



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Avaliação e Caracterização da Ação Inibitória de Iminociclítóis na Atividade Alfa-glucosidase de Células de Mamífero**

**Patrícia Isabel Ramos Louro**

Orientação: Prof. Doutora Célia Antunes

Prof. Doutor Anthony Burke

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2014



## Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao Departamento de Química da Escola de Ciências e Tecnologias, ao ICAAM, ao CQE que ajudaram à realização deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Célia Antunes pela orientação, ajuda e disponibilidade demonstradas.

Ao Prof. Anthony Burke, pela ajuda e orientação.

À Doutora Elisabete Carreiro, pela ajuda e pelo fornecimento dos compostos testados.

À minha família, em especial, aos meus pais, por todo o apoio moral e monetário, que tornaram possível todo o meu percurso académico.

A todas as “habitantes” do lab. A3, professoras, colegas e funcionárias, por toda a ajuda, amizade e convívio durante este ano, que tornou esta experiência mais rica e alegre.

Aos meus colegas de mestrado, pela ajuda e companheirismo, que demonstraram neste dois anos.

A todos os funcionários dos Laboratórios dos Colégios L. A. Verney e Mitra, pelo apoio e assistência cedida durante a realização do trabalho prático.

E por fim, mas não menos importante, à Universidade de Évora, por todos os ensinamentos amigáveis e por me ter possibilitado uma experiência enriquecedora ao longo de 6 anos de vida académica.

## Índice

Agradecimentos.....	iii
Índice de Figuras .....	vi
Índice de Tabelas.....	vii
Abreviaturas e Acrónimos.....	viii
Unidades.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract .....	xiii
<i>Introdução Teórica</i> .....	2
1. Intestino Delgado e Absorção de Nutrientes.....	2
1.1 Digestão de Glúcidos .....	3
1.2 Absorção de glúcidos .....	5
2 A $\alpha$ -glucosidase enquanto Alvo Terapêutico .....	6
2.1 Inibidores da $\alpha$ -glucosidase.....	6
2.1.1 Acarbose.....	7
2.1.2 1-desoxinojirimicina (DNJ).....	8
2.2 Procura de Novos Fármacos – Iminociclítóis.....	9
3 Toxicologia e Biossegurança .....	12
3.1 Modelos biológicos para o estudo da biossegurança.....	13
3.2 Metodologias utilizadas em ensaios de biossegurança ou toxicidade .....	14
4 Cinética Enzimática.....	16
4.1 Reação Enzimática .....	16
4.2 Equação de Michaelis – Menten .....	17
4.2.1 Linearizações da equação de Michaelis-Menten.....	18
4.2.1.1 Linearização de Eisenthal e Cornish-Bowden (Método Linear Direto).....	18
4.2.1.2 Linearização de Lineweaver – Burk.....	19
4.2.1.3 Linearização de Hanes-Woolf.....	20
4.2.1.4 Linearização de Eadie-Hofstee.....	20
4.3 Inibição Enzimática.....	21
4.3.1 Tipos de Inibição.....	22
4.3.2 Constante de Inibição, $K_I$ .....	22
4.4 Condições para Realização de Estudos de Atividade Enzimática e de Inibição Utilizando Homogeneizados Celulares .....	24
<i>Projeto</i> .....	27
1 Problemática.....	28
2 Objetivos .....	29

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminociclítóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

3	Metodologia .....	30
3.1	Estratégia adotada .....	30
3.2	Organograma.....	32
3.3	Procedimento Experimental .....	33
3.3.1	Soluções Utilizadas .....	33
3.3.2	Isolamento dos Enterócitos de Rato .....	33
3.3.3	Obtenção da suspensão enzimática rica em $\alpha$ -glucosidase .....	34
3.3.4	Doseamento da Proteína.....	34
3.3.5	Determinação da Atividade Enzimática $\alpha$ -glucosidase:.....	35
3.3.6	Cultura Celular de BRIN BD-11 .....	36
3.3.7	Ensaio de Toxicidade.....	37
3.3.8	Análise Estatística .....	38
4	Resultados e Discussão .....	39
4.1	Estudo da Atividade Enzimática $\alpha$ -glucosidase e Determinação dos Parâmetros Cinéticos.....	39
4.2	Estudos da Ação dos Iminociclítóis sobre a Atividade $\alpha$ -glucosidase .....	42
4.3	Determinação do Tipo de Inibição e Constante de Inibição, $K_i$ .....	44
4.4	Estudo de Toxicidade dos Iminociclítóis .....	48
5	Conclusões .....	49
6	Referências Bibliográficas .....	50
	<i>Sites Consultados:</i> .....	53
	Anexos.....	55
	Reagentes .....	56
	Material/Equipamento.....	57
	Soluções Utilizadas: .....	59
	Tratamento Estatístico.....	61

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Esquema representativo de estrutura do trato intestinal (a) e das vilosidades intestinais (b) .....	2
<b>Figura 2</b> - Estrutura da $\alpha$ -glucosidase .....	4
<b>Figura 3</b> – Transporte de glucose, galactose e frutose no enterócito, pela ação dos transportadores GLUT-1, GLUT-2 e GLUT-5.....	5
<b>Figura 4</b> – Estrutura química da Acarbose .....	7
<b>Figura 5</b> – Modo de ação da Acarbose sobre $\alpha$ -glucosidase, ao nível dos enterócitos. ....	8
<b>Figura 6</b> – Estrutura de 1- desoxinojirimicina (DNJ).....	9
<b>Figura 7</b> – Estruturas base dos iminociclitois.....	10
<b>Figura 8</b> – Via sintética utilizada para síntese das moléculas alvo. As condições utilizadas foram: (a) Etanol, Pd(0) EnCat 30NP, H <sub>2</sub> , 50 °C, 24h; (b) Brometo de benzilo, NaH, DMF, T. Amb., 16h.....	11
<b>Figura 9</b> - Microfotografia de contraste de fase de células BRIN-BD11 cultivadas em cultura de tecidos .....	14
<b>Figura 10</b> – Gráfico representativo de equação de Michaelis-Menten, onde observa-se a velocidade da reação em função concentração de substrato. ....	18
<b>Figura 11</b> – Representação da linearização de Lineweaver-Burk .....	19
<b>Figura 12</b> – Representa gráfica da linearização de Hanes-Woolf .....	20
<b>Figura 13</b> – Representação de gráfica da linearização de Eadie-Hofstee.....	21
<b>Figura 14</b> – Gráfico de Dixon, para os vários tipos de Inibição.....	23
<b>Figura 15</b> - Atividade da $\alpha$ -glucosidase, para as várias concentrações de homogeneizado celular .....	25
<b>Figura 16</b> - Curva de Calibração para a determinação da concentração de proteína. ....	35
<b>Figura 17</b> – Reação de conversão de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido em p-nitrofenol e glucose.....	35
<b>Figura 18</b> - Atividade da $\alpha$ -glucosidase para as diferentes concentrações de substrato (p-NPG). .....	39
<b>Figura 19</b> – Determinação dos parâmetros cinéticos K <sub>M</sub> e V <sub>máx</sub> utilizando a curva de Michaelis-Menten (a), as linearizações de Eadie-Hofstee (b), de Hanes-Woolf (c) e de Lineweaver-Burk (d). Os gráficos foram obtidos utilizando o programa <i>Hyper 32</i> . ....	40

<b>Figura 20</b> - Curvas de cinética dos controlos utilizados nos ensaios de inibição, utilizando Acarbose (0,77 mM) e DNJ (50 $\mu$ M) como controlos positivos (Inibidores comerciais), assim como duas réplicas exemplo da Atividade $\alpha$ -glucosidase máxima. ....	41
<b>Figura 21</b> - Curva de inibição do Inibidor comercial (DNJ).. ....	42
<b>Figura 22</b> - Curvas de Inibição dos compostos em estudo: a) Composto 1((3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-1-benzilpirrolidina-3,4-diol) (p = 1,91); b) Composto 2 ((3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-1-benzilpirrolidina-3,4-diol) (p = 1,44 para parte superior da sigmoide e p = 1,70, para parte inferior da sigmoide.); c) Composto 3 ((3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-pirrolidina-3,4,diol) (p = 1,81) ; d) Composto 4((3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-1-benzil-3,4-di(benziloxi)pirrolidina) (p = 0,96) .....	43
<b>Figura 23</b> – a1) b1) c1) Curvas de Michaelis-Menten na presença e na ausência de três compostos em estudo. a2) b2) c2) Gráfico de Dixon para três dos compostos em estudo. ( $R^2 = [0,7139 ; 1]$ ).. ....	45
<b>Figura 24</b> - Atividade Desidrogenase (%)das células BRIN BD-11, na presença do Composto 1 (■), Composto 2 (■) e Composto 3 (■). ....	48

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Valores de $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ . obtidos através do método de Michaelis – Menten e das suas linearizações. ....	41
<b>Tabela 2</b> – Valores de $IC_{50}$ e respetivos $K_I$ dos compostos estudados. ....	46

## Abreviaturas e Acrónimos

% – Percentagem

A. – Absorvância

ADA – Associação América de Diabetes

ADP – (do inglês *Adenosine Diphosphate*) Difosfato de Adenosina

AGJ – Anomalia da glucose em jejum

AGL – Ácido gordos livres

AGNE – Ácido gordo não-esterificado

APC – (do inglês *Antigen Presenting Cell*) Célula Apresentadora de Antígeno

ATP – Adenina Trifosfato

ATPase – Adenina Trifosfato Sintetase

BBM – Membrana *Brush Border*

BLM – Membrana basolateral

BSA – Albumina do soro bovino

c – concentração

CA - Califórnia

CCK – 8- (do Inglês *Cell Counting Kit-8*) Contagem de Células Kit-8

DAG - diacilgliceróis

DM – Diabetes *Mellitus*

DM 1 – Diabetes *Mellitus* tipo 1

DM 2 – Diabetes *Mellitus* tipo 2

DMG – Diabetes *Mellitus* Gestatioanl

DMSO – Dimetilsulfóxido

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

DNJ – 1-desoxinojirimicina

$\epsilon$  – Absortividade molar

E – enzima

EC – (do Inglês *Enzyme Commission*) Comissão de Enzima

ECTUE – Escola de Ciências e Tecnologias da Universidade de Évora

HDL – (do Inglês *High Density Lipoprotein*) Lipoproteína de elevada densidade

HIV – (do inglês *Human Immunodeficiency vírus*) Vírus da Imunodeficiência Humana

HMC – (do inglês *Histocompatibility Major Complex*) Complexo Maior de Histocompatibilidade

I – Inibidor

IAG – Inibidor de  $\alpha$ -glucosidase

IDF – (do inglês *International Diabetes Federation*) Federação Internacional de Diabetes

k – constante de equilíbrio

$K_M$  – constante de Michaelis

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

l – percurso ótico

MCP-1 – (do inglês *Macrophage chemo-attract protein-1*) Proteína quimio-atraente 1 de macrófagos

MMT – (3- (4, 5-dimethyl-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazolio bromido) hidroinsolúvel

MO - Missouri

MODY – (do inglês *maturity onset diabetes of the young*) - Diabetes Juvenil com Início na Maturidade

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminociclítóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

NADH – (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*) dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH – (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

nm – Nanómetro

OND – Observatório Nacional de Diabetes

P – produtos resultantes de uma reação enzimática

PBS – (do inglês *phosphate buffered saline*) Tampão fosfato salino

pNPG – p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo

p-NP – p-nitrofenol

PPAR – Recetor Ativado por Proliferador de Peroxissomas;

PTGO – Prova de Tolerância à Glucose Oral

p/v – Relação peso/volume

QSAR – Relação quantitativa estrutura-atividade

Rato NEDH – do inglês *New England Deacones Hospital Rat*

S – Substrato

[S] – concentração de substrato

SDS – Duodecil sulfato de Sódio

SE – Complexo enzima-substrato

s.n. – (do Latim *sine nomeie*) Sem nome

TDG – Tolerância Diminuída à Glucose

TNF – (do Inglês *Tumour Necrose Factor*) Fator de Necrose Tumoral

v – velocidade

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

V<sub>0</sub> – velocidade inicial

V<sub>máx</sub> – velocidade máxima

VLDL – (do Inglês *Very Low Density lipoprotein*) Lipoproteína de muito baixa densidade

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

WST-8 – (do inglês *water-soluble-tetrazolium-8*) tetrazólio hidrossolúvel 8

## Unidades

cm – centímetro

°C – graus Celsius

dL – decilitro

g – Grama

h – hora

kg – Quilograma

L – Litro

M - molar

m<sup>2</sup> – metro quadrado

mg – miligrama

min – minuto

mM – milimolar

mmol – milimole

## Resumo

Os inibidores das  $\alpha$ -glucosidases, entre os quais se enquadram os iminociclitóis, são agentes de elevado interesse terapêutico uma vez que podem contribuir para a diminuição da absorção intestinal de glucose e, conseqüentemente, para um desagravamento da hiperglicemia em condições patológicas como a diabetes.

Neste trabalho procurou-se estudar a ação de alguns compostos novos da família iminociclitol na atividade  $\alpha$ -glucosidase de enterócitos de mamífero.

Dos quatro compostos estudados (*S,S*) e (*R,R*) (3,4)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol e (3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4-diol provocaram uma diminuição significativa da atividade enzimática  $\alpha$ -glucosidase, sendo os  $IC_{50}$  inferiores a 5,8 mM. Os resultados apontam ainda para um mecanismo de inibição do tipo misto com valores de  $K_I$  inferior a 1,2 mM. Os compostos estudados revelaram ser pouco tóxicos.

Os resultados sugerem que estes compostos não constituem fármacos promissores enquanto inibidores de  $\alpha$ -glucosidases, de mamífero. Contudo, dada a sua baixa toxicidade não são de excluir outras aplicações nomeadamente, agroindustriais.

## Abstract

“Evaluation and characterization of inhibitory action of iminocyclitols on alpha-glucosidase activity in mammal’s cells.”

Iminocyclitols as  $\alpha$ -glucosidases inhibitors, are agents with high therapeutical interest since they contribute to diminish intestinal glucose absorption and consequently, to ameliorate hyperglycemia in pathological conditions such as diabetes.

The aim of this work was to study the inhibitory effect of several iminocyclitol compounds on the  $\alpha$ -glucosidase activity from enterocytes.

Among the compounds studied, three, (*S,S*) and (*R,R*) (3,4)-1-benzilpyrrolidine-3,4-diol and (3*R*,4*R*)-pyrrolidine-3,4-diol had significant inhibitory action over  $\alpha$ -glucosidase enzymatic activity with  $IC_{50}$  under 5,8 mM. It also show that the  $K_I$  under 1,2 mM. Moreover, the compounds presented negligible toxicity effects.



Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminociclítóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

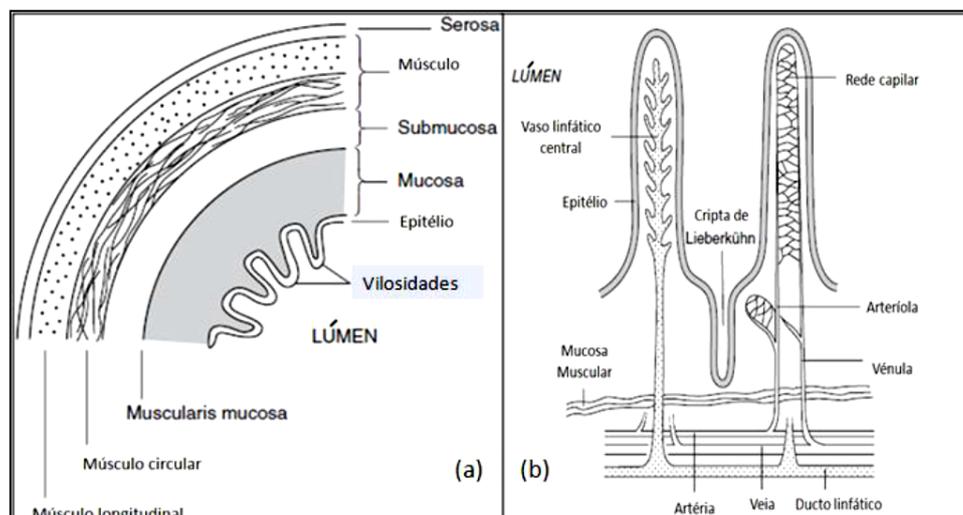
*Introdução Teórica*

---

## 1. Intestino Delgado e Absorção de Nutrientes

O **intestino delgado** é um órgão do sistema digestivo, responsável pela maioria da digestão e absorção dos nutrientes. A sua estrutura está especialmente especializada para as suas funções, como é o caso do seu comprimento e ocorrência de vilosidades que aumentam drasticamente a sua superfície de contacto, perfazendo um total 200 m<sup>2</sup> de área intestinal (Newsholme, *et al.*, 2010, Tortora, *et al.*, 2009).

O intestino delgado divide-se em três regiões. O **duodeno** é a região mais pequena e encontra-se abaixo do estômago. Nos humanos, tem cerca de 25 cm. É aqui que ocorre a maior parte da digestão, com libertação das secreções enzimáticas provenientes do pâncreas e da vesícula biliar. O **jejuno** tem cerca de 3 metros de comprimento, em humanos. É nesta região que começa a absorção dos nutrientes. O íleo é a região mais comprida do intestino delgado, tendo 4 metros em humanos, e é onde termina a absorção. Estas três regiões apresentam estrutura semelhante, indicada na figura 1 (Newsholme, *et al.*, 2010, Tortora, *et al.*, 2009):



**Figura 1** – Esquema representativo de estrutura do trato intestinal (a) e das vilosidades intestinais (b) (adaptado de Newsholme, *et al.*, 2010).

As vilosidades são constituídas por vários tipos de células. Existem células secretoras de muco, outras secretoras de hormonas, como a secretina. Mas as células que existem em maior número são os **enterócitos**, células responsáveis pela absorção dos nutrientes do lúmen para a corrente sanguínea. Os enterócitos são células epiteliais muito polarizadas, especialmente onde a membrana luminal apresenta uma grande

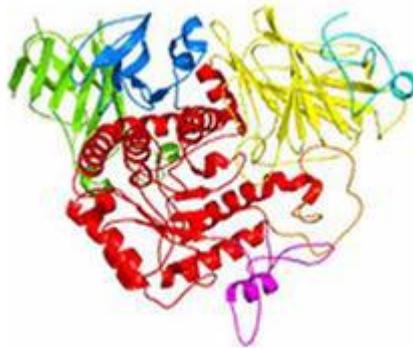
variedade de transportadores de membrana. Na face luminal ou apical, e no que respeita à absorção de nutrientes, os enterócitos possuem inúmeros transportadores dependentes de  $\text{Na}^+$ , que permitem efetuar o transporte ativo secundário de aminoácidos e glúcidos. Os enterócitos encontram-se justapostos e unidos por ligações de adesão, as “*tight junctions*”, que contribuem para manter a estrutura da mucosa e impermeabilizar o espaço entre as células. Na face basolateral, em contacto com os vasos sanguíneos, a membrana possui essencialmente transportadores que permitem a passagem de nutrientes por transporte passivo do citoplasma para o sangue, nomeadamente o GLUT-1, uma permease da glucose (Newsholme, *et. al.*, 2010, Tortora, *et. al.*, 2009).

À superfície dos enterócitos estão enzimas digestivas de várias classes, designadas por enzimas da *brush-border*. A maior parte da digestão ocorre no lúmen intestinal, mas são estas enzimas que catalisam os passos finais de alguns processos digestivos, por quebra de ligações originando produtos menos complexos, como, por exemplo, glúcidos simples e aminoácidos. São estes produtos que são absorvidos para a corrente sanguínea (Newsholme, *et. al.*, 2010, Tortora, *et. al.*, 2009).

## 1.1 Digestão de Glúcidos

A digestão e absorção dos glúcidos processam-se em várias etapas. Os glúcidos correspondem a cerca de 40% da energia presente numa refeição, principalmente sob a forma de amido, sacarose e lactose, que por ação das enzimas digestivas presentes ao longo do tubo digestivo e principalmente as presentes no intestino, são degradados nos seus constituintes mais simples, glucose, frutose e galactose. A digestão do amido, por exemplo, envolve a hidrólise das ligações entre as moléculas de glucose que o compõem. São necessárias duas classes de hidrolases nesta etapa: amílases salivares e pancreáticas e oligossacaridases. Entre estas enzimas encontra-se a  **$\alpha$ -glucosidase (E.C. 3.2.1.20)**, cuja função é metabolizar oligossacáridos em unidades mais pequenas. Associadas ao glicocálix, estão oligossacaridases e dissacaridases, que ao estarem perto dos enterócitos, proporcionam o aumento da concentração de glúcidos simples, o que facilita a sua absorção (Smith, *et. al.*, 2005, Newsholme, *et. al.* 2010).

A  **$\alpha$ -glucosidase** (EC 3.2.1.20) é uma enzima da família das hidrolases que é responsável pela hidrólise do terminal não redutor  $\alpha$  (1-4) em glúcidos, glicoproteínas e glicolípidos, na presença de H<sub>2</sub>O, com libertação de  $\alpha$ -D-glucose. Também conhecida como maltase, este enzima consegue hidrolisar oligossacáridos, mas apenas a  $\alpha$ -glucosidase presente no intestino (mais especificamente nos enterócitos) consegue hidrolisar polissacáridos, assim como ligações  $\alpha$  (1-6), embora mais lentamente (Gunawan-Puteri, *et. al.*, 2010, Voet, *et. al.*, 2005).



**Figura 2** - Estrutura da  $\alpha$ -glucosidase (adaptado de Sim, *et. al.*, 2007)

A  $\alpha$ -glucosidase humana contém duas subunidades catalíticas glicosil-hidrolase homólogas da família 31: uma subunidade de N-terminal (NtMGAM) que encontra-se perto da ligação à membrana e uma subunidade C-terminal luminal (CtMGAM). Estudos recentes sugerem que NtMGAM e CtMGAM diferem na sua especificidade para o substrato, apesar da sua relação estrutural. Nos seres humanos é codificada pelo gene GANC. Este gene localiza-se numa região cromossómica (15q15) que está associado com a suscetibilidade à diabetes (Sim, *et. al.*, 2007).

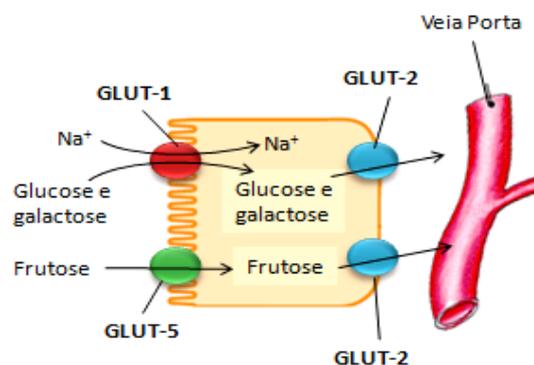
A  $\alpha$ -glucosidase desempenha um papel bastante importante na digestão de glúcidos e, por isso, tem um contributo apreciável na absorção dos glúcidos ingeridos. Por conseguinte, afeta a glicemia pós-prandial, um aspeto muito relevante em indivíduos que sofrem de intolerância à glucose e/ou diabetes. A utilização de inibidores permite diminuir a taxa de absorção de glucose e assim, reduzir o pico de glicemia após uma refeição, contribuindo para o controlo da doença em indivíduos diabéticos (de Melo *et. al.*, 2006, Newsholme, *et. al.*, 2010).

## 1.2 Absorção de glúcidos

Como dito anteriormente, os glúcidos são absorvidos sob a forma de glúcidos simples, moléculas estruturalmente mais simples. Desta forma, todos os glúcidos provenientes da dieta são transformados em monossacáridos e absorvidos posteriormente pelos enterócitos, deixando apenas as fibras e celulose não digerida (Tortora, *et. al.*, 2009)

Os monossacáridos são transportados através de dois sistemas de transporte: um para a glucose e galactose (GLUT-1) e um outro que transporta a frutose (GLUT-5). A galactose e a frutose produzidas por estas reações são absorvidas e transportadas até ao fígado, onde são convertidas em glucose, através da via das pentoses de fosfato (Newsholme, *et. al.*, 2010).

Na figura 3, está representada a absorção de glúcidos. A glucose é transportada para dentro da célula contra o gradiente de concentração, utilizando energia obtida no transporte de  $\text{Na}^+$  para dentro da célula. Desta forma, assegura-se que a concentração de glucose no enterócito é sempre maior do que na corrente sanguínea, de modo a que a glucose seja transportada através a membrana contralateral até ao espaço intersticial e para o sangue, seja a favor do gradiente de concentração e não seja necessário utilizar  $\text{Na}^+$ . Por seu lado, a concentração de frutose no lúmen é maior do que no enterócito, logo o transporte para dentro do enterócito não necessita de energia. O transporte dos produtos da digestão para o espaço intersticial assegura-se pelo transportador GLUT-2. Como dito anteriormente, o gradiente de concentração das oses possibilita a sua passagem sem necessitar de energia para que ocorra (Newsholme, *et. al.*, 2010).



**Figura 3** – Transporte de glucose, galactose e frutose no enterócito, pela ação dos transportadores GLUT-1, GLUT-2 e GLUT-5 (adaptado de Tortora, *et. al.*, 2009).

## 2 A $\alpha$ -glucosidase enquanto Alvo Terapêutico

Nos anos 70, verificou-se que os inibidores da  $\alpha$ -glucosidase retardavam os passos da digestão dos glúcidos, o que, por conseguinte, retardava a sua absorção. Na década seguinte, provou-se que esta ação podia reduzir a hiperglicemia pós-prandial na diabetes (Holt, *et. al.*, 2010).

A Diabetes *mellitus* é caracterizada por hiperglicemia crónica com distúrbios do metabolismo dos glúcidos, gorduras e proteínas que resultam da deficiente secreção de insulina e/ou resistência à insulina. A sua patogénese é complexa e ainda não está completamente compreendida. Parece ser causada por uma interação entre fatores genéticos e ambientais que levam a defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina e na eficácia de glucose (Holt, *et. al.*, 2010, Li, *et. al.*, 2013).

Atualmente, existem vários fármacos utilizados na terapêutica da diabetes. Estes podem ser divididos em várias classes, dependendo do sistema onde vão atuar, mas a maior parte leva a estimulação das células  $\beta$  produzirem insulina, ou à inibir a produção endógena de glucose. No entanto, existe uma classe, os inibidores da  $\alpha$ -glucosidase intestinal cujo principal objetivo é contribuir para a diminuição da hiperglicémia pós-prandial, constituindo-se assim um alvo terapêutico na diabetes (Ali, 2011, Holt, *et. al.*, 2011).

### 2.1 Inibidores da $\alpha$ -glucosidase

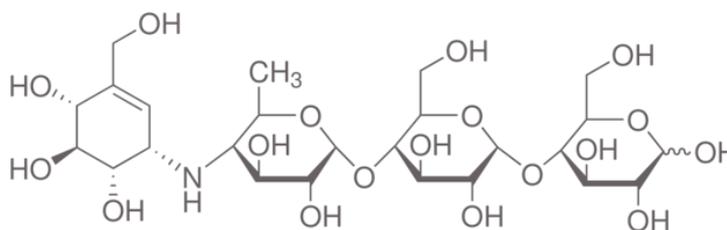
Os **inibidores da  $\alpha$ -glucosidase intestinal** atuam ao nível desta enzima e retardam a digestão do amido e de outros glúcidos presentes numa refeição, reduzindo a sua absorção e, conseqüentemente, diminuindo o pico de glicemia pós-prandial nos diabéticos. A sua ação é ao nível do intestino, localização da enzima, ligando-se a esta de forma competitiva, e com grande afinidade. Uma vez que há redução da glucose plasmática, os níveis de hemoglobina A1C são baixos. Uma vez que atuam ao nível da redução de quantidade de glucose que chega ao sangue, não aumentam ou imitam a ação da insulina, ao contrário das classes anteriormente apresentadas. É aconselhada a combinação com outro antidiabético oral, mas não sulfonilureias ou tiazolinedionas, sob risco de hipoglicémia (Ali, 2011, Holt, *et. al.*, 2010, Prontuário Terapêutico, 2011).

A **Acarbose** foi o primeiro inibidor da  $\alpha$ -glucosidase a ser utilizado como agente terapêutico, e o mais utilizado desta classe, sendo seguida pelo miglitol e voglibose (Holt, *et. al.*, 2010, Prontuário Terapêutico, 2011).

Os inibidores da  $\alpha$ -glucosidase tem grande importância no metabolismo e a sua ligação a vários processos metabólicos fazem destes inibidores potenciais agentes terapêuticos no tratamento de várias patologias como diabetes, obesidade, infecções por HIV, tumores, entre outros (Holt, *et al*, 2010).

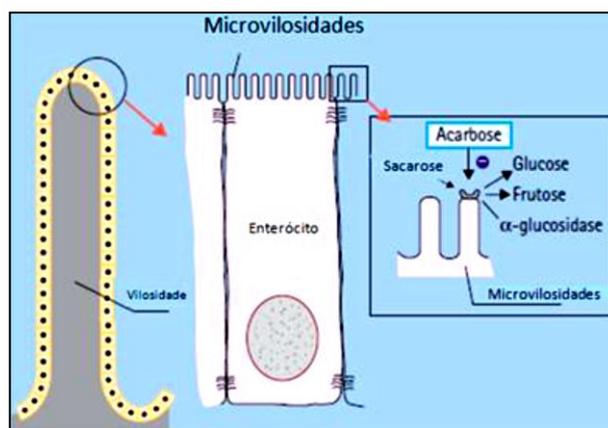
### 2.1.1 Acarbose

A **Acarbose** foi um dos primeiros compostos antidiabéticos utilizados no tratamento de diabetes tipo 2, e foi o primeiro da classe dos inibidores da  $\alpha$ -glucosidase. Este composto liga-se de forma competitiva à  $\alpha$ -glucosidase, presente nos enterócitos. Visto que tem grande afinidade, impede que os substratos se liguem à enzima. Isto vai retardar a digestão dos glúcidos mais complexos em monossacáridos (Holt, *et al*, 2010).



**Figura 4** – Estrutura química da Acarbose (www.Sigma-Aldrich.com).

A acarbose é apenas eficaz em pacientes que tenham uma dieta com maior teor em glúcidos não simples, uma vez que a sua ação retarda a digestão dos glúcidos. Sendo o seu local de ação o intestino, só é ativa se administrada por via oral e ingerida antes das refeições. A acarbose é maioritariamente degradada por amilases e por bactérias intestinais, mas cerca de 2% é absorvida juntamente com alguns produtos da digestão e é eliminada pela urina até 24h após a ingestão (Holt, *et. al.*, 2010).



**Figura 5** – Modo de ação da Acarbose sobre  $\alpha$ -glucosidase, ao nível dos enterócitos (adaptado de Holt, *et. al.*, 2010).

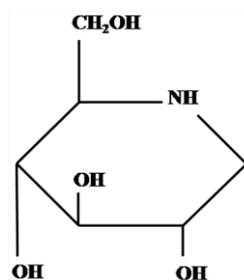
Quando usada como monoterapia, reduz o pico pós-prandial da glucose entre 1 a 4 mmol/L. O decréscimo da hemoglobina glicada é normalmente entre 6 a 11 mmol/L, e é bem tolerada numa grande quantidade. A utilização deste composto trás algumas vantagens, como o controlo de peso, a redução dos episódios de hipoglicemia interprandial. Quando combinada com outros agentes antidiabéticos, reduz a hipoinsulinemia pós-prandial, assim como a concentração plasmática de triacilgliceróis. Em contra partida, a utilização da acarbose pode produzir pequenas alterações ao nível da absorção intestinal de outros agentes antidiabéticos orais, embora seja recomendada a sua utilização em terapia combinada. A utilização da acarbose é contraindicada a doentes com colite ulcerosa ou Doença de Crohn, na gravidez e aleitamento (Holt, *et al*, 2010, *Prontuário Terapêutico*, 2011).

### 2.1.2 1-desoxinojirimicina (DNJ)

Desde há já muito tempo que extratos de folhas de amoreira são usados, na China e outros países asiáticos, para tratar a diabetes. Na década de 1970, descobriu-se que o composto 1-desoxinojirimicina (DNJ), um iminoaçúcar obtido a partir de extratos de folha de amoreira, era um potente inibidor das glucosidases intestinais, atuando como agente anti hiperglicémico, diminuindo a taxa de degradação de monossacáridos. Este atraso na absorção de glucose reduz significativamente os níveis de glucose pós-prandial no sangue. Hoje, este composto possui inúmeras aplicações terapêuticas, entre as quais no tratamento da infeção por HIV, na doença de Gaucher, e na Diabetes. No entanto, a sua extração a partir das folhas da amoreira torna-se bastante dispendiosa

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminociclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

devido à quantidade limitada de moléculas do composto (Li, *et. al.*, 2013; Onose, *et. al.*, 2012).



**Figura 6** – Estrutura de 1- desoxinojirimicina (DNJ) (Li, *et. al.*, 2013)

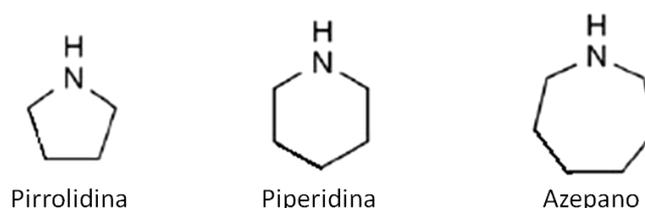
## 2.2 Procura de Novos Fármacos – Iminociclitóis

A constante evolução do conhecimento sobre os mecanismos subjacentes às patologias e a contínua necessidade de mais e melhores fármacos faz com que a procura de novos princípios ativos, mais vantajosos do que os já existentes, seja extremamente importante. Uma das fontes destes compostos é a própria natureza. Por exemplo, vários estudos têm demonstrado que certos fitoquímicos provenientes de recursos naturais têm potencial fitoterapêutico. Porém, a extração de princípios ativos de fontes biológicas, nomeadamente de plantas, é habitualmente muito limitada e requer muitos recursos naturais. Assim, a síntese química, em conjunto com a engenharia química e várias outras áreas da ciência fornecem novas oportunidades, conseguindo-se adaptar os compostos de modo a obter uma melhor atividade. A análise combinada, tais como *design* de fármacos com base na estrutura (*docking*), relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR) e análise do farmacóforo, fornecem informações importantes sobre as características estruturais para a interação dos inibidores e dão orientação para o *design* de novas drogas (Li, *et. al.*, 2013, Mehta, *et. al.*, 1998, Moorthy, *et. al.*, 2012).

Neste âmbito, os iminociclitóis, bem como funcionalização dos mesmos têm vindo a fornecer novas perspetivas e novos compostos que podem ser utilizados nestas terapêuticas.

Os Iminociclitóis são alcaloides polihidroxiladas com anéis de cinco a sete membros, em que o oxigénio do anel foi substituído por azoto, que conferem uma semelhança à estrutura dos monossacáridos (Figura 7). Estes grupos hidroxilo, nas posições 2, 3, 4 e 5 do anel, com orientação específica para imitar a forma e carga do

estado de transição entre a porção de glúcidos envolvida na reação, demonstraram ser potentes inibidores de enzimas intervenientes na degradação de glúcidos. Uma vez que um estado de transição de catiões é esperado estar envolvido em ambas reações glicosiltransferase e glucosidases, os iminociclítóis de cinco e seis membros podem ser utilizados como componentes principais para o desenvolvimento de inibidores, o que os torna numa família de compostos farmacologicamente interessante, com aplicações em vários níveis. Alguns dos derivados de DNJ têm sido bastante estudados como possíveis medicamentos antidiabéticos e também no tratamento de infeções virais, como dengue, hepatite B, hepatite C, entre outras (De Melo, *et al.*, 2006, Guerreiro, *et al.*, 2013, Howe, *et al.*, 2013, Onose, *et al.*, 2012, Perry, *et al.*, 2013, Saotome, *et al.*, 2001).

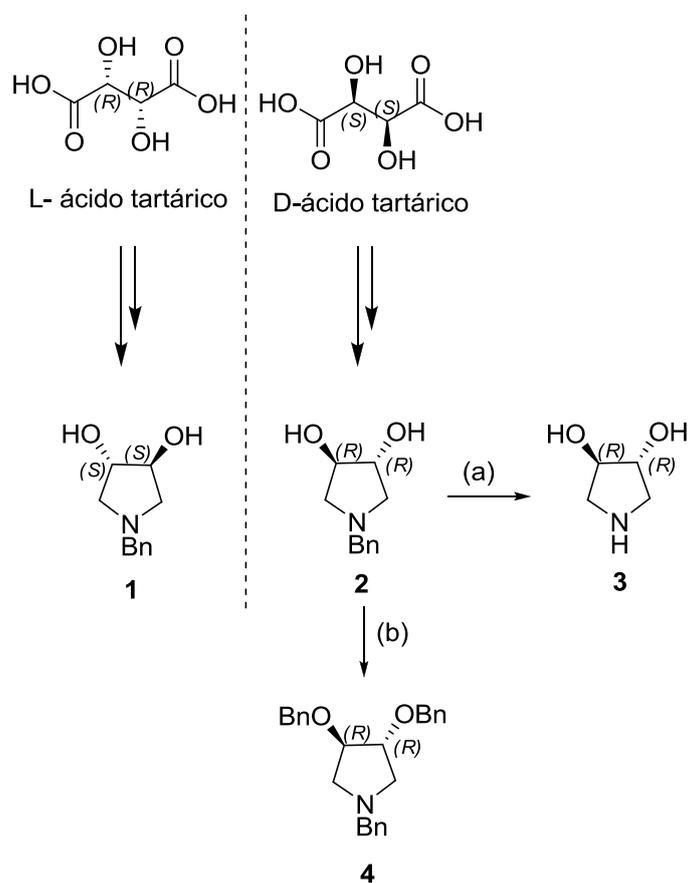


**Figura 7** – Estruturas base dos iminociclítóis (adaptado de Horne, *et al.*, 2011)

Tendo em conta que esta família de compostos desempenha um papel relevante no tratamento de algumas doenças, para além de serem úteis na compreensão dos mecanismos enzimáticos ligados à degradação dos glúcidos, pelo que a sua síntese química é bastante valorizada. Uma grande parte dos análogos sintéticos foi considerada inibidora de glucosidases, embora varie o poder de inibição.

Tem-se verificado nos últimos anos o aparecimento de novos compostos, tendo-se em vista sintetizar e isolar compostos com maior seletividade, de modo a ser mais fácil atuar sobre um local específico. A relação estrutura-atividade ainda não está bem definida, o que torna mais difícil o *design* de novos compostos. No entanto, em estudos anteriores notou-se que compostos que possuem na sua estrutura anéis de 5 membros têm maior ação inibitória do que aqueles que possuem anéis com 6 membros. Dos compostos testados infere-se que, a presença de substituintes hidroximetil leva a um aumento da eficiência da inibição, enquanto que a presença de grupos alquilo diminui esta ação podendo mesmo eliminá-la, o que sugere que o primeiro substituinte leva a uma maior aproximação à estrutura dos substratos comuns das  $\alpha$ -glucosidases (Guerreiro, *et al.*, 2013, Winchester, *et al.*, 2009).

Em Guerreiro, *et. al.*, uma série de compostos iminociclitóis com conformação *trans* e sem funcionalidade nas posições 2 e 5 do anel foi testada. Neste estudo, o composto que demonstrou maior inibição foi (3*S*,4*S*)-pirrolidina-3,4-diol, com IC<sub>50</sub> de 10,9 mM. Isto indica que a presença de grupos hidroxilo nas posições 3 e 4 é importante para favorecer a interação com o centro ativo da enzima.



**Figura 8** – Via sintética utilizada para síntese das moléculas alvo. As condições utilizadas foram: (a) Etanol, Pd(0) EnCat 30NP, H<sub>2</sub>, 50 °C, 24h; (b) Brometo de benzilo, NaH, DMF, T. Amb., 16h.

Todos os compostos testados revelaram inibição na ordem dos milimolar, o que sugere que a falta de substituintes nas posições 2 e 5 leva a inibição mais fraca. No entanto, é de notar que estes ensaios foram efetuados em  $\alpha$ -glucosidase pura de levedura, que, como é sabido, possui uma isoforma diferente da  $\alpha$ -glucosidase de mamíferos e, como demonstrado em outros estudos, leva a inibição diferente. Foi com isto em vista que se decidiu estudar alguns destes compostos utilizando  $\alpha$ -glucosidase de mamíferos. Os compostos foram obtidos por síntese, como indicado na figura 8 (Best, *et. al.*, 2010, Guerreiro, *et. al.*, 2013, Hakamata, *et. al.*, 2009).

### 3 Toxicologia e Biossegurança

A medicina moderna utilizada na maioria dos países baseia-se bastante na medicina tradicional, da qual fazem parte a medicina chinesa, a medicina galénica, entre outras. A medicina tradicional utilizava os conhecimentos adquiridos ao longo de vários séculos, através da observação dos efeitos da ingestão de certas plantas. Por outro lado, as descobertas mais importantes da medicina moderna estão na capacidade de diagnóstico, doenças infecciosas, endocrinologia e na química medicinal. A química medicinal é uma área com grande importância, onde os princípios ativos, principalmente alcaloides, provenientes das plantas que há muito demonstraram ter efeito em certas doenças, servem de precursores para outros compostos, que vêm, mais tarde, a ser utilizados nas várias terapias (Vogel, *et. al.*, 2002, *Prontuário Terapêutico*, 2011).

Em meados da década de 1970, os testes de ligação dos compostos ao recetor foram introduzidos como forma de avaliar a sua ação sobre o recetor-alvo. Isto levou ao desenvolvimento da química combinatória. Novos testes e ensaios foram desenvolvidos, como *docking* molecular, mapeamento dos locais de ligação, HPLC quiral para obtenção de compostos enantiomericamente puros e modelação de proteínas, o que permitiu o *design* racional de síntese de novos compostos/princípios ativos. Ao saber como os compostos interagem com o recetor é mais fácil prever quais os compostos com melhor ação (Burtis, *et. al.*, 2006, Vogel *et. al.*, 2002).

A pesquisa farmacológica começou na Europa em meados do século XIX, utilizando animais como modelo experimental para testar compostos com potencial interesse farmacológico. Com o aparecimento da síntese química, a avaliação farmacológica destes compostos tornou-se necessária. Um dos principais objetivos da farmacologia clínica é a constante avaliação da segurança e tolerabilidade de novos princípios ativos, testando, entre outros, o tipo, a frequência e severidade dos efeitos secundários que possam ocorrer, em que gama de concentrações, duração e quais os efeitos que possam ser reversíveis. A forma mais clássica de testar farmacologicamente estes compostos ou extratos biológicos envolve uma série de ensaios sequenciais nos sistemas alvo *in vitro*, antes de serem testados em animais (*in vivo*), principalmente em ratos e coelhos. É importante escolher o modelo animal adequado para que os resultados obtidos possam ser extrapolados a humanos, de modo a garantir a segurança destes

aquando de dos ensaios clínicos, bem como garantir o bem-estar do animal (Vogel *et. al.*, 2002).

### 3.1 Modelos biológicos para o estudo da biossegurança

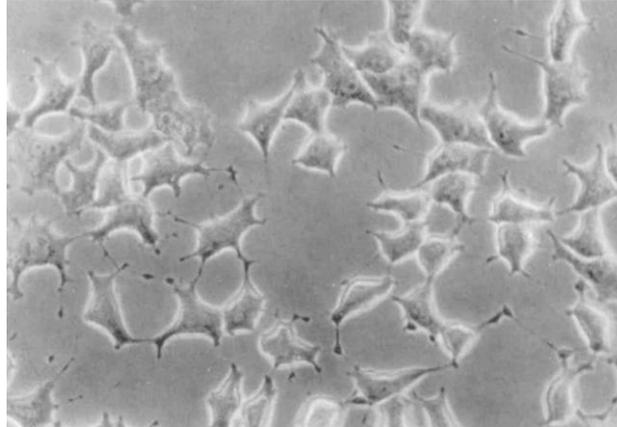
Hoje em dia, muitos procedimentos bioquímicos envolvendo tecido animal podem ser adequadamente experimentados em cultura de tecidos, contribuindo assim para a diminuição da utilização de animais. Noutros métodos *in vitro*, particularmente em toxicologia, podem ser utilizados microrganismos, cultura de células, substituindo, parcialmente, o uso de animais. A **Cultura de Células** é uma técnica que recria as condições biológicas de tal modo que certas células do organismo conseguem manter-se vivas, reproduzirem-se (mitose) e manter as suas funções metabólicas. No entanto, essas células têm que ser, numa primeira instância, recolhidas de animais, o que por vezes implica a sua eutanásia. Este tipo de cultura denomina-se **Cultura de Células Primárias**, que têm a desvantagem de se manterem pouco tempo em cultura, acabando por morrer ao fim de alguns ciclos de divisão. Existem também linhas tumorais, que são células, provenientes de certos tecidos fundidas com células tumorais, que têm a capacidade de se multiplicarem indefinidamente e que suportam condições muito mais adversas que as células primárias. São muitos os testes desenvolvidos utilizando estas células e que poder ser divididos em 3 categorias:

1. Ensaio de segundos mensageiros, que monitorizam a transdução de sinal ao nível dos recetores de superfície;
2. Ensaio de genes *repórter*, que seguem as respostas celulares ao nível da transcrição;
3. Ensaio de proliferação celular, que acompanham o crescimento ou ausência deste, de células estimuladas ou expostas a agentes externos (ECACC, 2011, Vogel *et. al.*, 2002).

A linha celular BRIN-BD 11 é uma linha celular secretora de insulina, obtida por eletrofusão de uma cultura primária de ilhéus Langerhans de rato NEDH com a linha celular RINm5F, derivada de um insulinoma de Rato NEDH (*New England Deaconess Hospital Rat*). Esta linha cresce em monocamada com uma morfologia

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

epitelial, quando confluentes, tendem a ocupar o frasco uniformemente e mantêm estabilidade em cultura pelo menos por 50 passagens (McClenaghan, *et. al.*, 1996).



**Figura 9** - Microfotografia de contraste de fase de células BRIN-BD11 cultivadas em cultura de tecidos (McClenaghan, *et. al.*, 1996).

As células BRIN-BD 11 possuem mecanismos sensíveis a glucose e apresentam função secretora de insulina e imortalidade. Em estudos recentes, provou-se que estas células têm atividade  $\alpha$ -glucosidase. No presente trabalho foram utilizadas como modelo celular, para avaliação da biossegurança dos compostos em estudo (Canelas, 2011, McClenaghan, *et. al.*, 1996, Mel, *et. al.*, 2010).

### 3.2 Metodologias utilizadas em ensaios de biossegurança ou toxicidade

Os ensaios toxicológicos constituem uma das etapas do desenvolvimento de fármacos, em que se analisam e avaliam os efeitos deletérios dos compostos em células, tecidos ou seres vivos. Os testes de toxicidade são habitualmente divididos em testes de **toxicidade aguda** e testes de **toxicidade crônica** que se relaciona essencialmente com a duração do período de exposição. Os primeiros desenvolvem-se em poucas horas, de modo a verificar as concentrações letais ou inibitórias do crescimento, podendo ser efetuados em culturas de células. Os ensaios de **toxicidade crônica** desenvolvem-se em períodos de mais longos (dias ou semanas) e avaliam os efeitos do composto a longo prazo. Existem vários tipos de testes que se podem utilizar. Estes baseiam-se em várias funções celulares tais como a atividade enzimática desidrogenase, a permeabilidade da membrana celular, a adesão celular, a produção de ATP, a produção de coenzimas

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

NADH e NADPH, a atividade citocromo c oxidase, entre outros (Dojindo - Measuring Cell Viability / Cytotoxicity).

O método do Azul de tripano é um ensaio utilizado para a identificação de células viáveis. Baseia-se na coloração de células cuja membrana não está íntegra permitindo a permeação do corante. Neste método, a viabilidade das células é determinada por contagem de células não coradas.

No método baseado na incorporação de timidina tritiada, a [<sup>3</sup>H]-timidina é envolvida no núcleo da célula, e constitui uma medida da atividade ao nível da replicação devido ao crescimento de células. A radiação devido ao trítio no núcleo é então medida, usando um contador de cintilação, e é proporcional ao crescimento celular. Embora o este ensaio seja sensível para determinar a influência sobre a atividade de polimerização de DNA, requer a utilização de um radioisótopo (Dojindo - Measuring Cell Viability / Cytotoxicity).

Os métodos que utilizam MTT (3- (4, 5-dimethyl-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazolio bromido hidrossolúvel) e WST (tetrazólio hidrossolúvel) baseiam-se na medida da atividade desidrogenase das células viáveis para determinar a viabilidade. Nestes métodos, sob ação das desidrogenases, o MTT ou WST são reduzidos pelo NADH a formazanos, cuja coloração permite a sua quantificação por desidrogenases em células é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Por ser fácil de usar, seguro e possuir uma elevada reprodutibilidade, é amplamente utilizado em ambos os ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade (Dojindo - Measuring Cell Viability/Cytotoxicity).

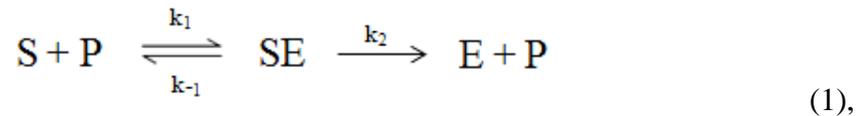
## 4 Cinética Enzimática

As **Enzimas** são proteínas que possuem capacidade de catalisar reações bioquímicas. Sendo uma parte importante da célula, são alvo de muitos estudos para os mais diversos fins e focando-se nos vários parâmetros, como por exemplo a sua atividade catalítica, taxa de conversão dos reagentes em produtos. O estudo de cinética enzimática impõe muitas vezes a purificação de enzimas, de modo a obter resultados mais reprodutíveis, e para minimizar interferências de outros componentes celulares e mesmo de outros tipos de enzimas (Metzler, 2003).

A **Cinética Enzimática** é um dos capítulos mais importantes da enzimologia e que se dedica ao estudo das reações químicas catalisadas pelas enzimas, e em particular à velocidade de reação. Este estudo permite compreender os pormenores dos mecanismos de ação enzimática, o seu papel no metabolismo, como a atividade é controlada na célula, o que permite, eventualmente, manipular as propriedades de enzimas para fins biotecnológicos (Cornish-Bowden, 2012, Quintas, *et al.*, 2008).

### 4.1 Reação Enzimática

A cinética enzimática tem como principal objetivo estabelecer uma equação que descreve a reação enzimática da forma o mais rigorosa possível. Para isso, utiliza várias grandezas obtidas experimentalmente, entre elas a velocidade inicial ( $V_0$ ). Para medir a velocidade de uma reação química, é necessário juntar os reagentes necessários para que a reação ocorra (substrato, enzima, cofatores se necessário) e ter em conta logo o início da reação. É sabido que, qualquer que seja o protocolo utilizado, a informação que se deve obter é a taxa de conversão do(s) reagente(s) em produto(s) ou a da degradação dos reagentes ou da formação dos produtos. A reação enzimática, segundo a hipótese do estado estacionário, assume que a velocidade a que se forma o complexo Enzima-Substrato (SE) é igual àquela a que se decompõe em Enzima e Substrato, e Enzima e Produto (Benkovic, 2001, Metzler, 2003), de acordo com a equação 1:



$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \quad (2).$$

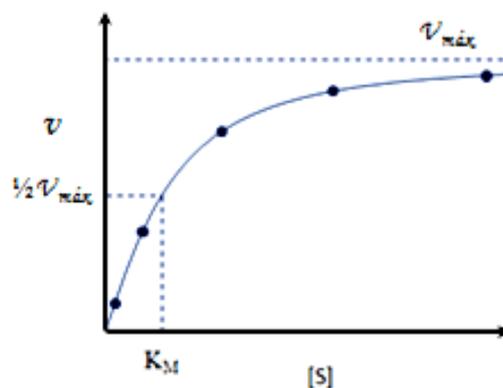
## 4.2 Equação de Michaelis – Menten

A equação 3 (Eq.3) representa a equação de Michaelis-Menten apresentada de seguida, descreve a taxa inicial da reação de um substrato, no estado estacionário, até se atingir a velocidade máxima, em função da concentração do substrato (Meltzer, 2003).

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + K_M/[S]} = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Eq. (3),}$$

onde  $K_M = (k_2+k_3)/k_1$ .

Os parâmetros  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_M$  são designados parâmetros cinéticos característicos de um determinado par enzima-substrato e a sua determinação é extremamente importante na sua caracterização. A **Velocidade máxima**, ou  $V_{m\acute{a}x}$ , é a taxa máxima à qual a enzima transforma substrato em produto, numa situação de saturação por substrato. O  $K_M$ , ou **Constante de Michaelis**, corresponde à concentração de substrato quando a velocidade da reação atinge metade da velocidade máxima, como indicado na figura 10, ou seja representa a concentração de substrato em que metade dos sítios ativos da enzima são preenchidos por moléculas de substrato. Esta constante é também uma medida da afinidade do substrato em relação a esta enzima. Quando menor for o valor de  $K_M$ , maior é a afinidade entre estas duas espécies químicas, mais fraca a ligação, se considerarmos a **Hipótese do Estado Estacionário** (Chang, 2000, Metzler, 2003).



**Figura 10** – Gráfico representativo de equação de Michaelis-Menten, onde observa-se a velocidade da reação em função concentração de substrato (adaptado de Metzler, 2003).

#### 4.2.1 Linearizações da equação de Michaelis-Menten

Obter os valores dos parâmetros  $K_M$  e  $V_{máx}$  com exatidão, a partir de dados experimentais é bastante complicado devido ao traçado do gráfico de Michaelis-Menten, que exige um grande número de pontos devido à sua natureza hiperbólica. Para evitar traçados curvos existem várias maneiras de reorganizar a equação de Michaelis-Menten para que os dados podem ser originar uma linha reta. Pelo que desenvolveram-se linearizações por rearranjo algébrico da equação, tornando-se mais simples obter os valores dos parâmetros. Através do declive e interceção, pode obter-se os valores de  $K_M$  e  $V_{máx}$ . Existem várias linearizações, sendo que as mais utilizadas são as seguidamente apresentadas (Chang, 2000, Metzler, 2003, Quintas *et. al.*, 2008):

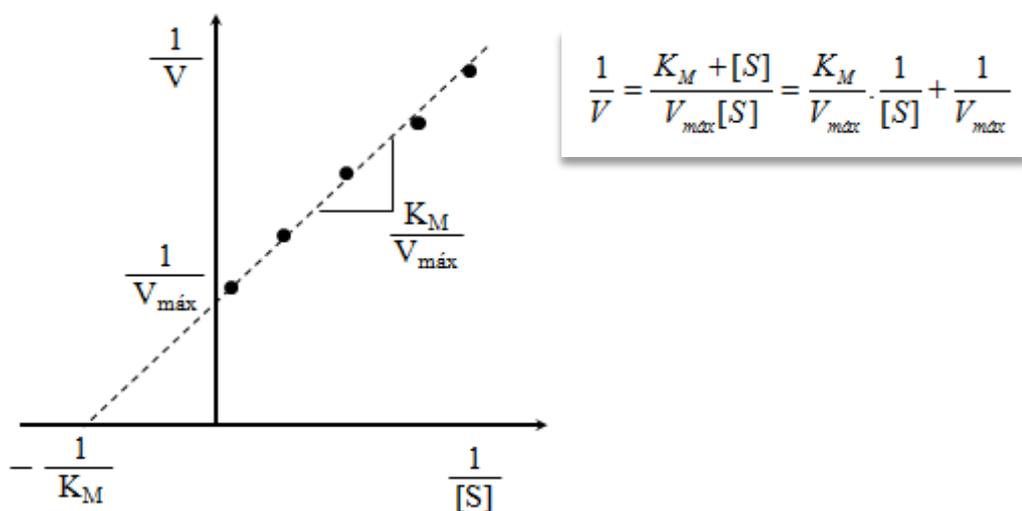
##### 4.2.1.1 Linearização de Eisenthal e Cornish-Bowden (Método Linear Direto)

No método linear direto, desenvolvido por Eisenthal e Cornish-Bowden, em 1974, obtêm-se os valores dos parâmetros cinéticos  $V_{máx}$  e  $K_M$  através da representação direta dos valores experimentais  $V$  e  $[S]$ . Para cada par de valores de  $V$  e  $[S]$ , obtêm-se uma reta, que, no seu conjunto, originam um ponto de intersecção, cuja abcissa corresponde a  $K_M$  e a ordenada é  $V_{máx}$ . No entanto, devido ao erro associado aos erros experimentais, na realidade obtêm-se um conjunto de pontos de intersecção. Os parâmetros cinéticos são determinados através da mediana dos valores obtidos para a(s) intersecção (ões) (Quintas, *et. al.*, 2008).

O método direto tem vantagens em relação aos outros métodos lineares, pois não necessita de cálculos para a obtenção dos parâmetros cinéticos e os erros de leitura estão incluídos nos resultados apresentados. Embora se possam identificar rapidamente os pontos divergentes, este método só permite representar um número limitado de resultados e é, por vezes, difícil identificar todas as intersecções (Quintas, *et. al.*, 2008)

#### 4.2.1.2 Linearização de Lineweaver – Burk

Na linearização de Lineweaver-Burk utiliza-se o inverso das grandezas utilizadas no gráfico de Michaelis-Menten, isto é  $1/v$  e  $1/[S]$ . Assim, a equação apresentada na figura 11 que descreve esta linearização toma a forma apresentada e leva a um gráfico com traçado linear, em que os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  são facilmente obtidos, onde  $V$  corresponde à velocidade,  $S$ , corresponde ao substrato. (Metzler, 2003, Quintas, *et. al.*, 2008).

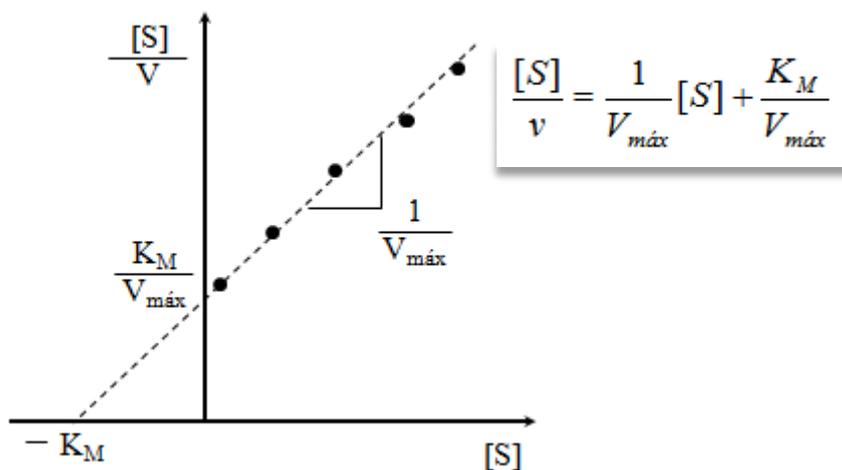


**Figura 11** – Representação da linearização de Lineweaver-Burk (adaptado de Metzler, 2003).

Este método de linearização é um dos mais utilizados, no entanto, tem associados erros significativos, principalmente no eixo  $oy$  e para  $[S]$  mais baixa, que no gráfico correspondem aos valores mais à direita (Quintas, *et. al.*, 2008).

### 4.2.1.3 Linearização de Hanes-Woolf

Na linearização de Hanes-Woolf utiliza-se como grandezas  $[S]/V$  e  $[S]$ . Para esta linearização, como a variável independente,  $[S]$ , está presente em ambos eixos, diminuiu os erros associados. Assim, a equação de Michaelis toma a forma apresentada na figura 12, a partir da qual se pode obter o gráfico seguinte (Metzler, 2003, Quintas, *et. al.*, 2008):



**Figura 12** – Representa gráfica da linearização de Hanes-Woolf (adaptado de Metzler, 2003).

Este método tem a vantagem de originar uma reta cujo declive é o inverso de  $V_{máx}$  e estão menos erros associados. (Quintas, *et. al.*, 2008)

### 4.2.1.4 Linearização de Eadie-Hofstee

Na linearização de Eadie-Hofstee utiliza-se como grandezas  $V$  e  $V/[S]$ . Neste caso, ao contrário da linearização de Hanes-Woolf, utiliza-se em ambos eixos a variável dependente, o que aumenta o erro associado. Com esta linearização, a equação de Michaelis toma a forma apresentada na figura 13, obtendo-se um gráfico como o apresentado seguidamente (Quintas, *et. al.*, 2008, Metzler, 2003).

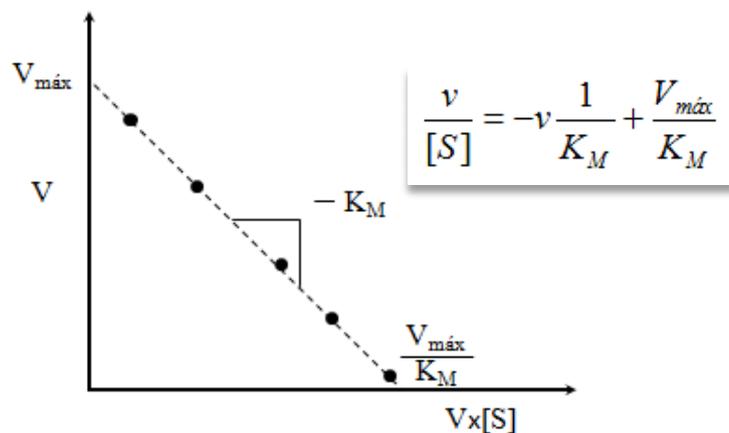


Figura 13 – Representação de gráfica da linearização de Eadie-Hofstee (adaptado de Metzler, 2003).

A linearização de Eadie-Hofstee é útil para obter os parâmetros cinéticos, pois não necessita de grandes cálculos, no entanto, devido ao fato de a velocidade (variável dependente) aparecer em ambas coordenadas faz com que o erro associado a esta, afete ambas membros da equação (Quintas, *et. al.*, 2008).

### 4.3 Inibição Enzimática

Todo o composto que diminui a atividade de uma enzima é designado por **inibidor**. A ligação enzima-inibidor pode ter um caráter **reversível**, em que a ligação do inibidor-enzima não é permanente e a extensão da inibição é menor quando a menor é a concentração do inibidor, ou **irreversível**, em que o inibidor se liga com grande afinidade à enzima, bloqueando a sua atividade (Holt, *et. al.*, 2010, Voet, *et. al.*, 2005).

Os inibidores são normalmente pequenas moléculas, podendo ser, por vezes, péptidos ou proteínas. Ao ligar-se ao enzima, modificam a forma do centro ativo, impedindo a ligação deste ao seu substrato, não ocorrendo a catálise (Holt, *et. al.*, 2010, Voet, *et. al.*, 2005).

### 4.3.1 Tipos de Inibição

A Inibição pode-se dividir em várias classes, dependendo do seu modo de ligação à enzima. Se o inibidor e o substrato se ligam no mesmo local da enzima, mais especificamente no centro-ativo, a inibição é **competitiva**. Neste caso, há um aumento aparente do valor de  $K_M$ , uma vez que o inibidor se liga no centro ativo, sendo necessária uma maior concentração de substrato para se atingir metade da velocidade máxima, que se mantém inalterada. Se, por outro lado, o inibidor se liga num local diferente do centro-ativo, a inibição é **não-competitiva** ou **alostéria**. Neste caso, a velocidade máxima sofre uma diminuição e o valor de  $K_M$  mantém-se inalterado, uma vez que o substrato se liga normalmente à enzima, mas devido à ligação do inibidor, a catálise fica impedida e, a velocidade máxima atingida é inferior. Existe também a inibição **anticompetitiva**, onde o inibidor se liga após a formação do complexo ES. Neste caso, observa-se uma diminuição tanto na  $V_{máx}$  como no valor de  $K_M$ . Na prática, a situação mais frequente é uma **inibição mista**, onde se verifica o efeito das inibições competitiva e não-competitiva em simultâneo (Cornish-Bowden, 2012, Newsholme, *et. al.*, 2010).

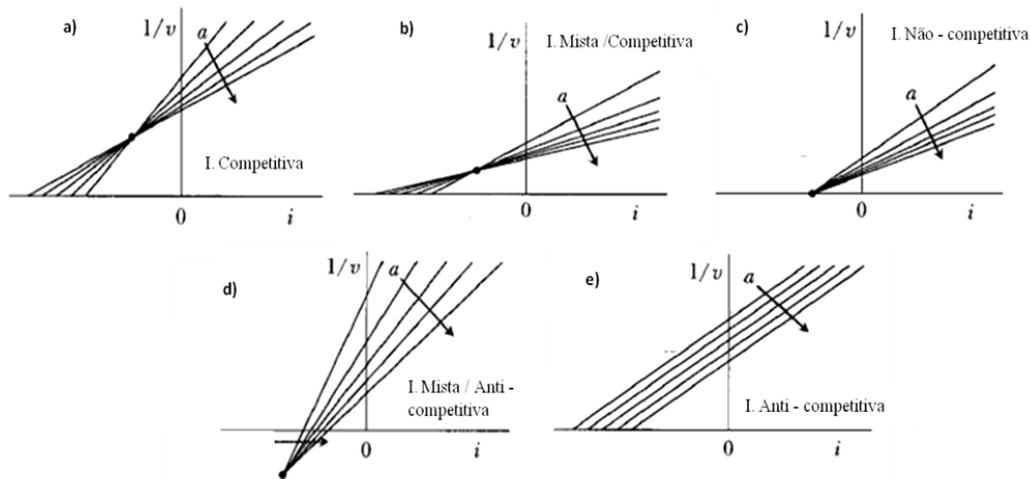
### 4.3.2 Constante de Inibição, $K_I$

A **constante de inibição**, ou  $K_I$  é uma constante importante nos estudos de cinética, pois a potência relativa dos inibidores é normalmente quantificada comparando esta constante, para a enzima em estudo. É designada como a concentração de inibidor necessária para produzir metade da inibição máxima, ou seja, na inibição competitiva, é a concentração necessária para duplicar o  $K_M$  e na inibição não-competitiva corresponde à concentração de inibidor necessária para reduzir a velocidade máxima para metade (Cortés, *et. al.*, 2001, Quintas, *et. al.*, 2008).

Para calcular este parâmetro é necessário recorrer ao **Gráfico de Dixon**, desenvolvido por Dixon em 1953, em que se correlaciona o inverso da velocidade inicial ( $V$ ) com a concentração do Inibidor  $[I]$ , para  $n$  valores de substrato, originando  $n$  retas lineares que se cruzam num ponto de interseção, cuja abcissa corresponde a  $-K_I$ , como indica a figura 14. No caso de a inibição ser competitiva ou mista predominantemente competitiva, esta interseção ocorre acima do eixo  $ox$ . Se a inibição for mista predominantemente anticompetitiva ou não-competitiva pura, a interseção

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

ocorre sobre ou abaixo do eixo  $ox$ , respectivamente. Se a inibição for anticompetitiva, o gráfico resultante contém  $n$  retas paralelas, pelo que não existe ponte de interseção (Dixon, *et. al.*, 1953, Quintas, *et. al.*, 2008).



**Figura 14** – Gráfico de Dixon, para os vários tipos de Inibição (adaptado de Cortés, *et. al.*, 2001).

Existe uma relação entre os valores de  $IC_{50}$ , que corresponde à concentração de inibidor necessária para se obter 50% de inibição, e  $K_I$ , dependendo do tipo de inibição e do mecanismo de reação. Quando a inibição é competitiva, estes dois parâmetros não são iguais. Mas, no caso de inibição não-competitiva e anticompetitiva,  $K_I$  é igual ao  $IC_{50}$ , se o valor de  $IC_{50}$  não depender da concentração de substrato. Assim, quando um dado grupo de inibidores tem mecanismos de ação idênticos, e considerando que os ensaios são efetuados nas mesmas condições, a comparação do valor de  $IC_{50}$  é suficiente para identificar a sua eficiência relativa (Cortés, *et. al.*, 2001).

#### 4.4 Condições para Realização de Estudos de Atividade Enzimática e de Inibição Utilizando Homogeneizados Celulares

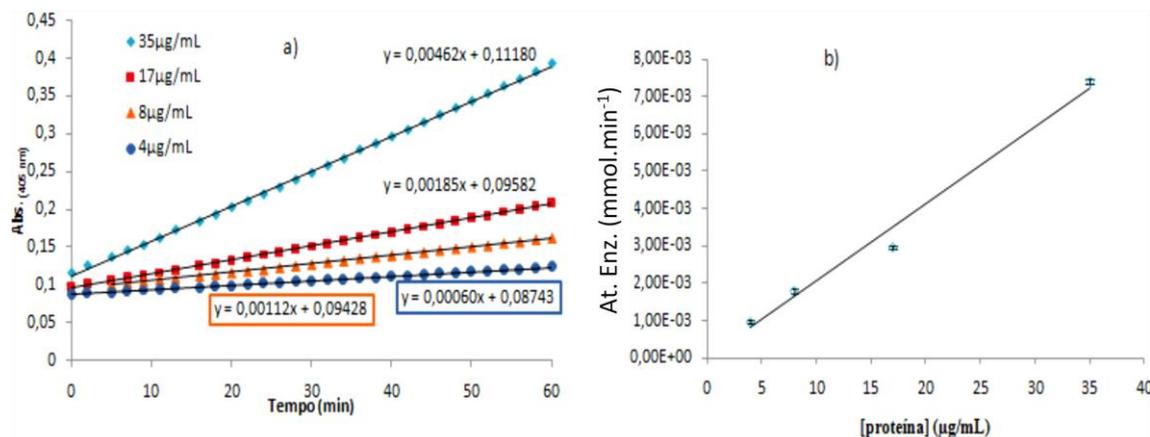
A determinação da atividade enzimática é uma das práticas mais usuais em Bioquímica, uma vez que está envolvida na avaliação, quantificação e caracterização de sistemas enzimáticos presentes nas amostras biológicas em estudo. A atividade enzimática é obtida por determinação da velocidade de conversão do substrato (s) em produto(s). Para isso, pode-se seguir a taxa de degradação do(s) substrato(s) ou a formação de produto(s), quando estes fornecem um sinal mensurável. Também existe a possibilidade de seguir uma segunda reação que esteja acoplada à primeira e que forneça um sinal apreciável. Para a determinação correta da atividade enzimática específica é também necessário que as condições da catálise sejam escolhidas adequadamente, ou seja, têm que estar as condições ótimas de alguns fatores, como temperatura, pH, sistema tampão, cofatores, quando necessário (Quintas, *et. al.*, 2008).

A obtenção do material biológico para o estudo enzimático é um passo importante, pois este deve garantir a obtenção da enzima alvo, em quantidades apreciáveis, assim como garantir a estabilidade desta e as melhores condições para a sua análise, em particular quando se trata de homogeneizados de tecidos ou células. A quantificação de proteína do homogeneizado é indispensável para permitir a determinação da atividade enzimática específica e a comparação entre ensaios e homogeneizados diferentes. (Quintas, *et. al.*, 2008).

A determinação da quantidade adequada de homogeneizado à determinação da atividade específica bem como o período durante o qual a cinética é linear são aspetos importantes destes trabalhos. No caso particular da atividade  $\alpha$ -glucosidase de enterócitos, foi anteriormente desenvolvido um método onde foram estabelecidas as condições ideais, no que respeita à concentração de proteína a utilizar, de forma a garantir uma boa razão sinal/ruído. Na figura 15 pode observar-se a cinética da reação, utilizando concentrações num intervalo de 4-35 $\mu$ g/mL. Note-se que a melhor relação sinal/ruído foi obtida utilizando uma concentração de proteína de 35 $\mu$ g/mL. Note-se ainda que independentemente da concentração de proteína utilizada, a reação foi linear durante pelo menos 60 minutos (Louro, 2011, Quintas, *et. al.*, 2008, Sjögren, *et. al.*, 2011).

## Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

Para que a determinação da atividade seja a mais correta possível, é necessário seguir a reação desde o momento inicial. É essencial acompanhar a reação desde o tempo zero (o segundos), de modo a garantir que a atividade inicial é bem estimada. A velocidade inicial pode ser subestimada por assumir erradamente a linearidade numa zona de curva que não a inicial (Louro, 2011, Sjögren, *et. al.*, 2011).



**Figura 15** - Atividade da  $\alpha$ -glucosidase, para as várias concentrações de homogeneizado celular (Louro, 2011).

Para além destes parâmetros, há ainda que ter em conta é a gama de concentrações do substrato, em particular para os estudos de inibição. Esta gama deve incluir concentrações de substrato de modo a assegurar que se atinge a velocidade máxima, mas sem provocar inibição por substrato. Efetivamente um dos riscos mais comuns é ocorrer inibição da catálise por consumo total do reagente (reagente limitante). A determinação da concentração adequada a este estudo foi efetuada no âmbito do presente trabalho (Louro, 2011, Quintas, *et. al.*, 2008).

Finalmente, outro aspeto a ter em conta nos ensaios enzimáticos é a utilização de controlos, em que o substrato ou a enzima estão ausentes. Estes são essenciais para o ensaio e para a interpretação dos resultados. Quando comparados com a atividade enzimática, descartam a possibilidade da produção de sinal por parte da enzima livre, autodegradação do substrato ou influência do sistema tampão ou solvente (Sudarshana, *et. al.*, 2001)

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminociclítóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

*Projeto*

---

## 1 Problemática

A Diabetes *mellitus* é uma doença metabólica sistêmica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que este número tem vindo a aumentar nos últimos anos (WHO, 2013). É uma doença com elevada morbidade, resultante das inúmeras complicações a ela associadas, cujo controlo exige a utilização de estratégias terapêuticas dirigidas e muitas vezes combinadas.

Embora os antidiabéticos orais existentes permitam o controlo da doença, a procura de novas substâncias de modo a obter compostos que possam auxiliar na terapia da diabetes, com menos efeitos adversos, menores custos e que complementem os medicamentos existentes, é um tema atual. Existem várias classes de antidiabéticos orais, entre os quais se encontram os inibidores das  $\alpha$ -glucosidasas, ao atuarem sobre estas enzimas atrasam a digestão dos glúcidos e, conseqüentemente diminuem a taxa de absorção de glucose a nível intestinal contribuindo de forma eficaz para o controlo da hiperglicémia pós-prandial (Holt, *et. al.*, 2010).

As  $\alpha$ -glucosidasas são um conjunto vasto e heterogéneo de isoenzimas e largamente distribuídos nos seres vivos (Hakamata, *et. al.*, 2009). Entre estas encontram-se as maltases e sacarases que são expressas nas células da mucosa intestinal (enterócitos) e que são responsáveis pela degradação das ligações  $\alpha$ -glucosídicas de maltose/sacarose cujo produto final é constituídos principalmente por glucose. As diferentes isoenzimas, para além de apresentarem seletividade para os substratos, são também seletivamente inibidas por compostos iminociclitois com grupos funcionais diferentes, dos quais é exemplo o DNJ. Estes inibidores são de elevado interesse terapêutico, pois além da atividade antidiabética, também apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, associadas à sua seletividade para isoenzimas diferentes de  $\alpha$ -glucosidase.

Devido ao seu interesse terapêutico, nos últimos anos têm sido sintetizados novos compostos com ação inibitória sobre estas enzimas, tornando-se bastante importante a caracterização da sua atividade biológica seletiva. No presente trabalho procurou-se avaliar o efeito de 4 compostos iminociclitois, na atividade  $\alpha$ -glucosidase de enterócitos de mamífero, tendo em vista a sua potencial utilidade como antidiabéticos orais.

## 2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho consiste em avaliar o potencial farmacológico de iminoclitóis enquanto inibidores de atividade  $\alpha$ -glucosidase, para utilização como terapêutica na diabetes.

Mais especificamente pretendeu-se avaliar o efeito dos iminoclitóis sobre a atividade  $\alpha$ -glucosidase de células de intestino de mamífero. Neste âmbito, realizaram-se ensaios de atividade enzimática para:

- i. determinação dos  $IC_{50}$  e identificação dos compostos mais promissores;
- ii. identificação do tipo de inibição e determinação do  $K_I$ .

Pretendeu-se, também, avaliar a toxicidade dos compostos utilizando, para o efeito, células em cultura aderente.

### 3 Metodologia

#### 3.1 Estratégia adotada

**a) Realização do trabalho:**

- i. Local: Laboratório de Bioquímica da Universidade de Évora, Departamento de Química da Universidade de Évora, Portugal.
- ii. Duração: 2 semestres letivos.

**b) Modelo e Características do Animal:**

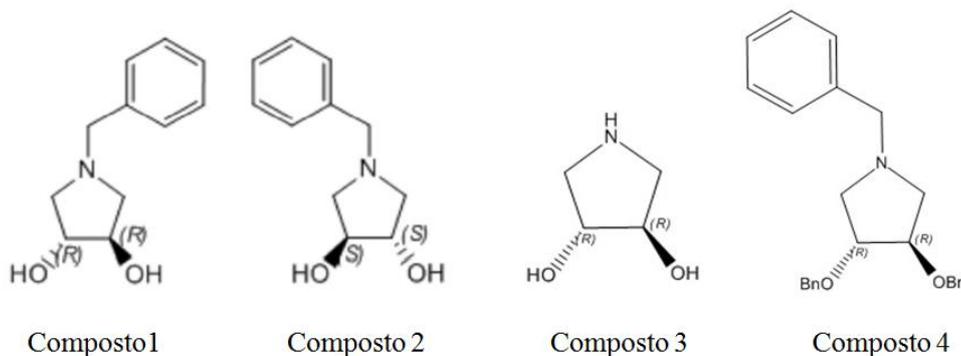
- i. Modelo Animal: ratos Wistar, mantidos no Biotério da Universidade de Évora.
- ii. Critério de seleção: adultos, machos;
- iii. Tipo de Alimentação: fornecimento de alimento e água *ad libitum*, com ciclo de 12h de luz e obscuridade.

**c) Modelo Celular:**

- i. Células epiteliais intestinais primárias de ratos (Enterócitos);
- ii. Células BRIN (Linha Tumoral).

**d) Enzima Alvo:**  $\alpha$ -glucosidase.

**e) Compostos em Estudo:** potenciais inibidores das  $\alpha$ -glucosidasas:



1- (3*R*,4*R*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol;

2- (3*S*,4*S*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol;

3- (3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4-diol;

4- (3*R*,4*R*)-1-benzil-3,4-di-(benziloxi) pirrolidina.

Estes compostos foram sintetizados pelo Laboratório de Química Orgânica da ECTUE (Doutora Elisabete Carreiro, Prof. Anthony Burke) e caracterizados por ponto de fusão e RMN.

**f) Métodos e técnicas utilizadas:**

- i. Obtenção dos enterócitos: isolamento recorrendo ao método inicialmente descrito por Watford (Watford *et. al.*, 1979) e ao qual se foram introduzidos algumas modificações durante a realização do trabalho;
- ii. Obtenção da fração rica em  $\alpha$ -glucosidase: centrifugação diferencial dos homogeneizados de enterócitos;
- iii. Determinação da Atividade na presença e ausência dos compostos iminociclitóis em estudo: espectrometria UV/Vis para determinação do produto de reação;
- iv. Cultura de células BRIN BD-11 em *batch*:
- v. Análise da viabilidade célula após exposição aos iminociclitóis: método de WST-8 (*Cell Counting Kit-8*);

**3.1.1 Espectrometria UV/Vis**

A **espectrometria UV/Vis** ou do ultravioleta visível é uma técnica espectrofotométrica que utiliza a luz do ultravioleta próximo (200 até 350nm) e do visível (350 a 750 nm). Nestas gamas de energia, as moléculas presentes na solução em estudo sofrem transições eletrônicas, onde absorvem radiação, o que permite determinar quantitativamente a concentração dessas mesmas moléculas. Esta técnica utiliza a **Lei de Lambert-Beer**, que é representada pela equação (6)

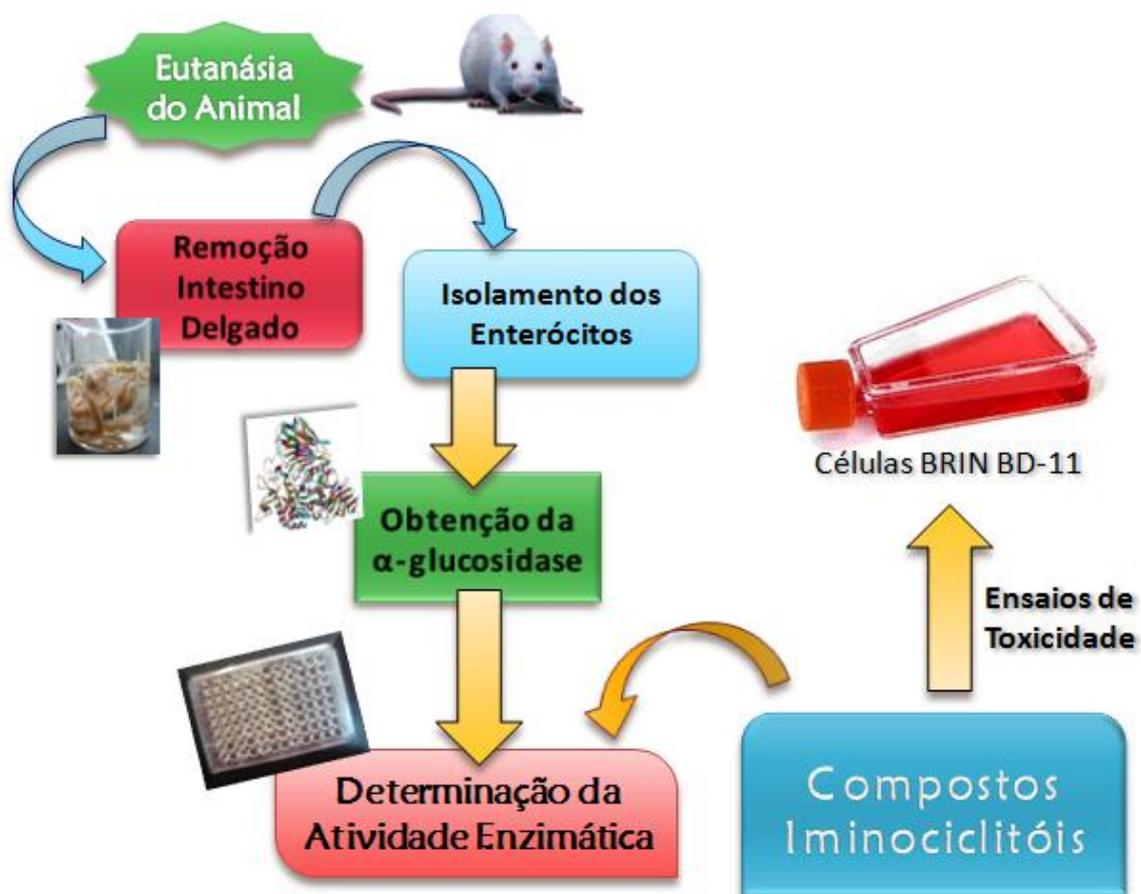
$$A = \varepsilon.l.c , \quad (6),$$

onde  $A$  representa a absorvância medida,  $\varepsilon$  representa a absortividade molar (especifica para cada substância);  $l$  representa o percurso ótico da solução;  $c$  representa a concentração da amostra, expressa em Molaridade (mol/L).

**3.1.2 Ensaios Toxicológicos**

O *Cell Counting Kit-8* contém sal de tetrazólio altamente solúvel em água que é reduzido pelas desidrogenases das células viáveis, formando um formazano de cor laranja, que é solúvel no meio de cultura de tecidos. A quantidade do corante de formazano produzido é, assim, diretamente proporcional ao número de células vivas.

### 3.2 Organigrama



### 3.3 Procedimento Experimental

#### 3.3.1 Soluções Utilizadas

Todas os reagentes utilizados na elaboração deste trabalho foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), exceto o reagente de Coomassie para quantificação de proteína, que foi adquirido da Bio-Rad (Hercules, CA).

- Meio Krebs & Henseilt modificado:

120 mM de NaCl; 2 mM KCl; 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 26 mM NaHCO<sub>3</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 11 mM glucose;

- Solução 1: Meio de Krebs & Henseilt sem CaCl<sub>2</sub>;
- Solução 2: Meio de Krebs & Henseilt sem CaCl<sub>2</sub>, com 0,25% (p/v) BSA e 5mM EDTA;
- Solução 3: Meio de Krebs & Henseilt com 2,5% (p/v) BSA.

#### 3.3.2 Isolamento dos Enterócitos de Rato

Para o isolamento dos enterócitos foi utilizado uma adaptação de Watford, *et al*, 1979. Procedeu-se à eutanásia dos animais, por decapitação, sem recorrer a anestésicos. Em seguida, removeu-se o intestino delgado, iniciando 5 cm abaixo do duodeno até cerca de 10 cm antes da junção com o cólon, perfazendo um total de 90 cm, aproximadamente. Iniciou-se a lavagem do intestino, enchendo o mesmo com 20 mL da solução 1 a 4°C, e espremendo-se de seguida para remoção dos detritos (por duas vezes). Posteriormente, selou-se uma das pontas com linha de sutura e encheu-se o intestino com 20 mL de solução 2 pré-aquecida a 37°C. Após ligar a ponta restante, incubou-se o intestino em 100 mL de solução 1 num banho termostatizado a 37°C com agitação (60 rotações por min), por 15 min. De seguida, abriu-se uma das pontas do intestino e desprezou-se o conteúdo. Lavou-se duas vezes com solução 3 a 4°C, procedimento que permitiu remover células mortas e parte do muco intestinal. Voltou-se a encher o intestino com solução 3 a 4°C, ligou-se novamente a ponta e agitou-se o intestino sob uma plataforma de gelo por cerca de 1 min. Este último tratamento é efetuado com cálcio, que vai promover a agregação dos enterócitos e a sua remoção para o lúmen intestinal. Recolheu-se, então, o conteúdo para tubos de *falcon*,

recorrendo-se a *clamps*, de modo a evitar perdas de material biológico. Centrifugou-se os tubos a 500g durante 3 minutos, desprezou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 4 vol. de solução 3 a 4°C, centrifugando-se os tubos novamente, nas mesmas condições. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 4 volumes de Tampão Fosfato Salino 0,1M pH 7,0 ao sedimento e centrifugou-se nas mesmas condições. Por fim, recolheu-se o sedimento e adicionou-se 4 volumes de Tampão Fosfato Salino 0,1M pH 7,0 e congelaram-se as células a -70°C até serem utilizadas.

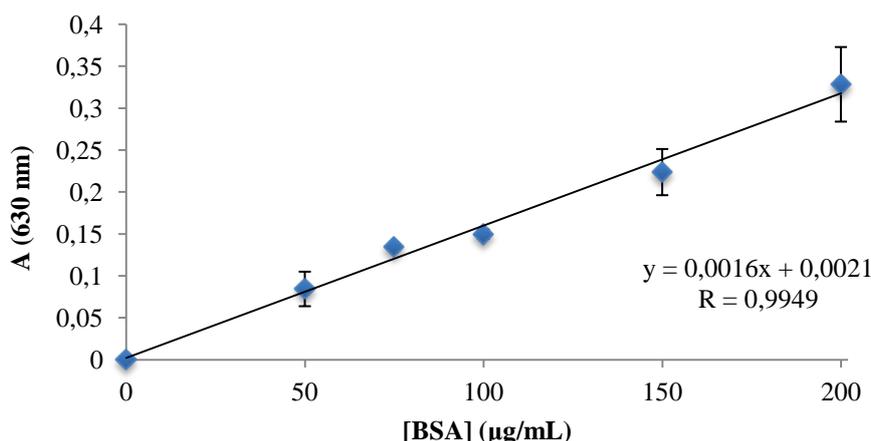
### **3.3.3 Obtenção da suspensão enzimática rica em $\alpha$ -glucosidase**

Após descongelamento das células, colocaram-se no tubo de *Potter* 10 mL e homogeneizaram-se a baixa velocidade. Colocou-se o homogeneizado em tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugaram-se a 20 000g, por 20 min a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante e armazenou-se em alíquotas a -80°C até a sua utilização.

### **3.3.4 Doseamento da Proteína**

Este método foi baseado no desenvolvido por Bradford, em 1976, em que a colorimetria é utilizada para determinar a concentração total de proteína. Inicialmente diluiu-se a suspensão celular (10 e 15x), em H<sub>2</sub>O bidestilada. Numa microplaca de 96 poços, aplicaram-se 10 $\mu$ L de amostra (suspensão celular) ou soluções Padrão de BSA<sup>(1)</sup> (nas concentrações 0, 50, 75, 100, 150 e 200  $\mu$ g/mL) e juntou-se 200 $\mu$ L de reagente de Commassie (fornecido pela Bio-Rad). Aguardou-se 5 min e leu-se a absorvância a 630 nm. Este método é baseado na alteração de absorvância do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250, que sob condições ácidas converte a sua cor vermelha em azul, ao ligar-se à proteína. A figura 16 mostra uma curva de calibração representativa das obtidas durante a realização do trabalho:

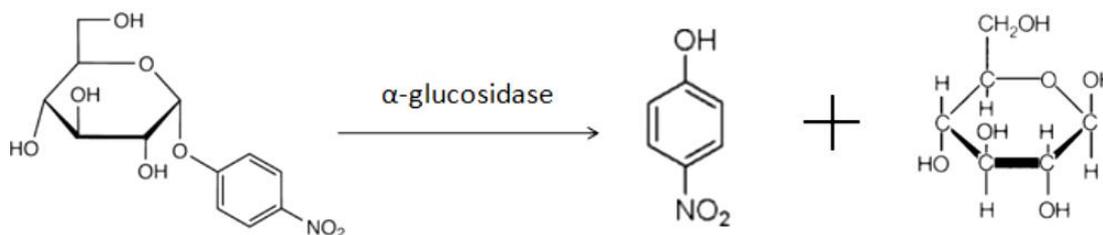
(1) Albumina de soro bovino



**Figura 16** - Curva de Calibração para a determinação da concentração de proteína. (Os dados são relativos a três experiências independentes e os resultados são referentes à média associada ao respetivo desvio padrão.)

### 3.3.5 Determinação da Atividade Enzimática $\alpha$ -glucosidase:

Numa microplaca de 96 poços, em cada poço utilizado aplicou-se 100µL de homogeneizado celular (na concentração de aproximadamente de 40µg de proteína/mL) e 100µL de substrato pNPG<sup>(2)</sup> a 24 mM, conforme indica a literatura (Dillon, 1997). Os ensaios efetuaram-se em quintuplicado. Leu-se e registou-se a absorvância a 405 nm durante 60 min (de 1 em 1 min). A atividade  $\alpha$ -glucosidase foi determinada com base no aumento de absorvância a 405 nm resultante da formação de p-nitrofenol, composto que é libertado em conjunto com uma molécula de glucose através da reação de degradação do substrato pela  $\alpha$ -glucosidase conforme a figura 17:



**Figura 17** – Reação de conversão de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo em p-nitrofenol e glucose.

Selecionou-se a região linear da curva cinética e determinou-se o declive da reta ajustada. Multiplicou-se o declive pelo  $\epsilon$  ( $18,1 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) de acordo com a lei de Lambert-Beer e dividiu-se pela concentração de proteína usada no ensaio, obtendo-se, desta forma, a atividade enzimática específica da  $\alpha$ -glucosidase.

(2) p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo

Para a avaliação da ação inibitória dos compostos, o procedimento foi ligeiramente alterado e foi preparado um conjunto de controlos.

Numa placa de 96 poços, aplicou-se 100  $\mu$ L do extrato celular, 50  $\mu$ L do composto (nas varias concentrações, no intervalo 0 – 36 mM) e 50  $\mu$ L de substrato 24 mM. Preparou-se um conjunto de controlos:

- i. **Controlo 1**, para a determinação da Atividade máxima (não foi adicionado composto nem solvente (DMSO), substituindo-se por tampão);
- ii. **Controlo 2**, controlo relativo do ensaio, para avaliação da degradação não enzimática do substrato;
- iii. **Controlo 3**, onde não se adicionou substrato, substituindo-se por tampão, determinando a atividade endógena, que possa, eventualmente, interferir com o ensaio.
- iv. **Controlo 4**, onde foi adicionado DMSO, para avaliar a degradação da enzima por este solvente;
- v. **Controlo 5**, controlo positivo do ensaio, utilizando um inibidor comercial.

Os ensaios efetuaram-se em quintuplicado. Leu-se e registou-se a absorvância a 405 nm durante 60 min (de 1 em 1 min).

### 3.3.6 Cultura Celular de BRIN BD-11

Inicialmente, descongelam-se as células que permaneceram a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ao momento de descongelamento em microtubos de congelação em meio constituído por meio 10% de soro fetal bovino, 10 % DMSO. Este passo deve ocorrer o mais rápido possível, para que não haja perda de viabilidade devido ao contacto com DMSO. Transferiu-se, então, o conteúdo do microtubo para um *falcon* de 15 mL com 5 mL de meio RPMI-1640 11 mM glucose incompleto, e centrifugou-se a 270g por 5 min. Ressuspendeu-se bem o *pellet* em 1 mL de meio completo e colocou-se em frascos de 75  $\text{cm}^2$ , contendo 20-25 mL de meio RPMI-1640 11 mM glucose completo, previamente aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$ . Os frascos foram colocados numa incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2/95\% \text{O}_2$ , para a proliferação das células.

Devido ao consumo dos nutrientes e à libertação de produtos resultantes do metabolismo das células, é necessário substituir o meio periodicamente. Normalmente, efetua-se esta mudança após 24 h (devido à existência de células que não sobrevivem ao descongelamento) e depois de dois em dois dias. Primeiro, observou-se o aspeto das células ao microscópio invertido, para verificar a que a cultura está nas condições normais e que estão aderentes. Depois, na câmara de fluxo, aspirou-se o meio com uma pipeta de Pasteur, com vácuo, tendo o cuidado de não tocar no fundo do frasco (onde estão as células). Adicionou-se 5 mL de meio incompleto, para lavar o fundo do frasco, e aspirou-se, novamente, com uma pipeta de Pasteur, com vácuo. Adicionou-se 20-25 mL de meio RPMI 1640 11 mM glucose completo e colocaram-se os frascos na incubadora, nas condições indicadas anteriormente.

Quando as células ocupam quase a totalidade do fundo do frasco de cultura (cerca de 90%), a cultura atingiu a confluência. Quando isto acontece é necessário passar as células para outros frascos e diluí-las. Utilizando a solução de Versénio, destacaram-se as células do fundo do frasco, permanecendo em suspensão no meio. Aspirou-se o meio com as células e colocou-se em tubos de centrifuga de 15 mL e centrifugou-se a 270 g durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de meio. Contaram-se as células numa câmara de *Neubauer* ao microscópio invertido e determinou-se a diluição a efetuar de modo a semear 500 000 células por frasco.

### 3.3.7 Ensaios de Toxicidade

A toxicidade dos compostos em análise foi avaliada medindo-se o seu efeito sobre a viabilidade celular de uma linha tumoral (BRIN BD-11) exposta aos compostos por 24 horas.

Colocou-se 100 µL da suspensão celular de BRIN BD-11 (20 000 células/mL) num microplaca de 96 poços estéril e colocou-se numa incubadora a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>. Após 24h, substituiu-se o meio e adicionou-se 10 µL das várias soluções dos compostos 11x concentradas nos poços indicados (obtendo-se como concentrações finais as indicadas) e voltou-se a incubar a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

durante 24 horas. No final do período de incubação, adicionou-se 10  $\mu$ L do *cell counting kit-8* a cada poço e leu-se a absorvância a 450 nm ao fim de 45 minutos de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>. Foram utilizados dois controlos para validar o ensaio. O controlo negativo, que consistiu em células que não foram expostas aos compostos e um controlo positivo, em que as células foram expostas a SDS (dodecil sulfato de sódio), um detergente iónico, que destrói as biomembranas.

### 3.3.8 Análise Estatística

Os resultados apresentados foram calculados como média  $\pm$  desvio-padrão, exceto quando indicado contrário.

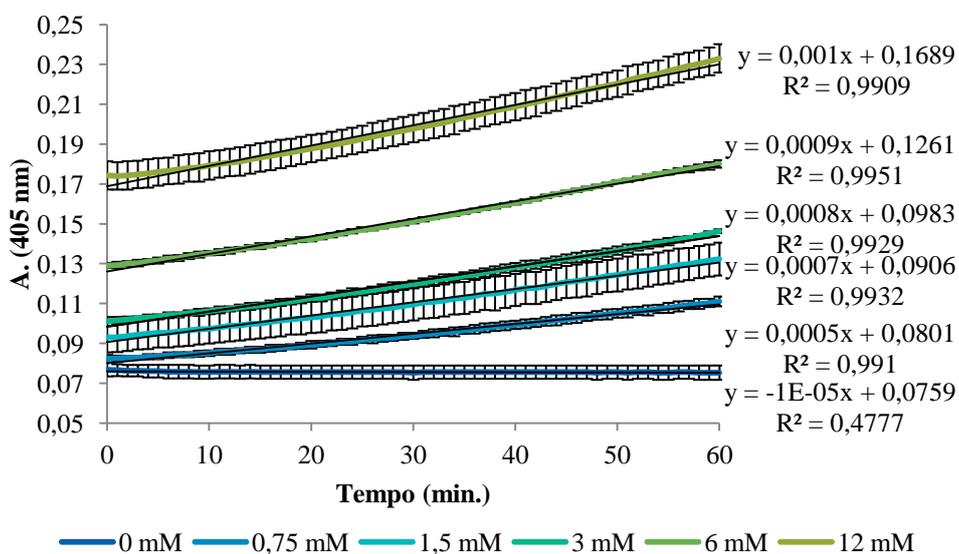
Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA), no caso da atividade enzimática, na presença e ausência dos compostos testados. Para os ensaios de toxicidade, foi utilizado *Paired-samples t-Test*, para comparação das amostras relativamente ao controlo negativo. Em todos os casos foi utilizado um nível de significância de 95%.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Estudo da Atividade Enzimática $\alpha$ -glucosidase e Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Primeiramente, efetuou-se um estudo que permitiu otimizar as condições do ensaio para a determinação da atividade enzimática  $\alpha$ -glucosidase em homogeneizado de enterócitos. A otimização de um ensaio enzimático implica o estudo da influência de diversos parâmetros na atividade enzimática, de forma estabelecer as condições adequadas que permitam efetuar um estudo quantitativo. A atividade enzimática é influenciada simultaneamente pela concentração de enzima e de substrato. Para além disso, a catálise obedece, habitualmente, a uma cinética de 1ª ordem, obrigando à determinação do intervalo de tempo para o qual a reação apresenta características lineares em função do tempo.

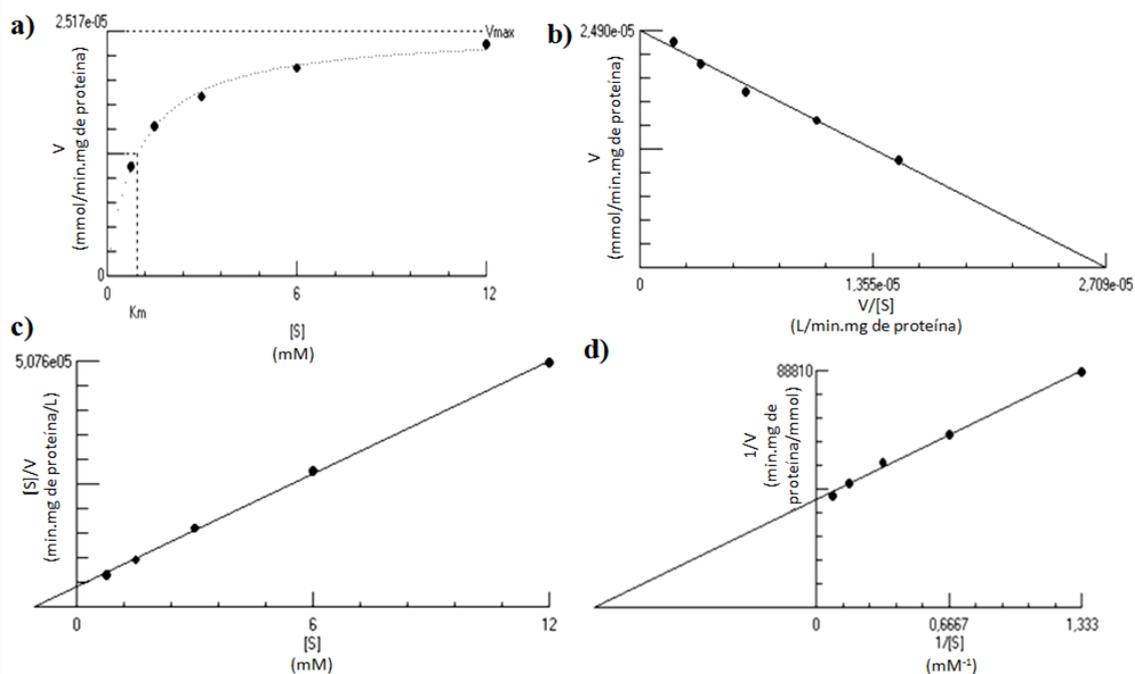
A figura 18 mostra as curvas de cinética da atividade enzimática  $\alpha$ -glucosidase de enterócitos para as concentrações de substrato no intervalo 0 - 12 mM. Na figura é possível observar que, na ausência de substrato, não se registou atividade enzimática significativa (declive  $\approx 0$ ), enquanto que o declive das retas sofre um aumento acompanhado as concentrações crescentes de substrato. A figura 18 mostra ainda que o ensaio é linear durante, pelo menos, 60 minutos, nas condições utilizadas.



**Figura 18** - Atividade da  $\alpha$ -glucosidase para as diferentes concentrações de substrato (p-NPG) (Os resultados são referentes a uma experiência com cinco réplicas. Cada ponto representa a média  $\pm$  sd).

Uma vez calculada a atividade específica, foi determinada a dependência desta relativamente ao substrato p-NPG e determinados os parâmetros cinéticos, recorrendo a diversos métodos.

A figura 19 mostra a curva de Michaelis-Menten (a), onde se observa a cinética de saturação característica de atividade enzimática em função da concentração de substrato, e as linearizações Eadie-Hofstee (b), Hanes-Woolf (c) e Lineweaver-Burk (d), as quais foram utilizadas para determinar os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$ .



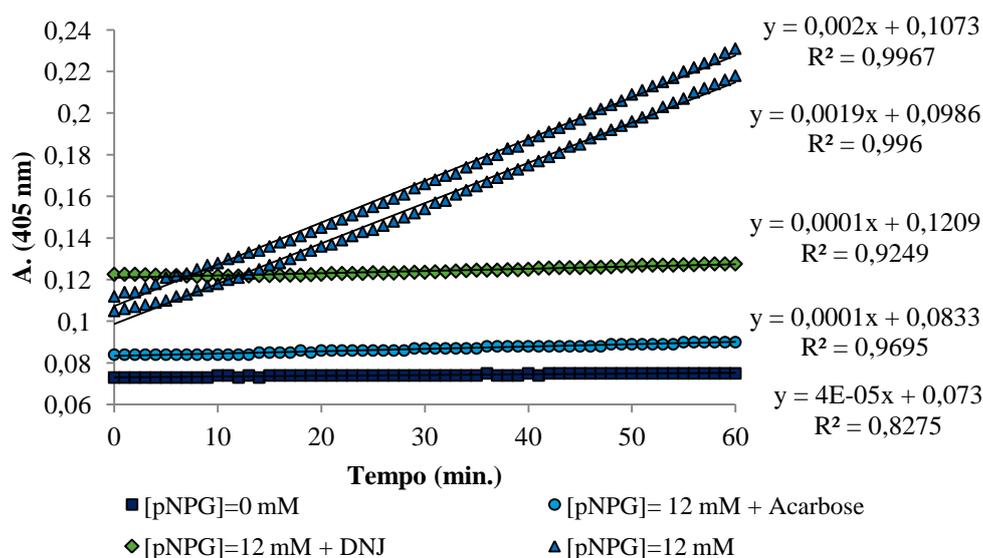
**Figura 19** – Determinação dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  utilizando a curva de Michaelis-Menten (a), as linearizações de Eadie-Hofstee (b), de Hanes-Woolf (c) e de Lineweaver-Burk (d). Os gráficos foram obtidos utilizando o programa *Hyper 32*. (Os resultados são representativos de duas experiências independentes, em quintuplicado. Os resultados são referentes à média  $\pm$  sd).

Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos através dos vários métodos são semelhantes entre si, como se pode ver na tabela 1, tendo o  $K_M$  um valor médio de  $0,9613 \pm 0,0722$  mM e o  $V_{m\acute{a}x}$  de  $2,513 \times 10^{-5} \pm 0,045 \times 10^{-5}$  mmol/min.mg de proteína.

**Tabela 1** – Valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  obtidos através do método de Michaelis – Menten e das suas linearizações.

	$K_M$ (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
<b>Michaelis – Menten</b>	0,9644	2,517x10 <sup>-5</sup>
<b>Lineweaver – Burk</b>	0,9193	2,490 x10 <sup>-5</sup>
<b>Hanes – Wolf</b>	1,066	2,574 x10 <sup>-5</sup>
<b>Eadie – Hofstee</b>	0,8953	2,470 x10 <sup>-5</sup>

Em cada ensaio foram efetuados controlos que permitem estabelecer os valores máximos e mínimos de atividade, indispensáveis à obtenção das curvas de inibição. A figura 20 mostra as curvas cinéticas para a atividade sem substrato, bem como a atividade dos controlos positivos, recorrendo a inibidores comerciais em concentrações que permitem obter inibição máxima (Acarbose 0,77 mM e DNJ 50µM) utilizando uma concentração saturante de substrato (12 mM). Note-se que a atividade detetada foi praticamente nula para qualquer das condições descritas, ao longo do período estudado. Em todos os ensaios efetuados, determinou-se também a atividade utilizando uma concentração saturante de substrato (12 mM) na ausência de inibidor, que permitiu obter a atividade máxima em cada ensaio.



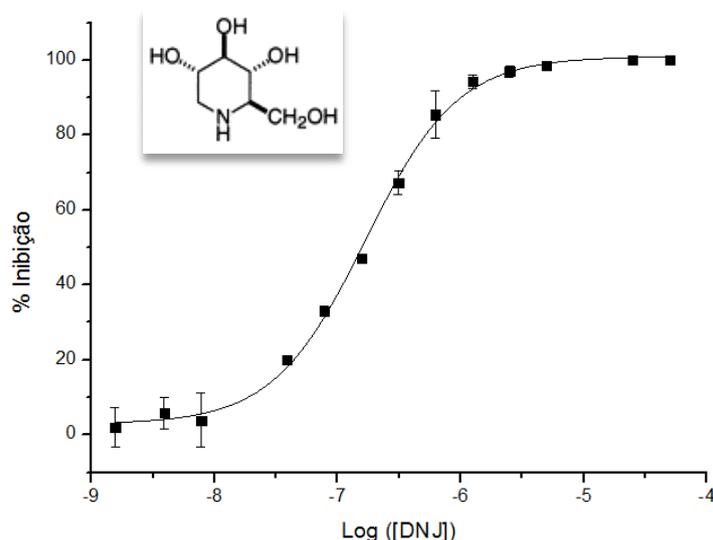
**Figura 20** - Curvas de cinética dos controlos utilizados nos ensaios de inibição, utilizando Acarbose (0,77 mM) e DNJ (50 µM) como controlos positivos (Inibidores comerciais), assim como duas réplicas exemplo da Atividade  $\alpha$ -glucosidase máxima.

Uma vez que o DNJ é estruturalmente mais parecido aos compostos estudados do que a Acarbose, este foi o inibidor comercial utilizado como controlo positivo nos ensaios realizados subsequentemente.

## 4.2 Estudos da Ação dos Iminociclitóis sobre a Atividade $\alpha$ -glucosidase

Para o estudo de ação inibitória foram testados 4 compostos, sintetizados nos laboratórios de Química Orgânica da Universidade de Évora. Estes compostos foram escolhidos por serem estruturalmente semelhantes a outros que apresentaram ação inibitória sobre a atividade  $\alpha$ -glucosidase de enterócitos de rato.

Na figura 21 está representada a % de inibição da  $\alpha$ -glucosidase na presença do inibidor comercial, DNJ, nas concentrações entre 0,0015 e 50 $\mu$ M. É possível observar a inibição da enzima para valores superiores a 0,0039  $\mu$ M, registando-se um valor de IC<sub>50</sub> de  $0,167 \pm 0,016 \mu$ M, semelhante ao valor publicado, 0,16  $\mu$ M, para atividade isomaltase intestinal de Rato (Kuriyama, *et. al.*, 2008).



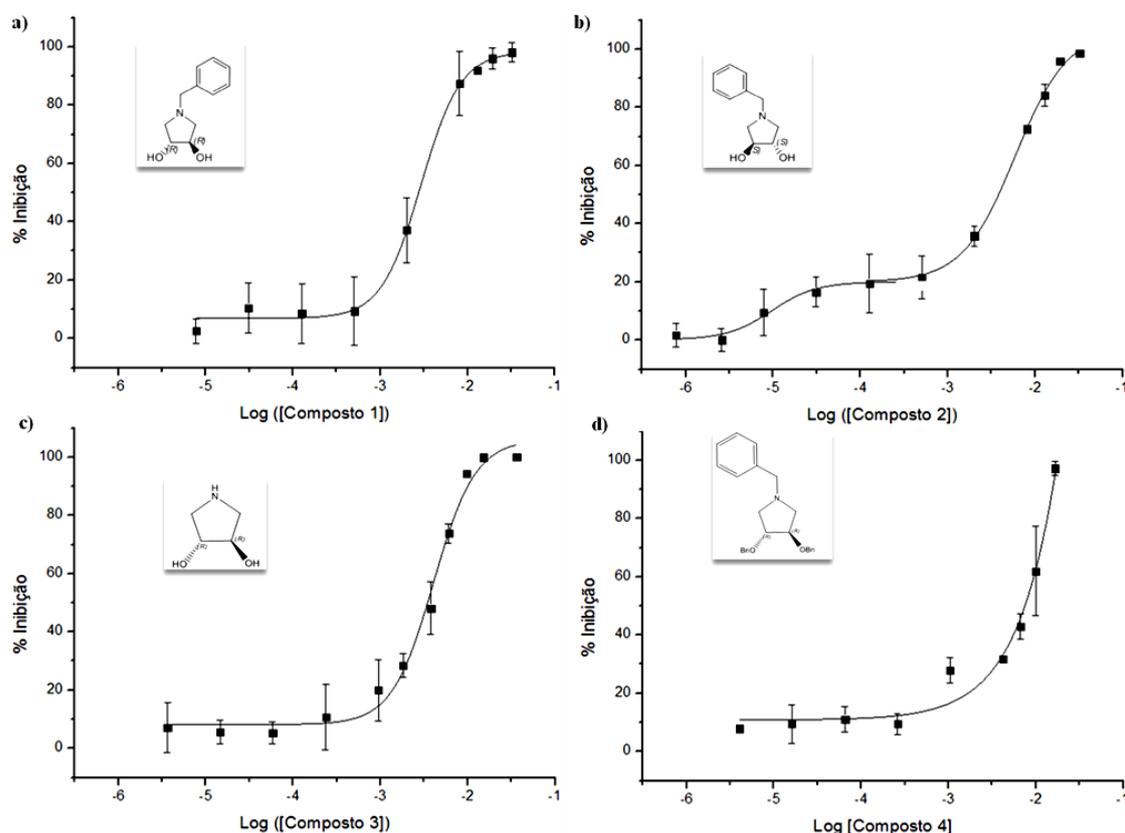
**Figura 21** - Curva de inibição do Inibidor comercial (DNJ) em Molar. (Os resultados são representativos de duas experiências independentes, em quintuplicado. Os resultados são referentes à média  $\pm$  sd).

Na figura 22 estão representadas as curvas de inibição dos 4 compostos em estudo. A curva de inibição da atividade  $\alpha$ -glucosidase na presença do composto 1, (3R,4R)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol, está representada na figura, 22 mostra a inibição da atividade enzimática para valores superiores a 0,01 mM. O valor de IC<sub>50</sub> determinado

para este composto foi  $2,97 \pm 0,046$  mM. É de notar que, dos compostos testados, este foi o IC<sub>50</sub> mais baixo.

No caso do composto 2, (3*S*,4*S*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol, foram utilizadas as concentrações entre 0,001 e 32,343 mM, tendo-se observado a inibição da atividade enzimática para valores superiores a 0,003 mM. Para este composto observaram-se existirem duas zonas de inibição, uma de menor afinidade, entre 0,127 e 32,343 mM, e outra de maior afinidade, entre 0,001 e 0,127 mM, o que sugere dois locais de ligação do composto à enzima. O valor de IC<sub>50</sub> obtido para este composto é  $5,82 \pm 0,039$  mM, para a zona de maior afinidade, e  $0,010 \pm 0,15$  mM, para a zona de menor afinidade, nas condições experimentais utilizadas.

O composto 3, (3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4,diol, foi utilizado no intervalo 0,0036 e 36,365 mM (figura 22 c)). Observou-se a inibição da  $\alpha$ -glucosidase para valores superiores a 1mM sendo o valor de IC<sub>50</sub> para este composto de  $4,07 \pm 0,042$  mM.



**Figura 22** - Curvas de Inibição dos compostos em estudo, em Molar: a) Composto 1((3*R*,4*R*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol) ( $p = 1,91$ ); b) Composto 2 ((3*S*,4*S*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol) ( $p = 1,44$  para parte superior da sigmoide e  $p = 1,70$ , para parte inferior da sigmoide.); c) Composto 3 ((3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4,diol) ( $p = 1,81$ ); d) Composto 4((3*R*,4*R*)-1-benzil-3,4-di-(benzíloxi)pirrolidina) ( $p = 0,96$ ). (Os resultados são representativos de três experiências independentes, em quintuplicado. Os resultados são referentes à média  $\pm$  sd.)

Para o composto 4, (3*R*,4*R*)-1-benzil-3,4-di-(benziloxi)pirrolidina, representado na figura 22 d), utilizando-se concentrações no intervalo 0,004 e 16,734 mM. Não foi possível estabelecer o patamar de inibição máxima, devido a uma grande dificuldade em solubilizar o composto, ocorrendo a formação de uma suspensão, o que não permitiu avaliar o efeito das concentrações superiores a 16,734 mM. O valor de IC<sub>50</sub> obtido para este composto, recorrendo a um ajuste da curva logística foi de 7,94 mM, nas condições experimentais utilizadas. Este valor poderá, contudo, estar afetado por um desvio devido ao problema acima mencionado.

Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os compostos em estudo variaram entre 2,97 e 7,94 mM. O composto (3*R*,4*R*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol é aquele que apresentou menor valor de IC<sub>50</sub>, sendo o que à partida pode ser um inibidor mais eficaz. Com o valor de IC<sub>50</sub> mais elevado, 7,94 mM, o composto (3*R*,4*R*)-1-benzil-3,4-di(benziloxi)pirrolidina mostra não ser um bom inibidor para a isoenzima em estudo, para além da fraca solubilidade em soluções aquosas.

### 4.3 Determinação do Tipo de Inibição e Constante de Inibição, K<sub>I</sub>

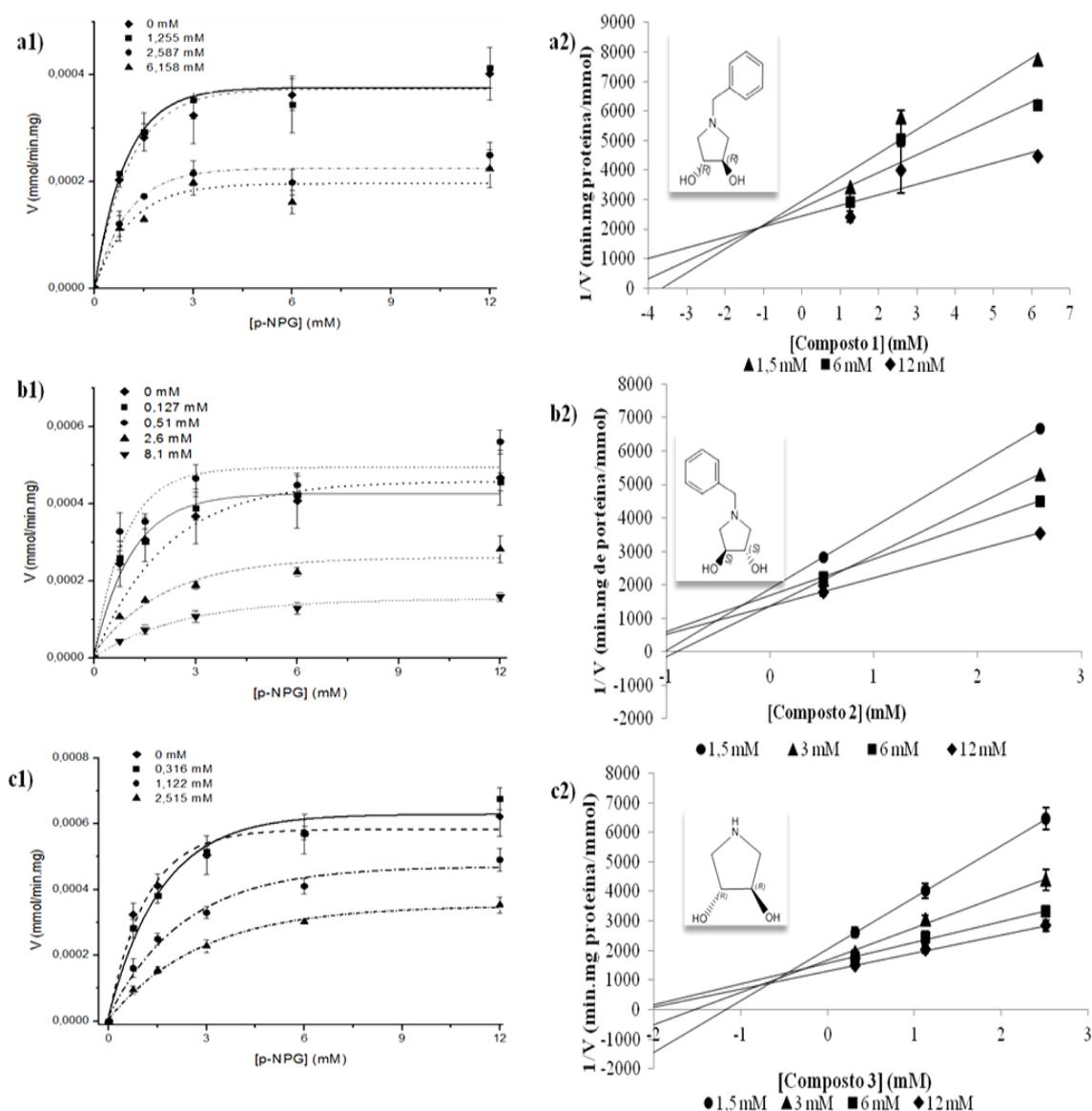
Um dos aspetos relevantes no estudo de inibição enzimática e, em particular, no que respeita a compostos cujo potencial farmacológico é relevante, é a determinação do tipo de inibição, dado que este aponta para o mecanismo inibitório, fornecendo pistas sobre a sua seletividade e utilidade.

Para os ensaios de determinação do tipo de inibição, apenas foram testados os compostos, que demonstraram melhor potencial inibitório, ou seja, que apresentam valores de IC<sub>50</sub> menores: **Composto 1** ((3*R*,4*R*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol), **Composto 2** ((3*S*,4*S*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol), e **Composto 3** ((3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4,diol).

Para a determinação do tipo de inibição foram preparadas as curvas de atividade enzimática utilizando concentrações de substrato no intervalo 0,75 e 12 mM, na presença de 3 concentrações diferentes de inibidor correspondentes a 20, 40 e 60% de inibição.

A figura 24 mostra os resultados obtidos para os compostos 1, 2 e 3, no lado esquerdo as curvas de Michaelis-Menten e no lado direito os gráficos de Dixon, que permitem determinar o tipo de Inibição e o  $K_I$  para cada um dos compostos estudados. Todos os compostos apresentaram inibição mista.

Para o composto (3*R*,4*R*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol, foram utilizadas as concentrações 1,255; 2,587 e 6,158 mM, como está representado na figura 23 a1), onde é possível observar que este composto apresenta inibição mista para esta enzima. No que diz respeito ao gráfico de Dixon, representado na figura 23 a2), foi possível determinar a constante de inibição,  $K_I$ , que para este composto foi de 1,18 mM.



**Figura 23** – a1) b1) c1) Curvas de Michaelis-Menten na presença e na ausência de três compostos em estudo. a2) b2) c2) Gráfico de Dixon para três dos compostos em estudo. ( $R^2 = [0,7139 ; 1]$ ). Os resultados são representativos de duas experiências independentes, em quintuplicado. Os resultados são referentes à média  $\pm$  sd).

Para o composto 2, (3*S*,4*S*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol, representada na figura 23 b1) utilizaram-se as concentrações 0,127; 0,51; 2,6 e 8,1 mM. Uma vez que este inibidor possui duas zonas de ligação, utilizaram-se duas concentrações correspondentes à inibição 20% (0,127; 0,51 mM). Como é possível observar, este composto apresenta inibição mista para esta enzima. Relativamente ao gráfico de Dixon, representado figura 23 b2), a constante de inibição,  $K_I$ , para este composto foi de  $0,27 \pm 0,25$  mM.

Para a determinação do tipo de inibição do composto 3 (3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4-diol, foram utilizadas as concentrações de inibidor 0,316; 1,122 e 2,515 mM, como indicado na figura 23 c1), onde é possível observar inibição mista. Na figura 23 c2) está representado gráfico de Dixon, para este composto, a obteve-se uma constante de inibição,  $K_I$ , de 0,44 mM.

A tabela 2 resume os resultados, no que diz respeito ao valor dos  $IC_{50}$  apresentados pelos três compostos, assim como os valores do  $K_I$ , dos compostos mais promissores. Como mencionado anteriormente, todos os compostos testados relativamente ao mecanismo de inibição revelaram uma inibição mista. Tendo em conta o tipo de gráfico de Dixon, e a figura 14, pode-se afirmar que esta inibição é mista predominantemente competitiva, uma vez que a interseção das retas ocorre acima do eixo *ox*. Quando comparados os valores de  $IC_{50}$  e de  $K_I$ , que observou-se serem diferentes (tabela 2), confirma a presença de inibição competitiva no mecanismo de ação destes compostos.

**Tabela 2** – Valores de  $IC_{50}$  e respetivos  $K_I$  dos compostos estudados.

Composto	$IC_{50}$ (mM)	$K_I$ (mM)
<b>(3<i>R</i>,4<i>R</i>)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol</b>	$2,97 \pm 0,046$	1,18
<b>(3<i>S</i>,4<i>S</i>)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol</b>	$5,82 \pm 0,034$ 0,01	$0,27 \pm 0,25$
<b>(3<i>R</i>,4<i>R</i>)-pirrolidina-3,4-diol</b>	$4,07 \pm 0,042$	$0,44 \pm 0,16$
<b>(3<i>R</i>,4<i>R</i>)-1-benzil-3,4-di-(benziloxi)pirrolidina</b>	7,94	ND
<b>1-desoxinojirimicina (DNJ)</b>	$1,67 \times 10^{-4} \pm 0,163 \times 10^{-4}$	ND

Nota: ND – Não determinado.

Todos os compostos iminociclitóis testados exercem inibição da atividade  $\alpha$ -glucosidase. Os  $IC_{50}$  obtidos foram 2,97; 5,82; 4,07 e 7,94mM, para os compostos 1, 2, 3 e 4, respetivamente. Quando comparados os  $IC_{50}$  dos dois enantiómeros do composto (3,4)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol, é possível concluir que o enantiómero (*R,R*) é mais eficaz. Isto sugere que os compostos com conformação (*R,R*) são mais estereoespecíficos para estas enzimas e que encaixam melhor no *pocket* da enzima. Por outro lado, quando efetuadas algumas alterações na estrutura deste composto, nomeadamente, ao desbenzilar-se, obteve-se um composto mais polar, com maior probabilidade de estabelecer um maior número de pontes de hidrogénio com o centro ativo da enzima. O composto obtido apresentou, no entanto, um pequeno agravamento do valor de  $IC_{50}$ . Ao benzilar o composto, tornando-o mais apolar, o  $IC_{50}$  sofreu um maior agravamento acrescentando ainda maior dificuldade de solubilização. Estes resultados parecem indicar que, para haver melhor inibição, é necessário haver um equilíbrio entre as cargas polares e apolares. É importante mencionar que os compostos 1, 2 e 3, que já tinham sido testados em  $\alpha$ -glucosidase de levedura (Guerreiro, *et. al.*, 2013) apresentaram, neste estudo, valores de  $IC_{50}$  bastante inferiores, o que demonstra que diferentes isoformas da  $\alpha$ -glucosidase apresentam seletividade diferente aos inibidores.

Para que um inibidor seja considerado eficaz, a concentração para a qual se observa um efeito inibitório significativo dever ser tão baixa quanto possível, idealmente da ordem dos nanomolar (nM), na maioria das vezes na gama de micromolar ( $\mu$ M) (Frankowski, *et. al.* 1998). No caso dos compostos em estudo, os valores de  $IC_{50}$  foram de ordem dos mM, duas ordens de grandeza superiores ao do DNJ (167 nM), controlo positivo utilizado neste estudo. Presume-se que estas diferenças sejam devidas às diferenças nas estruturas químicas das pirrolidinas em estudo, comparadas com o DNJ.

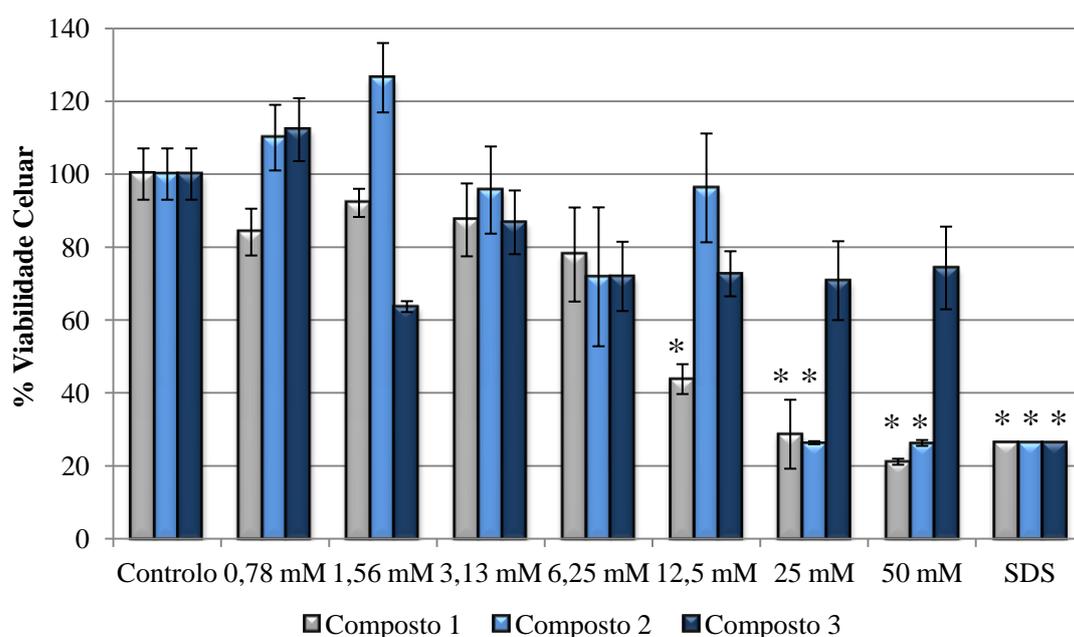
Assim, estes inibidores parecem não ser vantajosos para esta aplicação em particular, não invalidando, contudo, a sua utilização noutras aplicações, um vez que as diferentes isoenzimas apresentam seletividades distintas, no que respeita aos inibidores (Hakamata, *et. al.*, 2009, Sim, *et. al.*, 2007).

#### 4.4 Estudo de Toxicidade dos Iminoclitóis

A avaliação toxicológica e de substâncias para utilização industrial, farmacológicas ou outras, é uma etapa imprescindível no processo de desenvolvimento de novos princípios ativos, uma vez que permite inferir sobre a biossegurança destes.

Assim, neste trabalho procurou-se fazer uma avaliação de toxicidade dos compostos 1, 2 e 3. Foram obtidos alguns resultados preliminares, apresentados na figura 24.

Os resultados mostram que a viabilidade celular foi afetada pelo composto 1 para concentrações superiores a 12,5 mM e pelo composto 2 para concentrações superiores a 25 mM, enquanto que o composto 3 não teve qualquer efeito sobre a viabilidade celular no intervalo de concentrações estudo.



**Figura 24** – Viabilidade Celular (%) das células BRIN BD-11, na presença do Composto 1 (■), Composto 2 (■) e Composto 3 (■). (Os resultados são representativos de uma experiência, em quadruplicado. Os resultados são referentes à média  $\pm$  epm. Os \* indicam os valores diferentes do controlo ( $p < 0,05$ )).

Os resultados indicam que os compostos em estudo, em particular o composto 3 apresentam baixa toxicidade. É ainda de realçar que os compostos benzilados são menos seguros quando comparados com a pirrolidina desbenzilada.

## 5 Conclusões

Neste trabalho tinha-se como objetivo estudar um conjunto de compostos iminociclitóis de modo a avaliar e determinar a sua ação inibitória sobre uma enzima importante da digestão dos glúcidos, a  $\alpha$ -glucosidase dos enterócitos, bem como determinar o tipo de inibição em causa.

Observou-se que todos os compostos utilizados inibem as  $\alpha$ -glucosidases, com eficiências diferentes entre si. Para todos os caso revelou-se um tipo de inibição misto. O composto 1 apresentou menor  $IC_{50}$ , contudo foi o composto 2 que registou o menor  $K_I$ . Note-se, no entanto, que os valores são da mesma ordem de grandeza e significativamente mais elevados que o DNJ (tabela 2). Por outro lado, quando avaliados do ponto de vista da sua biossegurança, o composto 3 foi o melhor tolerado pelas células, não exercendo efeitos tóxicos no intervalo de concentrações estudo.

No seu conjunto, estes resultados permitem concluir que o composto 3, (3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4-diol, é aquele que apresenta parâmetros mais interessantes do ponto de vista farmacológico uma vez que tendo um efeito inibitório equivalente aos restantes, poderá ser utilizado em concentrações mais elevadas sem apresentar efeitos biológicos deletérios.

Em suma, apesar dos compostos testados não apresentarem valores de  $IC_{50}$  ou  $K_I$  na ordem de grandeza aconselhada na literatura, são relativamente bem tolerados pelas células, o que sugere que embora não seja os mais promissores como fármacos para a diabetes, não se pode excluir a possibilidade de serem utilizados em outras aplicações.

## 6 Referências Bibliográficas

- Ali, N., *Diabetes and You: A Comprehensive, Holistic Approach*, Edição Nova York: Rowman & Littlefield Publishers, Inc., 2011. ISBN:978-1-4422-0728-8
- Best, D., Wang, C., Weymouth-Wilson, A. C., Clarkson, R. A., Wilson, F. X., Nash, R. J., Kato, A., Fleet, G. W. J., *Looking glass inhibitors: scalable syntheses of DNJ, DMDP, and L-DMDP, and (3S)-3-hydroxy-D-bulgecini from L-glucuronolactone. DMDP inhibits  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase whereas L-DMDP is a potent and specific inhibitor of  $\alpha$ -glucosidase*, Tetrahedron: Asymmetry, 2010; 21: 311-319.
- Booth, C., O'Shea, J.A., *Isolation and Culture of Intestinal Epithelial Cells*, Culture of Epithelial Cells, 2ª Edição, Manchester: Wiley-Liss, Inc., 2002.
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R.; Burns, D. E., *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4ª Edição, St. Louis: Elsevier Saunders, 2006. ISBN: 978-0-7216-0189-2.
- Canelas, A.F., *Estudo da atividade  $\alpha$ -glucosidase em células BRIN-BD11- Aplicação como modelo celular para a avaliação de novos compostos inibidores*, Évora [s.n.], 2011, Relatório de Estágio.
- Chang, *Enzyme Kinetics - University Science Books*, Sausalito: Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences, University Science Books, 2000.
- Cheng, Y., Prusoff, W., *Relationship Between The Inhibition Constant ( $K_I$ ) And The Concentration Of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition ( $I_{50}$ ) Of An Enzymatic Reaction*, Biochemical Pharmacology, 1973; 22: 3099-3108.
- Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4ª edição, Hoboken: Wiley-Blackwell, 2012. ISBN: 978-3-527-33074-4.
- Cortés, A., Cascante, M., Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., *Relationships between inhibition constants, inhibitor concentration for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data*, Biochemistry Journal, 2001; 357: 263-268.
- Devlin. T. M., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 4ª edição, Nova York: Wiley- Liss, Inc., 2006. ISBN: 978-0-470-28173-4.
- De Melo, E. B., Gomes, A. S., Carvalho, I.,  *$\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity*, Tetrahedron report number, 2006; 773 (62): 10277-10302.
- ECACC, *Fundamental Techniques in Cell Culture – Laboratory Handbook*, 2ª Edição, St. Louis: Sigma, Live Science, 2011.
- Frankowski, A., Streith, J., *Les aminodésoxysucres inhibiteurs de glycosidases*, C. R. Acad. Sci. Paris, 1988; 1(II c) : 681-700.

- Guanwan-Puteri, M.D.P.T, Kawabata, J., *Novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Macarangananaris leaves*, Food Chemistry, 2010; 123: 384-389.
- Guerreiro, L. R., Carreiro, E. P., Fernandes, L., Cardote, T. A. F., Caldeira, A. T., Guedes, R. C., Burke, A. J., *Five-membered iminocyclitol  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: Synthetic, biological screening and in silico studies*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013; 21: 1911 – 1917.
- Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T., Oku, T., *Design and Screening Strategies for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Based on Enzymological Information*, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2009; 9: 3-12.
- Holt, R.I.G., Cockram, C. Flyvbjerg, A. Goldstein, B. J., *Textbook of Diabetes*, 4ª edição, West Sussex: Wiley-Blackwell - John Wiley & Sons, Ltd., 2010. ISBN: 978-1-4051-9181-4.
- Horne, G., Wilson, F. X., Tinsley, J., Williams, D. H., Storer, R., *Iminosugars past, present and future: medicines for tomorrow*, Drug Discovery Today, 2011; 16 (3,4): 107 – 118.
- Howe, J. D. Smith, N., Lee, M. J., Arde-Guisot, N., Vauzeilles, B., Désiré, J., Baron, A., Blériot, Y., Sollogoud, M., Alonzi, D.S., Butters, T.D., *Novel imino sugar  $\alpha$ -glucosidase inhibitors as antiviral compounds*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013; 21 (16): 4831-4838;
- Kuriyama, C., Kamiyama, O., Ikeda, K., Sanae, F., Kato, A., Adachi, I., Imahori, T., Takahata, H., Okamoto, T., Asano, N., *In vitro inhibitors of glycogen-degrading enzymes and glycosidases by six-membered sugars mimics and their evaluation in cell cultures*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008; 16: 7330-73336.
- Li, Y., Ji, D., Zhong, S., Lin, T., Lv, Z., Hu, G., Wang X., *1-Deoxynojirimycin Inhibits Glucose Absorption And Accelerates Glucose Metabolism In Streptozotocin-Induced Diabetic Mice*, Scientific Reports, 2013; 3: 1377, 1-12.
- Louro, P., *Estudo Da Inibição De Pirrolidinas (Alcalóides) Na Actividade  $\alpha$ -Glucosidase Em Homogeneizados De Enterócitos De Rato*, Évora: [s.n.], 2011, Relatório de Estágio.
- McClenaghan, N. H., Barnett, C. R., Ah-Sing, E., Abdel-Wahab, Y. H. A., O'Harte, F. P. M., Yoon, T., Swanston-Flatt, S. K., Flatt, P. R., *Characterization of a Novel Glucose-Responsive Insulin-Secreting Cell Line, BRIN-BD11, Produced by Electrofusion*, Diabetes, 1996; 45: 1132- 1140.
- McClenaghan, N. H., Gray, A M., Barnett, C. R., Flatt, P. R., *Hexose Recognition by Insulin-Secreting BRIN-BD11 Cells*, Biochemical And Biophysical Research Communications, 1996; 223: 724–728.
- McClenaghan, N. H., Elsner, M., Tiedge, M., Lenzen, S., *Molecular Characterization of the Glucose-Sensing Mechanism in the Clonal Insulin-Secreting BRIN-BD11 Cell Line*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988; 242: 262–266.

- Mel, M., Karim, M. I. A., Yusuf, S. A. M., Hashim, Y. Z. H., Nor, Y. A., *Comparing BRIN-BD11 Culture Producing Insulin using different type of microcarriers*, Cytotechnology, 2010; 62: 423–430.
- Mehta, A., Zitzmann, N., Rudde, P.M., Block, T.M., *K-Glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents*, FEBS Letters, 1998; 430: 17-22.
- Metzler, D.E., *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*, 2ª edição, Amsterdão: Academic Press., 2003.
- Moorthy, N. S. H. N., Brás, N. F., Ramos, M. J., Fernandes, P. A., *Virtual screening and QSAR study of some pyrrolidine derivatives as  $\alpha$ -mannosidase inhibitors for binding feature analysis*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012; 20: 6945–6959.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., *Lemhinger – Principles of Biochemistry*, 5ª edição, Nova York: W. H. Freeman and Company, 2008. ISBN: 978-0-7167-7108-1.
- Newsholme, E., Leech, T., *Functional Biochemistry in Health and Disease*, 1ª edição, West Susses: Wiley-Blackwell – John Wiley & Sons, Ltd, 2010. ISBN: 978-0-471-98820-5.
- Observatório Nacional de Diabetes, *Diabetes: Factos e Números 2012*, Sociedade Portuguesa de Diabetologia.
- O'Harte, F. P.M., Abdel-Wahab, Y. H.A., Conlon, J. M., *Amino terminal glycation of gastric inhibitory polypeptide enhances its insulinotropic action on clonal pancreatic B-cells*, Biochimica et Biophysica Acta, 1998; 1425: 319-327.
- Onose, S., Ikeda, R., Nakagawa, K., Kimura, T., Yamagishi K., Higuchi, O., Miyazawa, T., *Production of the  $\alpha$ -glycosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin from Bacillus species*, Food Chemistry, 2012; 138: 516–523.
- Perry, S. T., Buck, M.D., Plummer, E. M., Penmasta, R. A., Batra, H., Stavale, E. J., Warfield, K. L., Dwek, R. A., Butters, T. D., Alonzi, D. S., Lada, S. M., King, K., Klose, B., Ramstedt, U., Shresta, S., *An iminosugar with potent inhibition of dengue virus infection in vivo*, Antiviral Research, 2013; 98: 35-43.
- Prontuário Terapêutico-10 (2011), INFARMED- Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, Ministério da Saúde, Portugal. ISBN: 978-989-8369-07-9.
- Quintas, A., Freire, A. P., Halpern, M. J., *Bioquímica – Organização Molecular da Vida*, 1ª Edição, Lisboa: Lidel – Edições Técnicas, Lda, 2008. ISBN 978-972-757-431-5.
- Saotome, C., Wong, C., Kanie, O., *Combination library of five-membered iminocyclitol and the inhibitors activities against glycol-enzymes*, Chemistry & Biology, 2001; 8: 1061 – 1070.
- Sim, L., Quezada-Calvillo, R., Sterchi, E.E., Nichols, B.L., Rose, D.R., *Human Intestinal Maltase–Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic*

*Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity*, Journal Molecular Biology, 2008; 375: 782–792.

- Sjögren, E., Nyberg, J., Magnusson, M. O., Lennernäs, H., Hooker, A., Bredberg, U., *Optimal Experimental Design for Assessment of Enzyme Kinetics in a Drug Discovery Screening Environment*, Drug Metabolism And Disposition, 2011; 39 (5): 858 – 863.
- Smith, C., Marks, A.D., Lieberman, M., *Marks' Basic Medical Biochemistry – A clinical Approach*, 2ª edição, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. ISBN 978-0-474-98820-5.
- Sudarshana, S., Noor, S., Puneekar, N., *On the importance of controls in enzyme assays – an odd example*, Biochemistry and Molecular Biology Education, 2011; 29: 76-78.
- Takesue, Y., Takesue, S., *Purification and characterization of  $\alpha$ -glucosidase complex from the intestine of the frog, *Rana japonica**, Biochimica and Biophysica Acta, 1996; 1296: 152-158.
- Tortora, G.J., Derickson, B., *Principles of Anatomy and Physiology*, 12ª edição, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2009. ISBN: 978-0-470-08471-7.
- Voet, D., Voet, J. G., Pratt. C. W., *Fundamentals of Biochemistry*, 2ª edição Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2005. ISBN: 978-0470-57095-1.
- Vogel, H. G., Vogel, W. H., Shölkens, B. A., Sandow, J., Müller, G., Vogel, W. F., *Drug Discovery and Evaluation, Pharmacological Assays*, , 2ª edição, Nova York: Springer, 2002. ISBN: 3-540-42396-6.
- Wang, H. Du, Y. J., Song, H.C., ,  *$\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amilase inhibitors activities of guava leaves*, Food Chemistry, 2010; 123: 6-13;
- Watford, M., Lund, P., H., *Isolation and Metabolic Characteristics of Rat and Chicken Enterocytes*, Biochemistry J., 1979; 178: 589-596;
- Winchester, B. G., *Iminosugars: from botanical curiosities to licensed drugs*, Tetrahedron: Asymmetry Report Number, 2009; 109 (20) 645-651;

### **Sites Consultados:**

- [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) (acedido a 09/04/2013)
- <http://www.sigmaaldrich.com/portugal.html> (acedido a 08/04/2013)
- [www.ecfs.org](http://www.ecfs.org) (acedido a 20/04/2013)
- <http://www.dojindo.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx> (acedido a 06/05/2013)
- <http://www.who.int/diabetes/en/> (acedido a 01/07/2013)

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminociclítóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

**Anexos**

## Reagentes

- Água Bidestilada;
- Água MilliQ;
- BSA (0,25% (p/m));
- BSA (0; 50; 75; 100; 150; 200;300 µg/mL);
- Carbonato de Sódio (26 mM);
- Cloreto de Cálcio (0,5 mM);
- Cloreto de Potássio (2 mM);
- Cloreto de Sódio (120 mM);
- Dihidrogenofosfato de Potássio;
- DMSO;
- EDTA (5 mM);
- Glucose (11 mM);
- Extrato rico em  $\alpha$  – glucosidase;
- Meio de Cultura RPMI 1640
- Meio Krebs-Henseilt Modificado;
- p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo (48; 24; 12; 6 e 3 mM);
- Penicilina-estreptomicina;
- Reagente de Coomassie;
- Soro Fetal Bovino;
- Sulfato de Magnésio (10 mM);
- Tampão Fosfato Salino (100 mM pH 7,0);

## Material/Equipamento

- Agitador Magnético – IKA Color SQUID 100.240V 50160 Hz 4 W
- Balança analítica – METTLER AE200;
- Balões volumétricos (diversos volumes);
- Banho termostatizado com agitação;
- Câmara de *Neubauer*;
- Centrifuga Refrigerada - HERMLE Z 323 K;
- *Clamps*;
- Copos de vidro (diversos volumes);
- Cronómetro;
- Criotubos;
- Erlenmeyer's (diversos volumes);
- Esguicho;
- Espátulas;
- Espectrofotómetro;
- Etiquetas;
- *Falcons* (15 e 50 mL);
- Filtros 0,2 µm;
- Filtros estéreis para seringas (0,2 µm);
- Fio de sutura;
- Frasco de Cultura 75 cm<sup>2</sup> poliestireno estéreis;
- Gelo;
- Homogeneizador tipo Potter – FALC Instruments S.R.L Treviglio (BG) Italy;

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminociclítóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

- Luvas descartáveis;
- Máscara descartáveis;
- Magnetes;
- Microscópio invertido;
- Micropipetas P20, P200, P1000;
- Microplaca 96 poços
- Microtubos (0,5; 1,5 mL)
- Papel Absorvente
- Parafilm;
- Pinças;
- Pipetas descartáveis (2, 5 e 10 mL);
- Pipetas graduadas (diversos volumes);
- Pipetas de Pasteur;
- Pompets;
- Pontas de micropipetas;
- Potenciômetro – Inoab pH Level 1;
- Seringas descartáveis (20 e 50 mL);
- Tabuleiro;
- Tesouras;
- Unidades de Filtração (250 e 500 mL);
- Varetas de vidro;
- Vortex – ZX3;

## Soluções Utilizadas:

- Preparação do substrato:
  - Para obter o substrato concentrado tomou-se 0,0121 g de substrato e dissolveu-se em 100  $\mu$ L de DMSO. Para obter o substrato 12 mM, tomou-se 30  $\mu$ L de substrato concentrado e diluiu-se em 970  $\mu$ L de tampão fosfato salino 100 mM pH 7,0.
- Preparação do Reagente de Comassie Diluído:
  - Tomou-se 1 mL do reagente de Comassie e diluiu-se em 4 mL de água bidestilada.
- Preparação das soluções de compostos:
  - Tomou-se 0,01 g do composto e dissolveu-se em 100  $\mu$ L de DMSO (solução-mãe). A partir desta solução foram efetuadas as seguintes diluições: 25; 15; 10; 6,25; 1,56; 0,75; 0,39; 0,098; 0,024; 0,006; 0,0015 mg/mL.

**Nota:** Para o composto (3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4-diol não foram utilizadas as concentrações 25 e 10 mg/mL e foram substituídas pelas 4 e 2,5 mg/mL.

- Preparação da solução de Inibidor comercial (DNJ):
  - Tomou-se 5 mg do composto e diluiu-se em 2,5 mL de DMSO, ficando com uma concentração de 100 mM. A partir desta solução prepararam-se as seguintes diluições: 100; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,0312; 0,0156; 0,00624  $\mu$ M.
- Preparação do Meio RPMI 1640:
  - Pesaram-se 5,2 g de meio RPMI-1640 e 1,05 g de bicarbonato de sódio e dissolveu-se em 500 mL de água milliQ e acertou-se o pH a 7,4. Na câmara de cultura, o meio foi filtrado na unidade de filtração, com filtro de 0,2  $\mu$ m e é-lhe adicionado 5 mL dos anticorpos penicilina-estreptomicina e 50 mL de soro fetal bovino. No caso do meio incompleto, não é adicionado soro.

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminociclítóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

▪ Composição do Meio RPMI 1640:

<b>Sais Inorgânicos</b>	<b>(mg/L)</b>
Nitrato de cálcio 4H <sub>2</sub> O	100
Sulfato de Magnésio (anidro)	48,84
Cloreto de Potássio	400
Cloreto de sódio	6000
Fosfato de sódio dibásico anidro	800
<b>Aminoácidos</b>	<b>(mg/mL)</b>
L-Asparagina	50
L-Arginina (base livre)	200
Ácido L-Aspártico	20
Dihidroclorato de L-Cistina	62,15
L-Glutamina	300
Ácido L-Glutâmico	20
Glicina	10
L-Histidina (base livre)	15
L-Hidroxiprolina	20
L-Isoleucina (alo livre)	50
L-Leucina (livre de metionina)	50
Hidroclorato de L-Lisina	40
L-Metionina	15
L-Fenilalanina	15
L-Prolina	20
L-Serina	30
L-Treonina (alo livre)	20
L-Triptofano	5
L-Tirosina	20
L-Valina	20
<b>Vitaminas</b>	<b>(mg/mL)</b>
D-Biotina	0,20
D-Ca-Pantotenato	0,25
Cloreto de colina	3
Ácido Fólico	1
i-Inositol	35
Niacinamida	1
Ácido P-Aminobenzóico	1
Hidroclorato de Piridoxina	1
Riboflavina	0,20
Hidroclorato de Tiamina	1
Vitamina B 12	0,005
<b>Outros</b>	<b>(mg/mL)</b>
D-Glucose	2000
Glutationo reduzido	1
Tampão HEPES	5958
Vermelho Fenol	5

• Preparação da solução de Versênio:

- Tomou-se 100mL PBS 100 mM pH 7,4 e adicionou-se 0,55mL EDTA 100mM.

## Tratamento Estatístico

### Atividade Enzimática

- Declives das curvas de cinética com diferentes concentrações de substrato:

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 2	Subst12 - Subst3	,0002200	,0000447	,0000200	,0001645	,0002755	11,000	4	,000
Pair 3	Subst12 - Subst15	,0003200	,0000447	,0000200	,0002645	,0003755	16,000	4	,000
Pair 4	Subst12 - Subst075	,0005200	,0000447	,0000200	,0004645	,0005755	26,000	4	,000
Pair 5	Subst12 - Subst0	,001011600	,000008173	,000003655	,001001452	,001021748	276,761	4	,000

- Absorvância da Atividade Máxima

Anova: fator único

### SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	61	10,217	0,167492	0,001275
Coluna 2	61	9,558	0,156689	0,001185

### ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,00356	1	0,00356	2,894003	0,0915	3,920124
Dentro de grupos	0,147602	120	0,00123			
Total	0,151162	121				

- Composto 1 (3R,4R)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol):

Model		DoseResp	
Equation		$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{(L \cdot \text{LOGx0} - x)^p})$	
Reduced Chi-Sqr	7,36532		
Adj. R-Square	0,99606		
		Value	Standard Error
% Inibição	A1	6,89732	1,46674
% Inibição	A2	98,32466	2,5662
% Inibição	LOGx0	-2,53398	0,0376
% Inibição	p	1,91179	0,27015
% Inibição	span	91,42734	
% Inibição	EC20	0,00142	
% Inibição	EC50	0,00292	
% Inibição	EC80	0,00604	

### ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
% Inibição	Regression	4	36562,4997	9140,62492	1241,03586	1,3413E-7
	Residual	5	36,82659	7,36532		
	Uncorrected Total	9	36599,32629			
	Corrected Total	8	14943,74423			

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminoclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

• Composto 2 (3*S*,4*S*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol):

Model	DoseResp		
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LO\ Gx0-x)*p)})$		
Reduced Chi-Sqr	2,89698	3,63425	
Adj. R-Square	0,99758	0,95672	
		Value	Standard Error
% Inibição	A1	20	0
% Inibição	A2	106,48038	3,17584
% Inibição	LOGx0	-2,22794	0,03495
% Inibição	p	1,44327	0,11677
% Inibição	span	86,48038	
% Inibição	EC20	0,00226	
% Inibição	EC50	0,00592	
% Inibição	EC80	0,01546	
% Inibição	A1	0,16305	2,01254
% Inibição	A2	20	0
% Inibição	LOGx0	-5,01735	0,1141
% Inibição	p	1,70066	0,66004
% Inibição	span	19,83695	
% Inibição	EC20	4,25238E-6	
% Inibição	EC50	9,60832E-6	
% Inibição	EC80	2,17102E-5	

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
% Inibição	Regression	3	33312,48981	11104,16327	3833,01122	2,71974E-7
	Residual	4	11,58793	2,89698		
	Uncorrected Total	7	33324,07773			
	Corrected Total	6	7195,53006			
% Inibição	Regression	3	1197,3948	399,1316	109,82489	0,00156
	Residual	3	10,90276	3,63425		
	Uncorrected Total	6	1208,29756			
	Corrected Total	5	419,8816			

• Composto 3 ((3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4-diol):

Model	DoseResp		
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((L\ OGx0-x)*p)})$		
Reduced Chi-Sqr	19,16571		
Adj. R-Square	0,988		
		Value	Standard Error
% Inibição	A1	8,15347	2,16916
% Inibição	A2	105,9795	4,62388
% Inibição	LOGx0	-2,39007	0,04159
% Inibição	p	1,82216	0,27394
% Inibição	span	97,82603	
% Inibição	EC20	0,0019	
% Inibição	EC50	0,00407	
% Inibição	EC80	0,00872	

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
% Inibição	Regression	4	37952,56862	9488,14216	495,05819	1,64325E-8
	Residual	7	134,15998	19,16571		
	Uncorrected Total	11	38086,7286			
	Corrected Total	10	15966,1659			

• Composto 4 ((3*R*,4*R*)-1-benzil-3,4-di-(benziloxi) pirrolidina):

Model	DoseResp		
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$		
Reduced Chi-Sqr	31,21384		
Adj. R-Square	0,9658		
		Value	Standard Error
% Inibição	A1	10,80299	3,25427
% Inibição	A2	868361,98127	8,46416E9
% Inibição	LOGx0	2,37495	4386,37823
% Inibição	p	0,96574	0,61229
% Inibição	span	868351,17828	
% Inibição	EC20	56,43316	
% Inibição	EC50	237,11127	
% Inibição	EC80	996,25379	

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
% Inibição	Regression	4	17108,24198	4277,0605	137,02449	3,21113E-5
	Residual	5	156,0692	31,21384		
	Uncorrected Total	9	17264,31118			
	Corrected Total	8	7301,20344			

• DNJ:

Model	DoseResp		
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LO\ Gx0-x)*p)})$		
Reduced Chi-Sqr	3,69885		
Adj. R-Square	0,99776		
		Value	Standard Error
% Inibição	A1	2,89868	1,28206
% Inibição	A2	100,95342	1,1175
% Inibição	LOGx0	-6,77391	0,0232
% Inibição	p	1,15957	0,06612
% Inibição	span	98,05474	
% Inibição	EC20	5,0919E-8	
% Inibição	EC50	1,68301E-7	
% Inibição	EC80	5,56283E-7	

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
% Inibição	Regression	3	63547,23122	21182,41041	9899,43351	0
	Residual	10	21,3976	2,13976		
	Uncorrected Total	13	63568,62882			
	Corrected Total	12	14639,64674			

### Curvas de Michaelis-Menten para determinação do tipo de Inibição

- Composto 1 (3R,4R)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol):

- 1,255 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	5,44135E-7	1,81378E-7	215,66519	5,74052E-4
	Residual	3	2,52306E-9	8,41019E-10		
	Uncorrected Total	6	5,46658E-7			
	Corrected Total	5	1,0949E-7			

- 2,587 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	1,90968E-7	6,3656E-8	144,6975	0,00104
	Residual	3	1,31977E-9	4,39925E-10		
	Uncorrected Total	6	1,92288E-7			
	Corrected Total	5	3,98899E-8			

- 6,158 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	1,42129E-7	4,73764E-8	54,05443	0,00444
	Residual	3	2,62937E-9	8,76457E-10		
	Uncorrected Total	6	1,44759E-7			
	Corrected Total	5	3,13592E-8			

- At. Máx.

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	5,17503E-7	1,72501E-7	282,48477	3,83879E-4
	Residual	3	1,83197E-9	6,10656E-10		
	Uncorrected Total	6	5,19335E-7			
	Corrected Total	5	1,06117E-7			

- Composto 2 (3S,4S)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol):

- 0,127 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	6,91529E-7	2,3051E-7	222,22537	5,4899E-4
	Residual	3	3,11184E-9	1,03728E-9		
	Uncorrected Total	6	6,94641E-7			
	Corrected Total	5	1,3873E-7			

- 0,51 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	9,51569E-7	3,1719E-7	86,64132	0,00222
	Residual	3	1,09829E-8	3,66095E-9		
	Uncorrected Total	6	9,62552E-7			
	Corrected Total	5	1,89492E-7			

Avaliação e caracterização da ação inibitória de iminociclitóis na atividade alfa-glucosidase de células de mamífero

▪ 2,6 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	1,95895E-7	6,52985E-8	102,94272	0,00172
	Residual	3	1,90296E-9	6,34319E-10		
	Uncorrected Total	6	1,97798E-7			
	Corrected Total	5	4,79998E-8			

▪ 8,1 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	5,97013E-8	1,99004E-8	349,69929	2,7913E-4
	Residual	3	1,70722E-10	5,69073E-11		
	Uncorrected Total	6	5,98721E-8			
	Corrected Total	5	1,68297E-8			

▪ At. Máx

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	6,91529E-7	2,3051E-7	222,22537	5,4899E-4
	Residual	3	3,11184E-9	1,03728E-9		
	Uncorrected Total	6	6,94641E-7			
	Corrected Total	5	1,3873E-7			

• Composto 3 ((3R,4R)-pirrolidina-3,4-diol):

▪ 0,316 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	1,26538E-6	4,21795E-7	207,40841	6,08419E-4
	Residual	3	6,10093E-9	2,03364E-9		
	Uncorrected Total	6	1,27149E-6			
	Corrected Total	5	2,92364E-7			

▪ 1,22 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	6,02801E-7	2,00934E-7	254,89358	4,47483E-4
	Residual	3	2,36491E-9	7,88305E-10		
	Uncorrected Total	6	6,05166E-7			
	Corrected Total	5	1,56914E-7			

▪ 2,515 mM

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	2,99827E-7	9,99424E-8	1073,58006	5,21166E-5
	Residual	3	2,79278E-10	9,30927E-11		
	Uncorrected Total	6	3,00107E-7			
	Corrected Total	5	8,67174E-8			

▪ At. Máx.

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
V0	Regression	3	1,23328E-6	4,11094E-7	254,47314	4,48586E-4
	Residual	3	4,84642E-9	1,61547E-9		
	Uncorrected Total	6	1,23813E-6			
	Corrected Total	5	2,54156E-7			

## Resultados de Citotoxicologia

- Composto 2 (3*S*,4*S*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol):

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Controlo - C078	-9,99275	30,53576	15,26788	-58,58196	38,59646	-,654	3	,559
Pair 2	Controlo - C0156	-26,43425	7,04350	3,52175	-37,64204	-15,22646	-7,506	3	,005
Pair 3	Controlo - C3125	4,38700	35,44079	17,72039	-52,00720	60,78120	,248	3	,820
Pair 4	Controlo - C625	28,18700	28,14832	14,07416	-16,60326	72,97726	2,003	3	,139
Pair 5	Controlo - C125	3,79475	37,81822	18,90911	-56,38248	63,97198	,201	3	,854
Pair 6	Controlo - C25	73,69225	13,84460	6,92230	51,66241	95,72209	10,646	3	,002
Pair 7	Controlo - C50	73,76650	13,09689	6,54845	52,92642	94,60658	11,265	3	,002

- Composto 3 (3*R*,4*R*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diol):

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Controlo - C039	17,81675	28,20790	14,10395	-27,06831	62,70181	1,263	3	,296
Pair 2	Controlo - C078	15,91975	15,14841	7,57420	-8,18475	40,02425	2,102	3	,126
Pair 3	Controlo - C156	7,89800	10,54076	5,27038	-8,87470	24,67070	1,499	3	,231
Pair 4	Controlo - C3125	12,56650	23,57928	11,78964	-24,95339	50,08639	1,066	3	,365
Pair 5	Controlo - C625	22,07575	16,64149	8,32075	-4,40458	48,55608	2,653	3	,077
Pair 6	Controlo - C125	56,25400	13,62031	6,81016	34,58104	77,92696	8,260	3	,004
Pair 7	Controlo - C25	66,83000	17,08907	9,86638	24,37839	109,28161	6,774	2	,021
Pair 8	Controlo - C50	78,92275	13,76813	6,88406	57,01459	100,83091	11,465	3	,001

- Composto 4 ((3*R*,4*R*)-pirrolidina-3,4-diol):

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Controlo - C039	11,04669	16,39852	9,46769	-29,68948	51,78287	1,167	2	,364
Pair 2	Controlo - C078	-16,72577	24,85291	14,34883	-78,46381	45,01226	-1,166	2	,364
Pair 3	Controlo - C156	31,82957	12,18377	7,03431	1,56340	62,09574	4,525	2	,046
Pair 4	Controlo - C3125	8,70262	14,73524	8,50739	-27,90173	45,30698	1,023	2	,414
Pair 5	Controlo - C625	23,52719	25,20371	14,55137	-39,08230	86,13667	1,617	2	,247
Pair 6	Controlo - C125	22,81636	16,95637	9,78976	-19,30559	64,93831	2,331	2	,145
Pair 7	Controlo - C25	32,57958	19,41064	11,20674	-15,63912	80,79828	2,907	2	,101
Pair 8	Controlo - C50	14,38722	35,27992	20,36887	-73,25295	102,02740	,706	2	,553