aplicada à metabolômica de *Aldama* La Llave: contribuições quimiotaconômicas e fitoquímica direcionada baseada em inibição de ciclooxigenase-1 e 5- lipoxigenase**. Dissertação [mestrado em Ciências Farmacêuticas]- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

SANTOS, B.S.; SILVA, L.C.N.; SILVA, T.D.; RODRIGUES, J.F.S.; GRISOTTO, M.A.G.; CORREIA, M.T.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SILVA, M.V.; PAIVA, P.M.G. Aplicação de tecnologias Omics para avaliação de mecanismo de ação antibacteriana de produtos derivados de plantas. **Frontier in Microbiology**, v.7, p. 01-13, 2016.

SANTOS, D. V. D. A.; OLIVEIRA, G.A.; PACHECO, L.G.; FARIA, L.M.O.; CUNHA, J.C.; MELLO, T.M. Antibióticos através da abordagem do mecanismo de resistência bacteriana. **Ciência Atual**, v. 11, p. 02-14, 2018.

SCHELLI, K.; ZHONG, F.; ZHU, J. Comparative metabolomics revealing *Staphylococcus aureus* metabolic response to different antibiotics. **Microbial Biotechnology**, v. 10, p. 1764- 1774, 2017.

SCHNEEWIND, O.; FOWLER, A.; FAULL, K.F. Structure of the Cell Wall Anchor of Surface Proteins in *Staphylococcus aureus*. **SCIENCE**, v. 268, p.103-106, 1995.

SERRA-BURRIEL, M.; KEYS, M.; CAMPILLO-ARTERO, C.; AGODI, A.; BARCHITTA, M.; GIKAS, A.; PALOS, C.; LÓPEZ-CASASNOVAS, G. Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: systematic review and meta-analysis. **Public Library of Science**, v.15, p.1-14, 2020.

SHAGUFTA, I. A. Recent insight into the biological activities of synthetic xanthone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 116, p. 267- 280, 2016.

SHAKIL, S.; KHAN, R.; ZARRILLI, R.; KHAN, A.U. Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. **Journal of Biomedical Science**, v. 15, p. 5-14, 2008.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, C.; SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844- 855, 2006.

SOBOLEV, A.P.; BROSIO, E.; GIANFERRI, R.; SEGRE, A.L. Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR Spectra. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 625- 638, 2005.

SIQUEIRA- BATISTA, R.; GOMES, A. P. **Antimicrobianos – Guia Prático**. 2ª. ed., Rubio, 2010.

SOMERVILLE, G. A.; SAÏD-SALIM, B.; WICKMAN, J.M.; RAFFEL, S.J.; KREISWIRTH, B.N.; MUSSER, J.M. Correlation of Acetate Catabolism and Growth Yield in *Staphylococcus aureus*: Implications for Host-Pathogen Interactions. **Infection and immunity**, v. 71, p. 4724- 4732, 2003.

STANNEK, L.; THIELE, M.J.; ISCHEBECK, T.; GUNKA, K.; HAMMER, E.; VÖLKER, U.; COMMICHAU, F.M. Evidence for synergistic control of glutamate biosynthesis by glutamate dehydrogenases and glutamate in *Bacillus subtilis*. **Environmental Microbiology**, v. 17, p. 3379- 3390, 2015.

TIAN, J.S.; SHI, B.Y.; XIANG, H.; GAO, S.; QIN, X.M.; DU, G.H. ¹H-NMR-Based Metabonomic Studies on the Anti-Depressant Effect of Genipin in the Chronic Unpredictable Mild Stress Rat Model. **Plos one**, v. 8, p. 1- 11, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a. ed. [S.l.]: Artmed, 2012.

TREMAROLI, V.; WORKENTINE, M.L.; WELJIE, A.M.; VOGEL, H.J.; CERI, H.; VITI, C.; TATTI, E.; ZHANG, P.; HYNES, A.P.; TURNER, R.J.; ZANNONI, D. Metabolomic Investigation of the Bacterial Response to a Metal Challenge. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, p. 719- 728, 2009.

TROTT, O.; OLSON, A. J., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v.31, p. 455-61. 2010.

VERBEECK, N.; CAPRIOLI, R.M.; PLAS, R.V. Unsupervised machine learning for exploratory data analysis in imaging mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v.39, p. 245-291, 2020.

VINCENT, I.M.; EHMANN, D.E.; MILLS, S.D.; PERROS, M.; BARRETT, M.P. Untarget metabolomics to ascertain antibiotic modes of action. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 25, p. 2281- 2291, 2016.

WANG, Z.; GAO, K.; XU, C.; GAO, J.; YAN, Y.; WANG, Y.; LI, Z.; CHEN, J. Metabolic effects of *Hedyotis diffusa* on rats bearing Walker 256 tumor revealed by NMR-based metabolomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 56, p.5–17, 2018.

WHO. World Health Organization. *Antibiotic Resistance*. World Health Organization, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>>. Acesso em: 19 jan 2020.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, p. 92- 107, 2013.

ZHANG, B.; XIE, M.; BRUSCWEILER- LI, L.; BINGOL, K.; BRÜSCWEILER, R. Use of Charged Nanoparticles in NMR-Based Metabolomics for Spectral Simplification and Improved Metabolite Identification. **American Chemical Society**, v. 87, p. 7211- 7217, 2015.

ZHANG, B.; POWERS, R. Analysis of bacterial biofilms using NMR-based metabolomics. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 1273- 1306, 2012.

ZHOU, H.; CHEN, N.; SHI, M.; XIAN, M.; SONG, Y.; LIU, J. The metabolism and biotechnological application of betaine in microorganism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 3865- 3876, 2016.

Anexos

Figura A1. Espectro de RMN de ^1H da liquexantona (**1**) (CDCl_3)

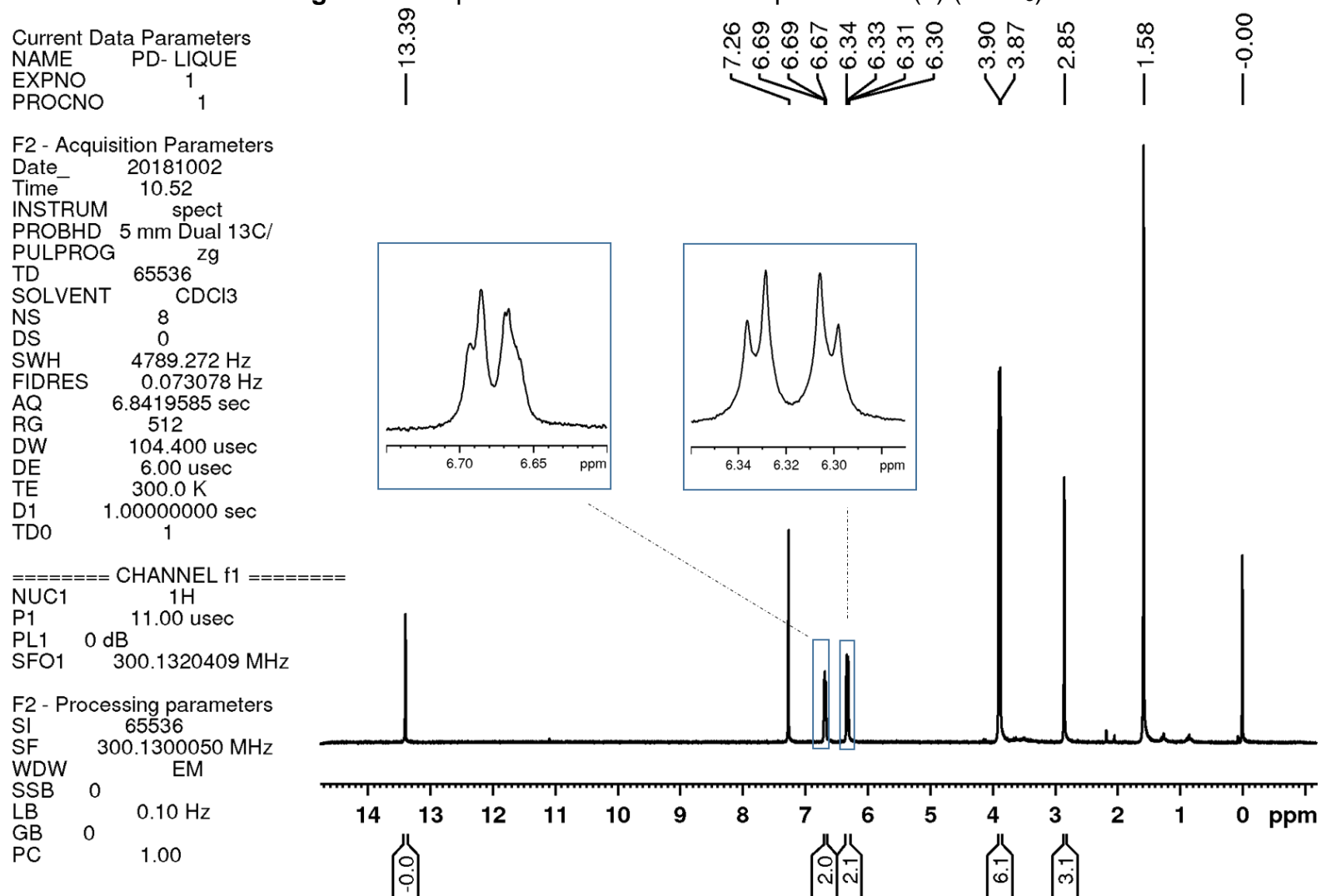


Figura A2. Espectro de RMN de ^1H da norliquexantona (**2**) (DMSO-d₆)

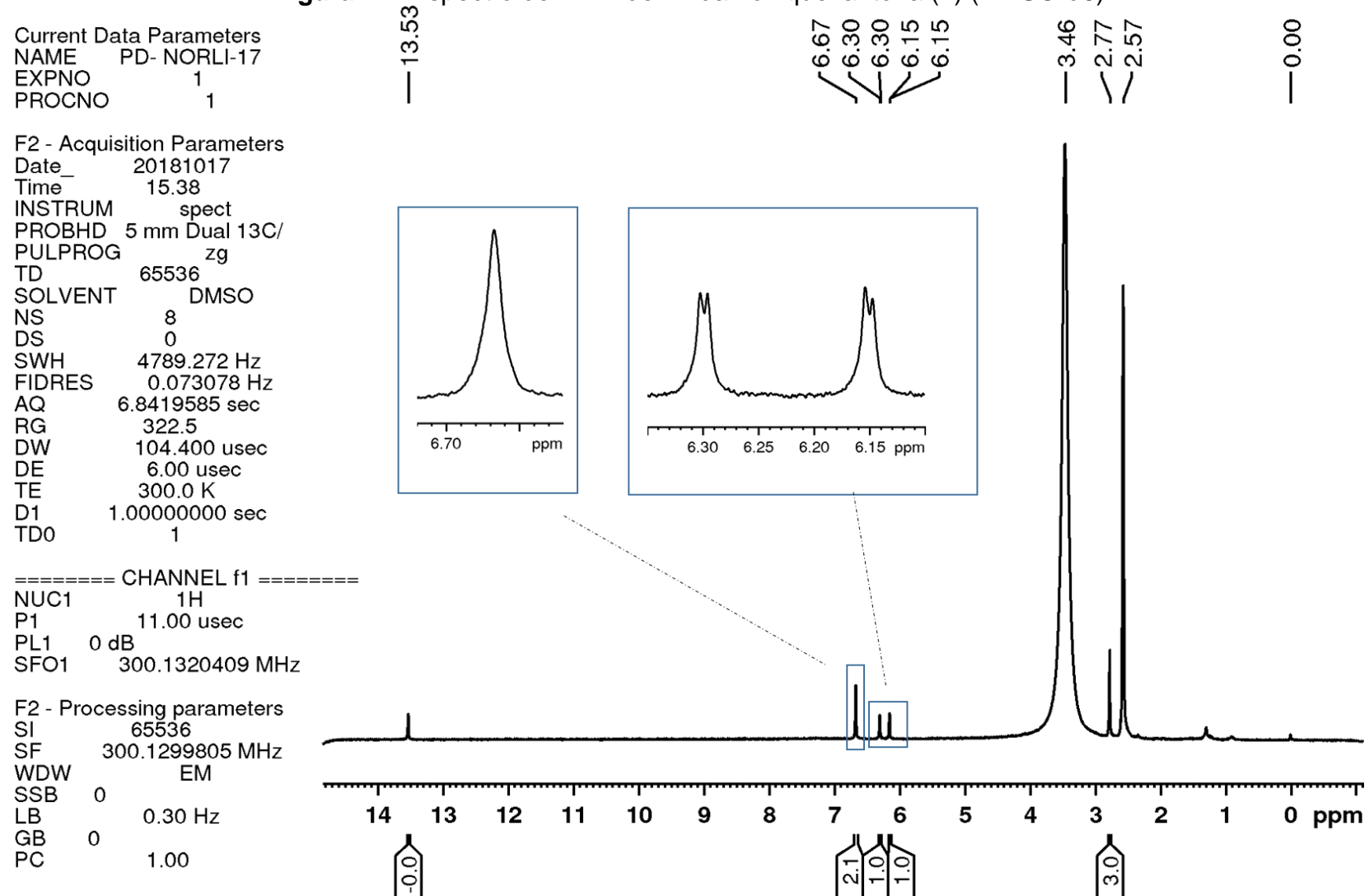


Figura A3. Espectro de RMN de ^1H da substância **3** (CDCl_3)

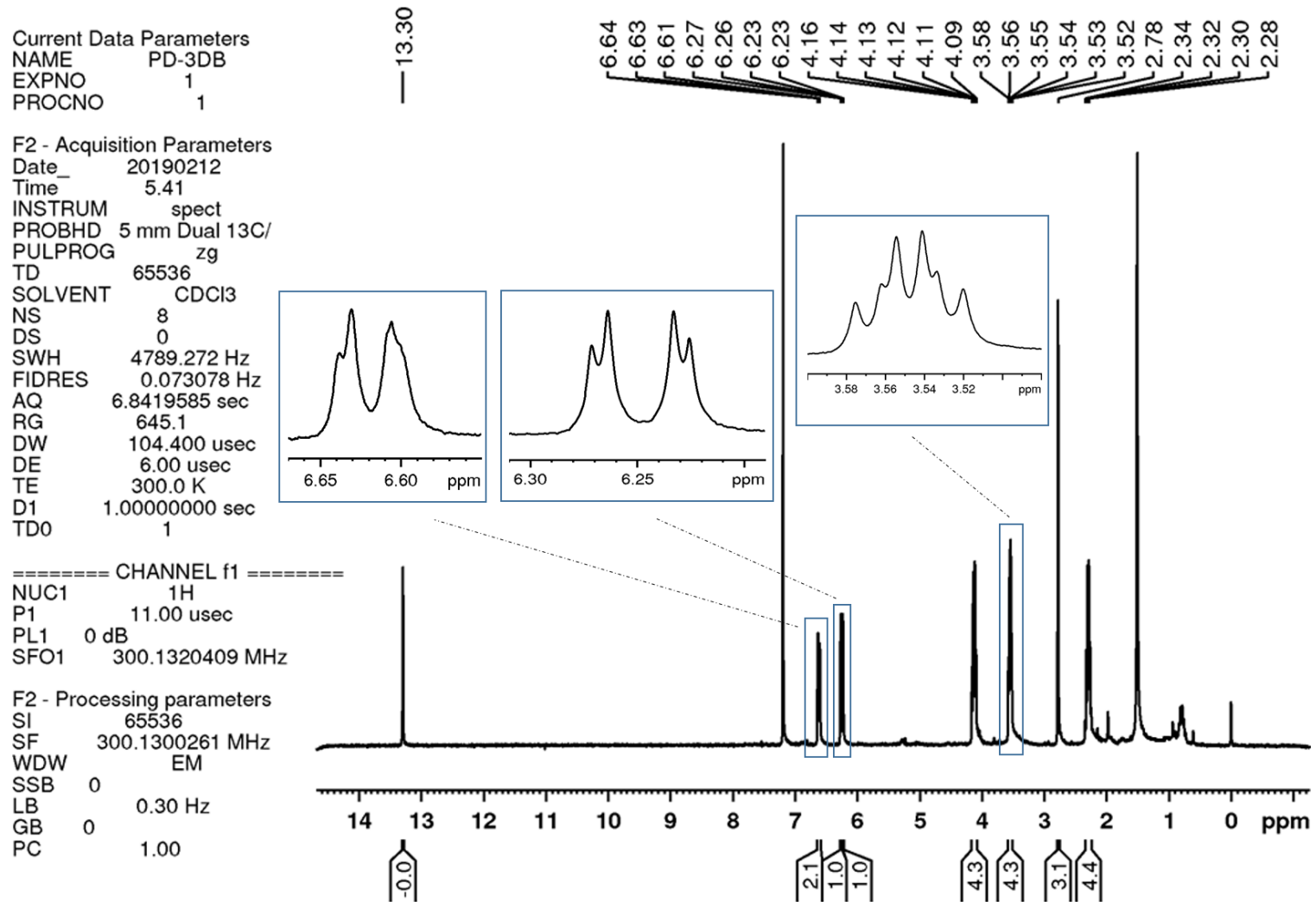


Figura A4. Espectro de RMN de ^1H da substância **4** (CDCl_3)

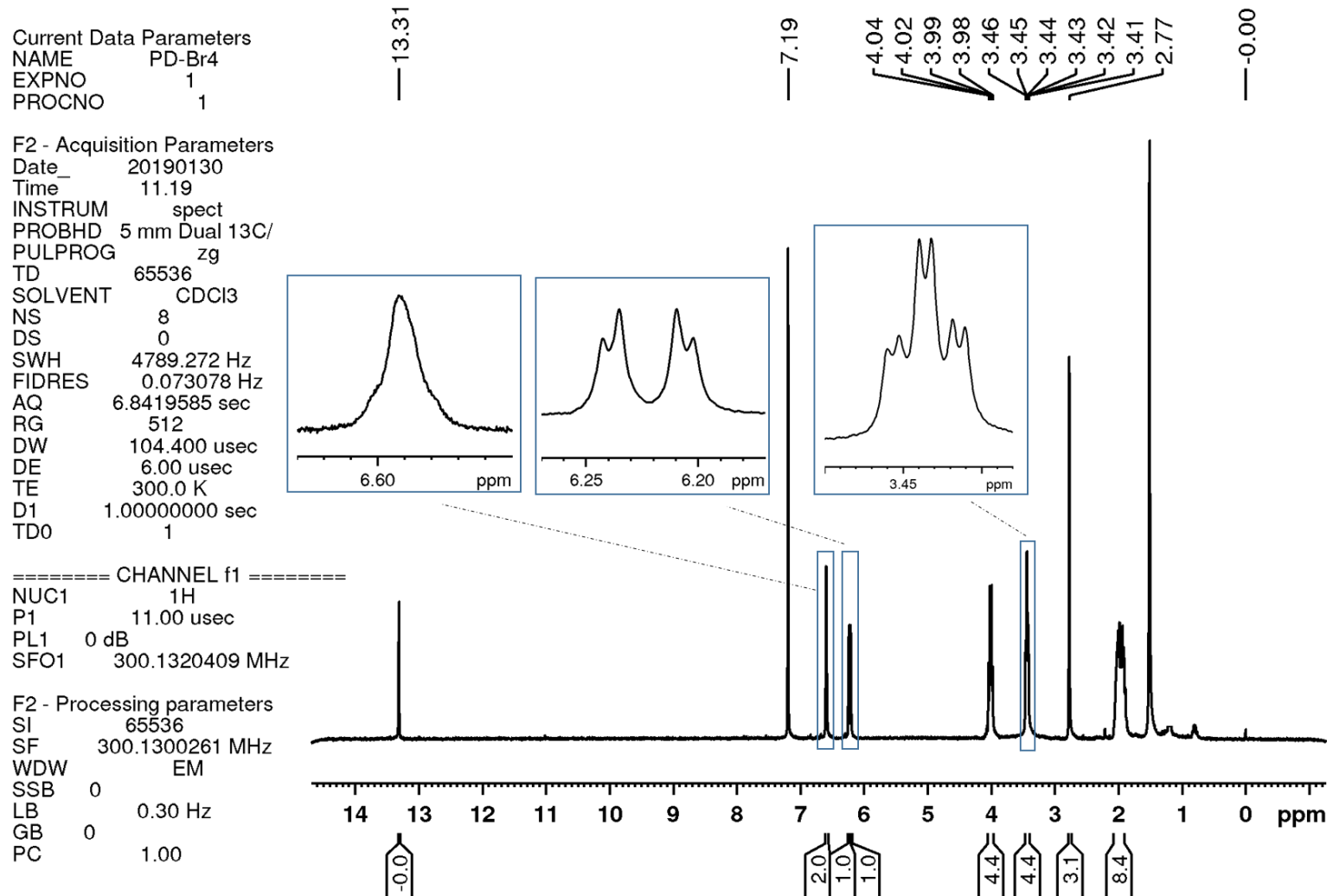


Figura A5. Espectro de RMN de ^1H da substância **5** (CDCl_3)

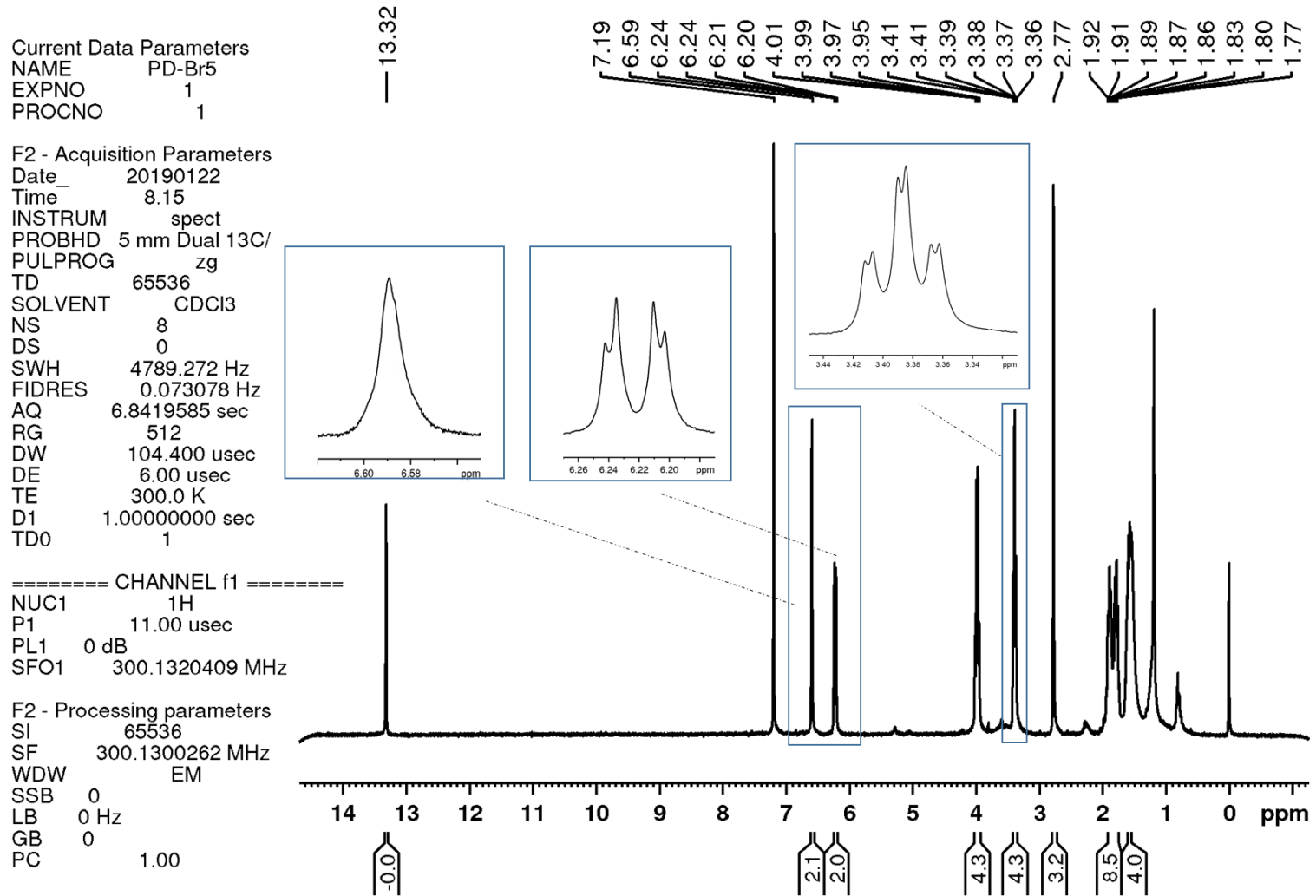


Figura A6. Espectro de RMN de ^1H da substância **S6** (MeOD- d_4)

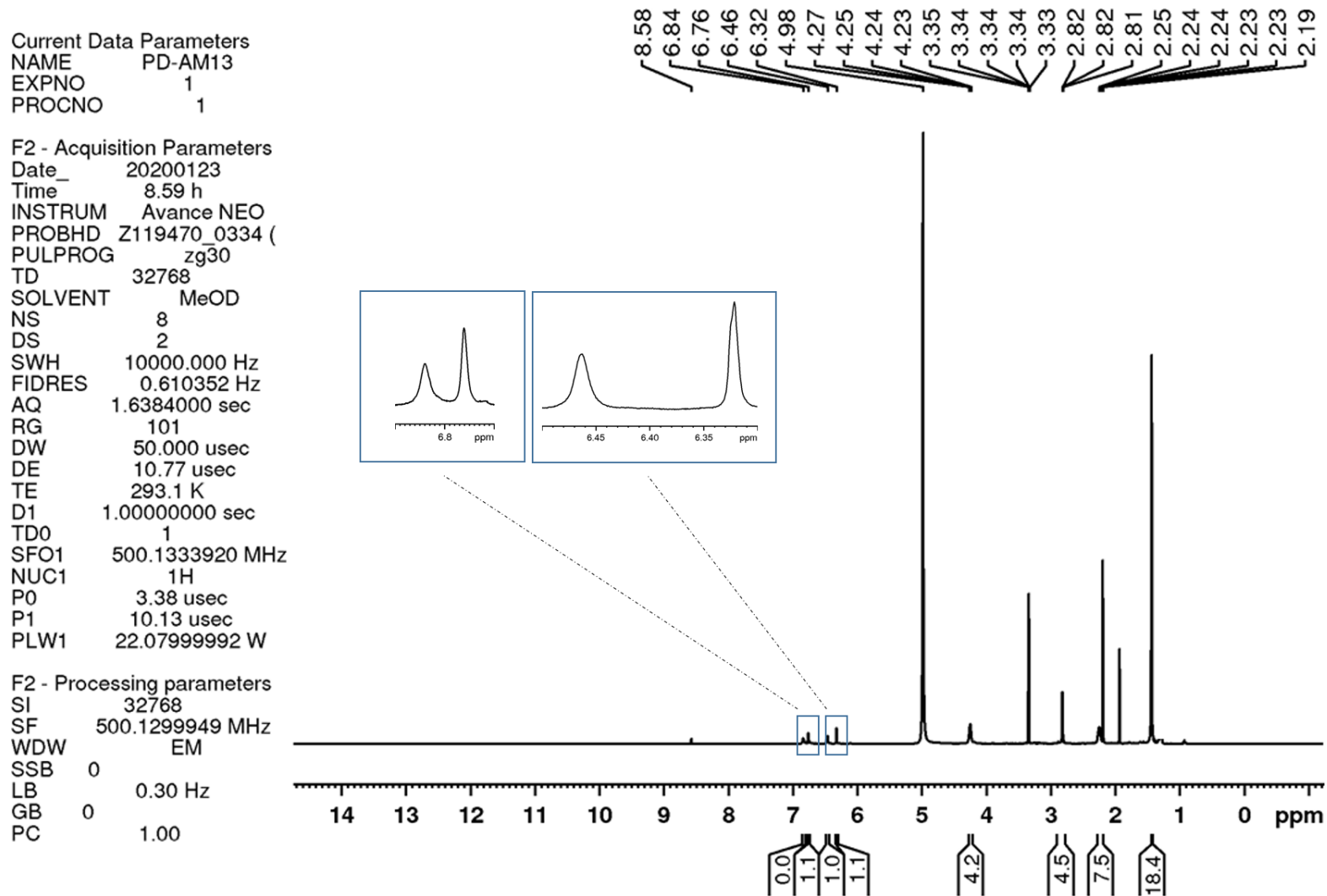


Figura A7. Espectro de RMN de ^1H da substância **S7** (MeOD- d_4)

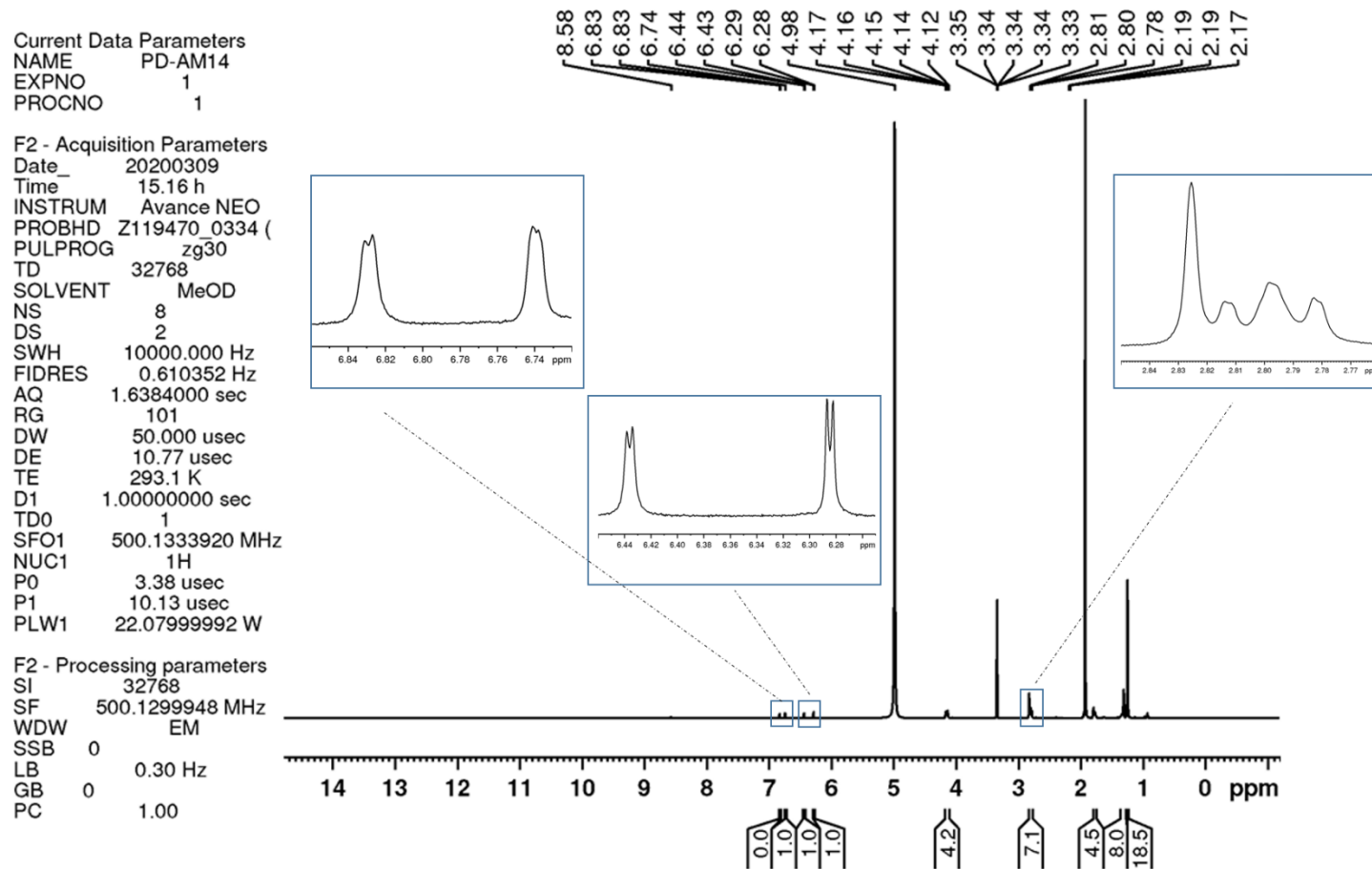


Figura A8. Espectro de RMN de ^1H da substância **S8** (CDCl_3)

Current Data Parameters
 NAME PD-AM15-PIPE
 EXPNO 11
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20200518
 Time_ 16.34 h
 INSTRUM Avance NEO
 PROBHD Z119470_0334 (
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl_3
 NS 8
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.610352 Hz
 AQ 1.6384000 sec
 RG 101
 DW 50.000 usec
 DE 10.77 usec
 TE 293.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1
 SFO1 500.1333920 MHz
 NUC1 ^1H
 P0 3.38 usec
 P1 10.13 usec
 PLW1 22.07999992 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 500.1300091 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

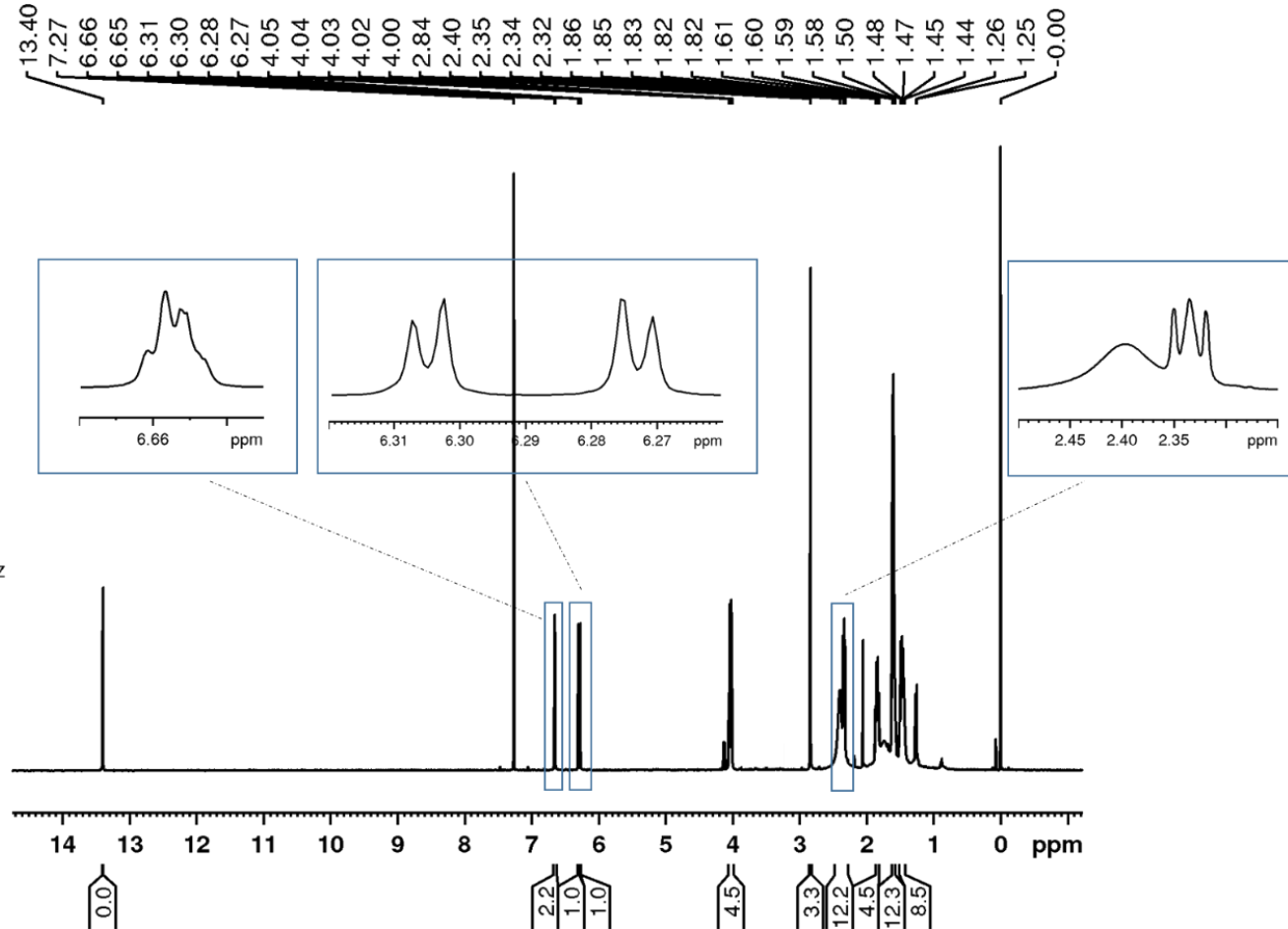


Figura A9. Gráfico de *loadings* de PLS-DA da cultura de *S. aureus* sem e após tratamento com ampicilina e tetraciclina (**Fig. 25a**)

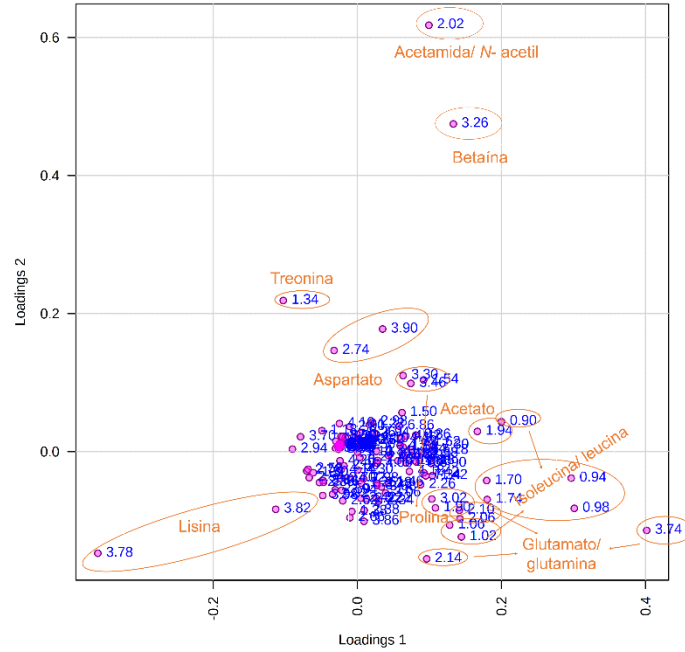


Figura A10. Gráfico de *loadings* de PLS-DA da cultura de *S. aureus* sem e após tratamento com ampicilina e canamicina (**Fig. 25b**)

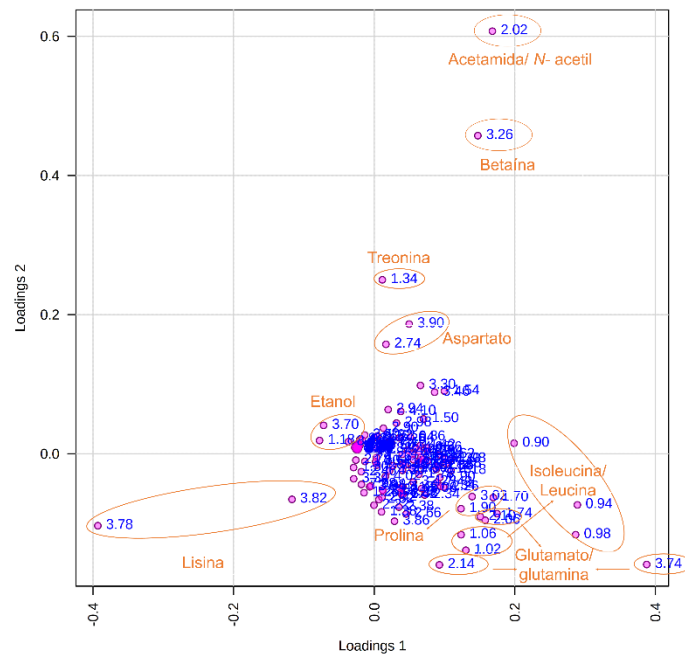


Figura A11. Gráfico de *loadings* de PLS-DA da cultura de *S. aureus* sem e após tratamento com ampicilina e ciprofloxacina (**Fig. 25c**)

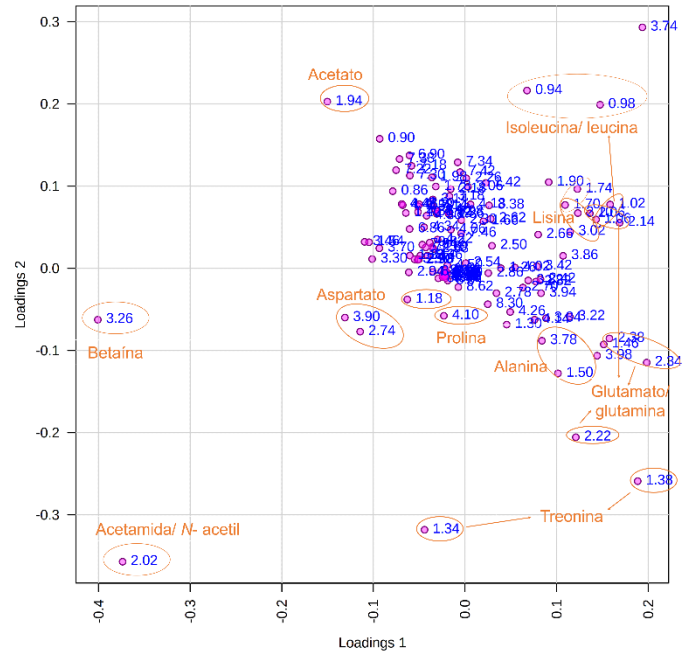


Figura A12. Gráfico de *loadings* de PLS-DA da cultura de *S. aureus* sem e após tratamento com canamicina e tetraciclina (**Fig. 25d**)

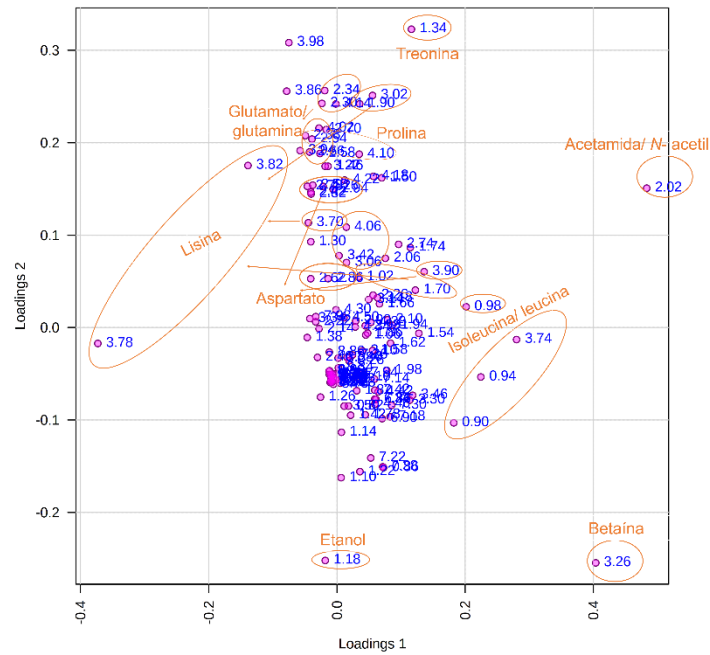


Figura A13. Gráfico de loadings de PLS-DA da cultura de *S. aureus* sem e após tratamento com ciprofloxacina e tetraciclina (**Fig. 25e**)

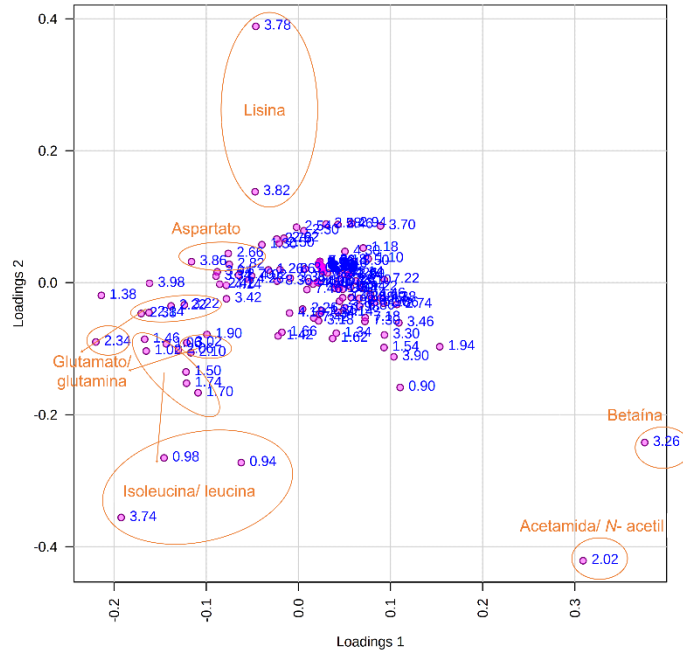


Figura A14. Gráfico de loadings de PLS-DA da cultura de *S. aureus* sem e após tratamento com canamicina e ciprofloxacina (**Fig. 25f**)

