

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DE CURCUMINA VISANDO
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS: INIBIÇÃO DE ENZIMAS
DIGESTIVAS DE CARBOIDRATOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE,
ESTUDOS TEÓRICOS E BIOFÍSICOS**

EMESON FARIAS ARAUJO SANTOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

EMESON FARIAS ARAUJO SANTOS

**AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DE CURCUMINA VISANDO
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS: INIBIÇÃO DE ENZIMAS
DIGESTIVAS DE CARBOIDRATOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE,
ESTUDOS TEÓRICOS E BIOFÍSICOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

MACEIÓ –AL

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237a Santos, Emeson Farias Araujo.

Avaliação de derivados de curcumina visando aplicações biotecnológicas : inibição de enzimas digestivas de carboidratos, capacidade antioxidante, estudos teóricos e biofísicos / Emeson Farias Araujo Santos. – 2023.

79 f. : il color.

Orientadora: Josué Carinhanha Caldas Santos.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 70-79.

Apêndices: f. 79.

1. Diabetes mellitus. 2. Enzimologia clínica. 3. Inibição enzimática. 4. Hipoglicemiantes. I. Título.

CDU: 606:577.15

DEDICATÓRIA

Primeiramente, dedico este trabalho a mim; a minha família, em específico aos meus pais e avôs; amigos; colegas de turma e todos aqueles que me apoiaram nesta jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu agradeço a Deus por me permitir várias oportunidades.

A **mim** por enfrentar e suportar todas as dificuldades durante minha vida toda, principalmente a jornada acadêmica, em destaque **estresse emocional** acarretado durante minha passagem na Universidade, sobretudo por acreditar no meu potencial, lutando até alcançar meus sonhos.

Alguns membros da minha família, em destaque aos meus **pais e avós** por confiarem em mim e me ofertarem condições favoráveis a minha permanência durante a pós-graduação

Ao meu orientador Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos por depositar sua confiança em meus trabalhos, ensinando-me a fazer ciência e, sobretudo, ensinando-me sobre a vida! – Um exemplo de profissional que me inspira não só no ambiente acadêmico, mas em sua essência como ser humano. Desde já muito obrigado!

Agradeço a minha parceria e amiga de laboratório Ellen dos Santos Silva Barros por sempre estar ao meu lado quando precisei, seja durante os experimentos assim como nos momentos além da UFAL. Agradeço aos demais colegas do laboratório Linqa.

Ao Ari Guimarães por me ajudar durante a execução de alguns experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (PPGQB/UFAL) e a Universidade Federal de Alagoas.

Por fim, agradeço as agências de fomento por me propiciar condições de permanência durante minha jornada no mestrado. Neste sentido, agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

EPÍGRAFE

“Se você tem um sonho, lute por ele. Tem de haver disciplina nas paixões. Não tem a ver com quantas vezes você é rejeitado ou cai ou apanha. Tem a ver com quantas vezes você se levanta, com coragem e continua a insistir.”

Stefani Germanotta

RESUMO

A inibição transitória de enzimas digestivas de carboidratos tem sido amplamente utilizada como estratégia terapêutica coadjuvante para o tratamento da diabetes *mellitus* (tipo II), sendo a acarbose (AC), o miglitol e o voglibol os medicamentos mundialmente comercializados. No entanto, o baixo potencial antiglicante e a presença de diversos efeitos colaterais, como complicações gastrointestinais associada a estes medicamentos tem motivado a busca por novos inibidores de enzimas digestivas de carboidrato. O potencial inibitório de derivados da curcumina (produto natural) na ação de enzimas como a α -amilase e α -glicosidase tem sido reportado na literatura como uma estratégia promissora para o tratamento do diabetes mellitus. Diante disso, onze compostos derivados da curcumina foram sintetizados e caracterizados em relação sua ação como inibidores da α -amilase e α -glicosidase. Dessa forma, realizou-se uma triagem dos derivados de curcumina por meio da atividade inibitória frente as enzimas, estudos clássicos de cinética e inibição (*in vitro*) e avaliação da capacidade antioxidante (DPPH• e ABTS^{•+}). Por conseguinte, sendo o composto mais promissor (**6**) selecionado para estudos biofísicos explorando ensaios teóricos (*docking* molecular) e experimentais. Inicialmente um ensaio *screening* empregando 150 μ M para todos os compostos foi realizado, a fim de verificar o potencial destes para inibir da α -amilase (1 U mL⁻¹). Neste ensaio, apenas quatro derivados apresentaram inibição superior a 50% e destes, apenas o **6** teve potencial inibitório semelhante a AC, o qual apresentou IC₅₀ = 18,50 \pm 0,31 μ M. Em ensaio similar para α -glicosidase (0,02 U mL⁻¹) aplicando concentração única de 250 μ M dos compostos, foi possível verificar que apenas seis compostos expressaram atividade inibitória acima de 50%, sendo o derivado **7** mais ativo com IC₅₀ = 17,67 \pm 0,58 μ M, enquanto AC apresentou IC₅₀ de 19 \pm 03 μ M (α -amilase) e 205 \pm 0,9 μ M (α -glicosidase). Os derivados **6** e **7** foram classificados como inibidores mistos a partir dos ensaios de cinética clássica para ambas as enzimas avaliadas. Nos ensaios antioxidantes, o derivado de curcumina **6** foi o mais ativo, apresentando os menores valores de IC₅₀ para ambos os radicais avaliados (DPPH• e ABTS^{•+}), comparativamente aos outros derivados. Estudos teóricos empregando *docking* molecular foram concordantes com os ensaios enzimáticos experimentais, sendo **6** e **7**, os compostos com melhor interação frente as enzimas α -amilase e α -glicosidase, respectivamente. Neste sentido, **6** foi selecionado para os estudos biofísicos empregando α -amilase como modelos de enzima. Diante disso, com o aumento da temperatura (22 a 38°C) se observou valores inversamente proporcionais da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) caracterizando um perfil de processo por *quenching* estático, o qual foi confirmado a partir dos valores da constante da taxa de extinção biomolecular (pois K_q > 2,0 \times 10¹⁰ M⁻¹ s⁻¹). As principais interações intermoleculares presente entre a α -amilase com **6** foram por ligação de hidrogênio e forças de *Van der Waals*. Além disso, foi possível verificar que o processo de interação entre a enzima e o ligante foi termodinamicamente espontâneo ($\Delta G < 0$). Por fim, o composto **6** demonstrou ser uma molécula com potencial ação inibitória das enzimas digestivas de carboidratos.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*; Enzimologia; Inibição enzimática; Anti-hiperglicêmico.

ABSTRACT

The transient inhibition of carbohydrate digestive enzymes has been widely used as an adjuvant therapeutic strategy for the treatment of diabetes mellitus (type II), with acarbose (AC), miglitol and voglibol being the drugs sold worldwide. However, the low anti-glycating potential and the presence of several side effects, such as gastrointestinal complications associated with these medications, have motivated the search for new carbohydrate digestive enzyme inhibitors. The inhibitory potential of curcumin derivatives (natural product) on the action of enzymes such as α -amylase and α -glucosidase has been reported in the specialized literature, therefore, the evaluation of similar compounds becomes a promising strategy for this purpose. Therefore, eleven compounds derived from curcumin were synthesized and characterized in relation to their action as inhibitors of α -amylase and α -glucosidase. Thus, a screening of curcumin derivatives was carried out through inhibitory activity against enzymes, classical kinetic and inhibition studies (in vitro) and evaluation of antioxidant capacity (DPPH \cdot and ABTS $^{+\cdot}$), being the most promising compound (**6**) selected for biophysical studies exploring theoretical (molecular docking) and experimental tests. Initially, a screening assay using 120 μ M for all compounds was carried out in order to verify their potential to inhibit α -amylase (1 U mL $^{-1}$). In this assay, only four derivatives showed inhibition greater than 50% and of these, only **6** had an inhibitory potential similar to AC, which presented $IC_{50} = 18.50 \pm 0.31 \mu$ M. In a similar assay for α -glucosidase (0.02 U mL $^{-1}$) applying a single dose of 250 μ M of the compounds, it was possible to verify that only six compounds expressed inhibitory activity above 50%, with derivative **7** being more active with $IC_{50} = 17.67 \pm 0.58 \mu$ M, while AC presented IC_{50} of $19 \pm 0.3 \mu$ M (α -amylase) and $205 \pm 0.9 \mu$ M (α -glucosidase). Derivatives **6** and **7** were classified as mixed inhibitors based on classical kinetics assays for both enzymes evaluated. In the antioxidant assays, curcumin derivative **6** was the most active, presenting the lowest IC_{50} values for both radicals evaluated (DPPH \cdot and ABTS $^{+\cdot}$), compared to the other derivatives. Theoretical studies using molecular docking were in agreement with experimental enzymatic tests, with **6** and **7** being the compounds with the best interaction with the enzymes α -amylase and α -glucosidase, respectively. In this sense, **6** was selected for biophysical studies using α -amylase as model enzymes. Therefore, with the increase in temperature (22 to 38°C), inversely proportional values of the Stern-Volmer constant (KSV) were observed, characterizing a process profile by static quenching, which was confirmed based on the values of the extinction rate constant. biomolecular, since $K_q > 2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The main intermolecular interactions present between α -amylase and **6** were through hydrogen bonding and Van der Waals forces. Furthermore, it was possible to verify that the interaction process between the enzyme and the ligand was thermodynamically spontaneous ($\Delta G < 0$). Finally, compound **6** demonstrated to be a molecule with potential inhibitory action on carbohydrate digestive enzymes.

Keywords: Diabetes mellitus; Enzymology; Enzyme inhibition; Antihyperglycemic

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação geral dos modelos clássicos de inibição enzimática reversíveis.....	18
Figura 2. Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk para determinação do K_i de inibidores clássicos.....	18
Figura 3. Estrutura química dos carboidratos polissacarídeos. (a) amilose, (b) amilopectina, (c) agrupamento da amilose com amilopectina como supostamente ocorre nos grânulos de amido.....	19
Figura 4. Representação gráfica dos níveis de estrutura das proteínas.	22
Figura 5. Representação gráfica de uma ligação reversível proteína-ligante.....	22
Figura 6. Formação do complexo proteína-ligante. (A) Chave-fechadura, (B) Encaixe induzido, (C) Seleção conformacional.	23
Figura 7. Representação gráfica dos possíveis tipos de ligações não covalentes envolvidas no processo de interação proteína-ligante.	24
Figura 8. Estrutura química dos inibidores de enzimas digestivas com aplicações clínicas. (A) Acarbose, (B) Miglitol, (C) Voglibose.....	27
Figura 9. (A) Flor da cúrcuma longa; (B) rizoma de cúrcuma longa; (C) pó seco e moído de rizoma cúrcuma longa.	28
Figura 10. Estruturas químicas dos fitoquímicos presentes em maior quantidade em cúrcuma longa.	28
Figura 11. Grupos funcionais na curcumina.	29
Figura 12. Estrutura das moléculas utilizadas neste trabalho cedidas pelo Grupo de Estudos em Química de Produtos Naturais e de Síntese Orgânica (IQB / UFAL).....	34
Figura 13. Gráfico de energia fitscore para a função de pontuação Gold score dos derivados de curcumina (1-11) frente α -amilase.	Erro! Indicador não definido.
Figura 14. Docking molecular entre amilase (PDB ID:1B2Y) e composto 6 (derivado de curcumina).	Erro! Indicador não definido.
Figura 15. Gráfico de energia fitscore para a função de pontuação Gold score dos derivados de curcumina (1-11) frente α -amilase.	Erro! Indicador não definido.
Figura 16. Docking molecular entre α -glicosidase (PDB ID: 2QMJ) e composto 7 (derivado de curcumina).....	Erro! Indicador não definido.

Figura 17. Percentual de inibição dos inibidores padrões e compostos derivados de curcumina (1-11) aplicando a dose única de 150 μM , utilizando 1 U mL^{-1} da α -amilase em diferentes sistemas tampões.	41
Figura 18. Resultados dos estudos cinéticos clássicos <i>in vitro</i> de inibição da α -amilase frente ao composto 6.	43
Figura 19. Percentual de inibição dos inibidores padrões e compostos derivados de curcumina (1-11) aplicando a dose única de 250 μM , utilizando 0,02 1 U mL^{-1} da α -glicosidase.....	46
Figura 20. Resultados dos estudos cinéticos clássicos <i>in vitro</i> de inibição da α -amilase frente ao composto 7.	47
Figura 21. Avaliação de supressão de fluorescência molecular entre α -amilase e composto 6, em diferentes temperaturas 22, 30 e 38°C.....	58
Figura 22. Espectros de fluorescência sincronizada de α -amilase (1 U mL^{-1}) após adição de concentrações crescentes do composto 6 em pH 6,9.....	59
Figura 23. O espectro de fluorescência 3D	61
Figura 24. Estudo de competição frente à atividade catalítica da α -amilase. s.....	63
Figura 25. Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da α -amilase (1 U mL^{-1}).....	65
Figura 26. Espectros de absorção no UV-vis da α -amilase na ausência e presença do composto inibidor 6, em tampão fosfato de sódio em pH 6,9: (A) região 270 nm; (B) 210 nm.....	67
Figura 27. Espectros de absorção no UV-vis da α -amilase em diferentes concentrações do cofator cálcio no sistema tampão Tris-HCl: (A) região 270 nm; (B) 210 nm.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de concentração mínima necessária para reduzir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) dos compostos utilizando 1 U mL ⁻¹ da α -amilase em diferentes sistemas tampões.....	43
Tabela 2. Parâmetros cinéticos da atividade catalítica da α -amilase frente a ausência/presença do composto inibidor de curcumina.	44
Tabela 3. Valores de concentração mínima necessária para reduzir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) dos compostos utilizando 0,02 U/mL da α -glicosidase.....	47
Tabela 4. Parâmetros cinéticos da atividade catalítica da α - glicosidase frente a ausência/presença do composto inibidor de curcumina.	48
Tabela 5. Valores de percentual da atividade antioxidante e IC_{50} dos inibidores padrões e compostos derivados de curcumina (1-11), pelo método de DPPH'	49
Tabela 6. Valores de percentual da atividade antioxidante e IC_{50} dos inibidores padrões e compostos derivados de curcumina (1-11), pelo método de ABTS ⁺⁺	51
Tabela 7. Avaliação da interação entre α -amilase e o composto 6 por meio dos parâmetros de Stern-Volmer, ligação e termodinâmicos em diferentes temperaturas (22, 30 e 38°C) e pH 6,9.....	58
Tabela 8. Parâmetros de fluorescência tridimensional (3D) para α -amilase livre ou na presença do composto 6	61
Tabela 9. Parâmetros calculados relacionados ao processo de FRET quanto a interação entre α -amilase e composto 6 , avaliando em diferentes concentrações de composto inibidor.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

K_b	Constante de ligação proteína com ligante
K_{sv}	Constante de supressão de Stern-Volmer
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_{IC}	Constante de inibição competitiva
K_{IU}	Constante de inibição não-competitiva
V_{max}	Velocidade máxima
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Variação de entalpia
ΔS	Variação de entropia
F	Fluorescência na presença de ligante
F_0	Fluorescência na ausência ligante
τ_0	Tempo de vida do fluoróforo
K_q	Constante de interação bimolecular
Da	Daltons
T	Temperatura
t	Tempo
Tyr	Tirosina
Trp	Triptofano
Glu	Glutamato
Asp	Aspartato
His	Histidina
UV-vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Enzimas	16
2.2 Enzimas digestivas de carboidratos	19
2.2.1 α -amilase	20
2.2.2 α -glicosidade	21
2.3 Interação proteína-ligante	21
2.4 Inibidores de enzimas digestivas de carboidratos como alvo-terapêutico	24
2.4.1 Diabetes <i>mellitus</i>	25
2.6 Inibidores comerciais de enzimas digestivas de carboidratos	27
2.7 Curcumina: química, estrutura, função e aplicações biotecnológicas	27
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo Geral	32
4.2 Objetivos Específicos	32
5.2 Experimental	33
5.2.1 Instrumental	33
5.2.2 Derivados de curcumina	33
5.2.3 Preparo de soluções	33
5.2.3.1 Soluções para estudos cinéticos da α -amilase	33
5.2.3.2 Soluções para estudos cinéticos da α -glicosidase	34
5.2.3.3 Soluções para estudos antioxidantes	35
5.2.3.3.1 Ensaio do sequestro do radical DPPH•	35
5.2.3.3.2 Ensaio do sequestro do radical ABTS ^{•+}	35
5.2.4 Ensaio de atividade enzimática <i>in vitro</i>	35
5.2.4.1 Ensaio de atividade da α -amilase	35
5.2.4.2 Ensaio de atividade da α -glicosidase	35
5.2.4.3 Estudos de inibição enzimática	36
5.2.5 Estudos de atividade antioxidante	36
5.2.5.1 Ensaio do sequestro do radical DPPH•	36
5.2.5.2 Ensaio do sequestro do radical ABTS ^{•+}	36
5.2.6 Estudos teóricos de <i>docking</i> molecular	37
5.2.7 Estudos biofísicos de interação enzima e derivado de curcumina 6	37
5.2.7.1 Parâmetros de ligação enzima-ligante	37

5.2.7.2 Espectroscopia de fluorescência síncrona	38
5.2.7.3 Espectroscopia de fluorescência tridimensional (3D)	39
5.2.7.4 Estudos de competição	39
5.2.7.5 Transferência de energia por ressonância de Först (FRET)	39
5.2.7.6 Avaliação do processo de interação por UV-vis	39
5.2.8 Análises estatísticas	40
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.3.1 Estudos de cinética clássica e inibição <i>in vitro</i> dos compostos análogos a curcumina frente à atividade das enzimas digestivas de carboidratos	40
5.3.1.1 α -amilase	40
5.3.1.1.1 Otimização dos estudos cinéticos da α -amilase	40
5.3.1.1.2 Inibição e cinética clássica <i>in vitro</i> da α -amilase	42
5.3.1.2 α -glicosidase	45
5.3.1.2.1 Otimização dos estudos da α -glicosidase	45
5.3.1.2.2 Inibição e cinética clássica <i>in vitro</i> da α -glicosidase	46
5.3.2 Estudos da capacidade antioxidante dos compostos análogos a curcumina	48
5.3.2.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-2-picrilidrazila (DPPH [*])	48
Fonte: Autor, 2023.	50
5.3.2.2 Sequestro do radical ABTS ^{•+}	50
5.3.3 Estudos teóricos de <i>docking</i> molecular	51
5.3.3.1 Estudos teóricos de <i>docking</i> molecular frente à α -amilase	52
5.3.3.2 Estudos teóricos de <i>docking</i> molecular frente à α -glicosidase	54
5.3.4 Estudos biofísicos <i>in vitro</i> do composto 6 frente a α-amilase	56
5.3.4.1 Supressão de fluorescência	56
5.3.4.2 Espectroscopia de fluorescência síncrona	59
5.3.4.3 Espectroscopia de fluorescência tridimensional (3D)	60
5.3.4.4 Estudos de competição	62
5.3.4.5 Transferência de energia por ressonância de Först (FRET)	64
5.3.4.6 Medições de absorção UV-vis	66
5.4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	69

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os carboidratos são biomoléculas derivadas de aldeídos e cetonas que apresentam variado número de grupos hidroxilas em sua composição (Drula *et al.*, 2022). Esta classe de compostos biológicos desempenha papel fundamental no desenvolvimento e homeostase da vida, uma vez que atua na comunicação e interação com outras moléculas presentes no ambiente da célula, intermediários metabólicos e, principalmente, como fonte principal de energia (Podlogar; Wallis, 2022).

Essas enzimas são classificadas de acordo com a região de ação catalítica e substrato como a α -amilase (α -1,4 glicano-4-glicano-hidrolase, E.C. 3.2.1.1) e α -glicosidase (α -D-glicosídeo-glicohidrolases, E.C. 3.2.1.20), por exemplo. Diante do exposto, inibidores sintéticos destas enzimas como miglitol, voglibol e acarbose foram desenvolvidos, a fim de diminuir o quadro clínico hiperglicêmico, pós-prandial, em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo II (DM-II) (Devi *et al.*, 2023). Entretanto, a maioria dos pacientes durante o tratamento da patologia para de usar estes medicamentos, devido seus efeitos colaterais como náuseas, diarreia, hipoglicemia, flatulência, e distensão abdominal, além do baixo potencial antiglicante (Sun *et al.*, 2023).

Sendo assim, alguns estudos vêm demonstrando os potenciais de inibição de glicação de compostos fenólicos de origem natural, como de *Curcuma longa* Linn. (*C. longa*), frente à atividade catalítica das enzimas digestivas de carboidratos (Oliveira *et al.*, 2023). Um desses compostos fenólicos é a curcumina, que se apresenta como um pó alaranjado, pouco solúvel em água, sendo caracterizado por três grupos funcionais em sua estrutura química, sendo dois grupos fenólicos e duas duplas ligações conjugadas, além de uma porção β -dicetona (e respectivo tautômero ceto-enol) (Lan *et al.*, 2023).

Foi verificado que a curcumina alivia os sintomas do DM-II, por meio da atuação de inibição da atividade catalítica das enzimas digestivas de carboidrato, melhorando a função das células beta, além da atividade antiglicante, antioxidante e anti-inflamatória (Ezati *et al.*, 2023). Somando-se a isto, foi verificado que há possibilidade de melhorar o potencial anti-hiperglicêmico por meio da modificação estrutural da molécula (Shen *et al.*, 2023). Neste sentido, este trabalho teve por objetivo investigar o potencial de inibição de compostos derivados de curcumina frente à atividade catalítica das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos.

Diante do exposto, 11 derivados sintéticos de curcumina foram avaliados como inibidores de α -amilase e α -glicosidase relacionado ao perfil da cinética de inibição, valor

da concentração de um inibidor necessária para diminuir pela metade (50%) a atividade enzimática (IC_{50}), avaliação da capacidade antioxidante, e estudos biofísicos explorando técnicas espectroscópicas e estudos teóricos. Logo, este trabalho visa proporcionar conhecimento acerca das interações das enzimas frente os derivados curcuminoides, auxiliando da compreensão dos efeitos destes na atividade das enzimas digestivas de carboidrato avaliadas e, desta forma, selecionar compostos promissores, com futuro potencial para aplicação biotecnológica, considerando o tratamento do diabetes *mellitus* tipo II, por exemplo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enzimas

As enzimas são biomoléculas, sendo a maioria de origem proteica, que atuam como catalizadores biológicos, fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da vida (Nelson; Cox, 2017).

Somando-se a isto, compreende-se que muitas enzimas dependem de cofatores para que ocorra sua atividade catalítica, isto porque mesmo o papel do cofator varie de enzima para enzima, sua presença estabiliza a estrutura tridimensional da enzima acarretando uma melhor atividade catalítica (Chen; Arnold, 2020).

A principal propriedade catalítica das enzimas é acelerar as reações químicas, por meio da diminuição da energia livre de ativação. Entretanto, as enzimas não têm o poder de alterar o equilíbrio das reações, alterando apenas a velocidade da reação através da formação dos estados de transição. Com isso, a primeira etapa da catálise é a formação de um sistema, sendo o complexo “enzima-substrato”, no qual são ligados por meio de interações intermoleculares em uma região específica da enzima denominada de sítio ativo (Bisswanger, 2017).

Os sítios ativos variam de acordo com o tipo de enzima, no entanto apresentam características em comum, como uma região que mais contribui para a diminuição da energia livre de ativação da reação; contém resíduos de aminoácidos que irão participar de forma direta na quebra e geração das ligações químicas; em relação ao volume total de uma enzima, o sítio ativo ocupa relativamente uma parte pequena; a especificidade entre a enzima e o substrato é dependente do arranjo espacial dos átomos presentes no centro ativo do catalizador (Nelson; Cox, 2017; Zhang *et al.*, 2022).

Uma forma de compreender como as enzimas funcionam é o estudo destas por meio das propriedades cinéticas com o uso da equação de Michaelis-Menten. Logo, uma alternativa simples para avaliar a cinética enzimática é por meio do acompanhamento do aumento da concentração do substrato em relação à formação do produto. Com isso, é possível determinar os parâmetros cinéticos como os valores a constante de Michaelis ($V_{máx}$) e a velocidade média (K_m). No entanto, para rastrear os valores precisos destes parâmetros é necessária a realização de uma transformação dos dados a fim de fornecer um gráfico em linha reta. Para isso, é feito um gráfico de dupla recíproca ou gráfico de Lineweaver-Burk,. De forma geral, K_m é uma medida de eficiência catalítica da enzima

em relação ao tipo de substrato, além de fornecer qual a concentração de substrato que é necessária para ocorrer a reação catalítica de forma significativa (Kari *et al.*, 2017).

Além das propriedades cinéticas, os parâmetros termodinâmicos são fundamentais para a compreensão das enzimas. Isto porque, para compreender melhor as operações catalíticas das enzimas, é necessário considerar as propriedades termodinâmicas das reações. Primeiramente, avaliar a diferença entre a energia livre entre os reagentes e produtos, bem como a energia livre de ativação da reação. Com isso, é possível avaliar a espontaneidade da reação. Logo, para que uma reação seja espontânea é necessário que o valor da energia livre seja negativo, caso contrário a reação será endergônica (Alberty, 2006; Nelson; Cox, 2017).

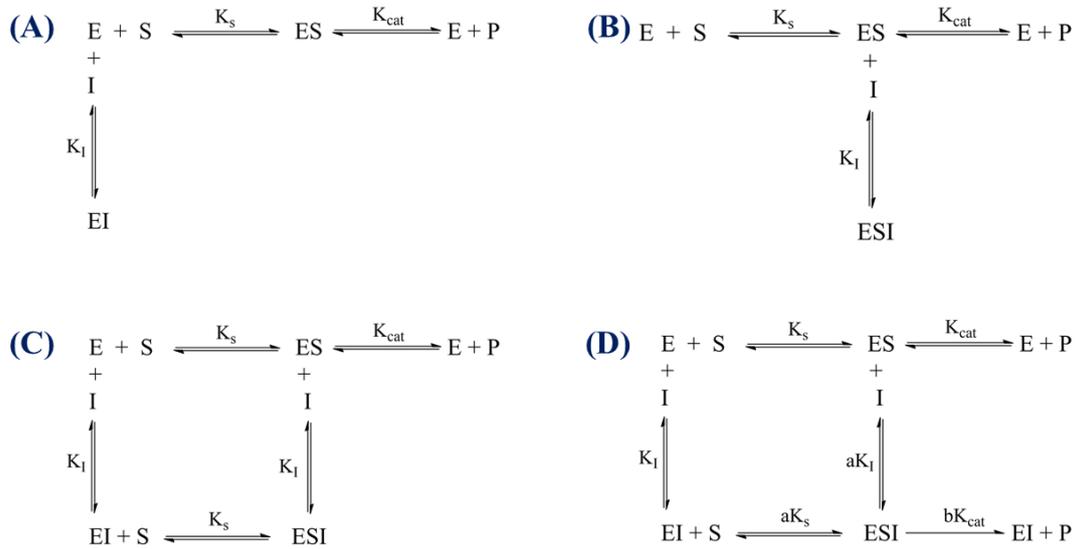
Há diversos fatores que podem afetar a atividade catalítica das enzimas como pH, temperatura e compostos químicos inibidores ou ativadores. Os inibidores são fundamentais para regular os sistemas biológicos, sendo bastante utilizados no campo da medicina para controle de algumas doenças como é o caso do diabetes *mellitus* e enfermidades virais (Nelson; Cox, 2017).

Qualquer substância que ao interagir com enzima reduza sua velocidade da reação, bem como, a formação de produtos pode ser classificada como um potencial inibidor. Do ponto de vista fisiológico, a utilização de inibidores competitivos representa uma ferramenta fundamental para obter informações sobre a especificidade da enzima, mecanismo cinético, estrutura física e química, bem como, compreensão da microrregião do sítio ativo (Leone, 2021).

Os inibidores enzimáticos podem ser classificados como reversíveis e irreversíveis por meio das interações intermoleculares entre o inibidor e a enzima (Zollner, 1989; Sellergren, 2010). No que compete ao mecanismo de inibição irreversível, a ligação intermolecular entre a molécula ligante frente à enzima é por meio da ligação covalente. Neste caso, mesmo que haja um aumento da concentração do substrato no meio reacional, o efeito inibidor não será retirado.

De forma contrária, os inibidores reversíveis são compreendidos pelo fato da interação proteína ligantes não ser do tipo covalente. Assim, quando há um aumento da concentração do substrato, conseqüentemente há a retirada do efeito inibidor. Já para os inibidores reversíveis, uma forma de distingui-los é por meio do mecanismo cinético da reação, podendo ser classificado como competitivo, incompetitivo, não competitivo ou misto, conforme a Figura 1 (Leone, 2021).

Figura 1. Representação geral dos modelos clássicos de inibição enzimática reversíveis. (A) modelo de uma inibição competitiva clássica, (B) modelo de uma inibição incompetitiva clássica, (C) modelo de uma inibição não competitiva clássica, (D) modelo de uma inibição mista clássica. Sendo que: E : significa concentração da enzima, S : concentração de substrato, ES : complexo enzima-substrato, ESI : complexo enzima-substrato-inibidor, P : concentração de produto. K_s e k_i : representam as constantes de dissociação do complexo ES e EI , respetivamente. K_{cat} representa a constante de velocidade da reação.

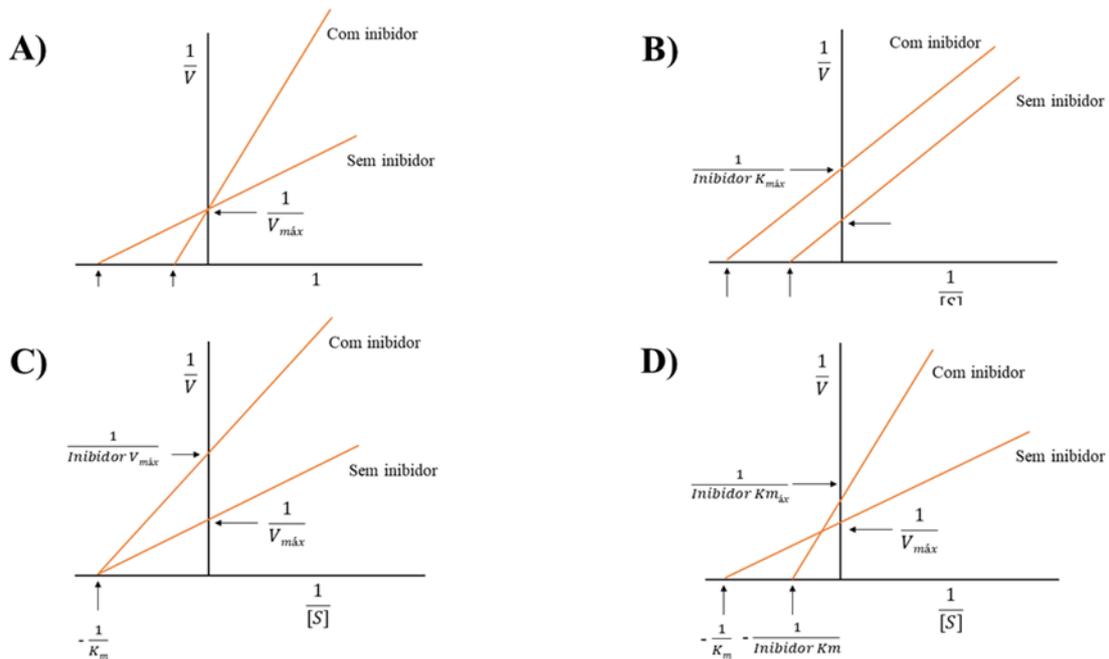


Fonte: Leone, 2021.

Na inibição competitiva, o composto ligante compete juntamente com o substrato pela microrregião catalítica. Neste caso, com a adição alta de substrato, há a anulação da inibição do ligante na enzima. De fato, em um sistema onde a enzima se encontra com um ligante caracterizado como competitivo, é possível verificar a mesma velocidade máxima. Para o inibidor incompetitivo, só haverá ligação no complexo enzima-substrato que, por sua vez, formará um novo complexo chamado de enzima-substrato-inibidor que não prosseguirá para a formação de produtos.

Com isso, a velocidade máxima sempre será menor no sistema onde terá enzima e ligante do que na sua ausência, além de diminuir o valor aparente de K_m . Para a inibição não competitiva, é possível haver ligação do substrato no complexo enzima-inibidor, no entanto não formará produto e o valor de K_m não será afetado. Por fim, a inibição mista é caracterizada pelo fato de que o ligante pode interagir tanto no sítio ativo da enzima como em outra região, conforme a Figura 2 (Leone, 2021).

Figura 2. Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk para determinação do K_i de inibidores clássicos. A) Inibidor competitivo clássico; B) Inibidor incompetitivo clássico; C) Inibidor não competitivo clássico; D) Inibidor misto clássico.

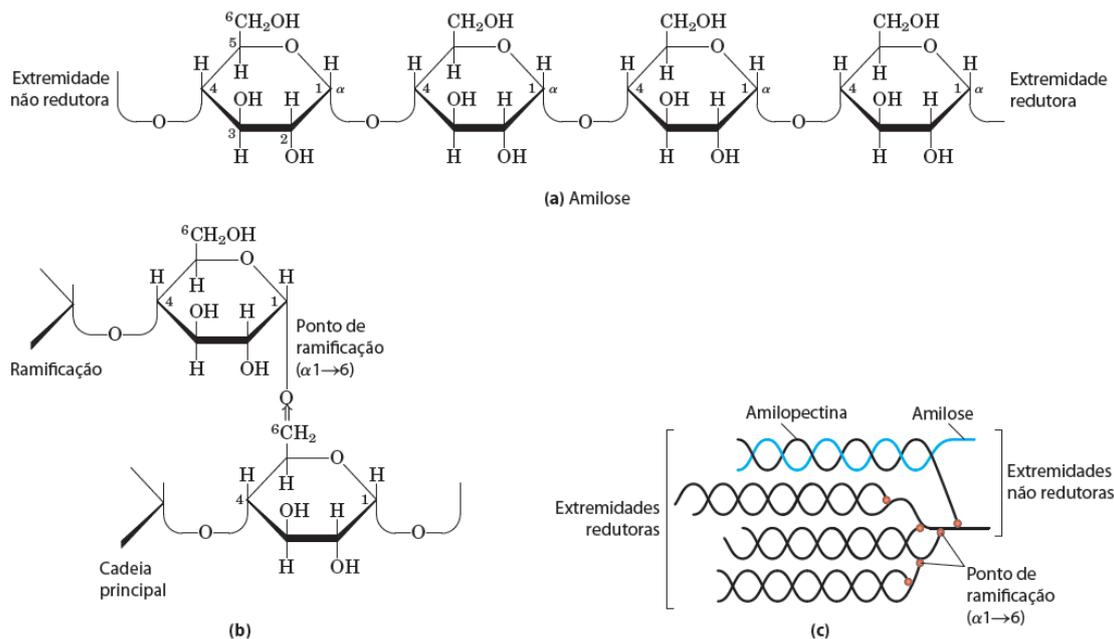


Fonte: Leone, 2021.

2.2 Enzimas digestivas de carboidratos

Os carboidratos são compostos orgânicos que apresentam funções estruturais e energéticas, nos quais são conhecidos como hidratos de carbono, glicídios, sacarídeos ou açúcares (Wardman *et al.*, 2022). De fato, os carboidratos são encontrados principalmente em vegetais e massas como pães. Logo, esta classe de macromolécula é responsável por uma parte da dieta, além de que sua oxidação é compreendida como a via principal para fornecer energia para os organismos (Rafiullah; Musambil; David, 2022). Neste sentido, o carboidrato principal como fonte de energia é o amido, sendo classificado como um homopolissacarídeo, constituído de cadeias de amilose e amilopectina, representado na Figura 3 (Nelson; Cox, 2022).

Figura 3. Estrutura química dos carboidratos polissacarídeos. (a) amilose, (b) amilopectina, (c) agrupamento da amilose com amilopectina como supostamente ocorre nos grânulos de amido.



Fonte: Nelson e Cox, 2022.

Os polissacarídeos são polímeros originados a partir da repetição de várias unidades básicas de carboidratos conhecidos como monossacarídeos. Classifica-se como homopolissacarídeo devido a sua construção ser formada apenas pelo mesmo monossacarídeo que neste caso é a α -glicose, à qual é uma glicose em estrutura cíclica.

Conforme a Figura 3, pode-se perceber que o amido é formado dois tipos de polímeros de glicose, amilose (α 1-4), quando a ligação é formada entre os carbonos 1 e 4, ou amilopectina (α 1-4 e α 1-6), quando a formação pode ser tanto entre os carbonos 1 e 4 ou o os carbonos 1 e 6. O amido está fortemente presente em frutas, grãos e raízes e não apresenta um sabor adocicado e sua hidrólise pelos organismos é com função em obter energia para manutenção da vida. Sua hidrólise é realizada por enzimas digestivas de carboidratos específicos como α -amilase e α -glicosidase, presente na saliva e pâncreas.

2.2.1 α -amilase

As α -amilases (1,4- α -glicano glicanoidrolase EC 3.2.1.1) são classificadas como enzimas endoamilases, cuja reação catalítica ocorre por meio da hidrólise do amido entre as ligações α -1,4 e, por vezes, α -1,6 resultando na liberação de uma variedade de tamanho de oligossacarídeos. Neste contexto, estas enzimas podem ser também classificadas dependendo do grau catalítico da hidrólise no amido. Quando ocorre uma hidrólise de 50 a 60% do substrato, as enzimas são classificadas de sacarificantes, já quando a

porcentagem de hidrólise cai para 30 a 40%, as enzimas são classificadas como liqueficientes (Vihinen; Mäntsälä, 1989).

2.2.2 α -glicosidade

As α -glicosidases (α -D-glicosideo glicoidrolase EC 3.2.1.20) são classificadas como exoamilases, cuja atividade catalítica ocorre de forma preferencial nas ligações glicosídicas α -1,4 de sacarídeos curtos, resultando na liberação de unidades de α -D-glicose (Okuyama *et al.*, 2005; Giannesi *et al.*, 2006). Somando-se a isto, estas enzimas também hidrolisam as ligações O-glicosídicas, além da formação de glicoproteínas e glicolipídios.

2.3 Interação proteína-ligante

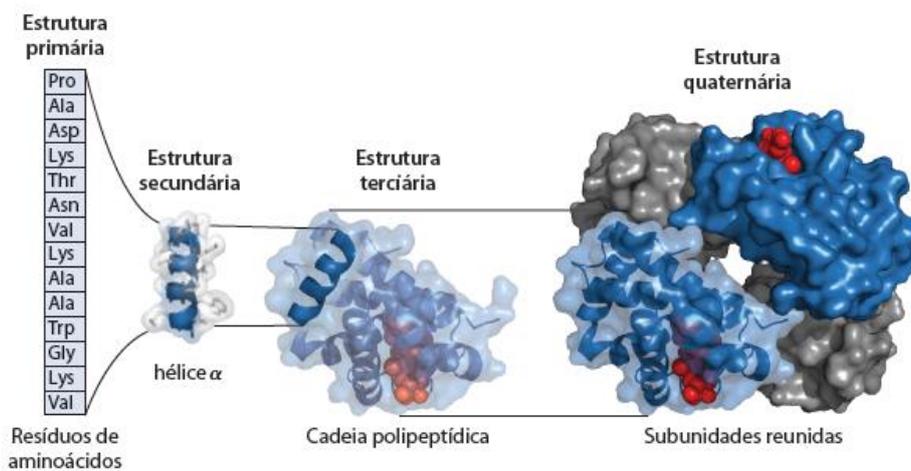
Proteínas são compostos biológicos que apresentam uma diversidade de funções nos organismos vivos, além de participar direta e indiretamente de todos os processos químicos que ocorrem tanto de forma intercelular quanto extracelular. De fato, as proteínas sejam elas encontradas dentro dos organismos mais simples como as bactérias até os seres mais complexos como os humanos, são formadas a partir da ligação de vários aminoácidos (Kyte, 2006; Kuhlman; Bradley, 2019). Com isso, tanto a estrutura química quanto sua função dependem dos tipos de aminoácidos presentes (Figura 4), bem como as possíveis ligações intermoleculares nos quais fornecem uma estrutura tridimensional específica para exercer uma determinada atividade (Hetz, C.; Zhang; Kaufman, 2020).

De fato, há vinte tipos diferentes de aminoácidos que são encontrados nas proteínas e suas diferentes combinações formam uma diversidade de proteínas. Além disso, alguns resíduos de aminoácidos participam diretamente da atividade catalítica da proteína, presente na região do sítio ativo (Akram *et al.*, 2011). Pode-se observar que os aminoácidos compartilham características em comuns, sendo um carbono α fazendo ligação com um grupo carboxila, um grupo amina, um átomo de hidrogênio e um grupo R. Neste sentido, a classificação do aminoácido é definida pelo grupo R, nos quais podem ser apolares alifático, aromático, polar não carregado, polar carregado positivamente e polar carregado negativamente (Nelson; Cox, 2022).

As proteínas apresentam uma dependência entre sua função e a sequência de aminoácidos, que confere em uma determinada estrutura tridimensional. Além disso, as estruturas das proteínas podem ser descritas conforme a complexidade de vários níveis

de arranjo hierárquico. Neste sentido, elas podem ser classificadas em estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. Sendo assim, a estrutura primária da proteína é compreendida pela ligação peptídica que são uniões sequenciais entre os aminoácidos, um grupo carboxílico se ligando a um grupo amínico de outro aminoácidos. Já a estrutura secundária da proteína descreve o arranjo espacial estável entre os resíduos de aminoácidos, nos quais podem se configurar em estrutura alfa-hélice folhas betas (Nelson; Cox, 2022).

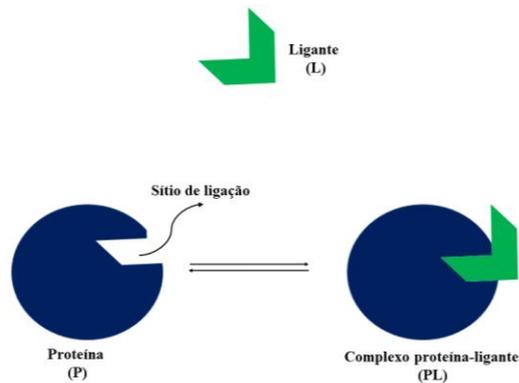
Figura 4. Representação gráfica dos níveis de estrutura das proteínas.



Fonte: Nelson e Cox, 2022.

De forma geral, as proteínas conseguem exercer suas atividades biológicas por meio da utilização de interações químicas com o meio. Diante disso, há diversas possibilidades de interação, nos quais podem ocorrer proteína-proteína, proteína-íon e proteína-ligante (Williams; Daviter, 2016).

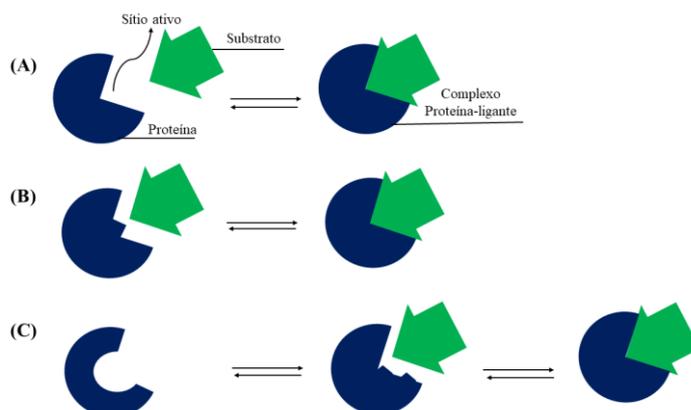
Figura 5. Representação gráfica de uma ligação reversível proteína-ligante.



Fonte: DU et al., 2016, com adaptações pelo autor.

Há basicamente três modelos que podem explicar a interação entre uma proteína e seu ligante (Williams; Daviter, 2016). De acordo com a Figura 6, sendo o mecanismo chave-fechadura é um modelo mais rígido quanto a seletividade da proteína e seu ligante, uma vez que a ligação deve ocorrer perfeitamente de acordo com as suas regiões. No que compete o modelo encaixe-induzido, é um mecanismo mais flexível quando comparado ao mecanismo de chave-fechadura, já que há uma possibilidade de interação mesmo suas regiões iniciais não serem específicas, embora essa possibilidade de mudança conformacional seja apenas no sítio catalítico da proteína. Já no modelo seleção conformacional a mudança é intrínseca, ou seja, tanto a proteína quanto o inibidor se moldarem para que haja uma interação entre ambos (Salentin *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2016).

Figura 6. Formação do complexo proteína-ligante. (A) Chave-fechadura, (B) Encaixe induzido, (C) Seleção conformacional.

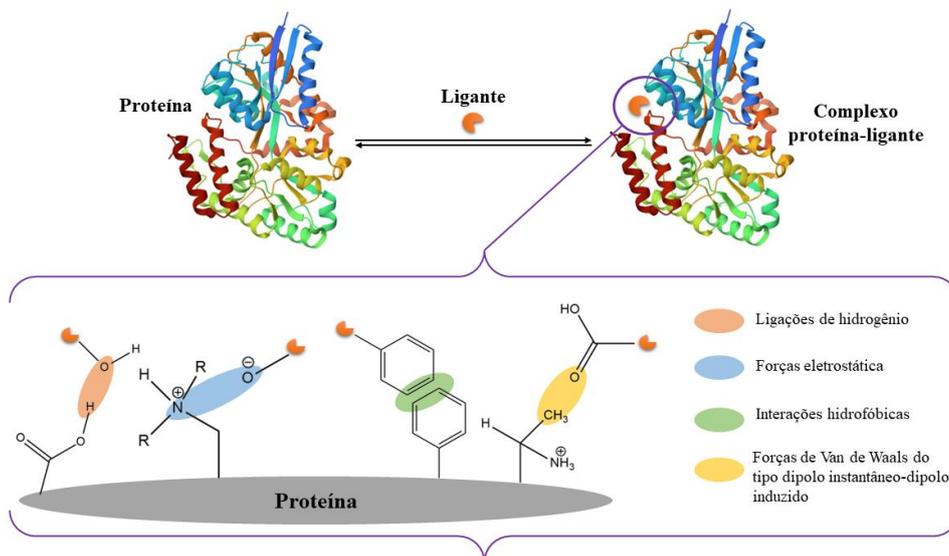


Fonte: DU et al., 2016, com adaptações pelo autor.

Diante disso, as interações entre a proteína e seu ligante é resultado de ligações de

interações fracas, representadas na Figura 7. Interações estas podendo ser por ligação de hidrogênio, hidrofóbicas, de Van de Walls e eletrostáticas.

Figura 7. Representação gráfica dos possíveis tipos de ligações não covalentes envolvidas no processo de interação proteína-ligante.



Fonte: Silva, 2017, com adaptações.

De forma geral, nas ligações não covalentes não ocorrem o compartilhamento de elétrons, o que as caracteriza como ligações fracas. Essas ligações podem ser intermoleculares quando ocorrem entre átomos de moléculas diferentes ou intramoleculares quando ocorrem entre átomos de uma mesma molécula. As interações eletrostáticas ocorrem quando um átomo carregado interage por atração com um grupo de carga oposta. A magnitude desse tipo de interação eletrostática diminui com o aumento da constante dielétrica do meio (Kapan, 2006).

A ligação de hidrogênio é classificada quando um átomo de hidrogênio interage com um átomo mais eletronegativo, como o oxigênio, nitrogênio e o flúor. A interação de van der Waals é baseada na pontuação da distribuição da carga eletrônica em torno do átomo em função do tempo. Isto porque em algum momento a distribuição de carga apresenta uma simetria transiente permitindo a interação com átomo vizinho que possua assimetria complementar, pois um atrai o outro e, conseqüentemente, essa atração aumenta quanto mais o átomo se aproxima um do outro (Fraga, 2015).

2.4 Inibidores de enzimas digestivas de carboidratos como alvo-terapêutico

2.4.1 Diabetes *mellitus*

O Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada pelos altos índices de glicose na corrente sanguínea, devido à ausência ou ineficiência da ação da insulina (Yong *et al.*, 2021; Targher *et al.*, 2021). Com isso, o DM é uma doença relativa ao metabolismo intermediário, um conjunto de reações bioquímicas, processos fisiológicos e homeostáticos, que visa à manutenção do balanço energético do organismo (Lim *et al.*, 2021; Triposkiadis *et al.*, 2021). De acordo com a Sociedade Brasileira do Diabetes (SBD) e a Associação Americana do Diabetes (*American Diabetes Association* - ADA), há quatro principais tipos de DM que, por sua vez, são baseados na etiologia da doença, sendo: (1) diabetes autoimune, no qual é subdividido em DM1 e o diabetes autoimune latente do adulto (LADA); (2) diabetes *mellitus* tipo II; (3) diabetes *mellitus* gestacional; (4) outros tipos específicos oriundos dos defeitos genéticos.

O tratamento do DM tipo II é muito diferente nas suas fases iniciais quando comparado do tipo I, devido o problema ser a resistência à insulina e não exatamente a insulinopenia. Nas fases iniciais, o paciente desenvolve uma resistência periférica a insulina de forma progressiva até atingir um patamar máximo na medida em que ele começa a desenvolver doença periférica à insulina. A reação do pâncreas é aumentar a secreção de insulina, mas isso ocorre até um determinado momento, no qual a partir desse momento há uma fadiga pancreática acarretando um decaimento na produção de insulina. Com isso, à medida em que há esse distanciamento do grau de resistência à insulina e da produção efetiva de insulina vai ocorrendo a insulinopenia ativa e a glicemia do paciente vai aumentando (Chatterjee; Khunti; Davies, 2017).

Diante disso, o principal objetivo para o tratamento do DM tipo II é atacar o fator crucial na sua fisiopatogênese que é a resistência à insulina. Assim, para os doentes que já se encontram a diminuição da secreção de insulina, com uma hipoinsulemia relativa, no qual até tem insulina acima do normal, mas não é suficiente para vencer a resistência à insulina, pode-se ter como objetivo o aumento da secreção de insulina. Somando a isto, para ajudar a compor a estratégia terapêutica é diminuir a absorção de glicose, tendo em vista que com isso o paciente tenderá a ter um menor pico de glicemia pós-prandial (Chaudhury *et al.*, 2017). Outra possível alternativa acoplada ao tratamento do paciente diagnosticado com DM tipo II é a utilização de *incretinomiméticos*, substâncias que são facilitadoras de secreção de insulina pelo pâncreas em resposta a presença de glicose.

Existem duas classes de medicamentos disponíveis para o tratamento relativo à

resistência à insulina, sendo as biguanidinas, cujo único representante disponível é a metformina e as glitazonas. A metformina atua principalmente no hepatócito e na musculatura estriada esquelética, no qual apresentam benefícios adicionais, além da redução da resistência à insulina, uma diminuição do peso, mas seu grande risco é a possibilidade de desencadear a acidose láctica metabólica, principalmente no paciente que tem disfunção renal (Mathu; Abarnadevika; Ariharasivakumar, 2021).

A metformina é contraindicada para quem apresenta creatinina acima de 1,5 e outros fatores de risco para acidose metabólica, cirrose hepática descompensada e a insuficiência cardíaca congestiva. Já as glitazonas são estimuladores do PPAR gamas, no qual atua na modificação o padrão de expressão gênica das células responsáveis pela produção de insulina aumentando a síntese dos segundos mensageiros que se encontram bloqueados no paciente que tem resistência periférica a insulina.

No entanto, uma das consequências com o uso das glitazonas é o aumento de peso do paciente, além de estimular o rim a reter sal, no qual as contraindicações por causa desses efeitos de aumentar a retenção de sal e água, o motivo do ganho de peso, são a insuficiência cardíaca avançada e a insuficiência hepática (Foretz; Guigas; Viollet, 2019). Quando o objetivo é aumentar a liberação de insulina, o tratamento é por meio dos medicamentos *secretagogos*, que podem ser as sulfonilureias que aumentam diretamente a secreção basal de insulina e as glinidas que são secretagogos de ação rápida, no qual funcionam como análogos de insulina de ação rápida pós-prandial (Reis, 2019).

Os incretinomiméticos podem ser diretamente incretinas e análogo de incretinas como GLP-1, que visa produzir um aumento da insulina dependente da glicemia do paciente no qual podem ser de dois tipos: O análogo de incretina que é o exenatide e as gliptinas que não são diretamente análogos de incretina, mas são inibidores das enzimas que degradam as incretinas, inibidores da DPP-4 (Müller *et al.*, 2019).

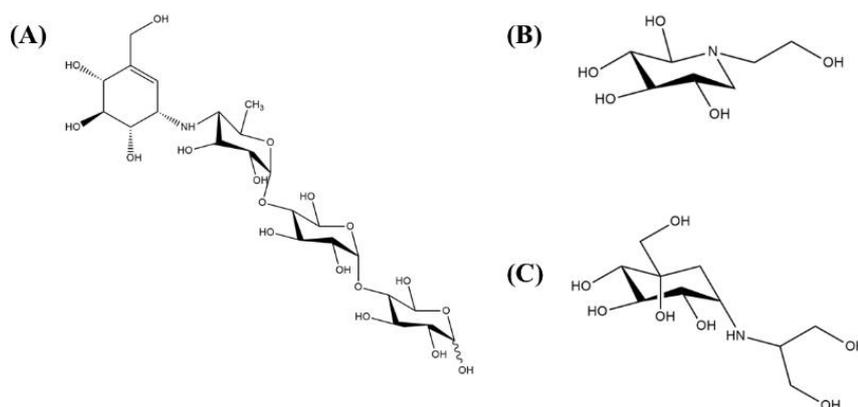
Já o tratamento que visa diminuir a absorção de glicose é usado o medicamento acarbose, que o representante do grupo dos inibidores de enzimas digestivas como α -amilase e α -glicosidase, no qual seu principal mecanismo de ação é diminuir a digestão dos carboidratos complexos em composições monoméricas como a glicose e, portanto, diminui os níveis de pico glicêmicos na corrente sanguínea. Entretanto, o grande problema é quando esses polímeros sobram dentro do lúmen digestivo são captados pelas bactérias intestinais acarretando flatulência e diarreia (Yang *et al.*, 2019).

2.6 Inibidores comerciais de enzimas digestivas de carboidratos

2.7 Curcumina: química, estrutura, função e aplicações biotecnológicas

Inibidores de enzimas digestivas de carboidratos são considerados como uma alternativa terapêutica aplicada ao tratamento do DM (Lebovitz, 1997; Laar, 2005). Diante disso, há três medicamentos disponíveis mundialmente para o tratamento desta patologia, sendo apresentados na Figura 8. (Kalra, 2014; Dirir *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022). Dentre estes três, apenas a acarbose é liberada pela ANVISA e conseqüentemente comercializada. No entanto, é um medicamento que está sendo pouco utilizado devido o composto apresentar diversas complicações ao paciente durante o tratamento, o que acarreta a necessidade de investigar novos compostos mais eficazes e com menos efeitos colaterais (Singh *et al.*, 2023).

Figura 8. Estrutura química dos inibidores de enzimas digestivas com aplicações clínicas. (A) Acarbose, (B) Miglitol, (C) Voglibose.



Fonte: Autor, 2023.

Ao longo dos anos tem se difundido como finalidade terapêutica o uso de plantas medicinais. Exemplo disso é o uso da *Curcuma longa* Linn. (*C. longa*) (Figura 9A), popularmente conhecida como açafrão ou gengibre dourado (Ibáñez; Blázquez, 2020; Jyotirmayee; Mahalik, 2022). Originalmente a *Curcuma* é uma espécie do Sudeste da Ásia, porém também é muito cultivada no Brasil (Quemel *et al.*, 2021). Apesar de haver diversas partes da *C. Longa* estudadas, o rizoma é a parte mais estudada e utilizada pelas pessoas na forma de pó seco (Figura 9C) (Jeengar *et al.*, 2017). O pó seco e moído de rizoma é muito utilizado tanto como ingrediente medicinal quanto como tempero, sendo um ingrediente colorante (Zeng *et al.*, 2021).

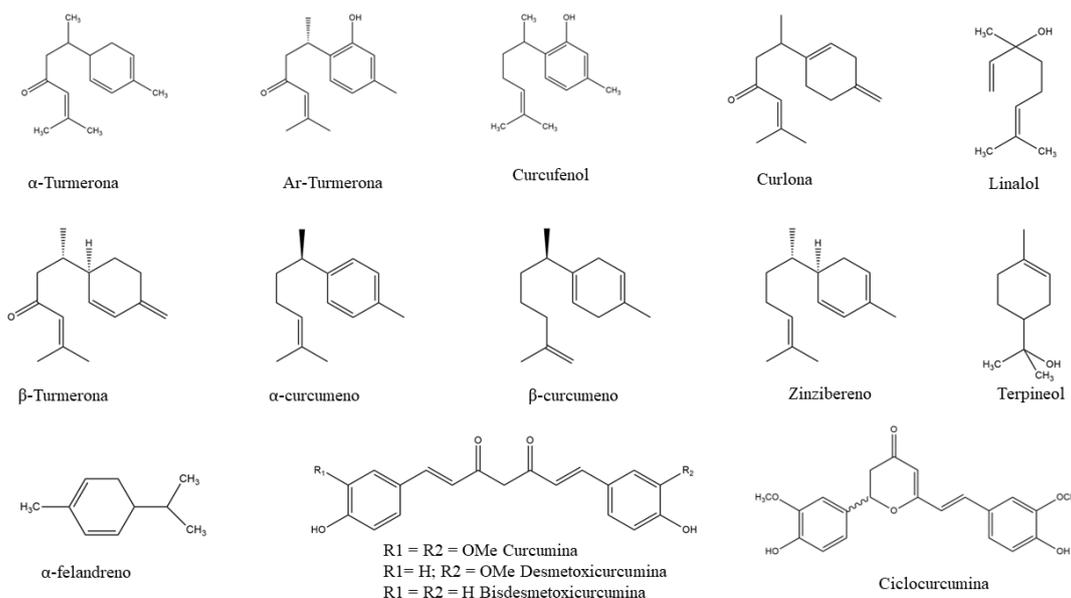
Figura 9. (A) Flor da cúrcuma longa; (B) rizoma de cúrcuma longa; (C) pó seco e moído de rizoma cúrcuma longa.



Fonte: Santos e colaboradores, 2019.

Compreende-se a composição da *C. longa* contendo maior porcentagem de carboidratos, a qual varia em torno de 60 e 70%, e logo depois a proteína com 6 a 8% e lipídios de 5 a 10%. Além disso, são encontrados diversos fitoquímicos como ciclocurcumina, tumeronas, curcumenos, curcumina, zinzibereno, curcufenol, desmetoxicurcumina, curlona, linalol e bisdesmetoxicurcumina, além oléos essenciais como zingiberona, tumerona e atlantona (Figura 10) (Baliga *et al.*, 2012; Trujillo *et al.*, 2013). De fato, os pigmentos lipossolúveis como curcumina, bisdesmetoxicurcumina e desmetoxicurcumina são geralmente associados a cor amarela do açafrão. Somando-se a isso, o curcurminoide que é mais expressivo em quantidade é a curcumina, variando em 50 a 70% dos curcurminoides, ficando em segundo a desmetoxicurcumina com aproximadamente 17%, e em terceiro a bisdesmetoxicurcumina com 3% (Trujillo *et al.*, 2013; Stanic, 2016).

Figura 10. Estruturas químicas dos fitoquímicos presentes em maior quantidade em cúrcuma longa.

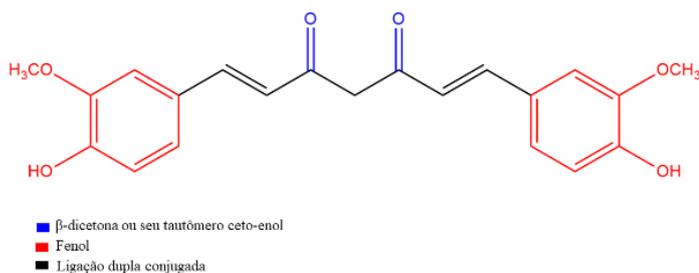


Fonte: Esatbeyoglu et al. (2012) e Sueth-Santiago et al. (2015).

Entre os curcuminoides, o fitoquímico que mais apresenta atividades biológicas é a curcumina, sendo caracterizada como o principal componente extraído da cúrcuma, que apresenta diversas propriedades farmacológicas, como antioxidante (Doldolova *et al.*, 2021), fotoprotetor (Adusumilli *et al.*, 2021), anti-inflamatória (Memarzia *et al.*, 2021) e anticancerígena (Wong; Kamarudin; Naidu, 2021). Além dessas atividades, diversos estudos têm apontado a curcumina como um polifenol com propriedades anti-hiperglicêmica. Diante disso, esta molécula torna-se um modelo alvo para o *designer* de novas arquiteturas moleculares ativas (Dehzad *et al.*, 2023).

A curcumina apresenta-se como um pó alaranjado, pouco solúvel em água a qual contém três grupos funcionais em sua estrutura química, sendo dois grupos fenólicos e duas duplas ligações conjugadas, além de uma porção β -dicetona ou seu tautômero ceto-enol (Figura 11) (Hatcher *et al.*, 2008; Sueth-Santiago *et al.*, 2015).

Figura 11. Grupos funcionais na curcumina.



Fonte: Hatcher et al., (2008) e Sueth-Santiago et al., (2015).

A *Curcuma longa* e a curcumina são bastante utilizadas na medicina tradicional como medicamento oral. Com isso, diversos estudos foram executados a fim de comprovar suas atividades biológicas, obtendo como principais resultados as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (Lara-Espinosa *et al.*, 2022). Por conseguinte, a curcumina virou um fotoquímico alvo para os tratamentos de diversas outras doenças (Zhang *et al.*, 2022). Isso porque a curcumina consegue interagir com uma gama de outras moléculas intracelular e extracelular, o que acarreta diversos efeitos incluindo principalmente sua ação antioxidante e a inibição de espécies reativas de oxigênio (Dehzad *et al.*, 2023).

3 JUSTIFICATIVA

É altamente desejado que haja o desenvolvimento de compostos ativos no que compete a ação de inibir e, possivelmente, controlar a atividade de enzimas digestivas de carboidratos, como α -amilase e α -glicosidase (Kaur *et al.*, 2021). Isto porque um dos mecanismos de tratamento do DM é por meio do controle glicêmico pós-prandial, por meio do retardo gradual da absorção de glicose (Remok *et al.*, 2023). O sucesso das aplicações biotecnológicas das enzimas, assim como dos seus inibidores é resultado de estudos que envolvem a caracterização dos parâmetros (bio)químicos juntamente com os parâmetros biofísicos (Silva *et al.*, 2018). Estudos cinéticos possibilitam prever condições reacionais que ainda não foram experimentalmente realizadas, bem como informações sobre a afinidade da enzima com determinado substrato, e inibidores efetivos (Butterworth *et al.*, 2022). Por outro lado, os parâmetros biofísicos são úteis para prever a estabilidade, do complexo enzima-ligante ou enzima-inibidor (Braga *et al.*, 2022). A partir dos estudos biofísicos é possível prever as possíveis interações intermoleculares entre a enzima-inibidor, uma questão importante para fundamentar a arquitetura física e química de mudanças conformacionais da enzima após o processo de complexação (Tavares *et al.*, 2023). Com isso, reforça-se a importância de avaliar os parâmetros cinéticos e biofísicos da α -amilase e α -glicosidase frente ao potencial inibitório de análogos de curcumina, para fornecer percepções fundamentais sobre compostos que possam ser promissores visando aplicações biotecnológicas, considerando a terapêutica da DM como também no controle de pragas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de análogos de curcumina em inibir a atividade de enzimas digestivas de carboidratos por meio de estudos de cinética enzimática, teóricos e biofísicos *in vitro*, explorando técnicas espectroscópicas em condições fisiológicas simuladas.

4.2 Objetivos Específicos

- (i) Avaliar o perfil de inibição dos compostos análogos a curcumina frente às enzimas α -amilase e α -glicosidase, empregando estudos cinéticos clássicos;
- (ii) Avaliar a capacidade antioxidante dos derivados empregando ensaios baseados em sequestro de espécies radicalares (DPPH• e ABTS•⁺);
- (iii) Realizar estudo teórico de *docking* molecular utilizando derivados de curcumina frente potencial de inibição da α -amilase e α -glicosidade;
- (iv) Determinar os parâmetros de ligação e termodinâmicos e mudanças conformacionais na enzima devido a formação do complexo entre α -amilase e o composto **6**.

5.2 Experimental

5.2.1 Instrumental

Utilizou-se o espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) para as realizações das medidas espectrofluorimétricas, além das cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico com quatro faces polidas. Ademais, empregou-se espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX- 54 6100PC, Brasil), sendo equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico para as medidas espectrofotométricas, com duas faces polidas. Em relação ao processo de pesagem dos reagentes foi empregado balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg. Já para as medidas de pH foram realizadas com eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro Gehaka (PG 1800, Brasil). Para o preparo das soluções, utilizou-se purificador Master System MS2000 (Gehaka, Brazil), para água ultrapura (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$). Para os ensaios de atividades de inibição da α -glicosidase em microplaca, foi utilizada uma leitora de microplaca (Tecan Infinite 200 PRO RCHISTO) e microplaca de poliestireno (96 poços).

5.2.2 Derivados de curcumina

Neste trabalho, foram utilizados 11 compostos análogos à curcumina (Figura 12). Os compostos foram sintetizados, caracterizados e gentilmente cedidos pelo Grupo de Estudos em Química de Produtos Naturais e de Síntese Orgânica (LPqPNSO/IQB/UFAL) coordenado pelo Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima.

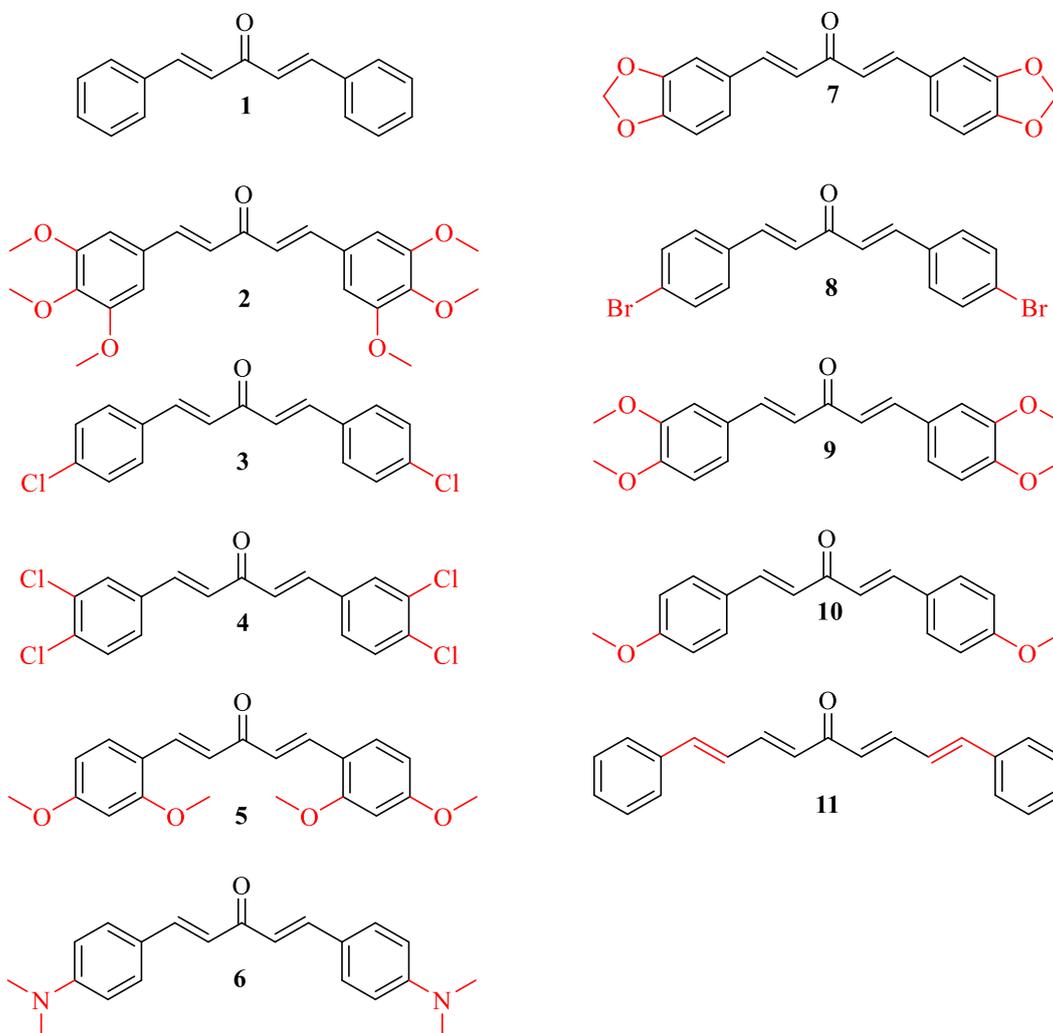
5.2.3 Preparo de soluções

5.2.3.1 Soluções para estudos cinéticos da α -amilase

Todos os reagentes empregados neste trabalho foram de grau analítico de pureza sem necessidade de purificação previa, provenientes da Sigma-Aldrich (USA) ou Merck (Alemanha). Foram preparadas soluções tampão de fosfato de sódio 20 mM (pH = $6,9 \pm 0,1$) e solução tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) com CaCl_2 (10 mM). A solução estoque de α -amilase pancreática de porco (Tipo VI, Sigma Aldrich) foi preparada diretamente em cada solução tampão a 40 U mL^{-1} . A solução de amido a 1% (m/v) foi preparada em água ultrapura obtida a partir do sistema de Gehaka (São Paulo, Brasil). A solução estoque de ácido dinitrosalicílico (DNS) foi preparada em solução contendo 21,86 g tartarato de potássio de sódio, 1,41 g de NaOH e o volume corrigido com água para 100 mL. O

controle positivo utilizado nos ensaios foi a acarbose (AC) (Sigma-Aldrich), preparada uma solução estoque de 1,0 mg mL⁻¹.

Figura 12. Estrutura das moléculas utilizadas neste trabalho cedidas pelo Grupo de Estudos em Química de Produtos Naturais e de Síntese Orgânica (IQB / UFAL).



Fonte: Autor, 2023.

5.2.3.2 Soluções para estudos cinéticos da α -glicosidase

Foi utilizada uma solução tampão fosfato de potássio 100 mM (pH = 6,8 \pm 0,1) preparada em água. Com esta solução tampão foi preparada a solução estoque α -glicosidase a 0,2 U mL⁻¹, utilizando α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Tipo I, Sigma-Aldrich). Para avaliar a atividade enzimática se empregou a sonda espectrofotométrica *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (PNPG, Sigma-Aldrich), preparando solução estoque a 5 mM. O controle positivo utilizado nos ensaios foi a acarbose (AC) (Sigma-Aldrich), sendo preparada uma solução estoque de 1,0 mg mL⁻¹.

5.2.3.3 Soluções para estudos antioxidantes

5.2.3.3.1 Ensaio do sequestro do radical DPPH•

Para a solução do estoque foram pesados 12 mg do radical DPPH• (2,2 difenil-2-picrilidrazila, Sigma-Aldrich) e solubilizado em metanol. Como controle positivos foram utilizados quercetina (Q), Ácido ascórbico (AA), Curcumina (CC) e Trolox® (T), todos da Sigma-Aldrich. A solução estoque de do quercetina (100 mg L⁻¹) foi preparada em meio aquoetanólico 30% (v/v) sendo dissolvido 1,0 mg de quercetina (2-(3,4-diidroxifenil)-3,5,7-triidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) em 10 mL. A solução estoque de Trolox® (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromen- 2-carboxílico) foi preparada a partir da dissolução de 10 mg do sólido em 20 mL de etanol perfazendo uma concentração final de 100 mg L⁻¹.

5.2.3.3.2 Ensaio do sequestro do radical ABTS•+

Para preparação da solução estoque do radical ABTS•+ (7 mM), primeiramente foi pesado 26 mg do ABTS (ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico, Sigma-Aldrich) e 4 mg de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (Merck), no qual foram dissolvido em 10 mL de água ultra pura. Após período de incubação de 16 h, esta solução foi diluída com tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH = 7,2 ± 0,1), para de 25 mL.

5.2.4 Ensaio de atividade enzimática *in vitro*

5.2.4.1 Ensaio de atividade da α-amilase

A avaliação da atividade da α-amilase foi realizada por espectrofotometria, baseada na metodologia de Bernfeld (1948). A quantificação da atividade da α-amilase foi determinada a partir da redução do DNS (ácido dinitrosalicílico). Assim, foi incubada a solução da enzima (1 U mL⁻¹) com o substrato (concentração variada), em solução de amido mM) na presença de solução tampão, e o sistema foi mantido a 100 °C por 60 min. Os experimentos foram realizados em triplicata (*n* = 3). Como controle positivo (inibidor de referência) foi empregada a acarbose. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 540 nm.

5.2.4.2 Ensaio de atividade da α-glicosidase

Para o ensaio de determinação de inibição da atividade da α-glicosidase foi usado

a metodologia descrita por Vinholes e colaboradores (2011), com adaptações. Neste sentido, a enzima α -glicosidase (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich) foi preparada em solução tampão fosfato de potássio (100 mM). A solução do inibidor padrão acarbose (Sigma-Aldrich) foi preparada com água ultrapura. Primeiramente foi utilizado 27 μ L da solução da enzima (0,2 U mL⁻¹), 60 μ L da solução do inibidor (em diferentes concentrações) e 36 μ L de solução tampão. Em seguida, foram adicionados 17 μ L da solução de PNPG 5 mM, e o sistema foi incubando a 37 °C por 15 min. Após a incubação foram adicionados 60 μ L de solução de carbonato de sódio 100 mM para interromper a reação e o sinal analítico (absorvância) foi medido em 400 nm.

5.2.4.3 Estudos de inibição enzimática

Os estudos de inibição enzimática foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos tópicos anteriores. Com isso foi padronizado uma concentração fixa de enzima variando a concentração no composto inibidor. No caso da α -amilase foi utilizado 1 U mL⁻¹ e diferentes concentrações de inibidor, enquanto para a α -glicosidase se utilizou 0,02 U mL⁻¹. A porcentagem do efeito inibitório (*I*) dos compostos análogos de curcumina frente a α -amilase ou α -glicosidase foi medida de acordo com a equação 1:

$$I = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{branco}}} \right) \times 100\% \quad \text{equação (1)}$$

Onde, A_{branco} representa o sinal na ausência do composto inibidor e A_{amostra} o sinal na presença dos inibidores. O valor da concentração do inibidor que inibiu até 50% da atividade da enzima (IC_{50}) foi estimado em função do perfil gráfico.

5.2.5 Estudos de atividade antioxidante

5.2.5.1 Ensaio do sequestro do radical DPPH•

Foi adicionado 0,2 mL do radical comercial DPPH• a 600 μ M em um tubo falcon, 1,0 mL da solução dos compostos a diferentes concentrações (ou controle positivo) e 2,8 mL de solução aquometanólica 30% (v/v). A medida espectrofotométrica foi realizada em 527 nm com cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico (Santos *et al.* 2015).

5.2.5.2 Ensaio do sequestro do radical ABTS^{•+}

Este método seguiu as orientações de Santos e colaboradores (2015), no qual foi

adicionado 0,22 mL da solução estoque do radical ABTS^{•+} (5 mM), 1,0 mL da solução padrão do composto a ser testado (ou controle positivo) da amostra previamente diluída e 2,8 mL de água deionizada. Após 15 min foi realizada a medida espectrofotométrica em 734 nm utilizando cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico.

5.2.6 Estudos teóricos de *docking* molecular

Os compostos foram desenhados usando o *software* ChemDraw 15.1 (Massachusetts, USA), convertidos em arquivos tridimensionais MDL Molfile (.mol) e tiveram suas microespécies mais abundantes no pH 6,9 (α -amilase) e 6,8 (α -glicosidase) determinadas (Marvin Sketch, Budapeste, Hungria). Em seguida, as microespécies foram otimizadas usando o método PM7, no *software* MOPAC (Colorado, USA), gerando o input na interface gráfica Mercury 4.3.1 (Massachusetts, USA) como descrito por Braga e colaboradores (2019). Os estudos de *docking* molecular foram realizados usando as estruturas tridimensionais de α -amilase do pâncreas de porco (PDB ID: 1OSE) e a α -glicosidase (PDB ID: 2QMJ) ambas complexadas com a acarbose, usando o Gold versão 5.5, na função de pontuação Gold Score. O algoritmo genético (AG) com a eficiência de busca de 100% foi definido (Verdonk, 2003). A bolsa de ligação (sítio ativo) de cada enzima onde a acarbose está complexada foi utilizada como referência, e os derivados curcumina de 1 a 11 foram docados usando raio de 10 Å. Por fim, os dados tratados com os *softwares* UCSF Chimera (Califórnia, USA) e Discovery Studio Visualizer (Califórnia, USA) (Neese, 2012).

5.2.7 Estudos biofísicos de interação enzima e derivado de curcumina 6

5.2.7.1 Parâmetros de ligação enzima-ligante

As medições de fluorescência no estado estacionário foram realizadas empregando comprimento de onda de excitação de 280 nm para a enzima e a medição da intensidade de fluorescência foi de 300 - 500 nm, empregando largura da fenda (*slit*) de 5 nm, para excitação e emissão. Os estudos de interação empregando procedimento de titulação espectrofluorimétrica entre a α -amilase (1 U mL⁻¹) o derivado de curcumina **6** (0 a 110 μ M) foram realizados em três temperaturas (295,15; 303,15 e 311,15 K). Os parâmetros de ligação em diferentes temperaturas foram ajustados de acordo com modelos matemáticos estabelecidos na literatura (Bhowmick; Jagannadham, 2006). A

supressão da intensidade de fluorescência foi avaliada empregando a equação de Stern-Volmer (Braga *et al.*, 2019):

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad \text{equação (2)}$$

Aqui, F_0 e F denotam as intensidades de fluorescência no estado estacionário na ausência e presença do composto *quercher* $[Q]$, no caso **6**, K_{SV} é a constante de extinção de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração de **6**, K_q é a constante de velocidade de extinção biomolecular, τ_0 é o tempo médio de vida (10^{-8} s) no estado excitado. Os valores do número de sítios de ligação (n) e constante de ligação (K_b) no complexo α -amilase-**6** foram obtidos por meio da equação (5) (Yan-Qing; Hong-Mei, 2012);

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = K_b + n \log[Q] \quad \text{equação (3)}$$

A partir do ajuste linear gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log[Q]$, os valores de n (estequiometria complexo-ligante) e K_b (constante de ligação) foram calculados. As forças preferenciais de estabilização do complexo supramolecular α -amilase-**6** foram avaliadas experimentalmente por meio dos parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da equação de Van't Hoff (Braga *et al.*, 2019):

$$\ln(K_b) = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{equação (4)}$$

onde K_b é a constante de ligação e R é a constante dos gases ideais, enquanto ΔH e ΔS correspondem a variação de entalpia a entropia, respectivamente, determinados pela linearização da equação de Van't Hoff. A energia livre de Gibbs (ΔG) foi estimada a partir da seguinte equação (7):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{equação (5)}$$

5.2.7.2 Espectroscopia de fluorescência síncrona

Para os ensaios de espectroscopia de fluorescência síncrona, os intervalos de comprimento de onda ($\Delta\lambda$) foram fixados em $\Delta\lambda = 15$ e $\Delta\lambda = 60$ nm (Lage *et al.*, 2018; Braga *et al.*, 2019), a fim de confirmar a interação preferencial de **6** frente aos resíduos de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), respectivamente, presentes na estrutura da α -amilase. O ajuste da fenda de excitação e emissão foi igual a 5 nm. Neste experimento, variou-se

a concentração de **6** (0 - 125 μM), mantendo-se fixa a α -amilase (1 U mL^{-1}), com pH = 6,9 (tampão fosfato 20 mM).

5.2.7.3 Espectroscopia de fluorescência tridimensional (3D)

Os ensaios de fluorescência 3D da α -amilase, na presença e ausência de **6** foram processados no intervalo de comprimentos de onda de excitação de 200 a 500 variando de 10 em 10 nm, enquanto o espectro de emissão foi registrado de 230 a 700 nm (Braga et al., 2019), com largura da fenda de excitação e emissão igual a 5 nm. Por fim, foi utilizada concentração da enzima de 1 U mL^{-1} e 5 μM do composto **6**.

5.2.7.4 Estudos de competição

Foi avaliado o efeito de diferentes inibidores (acarbose, ácido salicílico e ácido tânico) de perfil competitivo. Para tanto, o valor da constante de ligação na ausência dos inibidores (K_b : α -amilase + **6**) e na presença (K'_b : α -amilase + **6** + inibidor) foi empregado como critério de avaliação (Lage et al., 2018)

5.2.7.5 Transferência de energia por ressonância de Först (FRET)

Para calcular a distância crítica para transferência de energia entre o doador (enzima) e acceptor (**6**) durante o processo da α -amilase (1 U mL^{-1}) com o derivado de curcumina **6** (10 e 20 μM) foi realizado o ensaio baseado nos conceitos relacionado ao processo de FRET (Zhang et al., 2009).

5.2.7.6 Avaliação do processo de interação por UV-vis

Os espectros de absorção no UV-vis entre a α -amilase na ausência e presença de **6** foram registrados em um espectrofotômetro UV-vis de 200 a 500 nm. A concentração utilizada de α -amilase foi de 1 U mL^{-1} enquanto a concentração do composto inibidor foi de 10 μM . As medidas espectrofotométricas dos sistemas enzima, enzima + **6**, bem como, do composto livre foram realizadas a 25 °C.

Além disso, também foi monitorado o efeito do cálcio no sistema tampão Tris-HCl frente o potencial do ligante na capacidade de interação da amilase por UV-vis, focando o monitoramento na região próxima de 210 e 270 nm. Logo, utilizou-se 1 U mL^{-1} de α -amilase enquanto a concentração do cálcio variou entre 0 a 50 mM.

5.2.8 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão para $n \geq 3$. Para os sistemas que apresentarem mais de dois grupos a análise estatística paramétrica empregou-se à análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de diferença significativa entre as médias, e quando necessário pós-teste de Tukey para comparações múltiplas ($\alpha = 0,05$). Para dois grupos, os testes estatísticos empregados foram teste t de Student pareado ($n - 1$) ou de médias independentes ($n - 2$). Para as análises estatísticas usou-se o *software* OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation), sendo as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Estudos de cinética clássica e inibição *in vitro* dos compostos análogos a curcumina frente à atividade das enzimas digestivas de carboidratos

5.3.1.1 α -amilase

5.3.1.1.1 Otimização dos estudos cinéticos da α -amilase

Um dos fatores críticos para a pessoa com diabetes mellitus é o evento hiperglicêmico pós-prandial, cujo estar associado a várias complicações micro e macrovasculares (Schiano *et al.*, 2021; Iacobini *et al.*, 2022). Um processo fisiológico que acarreta respostas glicêmicas no organismo, tendo em vista um aumento dos níveis séricos de glicose na corrente sanguínea após as refeições devido à hidrólise do amido por meio da ação enzimática da α -amilase (Jafari-Vayghan *et al.*, 2020).

Logo, a redução da absorção de glicose é abordagem terapêutica para o tratamento do DM-II. Neste sentido, utilizam-se inibidores de enzimas digestivas de carboidratos, sendo miglitol, acarbose e voglibol inibidores comercialmente disponíveis no mercado mundial (Zhao *et al.*, 2022). No entanto, os vários efeitos adversos destes medicamentos provoca a necessidade de investigar o potencial inibitório de outras moléculas (Sugimoto *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018, Dong *et al.*, 2022).

Neste sentido, este trabalho buscou investigar o potencial inibitório de 11 compostos derivados de curcumina frente à atividade catalítica da α -amilase. Para tanto, empregou-se a metodologia proposta por Bernfeld (1948) utilizando bioensaios

espectrofotométricos por redução do DNS (ácido dinitrosalicílico). No entanto, por não haver uma padronização no protocolo experimental entre os artigos publicados foi necessário executar uma padronização em relação à concentração da enzima, do inibidor, sonda, tampão e da temperatura, a fim de otimizar as condições experimentais.

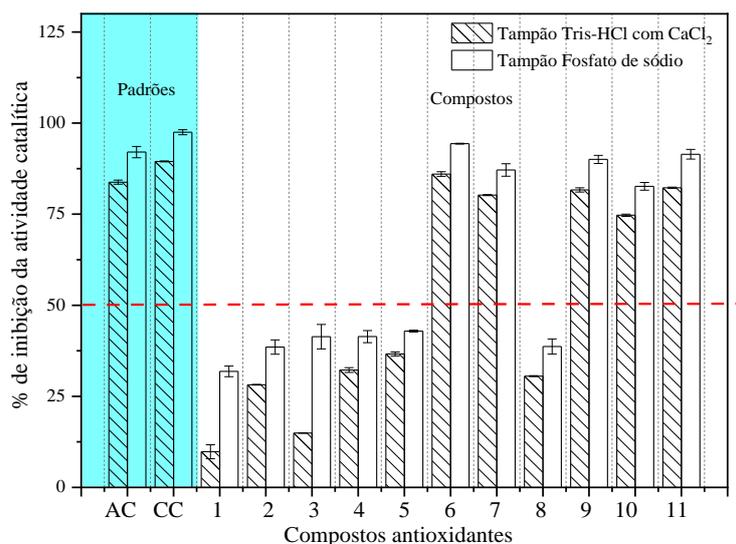
Primeiramente, realizou-se estudos de otimização para a atividade catalítica da α -amilase, para investigar a influência do sistema tampão no valor do IC_{50} referente ao potencial de inibição da atividade catalítica da α -amilase em diferentes concentrações da enzima, pré-incubada aproximadamente em 24 °C (Apêndice A).

Diante disso, foi possível verificar que houve diferença nos valores de IC_{50} nos dois diferentes sistemas utilizando tanto o tampão fosfato de sódio quanto no sistema utilizando tampão Tris com cloreto de cálcio. Sendo assim, os estudos indicaram que quanto maior for a concentração da enzima é necessária uma maior concentração do inibidor para reduzir em até 50% da atividade catalítica da enzima.

Estudos posteriores foram realizados para investigar a influência da temperatura e do sistema tampão no potencial de inibição da α -amilase. Com isso, observou-se que a diferença de temperatura influenciou na atividade da enzima, a qual em temperaturas mais elevada (37 °C) reduziu os valores de IC_{50} nos dois sistemas tampão. Além disso, notou-se que no sistema utilizando o tampão com $CaCl_2$ houve uma maior concentração do composto inibidor para reduzir em até 50% da atividade catalítica da enzima.

Isto pode ser explicado pelo fato do cálcio ser um cofator da α -amilase, o que acarretou maior estabilização da estrutura tridimensional da enzima e conseqüentemente ter melhorado sua atividade catalítica, impedindo sua inibição pela presença da acarbose. Logo após a padronização das condições experimentais, realizou-se um teste de triagem de inibição da α -amilase em dois sistemas tampão, na presença dos compostos análogos a curcumina utilizando dose única de 150 μ M dos compostos (Figura 17)

Figura 13. Percentual de inibição dos inibidores padrões e compostos derivados de curcumina (1-11) aplicando uma concentração de 150 μ M, utilizando 1 U mL⁻¹ da α -amilase em diferentes sistemas tampões.



Fonte: Autor, 2023.

Sendo assim, verificou-se que apenas cinco compostos dos análogos a curcumina (**6, 7, 9, 10 e 11**), acarbose e CC conseguiram reduzir até 50% da atividade catalítica da α -amilase. Neste estudo também foi possível observar que no sistema utilizando tampão com cloreto de cálcio houve menores reduções de inibição da atividade enzimática. Neste sentido, posteriores estudos (inibição e cinética clássica *in vitro* da α -amilase) foram realizados utilizando os compostos que apresentaram melhores resultados no teste de triagem (Figura 17).

5.3.1.1.2 Inibição e cinética clássica *in vitro* da α -amilase

Após os estudos de otimização experimental para a atividade da α -amilase, foram realizados os estudos *in vitro* de inibição da enzima para verificar os valores de IC₅₀ dos compostos análogos a curcumina que apresentaram melhor potencial de inibição no estudo de triagem, sendo utilizado a acarbose e curcumina como controles positivos. Com isso, verificou-se que **6** apresentou melhor potencial inibitório frente à α -amilase, com o valor de IC₅₀ igual a $18,56 \pm 0,32 \mu\text{M}$, no sistema com tampão fosfato de sódio, enquanto $24,02 \pm 0,18 \mu\text{M}$ no sistema com tampão com cloreto de cálcio (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de concentração mínima necessária para reduzir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) dos compostos utilizando 1 U mL^{-1} da α -amilase em diferentes sistemas tampões.

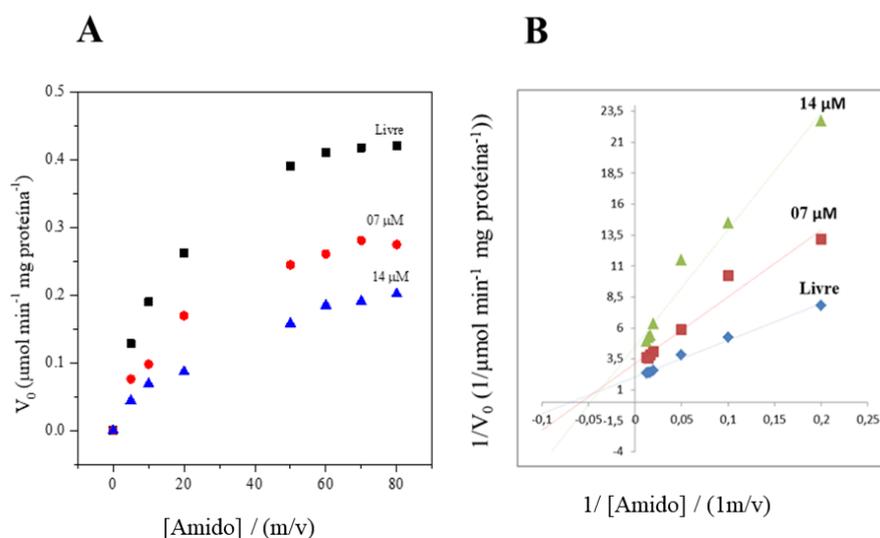
Compostos	IC_{50} (μM)	
	Tampão fosfato de sódio (20 mM), pH = 6,90	Tampão Tris-HCl com CaCl_2 (10 mM), pH = 6,90
AC	$19,03 \pm 0,16^a$	$23,64 \pm 2,16^a$
CC	$17,66 \pm 0,03^a$	$18,03 \pm 0,18^b$
6*	$18,50 \pm 0,31^a$	$24,02 \pm 0,07^{a,c}$
7	$26,63 \pm 1,29^b$	$32,18 \pm 0,99^d$
9*	$25,35 \pm 0,47^{b,c}$	$33,41 \pm 0,45^{d,e}$
10	$29,40 \pm 1,88^d$	$35,63 \pm 1,93^e$
11*	$23,73 \pm 0,16^c$	$27,02 \pm 0,15^c$

Fonte: Autor, 2023.

Legenda: Teste estatístico ANOVA *one-way* ($\alpha = 0,05$) com pós-teste de *Tukey*. Letras iguais evidenciam que não houve diferença estatística significativa. O asterisco (*) representa diferença significativa entre os valores de IC_{50} nas linhas, aplicando o teste *t*-pareado ($\alpha = 0,05$). AC: Acarbose; CC: curcumina.

Além disso, foram realizados estudos clássicos de cinética enzimática utilizando diferentes concentrações do composto análogo à cúrcuma, com intuito de investigar o mecanismo clássico deste inibidor (Figura 18). Logo, o composto 6 foi escolhido para ser realizado os cinéticos clássicos *in vitro* de inibição da α -amilase, uma vez que ter apresentado melhor potencial inibitório.

Figura 14. Resultados dos estudos cinéticos clássicos *in vitro* de inibição da α -amilase frente ao composto 6. (A) Hipérbole de Michaelis-Menten; (B) Gráficos de Lineweaver-Burk.



Fonte: Autor, 2023

Verifica-se que o comportamento hiperbólico típico do gráfico da velocidade inicial vs concentração do amido indica que α -amilase é uma enzima Michaeliana (Figura 18A). Os gráficos da hipérbole de Michaelis-Menten e duplo recíproco de Lineweaver-Burk para determinação do tipo de inibição de α -amilase causada pelo inibidor composto 6 são mostrados na Figura 18. Verifica-se que há um cruzamento em um único ponto no segundo quadrante na Figura 18B, para várias concentrações de inibidor. Diante disso, sugere-se que houve uma cinética de inibição da α -amilase com perfil misto, sendo de comportamento competitivo e não competitiva (Mittal; Singh; Benjakul, 2023).

Sendo assim, a partir dos estudos clássicos de cinética enzimática foram caracterizados aos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, sendo que no sistema onde não houve a presença do composto foram encontrados respectivamente 5,71 mM e $1,10 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína de K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Já no sistema com a presença do composto 6 os valores de $K_{m \text{ app}}$ e $V_{m\acute{a}x \text{ app}}$ foram 7,06 mM e $1,65 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros cinéticos da atividade catalítica da α -amilase frente a ausência/presença do composto inibidor 6.

Sistemas	Parâmetros cinéticos			
	$V_{m\acute{a}x \text{ app}}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}$ proteína)	$K_{m \text{ app}}$ (mM)	K_{cat} (s^{-1})	$V_{m\acute{a}x} / K_m$
Sem inibidor	0,48	14,35	4,8	0,033
6 (7 μM)	0,31	17,07	3,1	0,018
6 (17 μM)	0,22	20,94	2,2	0,010

Fonte: Autor, 2023.

Além do perfil do gráfico de Lineweaver-Burk, outra forma de sugerir o tipo de inibição é através dos valores dos parâmetros cinéticos (Avwioroko *et al.*, 2022). De acordo com Maradesha e colaboradores (2022), quando há mudança nos valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m é sinal que o tipo de inibição é misto. Sendo assim, verificar que o composto 6 comporta-se como inibidor misto, tendo em vista que houve mudanças nos parâmetros cinéticos.

Outra observação é que os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m foram inversamente proporcionais. Isto indica que o ligante tem preferência por se ligar à enzima livre, em

vez do complexo enzima-substrato (Saleem *et al.*, 2022). Além disso, outro parâmetro utilizado para indicar o tipo de inibição mista é a razão entre $V_{m\acute{a}x}/K_m$, sendo inibição do misto quando os valores diminuam com a presença e aumento da concentração do inibidor (Mittal; Singh; Benjakul, 2023). Logo, os valores deste estudo apresentaram diminuição com o aumento da concentração do composto 6, sugerindo um perfil de inibição mista, o qual corrobora com os demais resultados.

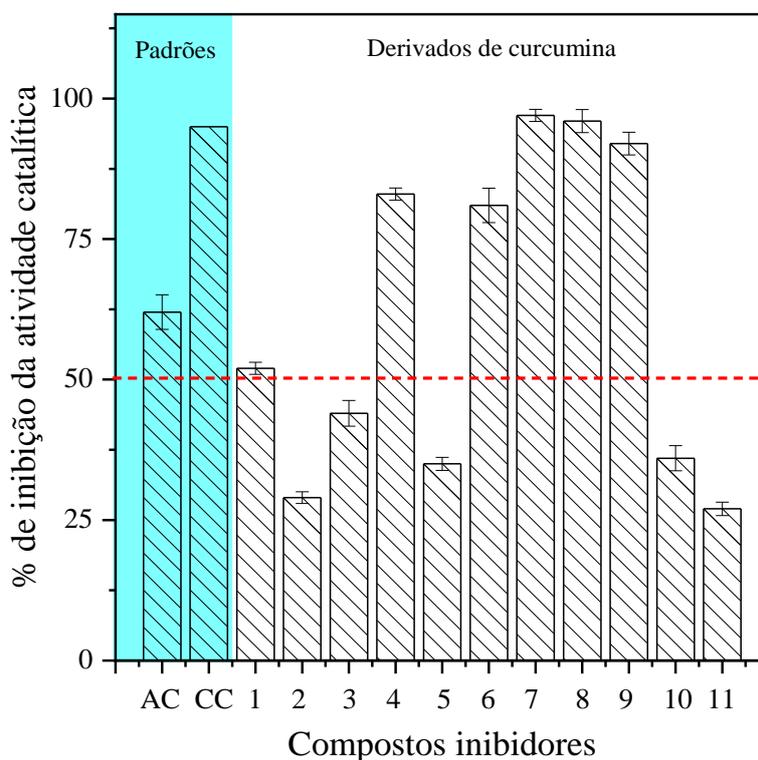
5.3.1.2 α -glicosidase

5.3.1.2.1 Otimização dos estudos da α -glicosidase

Antes da realização dos estudos clássicos de cinética e inibição da α -glicosidase, foram realizados estudos de otimização experimental para a atividade catalítica da referida enzima. Diante disso, os modelos experimentais para estudos da α -glicosidase foram otimizados a partir da investigação da influência da concentração da enzima na atividade catalítica (Figura 19), teste de triagem de inibição da α -glicosidase utilizando acarbose como inibidor em diferentes concentrações de enzima e composto inibidor, determinação do IC_{50} da acarbose frente à atividade da α -glicosidase em diferentes concentrações da enzima (Apêndice B). Além disso, teste de triagem de inibição da α -glicosidase utilizando dose única de 250 μ M do composto frente à concentração de 0,02 U mL⁻¹ da enzima. Logo, após estes testes de otimização foram escolhidas as melhores condições reacionais para os ensaios clássicos de inibição e cinética enzimática.

A partir da otimização da atividade catalítica da α -glicosidase em função da concentração da enzima, foi possível verificar a faixa linear e escolher a condição ideal para os posteriores estudos. Diante disso, a concentração da enzima escolhida para os estudos foi de 0,02 U mL⁻¹ de α -glicosidase. Sendo assim, foi realizado o teste de triagem de inibição da α -glicosidase utilizando dose única de 250 μ M do composto frente à concentração de 0,02 U mL⁻¹ da enzima (Figura 19).

Figura 15. Percentual de inibição dos inibidores padrões e compostos derivados de curcumina (1-11) aplicando a dose única de 250 μM , utilizando 0,02 U mL^{-1} da α -glicosidase.



Fonte: Autor, 2023.

Como resultado, foi possível verificar que apenas seis compostos análogos a curcumina e o composto padrão acarbose resultou em até 50% de inibição da atividade catalítica da enzima. É importante ressaltar que a acarbose é um medicamento vendido para fins de tratamento do diabetes mellitus, e os compostos (4, 6, 7, 8, 9) apresentaram melhor potencial inibitório do que o medicamento acarbose frente à α -glicosidase. Somando-se a isto, foi possível verificar que diferente dos estudos com a α -amilase, os compostos mostraram-se mais efetivos com a inibição da α -glicosidase quando comparado com o controle padrão acarbose.

5.3.1.2.2 Inibição e cinética clássica *in vitro* da α -glicosidase

Após os estudos de teste de triagem de inibição da α -glicosidase, escolheu-se os melhores compostos análogos a curcumina para determinar os valores de IC_{50} . Os estudos demonstraram que os compostos análogos à curcumina (1, 4, 6, 7, 8, 9) foram bem efetivos como inibidores representando valores de IC_{50} menores do que o controle padrão (Tabela 3). Isso demonstra que os compostos apresentam potencial para auxiliar no controle do DM.

Tabela 3. Valores de concentração mínima necessária para reduzir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) dos compostos utilizando $0,02 \text{ U mL}^{-1}$ da α -glicosidase.

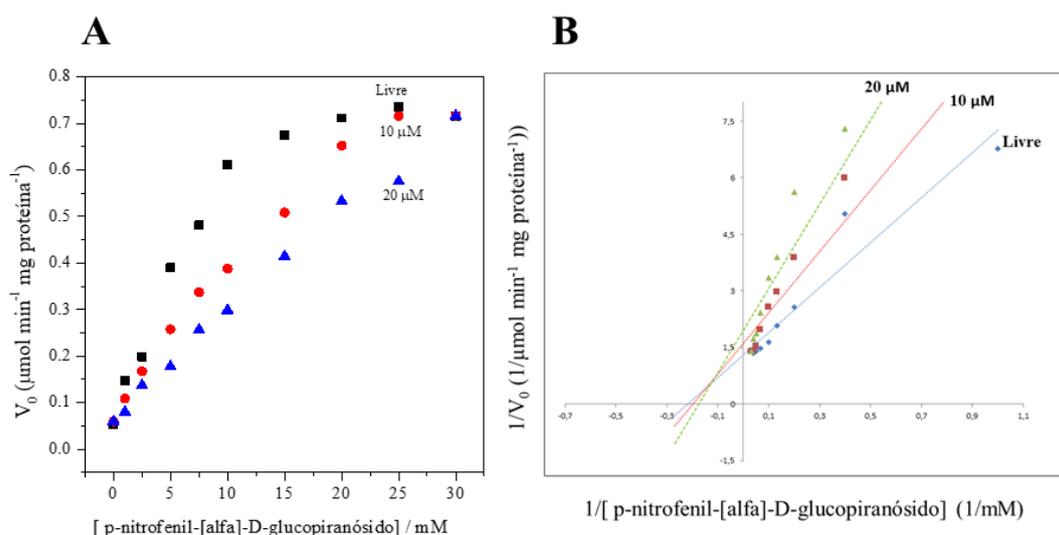
Compostos	$IC_{50} \text{ } \mu\text{M}$
	Tampão fosfato de potássio (100 mM) pH = 6,80
AC	$205 \pm 0,09^a$
CC	$16,14 \pm 0,15^b$
1	$174,53 \pm 0,80^c$
4	$24,53 \pm 0,86^d$
6	$24,90 \pm 0,88^d$
7	$17,67 \pm 0,65^{b,e}$
8	$19,21 \pm 0,16^e$
9	$27,59 \pm 0,46^f$

Fonte: Autor, 2023.

Legenda: Teste estatístico ANOVA *one-way* ($\alpha = 0,05$) com pós-teste de *Tukey*. Letras iguais evidenciam que não houve diferença estatística significativa. AC: Acarbose; CC: curcumina.

Foram realizados estudos clássicos de cinética enzimática utilizando diferentes concentrações do composto análogo a cúrcuma, com intuito de investigar o mecanismo clássico deste inibidor frente à α -glicosidase (Figura 20). Neste estudo, o composto escolhido para realizar os ensaios foi o composto **7**.

Figura 16. Resultados dos estudos cinéticos clássicos *in vitro* de inibição da α -glicosidase frente ao composto **7** (A) Hipérbole de Michaelis-Menten; (B) Gráficos de Lineweaver-Burk.



Fonte: Autor, 2023.

Geralmente empregam-se os gr\u00e1ficos de Lineweaver-Burk para determinar o tipo de inibi\u00e7\u00e3o (Song *et al.*, 2022). Diante disso, foi realizado o estudo e cin\u00e9tica cl\u00e1ssica

utilizando o composto **7** frente a atividade catalítica da α -glicosidase. Logo, o mostrou que o derivado de curcumina atuou como um inibidor misto da enzima.

Além disso, a partir dos estudos clássicos de cinética enzimática foram caracterizados aos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, sendo que no sistema onde não houve a presença do composto foram encontrados respectivamente 6,43 mM e $0,95 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína de K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Já no sistema com a presença do composto **7** os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram 5,57 mM e $0,71 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente. Somando-se a isto, é possível verificar que o composto **7** comporta-se como inibidor misto, sendo ilustrado a partir do gráfico de Lineweaver-Burk.

Logo, tanto o composto **6** quanto o composto **7** foram caracterizados como inibidores de perfil misto. Vale salientar que, diferente do perfil misto do composto **6** com a amilase, o composto **7** apresentou perfil misto mas sem preferência pelo estado de ligação, uma vez que os valores dos parâmetros cinéticos não foram inversamente proporcionais (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros cinéticos da atividade catalítica da α -glicosidase frente a ausência/presença do composto inibidor de curcumina.

	Parâmetros cinéticos			
	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}$ proteína)	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})	$V_{m\acute{a}x} / K_m$
Sem inibidor	0,95	6,43	47,5	0,14
7 (10 μM)	0,71	5,57	35,5	0,12
7 (20 μM)	0,56	5,79	28,0	0,09

Fonte: Autor, 2023.

De acordo com Liu e colaboradores (2021), quando o valor de $V_{m\acute{a}x}$ é constante com o aumento da concentração do ligante, enquanto o valor de K_m aumenta sugere um perfil de inibição competitiva. Por outro lado, quando a constante é o valor de K_m e o $V_{m\acute{a}x}$ é reduzido com o aumento do ligante, provavelmente o perfil de inibição é não competitiva (Kan *et al.*, 2021).

5.3.2 Estudos da capacidade antioxidante dos compostos análogos a curcumina

5.3.2.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-2-picrilidrazila (DPPH')

De forma geral, a curcumina apresenta sua capacidade como agente antioxidante, devido dois grupos presentes em sua estrutura, sendo as hidroxilas as quais pertencem os

grupos fenólicos, bem como o grupo central metileno. Seja pelo grupo metil ou fenólico, o mecanismo antioxidante deste composto está relacionado a doação do hidrogênio radicalar. Isto porque, a partir da formação dos radicais fenoxila, na subunidade fenol, os hidrogênios estão completamente disponíveis que, por ressonância no anel aromático, ocorre a estabilização do mesmo, mostrado na Tabela 5 (Sueth-Santiago *et al.*, 2015; Stanic, 2017). A partir do grupo metileno da curcumina, é possível originar um radical centrado em carbono. Isto porque o sítio da reação é compreendido pelo grupo CH₂, dicarbonílico, cuja ressonância ao efeito indutivo que é capaz de retirar os elétrons da vizinhança é mais fraca nas ligações CH (Stanic, 2017). Somando-se isto, a estabilidade do radical carbônico é menor quando comparado ao radical fenoxila, no entanto alguns estudos puderam compreender que há contribuições para a atividade antioxidante da curcumina por meio da dissociação do hidrogênio do grupo metileno. A partir disso, pode-se verificar que a curcumina é uma molécula-alvo com alta capacidade antioxidante, cujo potencial para combater diversas espécies de radicais livres nos organismos vivos.

Diante disso, foram realizados ensaios da capacidade antioxidantes dos compostos análogos a curcumina frente aos métodos clássicos de sequestros dos radicais DPPH• e ABST•⁺, sendo executadas a partir de curvas analíticas entre a concentração dos compostos versus o percentual de inibição. O sequestro do radical 2,2-difenil-2-picrilidrazila (DPPH•) é um método colorimétrico capaz de medir a capacidade antioxidante de alguns compostos por meio da simulação de espécies reativas. De início foi realizado um teste *screening* com concentração única de 2000 µM do composto para medir a capacidade antioxidante, sendo utilizado como controle positivo Trolox[®], quercetina e ácido ascórbico. Os resultados deste ensaio demonstraram que apenas os compostos análogos a curcumina **6**, **7** e **11** obtiveram maior do que 50% da sua atividade com a aplicação única da dose de 200 µM do composto. Além disso, o composto **6** apresentou ser o mais ativo em relação sua capacidade antioxidante frente aos demais compostos análogos a curcumina.

Tabela 5. Valores de percentual de consumo do radical e IC₅₀ dos inibidores padrões e compostos derivados de curcumina (**1** - **11**), pelo método de DPPH•. Nos estudos iniciais empregou-se concentração de 100 µM de cada composto.

Compostos	DPPH•	
	% de consumo do radical	IC ₅₀ (µM)
Trolox [®] (T)	92,20 ± 0,02	7,95 ± 0,02 ^a

Quercetina (Q)	97,90 ± 0,03	3,50 ± 0,03 ^b
Ácido ascórbico (AA)	95,60 ± 0,03	9,19 ± 0,03 ^a
Curcumina (CC)	89,40 ± 0,10	17,18 ± 0,61 ^c
1	11,40 ± 1,02	>100
2	14,60 ± 0,96	>100
3	18,20 ± 0,45	>100
4	15,50 ± 0,42	>100
5	15,70 ± 1,20	>100
6	74,50 ± 0,52	9,1 ± 3,1 ^d
7	54,60 ± 1,01	78,4 ± 1,18 ^e
8	48,70 ± 0,70	>100
9	45,20 ± 0,22	>100
10	39,20 ± 1,40	>100
11	52,10 ± 0,90	84,06 ± 0,69 ^f

Fonte: Autor, 2023.

Legenda: Teste estatístico ANOVA *one-way* ($\alpha = 0,05$) com pós-teste de *Tukey*. Letras iguais evidenciam que não houve diferença estatística significativa. AC: Acarbose; CC: curcumina.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, pode-se observar que os valores de IC₅₀ indicam que o composto análogo a curcumina mais ativo em relação sua atividade antioxidante é o composto **6**. Somando-se a isto, é possível perceber que o análogo a curcumina contendo o átomo de nitrogênio como grupo substituinte potencializou a atividade antioxidante frente aos demais análogos. Além disso, o composto **6** apresentou o IC₅₀ de atividade antioxidante (9,1 ± 3,1 µM) semelhante aos compostos padrões como o Trolox[®] (7,4 ± 2,5 µM), quercetina (7,9 ± 4,2 µM) e ácido ascórbico (8,2 ± 2,1 µM). É interessante observar que o composto **1** a qual não tinha grupo substituinte apresentou menor potencial de atividade antioxidante quando comparado aos demais compostos. Vale destacar que com base na estrutura química dos 11 compostos, todas as moléculas apresentam uma estrutura base comum representada pelos grupos β-dicetona ou seu tautômero ceto-enol e ligações duplos conjugado a qual contém uma das subunidades responsável pela sua atividade antioxidante. Por isso que todos os análogos apresentaram capacidade antioxidante mesmo que na presença de altas concentrações do composto como no caso dos compostos **1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9** e **10** com IC₅₀ > 100 µM.

5.3.2.2 Sequestro do radical ABTS^{•+}

Além do ensaio antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH[•], foi avaliado também pelo método do sequestro do radical ABTS^{•+}, cujo mecanismo é

atribuído a transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio levando em consideração as condições reacionais do meio assim como da estrutura do antioxidante. Os resultados deste estudo foram expressos em IC₅₀ na concentração de μM (Tabela 6).

Dentre os compostos análogos a curcumina avaliados, o composto **6** demonstrou ser o mais ativo referente sua capacidade como antioxidante, da mesma forma observado pelo método do sequestro do radical DPPH•.

Tabela 6. Valores de percentual de consumo do radical e IC₅₀ dos inibidores padrões e compostos derivados de curcumina (**1** - **11**), pelo método de ABTS^{•+}. Nos estudos iniciais empregou-se concentração de 200 μM de cada composto.

Compostos	ABTS ^{•+}	
	% de consumo do radical	IC ₅₀ (μM)
Trolox [®] (T)	88,50 ± 0,01	12,90 ± 0,12 ^a
Quercetina (Q)	87,70 ± 0,06	9,08 ± 0,04 ^b
Ácido ascórbico (AA)	92,20 ± 0,01	11,24 ± 0,01 ^a
Curcumina (CC)	82,60 ± 0,01	18,86 ± 0,64 ^c
1	22,10 ± 0,12	64,75 ± 1,48 ^d
2	24,60 ± 1,12	68,39 ± 0,08 ^e
3	21,10 ± 0,50	57,27 ± 0,78 ^f
4	25,20 ± 0,32	66,26 ± 0,45 ^{d,e}
5	25,10 ± 1,09	66,64 ± 1,19 ^{d,e}
6	67,40 ± 1,50	22,24 ± 0,07 ^f
7	39,20 ± 0,78	81,95 ± 0,53 ^g
8	36,40 ± 1,30	79,14 ± 0,06 ^h
9	39,80 ± 0,80	83,75 ± 1,27 ^g
10	32,40 ± 0,07	71,37 ± 0,44 ⁱ
11	40,60 ± 0,96	86,17 ± 0,84 ^j

Fonte: Autor, 2023.

Legenda: Teste estatístico ANOVA *one-way* ($\alpha = 0,05$) com pós-teste de *Tukey*. Letras iguais evidenciam que não houve diferença estatística significativa. CC: curcumina.

5.3.3 Estudos teóricos de *docking* molecular

No processo de rastreamento de moléculas biologicamente ativas é importante compreender que, em muitos casos, tanto a síntese quanto os estudos *in vitro* de muitos compostos orgânicos custam caro, além de não ser um trabalho rápido (Taha *et al.*, 2021). Diante do exposto, uma alternativa metodológica capaz de evitar esses gargalos é a aplicação de uma abordagem *in silico* (Ahmad *et al.*, 2009; Taha *et al.*, 2021; El-Azab *et al.*, 2021; Munir *et al.*, 2021). Sendo assim, uma técnica *in silico* amplamente aplicada é

o *docking* molecular, que se caracteriza na triagem de compostos biologicamente ativos baseados em estrutura, além de direcionar os modelos eficazes antes de sua síntese (Meng *et al.*, 2011; Ruyck *et al.*, 2016; Lavecchia; Giovanni, 2023).

O *docking* molecular auxilia na especificação de alvos sintéticos por meio da otimização de diferentes ligantes frente à proteína receptora, assim como, uma ferramenta que ajuda no entendimento das possíveis interações a nível molecular sendo uma ferramenta para dar suporte aos estudos experimentais (Taha *et al.*, 2021; Giovanni, 2023). Considerando-se este potencial, empregou-se o estudo de *docking* molecular dos compostos derivados de curcumina (**1-11**) com as macromoléculas α -amilase do pâncreas humano (PDB ID:1B2Y) e a α -glicosidase (PDB ID: 2QMJ) ambas complexadas com a acarbose. A bolsa de ligação (sítio ativo) de cada enzima onde a acarbose está complexada foi utilizada como referência, e os derivados curcumínicos **1 - 11** foram docados num raio de 10 Å. Além disso, utilizaram-se os valores mínimos de energia como base para as análises dos complexos ligante-proteína.

Inicialmente, realizou-se o *redocking* do ligante cocristalizado (arcabose), como método de validação dos parâmetros de encaixe especificados no algoritmo de entrada (*input*) para ambas as macromoléculas (acarbose e glicosidase). A partir dos resultados, pôde-se notar que o algoritmo de *docking* encontrou uma conformação para o ligante acarbose semelhante àquela observada na estrutura cristalográfica, demonstrado que os parâmetros de encaixe especificados no arquivo de entrada para o método, foram capazes de recuperar a estrutura e as interações do complexo. Além disso, no cálculo para ambas as biomoléculas se obteve moléculas com pose com RMSD abaixo de 2 Å do ligante cocristalizado, confirmando a robustez para o posterior *docking* dos derivados curcumínicos avaliados no trabalho.

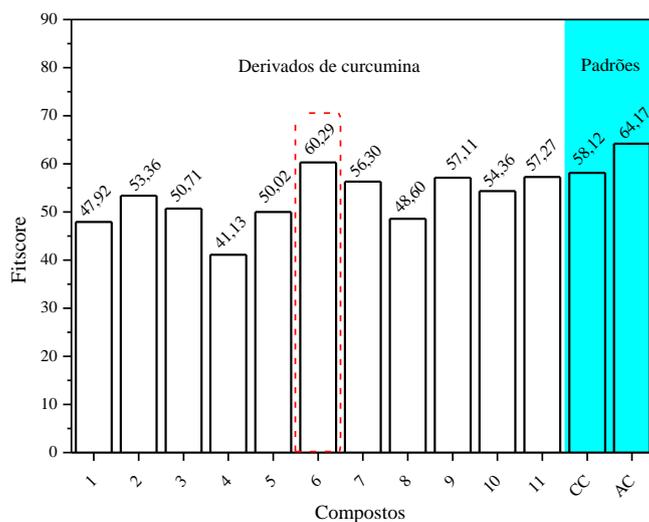
5.3.3.1 Estudos teóricos de *docking* molecular frente à α -amilase

Os complexos entre os derivados de curcumina e α -amilase acoplados foram investigados tendo em vista os valores de energia *fitscore* para a função de pontuação Goldscore. Diante do exposto, verificam-se que os derivados curcumínicos obtiveram valores de energia de ligação contra a α -amilase acima de 40 (Figura 13), sugerindo potencial ligação em relação a proteína avaliada (Giovanni, 2023). De acordo com valores

de energia *fitscore* para a função de pontuação Gold, verifica-se que o composto **6** foi o ligante mais ativo para α -amilase (60,29) entre os derivados testados.

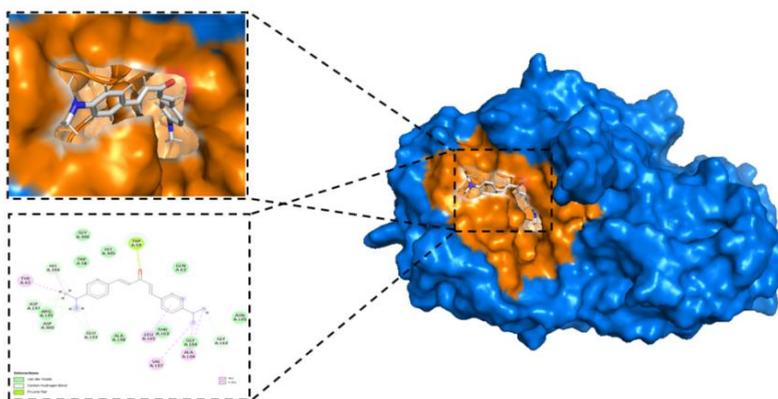
Todos os derivados de curcumina sintetizados tiveram o mesmo núcleo, disto, além derivados (**6**, **7** e **11**) apresentaram valores de energia próximo aos padrões (curcumina e acarbose). Logo, foi empregada a análise da relação proteína-ligante (*docking* molecular) a fim de avaliar a ligação na proteína-alvo. Vale salientar que o derivado **6** foi o mais ativo tanto nos estudos teóricos quanto na análise *in vitro*.

Figura 17. Gráfico de energia *fitscore* para a função de pontuação Gold score dos derivados de curcumina (**1-11**) frente α -amilase.



Fonte: Autor, 2023.

Figura 18. *Docking* molecular entre amilase (PDB ID:1B2Y) e composto **6** no sítio catalítico.



Fonte: Autor, 2023.

Ghosh e Rangan (2014) relataram a região do sítio catalítico da α -amilase, o qual serviu como base para os estudos com os derivados de curcumina. Em síntese, os

resultados da interação demonstram que o composto **6** se liga à região do sítio ativo da proteína-alvo, predominantemente por forças de *Van der Waals*, similar aos resultados observados nos estudos *in vitro* de supressão molecular e termodinâmico. Observa-se que **6** se liga aos resíduos de aminoácidos presentes na região do sítio ativo (ARG-195, HIS-299, TRP-58, GLY-306, HIS-305, GLN-63, THR-163, GLY-104, ASN-105) da α -amilase por forças de *Van der Waals*. Com base nos resultados dos estudos *in vitro*, os dados obtidos nos estudos teóricos, sugere-se que o composto **6** interage na região do sítio catalítico da α -amilase.

Recentemente, Saddique e colaboradores (2022) observaram moléculas contendo substituintes com grupos -OH, -CH₂, -Cl, -Br e -NH participaram eficazmente na inibição da enzima α -amilase, corroborando com os resultados do presente estudo, uma vez que **6** apresentou melhor resultado de inibição tanto nos estudos *in silico* quanto *in vitro*. Somando a isto, Nidhar e colaboradores (2022) também observaram que os derivados mais ativos frente a α -amilase foram compostos com grupos substituintes contendo átomos de nitrogênio, apresentando possibilidade de interagir via ligações de hidrogênio e de *Van der Waals* com aminoácidos no sítio ativo.

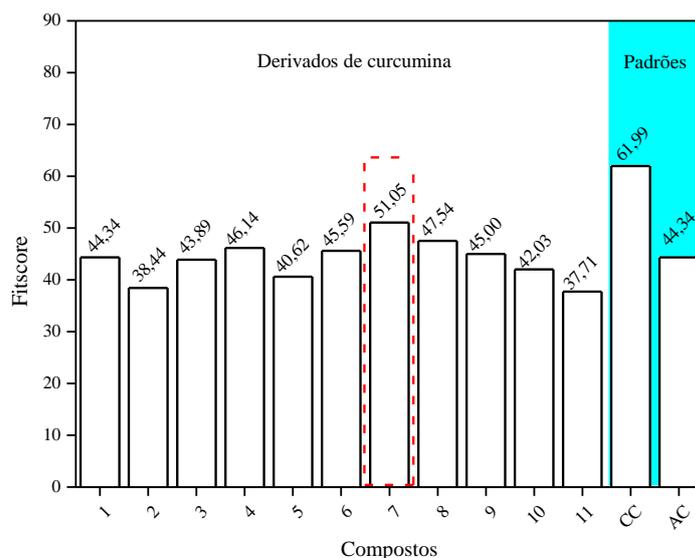
5.3.3.2 Estudos teóricos de docking molecular frente à α -glicosidase

De modo similar a α -amilase, foi analisada a interação dos derivados de curcumina (**1** - **11**) com a α -glicosidase levando em consideração os valores obtidos para a energia de *fitscore* para a função de pontuação Gold. Os compostos curcuminicos **4**, **6**, **7**, **8** e **9** apresentaram valores de *fitscore* entre os valores apresentados para os compostos padrões analisados (curcumina e acarbose) indicando potencial de ligação com a α -glicosidase (Figura 15). Baseado nos resultados encontrados para o *fitscore*, constatou-se que o composto **7** foi o ligante que apresentou o maior potencial de ligação (51,05) com a α -glicosidase em relação aos demais compostos avaliados.

Estudos recentes que avaliaram os valores de *fitscore* para possíveis ligantes com a enzima α -glicosidase observaram que compostos com substituintes -NH, -Br e -Cl exibem resultados destacados em estudos *in silico* e em *in vitro*, onde as principais interações ocorrem via forças de *Van der Waals* e ligações de hidrogênios (Saddique *et al.*, 2022; Nidhar *et al.*, 2022). Esse comportamento foi observado na presente pesquisa constatando assim a seguinte ordem de valores para *fitscore*: **7** > **8** > **4** > **6** > **9** > **1** > **3** > **10** > **5** > **2** > **11**. Nesta linha, o composto **4** que é similar ao **3**, porém é mais substituído

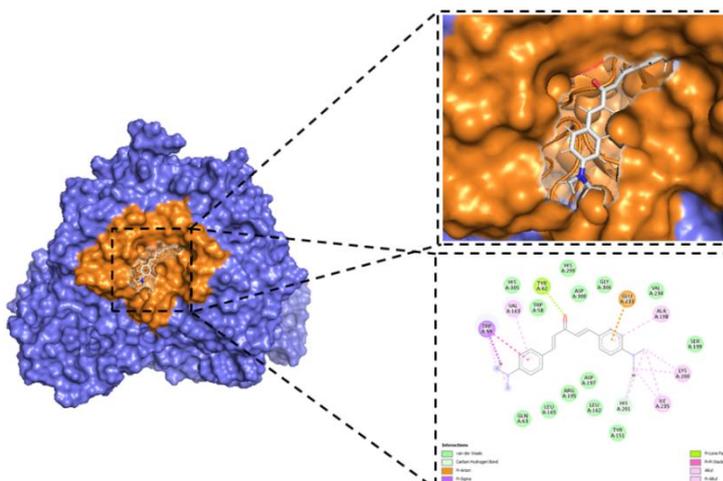
por grupo cloro apresentando um melhor valor de *fitscore*, por exemplo. No presente estudo o *docking* molecular foi realizado apenas com o derivado de curcumina **7** que apresentou o melhor valor de *fitscore* com o intuito de identificar os possíveis tipos de ligações e interações presentes entre o composto e a enzima (Figura 16).

Figura 19. Gráfico de energia *fitscore* para a função de pontuação Gold score dos derivados de curcumina (**1 - 11**) frente α -amilase.



Fonte: Autor, 2023.

Figura 20. *Docking* molecular entre α -glicosidase (PDB ID: 2QMJ) e composto 7.



Fonte: Autor, 2023.

Estudos recentes também puderam observar que a inserção de grupos retiradores de elétrons levam a derivados mais ativos frente a inibição enzimática da α -glicosidase

(Nidhar *et al.*, 2022; Kaur; Kaushal, 2023). O perfil de interação da α -glicosidase com derivados de curcumina, assim como os resultados *in vitro* revelaram que os compostos **7** > **8** > **4** > **6** > **9** têm potencial em inibir a atividade catalítica da α -glicosidase.

5.3.4 Estudos biofísicos *in vitro* do composto **6** frente a α -amilase

5.3.4.1 Supressão de fluorescência

A fluorescência molecular destaca-se entre as metodologias existentes para monitoramento de processos de interação proteína-ligante, uma vez que é caracterizada por ser altamente sensível, facilidade de implementação, bem como permite a realização dos experimentos sem que haja destruição das amostras experimentais (Wang *et al.*, 2022). A partir desta metodologia é possível inferir informações fundamentais para compreender melhor o mecanismo de interação entre a proteína e seu ligante, como mecanismo de *quenching* e os parâmetros termodinâmicos (Zhu *et al.*, 2021). Informações as quais podem inferir quais tipos de forças intermoleculares estão preferencialmente associadas no complexo proteína-ligante (Sun; Gidley; Warren, 2017).

Diante disso, foram realizados estudos de interação entre α -amilase e composto **6** empregando espectroscopia de fluorescência molecular como alternativa metodológica para compreender melhor o mecanismo de inibição da α -amilase pelo ligante análogo à curcumina. Logo, foi realizada uma titulação espectrofluorimétrica da enzima ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) frente ao ligante composto **6** ($0\text{-}110 \text{ }\mu\text{M}$). Sendo assim, os espectros de fluorescência entre a α -amilase na presença e ausência do composto **6** em diferentes temperaturas estão apresentados na Figura 21.

A partir da avaliação dos espectros, pode-se verificar que com a excitação em 280 nm a α -amilase apresentou uma banda intensa de fluorescência em 344 nm, sendo que com a adição de concentrações crescentes do composto **6** houve uma diminuição na intensidade da fluorescência da α -amilase. Isto indica que houve o mecanismo de *quenching*, devido a supressão da fluorescência (Zhu *et al.*, 2021). Além do que, a diminuição deste sinal de fluorescência é consequência da interação entre a α -amilase e composto **6**, de forma que houve mudança no microambiente dos resíduos de aminoácidos aromáticos presente na estrutura da enzima (Jiang *et al.*, 2021).

Além disso, com o intuito de investigar qual o mecanismo de *quenching* está

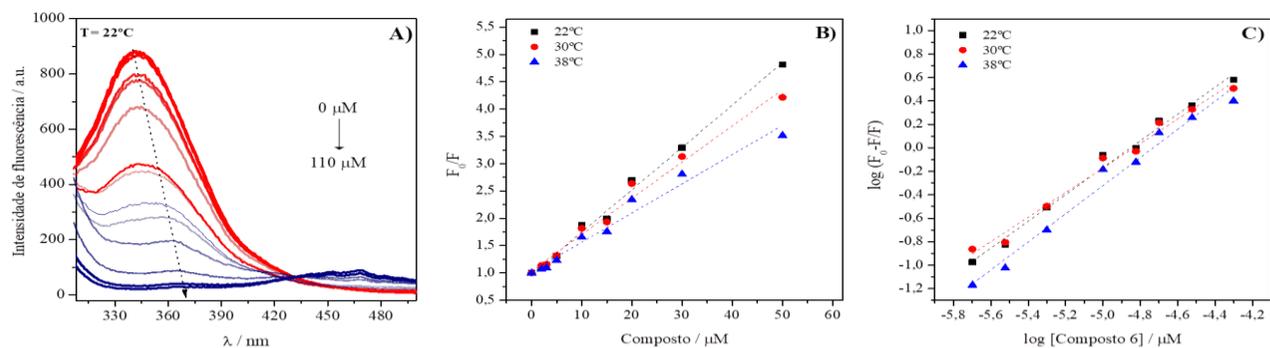
envolvido no processo de interação entre α -amilase com o composto **6** foram calculados os parâmetros de interação K_{sv} , K_q , K_b e n , valores estes apresentados na **Tabela 6**. A partir da tabela, pode-se verificar valores inversamente proporcionais entre a variação de temperatura versus valores de K_{sv} , a qual é caracterizado como um perfil indicativo do processo de *quenching* estático (Sun; Gidley; Warren, 2017). Além do valor de K_{sv} , o mecanismo de *quenching* também pode ser avaliado pelo valor da constante da taxa de extinção biomolecular (K_q), sendo que valores superiores à constante da taxa de difusão limitante de biomoléculas $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ é indicativo de *quenching* estático (Zhu *et al.*, 2021). Dessa forma, os valores de K_q obtidos nesta pesquisa variaram de 5,35 a $7,75 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$, dados estes no qual confirma que o *quenching* estático é mecanismo preferencial do processo de interação entre α -amilase com o composto **6**. Somando-se a isto, a partir da constante de ligação (K_b) foi avaliado a força de interação entre α -amilase com o composto **6**, no qual foi observado variação de 3,54 a $0,82 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com o intervalo de 22 a 38 °C, indicando que com o aumento da temperatura houve uma diminuição da afinidade do ligante com a α -amilase (Zhu *et al.*, 2022).

Além dos parâmetros de ligação, foram investigados os parâmetros termodinâmicos a fim de compreender as principais formas intermoleculares presente no complexo α -amilase com o composto **6**. Diante disso, foram calculados os valores de energia livre de Gibbs (ΔG), variação de entalpia (ΔH) e variação de entropia (ΔS), nos quais estão apresentados na Tabela 7.

Quando os valores de ΔH e ΔS são menores que zero é um indicativo de que preferencialmente o processo está associado por ligações de hidrogênios e forças de van der Waals. Entretanto, quando os valores de ΔH e ΔS são maiores que zero é um indicativo que as forças majoritárias presente no processo são de interações hidrofóbicas. Porém, quando o valor de ΔH é maior ou igual a 0 e ΔS for menor que 0 indica que as interações no processo ocorrem preferencialmente por forças eletrostáticas (Shamsi *et al.*, 2020).

Diante disso, é possível observar na Tabela 7 que as principais interações intermoleculares presente entre a α -amilase com o composto **6** são por ligações de hidrogênios e forças de van der Waals. Sendo assim, havendo similaridade com os estudos teóricos. Além disso, foi possível verificar que o processo de interação entre a enzima e o ligante foi termodinamicamente espontâneo tendo em vista que os valores de ΔG foram menores que zero, sendo -3,73 a -3,48 para o intervalo de temperatura de 22 a 38 °C.

Figura 21. Avaliação de supressão de fluorescência molecular entre α -amilase e composto 6, em diferentes temperaturas 22, 30 e 38°C. (A) Perfil espectral de emissão da α -amilase (1 U mL⁻¹) na presença de diferentes concentrações de composto 6 a pH 6,9 e 22 °C. (B) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (C) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



Fonte: Autor, 2023.

Tabela 7. Avaliação da interação entre α -amilase e o composto 6 por meio dos parâmetros de Stern-Volmer, ligação e termodinâmicos em diferentes temperaturas (22, 30 e 38°C) e pH 6,9.

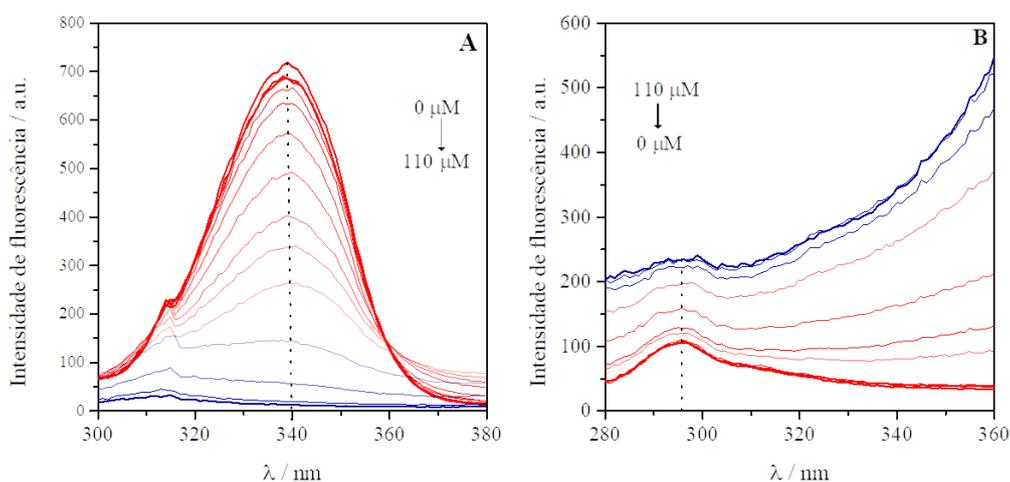
T (°C)	Parâmetro de Stern-Volmer			Parâmetro de ligação			Parâmetros termodinâmicos		
	K_{SV} (M ⁻¹)	r	K_q (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_b (M ⁻¹)	N	r	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹)
22	$7,75 (\pm 0,01) \times 10^4$	0,99717	$7,75 \times 10^{12}$	$3,54 (\pm 0,23) \times 10^5$	$1,14 (\pm 0,05)$	0,99499	-3,73		
30	$6,62 (\pm 0,01) \times 10^4$	0,99263	$6,62 \times 10^{12}$	$1,14 (\pm 0,25) \times 10^5$	$1,04 (\pm 0,05)$	0,99303	-3,61	-8,38	-15,71
38	$5,35 (\pm 0,01) \times 10^4$	0,98730	$5,35 \times 10^{12}$	$8,28 (\pm 0,45) \times 10^4$	$1,02 (\pm 0,09)$	0,98397	-3,48		

Fonte: Autor, 2023.

5.3.4.2 Espectroscopia de fluorescência síncrona

Foi possível realizar o monitoramento de forma separada dos resíduos de aminoácidos Trp e Tyr por meio de estudos de fluorescência sincronizada, com intuito de verificar, diante do processo de interação proteína-ligante, qual o microambiente foi mais afetado. Diante disso, foi necessário manter de forma constante o comprimento de onda entre os monocromadores de excitação e emissão, o qual foi selecionado para Tyr ($\Delta\lambda = 15$ nm) e para Trp ($\Delta\lambda = 60$ nm), representado na Figura 22.

Figura 22. Espectros de fluorescência sincronizada de α -amilase (1 U mL^{-1}) após adição de concentrações crescentes do composto 6 em pH 6,9, monitorando (A) $\Delta\lambda = 60$ nm (resíduos de Trp) e (B) $\Delta\lambda = 15$ nm (resíduos de Tyr).



Fonte: Autor, 2023.

A partir do empenho dos estudos de fluorescência sincronizada foi possível compreender mudanças conformacionais na estrutura tridimensional da α -amilase, tendo como pressuposto variações nos microambientes que, por sua vez, afeta o mecanismo de inibição. De acordo com a **Figura 22**, pode-se inferir que houve supressão de fluorescência com o aumento da concentração do composto 6. Somando-se a isto, estes resultados de fluorescência sincronizada capaz de monitorar os resíduos de Tyr e Trp corroboram com os dados obtidos pelos estudos de cinética enzimática clássica, a qual infere que o composto 6 atua como inibidor misto. Isto porque os resíduos de Tyr e Trp encontram-se distante do sítio catalítico da α -amilase.

5.3.4.3 Espectroscopia de fluorescência tridimensional (3D)

A ligação entre uma enzima e um ligante está constantemente relacionada a alterações estruturais na enzima possibilitando uma interação mais significativa no sítio catalítico (Zhan *et al.*, 2022). De acordo com Wang e colaboradores (2019), dentro das técnicas espectrofluorimétrica, o espectro de fluorescência tridimensional (3D) é capaz de obter informações sobre as alterações conformacionais na estrutura secundária da proteína. Diante disso, por meio do espectro de fluorescência 3D para a α -amilase livre e complexada com o composto 6, foi possível verificar a presença de três picos de intensidade de fluorescência (Figura 23).

Segundo Anigboro e colaboradores (2019), o pico 1 é caracterizado pelo mecanismo de espalhamento da radiação (*scattering Rayleigh*) pelo solvente, no qual compreende como o comprimento de onda de excitação sendo igual comprimento de onda de emissão ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$). Além disso, os aminoácidos aromáticos Trp e Try presente na estrutura da enzima são responsáveis pelo pico 2 e o correspondente à excitação de estados eletrônicos mais excitados dos aminoácidos aromáticos sendo responsável pelo pico 3 (Zheng *et al.*, 2020).

A partir da avaliação de mudanças conformacionais da α -amilase por meio da fluorescência tridimensional, pode-se verificar que houve mudança na sua estrutura tridimensional (Lu *et al.*, 2016). Isto porque a adição do composto 6 acarretou alterações no microambiente nos aminoácidos aromáticos, tendo em vista que houve a redução do sinal de fluorescência de aproximadamente 15% e 50% no pico 2 e 3, respectivamente.

De acordo com Mueller e colaboradores (2019), o deslocamento Stokes consiste na diferença de energia entre o ponto máximo do espectro de absorção e o máximo do espectro de emissão. Assim, outra possível forma de verificar se há mudança na estrutura nativa da proteína é por meio dos valores do deslocamento Stokes, uma vez que cada estrutura molecular apresenta absorção e emissão específica (Yu *et al.*, 2020).

Logo, neste estudo foi possível observar que houve o deslocamento de Stokes, no qual esse deslocamento fica mais evidente no pico 3 (tabela 8). Sugerindo que a alteração conformacional da molécula ocorreu preferencialmente na região da proximidade dos resíduos de Try (Sun *et al.*, 2023), corroborando com os estudos de fluorescência síncrona e os estudos por UV-vis.

Figura 23. O espectro de fluorescência 3D para (a) α -amilase livre e (b) complexada com composto 6, em pH . 6,9. Enzima e ligante foram utilizados em 1 U/mL e 10 μ M, respectivamente.

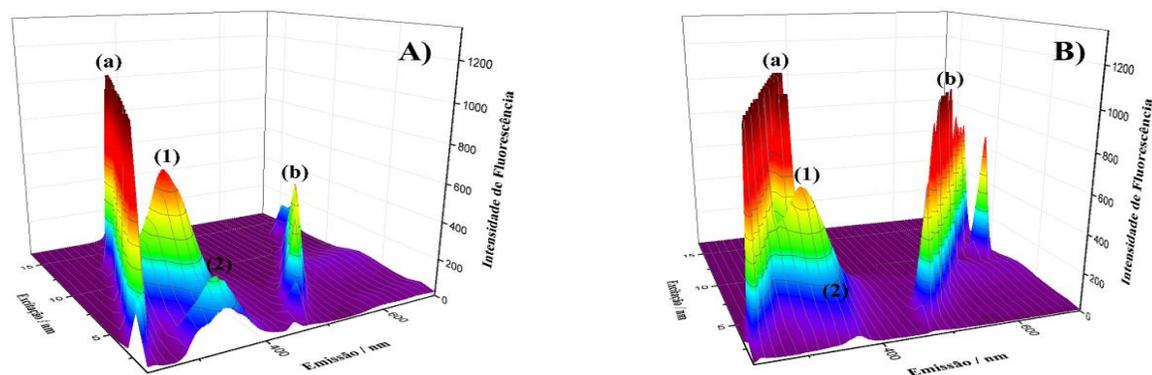


Tabela 8. Parâmetros de fluorescência tridimensional (3D) para α -amilase livre ou na presença do composto 6.

Picos	α -amilase			α -amilase-composto 6		
	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes ¹ $\Delta\lambda$ (nm)	<i>F</i> (u.a)	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	<i>F</i> (u.a)
1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	>1000
2	258,12 / 423,52	165,4	695,83 (100%)	258,46 / 423,52	165,06	593,93 (85,30%)
3	257,10 / 285,29	1,19	325,25 (100%)	260,51 / 312,95	286,44	159,98 (49,18%)

¹Deslocamento Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). ²Números entre parênteses representam a porcentagem relativa do sinal de fluorescência. Valores menores indicam maior variação em relação ao controle (α -amilase livre).

Fonte: Autor, 2023.

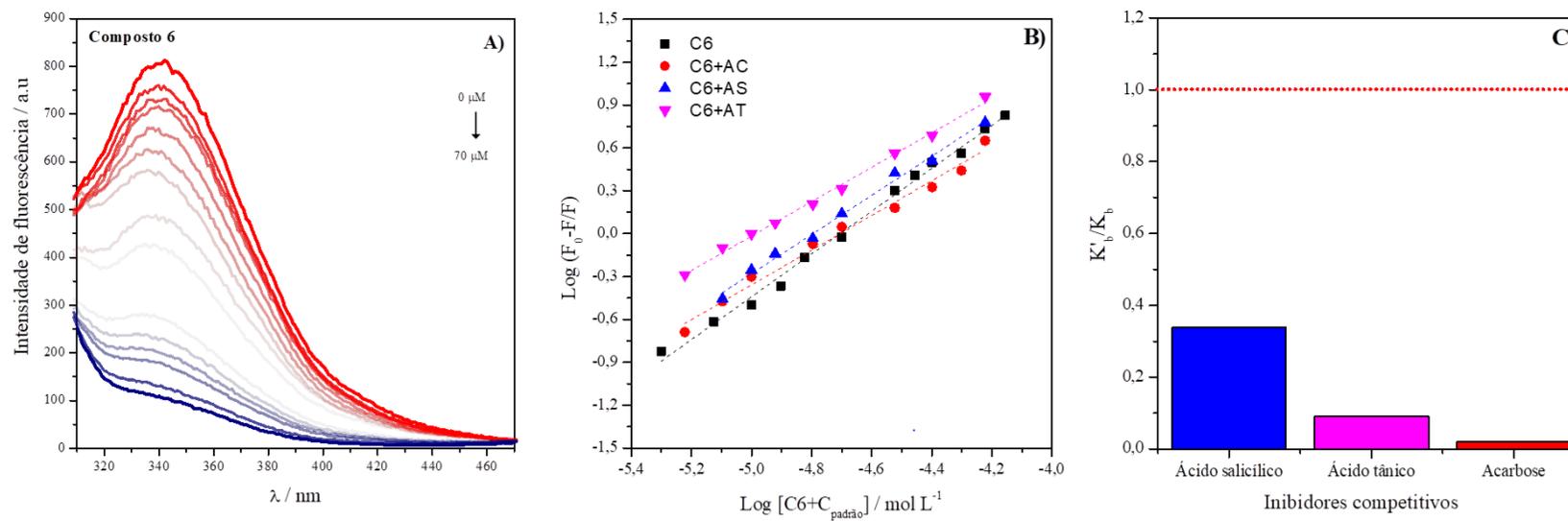
5.3.4.4 Estudos de competição

Empregou-se o estudo de competição entre o derivado de curcumina (composto 6) e α -amilase frente aos compostos inibidores de perfil competitivo como marcadores acarbose (Yang *et al.*, 2021), ácido tânico (Li *et al.*, 2013.) e ácido salicílico (Kaur; Gupta; Taggar, 2015), a fim de avaliar o sítio preferencial de ligação. Sendo assim, empregou-se uma titulação espectrofluorimétrica tanto na presença e na ausência dos inibidores competitivos usados como marcadores. Neste contexto, a avaliação do sítio preferencial de ligação foi verificada a partir da razão entre as constantes de ligação (K_b) na presença e na ausência dos competidores (K_b' / K_b), sendo que K_b' é a constante de ligação na presença do inibidor e K_b na ausência do competidor (Santana *et al.*, 2019).

O favorecimento, assim como o não favorecimento do complexo entre a enzima e o ligante frente aos marcadores foi avaliada por meio da razão K_b' / K_b . Ou seja, quando ocorre o favorecimento a razão K_b' / K_b é maior que 1, por outro lado, a razão K_b' / K_b é menor que 1, indicando desfavorecimento da formação do complexo devido à competição entre os ligantes e os inibidores clássicos possivelmente pela ligação no sítio ativo da enzima (Lage *et al.*, 2018).

Neste estudo foi possível observar que a constante de ligação diminuiu na presença dos inibidores ($K_b' / K_b < 1$) (Figura 24C) sugerindo que houve um desfavorecimento da formação do complexo devido à competição entre composto 6 (derivado de curcumina) e os inibidores clássicos (acarbose, ácido tânico e ácido salicílico), sendo a acarbose o inibidor competitivo que mais interferiu no complexo. A partir destes resultados, é possível sugerir que derivado de curcumina, composto 6, interage na região no sítio catalítico da α -amilase. Porém, é importante mencionar que não é possível diferenciar inibidores competitivos de inibidores mistos através deste estudo de competição (Braga *et al.*, 2019).

Figura 24. Estudo de competição frente à atividade catalítica da α -amilase. (A) perfil espectral de supressão de fluorescência do complexo α -amilase-composto 6; (B) curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação utilizando diferentes sistemas; (C) Razão entre as constantes de ligação do complexo α -amilase-composto 6 e o α -amilase-composto 6 com a adição possíveis compostos competidores.



Fonte: Autor, 2023.

Legenda: C6- Composto; C6+AC- Composto 6+ acarbose; C6+AS- Composto 6+ ácido salicílico; C6+AT- Composto 6+ ácido tânico.

5.3.4.5 Transferência de energia por ressonância de Först (FRET)

O presente estudo utilizou o processo de transferência de energia de ressonância Förster (FRET) para determinar a distância entre os resíduos de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) da α -amilase que apresenta o perfil de doador e o composto 6, derivado da curcumina, que se comporta como receptor. Essa distância (r_0) entre o receptor e doador foi determinada empregando a seguinte equação:

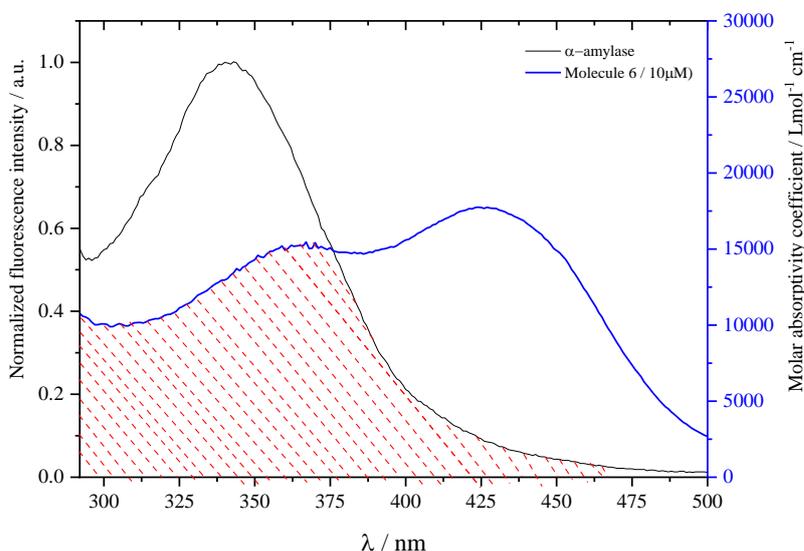
$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{Equação (7)}$$

onde, E consiste na eficiência de transferência de energia do doador para o receptor, F e F_0 são as intensidades de fluorescência da α -amilase na presença e ausência de receptor, respectivamente, e R_0 é definida com a distância crítica de Förster, quando 50% da energia de emissão do doador é transferida para o receptor (Borah; Sarkar; Duary, 2019). Além dessa equação que estabelece a relação R_0 com r_0 , E, F e F_0 , também foi possível estabelecer o valor de distância crítica por meio da seguinte equação:

$$R_0^6 = 8,79 \times 10^{-25} \times K^2 \times \Phi \times N^4 \times J(\lambda) \quad \text{Equação (8)}$$

em que, K^2 indica o fator de orientação espacial do dipolo formado entre o doador e o receptor, tendo um valor estabelecido de dois terços ($2/3$) para orientação aleatória em solução fluídas, o N está relacionado com o índice de refração médio do meio, neste caso da solução de α -amilase N é igual a 1,4, o Φ é o rendimento quântico do doador para a α -amilase (Lim; Ferruzzi; Hamaker, 2022), e J denota a área de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência normalizado do doador e em relação ao espectro de absorção do receptor (Figura 25).

Figura 25. Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da α -amilase (1 U mL^{-1}) que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular do composto 6 (10 e $20 \text{ }\mu\text{M}$) que atua como receptor em pH 6,9.



Fonte: Autor, 2023.

A sobreposição do espectro de emissão de fluorescência da α -amilase e do espectro de absorção do derivado de curcumina (composto 6) são apresentados na Figura 25. Vale salientar que houve uma padronização dos dados de acordo com os valores descritos por Avwioroko e colaboradores (2020), sendo $K^2 = 2/3$, $N = 1,40$ e $\Phi = 0,130$ para a α -amilase. Diante do exposto, a área de sobreposição (J) foi calculada pela equação (x):

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda) \times \varepsilon(\lambda) \times \lambda^4 \times d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) \times d\lambda} \quad \text{Equação (9)}$$

em que, $F(\lambda)$ está relacionada com a intensidade de fluorescência do doador no comprimento de onda avaliado (λ) e $\varepsilon(\lambda)$ é definido com o coeficiente de absorção molar do receptor, o qual pode ser obtido empregando a lei de Beer. Os valores apresentados de J , E , R_0 e r_0 para o complexo α -amilase-composto 6 a 25°C estão descritos na Tabela 9. De acordo com os resultados, a distância de ligação (r_0) entre a α -amilase e o derivado da curcumina (composto 6) foi $r_0 < 8 \text{ nm}$ e $0,5 R_0 < r_0 < 1,5 R_0$, indicando a extinção da fluorescência da α -amilase pelo composto 6 e que o processo de transferência de energia ocorreu sem radiação e com alta elevada probabilidade em decorrência do processo de interação.

Tabela 9. Parâmetros calculados relacionados ao processo de FRET quanto a interação entre α -amilase e composto **6**, avaliando em diferentes concentrações de composto inibidor.

6 (μM)	J ($10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$)	E (%)	R_0 (nm)	r_0 (nm)
10	$3,56 \times 10^9$	18,40	4,14	5,31
20	$3,68 \times 10^9$	50,80	4,17	4,14

Fonte: Autor, 2023.

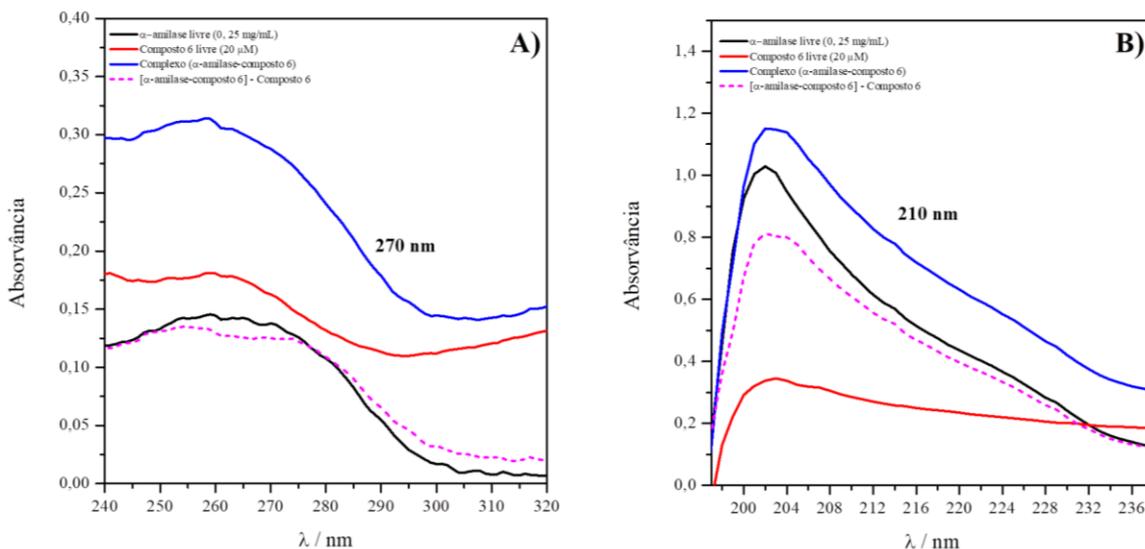
Outros estudos presentes na literatura também aplicaram o processo de transferência de energia de ressonância Förster (FRET) para avaliar a distância entre α -amilase e diferentes ligantes. Avwioroko e colaboradores (2020) trabalhou com as interações da α -amilase com três (3) ligantes dichalcogenoimidodifosfinato (ligante diselenoimidodifosfinato, ligante ditioimidodifosfinato e ligante tioselenoimidodifosfinato). Neste trabalho os valores referentes às distâncias de ligação (r_0) dos complexos enzima-composto variaram entre 1,86-3,31 nm, ou seja, $r_0 < 8$ nm em todos os sistemas. Além disso, nesses mesmos sistemas foi respeitada a condição de $0,5 R_0 < r_0 < 1,5R_0$.

Um estudo recente com aplicação do campo biológico investigou a distância de ligação entre α -amilase salivar humana (HSAm_y) e a molécula de sanguinarina, sendo os resultados obtidos para r_0 inferior a 4 nm e seguindo a hipótese de $0,5 R_0 < r_0 < 1,5R_0$ (Babatunde *et al.*, 2021). Diante do exposto, tanto os estudos de Avwioroko e colaboradores (2020) e Babatunde e colaboradores (2021) obtiveram resultados similares a esta pesquisa, cujo empregou a α -amilase como doador, sendo as distâncias de ligação (r_0) encontradas menores que 8 nm.

5.3.4.6 Medições de absorção UV-vis

Uma alternativa capaz de monitorar mudanças estruturais de proteínas é o estudo de espectroscopia por UV-vis (Tabassum, *et al.* 2012; Husain, *et al.* 2017). Além disso, através desta técnica é possível sugerir a respeito do tipo de mecanismo de quenching do processo de interação entre a enzima e o ligante (He *et al.*, 2016). Neste sentido, empregou-se espectroscopia por UV-vis para observar a formação do complexo α -amilase-composto **6**, assim como o mecanismo de *quenching* relativo a este processo de interação (Figura 26).

Figura 26. Espectros de absorção no UV-vis da α -amilase na ausência e presença do composto inibidor 6, em tampão fosfato de sódio em pH 6,9: (A) região 270 nm; (B) 210 nm.



Fonte: Autor, 2023.

Como resultado, verificou-se que houve mudança no espectro de absorção no UV-vis da α -amilase na ausência e presença do composto 6 (Figura 26), indicando que mecanismo de *quenching* é preferencialmente o estático, tendo em vista que houve mudança no espectro de absorção. Ou seja, alteração no estado fundamental da molécula, o qual corrobora com os resultados de espectroscopia de fluorescência molecular.

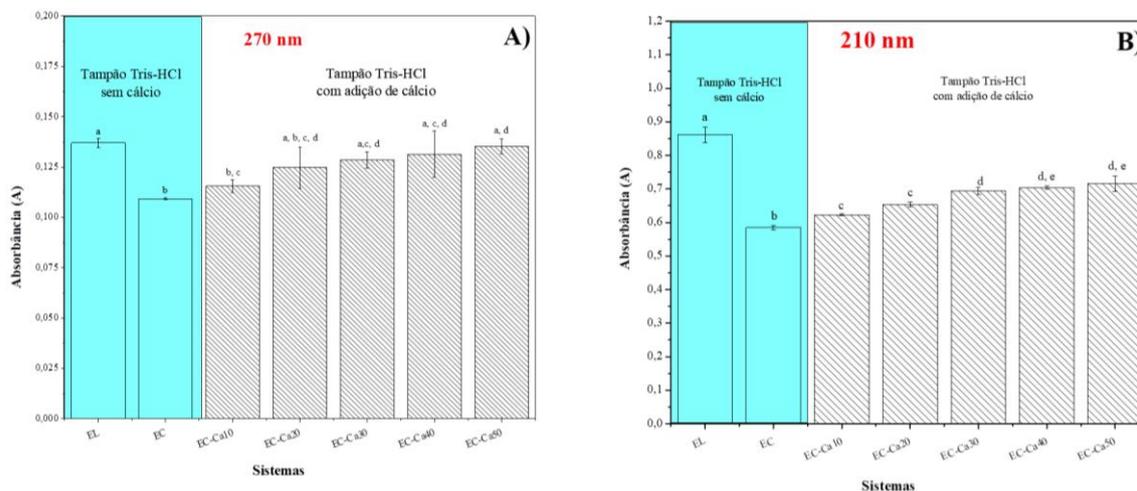
Observa-se essa evidência avaliando o espectro do sistema com a enzima livre, do composto livre e do complexo enzima-ligante, no qual será considerado como mecanismo de *quenching* estático quando o valor da absorbância do complexo for diferente do somatório a absorção da enzima mais o composto, e caso não ocorra mudança no espectro de absorção o mecanismo é considerado dinâmico. Com isso, é possível inferir que essas evidências indicam que houve interação entre o composto 6 e a α -amilase.

É importante compreender que caso o mecanismo de *quenching* fosse dinâmico, não haveria variações no espectro de UV-vis do complexo ($A_{\text{complexo}} = A_{\text{composto}} + A_{\text{amilase-composto 6}}$), uma vez que o *quenching* dinâmico afeta somente o estado excitado, e não o estado fundamental (Sahoo; Ghosh; Dasgupta, 2009; Wu, *et al.*, 2011).

Devido a diferença significativa entre os valores de IC_{50} dos compostos entre os sistemas tampões (Tris-HCl e fosfato de sódio), foram feitas medições espectrais de absorção no UV-vis da α -amilase em diferentes concentrações do cofator cálcio no sistema tampão Tris-

HCl, a fim de monitorar a influência do cofator cálcio no processo de interação entre α -amilase e o composto **6** (Figura 27).

Figura 27. Espectros de absorção no UV-vis da α -amilase em diferentes concentrações do cofator cálcio no sistema tampão Tris-HCl: (A) região 270 nm; (B) 210 nm.



Fonte: Autor, 2023.

Legenda: Teste estatístico ANOVA *one-way* ($\alpha = 0,05$) com pós-teste de *Tukey*. Letras iguais evidenciam que não houve diferença estatística significativa

Diante disso, foi possível verificar que a presença do cofator Cálcio no sistema tampão Tris-HCl influenciou no processo de interação entre a α -amilase e o composto **6**, visto que com o aumento da concentração do cálcio houve um aumento do espectro de absorção tanto na região próxima de 210 nm característico principalmente a estrutura alfa-hélice da proteína, quanto da região de 270 nm característico principalmente devido aos resíduos de aminoácidos aromáticos Tir e Trp (Yu *et al.*, 2014).

5.4 CONCLUSÕES E PESPECTIVAS

Foi avaliado o perfil de inibição do composto análogo a curcumina mais promissor frente às enzimas α -amilase e α -glicosidase, empregando estudos cinéticos clássicos, sendo caracterizado como tipo de inibição mista. Por conseguinte, foi avaliado a capacidade antioxidante dos derivados empregando ensaios baseados em sequestro de espécies radicalares (DPPH \cdot e ABTS \cdot +), no qual o composto 6 demonstrou ser mais promissor entre os derivados. Além disso, foi realizado estudo teórico de *docking* molecular utilizando derivados de curcumina frente potencial de inibição da α -amilase e α -glicosidase, demonstrando que o composto 6 e 7 foram os mais ativos frente a interação com as enzimas. E por fim, foi determinado os parâmetros de ligação e termodinâmicos e mudanças conformacionais na enzima devido a formação do complexo entre α -amilase e o composto 6. Como resultado, foi observado que o tipo de *quenching* foi estático, e as principais interações entre o composto 6 e a alfa-amilase foi por ligação de hidrogênio e van der waals.

Além disso, as principais perspectivas deste trabalho são a realização de estudos de inibição da glicação da hemoglobina. Por conseguinte, realizar estudos de citotoxicidade. Além de verificar o potencial antidiabético em modelos de camundongos diabéticos induzidos por alimentação, além de investigar o efeito dos compostos sobre as enzimas do estresse oxidativo, bem como a expressão de mediadores pró-inflamatórios.

REFERÊNCIAS

- AIKAELI, F. *et al.* Prevalence of microvascular and macrovascular complications of diabetes in newly diagnosed type 2 diabetes in low-and-middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. **PLOS Global Public Health**, v. 2, n. 6, p. e0000599, 2022.
- AJAHA, A. *et al.* Effect of 20-hydroxyecdysone, a phytoecdysteroid, on development, digestive, and detoxification enzyme activities of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 5, p. 18, 2019.
- ALBERTY, R. A. Relations between biochemical thermodynamics and biochemical kinetics. **Biophysical chemistry**, v. 124, n. 1, p. 11-17, 2006.
- AMATO, G. *et al.* Origanum heracleoticum Essential Oils: Chemical Composition, Phytotoxic and Alpha-Amylase Inhibitory Activities. **Plants**, v. 12, n. 4, p. 866, 2023.
- ANIGBORO, A. A. *et al.* Perfil fitoquímico, antioxidante, inibição de α -amilase, interação de ligação e estudos de docking de compostos bioativos de *Justicia carnea* com α -amilase. **Química Biofísica**, v. 269, p. 106529, 2021.
- AVWIOROKO, O. J. *et al.* Exploring the binding interactions of structurally diverse dichalcogenoimidodiphosphate ligands with α -amylase: Spectroscopic approach coupled with molecular docking. **Biochemistry and Biophysics Reports**, 24, 100837, 2020.
- AVWIOROKO, O. J. *et al.* α -Amylase inhibition, anti-glycation property and characterization of the binding interaction of citric acid with α -amylase using multiple spectroscopic, kinetics and molecular docking approaches. **Journal of Molecular Liquids**, v. 360, p. 119454, 2022.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes - A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019.
- BISSWANGER, H. **Enzyme kinetics: principles and methods**. John Wiley & Sons, 2017.
- BLANCO-LABRA, A.; ITURBE-CHINAS, F. A. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from *maize* (*Zea mays*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 1981.
- BLÉRIOT, Y.; AUBERGER, N.; DÉSIÉ, J. Sugar-Derived Amidines and Congeners: Structures, Glycosidase Inhibition and Applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 1271-1292, 2022.
- BONAVIDES, K. B. *et al.* Molecular identification of four different α -amylase inhibitors from *Baru* (*Dipteryx alata*) seeds with activity toward insect enzymes. **BMB Reports**, v. 40, n. 4, p. 494-500, 2007.

- BORAH, P. K.; SARKAR, A.; DUARY, R. K. Water-soluble vitamins for controlling starch digestion: Conformational scrambling and inhibition mechanism of human pancreatic α -amylase by ascorbic acid and folic acid. **Food chemistry**, v. 288, p. 395-404, 2019.
- BRADFUTE, S. B. History and impact of the mouse-adapted Ebola virus model. **Antiviral Research**, v. 210, p. 105493, 2023.
- BRAGA, T. C. *et al.* Ionic liquid-assisted synthesis of dihydropyrimidin (thi) one Biginelli adducts and investigation of their mechanism of urease inhibition. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 38, p. 15187-15200, 2019.
- CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **The lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239-2251, 2017
- CHAUDHURY, A. *et al.* Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. **Frontiers in endocrinology**, v. 8, p. 6, 2017.
- CHEN, K.; ARNOLD, F. H. Engineering new catalytic activities in enzymes. **Nature Catalysis**, v. 3, n. 3, p. 203-213, 2020.
- CHEN, S. *et al.* Pyrrole alkaloids and ergosterols from *Grifola frondosa* exert anti- α -glucosidase and anti-proliferative activities. **Journal of functional foods**, v. 43, p. 196-205, 2018.
- CHEN, S. *et al.* Pyrrole alkaloids and ergosterols from *Grifola frondosa* exert anti- α -glucosidase and anti-proliferative activities. **Journal of functional foods**, v. 43, p. 196-205, 2018.
- CONNERS, E. E. *et al.* Screening and testing for hepatitis B virus infection: CDC recommendations - United States, 2023. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 72, n. 1, p. 1, 2023.
- DAGAR, P.; MISHRA, A. Molecular modeling and *in vitro* studies of gedunin a potent alpha-amylase inhibitor and alpha-glucosidase inhibitor. **BioFactors**, 2022.
- DAGAR, P.; MISHRA, A. Molecular modeling and *in vitro* studies of gedunin a potent alpha-amylase inhibitor and alpha-glucosidase inhibitor. **BioFactors**, 2022.
- DAHAL, D. *et al.* *In Vitro* Studies on Alpha-amylase Inhibitory Activities of *Zanthoxylum armatum* of Mid-Western Regions of Nepal. **Amrit Research Journal**, v. 2, n. 01, p. 28-36, 2021.
- DARMAL, I. *et al.* Frequency of Type II Diabetes *Mellitus* in ST Segment Elevated MI patients presented to French Medical Institute for Mothers and Children: A Cross Section Study. **Journal of Medical Research and Health Sciences**, v. 5, n. 6, p. 2023-2038, 2022.
- DEVI, Meena *et al.* Design, synthesis, spectroscopic characterization, single crystal X-ray analysis, *in vitro* α -amylase inhibition assay, DPPH free radical evaluation and computational studies of naphtho [2, 3-d] imidazole-4, 9-dione appended 1, 2, 3-triazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 250, p. 115230, 2023.
- DIAS, S. C. *et al.* Molecular cloning and expression of an α -amylase inhibitor from rye with potential for controlling insect pests. **The Protein Journal**, v. 24, n. 2, p. 113-123, 2005.
- DRULA, E. *et al.* The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. **Nucleic acids research**, v. 50, n. D1, p. D571-D577, 2022.
- EL-AZAB, I.H.; EL-SHESHTAWY, H.S.; BAKR, R.B.; ELKANZI, N. New 1, 2, 3-Triazole-Containing Hybrids as Antitumor Candidates: Design, Click Reaction Synthesis, DFT Calculations, and Molecular Docking Study. **Molecules** **2021**, 26, 708.
- ENTEZARI, M. *et al.* AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: A pre-clinical and clinical investigation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112563, 2022.
- ETSASSALA, N. G. *et al.* Alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities of novel abietane diterpenes from *Salvia africana-lutea*. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 421, 2019.

- ETSASSALA, N. G. *et al.* Alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities of novel abietane diterpenes from *Salvia africana-lutea*. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 421, 2019.
- EZATI, M. *et al.* Design, synthesis, spectroscopic characterizations, antidiabetic, in silico and kinetic evaluation of novel curcumin-fused aldohexoses. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 285, p. 121806, 2023.
- FERREIRA, S. B. *et al.* Synthesis, biological activity, and molecular modeling studies of 1 h-1, 2, 3-triazole derivatives of carbohydrates as α -glucosidases inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2364-2375, 2010.
- FERREIRA, S. B. *et al.* Synthesis, biological activity, and molecular modeling studies of 1 h-1, 2, 3-triazole derivatives of carbohydrates as α -glucosidases inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2364-2375, 2010.
- FERRIS, R. L.; WESTRA, W. Oropharyngeal carcinoma with a special focus on hpv-related squamous cell carcinoma. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, p. 515-535, 2023.
- FONSECA, K. P.; RACHED, C. D. *Complicações do diabetes mellitus*. **International Journal of Health Management Review**, v. 5, n. 1, 2019. *Este t*
- FORETZ, M.; GUIGAS, B.; VIOLLET, B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 10, p. 569-589, 2019.
- FRANZIN, M. L. *et al.* Metarhizium Associated with Coffee Seedling Roots: Positive Effects on Plant Growth and Protection against Leucoptera coffeella. **Agriculture**, v. 12, n. 12, p. 2030, 2022.
- FURTUOSO, M. C. O.; BARROS, G. S. A.; GUILHOTO, J. J. M. O produto interno bruto do complexo agroindustrial brasileiro. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 36, n. 3, p. 9-32, 2019.
- GHADYALE, V. *et al.* Effective control of postprandial glucose level through inhibition of intestinal alpha glucosidase by *Cymbopogon martinii* (Roxb.). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- GHADYALE, V. *et al.* Effective control of postprandial glucose level through inhibition of intestinal alpha glucosidase by *Cymbopogon martinii* (Roxb.). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- GHANI, S. B. *et al.* The mitocidal activity of silver nanoparticles towards date palm mite (*Oligonychus afrasiaticus* (McGregor)): efficacy, selectivity, and risk assessment. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2022.
- GIRALDO, M. I.; GONZALEZ-OROZCO, M.; RAJSBAUM, R. Pathogenesis of Zika Virus Infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, p. 181-203, 2023
- GOLDBAUM, T. S. *et al.* Urgências em endocrinologia. In: **Endocrinologia e Metabologia**. Atheneu, 2022.
- GUERREIRO, L. R. *et al.* Five-membered iminocyclitol α -glucosidase inhibitors: synthetic, biological screening and in silico studies. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1911-1917, 2013.
- GUERREIRO, L. R. *et al.* Five-membered iminocyclitol α -glucosidase inhibitors: synthetic, biological screening and in silico studies. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1911-1917, 2013.
- HAYNES, B. F. *et al.* Strategies for HIV-1 vaccines that induce broadly neutralizing antibodies. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 3, p. 142-158, 2023.
- HOU, L. *et al.* A multicenter survey of type I diabetes mellitus in Chinese children. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 583114, 2021

- HUSNI, H. *et al.* The Level of Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867) Attack on Organic and Conventional Arabica Coffee Plantations at Several Altitudes. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 87, n. 2, p. 145-149, 2022.
- JADALLA, B. M. *et al.* *In vitro* alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities and antioxidant capacity of *Helichrysum cymosum* and *Helichrysum pandurifolium* Schrank constituents. **Separations**, v. 9, n. 8, p. 190, 2022.
- JADALLA, B. M. *et al.* *In vitro* alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities and antioxidant capacity of *Helichrysum cymosum* and *Helichrysum pandurifolium* Schrank constituents. **Separations**, v. 9, n. 8, p. 190, 2022.
- JIANG, MENG-YUAN *et al.* α -glucosidase inhibitory and anti-inflammatory coumestans from the roots of *Dolichos trilobus*. **Planta Medica**, v. 85, n. 02, p. 112-117, 2019.
- JIANG, Meng-Yuan *et al.* α -glucosidase inhibitory and anti-inflammatory coumestans from the roots of *Dolichos trilobus*. **Planta Medica**, v. 85, n. 02, p. 112-117, 2019.
- JIN, Z. *et al.* Potential global distribution of invasive alien species, *Anthonomus grandis* Boheman, under current and future climate using optimal MaxEnt Model. **Agriculture**, v. 12, n. 11, p. 1759, 2022.
- JÚNIOR, A. H. M. *et al.* Complications and Diagnosis of Diabetes *Mellitus*. **Amadeus International Multidisciplinary Journal**, v. 6, n. 12, p. 85-95, 2022.
- KARADE, S. S. *et al.* Structure-Based Design of Potent Iminosugar Inhibitors of Endoplasmic Reticulum α -Glucosidase I with Anti-SARS-CoV-2 Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 2744-2760, 2023.
- KARI, J. *et al.* An inverse Michaelis–Menten approach for interfacial enzyme kinetics. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 7, p. 4904-4914, 2017.
- KARRAY, A. *et al.* A proteinaceous alpha-amylase inhibitor from *Moringa oleifera* leaf extract: purification, characterization, and insecticide effects against *C. maculatus* insect larvae. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4222, 2022.
- KARRAY, A. *et al.* A proteinaceous alpha-amylase inhibitor from *Moringa oleifera* leaf extract: purification, characterization, and insecticide effects against *C. maculatus* insect larvae. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4222, 2022.
- KASAR, S. S. *et al.* Effect of α -amylase inhibitor from *Withania somnifera* on growth and development of *Callosobruchus chinensis* and *in silico* studies on its interactions with insect amylase. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 54, n. 5-6, p. 231-251, 2021.
- KASAR, S. S.; MAHESHWARI, V. L.; PAWAR, P. K. Bioactive α -Amylase Inhibitors: Sources, Mechanism of Action, Biochemical Characterization, and Applications. **Natural Products as Enzyme Inhibitors: An Industrial Perspective**, p. 59-104, 2022.
- KAUR, M.; KAUSHAL, R. Spectroscopic investigations, ab-initio DFT calculations, molecular docking and in-vitro assay studies of novel oxovanadium (V) chalcone complexes as potential antidiabetic agents. **Journal of Molecular Structure**, v. 1271, p. 133994, 2023.
- KAUR, R.; GUPTA, A. K.; TAGGAR, G. K. Characterisation and inhibition studies of *Helicoverpa armigera* (Hübner) gut α -amylase. **Pest management science**, v. 71, n. 9, p. 1228-1237, 2015.
- KAUR, S.; KAUR, K.; JINDAL, J. Status of phenolic metabolism and α -amylase inhibitor in maize under *Chilo partellus* infestation. **Cereal Research Communications**, p. 1-9, 2022.
- KAUSAR, S. *et al.* A review: Mechanism of action of antiviral drugs. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 35, p. 20587384211002621, 2021.

- KIM, J. H. *et al.* α -Glucosidase inhibition by prenylated and lavandulyl compounds from *Sophora flavescens* roots and in silico analysis. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 960-969, 2017.
- KIM, J. H. *et al.* α -Glucosidase inhibition by prenylated and lavandulyl compounds from *Sophora flavescens* roots and in silico analysis. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 960-969, 2017.
- KLEN, J.; DOLŽAN, V. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the management of type 2 diabetes mellitus and obesity: The impact of pharmacological properties and genetic factors. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 7, p. 3451, 2022.
- KUMAR, M. S.; JOGESWAR, P. Expression of plant α -amylase inhibitor (α AI) genes revealing bruchid resistance in legume crops. **Research Journal of Biotechnology** Vol, v. 15, p. 4, 2020.
- LAGE, T. C. A. *et al.* *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 5356-5366, fev. 2018.
- LAN, X. *et al.* A review of curcumin in food preservation: delivery system and photosensitization. **Food Chemistry**, p. 136464, 2023.
- Lavecchia, A.; Giovanni, C.D. Virtual screening strategies in drug discovery: A critical review. *Curr. Med. Chem.* **2013**, 20, 2839–2860.
- LEE, Soo-Kyung *et al.* Inhibitory activity of *Euonymus alatus* against alpha-glucosidase *in vitro* and *in vivo*. **Nutrition Research and Practice**, v. 1, n. 3, p. 184-188, 2007.
- LEE, Soo-Kyung *et al.* Inhibitory activity of *Euonymus alatus* against alpha-glucosidase *in vitro* and *in vivo*. **Nutrition Research and Practice**, v. 1, n. 3, p. 184-188, 2007.
- LI, W. *et al.* Binding interactions between protein and polyphenol decreases inhibitory activity of the polyphenol against α -amylase: A new insight into the effect of dietary components on starch-hydrolyzing enzyme inhibition. **Food Hydrocolloids**, v. 144, p. 109005, 2023.
- LI, X. *et al.* Multiple Roles of TRIM21 in Virus Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1683, 2023.
- LIEBESCHUETZ, J.W.; COLE, J.C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, 26, 737–748.
- LIM, J.; FERRUZZI, M. G.; HAMAKER, B. R. Structural requirements of flavonoids for the selective inhibition of α -amylase versus α -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 370, p. 130981, 2022.
- LIU, CHEN-HUA; KAO, JIA-HORNG. Acute hepatitis C virus infection: clinical update and remaining challenges. **Clinical and Molecular Hepatology**, 2023.
- LIU, F. *et al.* Phenolics from *Eugenia jambolana* seeds with advanced glycation endproduct formation and alpha-glucosidase inhibitory activities. **Food & function**, v. 9, n. 8, p. 4246-4254, 2018.
- LIU, Feifei *et al.* Phenolics from *Eugenia jambolana* seeds with advanced glycation endproduct formation and alpha-glucosidase inhibitory activities. **Food & function**, v. 9, n. 8, p. 4246-4254, 2018.
- LU, Q. *et al.* Investigation of the interaction between gallic Acid and α -amylase by spectroscopy. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 11, p. 2481-2494, 2016.
- MARADESHA, T. *et al.* Inhibitory effect of polyphenols from the whole green jackfruit flour against α -glucosidase, α -amylase, aldose reductase and glycation at multiple stages and their interaction: Inhibition kinetics and molecular simulations. **Molecules**, v. 27, n. 6, p. 1888, 2022.
- MATHU, R.; ABARNADEVIKA, A.; ARIHARASIVAKUMAR, G. A Study of Biguanides in the Care of Type II Diabetes Mellitus. **J Pharm Sci Drug Discov**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2021.

- MCINTYRE, H. D. *et al.* Gestational diabetes mellitus. **Nature reviews Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 47, 2019.
- MECHCHATE, H. *et al.* *In vitro* alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activity and *in vivo* antidiabetic activity of *Withania frutescens* L. Foliar extract. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 293, 2021.
- MECHCHATE, H. *et al.* *In vitro* alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activity and *in vivo* antidiabetic activity of *Withania frutescens* L. Foliar extract. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 293, 2021.
- MENG, X.-Y.; ZHANG, H.-X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2011**, 7, 146–157.
- MITTAL, A.; SINGH, A; BENJAKUL, S. α -amylase inhibitory activity of chitooligosaccharide from shrimp shell chitosan and its epigallocatechin gallate conjugate: kinetics, fluorescence quenching and structure–activity relationship. **Food chemistry**, v. 403, p. 134456, 2023.
- MUELLER, Stefan *et al.* A espectroscopia de fluorescência tridimensional multiquântica rápida desembaraça as vias quânticas. **Nature Communications** , v. 1, pág. 4735, 2019.
- MUGARANJA, K. P.; KULAL, A. Alpha glucosidase inhibition activity of phenolic fraction from *Simarouba glauca*: An in-vitro, in-silico and kinetic study. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04392, 2020.
- MUGARANJA, K. P.; KULAL, A. Alpha glucosidase inhibition activity of phenolic fraction from *Simarouba glauca*: An in-vitro, in-silico and kinetic study. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04392, 2020.
- MÜLLER, T. D. *et al.* Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). **Molecular metabolism**, v. 30, p. 72-130, 2019.
- MUNIR, R. *et al.* Microwave-Assisted Synthesis of (Piperidin-1-yl) quinolin-3-yl) methylene) hydrazinecarbothioamides as Potent Inhibitors of Cholinesterases: A Biochemical and In silico Approach. *Molecules* **2021**, 26, 656.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Medical microbiology** E-book. Elsevier Health Sciences, 2020.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2017.
- NIDHAR, M. *et al.* Design, synthesis and in-silico & *in vitro* enzymatic inhibition assays of pyrazole-chalcone derivatives as dual inhibitors of α -amylase & DPP-4 enzyme. **Chemical Papers**, v. 76, n. 3, p. 1707-1720, 2022.
- OLIVEIRA, G. *et al.* Effect of *Curcuma longa* L. Extract and Curcumin on Porcine Pancreatic α -Amylase Structure and Activity. **Food Biophysics**, p. 1-9, 2023.
- PALMER, W. H.; NORMAN, P J. The impact of HLA polymorphism on herpesvirus infection and disease. **Immunogenetics**, p. 1-17, 2023.
- PANDEY, A.; YADAV, R.; SANYAL, I. Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle. **Pest Management Science**, v. 78, n. 3, p. 855-868, 2022.
- PARK, Moo-Seok *et al.* Association of periodontitis with microvascular complications of diabetes mellitus: A nationwide cohort study. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 36, n. 2, p. 108107, 2022.
- PARKER, N. *et al.* **Microbiology** (OpenStax). OpenStax, 2016.
- PARRA, J. R. P.; COELHO, J. R. A. Insect rearing techniques for biological control programs, a component of sustainable agriculture in Brazil. **Insects**, v. 13, n. 1, p. 105, 2022.
- PICCIONI, A. *et al.* Gut Microbiota, LADA, and Type 1 Diabetes Mellitus: An Evolving Relationship. **Biomedicines**, v. 11, n. 3, p. 707, 2023.

- PRASAD, A. R. *et al.* Highly selective inhibition of α -glucosidase by green synthesised ZnO nanoparticles-In-vitro screening and in-silico docking studies. **International journal of biological macromolecules**, v. 139, p. 712-718, 2019.
- PRASAD, A. R. *et al.* Highly selective inhibition of α -glucosidase by green synthesised ZnO nanoparticles-In-vitro screening and in-silico docking studies. **International journal of biological macromolecules**, v. 139, p. 712-718, 2019.
- RAHIM, F. *et al.* Synthesis, *in vitro* alpha-glucosidase inhibitory potential of benzimidazole bearing bis-Schiff bases and their molecular docking study. **Bioorganic chemistry**, v. 94, p. 103394, 2020.
- RAHIM, F. *et al.* Synthesis, *in vitro* alpha-glucosidase inhibitory potential of benzimidazole bearing bis-Schiff bases and their molecular docking study. **Bioorganic chemistry**, v. 94, p. 103394, 2020.
- REIS, J. P. L. De Imhotep às Sulfonilureias. Uma história Brevíssima da Diabetes Mellitus. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 14, n. 3, p. 131-136, 2019.
- RUYCK, J.D. *et al.* Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* **2016**, 9, 1–11.
- SABBAH, D.A. *et al.* N-phenyl-6-chloro-4-hydroxy-2-quinolone-3-carboxamides: Molecular Docking, Synthesis, and Biological Investigation as Anticancer Agents. *Molecules* **2021**, 26, 73.
- SACHAN, A. K.; RAO, Ch V.; SACHAN, N. K. *In vitro* studies on the inhibition of α -amylase and α -glucosidase by hydro-ethanolic extract of *Pluchea lanceolata*, *Alhagi pseudalhagi*, *Caesalpinia bonduc*. **Pharmacognosy Research**, v. 11, n. 3, 2019.
- SACHAN, A. K.; RAO, Ch V.; SACHAN, N. K. *In vitro* studies on the inhibition of α -amylase and α -glucosidase by hydro-ethanolic extract of *Pluchea lanceolata*, *Alhagi pseudalhagi*, *Caesalpinia bonduc*. **Pharmacognosy Research**, v. 11, n. 3, 2019.
- SADDIQUE, F. A. *et al.* Alpha-glucosidase inhibition and molecular docking studies of 1, 2-benzothiazine 1, 1-dioxide based carbohydrazides. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, 2019.
- SADDIQUE, F. A. *et al.* Alpha-glucosidase inhibition and molecular docking studies of 1, 2-benzothiazine 1, 1-dioxide based carbohydrazides. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, 2019.
- SAEED, M. B.; LAING, M. D. Biocontrol of Maize Weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (*Coleoptera: Curculionidae*), in Maize over a Six-Month Storage Period. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1261, 2023.
- SALEEM, F. *et al.* Dicyanoanilines as potential and dual inhibitors of α -amylase and α -glucosidase enzymes: synthesis, characterization, *in vitro*, in silico, and kinetics studies. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 103651, 2022.
- SANTANA, C. C. *et al.* Evaluation of guanylhydrazone derivatives as inhibitors of *Candida rugosa* digestive lipase: Biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 169-180, jun. 2019.
- SARMADI, B. *et al.* Hypoglycemic effects of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. **Food chemistry**, v. 134, n. 2, p. 905-911, 2012.
- SARMADI, B. *et al.* Hypoglycemic effects of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. **Food chemistry**, v. 134, n. 2, p. 905-911, 2012.
- SAYCE, A. C. *et al.* Iminosugars inhibit dengue virus production via inhibition of ER alpha-glucosidases—not glycolipid processing enzymes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004524, 2016.
- SELLERGREEN, B. Shaping enzyme inhibitors. **Nature Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 7-8, 2010.

- SHEN, H. *et al.* Structure-activity relationships and the underlying mechanism of α -amylase inhibition by hyperoside and quercetin: Multi-spectroscopy and molecular docking analyses. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 285, p. 121797, 2023.
- SILVA, G. O. S.; DIAS, C. A. P.; PEREIRA, S. G. Crédito rural no Brasil: estudo sobre as perspectivas de taxa de juros entre as cooperativas de crédito versus instituições bancárias. **ALTUS CIÊNCIA**, v. 17, n. 17, p. 192-209, 2023.
- STERLING, J. C. Viral infections. **Rook's Textbook of Dermatology, Ninth Edition**, p. 1-124, 2016.
- SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. *In vitro* α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta biochimica polonica**, v. 55, n. 2, p. 391-398, 2008.
- SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. *In vitro* α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta biochimica polonica**, v. 55, n. 2, p. 391-398, 2008.
- SUN, Y *et al.* Mechanistic study on the inhibition of α -amylase and α -glucosidase using the extract of ultrasound-treated coffee leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2023.
- SUN, Y. *et al.* Estudo mecanístico da inibição de α -amilase e α -glicosidase utilizando extrato de folhas de café tratadas com ultrassom. **Jornal da Ciência da Alimentação e Agricultura**, 2023.
- SUZUKI, Y. Interferon-induced restriction of Chikungunya virus infection. **Antiviral Research**, v. 210, p. 105487, 2023.
- TAHA, M. *et al.* Synthesis of novel triazinoindole-based thiourea hybrid: A study on α -glucosidase inhibitors and their molecular docking. **Molecules** **2019**, *24*, 3819.
- TAKUISSU, G. R. *et al.* Occurrence of Hepatitis A Virus in Water Matrices: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 2, p. 1054, 2023.
- TEAGUE, M. *et al.* Use and Interchange of Incretin Mimetics in the Treatment of Metabolic Diseases: A Narrative Review. **Clinical Therapeutics**, 2023.
- TELI, P. *et al.* Imidazole derivatives: Impact and prospects in antiviral drug discovery. **Imidazole-Based Drug Discov**, p. 167-193, 2022.
- TITARENKO, E.; CHRISPPEELS, M. J. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 10, p. 979-990, 2000.
- TOMIC, D.; SHAW, J. E.; MAGLIANO, D. J. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 18, n. 9, p. 525-539, 2022.
- UNGER, J. M. *et al.* Risk prediction of hepatitis B or C or HIV among newly diagnosed cancer patients. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, p. djad053, 2023.
- VALENCIA, A. *et al.* α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 3, p. 207-213, 2000.
- VINHOLES, J.; VIZZOTTO, M. Synergisms in alpha-glucosidase inhibition and antioxidant activity of camellia sinensis l. kuntze and eugenia uniflora l. ethanolic extracts. **Pharmacognosy research**, v. 9, n. 1, p. 101, 2017.
- VINHOLES, J.; VIZZOTTO, M. Synergisms in alpha-glucosidase inhibition and antioxidant activity of camellia sinensis l. kuntze and eugenia uniflora l. ethanolic extracts. **Pharmacognosy research**, v. 9, n. 1, p. 101, 2017.

- VONGSAK, B. *et al.* *In vitro* alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 445-450, 2015.
- VONGSAK, B. *et al.* *In vitro* alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 445-450, 2015.
- VONIA, S.; HARTATI, R.; INSANU, M. *In Vitro* Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity and the Isolation of Luteolin from the Flower of *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip ex Walp. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 2132, 2022.
- VONIA, S.; HARTATI, R.; INSANU, M. *In Vitro* Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity and the Isolation of Luteolin from the Flower of *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip ex Walp. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 2132, 2022.
- WANG, H. *et al.* Mecanismo de interação do ácido carnósico contra a glicosidase (α -amilase e α -glucosidase). *Jornal internacional de macromoléculas biológicas*, 138, 846-853, 2019.
- WANG, Yi-Fan *et al.* Diels–Alder type adducts with potent alpha-glucosidase inhibitory activity from *Morus macroura*. **Phytochemistry Letters**, v. 26, p. 149-153, 2018.
- WANG, Yi-Fan *et al.* Diels–Alder type adducts with potent alpha-glucosidase inhibitory activity from *Morus macroura*. **Phytochemistry Letters**, v. 26, p. 149-153, 2018.
- WAROWICKA, A.; NAWROT, R.; GOŹDZICKA-JÓZEPIAK, A. Antiviral activity of berberine. **Archives of virology**, v. 165, p. 1935-1945, 2020.
- WONGNAWA, M. *et al.* Alpha-glucosidase inhibitory effect and inorganic constituents of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. ash. **Songklanakarín Journal of Science & Technology**, v. 36, n. 5, 2014.
- WONGNAWA, M. *et al.* Alpha-glucosidase inhibitory effect and inorganic constituents of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. ash. **Songklanakarín Journal of Science & Technology**, v. 36, n. 5, 2014.
- YAMASAKI, M. *et al.* Characterization of Sialic Acid-Independent Simian Rotavirus Mutants in Viral Infection and Pathogenesis. **Journal of Virology**, p. e01397-22, 2023.
- YAN, S. *et al.* Non-extractable polyphenols of green tea and their antioxidant, anti- α -glucosidase capacity, and release during *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 42, p. 129-136, 2018.
- YAN, S. *et al.* Non-extractable polyphenols of green tea and their antioxidant, anti- α -glucosidase capacity, and release during *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 42, p. 129-136, 2018.
- YANG, H. K. *et al.* Acarbose add-on therapy in patients with type 2 diabetes mellitus with metformin and sitagliptin failure: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 43, n. 3, p. 287-301, 2019.
- YANG, J. *et al.* Inhibition mechanism of α -amylase/ α -glucosidase by silibinin, its synergism with acarbose, and the effect of milk proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 36, p. 10515-10526, 2021.
- YU, J. *et al.* Espectroscopia de fluorescência com matriz de excitação-emissão (EEM) para caracterização de matéria orgânica em biorreatores de membrana: Princípios, métodos e aplicações. **Fronteiras da Ciência e Engenharia Ambiental**, v. 1-19, 2020.
- ZAHARUDIN, N.; STAERK, D.; DRAGSTED, L. O. Inhibition of α -glucosidase activity by selected edible seaweeds and fucoxanthin. **Food Chemistry**, v. 270, p. 481-486, 2019.
- ZAHARUDIN, N.; STAERK, D.; DRAGSTED, L. O. Inhibition of α -glucosidase activity by selected edible seaweeds and fucoxanthin. **Food Chemistry**, v. 270, p. 481-486, 2019.

ZHAN, H. *et al.* Inhibitory effects of a low-molecular-weight sulfated fucose-containing saccharide on α -amylase and α -glucosidase prepared from ascophyllan. **Food & Function**, v. 13, n. 3, p. 1119-1132, 2022.

ZHANG, LING-LING *et al.* The mechanism of interactions between flavan-3-ols against α -glucosidase and their *in vivo* antihyperglycemic effects. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 364-372, 2019.

ZHANG, Ling-Ling *et al.* The mechanism of interactions between flavan-3-ols against α -glucosidase and their *in vivo* antihyperglycemic effects. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 364-372, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Frustration and the Kinetic Repartitioning Mechanism of Substrate Inhibition in Enzyme Catalysis. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 126, n. 36, p. 6792-6801, 2022.

ZHENG, Yuxue *et al.* Mecanismo de inibição do ácido ferúlico contra α -amilase e α -glucosidase. **Química de Alimentos**, v. 317, pág. 126346, 2020.

APÊNDICE

Apêndice A – Influência do sistema tampão no IC₅₀ da atividade catalítica da α -amilase em diferentes concentrações da enzima, pré-incubado a 24 °C durante 10 min, utilizando acarbose como composto inibidor.

Concentração da enzima (U·mL ⁻¹)	IC ₅₀ (μM)	
	Tampão fosfato (20 mM)	Tampão Tris (50 mM) com CaCl ₂ (10 mM)
2	182,2 ± 0,01 ^a	333,53 ± 0,7 ^a
1	175,1 ± 0,02 ^b	278,42 ± 1,3 ^b
0,5	163,2 ± 0,02 ^c	249,13 ± 2,2 ^c

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Apêndice B – Teste de inibição da α -glicosidase utilizando acarbose como inibidor em diferentes concentrações de enzima e composto inibidor.

Concentração de enzima (U mL ⁻¹)	Inibição (%)	
	AC (150 μg mL ⁻¹)	AC (300 μg mL ⁻¹)
0,01	58,23 ± 2,21 ^a	74,89 ± 0,83 ^{aa}
0,02	45,96 ± 0,40 ^b	67,65 ± 2,31 ^{ba}
0,05	36,43 ± 3,23 ^c	57,75 ± 5,27 ^c
0,10	9,37 ± 1,89 ^d	34,13 ± 1,15 ^d

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

