



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Síntese de biguanidas e avaliação da sua
atividade biológica em linhas de células
tumoriais**

Mafalda Nunes Valério de Azevedo Gomes

Orientador: Prof. Doutor António Teixeira

Co-orientadora: Prof. Doutora Ana Rodrigues Costa

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2016



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Síntese de biguanidas e avaliação da sua
atividade biológica em linhas celulares
tumoriais**

Mafalda Nunes Valério de Azevedo Gomes

Orientador: Prof. Doutor António Teixeira

Co-orientadora: Prof. Doutora Ana Rodrigues Costa

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2016

“Uma pessoa que nunca cometeu um erro, nunca tentou algo novo”

Albert Einstein

“Façam o favor de ser felizes”

Raul Solnado

Dedicado a todos aqueles que nos deixam antes de tempo.

Especialmente à minha mãe.

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus orientadores, Prof. Dr. António Teixeira e Prof. Dra. Ana Costa, por terem aceite orientar este trabalho e pela paciência, disponibilidade e apoio prestado.

Gostava, também, de agradecer à Prof. Dra. Célia Antunes pela disponibilidade e apoio, bem como aos meus colegas, que ajudaram a realização deste trabalho.

Correndo o risco de ser, vulgar, agradeço aos meus pais, porque sem eles não estaria aqui.

Gostava de agradecer pessoalmente a todas as pessoas, mas infelizmente o espaço é curto, portanto vou apenas enumerar as mais importantes.

Ao meu pai que, todos estes anos, sempre me apoiou em todas as decisões que eu tomei. Por seres pai e mãe ao mesmo tempo e teres estado lá para mim, não há obrigados que cheguem para agradecer tudo.

Aos meus avós e tios, e mais recentemente, à minha pipoca mais nova, que estão sempre presentes para o que for preciso.

Às minhas meninas, Marta Ramos, Ana Catarina Jorge e Teresa Morgado, por todos os cafés, sermões, risos, amizade e, basicamente, fazerem parte da minha vida.

Às minhas meninas de Lisboa, Isabel Brito, Rita Tomaz, Isabel Alves, Nina Névoa e Margarida Alves, obrigada por toda a amizade, apesar de estarmos a 130km de distância.

Às primeiras pessoas que eu conheci nesta Universidade fantástica, Catarina Lopes, Margarida Ferreira e Joana Bastos, obrigada por serem quem são.

À minha afilhada e amiga, Isabela, por não me ter parado de chatear e sempre preocupada, com este meu “bebé” e por me ter escolhido.

Ao meu “mano”, Tomás Terras, que me aturou nos bons e maus momentos e que sei que esteve e vai estar sempre lá para mim.

Ao meu padrinho, David, por toda a amizade e apoio.

À minha tia que me deu guarida nestes cinco anos que passei nesta cidade maravilhosa.

A todos os que fizeram parte do meu percurso acadêmico e que me ajudaram a crescer como pessoa.

E por último, mas nunca menos importante, ao meu namorado, Filipe Pereira, que sempre teve uma paciência de santo, quando eu estava de mau humor. Aquele que nunca me vai deixar cair e apoia todas as minhas escolhas. MUITO OBRIGADA!!

Índice

Agradecimentos.....	i
Índice.....	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	viii
Siglas e Abreviaturas.....	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução.....	1
1.1 Biguanidas.....	1
1.1.1. Estrutura e principais vias de síntese das biguanidas.....	3
1.1.2. Propriedades químicas das biguanidas	5
1.1.3. Ação biológica	5
1.1.3.1. Ação hipoglicemiante	8
1.1.3.2. Ação anti-proliferativa	9
1.2. Métodos de avaliação da ação anti-proliferativa	11
1.2.1. Método de exclusão do azul de tripano e contagem em câmara de Neubauer.....	12
1.2.2. Método de avaliação da atividade de desidrogenases.....	14
1.2.3. Quantificação de ATP por luminescência	15
1.2.4. Quantificação da atividade enzimática Lactato desidrogenase	15
1.2.5. Atividade ATPásica celular	16
1.3. Modelo biológico utilizado.....	17
1.3.1. Células BRIN-BD11	17
1.3.2. Células MDST8	18
1.3.3. Células MCF7.....	18
2. Problemática.....	20
3. Objetivos.....	21
4. Materiais e Métodos	22
4.1. Síntese de Biguanidas.....	22
4.1.1. Síntese de cloridrato do ácido (S)-2-(3-(diaminometileno)guanidino)-pentanodióico (MG1)	22

4.1.2.	Síntese de cloridrato do ácido (S)-2-[3-(diaminometileno)guanidino]-3-(1H-imidazol-4-il)propanóico (MG14)	23
4.1.3.	Síntese de cloridrato do ácido (S)-2-[3-(diaminometileno)guanidino]-5-guanidinopentanóico (MG2)	24
4.1.4.	Síntese de cloridrato de N-(piperidin-1-il)biguanida (MG7)	25
4.1.5.	Síntese de cloridrato de N-(4-nitrofenil)biguanida (MG8)	26
4.1.6.	Tentativa de síntese de cloridrato de N-(2,4-dinitrofenil)biguanida (MG9)..	27
4.1.7.	Síntese de cloridrato de N-(4-cianofenil)biguanida (MG6).....	27
4.1.8.	Síntese de cloridrato de N-(2,4-dibromofenil)biguanida (MG5)	28
4.1.9.	Síntese de cloridrato do ácido 2-[3-(diaminometileno)guanidino]etanossulfónico (MG10)	29
4.1.10.	Síntese de cloridrato do ácido 7-[3-(diaminometileno)guanidino]naftaleno-1,3-dissulfónico (MG11)	29
4.1.11.	Tentativa de síntese de cloridrato do ácido 4-[3-(diaminometileno)guanidino]-1-hidroxibutano-1,1-diil]difosfónico (MG13)	30
4.2.	Modelo biológico utilizado	31
4.2.1.	Preparação dos meios de cultura	31
4.3.	Cultura de linhas celulares.....	32
4.3.1.	Contagem celular pelo método de exclusão do azul de tripano com contagem em câmara de Neubauer.....	32
4.4.	Avaliação do efeito anti-proliferativo de compostos sintetizados.....	33
4.4.1.	Esquema do ensaio	33
4.4.2.	Preparação de soluções dos compostos sintetizados.....	33
4.4.3.	Curva de calibração para as células	34
4.4.4.	Avaliação da atividade enzimática de calibração para as células	34
4.5.	Análise estatística.....	35
5.	Resultados e discussão	36
5.1.	Síntese de novos compostos derivados das biguanidas.....	36
5.2.	Otimização da utilização da atividade enzimática ATPásica para quantificação celular	38
5.2.1.	Estudo em BRIN-BD11	39
5.2.2.	Estudo em MDST8	43
5.2.3.	Estudo em MCF7.....	47
5.2.4.	Considerações gerais	50
5.3.	Estudo do efeito anti-proliferativo dos compostos.....	51
5.3.1.	Estudo em MDST8.....	51

5.3.1.1.	LF5	51
5.3.1.2.	LF7	52
5.3.1.3.	LF10.1.....	52
5.3.1.4.	LF12.....	53
5.3.1.5.	LF17.....	54
5.3.1.6.	LF19.....	55
5.3.1.7.	MG1.2.....	55
5.3.1.8.	MG7	56
5.3.2.	Considerações finais.....	57
6.	Conclusões.....	59
	Referências Bibliográficas	61
	Anexo I	i
	A. Equipamento.....	i
	B. Consumíveis	i
	C. Reagentes	i
	Anexo II	iii
	A. Parâmetros estatísticos.....	iii

Índice de Figuras

Figura 1 - Galega officinalis (“Medicinal Plants,” n.d.)	1
Figura 2 - Estruturas químicas das guanidinas (A), da fenformina (B), da buformina (C) e da metformina (D)	2
Figura 3 - Jean Sterne (1909–1997) (adaptado de Marita & Patade, 2014)	2
Figura 4 – Estruturas de biguanidas	3
Figura 5 – Tautómeros de biguanidas.....	4
Figura 6 – Esquema geral de síntese de biguanidas.....	4
Figura 7 – Síntese alternativa de biguanidas	5
Figura 8 – Estrutura de proguanil.....	6
Figura 9 – Estrutura das biguanidas substituídas com o grupo fenilo substituído, na posição 1	6
Figura 10 – Estrutura de biguanida com atividade antibacteriana	7
Figura 11 – Estrutura de biguanidas poliméricas, em que A é PHBGC e B é PHBGS ..	7
Figura 12 – Esquema dos modos ação da metformina (adaptado de Duque et al., 2010).	10
Figura 13 – Curva de crescimento celular padrão de células normais (adaptado de Alves & Guimarães, 2007).....	11
Figura 14 – Câmara de Neubauer.....	12
Figura 15 - Fotografia microscópica da câmara de Neubauer	13
Figura 16 - Estrutura de WST-8 e WST-8 formazano (adaptado de Sigma, 2006).....	14
Figura 17 – Fotomicrografia de uma cultura de células BRIN-BD11, com a ampliação de 40x (England, n.d.)	17
Figura 18 - Fotomicrografia de uma cultura de células MDST8, obtidas em observação ao microscópio invertido Olympus, modelo BX41 (ampliação 100x)	18
Figura 19 - Fotomicrografia de uma cultura de células MCF7, obtidas em observação ao microscópio invertido Olympus, modelo BX41 (ampliação 100x)	19
Figura 20 – Síntese do composto MG1.....	22
Figura 21 – Estrutura do composto MG1	23
Figura 22 - Síntese do composto MG14.....	23
Figura 23 – Estrutura do composto MG14	24
Figura 24 - Síntese do composto MG2	24
Figura 25 - Síntese do composto MG7	25
Figura 26 – Estrutura do composto MG7	25
Figura 27 - Síntese do composto MG8	26

Figura 28 – Estrutura do composto MG8	26
Figura 29 - Síntese do composto MG9	27
Figura 30 - Síntese do composto MG6	27
Figura 31 – Estrutura do composto MG6	28
Figura 32 - Síntese do composto MG5	28
Figura 33 - Síntese do composto MG10.....	29
Figura 34 - Síntese do composto MG11.....	29
Figura 35 – Estrutura do composto MG11	30
Figura 36 - Síntese do composto MG13.....	30
Figura 37 – Esquema geral do ensaio para o estudo anti-proliferativo	33
Figura 38 – Esquema geral de síntese de biguanidas com aminoácidos	36
Figura 39 – Esquema geral de síntese de biguanidas com anéis aromáticos	37
Figura 40 – Outras biguanidas utilizadas	38
Figura 41 – Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular BRIN-BD11, pelo método das desidrogenases.....	39
Figura 42 - Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular BRIN-BD11, pelo método das ATPases.	40
Figura 43 - Viabilidade celular dos controlos relativa ao número de células, para a linha celular BRIN-BD11, pelos métodos das desidrogenases e das ATPases.	40
Figura 44 – Gráficos dose-resposta para o 5-FU, em que A representa o gráfico dose-resposta para o método das desidrogenases e B para o método das ATPases.....	42
Figura 45 – Gráficos dose-resposta para a Met, em que A representa o gráfico dose-resposta para o método das desidrogenases e B para o método das ATPases.....	42
Figura 46 – Correlação relativa à absorvância aferida indiretamente (A) e relativa ao número de células (B), para a linha celular BRIN-BD11.....	43
Figura 47 – Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular MDST8, pelo método das desidrogenases.	44
Figura 48 - Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular MDST8, pelo método das ATPases.	45
Figura 49 – Viabilidade celular dos controlos relativa ao número de células, para a linha celular MDST8, pelos métodos das desidrogenases e das ATPases.....	45
Figura 50 – Correlação relativa ao número de células, para a linha celular MDST8. ..	47
Figura 51 – Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular MCF7, pelo método das desidrogenases.....	47
Figura 52 - Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular MCF7, pelo método das ATPases.	48

Figura 53 – Viabilidade celular dos controlos relativa ao número de células, para a linha celular MCF7, pelo método das desidrogenases e das ATPases.....	49
Figura 54 – Correlação relativa à absorvância aferida indiretamente (A) e relativa ao número de células (B), para a linha celular MCF7.	50
Figura 55 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF5.	51
Figura 56 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF7.	52
Figura 57 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF10.1.	53
Figura 58 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF12.	53
Figura 59 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF17.	54
Figura 60 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF19.	55
Figura 61 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto MG1.2.....	56
Figura 62 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto MG7.....	57

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Tabela resumo dos valores de IC50 dos compostos em estudo.....	58
---	----

Siglas e Abreviaturas

5-FU	5-Fluoruracilo
ABS	Absorvância
Act. Enz	Atividade Enzimática
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ATP	Adenosina Trifosfato
CCK8	<i>Cell Counting Kit 8</i>
DC	Dicianodiamida
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(2-aminoéter)tetra-acético
EMEM	<i>Eagle Minimum Essential Medium</i>
Epm	Erro Padrão da Média
ER	Recetor de estrogénio
FBS	Soro de bovino fetal
FMS	Metasulfato de fenazina
GLUT2	Transportador de glucose 2
IC50	Inibição celular em 50%
ILF	Fator de crescimento semelhante à insulina
LDH	Lactato desidrogenase
Met	Metformina
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
P53	Proteína citoplasmática
PBS	Tampão de fosfato salino
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TCA	Ácido tricloroacético

TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

Resumo

Síntese de biguanidas e avaliação da sua atividade biológica em linhas de células tumorais

As biguanidas são um grupo de compostos com diversas atividades biológicas. Recentemente, esta família de compostos tem sido estudada não só pela sua atividade hipoglicemiante, mas também pela sua atividade anti-proliferativa.

Um dos objetivos deste estudo foi a síntese de biguanidas, com cadeias laterais com diferentes estruturas e grupos funcionais. O trabalho desenvolvido permitiu a síntese de diversas biguanidas, tendo sido isolados quatro compostos.

Outro dos objetivos deste estudo foi avaliar a atividade anti-proliferativa de biguanidas, na linha celular MDST8. Para esse efeito, foi desenvolvido inicialmente um método de quantificação celular com base na atividade ATPásica, testado nas linhas celulares MDST8, MCF7 e BRIN-BD11, tendo sido utilizado como referência a quantificação pelo método das desidrogenases.

Os compostos estudados com melhor atividade anti-proliferativa apresentaram IC50 da ordem de $2,5 - 2,9 \times 10^{-3}$ M. Estes valores foram observados em biguanidas cujos grupos substituintes possuíam cadeias hidrocarbonadas cíclicas, alifáticas ou aromáticas *p*-substituídas, na sua estrutura.

Palavras-chave: biguanidas, síntese, atividade biológica, atividade anti-proliferativa.

Abstract

Synthesis of biguanides and evaluation of their biologic activity in tumor cell lines

Biguanides are a group of compounds which have diverse biological activities. Recently, this family of compounds has been studied not only for its hypoglycemic activity, but also for its anti-proliferative activity.

One purpose of this study was the synthesis of biguanides, with side chains with different structures and functional groups. The work led to the synthesis of several biguanides, with the isolation of four compounds.

Another objective of this study was the evaluation of the anti-proliferative activity of biguanides, in the cell line MDST8. To this aim, it was initially developed a cell quantification method based on the ATPase activity, tested in MDST8, MCF7 and BRIN-BD11 cell lines, with the dehydrogenases method used as reference.

The studied compounds with better anti-proliferative activity had IC₅₀ in the range from 2.5 to 2.9 x10⁻³ M for biguanides whose substituent groups had cyclic hydrocarbon, aliphatic or *p*-substituted aromatic chains in their structure.

Keywords: biguanide, synthesis, biological activity, anti-proliferative activity.

1. Introdução

As biguanidas são um grupo de compostos com diversas atividades biológicas. A aplicação terapêutica mais conhecida das biguanidas é no tratamento da diabetes de tipo 2, embora possam apresentar ainda ação contra outras doenças, como a malária. Mais recentemente, as biguanidas têm ganho relevo pela sua potencial ação anti-tumoral (Anisimov, 2014; Lebel, Maris, Duval, & Wuest, 2005; Wang, Sauer, & Djuric, 2009).

1.1 Biguanidas

No início do séc. XX, a guanidina foi identificada como composto ativo de uma planta medicinal, *Galega officinalis*, mais conhecida como arruda caprária (Figura 1), frequentemente utilizada na Europa medieval no tratamento de poliúria nos pacientes diabéticos (Duque, López, & Cruz, 2010; Faure, 2011; Krentz & Bailey, 2005).



Figura 1 - Galega officinalis ("Medicinal Plants," n.d.)

Na segunda década do séc. XX, descobriram-se as biguanidas antidiabéticas. No entanto, com a descoberta da insulina em 1921, o seu estudo perdeu interesse

científico e só 30 anos mais tarde se sintetizaram as primeiras biguanidas com aplicações terapêuticas: 1-feniletilbiguanida ou fenformina (Figura 2 – B), 1-butilbiguanida cloro-hidratada ou buformina (Figura 2 – C) e *N,N*-dimetilbiguanida ou metformina (Figura 2 – D) (Anisimov, 2014; Nangia-Makker et al., 2014; Narise, Okuda, Enomoto, Hirayama, & Nagasawa, 2014).

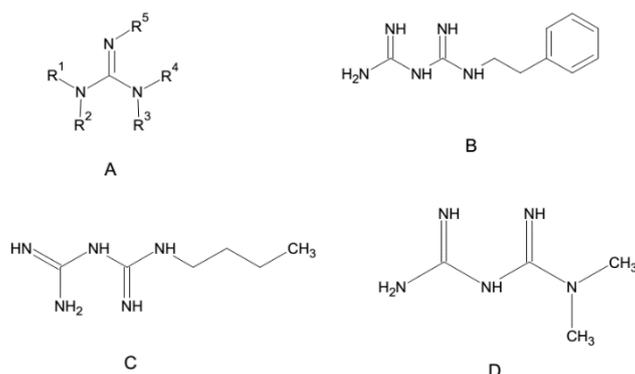


Figura 2 - Estruturas químicas das guanidinas (A), da fenformina (B), da buformina (C) e da metformina (D)

A metformina foi clinicamente desenvolvida em 1957 pelo médico francês Jean Sterne (Figura 3), que lhe deu o seu primeiro nome comercial, Glucophage ("captador de glucose") (Anisimov, 2014; Bailey & Day, 2004).

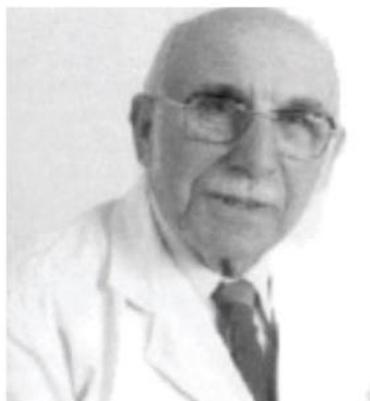


Figura 3 - Jean Sterne (1909–1997) (adaptado de Marita & Patade, 2014)

Em 1971, Dilman levantou a hipótese de que as biguanidas antidiabéticas poderiam ser ainda promissoras enquanto anti-cancerígenos (Anisimov, 2014). Em diversos estudos realizados a partir do meio de 1970, foi demonstrado que as biguanidas anti-diabéticas fenformina e buformina adiavam ou suprimiam o desenvolvimento de tumores espontâneos (Dil'man, Bershteïn, Zabezhinskiï, &

Aleksandrov, 1974). Essa hipótese foi também estudada por Kundu (1967), Lugaro (1968), Ghosh (1998) e Saczewski (2000).

Na década de 1960, a fenformina era bastante popular, no entanto foi retirada no início da década de 1970, uma vez que causava acidose láctica frequente e o conseqüentemente aumento da mortalidade por problemas cardíacos. A metformina, uma biguanida menos lipofílica, provou ser mais segura e suplantou a fenformina. Depois de 20 anos de uso na Europa, a metformina foi aprovada para uso nos EUA, em 1995. Em 2002, a metformina tornou-se disponível como medicamento, tornando-se um dos tratamentos mais acessível para a diabetes (Bailey & Day, 2004).

A funcionalidade das biguanidas tem sido encontrada em muitos produtos naturais e moléculas medicinalmente interessantes devido, principalmente, às suas propriedades biológicas (Wang et al., 2009).

1.1.1. Estrutura e principais vias de síntese das biguanidas

Na literatura, as estruturas de biguanidas continuam a ser descritas como mostrado na Figura 4- A, o que conduz a uma percepção enganadora. De acordo com estudos de análise cristalográfica de raios X, espectroscopia de RMN de azoto-15, modelação molecular e estabilidade dos tautómeros, confirma-se que as biguanidas devem ser representadas como na Figura 4 - B, onde há a presença da ponte de hidrogénio no azoto (Katritzky, Tala, & Singh, 2010).

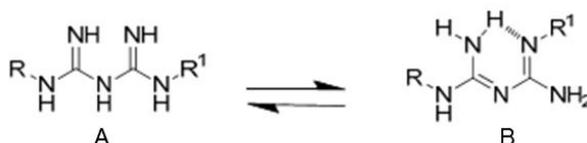


Figura 4 – Estruturas de biguanidas

Além da estrutura convencional, as biguanidas podem ocorrer sob a forma de tautómeros (Figura 5 - IA, IB e IC), devido à prototrofia. A estrutura I, por exemplo, fornece possibilidades de sete modificações diferentes por ressonância. Além disso, a molécula pode ainda ser modificada por ligação de hidrogénio, dando origem a

estruturas cíclicas, e outras biguanidas substituídas, que provavelmente, vão influenciar as suas propriedades químicas (Ray, 1961).

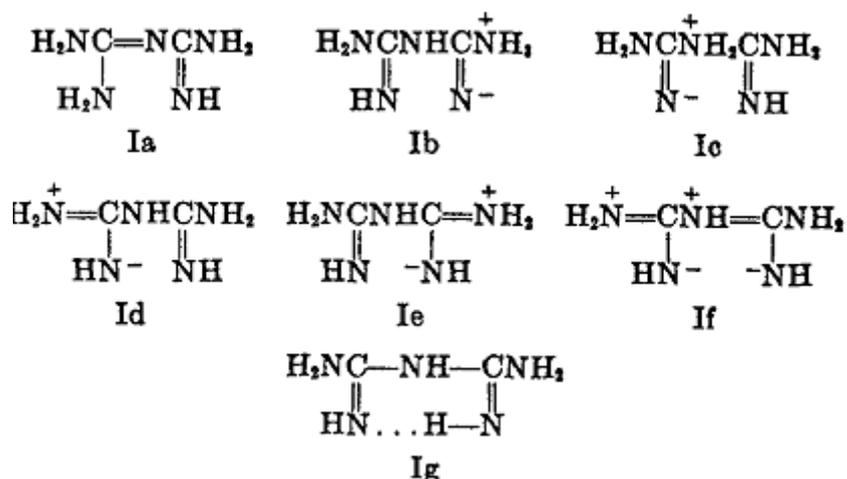


Figura 5 – Tautómeros de biguanidas

A síntese mais comumente utilizada para guanidinas substituídas é a reação de sais de aminas primárias com cianoguanidina (Figura 6) (Katritzky et al., 2010).

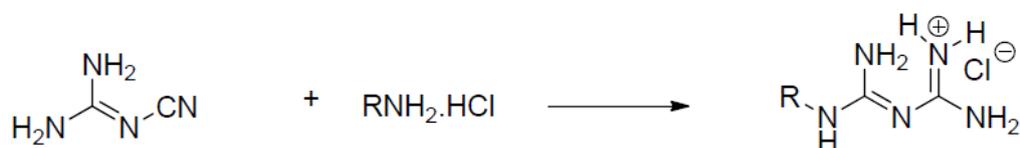


Figura 6 – Esquema geral de síntese de biguanidas

Neelakantan (Neelakantan, 1957) sintetizou as biguanidas 1,5-diarilo, utilizando um procedimento de um só recipiente, a partir de derivados de anilina e cianoguanidina a 100°C (Figura 6) (Katritzky et al., 2010).

Hechenbleikner descreveu outro método de síntese de biguanidas através do tratamento de dialquilcianamida (A) com cloreto de hidrogénio a 60°C e com aquecimento até 150°C, originando cloridratos de alquilguanilcloroformamidina (B). Esta reação com amónia aquosa ou aminas formou as biguanidas correspondentes a C (Figura 7) (Hechenbleikner & Donald W, 1955; Katritzky et al., 2010).

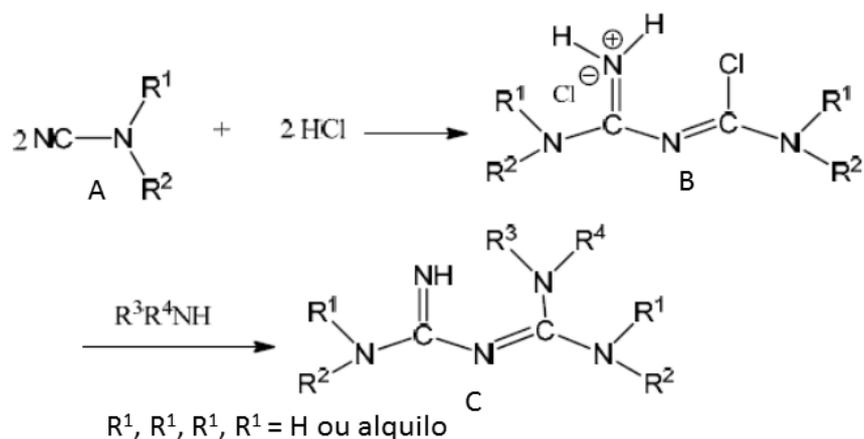


Figura 7 – Síntese alternativa de biguanidas

1.1.2. Propriedades químicas das biguanidas

As biguanidas são bases fortes ($\text{pK}_a > 11$) e, também, precursores valiosos para a síntese de uma ampla gama de compostos heterocíclicos (Lebel et al., 2005).

As aminotriazinas, são derivadas de uma classe de compostos heterocíclicos, as triazinas, contendo azoto, contudo, devido à sua síntese utilizando dicianodiamida (Chapman, 1933), têm um especial interesse entre os derivados heterocíclicos de biguanidas, uma vez que as aminotriazinas são elas próprias uma família extremamente útil de compostos (Lebel et al., 2005). Estes compostos são, por exemplo, amplamente usados em química supramolecular, uma vez que integram um padrão característico de múltiplos locais que podem doar ou aceitar pontes de hidrogénio, orientando deste modo o reconhecimento e associação molecular (Lebel et al., 2005).

1.1.3. Ação biológica

As biguanidas têm aplicação em várias áreas terapêuticas, com atividades anti-malária, antimicrobiana, antiviral, antisséptica, espasmolítica já descritas e, mais recentemente, tem ganho relevo a sua potencial ação anti-tumoral (Lebel et al., 2005; Marita & Patade, 2014; Wang et al., 2009).

A malária é uma doença infecciosa que causa enormes problemas de saúde pública. A doença é causada por parasitas protozoários do género *Plasmodium*. A biguanida, (*N*-(4-clorofenil)-*N'*-isopropilcarbamidoil)guanidina (proguanil - Figura 8) possui atividade anti-malárica, tendo sido utilizada com esta finalidade terapêutica (Katritzky et al., 2010; Marita & Patade, 2014).

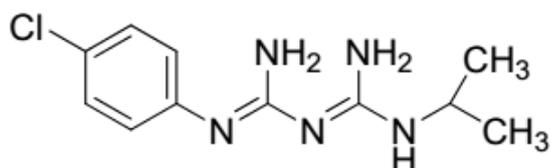
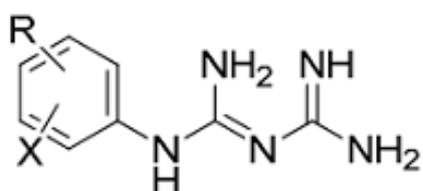


Figura 8 – Estrutura de proguanil

Diamond e o seu grupo de trabalho descobriram que biguanidas substituídas com o grupo fenilo no N1, (Figura 9) possuem ação espasmolítica e anti-secretora gástrica (Katritzky et al., 2010). Estes autores realizaram vários testes “in vivo” em modelos animais tendo em vista a possível aplicação posterior em humanos, nomeadamente em ratos Wistar e cães, para estudarem a ação fisiológica das biguanidas sintetizadas. Após estes estudos, as fenilbiguanidas 1-substituídas apresentaram uma atividade marcada, quer para o seu efeito espasmolítico quer para determinar a sua toxicidade. O procedimento utilizado foi descrito no artigo *Effect of Drugs on Gastric Emptying in Rats* de Brodie e Kundrats (1965) (Diamond, Douglas, & Burns, 1973).



R = grupo alquilo, X = halogéneo

Figura 9 – Estrutura das biguanidas substituídas com o grupo fenilo substituído, na posição 1

Tsubouchi, Ohguro, Yasumura, Ishikawa, & Kikuchi, em 1997, sintetizaram biguanidas 1,5-dissubstituídas (Figura 10), em que a atividade bactericida dos derivados de 3,4-diclorobenzilo foi elevada (Katritzky et al., 2010). Para esta conclusão, Tsubouchi

et al. realizaram vários testes em microplacas, utilizando várias estirpes de bactérias, tanto estirpes Gram + como Gram -, e os diferentes compostos sintetizados (Tsubouchi et al., 1997).

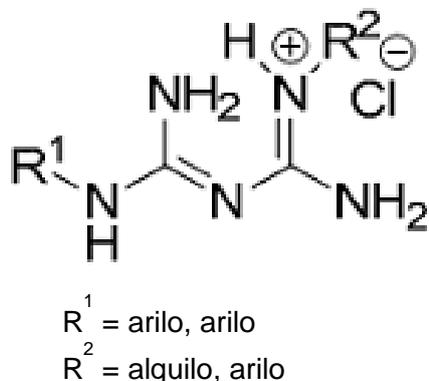


Figura 10 – Estrutura de biguanida com atividade antibacteriana

Zhang (Zhang, Jiang, & Chen, 1999) sintetizou o cloridrato de poli-hexametilenobiguanidina solúvel em água (PHBGC) e o estearato de poli-hexametileno biguanida lipofílico (PHBGS) (Figura 11), e testou a sua atividade antimicrobiana. Esses testes mostraram que as biguanidas poliméricas são eficazes no controle de bactérias e fungos (Katritzky et al., 2010). Zhang utilizou como agentes microbiológicos as seguintes estirpes: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Diplococci pneumoniae*, *Escherchia coli*, *Pseudomonas aeruginose*, *Rhizopus niger*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cervisiae* e *Candida albicans* (Zhang et al., 1999).

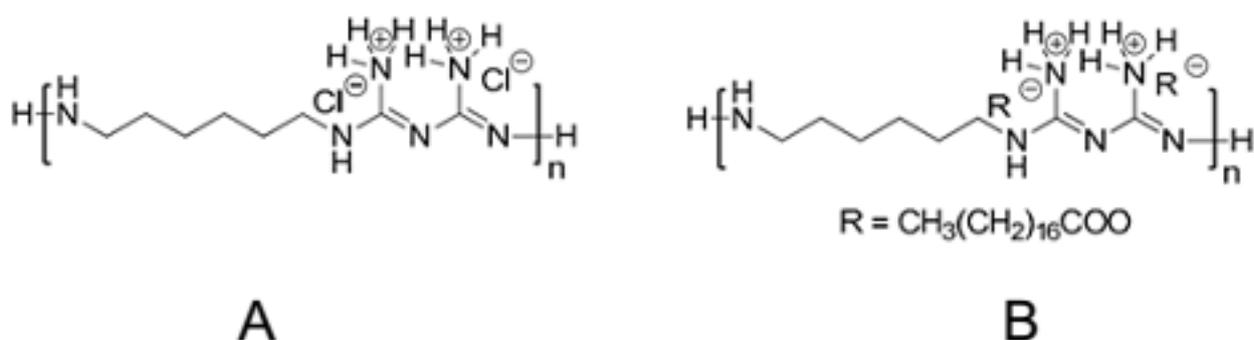


Figura 11 – Estrutura de biguanidas poliméricas, em que A é PHBGC e B é PHBGS

A atividade anti-tumoral de biguanidas foi mencionada com frequência desde os relatórios preliminares por Kundu et al. de 1967, relativamente a diguanidinas pirimidino como fármacos anti-cancerígenos (Katritzky et al., 2010).

Lugaro e colaboradores descobriram que mono- e di-biguanidinas substituídas exibiram atividade anti-tumoral (Corbellini, Lugaro, Giannattasio, & Torti, n.d.; Lugaro & Giannattasio, 1968; Lugaro, Giannattasio, Torti, & Perani, 1967). Estes sintetizaram biguanidas derivadas da estrutura geral (Figura 4) em que os seus grupos substituintes eram derivados dos grupos alquilo, arilo e alifáticos cíclicos. Estas biguanidas foram testadas em ratos com carcinoma de Ehrlich e como método de controlo foram utilizadas células hepáticas (Lugaro & Giannattasio, 1968).

Saczewski e colaboradores utilizaram biguanidas de derivados de triazinas, que mostraram uma atividade de inibição de crescimento em várias linhas de células tumorais na gama de concentrações entre 0,148 e 56,2 μM (Brzozowski, Saczewski, & Gdaniec, 2000; Katritzky et al., 2010). Saczewski utilizou várias biguanidas, derivadas de 2,4-diamino-1,3,5-triazina, onde a avaliação da atividade tumoral foi feita *in vivo*, num painel de 62 linhas de células tumorais derivadas de 9 tipos de cancro, tais como leucemia, cancro do cólon e cancro da mama, entre outros, seguindo um protocolo padrão. Estes concluíram que existe uma maior atividade antineoplásica para biguanidas derivadas de 2-clorometilo (Brzozowski et al., 2000).

Ghosh e colegas relataram propriedades anti-tumorais de biguanidas sintetizadas utilizando complexos de boro com hidroxibiguanidinas, como hidroxibiguanido monohidratado, di-hidroxibiguanido de boro(III) monohidratado e hidroxosalicil-hidroxamato de boro(III), em ratos com carcinoma de Ehrlich (Ghosh, Bag, Sur, & Sur, 1998; Katritzky et al., 2010).

1.1.3.1. Ação hipoglicemiante

A *Diabetes mellitus* é um dos mais graves problemas de saúde pública, especialmente no Ocidente, com um enorme peso económico no mundo industrializado. As biguanidas, como por exemplo, a metformina, e a fenformina, são amplamente utilizadas para o tratamento de *diabetes mellitus* tipo 2, uma vez que induzem uma redução dos níveis de glucose sanguíneos, sem causar hipoglicémia excessiva (Katritzky et al., 2010; Viollet et al., 2012) (ver Figura 2, B e D).

O mecanismo de ação da metformina não está completamente esclarecido. Este fármaco é descrito como um sensibilizador do efeito da insulina, reduzindo a insulinoresistência e, conseqüentemente, reduzindo os níveis de glucose no plasma sanguíneo (Viollet et al., 2012). No entanto, diversos estudos clínicos e em modelos

animais sugerem que a principal via de ação da metformina é a diminuição da produção de glucose ao nível hepático, por inibição da gluconeogénese (Viollet et al., 2012).

Estão descritos, além dos benefícios decorrentes da normalização dos níveis plasmáticos de glucose, outros benefícios do tratamento com metformina, nomeadamente ao nível cardiovascular (Hundal & Inzucchi, 2003; Katritzky et al., 2010).

A metformina, em tecido hepático, ativa uma cinase dependente de AMP (AMPK) muito importante no controlo de várias vias metabólicas. Esta cinase é constituinte de um sistema enzimático que induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta à alteração da carga energética celular (Júnior, Ugolini, Santomauro, & Souto, 2008; Rose, Dobson, El-masry, Brown, & Dobson, 2015), permitindo a manutenção da homeostasia energética ao nível celular e de todo o organismo, especialmente em condições de stresse energético decorrente de depleção energética (Fullerton, Steinberg, & Schertzer, 2013; Hardie, Ross, & Hawley, 2012). A AMPK é ativada pelo stresse metabólico ou por compostos xenobióticos que causem um desequilíbrio energético ao nível celular, que conduzam a um aumento da razão ADP/ATP e AMP/ATP (Hardie et al., 2012).

O principal alvo da metformina em células intactas é o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, que é inibido por esta. Decresce então a produção de ATP e, consequentemente, o sensor energético AMPK é ativado, de forma que as vias que consomem ATP sejam atenuadas ou desligadas e as que geram ATP sejam ativadas ou amplificadas (Viollet et al., 2012).

1.1.3.2. Ação anti-proliferativa

Em células normais, a AMPK promove a conservação da energia, promovendo a sobrevivência celular durante o stresse metabólico. Em células tumorais, que necessitam de um consumo energético mais amplo, a ativação da AMPK limita a utilização da energia disponível podendo mesmo impedir a sua capacidade proliferativa (Orecchioni et al., 2015; Quinn, Kitagawa, Memmott, Gills, & Dennis, 2013; Rose et al., 2015).

Como referido anteriormente, a metformina é um fármaco anti-diabético com potencial anti-tumoral. Este novo potencial é utilizado na gestão e quimioprevenção do cancro (Duque et al., 2010). Este medicamento combina favoravelmente com a

quimioterapia, uma vez que tem um benefício terapêutico em pacientes com cancro (Duque et al., 2010).

A Figura 12 mostra alguns dos mecanismos que podem explicar a ação anti-tumoral da metformina. Como acima referido, a ação inicial da metformina parece ser a inibição da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, é ativada a AMPK, quer diretamente por diminuição da razão ATP/AMP, quer indiretamente por estímulo da cinase a montante(LKB1). A ativação da AMPK parece ser determinante na sensibilização das células tumorais, durante a quimioterapia (Duque et al., 2010).

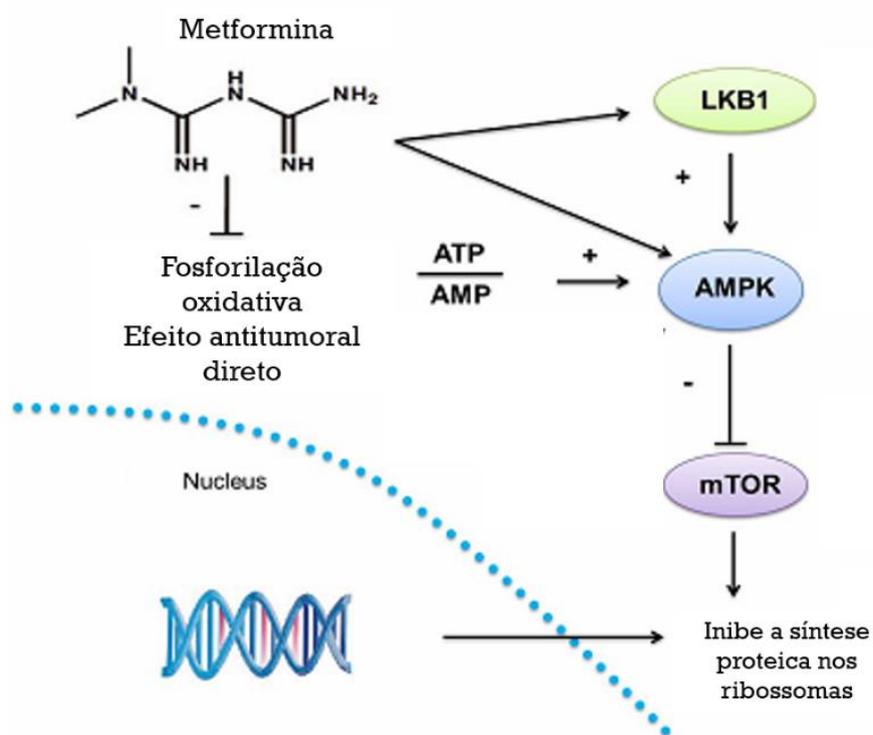


Figura 12 – Esquema dos modos ação da metformina (adaptado de Duque et al., 2010).

Não está completamente esclarecida de que forma, após a ativação da AMPK, a metformina desencadeia a ação anti-tumoral.

Num estudo de Choi e Park, demonstrou-se que a metformina pode atuar como um inibidor da proliferação celular dependente da dose através da regulação negativa da via da mTOR/S6 cinase, em linhas celulares de cancro da mama (Choi & Park, 2013; Krentz & Bailey, 2005).

Por outro lado, pode estar envolvida a via do p53 – sendo a produção de ATP mitocondrial reduzida pela metformina, ocorre uma perda de função pela via da AMPK

ou do p53, a célula entra em insuficiência energética, não existindo redução compensatória do consumo energético, o que pode resultar numa crise energética e morte celular, bem como a supressão tumoral (Choi & Park, 2013; Duque et al., 2010; Faubert, Vincent, Poffenberger, & Jones, 2015; Narise et al., 2014) (Figura 12).

1.2. Métodos de avaliação da ação anti-proliferativa

O conhecimento do ciclo celular é essencial para a compreensão das vias de ativação e proliferação das células, sendo necessário o conhecimento das suas fases. O ciclo celular está compreendido entre dois períodos, a interfase, que inclui as fases G1, S e G2, e a mitose.

Em cultura, as células possuem um padrão de crescimento representado por uma curva sigmoide, denominada curva de crescimento (Figura 13), que contém as fases lag, log e estacionária. Em determinadas circunstâncias, as células podem entrar numa fase de declínio, sendo que, neste caso, a curva tem forma de sino (Alves & Guimarães, 2007; Sigma, 2010).

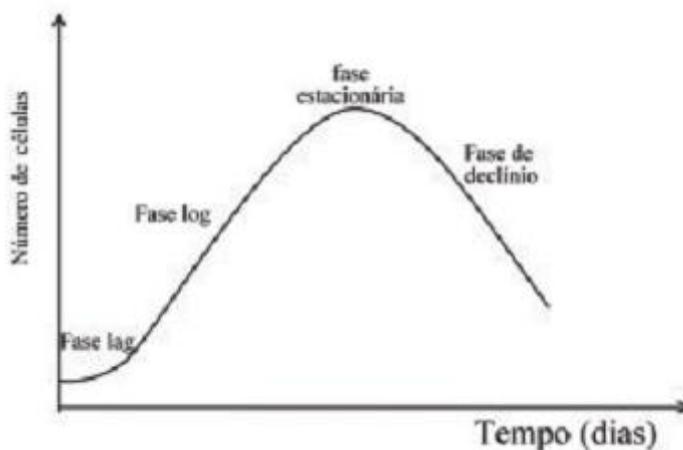


Figura 13 – Curva de crescimento celular padrão de células normais (adaptado de Alves & Guimarães, 2007).

Os estudos de efeito anti-proliferativo devem ser realizados quando as células se encontram na fase log, uma vez que é nesta fase que as células se mostram mais viáveis e a proliferar ativamente (Sigma, 2010).

Existem vários métodos para avaliar a viabilidade das células (Alves & Guimarães, 2007):

- Método Direto:

- Quantificação celular através da coloração com azul de tripano e contagem em câmara de Neubauer.

- Métodos Indiretos:

- Avaliação da atividade desidrogenase → Teste de brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazólio (MTS).
- Quantificação de ATP por luminescência.
- Quantificação da atividade enzimática Lactato desidrogenase.

1.2.1. Método de exclusão do azul de tripano e contagem em câmara de Neubauer

Este método permite avaliar a viabilidade celular com base na integridade membranar, nada dizendo sobre o estado metabólico das células. Para analisar a viabilidade celular é utilizado um corante, azul de tripano, que se caracteriza por não atravessar a membrana das células viáveis. Estas células são observadas no hemocitómetro, também conhecido como câmara de Neubauer.

A câmara de Neubauer é uma lâmina de vidro com divisões que auxiliam a contagem de células, possuindo 9 quadrados que medem 1 mm² de área.

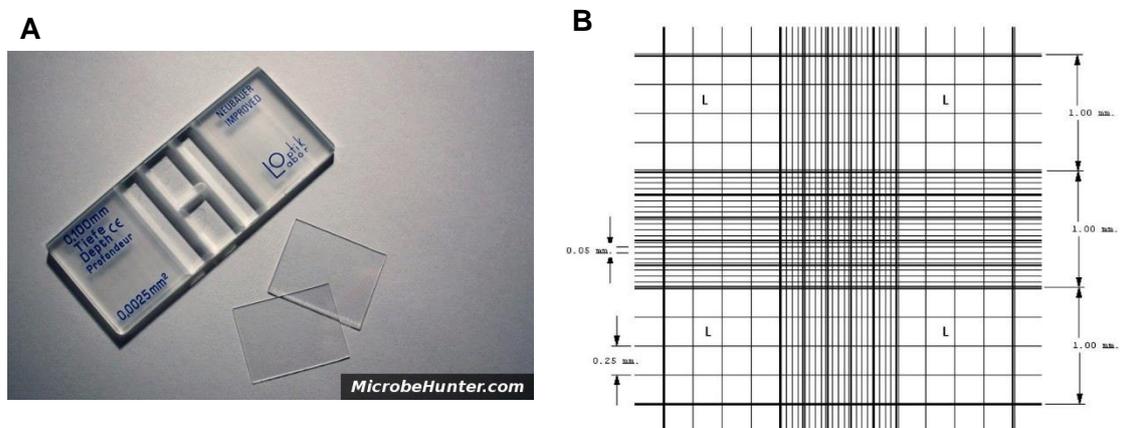


Figura 14 – Câmara de Neubauer.

Em **A** imagem da câmara e em **B** esquema de uma das células de contagem.

A fotografia de uma câmara ao microscópio ótico encontra-se na Figura 15. Apenas os quatro quadrados externos são utilizados na contagem de células animais. Cada quadrado externo é formado por mais 16 quadrados menores que auxiliam a contagem (Alves & Guimarães, 2007).

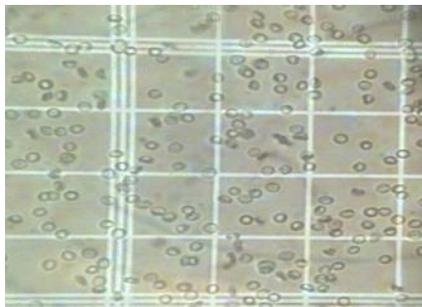


Figura 15 - Fotografia microscópica da câmara de Neubauer

Assim, ao observar uma preparação microscópica numa câmara de Neubauer, para proceder à sua contagem, é visualmente fácil distinguir as células viáveis, já que estas apresentam-se incolores, uma vez que a sua membrana se encontra íntegra e impede a passagem do corante para o interior da célula. As células inviáveis apresentam a coloração azul, uma vez que a sua membrana celular se encontra danificada, o corante penetra a membrana e dirige-se para o interior da célula fazendo com que esta apresente uma coloração azul quando é observada ao microscópio (Alves & Guimarães, 2007).

Para a contagem é necessário colocar uma lamela de vidro sobre a câmara, que serve para conter a suspensão celular. O espaço formado entre a lamela e a câmara é de 0,1 mm. Dessa forma, o volume determinado por cada quadrado é equivalente a 0,1 mm³. As células contadas num quadrado contidas em 1 mL equivalem ao valor de células contado multiplicado por 10⁴ (fator de correção da câmara) (Alves & Guimarães, 2007).

O número de células por mL de uma suspensão quando contado em câmara de Neubauer é obtido pela equação:

$$\frac{Q1 + Q2 + Q3 + Q4}{4} \times 10^{-4} \times \text{fator de diluição} = n^{\circ} \text{ de células/mL}$$

Para não ocorrer a contagem de uma célula mais de uma vez, efetua-se uma marcação em forma de L nos quadrados, para que, ao aparecerem células em cima das linhas, se contem apenas as que estiverem sobre a marcação (Alves & Guimarães, 2007).

1.2.2. Método de avaliação da atividade de desidrogenases

O teste do MTT ou brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio baseia-se na redução de sais de tetrazólio amarelos através das desidrogenases mitocondriais celulares metabolicamente ativas (Alves & Guimarães, 2007).

O teste de MTS é um ensaio colorimétrico que envolve a redução de células viáveis através do composto MTS ou 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (Dautry et al., 2013; “MTS cell proliferation protocol,” 2015; Riss, 2016).

O reagente do ensaio é constituído por MTS e um agente acoplador de elétrões, o metassulfato de fenazina (FMS). O formazano, produto da redução com MTS, é solúvel em meio de cultura. Esta reação só ocorre quando a atividade enzimática da redutase mitocondrial está ativa e, em consequência, a conversão pode ser diretamente relacionada com a viabilidade metabólica das células em cultura (Dautry et al., 2013; “MTS cell proliferation protocol,” 2015; Riss, 2016).

O reagente MTS funciona apenas numa baixa gama de absorvâncias, na ausência de células (Dautry et al., 2013; “MTS cell proliferation protocol,” 2015; Riss, 2016). O ensaio pode ser utilizado para a medição da proliferação de células em resposta a fatores de crescimento, citoquinas, agentes mitogénicos e nutrientes, entre outros. Também pode ser utilizado para a análise de compostos citotóxicos, como fármacos anti-cancerígenos, diversos agentes tóxicos e de compostos farmacêuticos (Dautry et al., 2013; “MTS cell proliferation protocol,” 2015; Riss, 2016).

O *Cell Counting Kit-8* (CCK-8) permite ensaios muito convenientes, utilizando o sal de tetrazólio WST-8 (sal monossódico de 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio), altamente solúveis em água (Ishiyama, Miyazono, Shiga, & Sasamoto, 1999). Este produz um corante de formazano solúvel em água mediante a redução na presença de um transportador de elétrões, tal como mostrado na Figura 16 (Sigma, 2006).

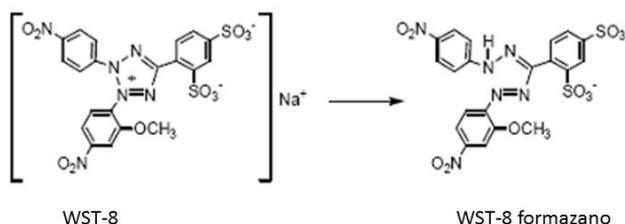


Figura 16 - Estrutura de WST-8 e WST-8 formazano (adaptado de Sigma, 2006)

O CCK-8 é comercializado como uma solução, sem que seja necessária a pré-mistura dos componentes. O CCK-8, sendo não radioativo, permite ensaios colorimétricos sensíveis para a determinação do número de células viáveis em ensaios de proliferação celular (Sigma, 2006).

O WST-8 é reduzido por desidrogenases em células para se obter um produto de cor amarela (formazano), que é solúvel no meio de cultura de tecidos. A quantidade do corante de formazano gerados pela atividade das desidrogenases em células é diretamente proporcional ao número de células vivas. A sensibilidade de detecção de CCK-8 é mais elevada do que outros sais de tetrazólio (Sigma, 2006).

1.2.3. Quantificação de ATP por luminescência

A quantidade de ATP nas células correlaciona-se com a viabilidade das mesmas. Dentro de minutos após a perda da integridade da membrana, as células perdem a capacidade de sintetizar ATP; as ATPases endógenas destroem o ATP restante, e os níveis de ATP decaem vertiginosamente (Riss, 2005).

A detecção é baseada na utilização da reação de luciferase para medir a quantidade de ATP a partir de células viáveis.

Apesar da adaptação das placas de ensaio à temperatura ambiente, é recomendada a realização rápida do ensaio. O sinal luminescente pode ser detetado 10 minutos logo após a adição do reagente ou várias horas mais tarde para processamento em lote de placas. Entre os ensaios de viabilidade celular, o ensaio de ATP é o mais rápido de realizar e pode detetar um menor número de células (Riss, 2005).

A única desvantagem deste método é o preço.

1.2.4. Quantificação da atividade enzimática Lactato desidrogenase

As células que perderam a integridade da membrana libertam lactato desidrogenase (LDH) no meio envolvente.

Existem métodos espectrofotométricos e fluorescentes que utiliza reações enzimáticas acopladas para medir a libertação de LDH a partir de células danificadas como um indicador de citotoxicidade. O ensaio é concebido para estimar o número de

células não viáveis presentes numa população mista de células vivas e mortas. Em alternativa, se um reagente de lise celular é utilizado, o mesmo ensaio químico pode ser utilizado para determinar o número total de células em uma população. O reagente não danifica as células vivas, e o ensaio pode ser realizado diretamente na cultura de células usando um método homogéneo (Riss, 2005).

Este é um ensaio rápido, necessitando apenas de um período de incubação de 10 minutos, e é compatível com formatos de 96 a 384 poços. A sensibilidade de deteção é de algumas centenas de células, mas pode ser limitada pela atividade de LDH presente no soro utilizado para suplementar o meio de cultura (Riss, 2005), tornando o método pouco apropriado para estudos anti-proliferativos, que têm de ser implementados na presença de soro.

1.2.5. Atividade ATPásica celular

ATPases são proteínas de membrana responsáveis por diversos processos biológicos e fisiológicos, uma vez que são capazes de fornecer a energia necessária para estes de realizarem.

Existem variados tipos de ATPases, como as F-ATPases, as V-ATPases, as ABC-ATPases e as P-ATPases. No caso deste trabalho vou apenas referir as P-ATPases, uma vez que estas se encontram na membrana celular.

As ATPases do tipo P são transportadores reversíveis de catiões. Ocorre, no mecanismo do transporte, uma fase de fosforilação pelo ATP, sendo que esta fosforilação causa uma mudança conformacional na molécula que permite a passagem dos catiões através pela membrana celular (Lutsenko & Kaplan, 1995; "Membranas - Bioquímica," n.d.). Existem três tipos de P-ATPases, as ATPases de metais pesados, como por exemplo a Cu^+ -ATPase, as ATPases clássicas, como a Na^+, K^+ -ATPase, e as ATPases bacterianas, como por exemplo a K^+ -ATPases (Lutsenko & Kaplan, 1995).

1.3. Modelo biológico utilizado

Para a realização dos ensaios biológicos, neste trabalho, utilizam-se diferentes linhas celulares.

1.3.1. Células BRIN-BD11

As células BRIN-BD11 são uma linha celular híbrida formada a partir de células β -pancreáticas primárias e de um insulinooma (RIN-5mF) de rato. Morfologicamente apresentam uma forma arredondada (Figura 17) (Sigma, n.d.-a).

É uma linha estável com resposta glicolítica semelhante à das células β -pancreáticas, secretoras de insulina. Expressam glucocinase e, ainda, o transportador de glucose GLUT2.

A linha celular BRIN-BD11 tem aplicação no estudo da função da célula β -pancreática (Sigma, n.d.-a).

Esta linha celular deve ser mantida em cultura em meio de cultura RPMI, com 10% de FBS.

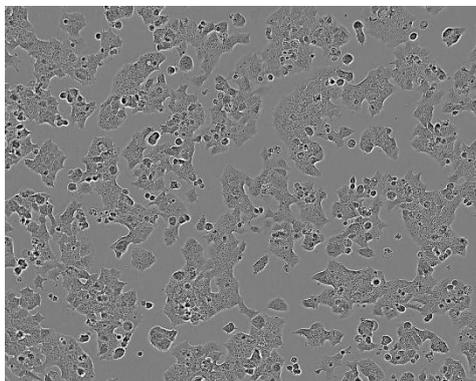


Figura 17 – Fotomicrografia de uma cultura de células BRIN-BD11, com a ampliação de 40x (England, n.d.)

1.3.2. Células MDST8

As células MDST8 são uma linha celular obtida a partir de explantes de tumores colo-retais humanos (Figura 18) (Public Health England, n.d.-b; Sigma, n.d.-b).

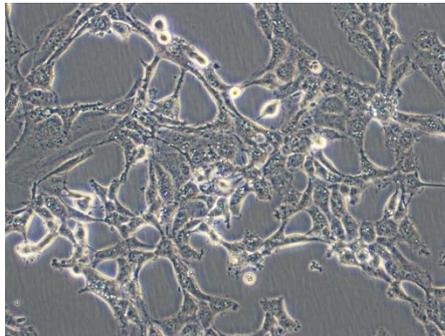


Figura 18 - Fotomicrografia de uma cultura de células MDST8, obtidas em observação ao microscópio invertido Olympus, modelo BX41 (ampliação 100x)

A linha celular MDST8 tem sido aplicada à terapia genómica em estudos com transdução adenoretroviral (Sigma, n.d.-b).

Esta linha celular deve ser mantida em cultura em meio de cultura DMEM, com 10% de FBS.

1.3.3. Células MCF7

As células MCF7 são uma linha celular que foi isolada pela primeira vez em 1970 a partir de tecido da mama de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade.

As células MCF7 são aderentes e capazes de formar o epitélio, dado que estas células crescem em monocamadas, normalmente cultivadas até apresentarem confluência. Devido a esta característica as células MCF7 são úteis para estudos *in vitro* de cancro da mama, uma vez que esta linha teve a capacidade de reter características particulares do epitélio mamário (Figura 19) (“MCF7,” n.d.; Public Health England, n.d.-a).

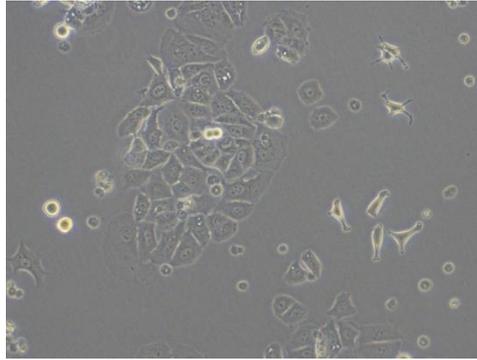


Figura 19 - Fotomicrografia de uma cultura de células MCF7, obtidas em observação ao microscópio invertido Olympus, modelo BX41 (ampliação 100x)

Esta linha celular foi geneticamente alterada, uma vez que no início esta linha apresentava um cariótipo com 85 cromossomas que posteriormente foi reduzido para 69 cromossomas. Além disso, existem diferenças genéticas entre a linha de células.

O crescimento pode ser inibido através do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e o tratamento de células MCF7 de cancro com anti-estrogénios pode modular a ação do fator de crescimento semelhante ao da insulina (ILF), o que acaba por ter um efeito redutor no crescimento celular. As células MCF7 têm ainda a característica de expressar recetores de estrogénio no citoplasma, podendo ser estudado nesta linha o efeito destas hormonas ("MCF7," n.d.).

Esta linha celular deve ser mantida em cultura em meio de cultura EMEM, com 10% de FBS.

2. Problemática

As biguanidas são uma classe de compostos com vastas aplicações terapêuticas, sendo a sua ação hipoglicemiante no tratamento da diabetes do tipo 2 a atividade mais conhecida. Para além desta aplicação terapêutica, também apresentam outras atividades, como atividades anti-malária, antimicrobiana, antiviral, antisséptica e espasmolítica.

Recentemente, foi identificada outra atividade biológica importante, a partir de observações clínicas em doentes oncológicos, com terapêutica simultânea com biguanidas para a diabetes do tipo 2: estes compostos apresentam atividade anti tumoral.

O cancro é um problema de saúde pública muito importante e o desenvolvimento de novos fármacos é muito importante.

Estudos celulares efetuados posteriormente revelaram que as biguanidas apresentam efeito anti-proliferativo, pois a replicação celular parece ser interrompida entre a fase G1 e a fase G2, por mecanismos ainda desconhecidos. Sendo a atividade anti-proliferativa avaliável por métodos pouco dispendiosos e que, por isso, podem ser aplicados a um grande número de compostos, esta atividade tem sido utilizada por vários autores como indicativa do potencial terapêutico de novos compostos.

Assim, neste trabalho pretende-se sintetizar diversas biguanidas com diferentes cadeias laterais e grupos funcionais, e estudar a sua atividade biológica, utilizando a avaliação do efeito anti-proliferativo como método de *screening* para identificação dos compostos mais promissores para uma aplicação na terapêutica antitumoral.

3. Objetivos

- Sintetizar e caracterizar compostos derivados de biguanidas.
- Desenvolver um método alternativo à atividade de desidrogenases utilizando atividade ATPásica, para quantificação do número de células.
- Avaliar a atividade anti-proliferativa de compostos sintetizados, utilizando a atividade ATPásica.

4. Materiais e Métodos

Os equipamentos, reagentes e consumíveis, utilizados neste trabalho para a avaliação da atividade anti-proliferativa, estão listados no Anexo I (ver página i).

4.1. Síntese de Biguanidas

Os compostos utilizados na síntese das diferentes biguanidas foram adquiridos comercialmente, tendo sido utilizados sem qualquer tratamento ou purificação.

Os compostos obtidos foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN) de próton (400 MHz) e de carbono-13 (100 MHz), num espectrómetro Bruker Avance III HD. Os desvios químicos (δ) estão indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). A multiplicidade dos sinais está indicada por s – singuleto, d – duplete, dd – duplo duplete, t – tripleto, qt - quintuplete e m – multiplete, seguidos da letra l quando os sinais se apresentam largos. Para a obtenção dos espectros dos compostos foi utilizado como solvente o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6).

Na preparação dos compostos utilizou-se como reagente principal a dicianodiamida ou cianoguanidina (DC).

4.1.1. Síntese de cloridrato do ácido (S)-2-(3-(diaminometileno)guanidino)-pentanodióico (MG1)

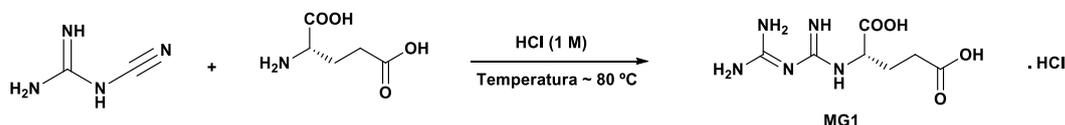


Figura 20 – Síntese do composto MG1

Num balão de fundo redondo pesou-se 0,4043 g de DC (4,8 mmol), 0,7707 g de ácido glutâmico (5,2 mmol) e adicionou-se 16 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante foi colocada em agitação à temperatura de $\approx 80^\circ\text{C}$, durante 8 h 30

min, seguida de agitação, à temperatura ambiente, durante 100 h. A solução foi levada à secura no evaporador rotativo tendo-se obtido um óleo. Adicionou-se umas gotas de metanol ao óleo e à solução foi adicionado acetato de etilo para precipitar o composto pretendido. Após evaporação dos solventes, o sólido obtido foi lavado com acetona tendo-se obtido 1,1155 g (rendimento: 83%) de um sólido branco, que por análise por RMN mostrou ser o produto pretendido (Figura 21).

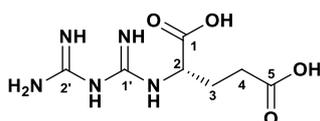


Figura 21 – Estrutura do composto MG1

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 1,98-2,05 (2H, m, H3), 2,33-2,41 (1H, m, H4), 2,47^(a) (H4), 3,89 (1H, s l, H2), 7,23 (1H, s l, NH), 8,27 (3H, s l, NH), 8,51 (2H, s l, NH), 10,54 (1H, s l, NH); ^(a) Sinal parcialmente sob o sinal do solvente $\text{DMSO-}d_6$.

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 25,75 (C3), 29,77 (C4), 51,67 (C2), 154,94 (C1'), 156,11 (C2'), 171,09 e 173,71 (COOH).

4.1.2. Síntese de cloridrato do ácido (S)-2-[3-(diaminometileno)guanidino]-3-(1H-imidazol-4-il)propanóico (MG14)

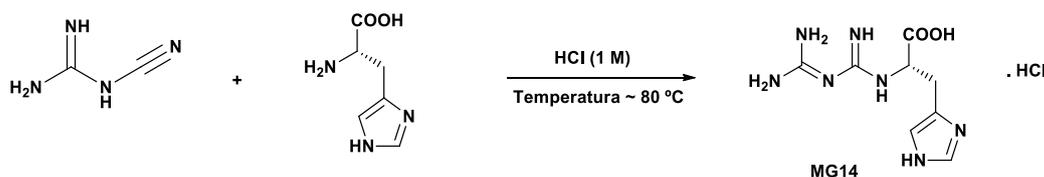


Figura 22 - Síntese do composto MG14

Num balão de fundo redondo pesou-se 0,1693 g de DC (4,8 mmol) e 0,0696 g de histidina (4,8 mmol) e colocou-se em 15 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante esteve em agitação à temperatura de $\approx 80^\circ\text{C}$ durante 10 h e à temperatura ambiente durante 120 h. A solução foi levada à secura no evaporador rotativo, e o sólido resultante foi lavado várias vezes com acetona, tendo-se obtido 1,4549 g (rendimento;

98%) de um sólido esbranquiçado, que por análise por RMN mostrou ser o composto pretendido (Figura 23).

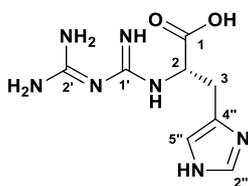


Figura 23 – Estrutura do composto MG14

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 3,29 (2H, d, $J=7,9$, H3), 4,34 (1H, t, $J=7,2$, H2), 7,25 (2H, s l, NH), 7,33 (1H, s l, H2'' ou H5''), 7,50 (1H, s l, H5'' ou H2''), 8,29 (3H, s l, NH), 9,10 (1H, s l, NH), 10,54 (1H, s l, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 25,56 (C3), 51,54 (C2), 118,31 (C5''), 127,57 (C4''), 154,91 (C1'), 156,22 (C2'), 159,01 (C2''), 169,81 (C1).

4.1.3. Síntese de cloridrato do ácido (S)-2-[3-(diaminometileno)guanidino]-5-guanidinopentanóico (MG2)

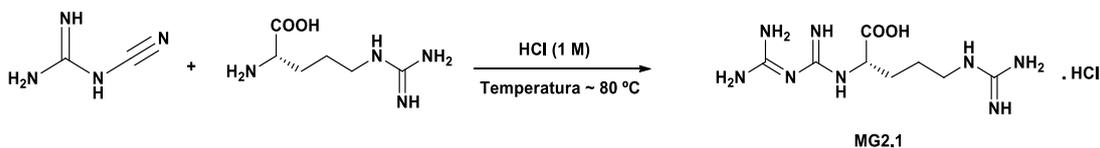


Figura 24 - Síntese do composto MG2

Num balão de fundo redondo pesou-se 0,4012 g de DC (4,8 mmol), 0,9120 g de arginina (5,2 mmol) e adicionou-se 15 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante esteve em agitação à temperatura de $\approx 80^\circ\text{C}$, durante 8 h 30 min e ficou em agitação, à temperatura ambiente, durante 100 h. A solução foi levada à secura no evaporador rotativo tendo-se obtido um óleo. Adicionou-se umas gotas de metanol para a dissolução do óleo e em seguida adicionou-se acetato de etilo para precipitar o composto. Foi necessário adicionar acetona para se obter um sólido após evaporação da solução no evaporador rotativo. Apesar das lavagens sucessivas do sólido obtido

com acetona, obteve-se uma mistura do composto pretendido e da dicianodiamida protonada.

4.1.4. Síntese de cloridrato de *N*-(piperidin-1-il)biguanida (MG7)

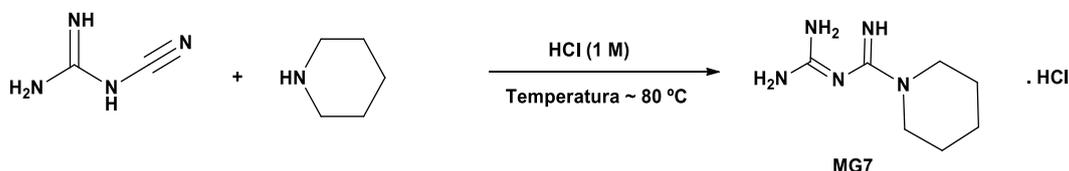


Figura 25 - Síntese do composto MG7

Num balão de fundo redondo pesou-se 0,4016 g de DC (4,8 mmol), e adicionou-se 0,48 mL de piperidina (4,8 mmol) e 15 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante esteve em agitação à temperatura de $\approx 80^\circ\text{C}$ durante 10h e à temperatura ambiente durante 80h. A solução foi levada à secura no evaporador rotativo e o sólido resultante foi analisado por RMN, mostrando que apenas existiam os compostos de partida. A este sólido foi adicionado mais 10 mL de solução HCl 1 M e colocado em agitação à temperatura $\approx 80^\circ\text{C}$ durante 10h e à temperatura ambiente durante 96h. Esta solução foi posteriormente levada à secura e o sólido resultante foi lavado com acetona sucessivas vezes. Após estas lavagens, obteve-se 0,7498 g (rendimento: 81%) de um sólido branco, que, por análise de RMN, mostrou ser o produto pretendido (Figura 26).

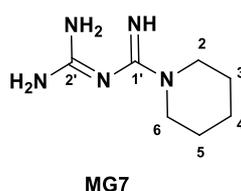


Figura 26 – Estrutura do composto MG7

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 1,54 (2H, qt, $J=5,6$, H4), 1,67 (4H, qt, $J=5,7$, H3, H5), 2,96 (4H, qt l, $J=5,0$, H2, H6), 7,24 (2H, s l, NH), 8,26 (3H, s l, NH), 9,02 (1H, s l, NH), 10,52 (1H, s l, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 22,16 (C4), 22,50 (C3, C5), 43,92 (C2, C6), 154,93 (C1'), 156,11 (C2').

4.1.5. Síntese de cloridrato de *N*-(4-nitrofenil)biguanida (MG8)

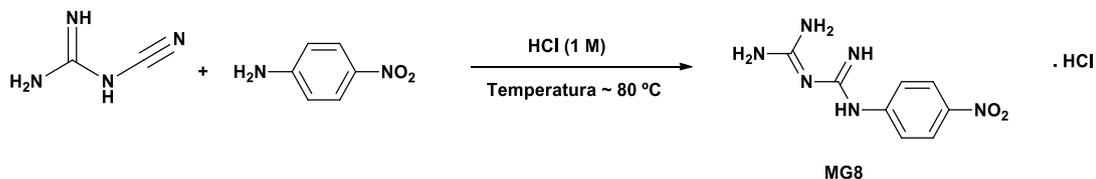


Figura 27 - Síntese do composto MG8

Num balão de fundo redondo pesou-se 0,4044 g de DC (4,8 mmol), 0,6583 g de 4-nitroanilina (4,8 mmol) e adicionou-se 16 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante esteve em agitação à temperatura de $\approx 80^{\circ}\text{C}$ durante 10 h e à temperatura ambiente durante 100 h. A solução foi levada à secura no evaporador rotativo, tendo-se obtido um sólido que foi lavado sucessivas vezes com acetona, tendo-se obtido 0,498 g (rendimento: 42%) de um sólido amarelo muito claro, que por análise por RMN mostrou ser o composto pretendido (Figura 28).

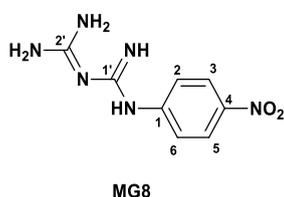


Figura 28 – Estrutura do composto MG8

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 7,38 (4H, m, NH), 7,72 (2H, d, $J=9,3$, H2,H6), 8,25 (2H, d, $J=9,2$, H3,H5), 8,50 (4H, s l, NH), 10,69 (s l, NH), 11,35 (1H, s l, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 119,28 (C2,C6), 125,60 (C3,C5), 142,94 (C4), 144,62 (C1), 151,57 (C1'), 155,40 (C2').

4.1.6. Tentativa de síntese de cloridrato de *N*-(2,4-dinitrofenil)biguanida (MG9)

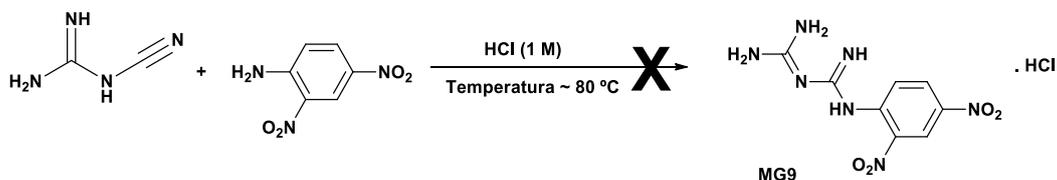


Figura 29 - Síntese do composto MG9

Num balão de fundo redondo, pesou-se 0,4013 g de DC (4,8 mmol), 0,8723 g de 2,4-dinitroanilina (4,8 mmol) e adicionou-se 15 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante esteve em agitação à temperatura de $\approx 80^{\circ}\text{C}$ durante 9h. A solução foi levada à secura no evaporador rotativo, mas o sólido obtido não apresentava, após análise por RMN, o composto pretendido.

4.1.7. Síntese de cloridrato de *N*-(4-cianofenil)biguanida (MG6)

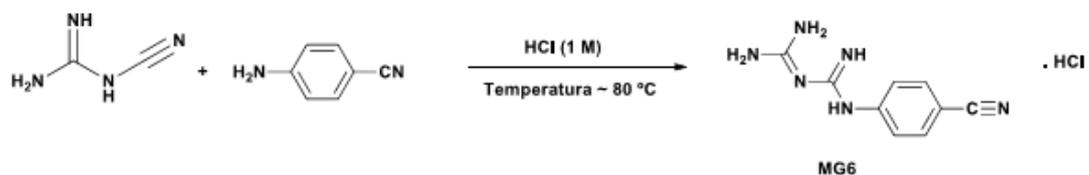


Figura 30 - Síntese do composto MG6

Num balão de fundo redondo pesou-se 0,4001 g de DC (4,8 mmol), 0,5630 g de 4-aminobenzonitrilo (4,8 mmol) e adicionou-se 10 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante esteve em agitação à temperatura de $\approx 80^{\circ}\text{C}$ durante 10 h e à temperatura ambiente durante 95 h. A solução foi levada à secura no evaporador rotativo, tendo-se obtido um sólido que foi lavado sucessivas vezes com acetona, tendo-se obtido 0,2411 g (rendimento de 21%) de um sólido amarelo claro, que por análise por RMN mostrou ser o composto pretendido (Figura 31).

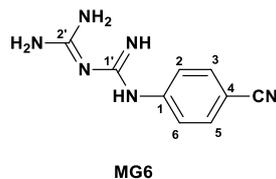


Figura 31 – Estrutura do composto MG6

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 7,22 (2H, s l, NH), 7,30 (2H, m, NH), 7,61 (2H, d l, $J=8,7$, H2,H6), 7,56 (3H, s l, NH), 7,74 (2H, d, $J=8,8$, H3,H5), 10,41 (1H, s l, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 104,54 (C4), 119,67 (CN), 120,11(C2,C6), 133,51 (C3,C5), 144,08 (C1), 154,34 (C1'), 162,23 (C2').

4.1.8. Síntese de cloridrato de *N*-(2,4-dibromofenil)biguanida (MG5)

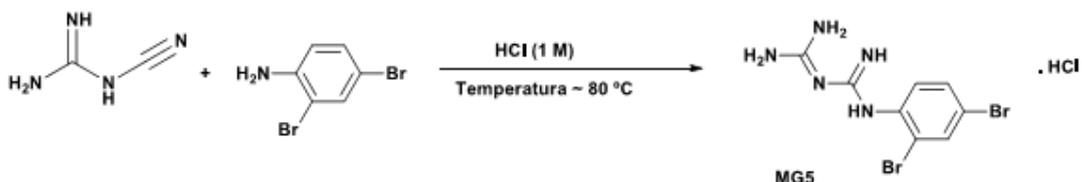


Figura 32 - Síntese do composto MG5

Num balão de fundo redondo pesou-se 0,4017 g de DC (4,8 mmol), 1,1937 g de 2,4-dibromoanilina (4,8 mmol) e adicionou-se 15 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante esteve em agitação à temperatura de $\approx 80^\circ\text{C}$ durante 6 h30min e à temperatura ambiente durante 80 h. Apesar das lavagens sucessivas do sólido obtido com acetona, obteve-se uma mistura do composto pretendido e dos reagentes de partida, embora tendo sido possível sintetizar o composto, não se conseguiu purificar.

4.1.9. Síntese de cloridrato do ácido 2-[3-(diaminometileno)guanidino]etanossulfônico (MG10)

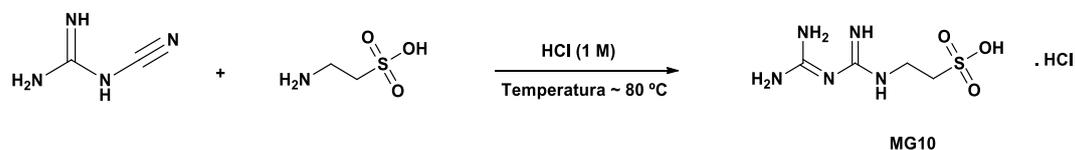


Figura 33 - Síntese do composto MG10

Num balão de fundo redondo pesou-se 0,4005 g de DC (4,8 mmol), 0,5953 g de taurina (4,8 mmol) e adicionou-se 16 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante esteve em agitação à temperatura de $\approx 80^{\circ}\text{C}$ durante 8 h 20 min e à temperatura ambiente durante 80 h. Apesar das lavagens sucessivas do sólido obtido com acetona, obteve-se uma mistura do composto pretendido e dos reagentes de partida.

4.1.10. Síntese de cloridrato do ácido 7-[3-(diaminometileno)guanidino]naftaleno-1,3-dissulfônico (MG11)

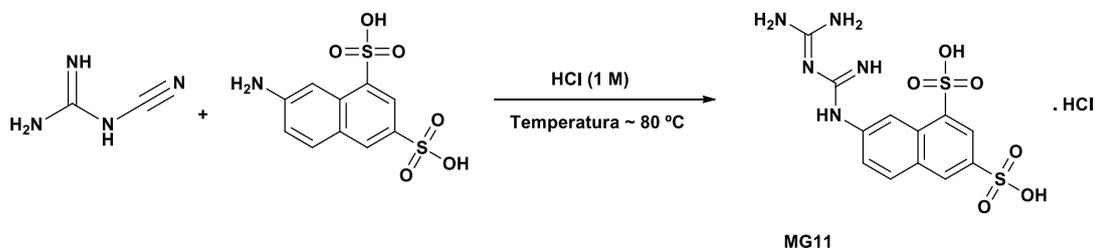
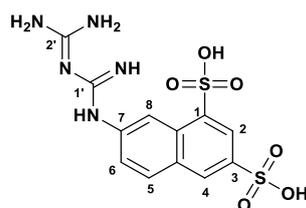


Figura 34 - Síntese do composto MG11

Num balão de fundo redondo, pesou-se 0,4002 g de DC (4,8 mmol), 1,4384 g de 7-amino-1,3-naftalodissulfonato de potássio hidratado (4,8 mmol) e adicionou-se 15 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante esteve em agitação à temperatura de $\approx 80^{\circ}\text{C}$ durante 9 h e à temperatura ambiente durante 100 h. A solução foi levada à secar no evaporador rotativo, tendo o sólido obtido sido lavado várias vezes com acetona, tendo-se obtido 1,8463g (rendimento: 94%) de um sólido branco, que por análise por RMN mostrou ser o produto pretendido (Figura 35).



MG11

Figura 35 – Estrutura do composto MG11

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 7,19 (3H, t, $J=51,0$, NH), 7,44 (1H, dd, $J_{\text{H6,H5}}=8,7$, $J_{\text{H6,H8}}=2,2$, H6), 8,10 (1H, d, $J=8,8$, H5), 8,14 (3H, s l, NH), 8,17 (1H, d, $J_{\text{H6,H8}}=1,2$, H2), 8,29 (1H, d, $J=1,7$, H4), 8,78 (1H, d, $J=1,6$, H8), 9,96 (1H, s l, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 120,40 (C8), 121,61 (C6), 124,21 (C4), 125,85 (C2), 129,33 (C4a), 131,08 (C5), 131,37 (C8a), 131,97 (C7), 143,75 (C3), 144,55 (C1), 154,84 (C1'), 155,90 (C2').

4.1.11. Tentativa de síntese de cloridrato do ácido 4-[3-(diaminometileno)guanidino]-1-hidroxibutano-1,1-diil]difosfónico (MG13)

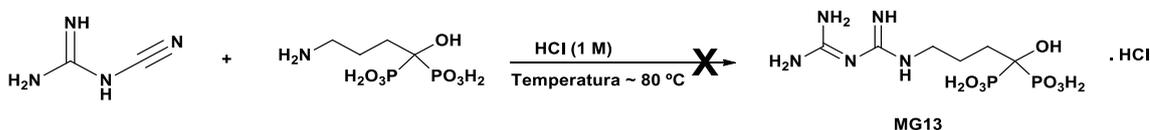


Figura 36 - Síntese do composto MG13

Num balão de fundo redondo pesou-se 0,0977 g de DC (1,1601 mmol), 0,3772g de ácido (4-amino-1-hidroxibutano-1,1-diil]difosfónico (GABA-BP) (1,1601 mmol) e adicionou-se 10 mL de solução aquosa de HCl 1 M. A solução resultante foi agitada à temperatura de $\approx 80^\circ\text{C}$ durante 13 h e à temperatura ambiente durante 100 h. A solução foi levada à secura no evaporador rotativo e o sólido foi lavado com acetona, mas obteve-se uma mistura de produtos e materiais de partida.

4.2. Modelo biológico utilizado

Para a realização dos ensaios biológicos utilizaram-se diferentes linhas celulares de modo a otimizar o método da atividade enzimática ATPásica para contagem celular, uma linha não tumoral (BRIN-BD11) e duas linhas tumorais (MDST8 e MCF7), de cancro de cólon e mama, respetivamente.

Para o estudo da ação anti-proliferativa dos compostos derivados de biguanidas sintetizados, apenas foi utilizada a linha tumoral MDST8.

4.2.1. Preparação dos meios de cultura

- **EMEM**

Para a preparação deste meio usa-se 9,61 g/L de meio de cultura e 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, dissolvidos em água miliQ (ultrapura). Acerta-se o pH a 7,1, por adição de HCl 1 M. A partir daqui todo o processo foi realizado na câmara de fluxo laminar para garantir a sua esterilidade. Todo o material não descartável foi autoclavado e, antes de entrar na câmara de fluxo laminar, foi passado por etanol a 70%. Foi utilizado um sistema de filtração a vácuo com um filtro de 0,2 µm para filtrar o meio anteriormente preparado e foram adicionados 1% de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina) ao meio de cultura para evitar o crescimento bacteriano antes da filtração, foi também adicionado 10% de FBS para cultivar as células em condições normais. O meio foi colocado em frascos estéreis.

- **DMEM**

Para a preparação deste meio usa-se 10 g/L de meio de cultura e 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, dissolvidos em água miliQ (ultrapura). Acerta-se o pH a 7,1, por adição de HCl 1 M. Procede-se da mesma forma como anteriormente descrito para esterilização e aditivação de antibióticos e soro.

- **RPMI**

Para a preparação deste meio usa-se 10,4 g/L de meio de cultura e 2,6 g/L de bicarbonato de sódio, dissolvidos em água miliQ (ultrapura). Acerta-se o pH a 7,2, por adição de HCl 1 M. Procede-se da mesma forma como anteriormente descrito para esterilização e aditivação de antibióticos e soro.

4.3. Cultura de linhas celulares

Para o cultivo das células utilizaram-se frascos de cultura de 75 cm² com capacidade aproximada para 20 mL de meio. Para retirar as células dos frascos, retirou-se o meio de cultura por aspiração.

Adicionou-se 2 mL de uma solução de versénio para lavagem, sendo também esta solução retirada por aspiração.

Por último, adicionou-se novamente solução de versénio (2-5 mL) e incubaram-se as células nesta solução, a 37°, durante 3-5 min. Passado este tempo, as células foram desagregadas e ressuspenderam-se mecanicamente com uma pipeta.

De seguida, a suspensão de células foi transferida dos frascos para um tubo de Falcon, que é centrifugado a 528 g durante 5 min, T= 20 °C. Retirou-se o sobrenadante e o sedimento celular foi ressuspensionado em 5 mL de meio de cultura (com o objetivo de remover o EDTA).

4.3.1. Contagem celular pelo método de exclusão do azul de tripano com contagem em câmara de Neubauer

Para a contagem celular, em condições estéreis, são retirados 20 µL de suspensão de células. Adicionou-se um volume equivalente de solução de azul de tripano (fator de diluição de 2x) e misturou-se cuidadosamente com a micropipeta.

Encheu-se os dois lados da câmara com suspensão celular (aproximadamente 5-10 µL) e observou-se a preparação ao microscópio ótico a uma ampliação de 100x. Contou-se o número de células viáveis (vistas como as células brilhantes) e as não viáveis (as células coradas de azul).

4.4. Avaliação do efeito anti-proliferativo de compostos sintetizados

4.4.1. Esquema do ensaio

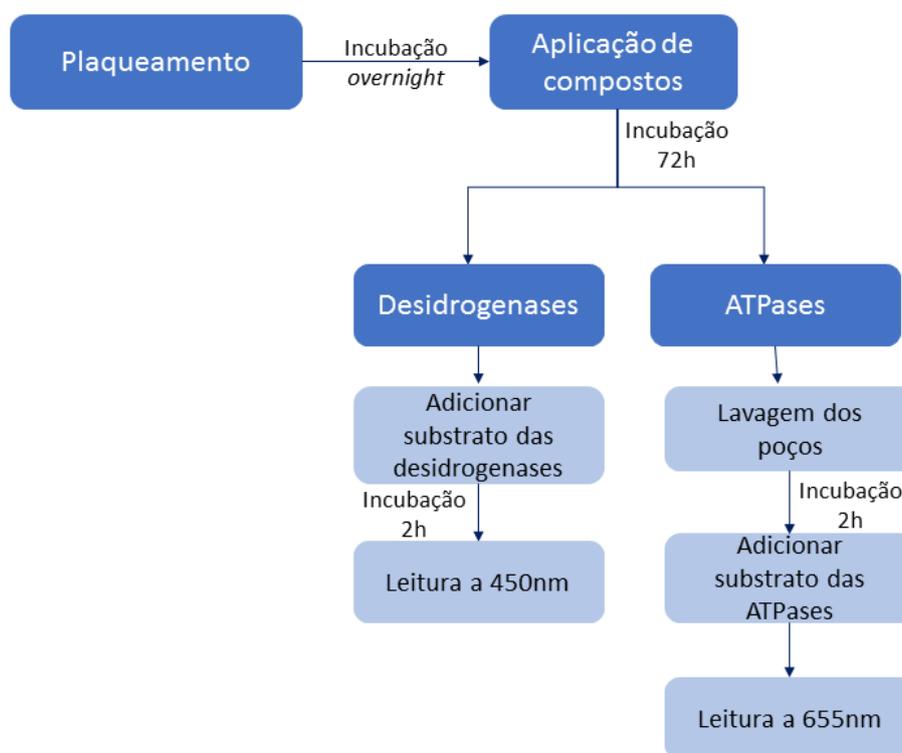


Figura 37 – Esquema geral do ensaio para o estudo anti-proliferativo

4.4.2. Preparação de soluções dos compostos sintetizados

Foram preparadas soluções, em EMEM, DMEM e RPMI, contendo 1 ou 10% FBS, consoante as células a serem utilizadas no ensaio de concentração conhecida (1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mM) para cada composto sintetizado e metformina, e com meio de cultura contendo 1% FBS para o 5-Fluoruracilo (10^{-9} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} M).

4.4.3. Curva de calibração para as células

As células foram plaqueadas na câmara de fluxo laminar e foram incubadas durante 12/18 h, a 37°C na presença de CO₂.

Depois de realizada a contagem celular, ficou-se a saber qual a concentração de células por mL e de seguida foram feitos cálculos para realizar o plaqueamento de células em meio de cultura numa microplaca de forma a conhecer o número de células existente em cada poço. Foram feitos triplicados, para o método das desidrogenases e quadruplicados para o método das ATPases de cada concentração celular (0; 1.250; 2.500; 5.000; 10.000; 15.000; 20.000; 30.000; 40.000; 60.000 células por poço).

4.4.4. Avaliação da atividade enzimática de calibração para as células

Para as diferentes linhas celulares foram plaqueadas diferentes concentrações nos poços da microplaca, sendo essas concentrações 10.000, 4.000 e 5.000 para MCF7, MDST8 e BRIN-BD11, respetivamente.

- **Atividade Desidrogenases**

O processo iniciou-se com o plaqueamento das células na microplaca com a concentração celular conhecida, ficando a incubar durante a noite (12h/18h). No dia seguinte aplicou-se os compostos e controlos, deixando-se a incubar, a 37°C com 5% de CO₂, durante 72h. Após este período mudou-se o meio da microplaca com as células em cultura e aplicou-se 10 µL de substrato de desidrogenases (CCK-8) e incubou-se 2h a 37°C com 5% de CO₂. Após 2 h, efetuou-se a leitura a 450 nm no leitor de microplacas.

Este procedimento foi efetuado para as placas que continham os diferentes compostos e controlos.

- **Atividade ATPásica**

A atividade enzimática da ATPase é determinada diretamente nas células aderentes (Costa, Real, Antunes, & Cruz-Morais, 2010). O ensaio permite a avaliação da atividade ATPásica total (isto é, de todas as ATPases que na presença de ATP e dos iões em solução estão ativas).

A atividade ATPásica foi determinada pela quantificação do fosfato inorgânico formado em 120 min de reação a 37°C.

O processo iniciou-se, tal como no método das desidrogenases, com o plaqueamento das células na microplaca com a concentração celular conhecida, ficando a incubar durante a noite (12h/18h). No dia seguinte aplicou-se os compostos e controlos, deixando-se a incubar, a 37°C com 5% de CO₂, durante 72h. Após este período, com a retirada da microplaca com as células em cultura da incubadora de CO₂ e, já em ambiente não estéril, efetuou-se uma lavagem das células com 100 µL de tampão ATPases (ver anexo I, página ii) sem ATP. Em seguida, aplicou-se 100 µL de meio reacional (tampão ATPases com ATP) e as células foram incubadas durante 120 min na incubadora de CO₂ a 37°C. Após este período, retirou-se imediatamente 80 µL do sobrenadante, transferindo-o para uma nova placa, onde se adicionou 40 µL de TCA 11,5%. Nessa mesma placa, preparou-se também uma curva de calibração para o fosfato inorgânico (com concentrações de KH₂PO₄ compreendidas entre 1,44 e 367,4 mM). Adicionou-se então 80 µL de reagente sulfomolibdico a cada poço e efetuou-se de imediato a leitura de absorvância a 655 nm, num leitor de microplacas.

Este procedimento foi efetuado para as placas que continham os diferentes compostos e controlos, sendo que cada microplaca continha dois compostos e uma curva de calibração de fosfato inorgânico.

4.5. Análise estatística

Os resultados foram apresentados com valores médios ± erro padrão da média (epm). O epm foi considerado mais relevante que o desvio padrão, uma vez que se pretende comparar médias.

O teste multi-comparativo de Tukey-Kramer, com $p < 0,05$, foi utilizado para realizar a avaliação das diferenças significativas entre grupos, com recurso ao programa NCSS 2001 (Jerry Hintze, USA).

Os gráficos foram realizados nos programas Microsoft Excel (Microsoft Office) e no programa ORIGIN Pro8 (OriginLab Corporation, USA).

5. Resultados e discussão

5.1. Síntese de novos compostos derivados das biguanidas

Este estudo tem como objetivo inicial a síntese de biguanidas, com diferentes grupos funcionais e avaliar a sua influência na atividade anti-proliferativa destes compostos em linhas de células tumorais. Para isso, utilizaram-se diversos reagentes com diferentes estruturas e/ou grupos funcionais, de modo a originar biguanidas com cadeias laterais com estruturas derivadas de aminoácidos, cadeias não aromáticas, cadeias aromáticas com diferentes grupos funcionais, incluindo grupos ácidos sulfônicos.

Para a síntese de biguanidas com cadeias laterais derivadas de aminoácidos, utilizaram-se como reagentes os aminoácidos ácido glutâmico, arginina e histidina, uma vez que estes aminoácidos também apresentam entre si diferenças na cadeia lateral, possuindo, respetivamente, grupos ácido carboxílico, guanidina e um anel imidazole (Figura 38).

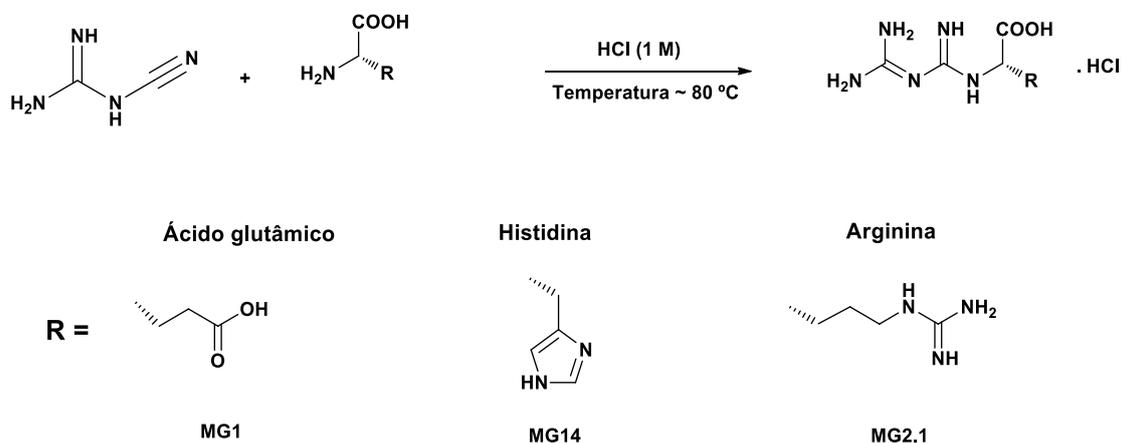


Figura 38 – Esquema geral de síntese de biguanidas com aminoácidos

No caso do ácido glutâmico, esta biguanida foi sintetizada com sucesso e com um bom rendimento (83%). A biguanida sintetizada com cadeia lateral de arginina não

foi possível purificar. A síntese da biguanida utilizando a histidina como cadeia lateral foi realizada com sucesso e com um bom rendimento (98%).

Sintetizou-se também uma biguanida com uma cadeia hidrocarbonada cíclica não aromática, fazendo-se reagir a dicianodiamida com piperidina (Figura 25). A síntese deste composto foi bem sucedida, tendo-se obtido a biguanida com bom rendimento (81%).

Prepararam-se ainda biguanidas com cadeias laterais com anéis aromáticos e com diferentes grupos funcionais (Figura 39), partindo das aminas aromáticas 4-aminobenzonitrilo, 2,4- dibromoanilina, 4-nitroanilina, 2,4-dinitroanilina. No entanto, só com os derivados da 4-nitroanilina e da 4-aminobenzonitrilo foi possível isolar os respectivos compostos. No caso da reação MG9 não se observou a formação do produto pretendido e também não se conseguiu isolar o composto MG5.

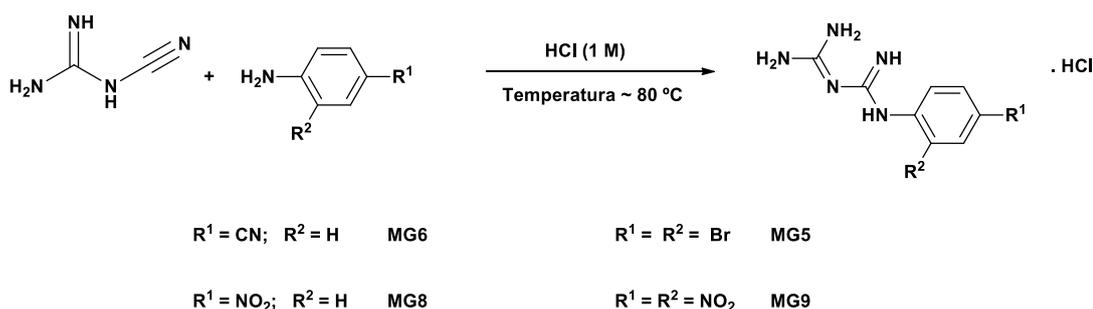


Figura 39 – Esquema geral de síntese de biguanidas com anéis aromáticos

Foi ainda sintetizada outra biguanida com uma cadeia lateral aromática, mas derivada do naftaleno e com dois grupos ácidos sulfônicos (Figura 34). Também, se tentou sintetizar uma biguanida derivada da taurina, que também possui um grupo ácido sulfônico, mas obteve-se pequena quantidade de produto não tendo sido possível separar a biguanida formada dos reagentes de partida presentes na mistura (Figura 33).

Por fim, tentou-se introduzir um outro grupo funcional, um ácido bisfosfônico, na cadeia lateral da biguanida (Figura 36), utilizando-se o alendronato de sódio, o qual é utilizado na terapêutica de patologias associadas ao metabolismo mineral do osso. O composto utilizado como reagente foi o derivado ácido bisfosfônico preparado a partir do ácido gama-aminobutírico. Mas, também neste caso, não se observou a formação da biguanida pretendida.

De um modo geral, as sínteses foram bem sucedidas, com rendimentos elevados. No entanto, a dificuldade e o número significativo de operações de lavagem para purificar o composto podem levar à obtenção de pequenas quantidades de biguanidas puras.

Para além dos compostos sintetizados, foram ainda utilizados nos estudos de avaliação da atividade anti-proliferativa, os compostos da Figura 40, preparados anteriormente pela Dra. Letícia Fialho (Fialho, 2015).

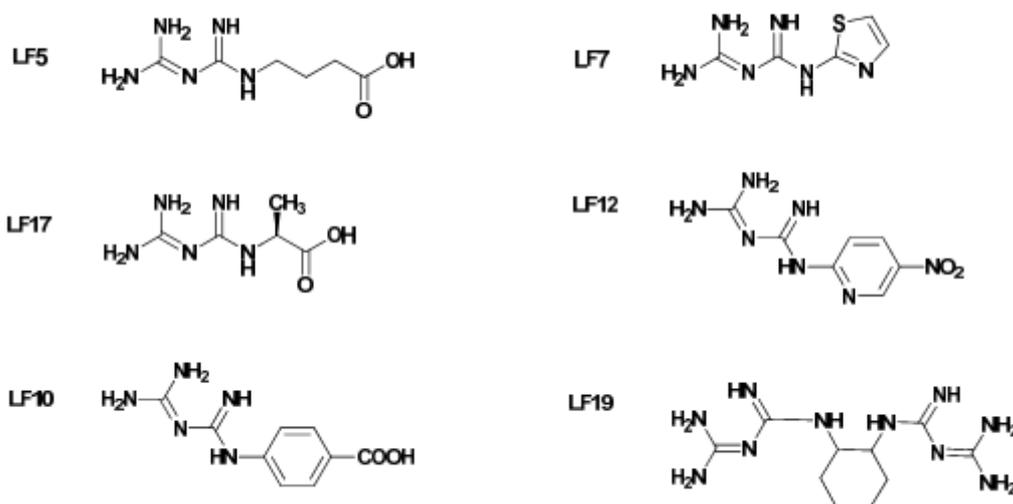


Figura 40 – Outras biguanidas utilizadas

5.2. Otimização da utilização da atividade enzimática ATPásica para quantificação celular

Para avaliar se o método das ATPases permite estimar um número de células equivalente ao estimado pelo método considerado padrão, a quantificação celular aferida pela atividade das desidrogenases, ambos os métodos foram aplicados a três diferentes linhas celulares, BRIN-BD11, MDST8 e MCF7.

5.2.1. Estudo em BRIN-BD11

A aplicação do método enzimático das desidrogenases à linha BRIN-BD11 permite obter uma curva de calibração para o número de células, que tem uma zona linear entre 1.250 e 15.000 células, perdendo a linearidade a partir desse valor, mas mantendo atividades crescentes (aferidas indiretamente pelo aumento da absorvância) até às 60.000 células (Figura 41).

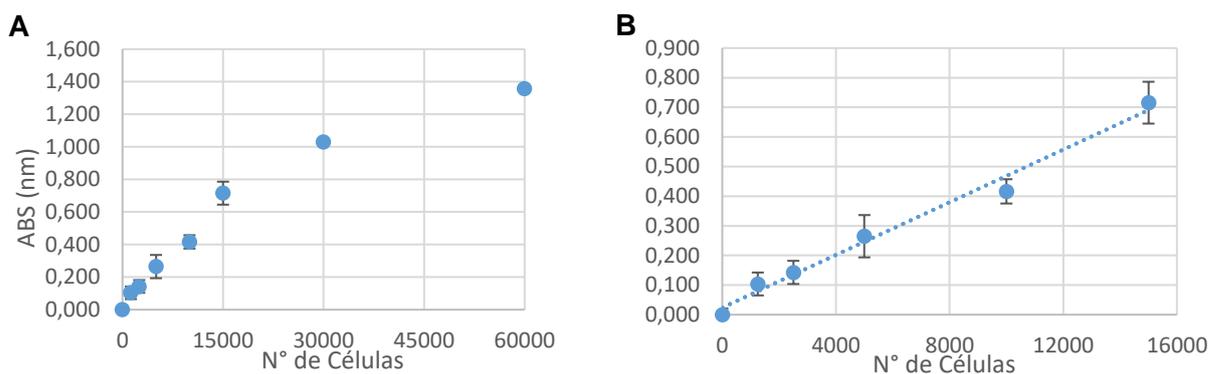


Figura 41 – Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular BRIN-BD11, pelo método das desidrogenases.

Em **A** representa-se a curva até 60.000 células e em **B** a porção linear da mesma, até às 15.000 células ($y=4,4 \cdot 10^{-5}x+1,3 \cdot 10^{-2}$ e $R^2=0,9777$). Resultados representativos da média \pm epm de três replicados.

A curva de calibração na zona linear que se obtém com este método (Figura 41 – B) apresenta um coeficiente de correlação próximo de 1 e um valor de p de $1,2 \cdot 10^{-4}$ (ver anexo, pág. iii), o que é indicativo de um bom ajuste linear.

A aplicação do método enzimático das ATPases à linha BRIN-BD11 permite obter uma curva de calibração para o número de células que, de forma equivalente ao observado para o método das desidrogenases, tem uma zona linear entre 1.250 e 15.000 células, perdendo a linearidade a partir desse valor, mas mantendo atividades crescentes até às 60.000 células (Figura 42).

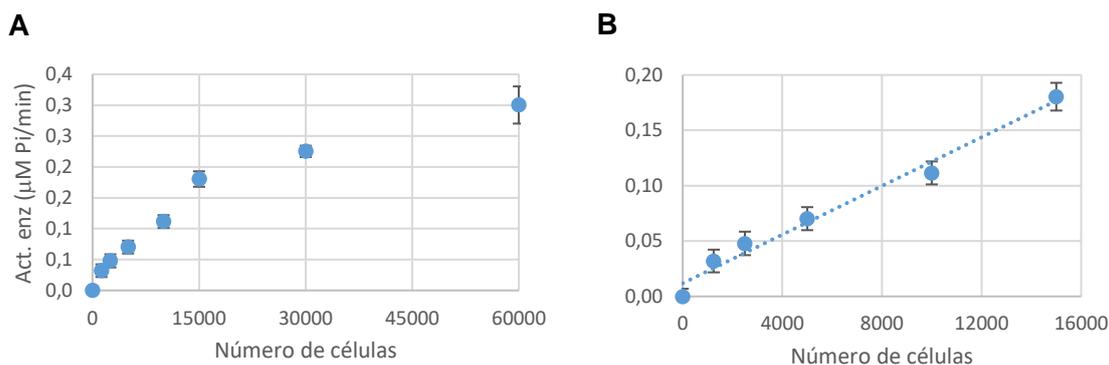


Figura 42 - Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular BRIN-BD11, pelo método das ATPases.

Em **A** representa-se a curva até 60.000 células e em **B** a porção linear da mesma, até às 15.000 células ($y=1,1 \cdot 10^{-5}x+7,98 \cdot 10^{-3}$ e $R^2=0,9702$). Resultados representativos da média \pm epm de oito replicados, obtidos em duas experiências independentes.

A curva de calibração na zona linear que se obtém com o método das ATPases (Figura 42 – B) apresenta um coeficiente de correlação próximo de 1, e um valor de p de $2,1 \times 10^{-4}$ (ver anexo, pág. iii), o que é indicativo de um bom ajuste linear.

Aplicando as curvas de calibração aos resultados dos ensaios, de forma a calcular o número de células, conseguimos estudar o efeito dos compostos de controlo, 5-fluoruracilo (5-FU) e metformina (Met) (Figura 43).

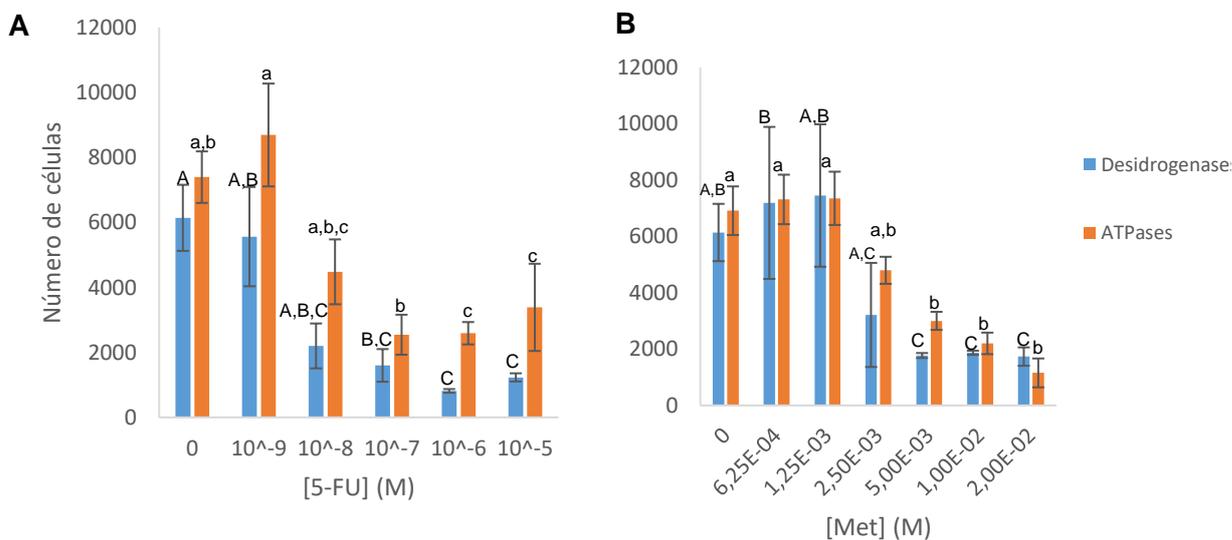


Figura 43 - Viabilidade celular dos controlos relativa ao número de células, para a linha celular BRIN-BD11, pelos métodos das desidrogenases e das ATPases.

Em **A** representa-se o controlo 5-FU e em **B** representa-se o controlo Met, ambos para um plaqueamento inicial de 5.000 células. Resultados representativos da média \pm epm (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$, sendo utilizadas maiúsculas e minúsculas para dados relativos a desidrogenases e ATPases, respetivamente). Este estudo foi realizado com 1% de FBS.

Para o 5-FU, no método das desidrogenases (Figura 43 – A, a azul), observamos que para uma concentração de 10^{-9} M de 5-FU não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo, e para concentrações entre 10^{-8} de 10^{-5} M registou-se um decréscimo acentuado do número de células, contudo só estatisticamente significativo a partir de 10^{-7} M. Tendo em conta que o número de células aplicado foi 5.000 células/poço, podemos concluir que as concentrações de 5-FU, neste método, a partir de 10^{-7} M, nesta situação experimental (1% FBS), têm um efeito tóxico. No método das ATPases (Figura 43 - A, a laranja), observamos que para uma concentração de 10^{-9} M de 5-FU não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo, e para concentrações entre 10^{-8} de 10^{-5} M registou-se um decréscimo do número de células, apenas estatisticamente significativo a partir de 10^{-6} M. Também com o método das ATPases se observou que o 5-FU a partir de 10^{-7} M, nesta situação experimental (1%FBS), tem um efeito tóxico.

Para a metformina, no método das desidrogenases (Figura 43 – B, a azul), observamos que para as concentrações de $6,25 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ M não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo, no entanto, para concentrações acima de 5×10^{-3} M observamos um decréscimo no número de células. Tendo em conta que o número de células aplicado foi 5.000 células/poço, podemos concluir que estas concentrações de Met entre $5-20 \times 10^{-3}$ M, nesta situação experimental (1%FBS), têm um efeito tóxico. Os resultados obtidos com o método das ATPases (Figura 43 – B, a laranja) são equivalentes.

Os resultados obtidos nos ensaios permitiram obter um gráfico dose-resposta que nos leva a determinar o valor de IC50 para cada composto (Figura 44 e Figura 45). Como o efeito observado é a toxicidade, este valor IC50 caracteriza a concentração de composto para a qual se obtém 50% de efeito tóxico.

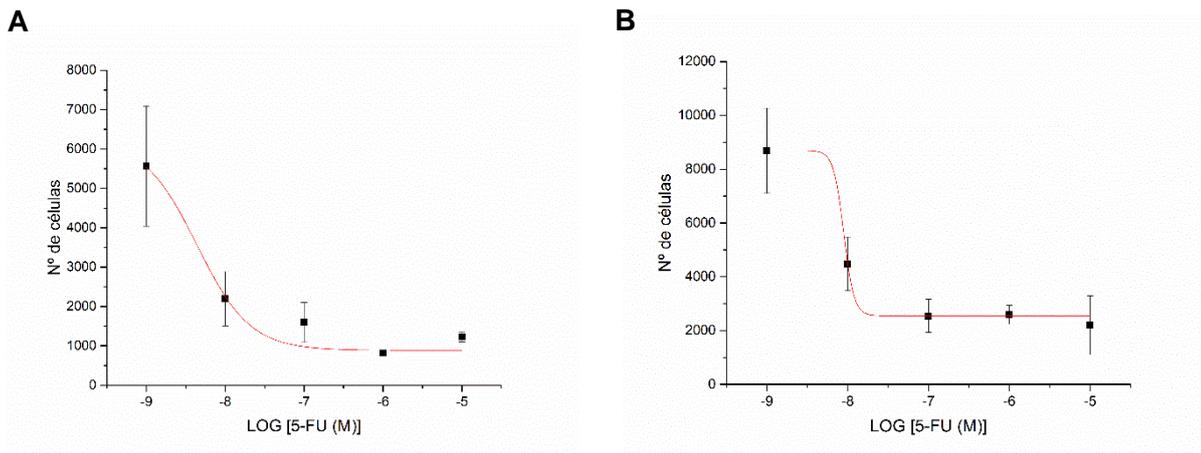


Figura 44 – Gráficos dose-resposta para o 5-FU, em que A representa o gráfico dose-resposta para o método das desidrogenases e B para o método das ATPases.

Para o 5-FU, para o método das desidrogenases (Figura 44 – A) obtemos um IC50 para uma concentração de $4,4 \times 10^{-9} \text{ M} \pm 4,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ e para o método das ATPases (Figura 44 – B) obtemos um valor de IC50 para uma concentração de $8,9 \times 10^{-9} \text{ M} \pm 3,4 \times 10^{-8} \text{ M}$.

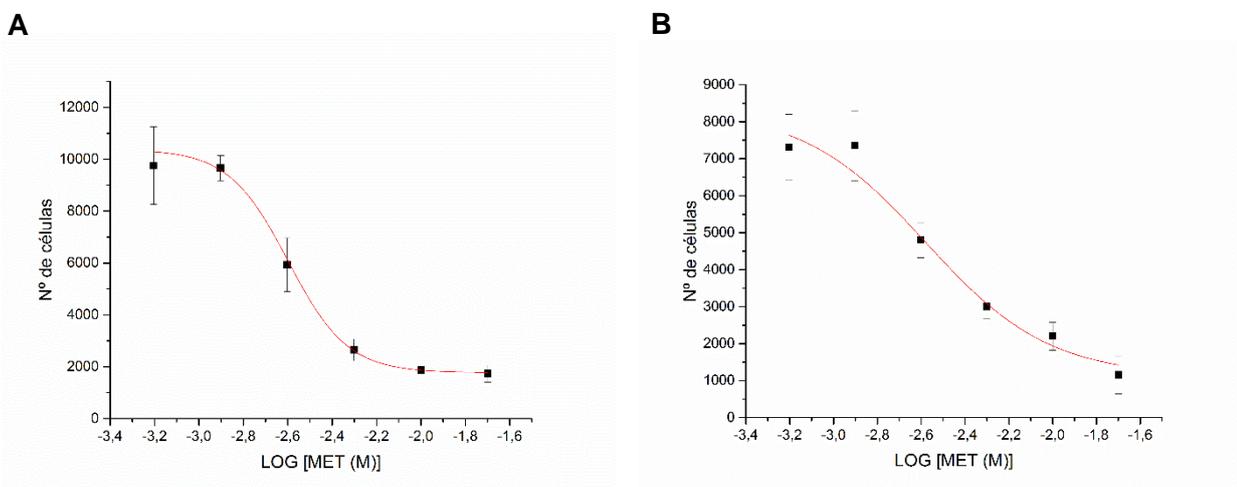


Figura 45 – Gráficos dose-resposta para a Met, em que A representa o gráfico dose-resposta para o método das desidrogenases e B para o método das ATPases.

Para a metformina, para o método das desidrogenases (Figura 45 – A) obtemos um IC50 para uma concentração de $2,5 \times 10^{-3} \text{ M} \pm 1,6 \times 10^{-4} \text{ M}$ e para o método das ATPases (Figura 45 – B) obtemos um valor de IC50 para uma concentração de $2,6 \times 10^{-3} \text{ M} \pm 8,6 \times 10^{-4} \text{ M}$. Quer no caso do 5-FU, quer no caso da Met, os valores de IC50 obtidos pelos dois métodos, tendo em conta a variação de cada um, são equivalentes.

Ao estabelecer uma correlação entre os dois métodos de viabilidade celular (Figura 46), para a linha BRIN-BD11, através do coeficiente de correlação, podemos concluir que, quer utilizando a absorvância aferida indiretamente (Figura 46 – A), quer pelo cálculo do número de células (Figura 46 – B) estes dois métodos apresentam uma correlação muito forte.

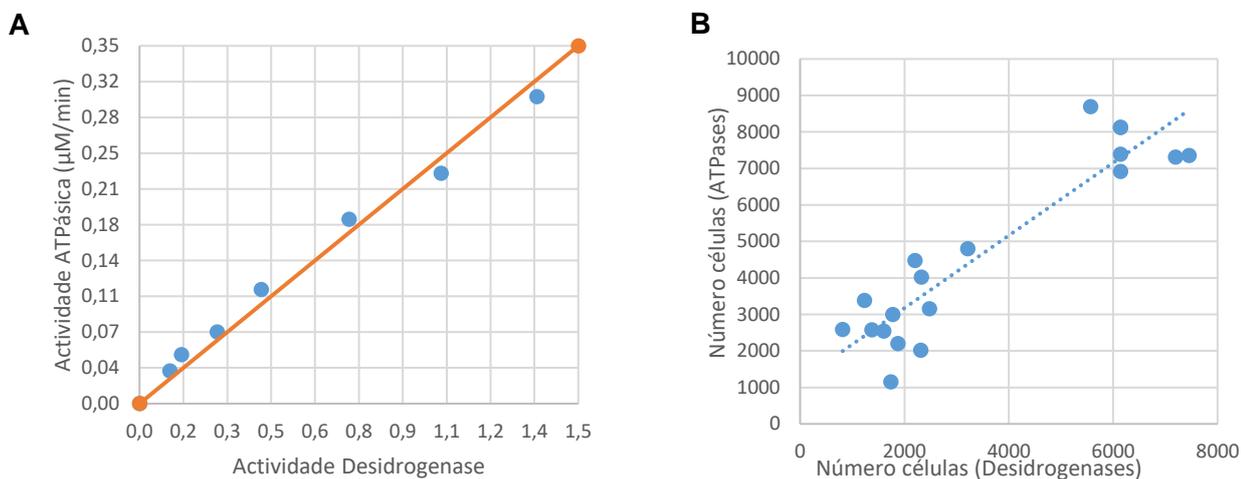


Figura 46 – Correlação relativa à absorvância aferida indiretamente (A) e relativa ao número de células (B), para a linha celular BRIN-BD11.
Coeficiente de correlação de 0,996 em A e coeficiente de correlação de 0,920 em B.

Tomados em conjunto, estes resultados apontam para a possibilidade de utilizar o método das ATPase para a quantificação celular em células BRIN-BD11.

5.2.2. Estudo em MDST8

A aplicação do método enzimático das desidrogenases à linha MDST8 permite obter uma curva de calibração para o número de células que pode ser visualizada na Figura 47 -A.

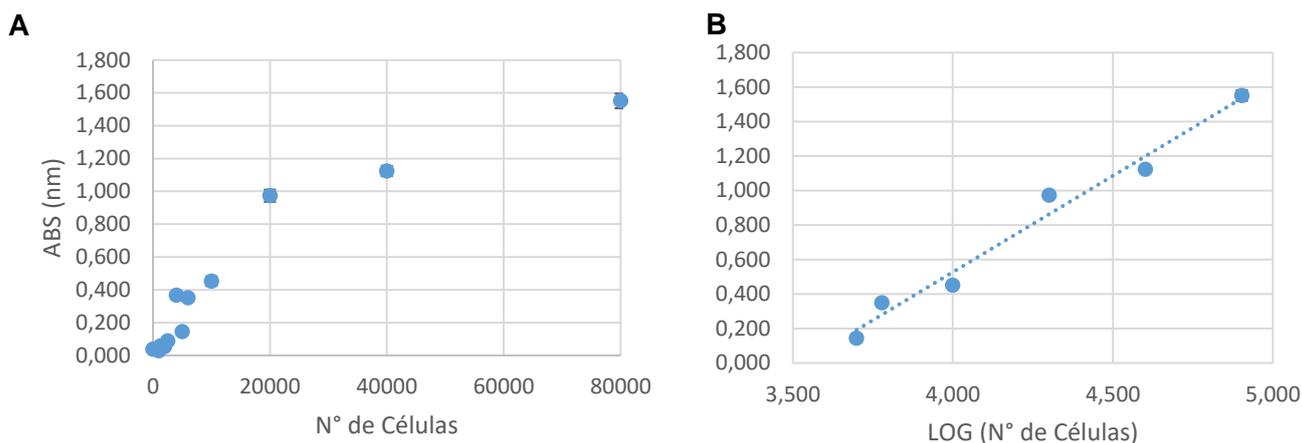


Figura 47 – Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular MDST8, pelo método das desidrogenases.

Em **A** representa-se a curva até 80.000 células e em **B** a porção logarítmica da mesma, das 5.000 às 80.000 células ($y=1,1 \cdot 10^{-5}x-3,86$ e $R^2=0,9698$). Resultados representativos da média \pm epm de seis replicados, obtidos em duas experiências independentes.

Na curva da Figura 47-A poder ser identificada uma zona linear entre 0 e 20.000 células, não apresentada em gráfico, com equação de reta $y=1,1 \cdot 10^{-5}x-3,86$, com r^2 de 0,9698 e valor de p de $3,2 \times 10^{-5}$ (ver anexo, pág. iv).

A curva de calibração logarítmica (Figura 47 - B) resulta do ajuste linear ao tratamento logarítmico realizado a todo o conjunto de valores apresentados em A e representa a atividade em função do logaritmo do número de células. Esta representação permite o cálculo do número de células no intervalo até às 80.000, o que para ensaios de proliferação celular pode ser muito útil. Este ajuste apresenta um coeficiente de correlação próximo de 1 e um valor de p de $2,2 \times 10^{-4}$.

A aplicação do método enzimático das ATPases à linha MDST8 permite obter uma curva de calibração para o número de células (Figura 48 - A). A porção linear desta curva tem dois padrões e ocorre no intervalo entre 0 e 2.500 células.

Também neste caso se realizou o ajuste linear ao tratamento logarítmico do número de células (Figura 48 – B). Este ajuste permite a utilização da curva até às 60.000 células e apresenta um coeficiente de correlação próximo de 1 e um valor de p de $3,7 \times 10^{-4}$ (ver anexo, pág. iv), o que é indicativo de um bom ajuste linear.

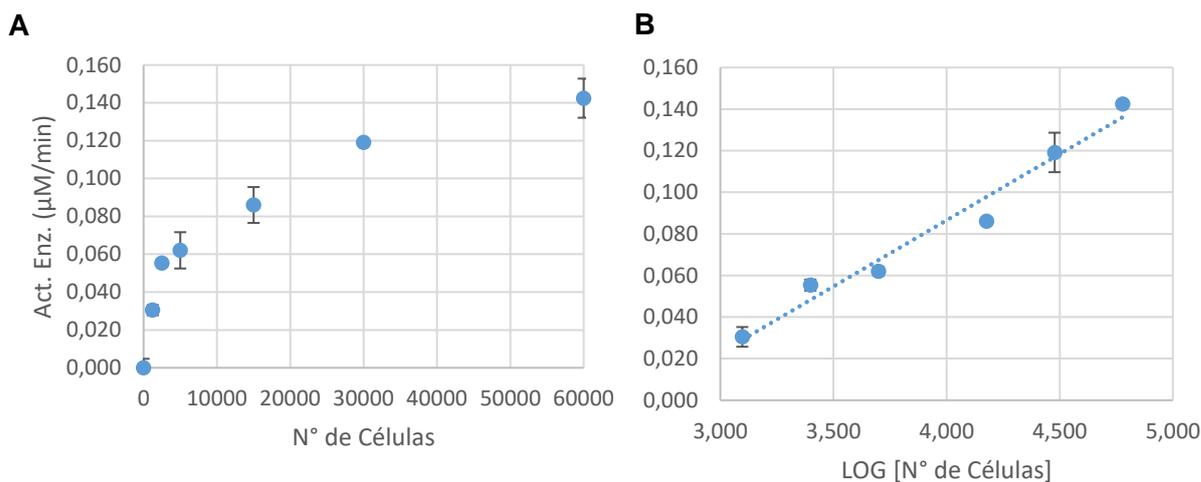


Figura 48 - Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular MDST8, pelo método das ATPases.

Em **A** representa-se a curva até 60.000 células e em **B** a porção logarítmica da mesma, das 1.250 às 60.000 células ($y=6,4 \cdot 10^{-2} \cdot x - 0,16$ e $R^2=0,9611$). Resultados representativos da média \pm epm de oito replicados, obtidos em duas experiências independentes.

Aplicando as curvas de calibração aos resultados dos ensaios, de forma a calcular o número de células, conseguimos estudar o efeito dos compostos de controlo, 5-Fluoruracilo (5-FU) e Metformina (Met) (Figura 49).

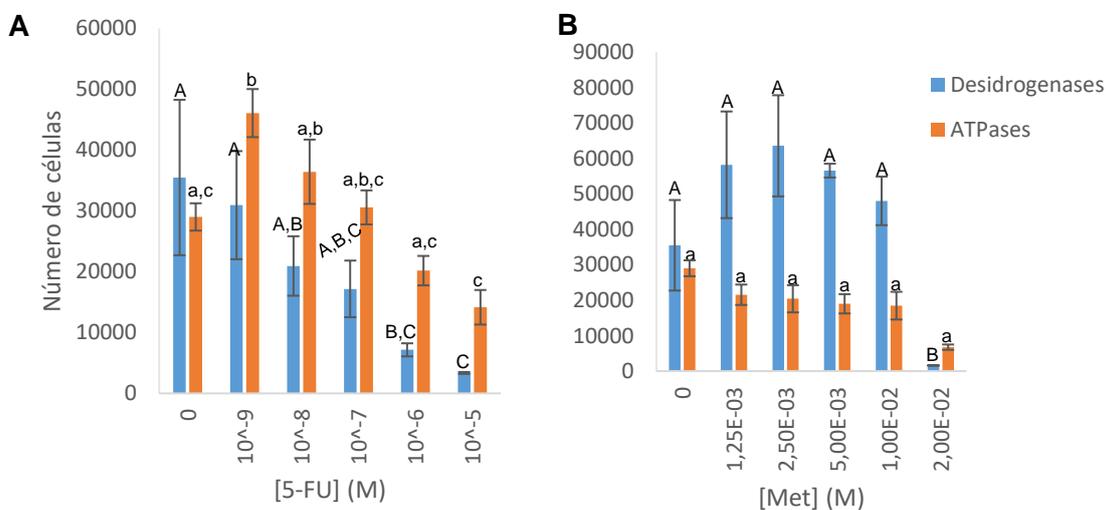


Figura 49 – Viabilidade celular dos controlos relativa ao número de células, para a linha celular MDST8, pelos métodos das desidrogenases e das ATPases.

Em **A** representa-se o controlo 5-FU e em **B** representa-se o controlo Met, ambos para um plaqueamento inicial de 4.000 células. Resultados representativos da média \pm epm (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$, sendo utilizadas maiúsculas e minúsculas para dados relativos a desidrogenases e ATPases, respetivamente). Este estudo foi realizado com 1% de FBS.

Para o 5-FU, no método das desidrogenases (Figura 49- A, a azul), observamos que para concentrações entre 10^{-9} M e 10^{-7} M de 5-FU não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo, e para as concentrações de 10^{-6} e de

10^{-5} M registou-se um decréscimo acentuado do número de células, contudo só estatisticamente significativo a partir de 10^{-5} M. Tendo em conta que o número de células aplicado foi 4.000 células/poço, podemos concluir que para a concentração de 5-FU de 10^{-5} M, nesta situação experimental (10%FBS), tem um efeito tóxico. Para o método das ATPases (Figura 49- A, a laranja), observamos que para as concentrações entre 10^{-8} e 10^{-6} M de 5-FU não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo, e para a concentração 10^{-9} M há um aumento do número de células e para a concentração de 10^{-5} M. Registou-se um decréscimo do número de células, tendo, este sido mais acentuado para as concentrações ente 10^{-6} e 10^{-5} M.

Para a metformina, no método das desidrogenases (Figura 49 – B, a azul), observamos que para concentrações entre $6,25 \times 10^{-4}$ e 1×10^{-2} M não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo, já para a concentração de 2×10^{-2} M, observamos um decréscimo significativo no número de células. Uma vez que o número de células aplicado foi 4.000 células/poço, podemos concluir que esta concentração de Met, nesta situação experimental (10%FBS), tem um efeito tóxico. Para a metformina, no método das ATPases (Figura 49 – B, a laranja), observamos que não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo, para nenhuma das concentrações estudadas.

Através dos resultados obtidos nos ensaios, não foi possível obter um gráfico dose-resposta que nos leve a determinar, com rigor, o valor de IC50 para o 5-FU.

Para a metformina, não conseguindo obter um gráfico dose-resposta, podemos apenas saber que o IC50 se vai localizar entre as concentrações de 1×10^{-2} e 2×10^{-2} M, uma vez que é onde se observa um decréscimo no número de células.

Ao estabelecer uma correlação entre os dois métodos de viabilidade celular (Figura 50), para a linha MDST8, calculando o coeficiente de correlação, podemos concluir que estes dois métodos apresentam uma correlação muito forte.

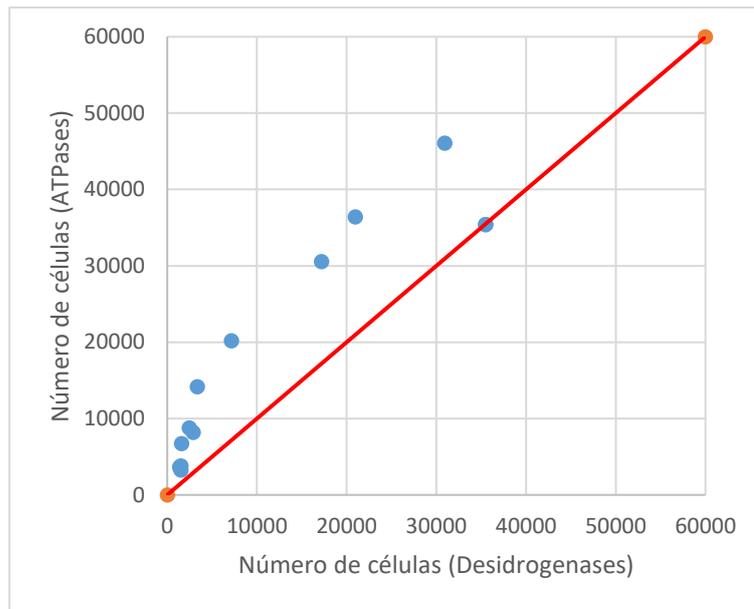


Figura 50 – Correlação relativa ao número de células, para a linha celular MDST8.
Verificamos um coeficiente de correlação de 0,928.

5.2.3. Estudo em MCF7

A aplicação do método enzimático das desidrogenases à linha MCF7 permite obter uma curva de calibração para o número de células, que tem valores crescentes até às 40.000 células (Figura 51).

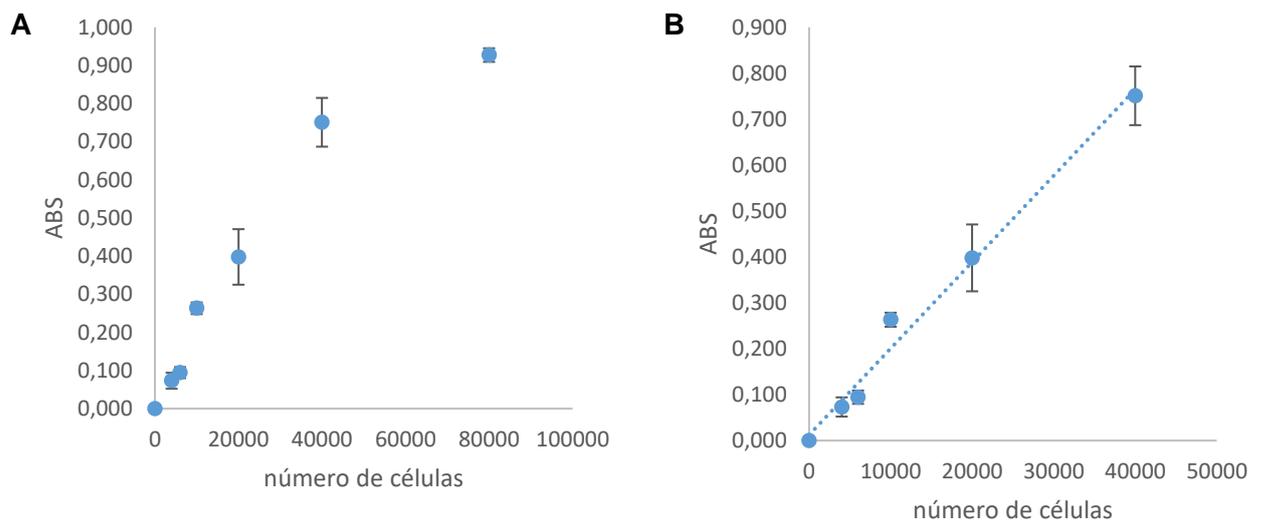


Figura 51 – Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular MCF7, pelo método das desidrogenases.

Em A representa-se a curva até 60.000 células e em B a porção linear da mesma, até às 40.000 células ($y=2,13 \cdot 10^{-5}x - 1,53 \cdot 10^{-5}$ e $R^2=0,9580$). Resultados representativos da média \pm epm de três replicados.

É possível realizar um ajuste linear entre as 2.500 e as 40.000 células. A curva de calibração na zona linear que se obtém com este método (Figura 51 – B) apresenta um coeficiente de correlação próximo de 1 e um valor de p de $6,7 \times 10^{-4}$ (ver anexo, pág. iv).

A aplicação do método enzimático das ATPases à linha MCF7 permite obter uma curva de calibração para o número de células, que tem uma zona linear entre 2.500 e 5.000 células, perdendo a linearidade a partir desse valor, mas mantendo atividades crescentes (aferidas indiretamente pelo aumento da absorvância) até às 60.000 células (Figura 52).

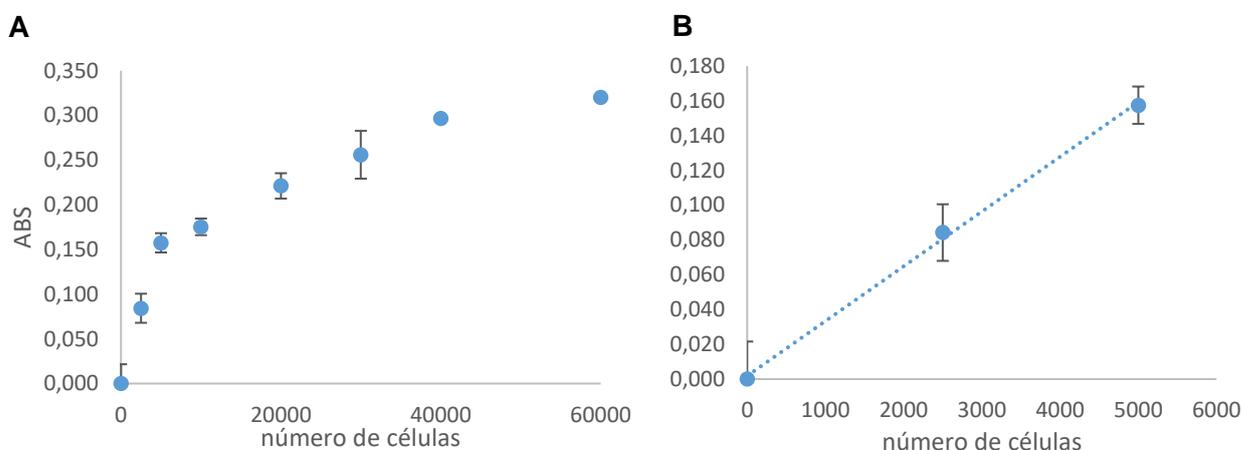


Figura 52 - Curva de calibração relativa ao número de células, para a linha celular MCF7, pelo método das ATPases.

Em **A** representa-se a curva até 60.000 células e em **B** a porção linear da mesma, até às 5.000 células ($y=6,4 \cdot 10^{-2} \cdot x - 0,16$ e $R^2=0,9611$). Resultados representativos da média \pm epm de quatro replicados.

A curva de calibração na zona linear que se obtém com este método (Figura 52 – B) apresenta um coeficiente de correlação próximo de 1 e um valor de p de $2,5 \times 10^{-2}$ (ver anexo, pág. v).

Aplicando as curvas de calibração aos resultados dos ensaios, de forma a calcular o número de células, conseguimos estudar o efeito dos compostos de controlo, 5-Fluoruracilo (5-FU) e Metformina (Met) (Figura 53).

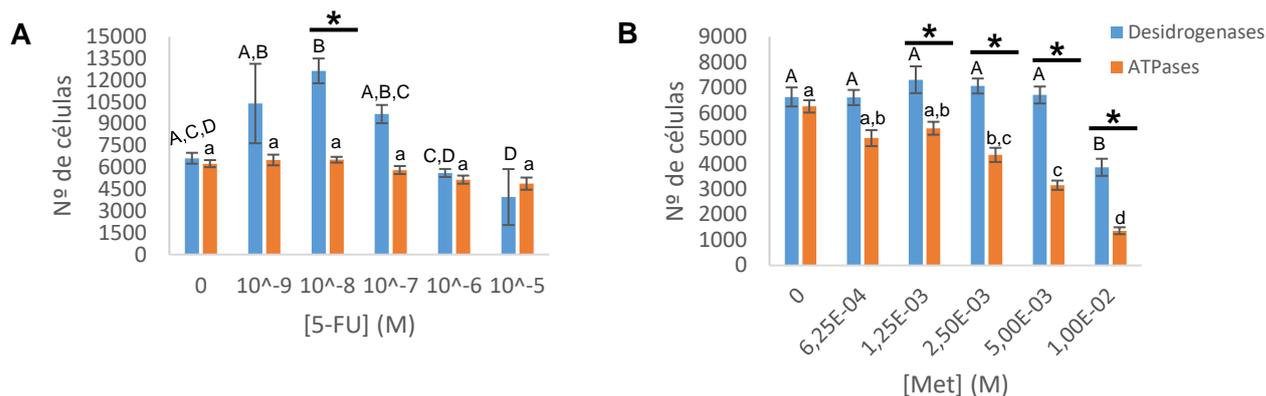


Figura 53 – Viabilidade celular dos controlos relativa ao número de células, para a linha celular MCF7, pelo método das desidrogenases e das ATPases.

Em **A** representa-se o controlo 5-FU e em **B** representa-se o controlo Met, ambos para um plaqueamento inicial de 10000 células. Resultados representativos da média ± epm (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes dentro do mesmo grupo e por * entre grupos diferentes, com $p < 0,05$, sendo utilizadas maiúsculas e minúsculas para dados relativos a desidrogenases e ATPases, respetivamente). Este estudo foi realizado com 1% de FBS.

Para o 5-FU, no método das desidrogenases (Figura 53 - A, a azul), observamos que há diferença significativa relativamente ao controlo na concentração 10^{-8} M de 5-FU, contudo, o número de células estimado com esta concentração não é diferente do calculado para as concentrações 10^{-9} ou 10^{-7} M, pelo que não deverá apresentar significado biológico. Para o método das ATPases (Figura 53 - A, a laranja), observamos que não há diferenças significativas entre as concentrações utilizadas, quer entre si, quer relativamente ao controlo.

Para a metformina, no método das desidrogenases (Figura 53 – B, a azul), observamos que para as concentrações até 5×10^{-3} M não há alterações significativas do número de células entre si e relativamente ao controlo. Para o método das ATPases (Figura 53 – B, a laranja), observamos que até $1,25 \times 10^{-3}$ M não há alterações significativas, relativamente ao controlo. Observamos um decréscimo no número de células para as concentrações entre $2,5 \times 10^{-3}$ e 1×10^{-2} M, sendo que este é mais acentuado na última concentração. Comparando os resultados de número de células estimados com os dois métodos, observamos diferenças significativas nas concentrações a partir de $1,25 \times 10^{-3}$ M. No caso concreto deste ensaio realizado com 1% de FBS, o efeito observado com as referidas concentrações de metformina é de toxicidade celular, podendo observar-se que o número de células estimado pelo método das ATPases é menor. Como neste método há lavagem dos poços, sendo retiradas células não aderentes, pode ser este o motivo pelo qual se estima um número de células menor.

Através dos resultados obtidos nos ensaios, não nos foi possível determinar os valores de IC50 para o 5-FU e Met, na linha MCF7.

Ao estabelecer uma correlação entre os dois métodos de viabilidade celular (Figura 54), para a linha MCF7, através do coeficiente de correlação, podemos concluir que estes dois métodos apresentam uma correlação moderada.

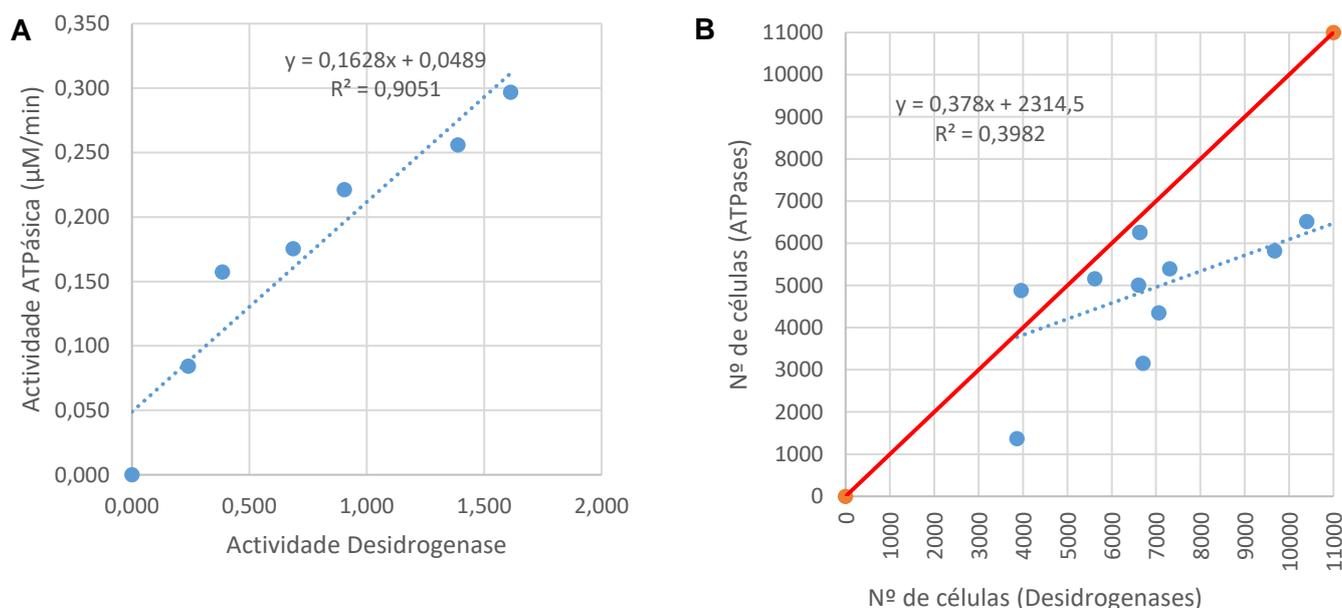


Figura 54 – Correlação relativa à absorvância aferida indiretamente (A) e relativa ao número de células (B), para a linha celular MCF7.
Em **A** verificamos um coeficiente de correlação de 0,951 e em **B** um coeficiente de correlação de 0,631.

5.2.4. Considerações gerais

Nos estudos para a otimização da utilização da atividade enzimática ATPásica para quantificação celular utilizando as linhas celulares BRIN-BD11, MDST8 e MCF7, observou-se, através dos testes e das correlações feitas para as três linhas celulares, podemos afirmar que os métodos das desidrogenases e das ATPases conseguem estimar números semelhantes de células.

Em todas as linhas, nas suas curvas de calibração, verificamos que a fração linear das mesmas varia.

Como tal, para os estudos de efeito anti-proliferativo, vai ser utilizado o método das ATPases, uma vez que é mais pático e económico.

5.3. Estudo do efeito anti-proliferativo dos compostos

5.3.1. Estudo em MDST8

Aplicando a curva de calibração do método das ATPases, para a linha celular MDST8, aos resultados dos ensaios, de forma a calcular o número de células, conseguimos estudar o efeito dos compostos sintetizados (LF5, LF7, LF10.1, LF12, LF17, LF19, MG1.2 e MG7) nas mesmas.

5.3.1.1. LF5

Para o composto LF5 (Figura 55), observamos que para todas as concentrações, de $6,25 \times 10^{-4}$ a 2×10^{-2} M não há alterações significativas do número de células entre estas. Pode, no entanto, identificar-se diferença estatisticamente significativa entre o número de células do controlo e o número de células estimado na presença de LF5 nas concentrações de $2,5 \times 10^{-3}$, 5×10^{-3} e 2×10^{-2} M.

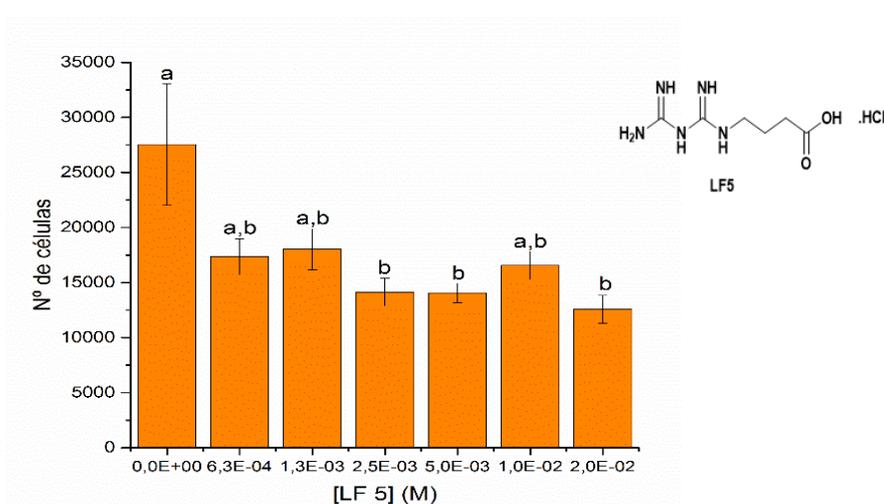


Figura 55 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF5.

Resultados representativos da média \pm epm de quatro replicados (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$). Este estudo foi realizado com 10% de FBS.

Podemos então concluir que, apesar de não se identificar nesta gama de concentrações um efeito dose-resposta, há efeito anti-proliferativo a partir de $2,5 \times 10^{-3}$ M, que é no máximo de aproximadamente 60% (este cálculo tem em conta o número de células inicialmente aplicadas por poço, que foi de 4.000). Tendo em conta estes resultados, não é possível calcular para o composto LF5 um valor de IC50.

5.3.1.2. LF7

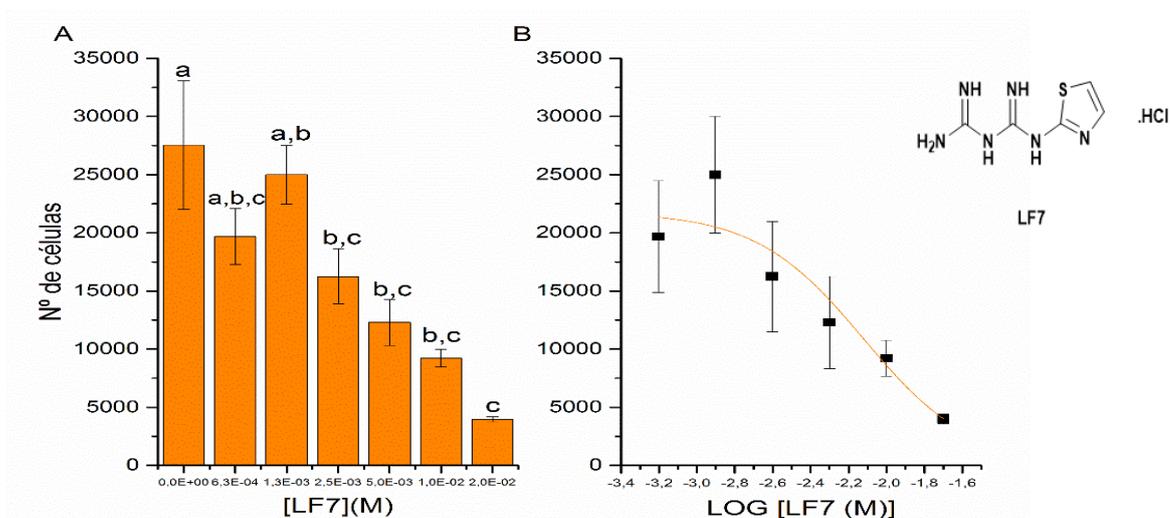


Figura 56 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF7.

Em **A** representa-se o estudo da viabilidade celular e em **B** o gráfico dose-resposta. Resultados representativos da média \pm epm de quatro replicados (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$). Este estudo foi realizado com 10% de FBS.

Para o composto LF7 (Figura 56 – A), observamos que para as concentrações de $6,25 \times 10^{-4}$ e $1,25 \times 10^{-3}$ M não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo. No entanto, para concentrações acima de $2,5 \times 10^{-3}$ observa-se um decréscimo no número de células, sendo que este é máximo para a concentração 2×10^{-2} M, em que o número de células estimado corresponde ao número de células semeadas. Assim, o composto LF7 apresenta na concentração 2×10^{-2} M um efeito anti-proliferativo de 100%, sem apresentar toxicidade nesta gama de concentrações.

Para o LF7 obtém-se um valor de IC₅₀ de $7,6 \times 10^{-3}$ M \pm $2,0 \times 10^{-3}$ M (Figura 56 – B).

5.3.1.3. LF10.1

Com o composto LF10.1 (Figura 57 – A), observa-se que, para as concentrações entre $6,25 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-3}$ M não há alterações significativas do número de células relativamente ao controlo. No entanto, para concentrações acima de 5×10^{-3} M, observa-se um decréscimo no número de células nos poços. Esta redução é de cerca de 90% na concentração 2×10^{-3} M.

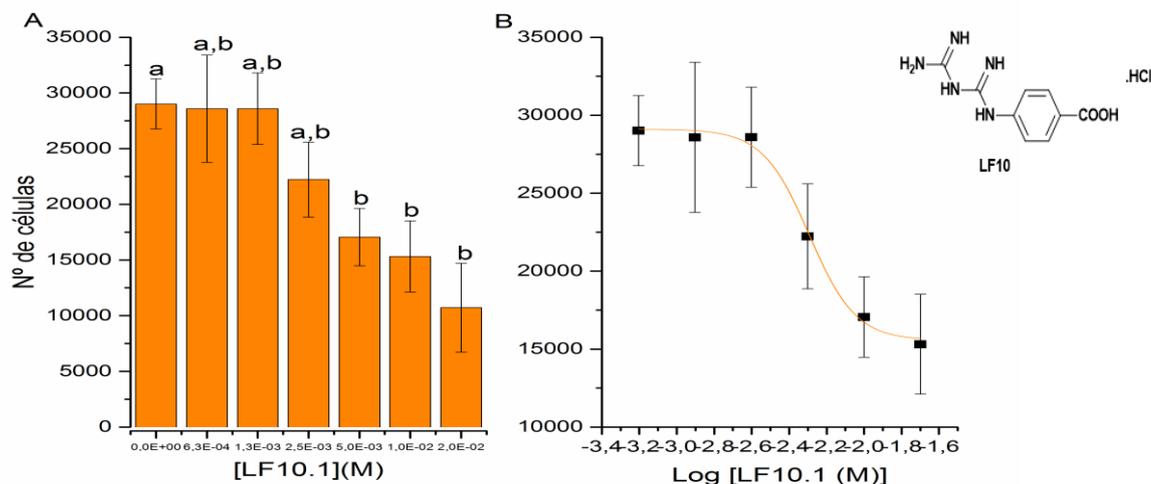


Figura 57 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF10.1.

Em **A** representa-se o estudo da viabilidade celular e em **B** o gráfico dose-resposta. Resultados representativos da média \pm epm de quatro replicados (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$). Este estudo foi realizado com 10% de FBS.

Para o composto LF10.1 obtém-se um valor de IC₅₀ de $4,3 \times 10^{-3} \text{ M} \pm 6,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Figura 57 – B).

5.3.1.4. LF12

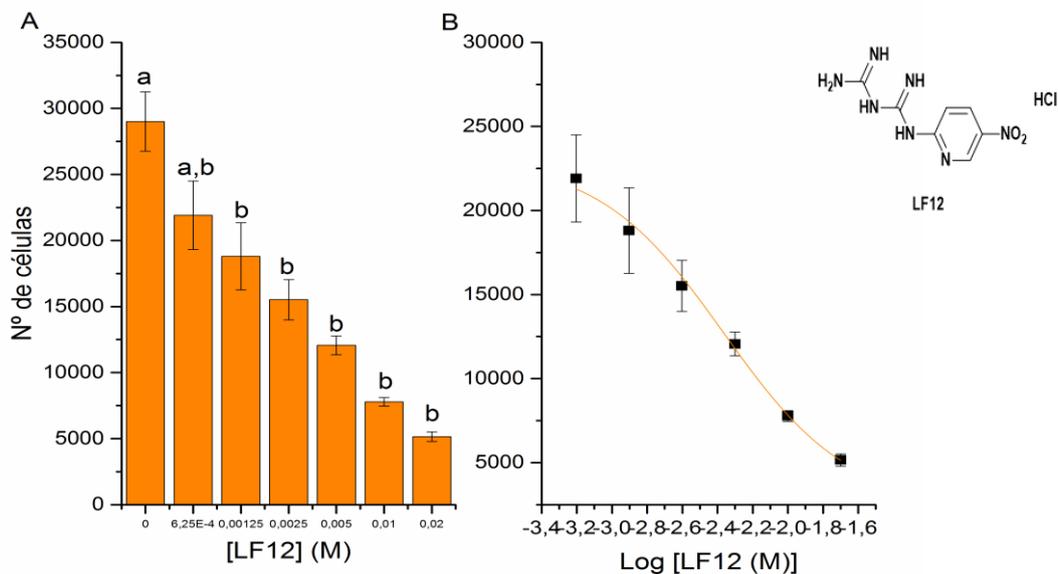


Figura 58 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF12.

Em **A** representa-se o estudo da viabilidade celular e em **B** o gráfico dose-resposta. Resultados representativos da média \pm epm de quatro replicados (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$). Este estudo foi realizado com 10% de FBS.

Para o composto LF12 (Figura 58 – A), observa-se que para a concentração $6,25 \times 10^{-4}$ M não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo. Para concentrações acima de $1,25 \times 10^{-3}$ M observa-se um decréscimo no número de células, sendo que este efeito é máximo na concentração 2×10^{-2} M, onde se consegue uma redução na proliferação celular de 95%.

O valor de IC₅₀ obtido para o composto LF12, (Figura 58 – B) é de $5,1 \times 10^{-3}$ M \pm $3,3 \times 10^{-4}$ M.

5.3.1.5. LF17

Para o composto LF17 (Figura 59 – A), observa-se que para as concentrações de $6,25 \times 10^{-4}$ a 5×10^{-3} M não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo (com exceção da concentração $1,25 \times 10^{-3}$ M, em que se estima um número de células superior ao do controlo). No entanto, para concentrações acima de 1×10^{-2} M, observa-se um decréscimo no número de células, sendo que este atinge um valor absoluto de 3054 ± 835 células (média \pm epm) na concentração 2×10^{-2} M. Tendo em conta que o número de células aplicado foi 4.000 células/poço, podemos suspeitar que a concentração de LF17 de 2×10^{-2} M possa ter já um efeito tóxico.

Para o composto LF17, (Figura 59 – B), obtém-se um valor de IC₅₀ de $6,1 \times 10^{-3}$ M \pm $1,8 \times 10^{-3}$ M.

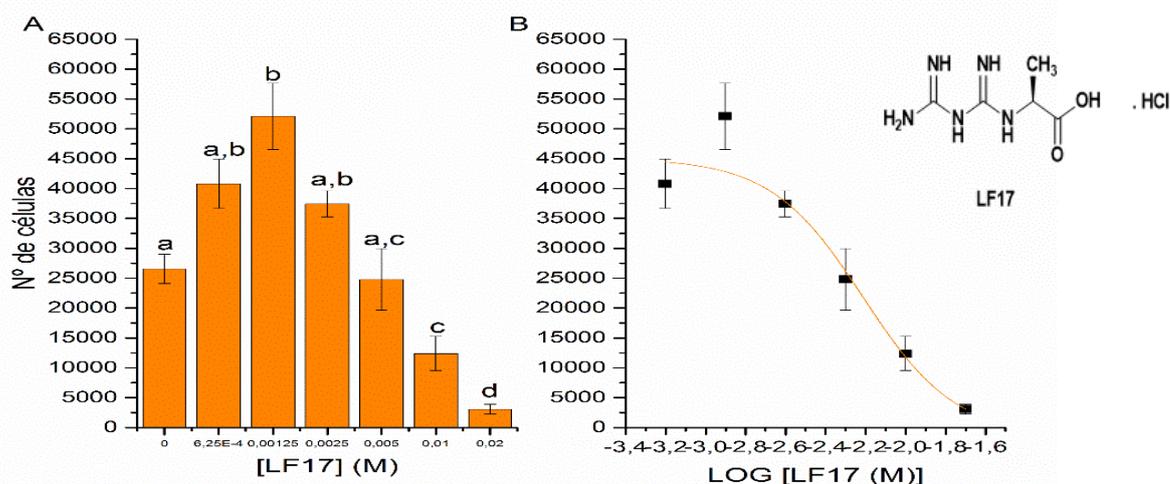


Figura 59 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF17.

Em **A** representa-se o estudo da viabilidade celular e em **B** o gráfico dose-resposta. Resultados representativos da média \pm epm de quatro replicados (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$). Este estudo foi realizado com 10% de FBS.

5.3.1.6. LF19

Para o composto LF19 (Figura 60 – A), observa-se que para as concentrações de $6,25 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-3}$ M não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo, no entanto, para concentrações acima de 5×10^{-3} M observa-se efeito anti-proliferativo, com um valor máximo a 1×10^{-2} M, o qual é de cerca de 100%.

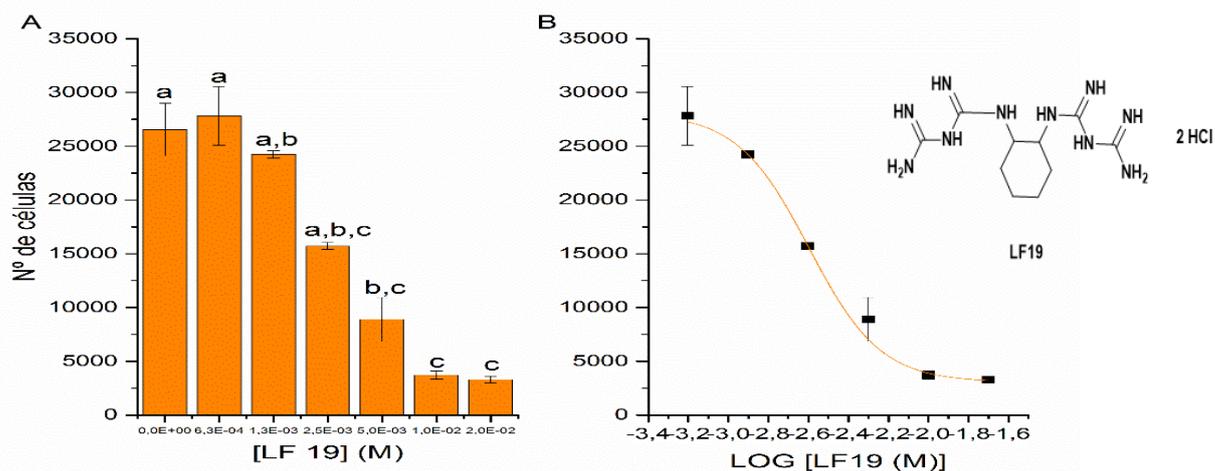


Figura 60 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto LF19.

Em A representa-se o estudo da viabilidade celular e em B o gráfico dose-resposta. Resultados representativos da média \pm epm de quatro replicados (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$). Este estudo foi realizado com 10% de FBS.

Para o composto LF19 obtém-se um valor de IC₅₀ de $2,5 \times 10^{-3}$ M \pm $1,3 \times 10^{-4}$ M (Figura 60 - B).

5.3.1.7. MG1.2

Para o composto MG1.2 (Figura 61– A), observa-se que para as concentrações entre $6,25 \times 10^{-4}$ e 5×10^{-3} M não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo. No entanto, para concentrações acima de 1×10^{-2} M, observamos um decréscimo no número de células, que é cerca de 96% para a concentração 2×10^{-2} M.

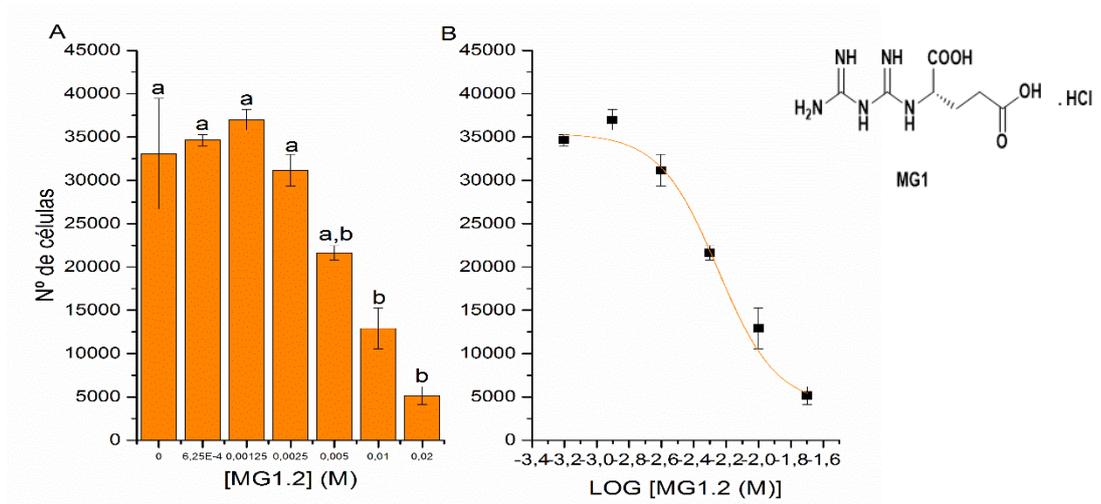


Figura 61 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto MG1.2.

Em A representa-se o estudo da viabilidade celular e em B o gráfico dose-resposta. Resultados representativos da média \pm epm de quatro replicados (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$). Este estudo foi realizado com 10% de FBS.

Para o composto MG1.2 determinou-se um valor de IC_{50} de $5,6 \times 10^{-3} \pm 8,4 \times 10^{-4}$ M (Figura 61 – B).

5.3.1.8. MG7

Para o composto MG7 (Figura 62 – A), observa-se que para as concentrações entre $6,25 \times 10^{-4}$ M e $2,5 \times 10^{-3}$ M não há alterações significativas do número de células, relativamente ao controlo. No entanto, para concentrações acima de 5×10^{-3} M observa-se um decréscimo no número de células, sendo que este é máximo na concentração 2×10^{-2} M. Com esta concentração obtém-se um número de células de 3349 ± 182 , o que sugere que, nesta concentração, o composto MG7 pode apresentar já efeito tóxico.

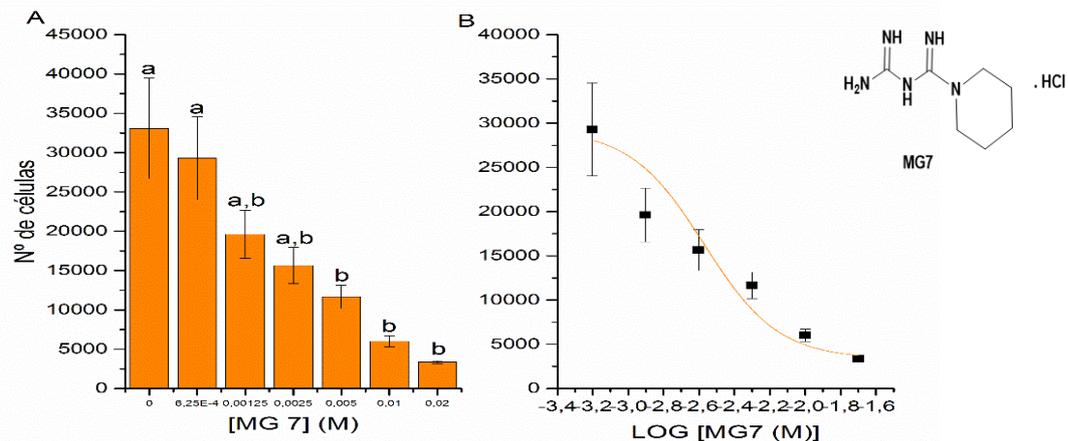


Figura 62 – Estudo anti-proliferativo utilizando o composto MG7.

Em **A** representa-se o estudo da viabilidade celular e em **B** o gráfico dose-resposta. Resultados representativos da média \pm epm de quatro replicados (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes, com $p < 0,05$). Este estudo foi realizado com 10% de FBS.

O valor de IC₅₀ que se obtém para o composto MG7 é de $2,7 \times 10^{-3} \pm 6,1 \times 10^{-4}$ M (Figura 62 – B).

5.3.2. Considerações finais

Tendo em conta o estudo de correlação entre os dois métodos para quantificação celular, e comparando o coeficiente de correlação obtido para cada uma das três linhas celulares utilizadas, a linha tumoral MDST8 foi a que apresentou um valor mais elevado (0,928), pelo que foi esta a linha utilizada para os ensaios enzimáticos com os compostos sintetizados.

Analisando os resultados relativos aos efeitos dos compostos sintetizados na proliferação celular, cujos resultados de IC₅₀ se encontram sistematizados na Tabela 1, verificamos que, de todos os compostos testados, apenas o LF5 não apresentou atividade anti-proliferativa. Todos os outros compostos apresentam atividade anti-proliferativa. Contudo, alguns dos compostos (LF17 e MG7) têm efeito tóxico nas concentrações mais elevadas estudadas.

Tabela 1 – Tabela resumo dos valores de IC50 dos compostos em estudo

Composto	IC50 (M)	Toxicidade
LF19	$2,5 \times 10^{-3} \pm 1,3 \times 10^{-4}$	—
MG7	$2,7 \times 10^{-3} \pm 6,1 \times 10^{-4}$	$> 2 \times 10^{-2} \text{M}$
LF10.1	$4,3 \times 10^{-3} \pm 6,2 \times 10^{-4}$	—
LF12	$5,1 \times 10^{-3} \pm 3,3 \times 10^{-4}$	—
MG1.2	$5,6 \times 10^{-3} \pm 8,4 \times 10^{-4}$	—
LF17	$6,1 \times 10^{-3} \pm 1,8 \times 10^{-3}$	$> 2,0 \times 10^{-2} \text{M}$
LF7	$7,6 \times 10^{-3} \pm 2,0 \times 10^{-4}$	—
LF5	—	—

Os compostos estudados que apresentaram melhor atividade anti-proliferativa têm IC50 da ordem de $2,5 - 2,9 \times 10^{-3} \text{M}$. Esses compostos são biguanidas cujos grupos substituintes possuem cadeias hidrocarbonadas cíclicas, alifáticas ou aromáticas *p*-substituídas, na sua estrutura. Estes grupos e estruturas podem conferir a estes compostos uma maior capacidade de penetração na membrana celular, por serem mais apolares.

O composto LF19, uma bis-biguanida, foi o composto estudado que apresentou melhor efeito anti-proliferativo.

6. Conclusões

O trabalho desenvolvido permitiu a síntese de diversas biguanidas com estruturas e grupos funcionais diferentes, tendo sido isolados seis compostos. Foram ainda sintetizados cinco compostos, mas não foi possível efetuar a sua purificação a partir da mistura obtida, sendo que na síntese de dois deles não se chegou ao composto pretendido (MG9 e MG13).

Foram efetuados estudos de proliferação celular nas linhas celulares BRIN-BD11, MDST8 e MCF7, utilizando como controlos os compostos 5-fluorouracilo e metformina, de modo a comparar o método das ATPases com o método das desidrogenases, utilizado como referência. Os resultados obtidos mostram que existe correlação entre os dois métodos em todas as linhas, permitindo estimar um número equivalente de células. No entanto, a linha MDST8 foi a que mostrou a melhor correlação.

O potencial anti-proliferativo dos compostos sintetizados foi avaliado na linha celular MDST8, utilizando como método de quantificação celular a determinação da atividade ATPásica, uma vez que este é mais económico.

O composto LF5 não mostra alterações significativas do número de células entre as diferentes concentrações, no entanto, identifica-se diferença significativa entre o número de células do controlo e das concentrações a partir de 2.5×10^{-3} M. Concluímos ainda que há um efeito anti-proliferativo de aproximadamente 60%.

O composto LF7, para concentrações acima de $2,5 \times 10^{-3}$, apresenta um decréscimo no número de células, sendo que este é máximo para a concentração de 2×10^{-2} M, em que o número de células estimado corresponde ao número de células semeadas. Assim temos um efeito anti-proliferativo de 100% na concentração 2×10^{-2} M sem apresentar toxicidade.

O composto LF10.1 para concentrações acima de 5×10^{-3} M, apresenta um decréscimo no número de células, que representa, na concentração 2×10^{-3} M, uma redução na proliferação celular de 90%.

O composto LF12, para concentrações acima de $1,25 \times 10^{-3}$ M, apresenta um decréscimo no número de células, sendo que este efeito é máximo na concentração 2×10^{-2} M, onde se consegue uma redução na proliferação celular de 95%.

O composto LF17, para concentrações acima de 1×10^{-2} M, apresenta um decréscimo no número de células, sendo que este composto tem um efeito tóxico na concentração 2×10^{-2} M.

O composto LF19, para concentrações acima de 5×10^{-3} M, apresenta um efeito anti-proliferativo, com um valor máximo a 1×10^{-2} M, que é de cerca de 100%.

O composto MG1.2, para concentrações acima de 1×10^{-2} M, apresenta um decréscimo no número de células, que representa uma atividade anti-proliferativa, para a concentração 2×10^{-2} M de cerca de 96%.

O composto MG7, para concentrações acima de 5×10^{-3} M apresenta um decréscimo no número de células, sendo que este é máximo na concentração 2×10^{-2} M. O composto MG7 pode apresentar já efeito tóxico para a concentração 2×10^{-2} M.

Com este método, podemos concluir, que para esta linha celular, os compostos LF7, LF10.1, LF12, LF17, LF19, MG1.2 e MG7 apresentam efeitos anti-proliferativos, sendo mais acentuados, principalmente a partir da concentração 5×10^{-3} M, exceto nos compostos LF17 e MG1.2 que é a partir da concentração 1×10^{-2} M. No entanto, o composto LF17, para concentrações mais elevadas apresenta um efeito tóxico. No caso do composto LF5, este não apresentou atividade anti-proliferativa.

Os compostos estudados que apresentaram melhor atividade anti-proliferativa têm IC50 da ordem de $2,5 - 2,9 \times 10^{-3}$ M. Esses compostos (LF 19 e MG 7) são biguanidas cujos grupos substituintes possuem cadeias hidrocarbonadas cíclicas, na sua estrutura.

Referências Bibliográficas

- Alves, E., & Guimarães, A. (2007). Cultivo celular. In E. Molinaro, L. Caputo, & M. Amendoeira (Eds.), *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde* (pp. 215–253). EPSJV/IOC.
- Anisimov, V. N. (2014). Do metformin a real anticarcinogen? A critical reappraisal of experimental data, *Annals of Translational Medicine*, 2(6), 25–28.
- Bailey, C. J., & Day, C. (2004). Metformin: Its botanical background. *Practical Diabetes International*, 21(3), 115–117.
- Brzozowski, Z., Saczewski, F., & Gdaniec, M. (2000). Synthesis, structural characterization and antitumor activity of novel. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35, 1053–1064.
- Chapman, W. H. (1933). Production of aminotriazines. US Patent # 2,299,274 United States Patent Office, 1–3.
- Choi, Y. K., & Park, K. G. (2013). Metabolic roles of AMPK and metformin in cancer cells. *Molecules and Cells*, 36(4), 279–287.
- Corbellini, A., Lugaro, G., Giannattasio, G., & Torti, G. (n.d.). Research on the antitumoral activity of the biguanides. IV. *Archivio Italiano Di Patologia E Clinica Dei Tumori*, 10(3), 197–210.
- Costa, A. R., Real, J., Antunes, C. M., & Cruz-Morais, J. (2010). A new approach for determination of Na,K-ATPase activity: Application to intact pancreatic β -cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 46(1), 7–10
- Dautry, R., Roca, P., Edjlali-goujon, M., Rabrait, C., Johnson, K., Wu, Y., Naggara, O., Rodriguez, C., Alshareef, F., Wieben, O., Oppenheim, C., Meder, J. (2013). MTS Cell Viability Assay of upcyte® hepatocyte Cultures Grown, Alvetex scaffold, 21, 2013.
- Diamond, J., Douglas, G. H., & Burns, B. J. (1973). 1-Substituted biguanides for treating hyperacidity or ulceration. US Patent # 3,959,488.
- Dil'man, V. M., Bershtein, L. M., Zabezhinskiĭ, M. A., & Aleksandrov, V. A. (1974). Effect of phenformin on mammary gland tumor induction in rats. *Voprosy Onkologii*, 20(9), 94–8.

- Duque, J. E., López, C., & Cruz, N. (2010). Antitumor mechanisms of metformin: Signaling, metabolism, immunity and beyond. *Universitas Scientiarum*, 15, 122–129.
- England, P. H. (n.d.). BRIN-BD11 48hr post seeding. Retrieved September 22, 2016, from http://www.phe-culturecollections.org.uk/media/57262/10033003_BRIN-BD11_48hr_post_seeding.jpg
- Faubert, B., Vincent, E. E., Poffenberger, M. C., & Jones, R. G. (2015). The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator. *Cancer Letters*, 356(2), 165–170.
- Faure, S. (2011). Biguanides. *Actualités Pharmaceutiques*, 50(506), 51–54.
- Fialho, L. (2015). *Síntese de compostos derivados das biguanidas e avaliação da sua atividade antiproliferativa*, Relatório de estágio de licenciatura em Bioquímica, 2015.
- Fullerton, M. D., Steinberg, G. R., & Schertzer, J. D. (2013). Immunometabolism of AMPK in insulin resistance and atherosclerosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 366(2), 224–234.
- Ghosh, P., Bag, S. P., Sur, B., & Sur, P. (1998). Antitumor properties of boron complexes with hydroxy biguanide and salicyl hydroxamic acid against Ehrlich ascites carcinoma. *Neoplasma*, 45(2), 68–72.
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMP-Activated Protein Kinase : A Target for Drugs both Ancient and Modern. *Chemistry & Biology*, 19(10), 1222–1236.
- Hechenbleikner, I., & Donald W, K. (1955). Preparation of biguanides. US Patent # 2,768,205.
- Hundal, R. S., & Inzucchi, S. E. (2003). Metformin: new understandings, new uses. *Drugs*, 63(18), 1879–94.
- Ishiyama, M., Miyazono, Y., Shiga, M., & Sasamoto, K. (1999). Water soluble tetrazolium salt compounds. Patente nº WO 97/38985.
- Júnior, A. C. S., Ugolini, M. R., Santomauro, A. T., & Souto, R. P. do. (2008). Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(1), 120–125.

- Katritzky, A. R., Tala, S. R., & Singh, A. (2010). Biguanidines , guanylureas and guanylthioureas. *Arkivoc*, 2010(viii), 76–96.
- Krentz, A. J., & Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65(3), 385–411.
- Lebel, O., Maris, T., Duval, H., & Wuest, J. D. (2005). A practical guide to arylbiguanides — Synthesis and structural characterization 1, *Canadian Journal of Chemistry*, 83(6-7)
- Lugaro, G., & Giannattasio, G. (1968). Effect of biguanides on the respiration of tumour cells. *Experientia*, 24(8), 794–5.
- Lugaro, G., Giannattasio, G., Torti, G., & Perani, G. (1967). Studies on the antitumoral activity of the biguanides. V. *Archivio Italiano Di Patologia E Clinica Dei Tumori*, 10(3), 211–22.
- Lutsenko, S., & Kaplan, J. H. (1995). Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry*, 34(48), 15607–13.
- Marita, A. R., & Patade, G. (2014). Metformin: A Journey from countryside to the bedside. *Journal of Obesity and Metabolic Research*, 1(2), 127.
- MCF7. (n.d.). Retrieved August 3, 2016, from <http://www.mcf7.com>
- Medicinal Plants. (n.d.). Retrieved September 25, 2016, from <http://medplants.blogspot.pt/2013/08/galega-officinalis.html>
- Membranas - Bioquímica. (n.d.). Retrieved September 25, 2016, from <http://www.ebah.pt/content/ABAAABdeEAF/membranas#>
- MTS cell proliferation protocol. (2015), (April). Retrieved from [http://www.abcam.com/ps/products/197/ab197010/documents/ab197010 MTS Cell Proliferation Colorimetric Assay Kit Protocol v2 \(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/197/ab197010/documents/ab197010%20MTS%20Cell%20Proliferation%20Colorimetric%20Assay%20Kit%20Protocol%20v2%20(website).pdf)
- Nangia-Makker, P., Yu, Y., Vasudevan, A., Farhana, L., Rajendra, S. G., Levi, E., & Majumdar, A. P. N. (2014). Metformin: A potential therapeutic agent for recurrent colon cancer. *PLoS ONE*, 9(1), 1–10.
- Narise, K., Okuda, K., Enomoto, Y., Hirayama, T., & Nagasawa, H. (2014). Optimization of biguanide derivatives as selective antitumor agents blocking adaptive stress responses in the tumor microenvironment. *Drug Design, Development and*

Therapy, 8, 701–717.

Neelakantan, L. (1957). Biguanide Derivatives of γ -Pyridones, 22, 1584–1586.

Orecchioni, S., Reggiani, F., Talarico, G., Mancuso, P., Calleri, A., Gregato, G., Labanca, V., Noonan, D. M., Dallaglio, K., Albin, A., Bertolini, F. (2015). The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *International Journal of Cancer*, 136(6), E534–E544.

Public Health England. (n.d.-a). ECACC General Cell Collection: MCF7. Retrieved September 1, 2016, from https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012803&collection=ecacc_gc.

Public Health England. (n.d.-b). ECACC General Cell Collection: MDST8. Retrieved September 1, 2016, from http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=99011801&collection=ecacc_gc.

Quinn, B. J., Kitagawa, H., Memmott, R. M., Gills, J. J., & Dennis, P. A. (2013). Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(9), 469–480.

Ray, P. (1961). Complex Compounds of Biguanides and Guanylureas with Metallic Elements. *Chemical Reviews*, 61(4), 313–359.

Riss, T. (2005). Selecting Cell - Based Assays For Drug Discovery Screening. *Cell Note Issue*, (13), 16–21.

Riss, T. (2016). *Assay Guidance Manual*. (G. S. Sittampalam, Ed.). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda (MD).

Rose, P., Dobson, M., El-masry, O. S., Brown, B. L., & Dobson, P. R. M. (2015). Effects of activation of AMPK on human breast cancer cell lines with different genetic backgrounds, *Oncology Letters*, 3, 224-228.

Sigma. (n.d.-a). BRIN-BD11 Pancreatic islets from rat. Retrieved July 27, 2016, from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/10033003?lang=pt®ion=PT>

Sigma. (n.d.-b). MDST8. Retrieved July 27, 2016, from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/99011801?lang=pt®ion=PT>

- Sigma. (2006). Cell Counting Kit - 8 BioChemika.
- Sigma. (2010). *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook* (2nd ed.). Health Protection Agency.
- Tsubouchi, H., Ohguro, K., Yasumura, K., Ishikawa, H., & Kikuchi, M. (1997). Synthesis and Structure-Activity Relationships of Novel Antiseptics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7(13), 1721–1724.
- Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N. S., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 122(6), 253–70.
- Wang, Y., Sauer, D. R., & Djuric, S. W. (2009). A facile and practical one-pot “catch and release” synthesis of substituted guanidines. *Tetrahedron Letters*, 50(36), 5145–5148.
- Zhang, Y., Jiang, J., & Chen, Y. (1999). Synthesis and antimicrobial activity of polymeric guanidine and biguanidine salts. *Polymer*, 40(22), 6189–6198.

Anexo I

A. Equipamento

- Câmara de fluxo laminar – Nuaire Class II
- Câmara de Neubauer
- Centrifuga – Rotina 420R Hettich zentrifuger
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Bruker Avance III HD
- Leitor de microplacas – BioRad Coda Automated EIA Analyzer
- Microscópio invertido – Olympus CKX41 equipado com câmera fotográfica
- Microscópio ótico – Olympus BX41 equipado com câmera fotográfica

B. Consumíveis

- Frascos de cultura de 25 cm² e de 75 cm²
- Microplacas de 96 poços, estéreis
- Pipetas serológicas estéreis de 1, 2, 5 e 10 cm³

C. Reagentes

- Etanol a 70% (v/v)
- Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) completo (com 10% de FBS (Soro de bovino fetal) e 1% antibióticos penicilina e estreptomicina) para as células MDST8
- Meio de cultura *Eagle Minimum Essential Medium* (EMEM) completo (com 10% de FBS e 1% antibióticos penicilina e estreptomicina) para as células MCF7
- Meio de cultura *RPMI-1640 Medium* (RPMI) completo (com 10% de FBS e 1% antibióticos penicilina e estreptomicina) para as células BRIN-BD11
- Reagente desidrogenases – Cell Counting Kit-8 (CCK-8, SIGMA)
- Reagente sulfomolibdico (molibdato de amônio 1% e sulfato de ferro (II) 5% em ácido sulfúrico 1N)
- Solução 0,4 % de azul de tripano em PBS

- Solução de PBS (136,9mM NaCl; 2,7mM KCl; 10,1mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄, ajustado o pH a 7,4 com NaOH 2M).
- Solução de Versénio (solução de PBS; 0,5mM EDTA, ajustado o pH a 7,3 com NaOH 2M).
- Tampão ATPases (ATP (2mM), NaCl (100mM), KCl (5mM), MgCl₂ (10mM), EGTA (1mM) e Tris-HCl (50mM); pH 7,4)

Anexo II

A. Parâmetros estatísticos

1. Regressão linear Figura 41

	Valor	Erro
Ordenada da Origem	0,01307	0,01765
Declive	4,40239E-5	3,51733E-6
R ²	0,9777	
Valor F	220,203	
Prob>F	1,2008E-4	

2. Regressão linear Figura 42

	Valor	Erro
Ordenada da Origem	0,00798	0,01386
Declive	1,1327E-5	2,20512E-6
R ²	0,9702	
Valor F	163,78269	
Prob>F	2,14853E-4	

3. Regressão linear Figura 47

	Valor	Erro
Ordenada da Origem	-3,85808	0,20098
Declive	1,09748	0,05003
R ²	0,96984	
Valor F	161,76097	
Prob>F	2,20148E-4	

4. Regressão linear Figura 48

	Valor	Erro
Ordenada da Origem	-0,1649	0,02573
Declive	0,06376	0,00769
R ²	0,9611	
Valor F	124,54143	
Prob>F	3,66966E-4	

5. Regressão linear Figura 51

	Valor	Erro
Ordenada da Origem	-1,53008E-5	0,00945
Declive	2,12854E-5	2,22821E-6
R ²	0,95801	
Valor F	91,25315	
Prob>F	6,70773E-4	

6. Regressão linear Figura 52

	Valor	Erro
Ordenada da Origem	0,00313	0,00496
Declive	3,10181E-5	1,22379E-6
R ²	0,99845	
Valor F	642,4161	
Prob>F	0,0251	