



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Polímeros Molecularmente Impressos à base de Flavonóides
para entrega de Fármacos para a doença de Alzheimer**

Pedro Samuel Benedito Domingos Muria

Orientador(es) | Elisabete Carreiro
Ana Rodrigues Costa

Évora 2025





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Polímeros Molecularmente Impressos à base de Flavonóides
para entrega de Fármacos para a doença de Alzheimer**

Pedro Samuel Benedito Domingos Muria

Orientador(es) | Elisabete Carreiro
Ana Rodrigues Costa

Évora 2025



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora)

Vogais | António Paulo Teixeira (Universidade de Évora) (Arguente)
Elisabete Carreiro (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

Manifesto meu sincero agradecimento ao Departamento de Química e Bioquímica da Escola de Ciências e Tecnologias da Universidade de Évora, pelo acolhimento como aluno de mestrado em Bioquímica.

Agradeço à minha orientadora Doutora Elisabete Palma Carreiro, por me ter recebido como orientando, pela sugestão do tema desta dissertação, pelo apoio, pela disponibilidade e dedicação, pela compreensão nas limitações que tive e pela paciência principalmente nos momentos que eu ficava desapontado com algumas sínteses nas várias etapas deste trabalho. Manifesto meu sincero reconhecimento pelos ensinamentos ministrados e pela amizade que me dispensou no decorrer deste período da dissertação.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Ana Rodrigues Costa, pelo apoio, pela dedicação na orientação deste trabalho, pela paciência no esclarecimento de dúvidas e pelos ensinamentos nos testes de viabilidade celular e no tratamento de resultados.

A Doutora Carolina Marques pelas palavras de carinho e de motivação no decorrer dos trabalhos de síntese no laboratório 029, quando eu ficava desapontado por um resultado inesperado. Muito obrigado

Agradeço ao Diogo Frazão Velez pelo apoio prestado nos ensaios bioquímicos, apoio nos tratamentos de resultados e pelas palavras de carinho durante o percurso deste trabalho. Agradeço pelos momentos de descontração com o belíssimo tema de José Pinhal “*Tu És a Que Eu Quero (Tu não Prendas o Cabelo)*”.

À D. Esperança, funcionária do laboratório bloco A, pelo apoio prestado na limpeza e lavagem do material.

À D. Deolinda, funcionária do laboratório bloco A, pelo apoio na preparação de solução tampão fosfato salino, na limpeza, lavagem e armazenamento do material.

Apoios

Este projeto de dissertação de mestrado foi apoiado através do projeto estratégico atribuído ao LAQV-Universidade de Évora UIDB/50006/2020 | UIDP/50006/2020, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)/ Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através de fundos nacionais.



Resumo

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver um novo sistema de entrega de fármacos (SEFs) para o donepezilo, usado no tratamento da doença de Alzheimer. Este SEFs deve possuir reconhecimento molecular para o donepezilo, proporcionando uma libertação sustentada e apresentar propriedades neuroprotetora e antioxidante. Para isso sintetizaram-se e caracterizaram-se derivados de quercetina, o 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (**3**) e 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**5**), que foram utilizados como monómeros funcionais para a síntese de partículas poliméricas molecularmente impressas (MIPs) seletivas para o donepezilo. Os MIPs mais promissores apresentaram capacidade de adsorção de donepezilo de 39 mg/g. Estes polímeros foram avaliados quanto à sua capacidade inibitória de colinesterases, degradação enzimática e citotoxicidade, revelando fraca capacidade inibitória, baixa biodegradabilidade, e ausência de citotoxicidade. O MIP à base do monómero **5** revelou uma libertação controlada de donepezilo, de aproximadamente 98% após 4 dias a pH=7. Estas características conferem a este polímero um elevado potencial para aplicação como SEFs do donepezilo.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; Entrega de fármacos; Quercetina; Donepezilo; Polímeros molecularmente impressos.

Flavonoid-based Molecularly Imprinted Polymer for Drug Delivery: Alzheimer's Disease

Abstract

The aim of this study was to develop a new drug delivery system (DDS) for donepezil, used in the treatment of Alzheimer's disease. These DDS must have molecular recognition for donepezil, providing sustained release, and have neuroprotective and antioxidant properties. To this end, quercetin derivatives, 7-acryloxy-3',4',3,5-tetracetylquercetin (**3**) and 3-acryloxy-3',4',5,7-tetramethylquercetin (**5**), were synthesized and characterized and used as functional monomers for the synthesis of molecularly imprinted polymeric particles (MIPs) selective for donepezil. The most promising MIPs showed a donepezil adsorption capacity of 39 mg/g. These polymers were evaluated for their cholinesterase inhibitory capacity, enzymatic degradation and cytotoxicity, revealing poor inhibitory capacity, low biodegradability and no cytotoxicity. The MIP based on monomer **5** showed a controlled release of donepezil, reaching approximately 98% after 4 days at pH=7. These characteristics give this polymer high potential for application as donepezil DDS.

Keywords: Alzheimer's disease; Drug delivery; Quercetin; Donepezil; Molecularly imprinted polymers.

Índice

Agradecimentos.....	i
Apoios.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas	ix
Índice de Esquemas	ix
Lista de Abreviaturas	x
1 Introdução	1
1.1 Doença de Alzheimer	1
1.2 Fisiopatologia da Doença de Alzheimer	1
1.2.1 Hipótese Colinérgica	2
1.2.2 Hipótese β -amilóide.....	4
1.2.3 Outras Hipóteses	5
1.3 Fármacos atuais para terapia de DA e suas limitações	6
1.4 Sistema de Entrega de Fármacos	8
1.5 Polímeros Molecularmente Impressos	10
1.5.1 Monómeros funcionais.....	11
1.5.2 Agentes de ligação cruzada “Crosslinkers”	12
1.5.3 Métodos de polimerização	13
1.6 Flavonóides: Quercetina	14
1.7 A utilização de linhas celulares na avaliação de citotoxicidade	16
2 Parte Experimental.....	20
2.1 Síntese e caracterização de monómeros funcionais à base de quercetina.....	21
2.1.1 Síntese da 3',4',3,5,7-pentacetilquercetina (1)	21
2.1.2 Síntese da 7-hidroxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (2).....	22
2.1.3 Síntese da 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (3)	22
2.1.4 Síntese da 3-hidroxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (4).....	23
2.1.5 Síntese da 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (5).....	24
2.2 Síntese e caracterização dos Polímeros Molecularmente Impressos	25
2.3 Ensaios de Reconhecimento molecular	26
2.3.1 Preparação das soluções de diferentes concentrações de donepezilo e dos MIPs e NIPs	26

2.3.2	Determinação da capacidade de adsorção	27
2.4	Ensaio Biológicos.....	27
2.4.1	Ensaio de Inibição de colinesterases	27
2.4.2	Estudos de Biodegradação:	29
2.4.3	Ensaio de viabilidade celular	30
2.5	Ensaio de libertação <i>in vitro</i> :	33
2.5.1	Preparação das soluções de donepezilo em diferentes pHs 3, 5,5 e 7.....	33
2.5.2	Carregamento dos MIPs com o donepezilo:	33
2.5.3	Ensaio de Libertação do Donepezilo.....	33
3	Discussão e Tratamento de Resultados	35
3.1	Monómeros Funcionais Derivados de Quercetina	35
3.1.1	Síntese dos Derivados de Quercetina.....	36
3.1.2	Caracterização dos Monómeros funcionais:.....	39
3.2	Preparação e Caracterização dos Polímeros Impressos Molecularmente	40
3.2.1	Síntese de Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs).....	40
3.2.2	Caracterização físico-química- Composição química – FTIR-ATR.....	45
3.3	Ensaio de Reconhecimento Molecular.....	50
3.3.1	Identificação e Quantificação do Donepezilo.....	50
3.3.2	Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular	51
3.4	Ensaio Biológicos.....	57
3.4.1	Avaliação do potencial inibitório de colinesterases pelos materiais preparados ..	57
3.4.2	Ensaio de Biodegradação	60
3.4.3	Avaliação da citotoxicidade dos MIPs e NIPs mais promissores	63
3.5	Ensaio de Libertação do donepezilo <i>in Vitro</i>	67
4	Conclusão.....	75
5	Referências Bibliográficas.....	76
6	Anexos	A

Índice de Figuras

Figura 1. A- Hipótese colinérgica da doença de Alzheimer e B- A via de síntese do neurotransmissor acetilcolina. (adaptado de [9, 12]).	4
Figura 2. Diagrama de Mecanismo da Doença de Alzheimer de acordo a hipótese β -amilóide (β -a). Os β -a ₁₋₄₀ e β -a ₁₋₄₂ são os oligómeros β -amilóide formados pela clivagem de APP. (adaptado de [11, 13]).	5
Figura 3. Fármacos atualmente usados para o tratamento da DA, aprovados pela FDA e EMA.	7
Figura 4. Estruturas dos monómeros funcionais comerciais.	12
Figura 5. Estrutura dos agentes de ligação cruzada comerciais.	13
Figura 6. Estrutura da Quercetina.	15
Figura 7. Mecanismo de avaliação de viabilidade celular utilizando diacetato de fluoresceína (DAF).	17
Figura 8. Ação do WST-8 enquanto indicador da viabilidade celular.	18
Figura 9. Reação de hidrólise da iodeto de butiriltiocolina/iodeto de acetiltiocoline catalisada pela AChE/BuChE, utilizando o método de Ellman.	28
Figura 10. Estrutura dos monómeros funcionais derivados de quercetina: 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (3) e a 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (5).	35
Figura 11. Estruturas dos monómeros funcionais e <i>crosslinkers</i> utilizados na síntese dos polímeros.	44
Figura 12. Espectros de FTIR do donepezilo e dos polímeros sintetizados com ácido acrílico Ia (MIP/NIP-1 e 2).	46
Figura 13. Espectros de FTIR do donepezilo e dos polímeros preparados com o monómero 3.	47
Figura 14. Espectros de FTIR do donepezilo e dos polímeros feitos a base do monómero 5. Os MIP/NIPs-6 e 7 com EGDMA e os MIP/NIPs-8 e 9 com TMPTA.	47
Figura 15. Curva de calibração de donepezilo a 272 nm.	51
Figura 16. Avaliação da capacidade de adsorção do donepezilo nos MIP/NIP-2 (sem flavonóide).	52
Figura 17. Potenciais interações por ligações de hidrogénio entre o ácido acrílico (Ia) e o donepezilo•HCl.	53
Figura 18. Avaliação da capacidade de adsorção do donepezilo nos MIP/NIP-1 (sem monómero à base de quercetina).	54
Figura 19. Avaliação da capacidade de adsorção do donepezilo nos MIPs/NIPs à base de composto 3 .	55
Figura 20. Potenciais complexos formados entre os monómeros Ia e composto 5 .	56
Figura 21. Avaliação da capacidade de adsorção do donepezilo nos MIPs/NIPs à base do composto 5 .	57
Figura 22. Curva de inibição dose-resposta para o donepezilo contra a <i>ee</i> AChE ($IC_{50} = 0,06097 \pm 0,00621 \mu\text{M}$ ou $60,97 \pm 0,62 \text{ nM}$).	58
Figura 23. Curva de inibição dose-resposta para o donepezilo contra a <i>eq</i> BuChE ($IC_{50} = 3,09 \pm 0,39 \mu\text{M}$).	58
Figura 24. Curva de calibração do 7-hidroxil-3',4',3,5-tetracetilquercetina (2).	61
Figura 25. Curva de calibração do composto 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (5).	61
Figura 26. Espectros de FTIR do MIP-4 e e MIPs após o ensaio de degradação.	62
Figura 27. Espectros de FTIR do MIP-9 e MIPs após o ensaio de degradação.	63
Figura 28. Estudo do efeito da ação de MIP/NIPs na viabilidade celular de células MCF-7, avaliada pelo método WST-8. Os resultados são expressos em % de viabilidade, calculados relativamente ao controlo negativo (ausência de estímulo) e controlo positivo (em que é usado SDS) e estão apresentados como média \pm EPM ($n \geq 4$). A análise estatística foi feita através do método de comparação de médias Tukey-Kramer, evidenciando-se as diferenças significativas ($p > 0.05$) relativamente ao controlo negativo.	65

Figura 29. Estudo do efeito da ação de MIP/NIPs na integridade membranar de células MCF-7, avaliada pelo método DAF. Os resultados são expressos em % de viabilidade, calculados relativamente ao controlo negativo (ausência de estímulo) e controlo positivo (em que é usado SDS) e estão apresentados como média \pm EPM ($n \geq 4$). A análise estatística foi feita através do método de comparação de médias Tukey-Kramer, evidenciando-se as diferenças significativas ($p > 0.05$) relativamente ao controlo negativo.	66
Figura 30. Cinética de libertação de donepezilo pelos polímeros (MIP/NIP-9) em tampão citrato de sódio pH=3 ($n = 2$). Mais de 50% de libertação em 11 dias.	68
Figura 31. Cinética de libertação de donepezilo pelos polímeros (MIP-9/NIP-9) em PBS pH=5,5 ($n = 2$). Menos de 50% de libertação em 11 dias.	69
Figura 32. Cinética de libertação de donepezilo pelos polímeros (MIP/NIP-9) em PBS pH=7 ($n = 2$). No geral, os MIPs tiveram maior libertação em relação aos NIPs. Em 11 dias a libertação foi mais de 90%.	69
Figura 33. Potenciais interação estabelecidas entre o donepezilo e os grupos funcionais das cavidades impressas do MIP-9 em diferentes meios.	73

Índice de Tabelas

Tabela 1. Polímeros molecularmente impressos sintetizados, monómeros funcionais e agentes de ligação cruzada (<i>Crosslinkers</i>) utilizados, e respectivas quantidades.....	26
Tabela 2. Constituição dos polímeros sintetizados MIPs/NIPs.	43
Tabela 3. Imagens de SEM dos polímeros preparados.	48
Tabela 4. Inibição das colinesterases (AChE e BuChE) pelos polímeros não carregados e carregados com donepezilo e pelos monómeros funcionais. <i>ee</i> AChE ($IC_{50} = 0,06 \pm 0,01 \mu M$) e <i>eq</i> BuChE ($IC_{50} = 3,09 \pm 0,39 \mu M$).....	59
Tabela 5. Resultados de ensaios de biodegradação dos MIPs nos respectivos monómeros.....	62
Tabela 6. Constante de Korsmeyer-Peppas em relação a libertação de donepezilo.	71

Índice de Esquemas

Esquema 1. Processo de síntese de um polímero molecularmente impresso.....	11
Esquema 2. Síntese de 3',4',3,5,7-pentacetilquercetina (1).....	36
Esquema 3. Síntese da 7-hidroxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (2).....	37
Esquema 4. Síntese da 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (3).....	37
Esquema 5. Síntese de 3-hidroxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (4) a partir da (+)-rutina.....	38
Esquema 6. Síntese de 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (5).....	38
Esquema 7. Esquema genérico para a síntese de polímeros molecularmente impressos (MIP) seletivo para o donepezilo.	41
Esquema 8. Potenciais interações entre o donepezilo•HCl e os monómeros funcionais.	42

Lista de Abreviaturas

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AIBN – Azobis(isobutironitrilo)

ApoE – Apolipoproteína E

APP – Proteína Precursora Amilóide (APP, do inglês *Amyloid Precursor Protein*)

BHE – Barreira hematoencefálica

BMEC – células endoteliais microvasculares cerebrais (do inglês *brain microvascular endothelial cells*)

BuChE – Butirilcolinesterase

CCF – Cromatografia de Camada Fina

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta ao monofosfato de adenosina cíclico (CREB, do inglês *cAMP response element-binding protein*)

DA - Doença de Alzheimer

DAF – Diacetato de Fluoresceína

DCM – Diclorometano

DMF – dimetilformamida

DMSO – Dimetil sulfoxido

DMSO-*d*₆ – Dimetil sulfoxido hexadeuterado

EGDMA - dimetilacrilato de etilenoglicol (EGDMA, do inglês *ethylene glycol dimethacrylate*)

EMA- Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês *European Medicines Agency*)

Eq. - equivalente

FDA- Agência Americana de Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA do inglês *Food and Drug Administration*)

FTIR – Espectroscopia do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform InfraRed*);

I-ChE - Inibidor das enzimas colinesterases

IL-1 β – Interleucina 1 beta

Is-ChE – Inibidores das enzimas colinesterases

MIP – Polímeros Molecularmente Impressos (MIP do inglês *Molecularly imprinted polymers*)

NAD⁺ – dinucleótido de nicotinamida

NADH – forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida

NADPH – forma reduzida do dinucleótido de fosfato de nicotinamida

NFT – Novelas neurofibrilares (NFT do inglês *Neurofibrillary tangles*)

NIP – Polímeros Molecularmente não-Impressos (NIP do inglês *Non-molecularly imprinted polymers*)

NMDA – *N*-metil-D-Aspartato

NPs – Nanopartículas

NV – Nanoveículo

PBS – solução tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate-buffered saline*)

PD1, PD2 e PD3 – Produtos de degradação do MIP-4

PD4, PD5 e PD6 – Produtos de degradação do MIP-9SEM-EDX – Microscópio de varrimento eletrônico com espectroscopia de dispersão de energia de raios X (SEM-

EDX, do inglês *Scanning Electron Microscope com Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*)

SEFs – Sistema de entrega de fármacos

TMPTA – trimetacrilato de trimetilpropano (TMPTA, do inglês *trimethylolpropane trimethacrylate*)

UV – Ultravioleta

UV/vis – Ultravioleta e visível

β -a – Proteína- β -amilóide

β -a₁₋₄₂ – Oligômero da proteína- β -amilóide

λ_{ex} – comprimento de onda de excitação

λ_{emi} – comprimento de onda de emissão

1 Introdução

1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurodegenerativa irreversível de etiologia complexa caracterizada pela deterioração progressiva da memória e da função cognitiva. Nos últimos anos a incidência da DA tem aumentado significativamente, com mais de 35 milhões de casos no mundo [1], cerca de 11,8 casos por 1000 pessoas por ano são registados na Europa, distribuídos em 7,02 casos por 1000 pessoas por ano nos homens e 13,25 casos por 1000 pessoas por ano em mulheres [2]. Nos Estados Unidos cerca de 5 milhões de pessoas têm DA e estima-se que este número possa triplicar nos próximos 40 anos [3]. Na China a incidência da DA é de 3,21 % [4]. A prevalência da DA é de 5,05 % no mundo [2] e é apontada como uma das principais causas de morte na Europa e a sexta causa de morte nos Estados Unidos, principalmente em pessoas com mais de 65 anos de idade [3].

Várias hipóteses têm sido estudadas e propostas para explicar a patogénese da DA tais como a hipótese colinérgica, a hipótese da cascata β -amilóide, a hipótese do stress oxidativo e da Apolipoproteína E (ApoE) entre outras, que descreveremos em seguida. Estas várias hipóteses têm sustentado o desenvolvimento de diferentes linhas terapêuticas, não tendo ainda sido identificada nenhuma estratégia farmacológica, única ou combinada, capaz de travar a progressão desta doença [5, 6, 7, 8].

1.2 Fisiopatologia da Doença de Alzheimer

O estudo das várias manifestações patológicas e bioquímicas observadas em pacientes com DA e os resultados de investigação realizadas em pessoas que morrerem vítimas desta doença revelam que a fisiopatologia da DA é complexa, ainda não totalmente compreendida, existindo várias hipóteses e teorias que procuram descrever os processos moleculares e celulares que conduzem à doença.

As características histopatológicas identificadas no parênquima cerebral de pacientes portadores da DA incluem depósitos fibrilares amiloidais, localizados nas

paredes dos vasos sanguíneos, associados a uma variedade de diferentes tipos de placas senis, e ainda a acumulação de filamentos anormais da proteína tau e consequente formação de novos neurofibrilares (NFT). Estes elementos parecem conduzir à perda neuronal e sináptica, com ativação da glia e inflamação [9].

As teorias explicativas da fisiopatologia da DA baseiam-se nos diversos mecanismos moleculares envolvidos, como a hipótese colinérgica, a hipótese da cascata β -amilóide, a hipótese do stresse oxidativo, a implicação da Apolipoproteína E (ApoE), as alterações da proteína tau, a disfunção nas vias de sinalização CREB, bem como a resistência à insulina no sistema nervoso central, entre outras.

1.2.1 Hipótese Colinérgica

O cérebro é innervado por neurónios colinérgicos que desempenham um papel importante na aprendizagem, na memória, na resposta a estímulos, entre outras funções. A transmissão do sinal colinérgico é dependente da síntese e da libertação do neurotransmissor acetilcolina na região sináptica. A hipótese colinérgica afirma que a disfunção cognitiva na DA é resultado de dano de neurónios colinérgicos no hipocampo, córtex frontal, núcleo basal e septo medial causada pela deficiência da acetilcolina no cérebro [9]. Esta hipótese é sustentada por resultados obtidos em diversas pesquisas. Uma pesquisa, por exemplo, que consistiu na avaliação de neurónios em amostras cerebrais obtidas após a morte de indivíduos com a DA e de indivíduos que não apresentavam a doença, demonstrou haver menor número de neurónios colinérgicos no cérebro dos doentes com DA quando comparado com indivíduos sem DA [10]. A hipótese postula que no estágio inicial da DA há baixo nível da enzima colina acetiltransferase, responsável pela síntese do neurotransmissor acetilcolina no cérebro, devido a perda das funções dos neurónios colinérgicos envolvidos nessa síntese e, conseqüentemente, há deficiência na síntese de acetilcolina o que leva a uma deficiente comunicação das células nervosas, resultando em disfunção cognitiva [5, 11], (Figura 1-A). Baseados nesta hipótese, vários estudos têm sido desenvolvidos de modo a encontrar mecanismos para aumentar os níveis de acetilcolina no cérebro. Na figura 1 em A.1) está representada um potencial de ação que resulta no influxo de iões Ca^{2+} e atraso de membrana de vesícula sináptica, fusão das vesículas e libertação de acetilcolina na fenda sináptica. Em A.2) a acetilcolina libertada na fenda sináptica liga-se aos recetores e inicia-se a despolarização

pós-sináptica. Em A.3) a hidrólise da acetilcolina em acetato e colina, e consequente reabsorção da colina pelo neurónio pós-sináptico [12].

Atualmente, a principal abordagem no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento dos sintomas cognitivos (perda de memória, confusão mental, lentidão no raciocínio) baseiam-se na identificação e desenvolvimento de moléculas que possam prevenir a degradação do neurotransmissor acetilcolina, como os inibidores das colinesterases (I-ChE). Em 1993 a agência norte americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou as primeiras substâncias I-ChE para o tratamento de DA [8]. No entanto, estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de encontrar outras formas de terapia da DA, formas que agregam mais vantagens, tenham menos efeitos colaterais e que possam prevenir a degeneração neuronal progressiva.

No entanto, a limitação dessa abordagem reside no facto das substâncias I-ChE desenvolvidas até ao momento para o tratamento da DA se revelarem eficazes apenas no alívio dos sintomas, sem impedir a progressão da neurodegeneração [5].

A falha na estratégia terapêutica da DA com I-ChE deixou claro que a hipótese colinérgica não é o único mecanismo patológico da DA. Com a preocupação de encontrar estratégias terapêuticas mais eficazes que possam parar a neurodegeneração, pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de encontrar outras bases moleculares desta patologia.

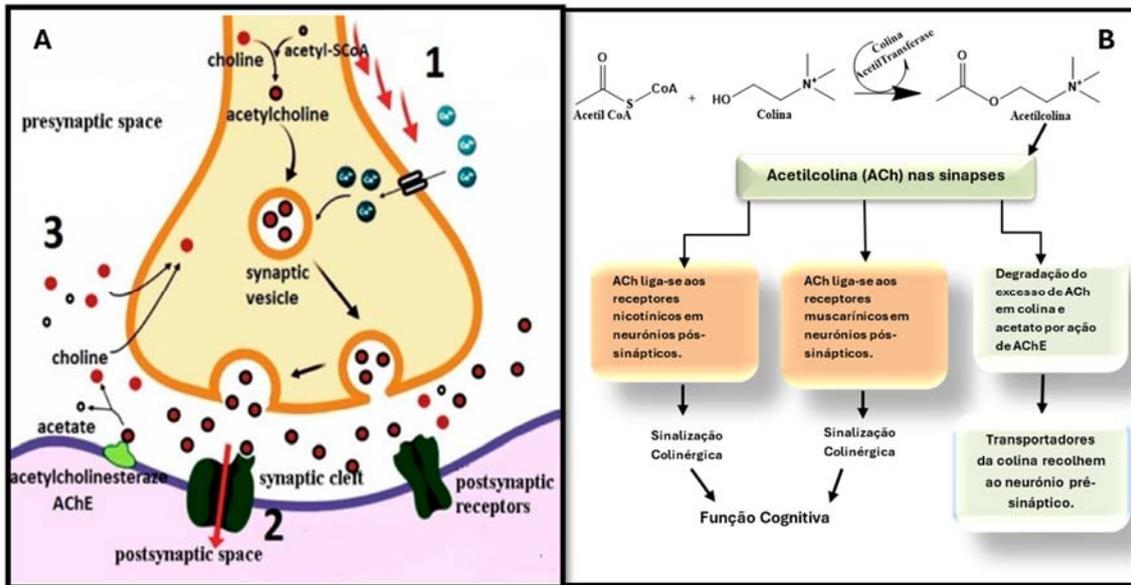


Figura 1. A- Hipótese colinérgica da doença de Alzheimer e B- A via de síntese do neurotransmissor acetilcolina. (adaptado de [9, 12]).

1.2.2 Hipótese β -amilóide

Na hipótese β -amilóide a DA surge como resultado de danos oxidativos causados pela agregação do péptido β -amilóide (Figura 2). O péptido β -amilóide pode ser encontrado em pequenas quantidades no cérebro de indivíduos saudáveis maiores de 65 anos de idade. No entanto, estudos demonstraram que certos oligómeros β -amilóide como o β -a1-42 são neurotóxicos, induzem danos oxidativos, e promovem a hiperfosforilação de proteína tau. A proteína precursora amilóide (APP) é clivada pela α -secretase, pela β - e γ -secretase em diferentes posições, o que resulta numa produção excessiva de diferentes oligómeros de péptido β -amilóide (β -a1-40 e β -a1-42) que se agregam de forma espontânea e se depositam em placas senis extracelulares do tecido cerebral o que pode levar à morte celular [13, 14]. Embora existam muitos estudos sobre a relação do péptido β -amilóide e a DA, a disfunção exercida pelas placas senis ainda não está completamente esclarecida. Um estudo que consistiu na administração de péptido β -amilóide em ratos para avaliar a neurotoxicidade, demonstrou que a acumulação desta substância tem uma importante influência no mecanismo da fase inicial da perda de memória [15, 16]. Contudo, um mecanismo claro e específico que descreve o modo de ação de péptido β -amilóide ainda não é conhecido.

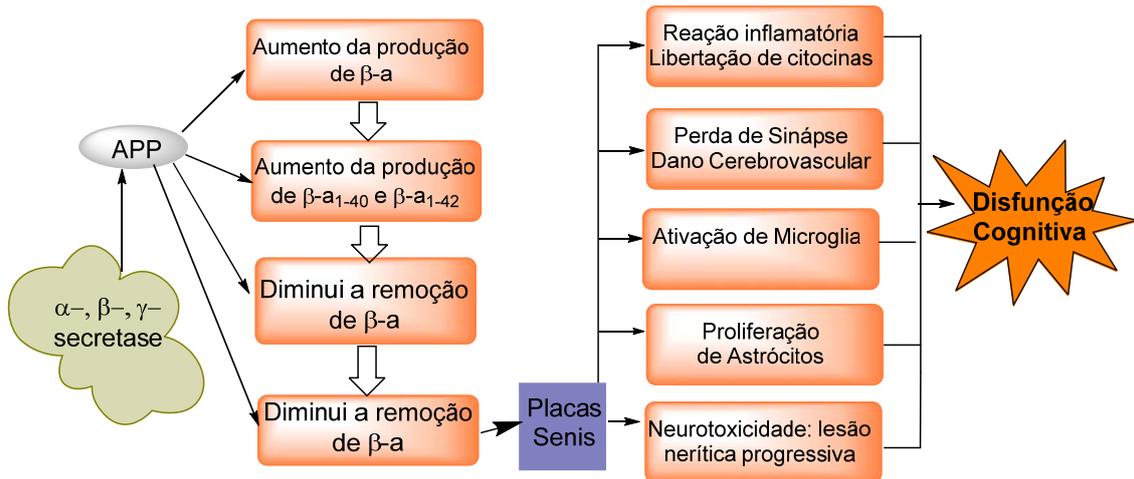


Figura 2. Diagrama de Mecanismo da Doença de Alzheimer de acordo a hipótese β-amilóide (β-a). Os β-a₁₋₄₀ e β-a₁₋₄₂ são os oligômeros β-amilóide formados pela clivagem de APP. (adaptado de [11, 13]).

1.2.3 Outras Hipóteses

Uma outra hipótese que tem sido estudada no mecanismo da DA é a hipótese da disfunção glutamatérgica ou hipótese excitotóxica. Esta hipótese sugere que o excesso de ativação dos recetores do neurotransmissor glutamato, especificamente os recetores ionotrópicos *N*-metil-D-Aspartato (NMDA), pode induzir a morte celular e a neurodegeneração. Os recetores de glutamato têm a importante função de regular a atividade do neurotransmissor nas regiões do hipocampo e córtex cerebral [17]. O glutamato está normalmente envolvido em diferentes processos neurológicos como o desenvolvimento neuronal, a regulação de plasticidade sináptica, aprendizagem e memória [13]. No entanto, uma vez que na fenda sináptica não existe uma enzima que degrada o glutamato, a sua regulação é feita por transportadores pré-sinápticos. A liberação excessiva e prolongada do glutamato induz ao excesso de ativação de recetor NMDA e altera a homeostase de cálcio aumentando a concentração intracelular de iões Ca^{2+} que pode desencadear o processo de necrose ou apoptose neuronal [18].

Alguns estudos sugerem que certas alterações no metabolismo energético celular e a acumulação de certos oligômeros β-amilóides podem causar a ativação excessiva de recetores NMDA [11] e causar excitotoxicidade. De forma geral, a excitotoxicidade induzida

pelo glutamato tem sido apontada como uma das causas da neurodegeneração e morte neuronal, podendo eventualmente desencadear demências tais como a DA.

Outra hipótese que tem merecido atenção na investigação de mecanismos moleculares da DA é o papel da proteína Tau. Uma vez que a proteína tau se encontra nos neurónios e com a função de estabilizar os microtúbulos, a variação da quantidade desta proteína ou alterações da sua estrutura compromete a dinâmica dos microtúbulos e pode afetar o funcionamento do neurónio e consequentemente levar a um estado de demência. Como referido anteriormente, pacientes com DA apresentam grandes quantidades da proteína tau hiperfosforilada [17]. A hiperfosforilação da proteína tau favorece a formação de agregados que dificultam o transporte intraneuronal e afetam assim a homeostase neuronal. Os estudos sobre os fatores responsáveis pela iniciação da hiperfosforilação da proteína tau nos neurónios ainda não foram conclusivos. Assim, ainda não são conhecidos os fatores que favorecem a hiperfosforilação da tau.

1.3 Fármacos atuais para terapia de DA e suas limitações

O estudo da patogénese da DA tem guiado os pesquisadores para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para esta doença. As estratégias terapêuticas desenvolvidas com base na hipótese da deficiência colinérgica constituem, até ao momento, a abordagem que tem demonstrado algum grau de eficácia no tratamento da DA. As primeiras substâncias Is-ChE aprovadas pela FDA para o tratamento da DA foram a tacrina, o donepezilo, a rivastigmina e a galantamina [13, 19]. Devido a elevada hepatotoxicidade da tacrina, este composto foi retirado do mercado em 2013. Atualmente, os medicamentos aprovados pela FDA e *European Medicines Agency* (EMA), são o donepezilo, a rivastigmina e a galantamina (inibidores das colinesterases) e a memantina (agonista do recetor *N*-metil-D-Aspartato) (Figura 3) [5] [20].

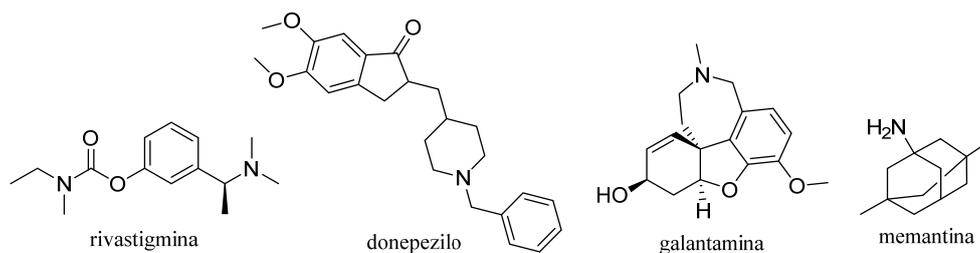


Figura 3. Fármacos atualmente usados para o tratamento da DA, aprovados pela FDA e EMA.

O donepezilo foi aprovado em 1996 para uso terapêutico da DA no estado moderado a grave. É o medicamento I-ChE, aprovado pela FDA e EMA, mais utilizado mundialmente no tratamento da DA [21] devido à sua alta capacidade seletiva de inibir a atividade da AChE [7] e ter um tempo de meia vida relativamente longo. Pesquisas publicadas provaram a hipótese do donepezilo ter uma ação neuroprotetora ao poder conter ou reduzir a progressão da degeneração de neurónios cerebrais e atrofia do hipocampo. Além disso, o donepezilo pode suprimir a expressão de IL-1 β e ciclooxigenase-2 e conseqüentemente prevenir a inflamação sistêmica do cérebro e baço [22]. Por estas razões, o donepezilo é considerado um agente primário para o tratamento sintomático da DA. No entanto, vários são os efeitos secundários de donepezilo nos pacientes que seguem esta linha de tratamento. Entre eles observa-se a perda de apetite, náuseas, vômitos, diarreia, insônia, aumento da frequência de evacuações, câibras, [1], tonturas e fraquezas musculares. Em alguns casos, estes efeitos tendem a agravar-se à medida que o tratamento se prolonga.

A rivastigmina é um inibidor seletivo da AChE e da BuChE que foi aprovada para o tratamento da DA no estado leve a moderado, em 2000. Devido à sua capacidade de inibir as duas colinesterases, este medicamento foi também usado para o tratamento de outras demências como a doença de Parkinson [7]. Zhang *et al.* levantaram a hipótese de que o uso de rivastigmina para tratamento de pacientes com DA pode melhorar a perfusão regional cerebral na área temporal, aumentar a função colinérgica e melhorar as funções cognitivas, como a formação e organização da linguagem e de comportamento [23]. Os efeitos colaterais da rivastigmina são a perda de apetite, perda de peso a longo prazo, vômitos, náuseas e aumento da frequência de evacuações [1].

A descoberta e as pesquisas da galantamina para o uso terapêutico data dos anos 50. Em 2000, a FDA aprovou a galantamina, um composto com capacidade para aumentar

o nível de ACh na região sináptica ao retardar a degradação do neurotransmissor por inibição seletiva da AChE [7]. Estudos provaram que a galantamina potencia a ação da ACh através da ligação alostérica no recetor nicotínico colinérgico neuronal (nAChRs), o que é visto como uma vantagem no seu papel na inibição seletiva da AChE [24]. A. Kavanag *et al.*, demonstraram que o uso da galantamina para o tratamento de pacientes com DA no estágio médio a moderado por mais de 4 meses ajudou a melhorar os sintomas comportamentais como delírios, alucinações, agitação, agressão, depressão, irritabilidade, capacidade motora, apatia e euforia. Além disso, os nAChRs regulam também a libertação do glutamato e das aminas serotonina e norepinefrina [25] [26]. Portanto, a ação da galantamina nos nAChRs pode contribuir para a correção de alguns défices neuroquímicos e consequentemente favorecer a redução dos sintomas da DA. Alguns estudos relatam que os efeitos secundários da galantamina são consequências da sobredosagem [7].

A memantina foi concebida na base da hipótese da disfunção glutamatérica. Este fármaco é o único antagonista do recetor NMDA utilizado para o tratamento da DA no estágio moderado a severo. Estudos da memantina para o tratamento da doença DA demonstraram que este fármaco melhorou a função cognitiva e reduziu as perturbações comportamentais nos pacientes com DA [27].

1.4 Sistema de Entrega de Fármacos

As estratégias terapêuticas para a maioria das doenças, incluindo a DA, tradicionalmente baseiam-se em sistemas convencionais de entrega de fármacos, tais como pós, cápsulas, comprimidos e líquidos, administrados por via oral, injetável, retal, cutânea, nasal ou oftálmica. No entanto, esses métodos frequentemente se mostram ineficazes, em razão de limitações como baixa solubilidade dos fármacos, biodisponibilidade reduzida, necessidade de dosagens elevadas, farmacocinética desfavorável e, especialmente para doenças do sistema nervoso central, a dificuldade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Diversos estudos sugerem que uma parcela significativa das falhas clínicas nas terapias direcionadas ao Sistema Nervoso Central está associada justamente a essas limitações dos sistemas de entrega [28]. De facto, a maioria das substâncias não consegue ultrapassar a barreira protetora do cérebro.

Com os avanços recentes na ciência e tecnologia, diversas pesquisas têm demonstrado o potencial das NPs para a entrega de fármacos [29]. Atualmente, o tratamento da DA utiliza predominantemente sistemas de entrega por via oral, sendo a rivastigmina, também, administrada por via transdérmica, os quais, contudo, sofrem com as limitações já mencionadas, como baixa biodisponibilidade e metabolismo rápido.

Os SEFs têm um papel crucial no aumento da eficácia terapêutica e na redução dos efeitos colaterais de medicamentos utilizados no tratamento de doenças graves. No mercado, muitos medicamentos já são comercializados em nanoveículos (NVs) para uso humano, como Abraxane®, Caelyx®, Mepact®, Myocet®, Emend® e Rapamune®, sendo que a maioria desses sistemas é baseada em lipossomas [28]. No caso da DA, os inibidores de colinesterase (I-ChEs), donepezilo, galantamina e rivastigmina, constituem, até o momento, a única abordagem terapêutica disponível [29]. Entretanto, esses fármacos apresentam desafios, como baixa biodisponibilidade e, em alguns casos, efeitos colaterais graves, possivelmente devido à limitada permeabilidade pela BHE. Para superar essas limitações, os nanomedicamentos emergem como uma estratégia inovadora, visto que oferecem a vantagem de atravessar facilmente a BHE e possibilitam a liberação direcionada e sustentada dos fármacos. A biodisponibilidade prolongada, além de reduzir a frequência da dosagem, minimiza os efeitos colaterais. Diversos SEFs têm sido descritos para o tratamento da DA, incluindo nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanoemulsões, microemulsões e cristais líquidos [30]. Exemplos de nanopartículas poliméricas, como as baseadas em poliestireno, PLGA conjugado com quitosano, partículas de ouro, magnemita, nanocápsulas de Eudragit S100 e nanosuspensões, demonstram capacidade de atravessar a BHE, geralmente por meio de endocitose seguida de transcitose através das células endoteliais microvasculares cerebrais (BMEC) [31].

Neste projeto de mestrado, nosso objetivo é aprimorar a eficácia e o direcionamento terapêutico, minimizando os efeitos colaterais do fármaco utilizado na DA, o donepezilo [29], por meio da entrega seletiva além da BHE. A utilização de MIPs como SEFs apresenta vantagens significativas em relação a outras NPs poliméricas, permitindo uma liberação sustentada devido à afinidade entre o fármaco e o polímero, o que aumenta o tempo de residência do fármaco no organismo [32]. Diversos sistemas de NPs com resposta a estímulos de pH e redox já foram reportados para a entrega de fármacos [33], e alguns SEFs baseados em MIP e MIP-hidrogéis têm se mostrado métodos promissores

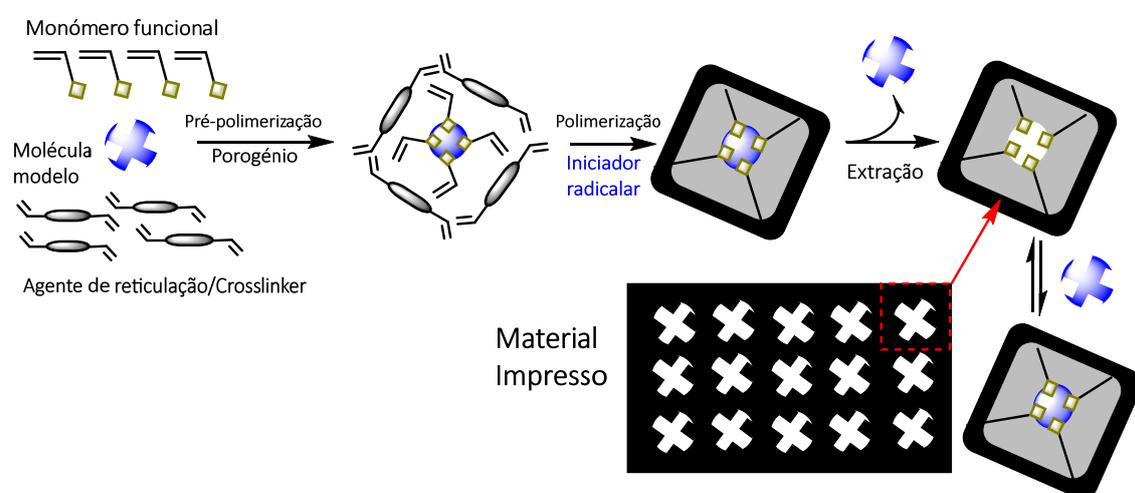
para alcançar a libertação sustentada dos fármacos, obtendo os resultados terapêuticos desejados [34].

Na literatura, existem poucos exemplos de SEFs baseados em MIP para a entrega de fármacos na DA. Estudos recentes demonstram, por exemplo, que Hemmati *et al.* sintetizaram SEFs baseados em MIP magnético e óxido de grafeno para a entrega da rivastigmina, os quais apresentaram elevada biocompatibilidade [35]. Da mesma forma, Harthi *et al.* desenvolveram um sistema lipossomal de donepezilo, disperso em hidrogel de quitosano tiolado para administração nasal, que demonstrou alta eficiência, com resultados *in vivo* indicando um aumento significativo na concentração do fármaco no sangue e no cérebro [36]. Ruela *et al.* também sintetizaram um MIP capaz de dissolver-se em formulações lipídicas, configurando um veículo promissor que permitiu a libertação prolongada do donepezilo [37].

1.5 Polímeros Molecularmente Impressos

A impressão molecular é uma tecnologia que tem vindo a ser desenvolvida desde 1972, tendo tido início com o estudo realizado por Wulff e Sarham [38]. Estes autores analisaram a síntese de um polímero orgânico covalente que apresentava grupos seletivos para os enantiómeros do ácido glicérico. O estudo e as análises de Wulff e Sarham contribuíram ainda para o desenvolvimento de conceitos importantes, nomeadamente a impressão molecular e a polimerização por radicais livres [39]. Os polímeros molecularmente impressos (MIP) são polímeros sintéticos que têm sido amplamente utilizados para aplicações terapêuticas devido às suas inúmeras vantagens como alta estabilidade, boa seletividade e baixo custo [34]. Esses MIPs são sintetizados a partir de uma molécula modelo, também denominada analito alvo por alguns autores, e de um monómero funcional. Em seguida, ocorre a polimerização, que pode ser induzida por radiação UV, calor, corrente elétrica, entre outros métodos, na presença de um agente de reticulação em excesso e de um solvente, denominado porogénio. Em alguns casos, é necessário o uso de um iniciador. Após a polimerização, a molécula modelo é removida do polímero, que passa a dispor de cavidades ou sítios de ligação específicos (Esquema 1) [38,39]. Tanto as ligações covalentes quanto as não covalentes são responsáveis pela formação desses sítios [39]. As ligações covalentes estabelecidas com a molécula modelo

condicionam a seletividade para o analito alvo, enquanto o tamanho do polímero pode aumentar a capacidade de carga do fármaco. Outras vantagens dos MIPs incluem a biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e a possibilidade de administração por diversas vias. Dessa forma, os MIPs têm se mostrado uma estratégia eficaz e controlada para a liberação de fármacos, sendo frequentemente descritos como anticorpos artificiais [34].



Esquema 1. Processo de síntese de um polímero molecularmente impresso.

1.5.1 Monómeros funcionais

Monómeros funcionais são moléculas pequenas, geralmente formadas por dois tipos de unidades ou grupos funcionais, capazes de se unirem por meio de interações físico-químicas e formar um polímero com propriedades específicas [40]. Geralmente, para a síntese dos MIPs é importante haver a seleção de um monómero funcional capaz de realizar interações com a molécula modelo e formar um complexo estável [40, 41], isto é, as forças de interação entre o monómero funcional e a molécula modelo afetam a estabilidade e a qualidade do polímero e vão garantir uma boa precisão e seletividade dos locais de reconhecimento. Na figura 4 estão representados os monómeros funcionais comerciais comumente usados na síntese dos MIPs.

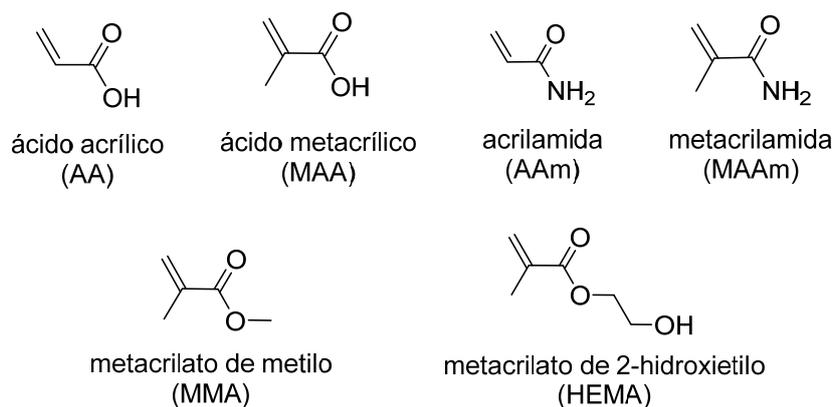


Figura 4. Estruturas dos monómeros funcionais comerciais.

1.5.2 Agentes de ligação cruzada “Crosslinkers”

Um dos elementos essenciais na impressão molecular é o agente de ligação cruzada, designado em inglês “*crosslinker*” [41]. Os agentes de ligação cruzada são substâncias químicas utilizadas no processo da síntese de um MIP para complexar ao monómero funcional e condensar em torno da molécula modelo de modo que fique um polímero rígido e com cavidades após a remoção da molécula modelo [42, 43]. Na impressão molecular, a escolha do tipo do agente de ligação cruzada depende do tipo de molécula modelo e da finalidade do polímero [41]. Além destes dois fatores, a razão molécula modelo, monómero e agente de ligação cruzada é também um fator determinante para a estrutura e estabilidade do polímero, e garantir maior seletividade de reconhecimento à molécula modelo [44]. Uma quantidade muito baixa de agente de ligação cruzada pode resultar na instabilidade física do polímero, como por exemplo baixa rigidez mecânica e conseqüentemente afetar o reconhecimento molecular. Entretanto, alguns estudos demonstraram que o EGDMA em baixas quantidades pode ser suficientemente eficiente e facilitar a ligação de certos monómeros na formação de polímeros [45]. Na figura 5 estão representados os agentes de ligação cruzada normalmente utilizados na preparação de MIPs.

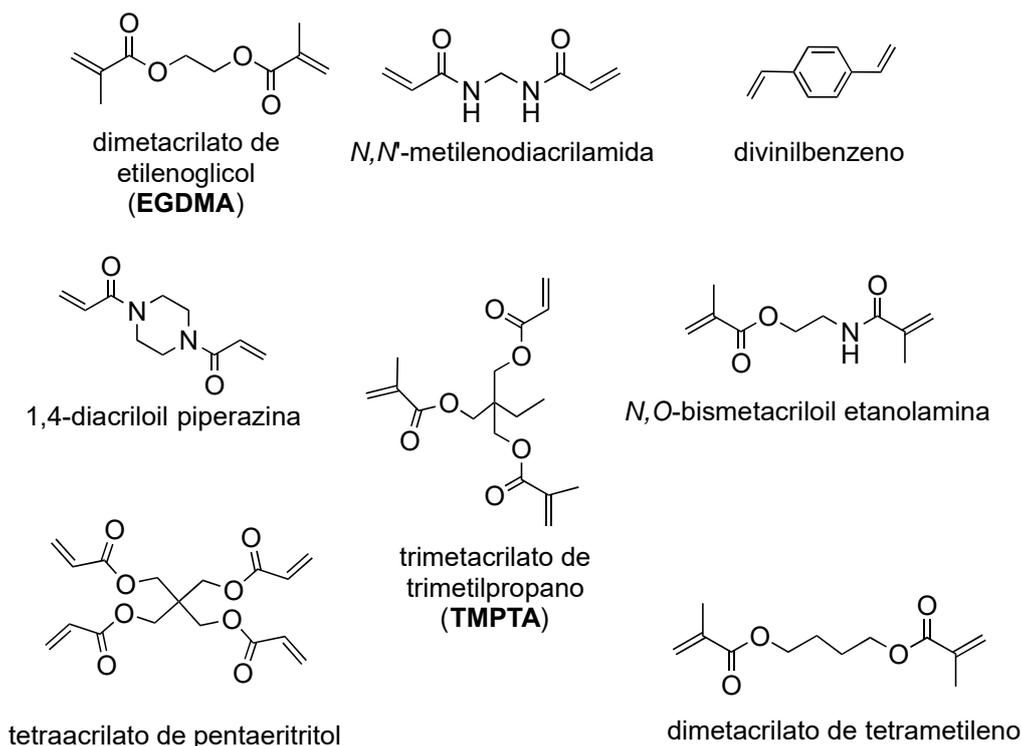


Figura 5. Estrutura dos agentes de ligação cruzada comerciais.

1.5.3 Métodos de polimerização

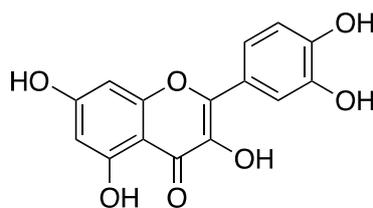
Na impressão molecular normalmente necessitamos de cinco elementos diferentes (molécula modelo (*template*), monómero funcional, agente de ligação cruzada, iniciador de polimerização e um solvente, o porogénio) para combinar em reação química entre si, em proporções específicas e formar um polímero com maior seletividade [40, 46]. Deste modo, a síntese dos MIPs exige um protocolo bem estruturado, com parâmetros específicos a serem cumpridos. Existem vários métodos reportados na literatura para a síntese de MIPs, entre os quais se destacam os mais utilizados [47].

O método da polimerização em volume (*Bulk*) considerado o mais simples e de fácil execução, no entanto exige atenção especial e controlo rigoroso da quantidade de agente de ligação cruzada. O processo de produção consiste na mistura de todos os componentes (monómero funcional, agente de ligação cruzada e molécula modelo) seguida da polimerização num bloco sólido. A principal desvantagem deste método é a irregularidade na forma e no tamanho das partículas do MIP [47, 48].

A polimerização radicalar controlada via *iniferter* é uma técnica fotocontrolada que permite o crescimento controlado das cadeias poliméricas sob irradiação UV. O termo *iniferter* deriva das funções de iniciador (*initiator*), agente de transferência (*transfer*) e terminador (*terminator*) desempenhadas por uma única molécula. Um exemplo comum é o dissulfeto de tetraetiluram, que atua como fonte de radicais ativos e dormentes. Durante a reação, os radicais ativos promovem a propagação das cadeias poliméricas, enquanto os radicais dormentes estabilizam o sistema, mantendo um equilíbrio dinâmico entre os estados ativo e inativo da cadeia. Este processo evita a formação de microgéis e favorece a obtenção de nanopartículas com melhor controle sobre a massa molecular, a polidispersibilidade e a morfologia da rede polimérica [49]. Na preparação dos MIPs, a técnica melhora a acessibilidade e a afinidade dos sítios de reconhecimento, contribuindo para polímeros mais seletivos e eficientes [50].

1.6 Flavonóides: Quercetina

Nos últimos anos, os flavonóides têm sido alvo de muitas pesquisas com o objetivo de estudar as suas diversas propriedades biológicas benéficas aos humanos e aos animais, e aplicá-los para fins terapêuticos [51]. Os flavonóides são um grupo de compostos fenólicos naturais, encontrados em diversos vegetais e frutos consumidos na alimentação humana, como a amendoeira, a castanha doce, a maçã, uva, frutos vermelhos, citrinos, cebola, pimentos, cacau, vegetais de folhas verdes e entre outros [40, 52]. Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas já cientificamente comprovadas, incluindo propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas [53, 54]. Devido à sua propriedade antioxidante, os flavonóides protegem as células nervosas dos danos provocados por espécies reativas de oxigênio e contribuem para a manutenção das funções cognitivas, o que ajuda a reduzir o risco de doenças associadas à idade, como as neurodegenerativas, cardiovasculares e alguns tipos de tumores [51]. Os flavonóides subdividem-se em várias subclasses, entre as quais se destacam as flavonas, os flavonóis e as flavanonas. Os flavonóides mais abundante na dieta humana são os flavonóis [55].



Quercetina

Figura 6. Estrutura da Quercetina.

A quercetina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavona) (Figura 6) um flavonóide da família dos flavonóis, tornou-se o foco de muitos estudos médicos e farmacológicos devido às suas diversas propriedades antioxidante [56], antiagregantes, anticancerígenas, vasodilatadoras, entre outras. Um estudo realizado em 2008, que teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante da quercetina, rutina e de outros compostos fenólicos na eliminação de dois tipos de radicais livres ((1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e peróxinitrito (ONOO⁻)), demonstraram um baixo IC₅₀ para a eliminação de ambos tipos de radicais [57]. Priyadarsini *et al.* realizaram um estudo para examinar o efeito da quercetina na viabilidade celular em células do cancro do colo do útero humano (HeLa) e, através desse efeito determinaram o mecanismo da morte celular. Os resultados demonstraram que a quercetina induz paragem do ciclo celular na fase G2/M, reduzindo a viabilidade celular em cerca de 50%, e promove apoptose mediada por mitocôndrias, através de um mecanismo dependente da proteína p53 [58, 59, 60]. Estudos demonstraram que quercetina desempenha um papel antagonista ao inibir a atividade oxidante de algumas espécies reativas de oxigénio (peróxido de hidrogénio, hidroperóxido de ácido linoleico) nas células nervosas e reduz a peroxidação lipídica, o que aumenta a longevidade neuronal [51, 61]. Shimmyo *et al.* no seu estudo com flavonóides, demonstraram que a quercetina atua como inibidor da enzima β -secretase (BACE-1) em células neuronais e, conseqüentemente, reduz o nível da proteína β -amilóide nos neurónios. Uma vez que a agregação da proteína β -amilóide é um dos mecanismos da DA, a sua redução no cérebro poderá contribuir para a diminuição da progressão da neurodegeneração [62]. Os mecanismos pelos quais a quercetina atua na neuroproteção ainda não estão totalmente elucidados. Contudo, a investigação sobre os efeitos da quercetina na neuroproteção tem vindo a crescer, e os resultados permitem formular várias hipóteses [63].

Neste projeto de mestrado, propõe-se a síntese de monómeros funcionais à base de quercetina, devido às suas propriedades farmacológicas de interesse para a doença de Alzheimer.

1.7 A utilização de linhas celulares na avaliação de citotoxicidade

Os materiais desenvolvidos para entrega do donepezilo devem ser seguros, não causando eles próprios danos no organismo no qual, no futuro, possam ser aplicados. Desta forma, para além destes materiais serem testados quanto à sua eficácia no funcionamento (capacidade de ligar donepezilo, capacidade de fazer libertação controlada, manutenção da atividade biológica de inibição de colinesterases, por exemplo) é importante também testar a sua segurança biológica.

Numa fase inicial do desenvolvimento farmacêutico, ainda em avaliação pré-clínica, os compostos devem ser testados quanto à sua citotoxicidade, isto é, a capacidade de gerar a morte de células. Estes testes podem ser realizados em diferentes linhas celulares, servindo os resultados destes testes também para exclusão de compostos, isto é, para auxiliar no *screening* dos melhores compostos que podem avançar para as fases seguintes de avaliação de eficácia e segurança [64].

Nos ensaios de citotoxicidade, são cultivadas células como sistema modelo, sendo as células expostas a um composto de ensaio e, após um certo período de incubação, é medido um marcador que reflita o número de células viáveis presentes em comparação com os tratamentos de controlo positivos (agente tóxico) e negativos (veículo). Para todos os ensaios que utilizam células cultivadas como sistema modelo, é valioso saber quantas células vivas e mortas estão presentes durante ou após o final da experiência [65].

Os métodos comumente usados para estimar células mortas aproveitam a perda de integridade da membrana e a capacidade das moléculas indicadoras se manterem num determinado compartimento celular, se a membrana celular estiver intacta. Os ensaios usados para detetar células mortas incluem a medição do vazamento de um componente (geralmente um marcador enzimático) do citoplasma para o meio de cultura ou a penetração de um corante não permeável em células com uma membrana comprometida. No caso deste trabalho, esta avaliação será feita utilizando o indicador diacetato de

fluoresceína [66]. Este composto (que não apresenta fluorescência) tem propriedades químicas que facilitam a sua entrada nas células por difusão. Uma vez no interior das células, os enzimas citoplasmáticos esterases clivam o composto, libertando fluoresceína, que é fluorescente (comprimento de onda de excitação e de emissão são 488 nm e 530 nm, respetivamente) e não atravessa a membrana por difusão (Figura 7). Assim, as células cujas membranas estão íntegras, ficam fluorescentes. Pode ser medida a fluorescência nas microplacas com as células aderentes (se forem semeadas em placas adequadas), e aí a fluorescência será indicativa do número de células viáveis, ou pode ser medida a fluorescência no meio de cultura, e aí será indicativa do número de células mortas.

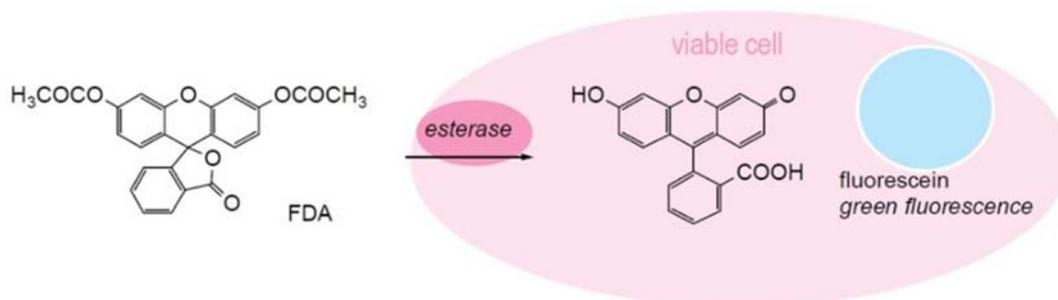


Figura 7. Mecanismo de avaliação de viabilidade celular utilizando diacetato de fluoresceína (DAF).

Um outro método de medição de viabilidade celular é a avaliação da atividade metabólica das células utilizando sais de tetrazólio como substrato das desidrogenases celulares. Um desses sais é o WST-8.

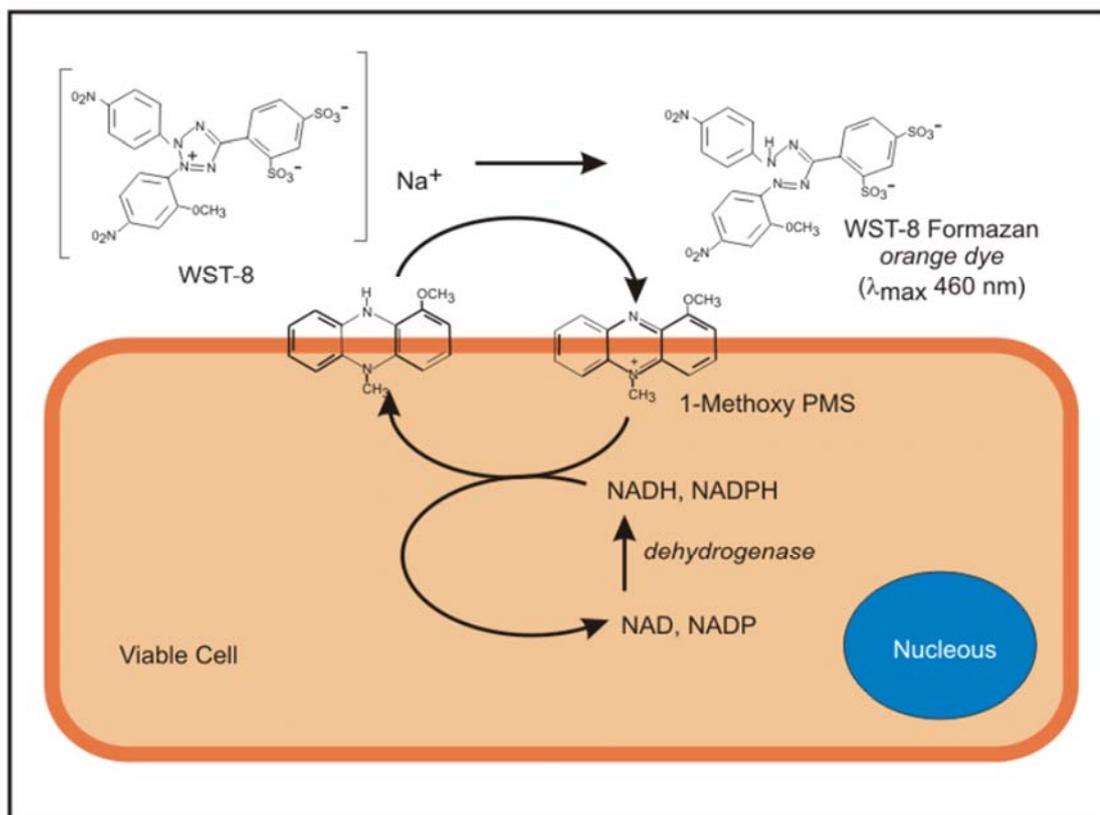


Figura 8. Ação do WST-8 enquanto indicador da viabilidade celular.

O sal de tetrazólio, WST-8, é reduzido através de uma reação com a forma reduzida de 1-metoxi PMS. Este mediador reside na membrana celular e reage diretamente com NADH (forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida) ou NADPH (forma reduzida do dinucleótido de fosfato de nicotinamida) (Figura 8). NADH e NADPH são gerados a partir de NAD⁺ ou NADP⁺ pela reação de enzimas desidrogenase e seus [67] substratos, como lactato desidrogenase e ácido láctico, respetivamente. Portanto, o sal de tetrazólio é utilizado para a determinação da atividade da desidrogenase ou de um substrato da desidrogenase. A solução de um sal de tetrazólio WST-8 é quase incolor, enquanto o seu produto, formazano, origina uma solução fortemente corada com um pico de absorvância a 460 nm.

Muitos trabalhos utilizam sais de tetrazólio como forma de avaliar a citotoxicidade de compostos com potencial ação farmacológica [68] [69] [70], sendo um importante ponto de *screening*.

Neste trabalho de dissertação de mestrado, o objetivo principal foi desenvolver um SEF à base de polímeros molecularmente impressos (MIPs) utilizando monómeros funcionais derivados de quercetina para a entrega controlada de donepezilo, com o intuito de aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos secundários. As etapas para alcançar este objetivo, consistiram em:

- Sintetizar e caracterizar os monómeros funcionais a base da quercetina;
- Sintetizar e caracterizar as partículas à base de polímeros molecularmente impressos constituídos por monómeros funcionais derivados da quercetina.
- Estudar as partículas sintetizadas quando à sua: a) capacidade de reconhecimento molecular para o donepezilo; b) estabilidade; c) capacidade de libertação *in vitro* em diferentes meios.
- Avaliar os polímeros molecularmente impressos quando à sua toxicidade e capacidade inibitória de colinesterases.

2 Parte Experimental

Considerações Gerais

Os solventes e reagentes utilizados na realização deste relatório foram fornecidos pela Sigma-Aldrich e Alfa-Aesar, e usados diretamente sem qualquer purificação.

A cromatografia em camada fina (CCF) unidimensional foi realizada em placas de alumínio revestidas com sílica gel 60F254 da Merck, sendo reveladas por irradiação UV a 254 nm ou uma solução de ácido fosfomolibdico em etanol.

Todos os compostos orgânicos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN): os espectros de ^1H e ^{13}C foram traçados num espectrómetro Bruker AVANCE III HD 400MHz (^1H : 400MHz e ^{13}C : 100MHz) na Universidade de Évora. As amostras para espectroscopia de RMN foram preparadas como solventes CDCl_3 e $\text{DMSO}-d_6$. Relativamente aos desvios químicos (δ), estes foram registados em partes por milhão (ppm).

Nas sínteses de polímeros a etapa de pré-polimerização foi realizada no banho de ultrassons. Os ensaios de reconhecimento molecular dos MIPs e NIPs foram feitos com recurso a uma incubadora com agitador orbital Ohaus à temperatura de 37°C com 150 rpm. As partículas foram sedimentadas através da centrifugação a 4500 rpm durante 15 minutos, na centrífuga HERMLE Labortechnik Z307. A curva de calibração do donepezilo foi realizada com recurso ao espectrofotómetro de UV-Vis T80 PGI Instruments. As absorvâncias foram medidas a 272 nm (comprimento de onda de absorção de donepezilo). A partir da curva de calibração calculou-se a quantidade de donepezilo.

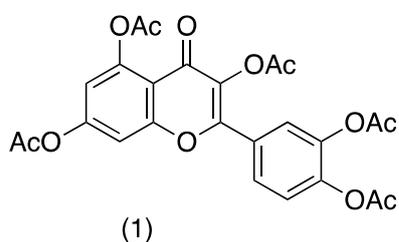
A percentagem de libertação do donepezilo pelos polímeros foi calculada a partir das absorvâncias medidas dos sobrenadantes. A medição das absorvâncias no ensaio de libertação, nos testes de viabilidade metabólica e nos ensaios de degradação dos polímeros foi realizada num espectrofotómetro de microplacas *Molecular Devices Spectra Max iD3*.

Os polímeros sintetizados e o produto de degradação, foram caracterizados por espectroscopia de FTIR-ATR utilizando o espectrómetro PerkinElmer Spectrum Two, equipado com acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR).

Para a caracterização morfológica dos polímeros sintetizados utilizou-se o Microscópio de varrimento eletrônico com espectroscopia de dispersão de energia de raios X (SEM-EDX, *do inglês Scanning Electron Microscope com Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) modelo Phenom da ThermoFisher Scientific.

2.1 Síntese e caracterização de monómeros funcionais à base de quercetina

2.1.1 Síntese da 3',4',3,5,7-pentacetilquercetina (1)

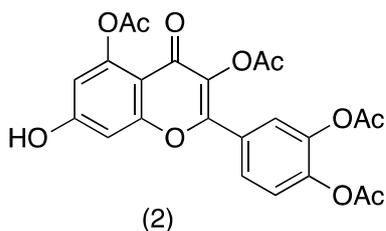


Dissolveram-se cerca de 3,0 g (9,93 mmol, 1 eq.) de quercetina em 45,0 mL de piridina e adicionou-se 18,0 mL (190,42 mmol, 19 eq.) de anidrido acético. A mistura foi colocada sob agitação e em refluxo a 120 °C durante 5 h. Decorrido esse tempo, adicionou-se a mistura reacional a um erlenmeyer contendo aproximadamente 100 g de gelo e deixou-se em agitação cerca de 15 min. até ocorrer a formação do precipitado branco-sujo. Seguidamente, o precipitado foi filtrado sob vácuo e lavado com acetato de etilo frio. O precipitado foi recolhido para um balão de fundo redondo e seco sob vácuo. Obteve-se o produto **1** sob a forma de um sólido creme (3,5 g, $\eta=67,9\%$). O produto foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,33 (s, 6H, 2x CH_3), 2,34 (s, 3H, CH_3), 2,34 (s, 3H, CH_3), 2,43 (s, 3H, CH_3), 6,87 (d, 1H, $J=2,2$ Hz, ArH), 7,33-7,36 (m, 2H, 2xArH), 7,69-7,73 (m, 2H, 2xArH) ppm.

^{13}C APT RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 20,6, 20,8, 21,2, 21,3, 109,12, 114,0, 114,9, 124,0, 124,1, 126,6, 127,9, 134,2, 142,4, 144,5, 150,6, 153,9, 154,4, 157,0, 167,8, 167,9, 168,0, 168,1, 169,4, 170,2 ppm.

2.1.2 Síntese da 7-hidroxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (2)

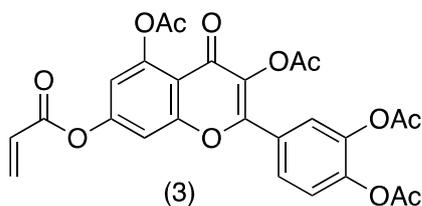


Solubilizou-se cerca de 1,0 g (2,14 mmol, 1 eq.) de 3',4',3,5,7-pentacetilquercetina (1) em diclorometano (DCM) e colocou-se num banho de gelo. Adicionou-se 0,265 g (4,02 mmol, 2 eq.) de imidazol dissolvida em 15 mL de DCM, gota-a-gota durante 10 min. Deixou-se a mistura reagir por 1 h em banho de gelo e mais 1 h à temperatura ambiente. À mistura reacional foi adicionada 50 mL de DCM e seguidamente extraída com a solução de HCl 0,1 M (3x50 mL). Os vestígios de água presentes na fase orgânica foram removidos com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e removeu-se o solvente sob pressão reduzida. A purificação da mistura obtida foi feita por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando a mistura de solventes hexano/acetato de etilo (1:2) como eluente. O produto **2** foi obtido sobre a forma de um sólido branco (0,5 g, $\eta = 47,0\%$), e caracterizado por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C APT.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,29 (s, 3H, CH₃), 2,30 (s, 3H, CH₃), 2,32 (s, 3H, CH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 6,65 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, ArH), 6,94 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, ArH) 7,50-7,52 (m, 1H, ArH), 7,80-7,85 (m, 2H, ArH), 11,35 (s, 1H, OH) ppm.

^{13}C APT RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 20,3, 20,4, 20,5, 20,9, 101,0, 109,1, 109,4, 123,6, 124,5, 126,6, 127,5, 132,8, 142,2, 144,2, 150,2, 152,4, 157,6, 162,9, 168,0, 168,1, 168,3, 168,8, 169,0 ppm.

2.1.3 Síntese da 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (3)

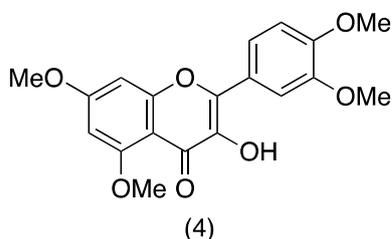


A esterificação do composto **2** foi feita, através da adição de 0,19 mL (1,36 mmol, 1,3 eq.) de trietilamina a uma solução de 0,492 g (1,05 mmol) do composto **2** dissolvido em 25 mL de DCM. Deixou-se a mistura reagir por meia hora, seguidamente colocou-se em banho de gelo e adicionou-se cloreto de acríloílo (0,11 mL, 1,36 mmol, 1,3 eq.). Deixou-se a mistura sob agitação a temperatura ambiente por 5 horas. O produto foi extraído com solução saturada de NaHCO₃ (50,0 mL x 3). Adicionou-se Na₂SO₄ anidro à fase orgânica, filtrou-se e removeu-se o solvente sob vácuo. O produto bruto foi obtido sob a forma de sólido castanho, e foi purificado através de cromatografia em coluna em sílica gel, utilizando a mistura de hexano/acetato de etilo (1:1) como eluente. O composto **3** foi obtido sob a forma de sólido branco (0,3 g, η = 48,9 %) e caracterizado através de espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 2,33 (s, 6H, 2xCH₃), 2,34 (s, 3H, CH₃), 2,44 (s, 3H, CH₃), 6,11 (dd, 1H, $J=1,0$ Hz, $J=10$ Hz, CH₂), 6,32 (dd, 1H, $J=10,0$ Hz, $J=17$ Hz, CH), 6,67 (dd, 1H, $J=1,0$ Hz, $J=17$ Hz, CH₂), 6,92 (d, 1H, $J=4,0$ Hz, ArH), 7,35 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, ArH), 7,40 (d, 1H, $J=4,0$ Hz, ArH), 7,7 (d, 1H, $J=4,0$ Hz, ArH), 7,72 (dd, 1H, $J=4,0$ Hz, $J=8,0$ Hz, ArH) ppm.

¹³C APT RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : 20,7, 20,8, 21,2, 109,1, 114,0, 115,0, 124,0, 124,1, 126,6, 127,2, 127,9, 134,2, 134,4, 142,3, 144,5, 150,6, 153,9, 154,4, 157,0, 163,1, 167,9, 167,9, 168,0, 168,0, 169,4, 170,2 ppm.

2.1.4 Síntese da 3-hidroxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (4)

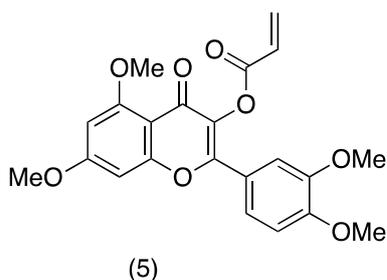


Num balão de fundo redondo esmerilado de 250 mL munido com um magnete adicionou-se a rutina (5,0 g, 7,52 mmol, 1 eq.), K₂CO₃ (5,6 g, 40,61 mmol, 5,4 eq.) e solubilizou-se com 30 mL de DMF. Seguidamente adicionou-se CH₃I (2,54 mL, 40,61 mmol, 5,4 eq.) sob agitação e protegido da luz. Deixou-se a mistura reacional reagir

durante a noite. O solvente (DMF) foi removido por destilação a vácuo a 60 °C, o sólido obtido dissolveu-se, cuidadosamente, com uma solução de H₂SO₄ 2% e colocou-se a mistura em refluxo a 115°C durante 3 horas, ocorrendo a precipitação de um sólido amarelo. Deixou-se a mistura arrefecer e filtrou-se o sólido sob vácuo, lavou-se com água destilada e secou-se na bomba a vácuo. O composto **4** foi obtido sob a forma de um sólido amarelo (2,6 g, η = 96,0 %), e caracterizado por ¹H RMN.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) **δ**: 3,92 (s, 3H, CH₃), 3,95 (s, 3H, CH₃), 3,97 (s, 3H, CH₃), 3,98 (s, 3H, H₃), 6,34 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, CH), 6,54 (d, 1H, $J=2,2$ Hz, CH), 6,98 (t, 1H, $J=4,5$ Hz, CH), 7,41 (s, 1H, OH), 7,78-7,81 (m, 2H, 2xCH) ppm.

2.1.5 Síntese da 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**5**)



A esterificação do composto **4** foi feita, com a adição de 0,82 mL (5,86 mmol, 3,0 eq.) de trietilamina a uma solução do composto **4** (0,70 g, 1,95 mmol) dissolvido em 20 mL de DCM. Deixou-se a mistura reagir por meia hora, seguidamente colocou-se sob um banho de gelo e adicionou-se 0,47 mL (5,86 mmol, 3,0 eq.) de cloreto de acrilóilo. Deixou-se a mistura sob agitação a temperatura ambiente por 5 horas. O produto foi extraído com solução saturada NaHCO₃ (50,0 mL x3). Adicionou-se Na₂SO₄ anidro à fase orgânica, filtrou-se e removeu-se o solvente sob vácuo. O produto bruto foi obtido sob a forma de sólido castanho, e foi purificado através de cromatografia em coluna em sílica gel, utilizando a mistura de hexano/acetato de etilo (1:9) como eluente. O composto **5** foi obtido sob a forma de sólido branco (0,7 g, η = 78,9 %) e caracterizado através de espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 3,90 (s, 3H, CH₃), 3,90 (s, 3H, CH₃), 3,93 (2 x s, 6H, CH₃), 6,02 (dd, 1H, *J*=1,3Hz, *J*=10,4Hz, CH), 6,36 (d, 1H, *J*= 2,4Hz, CH), 6,37 (dd, 1H, *J*=10,5Hz, *J*=17,3Hz, CH), 6,52 (d, 1H, *J*=2,3 Hz, CH), 6,63 (dd, 1H, *J*=1,3Hz, *J*=17,3Hz, CH), 7,37 (d, 1H, *J*=2,1 Hz, CH), 7,48 (dd, 1H, *J*=2,1 Hz, *J*=8,5Hz, CH) ppm.

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 55,9, 56,1, 56,1, 56,4, 92,7, 96,2, 108,9, 110,9, 111,0, 121,8, 122,4, 127,3, 133,4, 133,6, 148,9, 151,3, 153,4, 159,2, 161,3, 163,3, 164,4, 170,6 ppm.

2.2 Síntese e caracterização dos Polímeros Molecularmente Impressos

Procedimento geral:

Para a síntese dos MIPs dissolveu-se cerca de 0,03 g (0,0791 mmol, 1 eq.) de donepezilo•HCl em 5 ml de acetonitrilo, 1 ml de DMSO e 1 ml de CHCl₃. Adicionou-se o(s) monómero(s) **Ia-b** (ácido acrílico (**Ia**), acrilamida (**Ib**)) e/ou monómero **3** ou **5**, e procedeu-se à pré-polimerização no banho de ultrassons durante 15 min. Seguidamente, adicionou-se o *crosslinker* (EGDMA 20 eq 1,59 mmol; 0,3 mL ou 14 eq.; 1,1 mmol; 0,21 ml, ou TMPTA 14 eq.; 1,1 mmol; 0,35 ml) e o AIBN (2,3 eq; 0,180 mmol; 0,0299 g) e colocou-se a mistura reacional a 75 °C durante 24 horas. Para cada MIPs sintetizados, as proporções de todos monómeros e *crosslinkers* estão devidamente especificadas na tabela 1. Após este tempo de polimerização, procedeu-se à lavagem do polímero através de uma extração por soxhlet com a mistura MeOH:AcOH (9:1) durante 24h e MeOH durante 24h. O polímero foi seco na bomba de vácuo. Simultaneamente sintetizou-se o polímero molecularmente não-impresso (NIP) utilizando o mesmo procedimento, porém, sem a adição de donepezilo•HCl.

Utilizando este procedimento sintetizaram-se nove MIPs e respetivos NIPs, de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Polímeros molecularmente impressos sintetizados, monómeros funcionais e agentes de ligação cruzada (*Crosslinkers*) utilizados, e respectivas quantidades.

	<i>Monómero Ia-b</i>			<i>Monómero 3 ou 5</i>			<i>Crosslinker</i>
	(eq.)	(mmol)	($\mu\text{L}/\text{mg}$)	(eq.)	(mmol)	(mg)	(eq.)
MIP-1	Ia (4)	0,32	21,70	-	-	-	EGDMA (14)
NIP-1	Ia (4)	0,32	21,70	-	-	-	EGDMA (14)
MIP-2	Ia (4)	0,32	21,70	-	-	-	TMPTA (14)
NIP-2	Ia (4)	0,32	21,70	-	-	-	TMPTA (14)
MIP-3	Ia (3)	0,24	16,30	3 (1)	0,0791	41	EGDMA (14)
NIP-3	Ia (3)	0,24	16,30	3 (1)	0,0791	41	EGDMA (14)
MIP-4	Ib (1,7)	0,14	9,60	3 (2)	0,158	83	EGDMA (20)
NIP-4	Ib (1,7)	0,14	9,60	3 (2)	0,158	83	EGDMA (20)
MIP-5	Ib (1)	0,08	6,00	3 (2)	0,158	83	EGDMA (20)
NIP-5	Ib (1)	0,08	6,00	3 (2)	0,158	83	EGDMA (20)
MIP-6	Ia (3)	0,24	16,30	5 (1)	0,0791	32,6	EGDMA (14)
NIP-6	Ia (3)	0,24	16,30	5 (1)	0,0791	32,6	EGDMA (14)
MIP-7	Ia (2)	0,16	11,00	5 (2)	0,158	65,2	EGDMA (14)
NIP-7	Ia (2)	0,16	11,00	5 (2)	0,158	65,2	EGDMA (14)
MIP-8	Ia (3)	0,24	16,30	5 (1)	0,0791	32,6	TMPTA (14)
NIP-8	Ia (3)	0,24	16,30	5 (1)	0,0791	32,6	TMPTA (14)
MIP-9	Ia (2)	0,16	11,00	5 (2)	0,158	65,2	TMPTA (14)
NIP-9	Ia (2)	0,16	11,00	5 (2)	0,158	65,2	TMPTA (14)

2.3 Ensaios de Reconhecimento molecular

2.3.1 Preparação das soluções de diferentes concentrações de donepezilo e dos MIPs e NIPs

Preparou-se soluções aquosas de donepezilo•HCl de concentrações 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 90,0 mg/L através de diluições sucessivas a partir da solução de 180 mg/L, para a realização da curva de calibração. As diferentes soluções foram analisadas por espectroscopia de UV-vis a 272 nm.

2.3.2 Determinação da capacidade de adsorção

Para os diferentes MIPs e NIPs preparados previamente, procedeu-se à preparação de soluções com 5,0 mg de polímero disperso em 5 mL de solução de donepezilo•HCl (12,5; 25,0; 90,0 e 180,0 mg/L). As soluções foram incubadas a 37°C com oscilação de 300 rpm durante 30 min. Após este período, as soluções foram centrifugadas e o sobrenadante foi decantado e analisado por espectroscopia de UV-vis a 272 nm. Procedeu-se da mesma forma, para as massas de 10,0; e 25,0 mg de MIPs e NIPs dispersas em 5 mL de solução de donepezilo•HCl de diferentes concentrações (12,5; 25,0; 90,0 e 180,0 mg/L). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.4 Ensaios Biológicos

2.4.1 Ensaios de Inibição de colinesterases

Considerações gerais:

O método colorimétrico de Ellman é um dos métodos mais utilizados para a determinação da atividade das colinesterases, por ser um método rápido, simples, preciso e com medição direta da atividade enzimática, seja em sangue ou tecidos. Este método é baseado na reação entre a tiocolina, um dos produtos da hidrólise enzimática do substrato sintético iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina, com o grupo sulfidrilo do cromogéneo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman). Desta forma, ocorre a formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico de coloração amarela, o qual pode ser medido através da quantificação da absorvância a 412 nm [71]. Na figura 9 está representada a reação de hidrólise do iodeto de butiriltiocolina/acetiltiocolina catalisada pela BuChE/AChE, utilizando o método de Ellman [71].

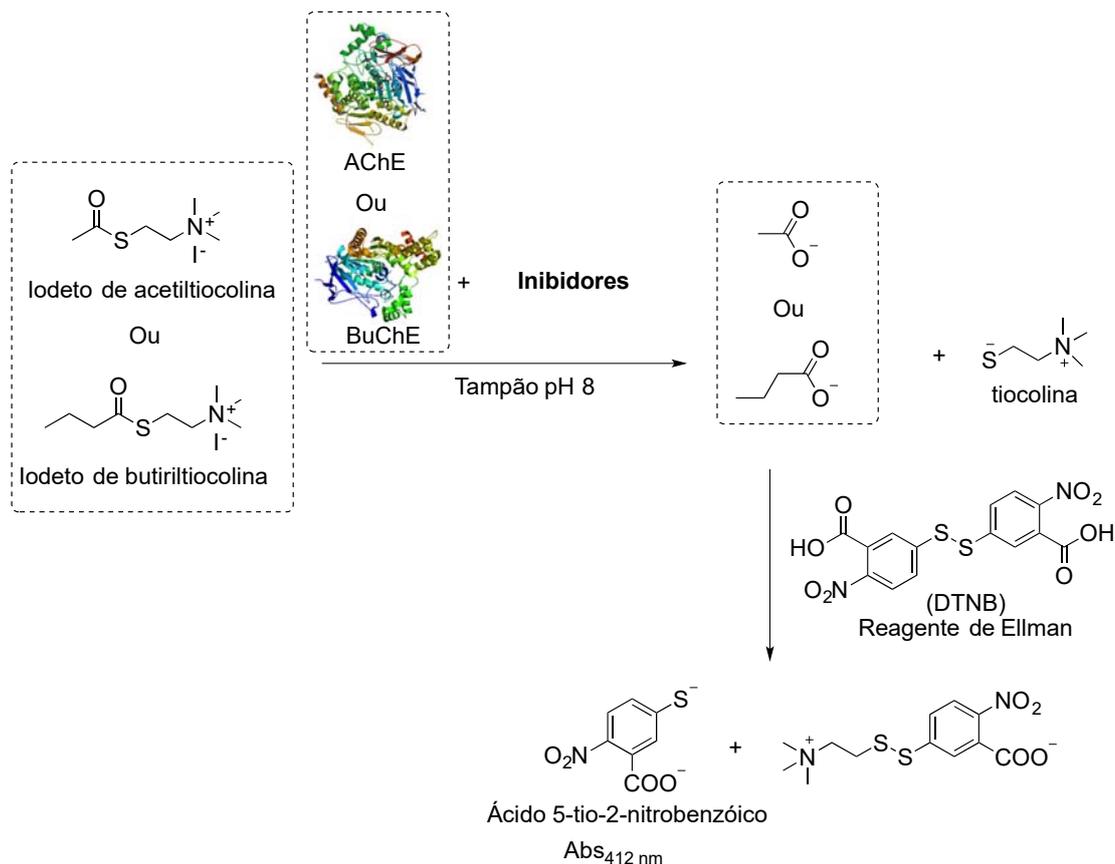


Figura 9. Reação de hidrólise da iodeto de butiriltiocolina/iodeto de acetiltiocoline catalisada pela AChE/BuChE, utilizando o método de Ellman.

Para a elaboração deste estudo utilizaram-se os reagentes, tais como iodeto de acetiltiocolina (ATCI), iodeto de butiriltiocolina (BTCl), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) ou reagente de Ellman e DMSO. As enzimas selecionadas foram compradas à Sigma-Aldrich: acetilcolinesterase de enguia elétrica (*eeAChE*) (E.C.3.1.1.7, Tipo VI-S, pó liofilizado, 500 U/2 mg), butirilcolinesterase de soro equino (*eqBuChE*) (E.C. 3.1.1.8, pó liofilizado, 10,9U/mg). O inibidor utilizado donepezilo (TCI).

2.4.1.1 Preparação de soluções

A solução de *eeAChE* de concentração 0,3 U/mL em tampão fosfato 100 mM (pH 8) foi preparada a partir da *eeAChE* 500 U/2 mg de proteína.

A solução de *eqBuChE* de concentração 0,3 U/mL em tampão fosfato 100 mM (pH 8) foi preparada a partir da *eqBuChE* 10,9 U/1 mg de proteína.

Foram preparadas as soluções de substratos ATCI a 15,0 mM e BTCI a 8,0 mM em H₂O. As soluções de DTNB a 3,0 e 1,6 mM, foram preparadas através da dissolução da quantidade adequada do reagente e NaHCO₃ (0,038 eq.) em tampão fosfato 100 mM (pH 7).

Nota: Estas soluções devem ser frescas, preparadas apenas no dia da utilização.

Procedeu-se soluções seriadas dos MIPs e NIPs de acordo a descrição na secção 2.5.1.3. Foram preparadas soluções seriadas de donepezilo•HCl em água destilada de 0,0003; 0,0012; 0,0048; 0,0191; 0,0763; 0,305; 1,22; 4,88; 19,53; 78,13 e 312,15 µM por diluições sucessivas a partir de uma solução-mãe de 11 mM.

2.4.1.2 Avaliação da atividade inibitória dos materiais contra a *eeAChE* e *eqBuChE*

Numa microplaca de 96 poços, adicionou-se 20 µL de diferentes concentrações de donepezilo•HCl, 55 µL de tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0), 125 µL de DTNB (3,0 mM ou 1,6 mM) e 25 µL de *eeAChE* (0,3 U/mL) ou *eqBuChE* (0,3 U/mL). Deixou-se incubar durante 15 minutos a 37 °C. Seguidamente, adicionou-se 25 µL de ATCI (15 mM) ou BTCI (8,0 mM) a cada poço e voltou-se a incubar durante 15 minutos a 37 °C. Por fim, a microplaca (absorvância) foi lida a 25 °C a 412 nm no leitor de microplacas *Molecular Devices Spectra Max iD3*. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.4.2 Estudos de Biodegradação:

2.4.2.1 Curvas de calibração para os compostos 2 e 5

Preparou-se soluções aquosas do composto 2 (0, 0,006, 0,018, 0,053, 0,159, 0,477 µg/mL), e analisaram-se por espectroscopia de fluorescência com λ_{ex} 380 nm e λ_{emi} 540

nm, para a realização da curva de calibração, necessária para o doseamento dos potenciais produtos de degradação.

Preparou-se soluções aquosas do composto 5 (0, 0,134, 0,404, 1,21, 3,36 $\mu\text{g/mL}$), e analisaram-se por espectroscopia de fluorescência com λ_{ex} 340 nm e λ_{emi} 470 nm, para a realização da curva de calibração, necessária para o doseamento dos potenciais produtos de degradação.

2.4.2.2 Ensaio de Biodegradação

Neste estudo utilizaram-se os MIP-4, MIP-9 e a enzima proteinase K (NZy Mag Proteinase K). Pesou-se 1 mg de MIP-4 ou MIP-9 para um microtubo (ensaio realizado em triplicado para cada MIP) e adicionou-se 1 mL de PBS 100 μM , pH 7 ou pH 8 (MIP-9) e 25 μL de enzima proteinase K. Foram preparadas duas soluções controlo (A e B) para cada MIP em estudo, o controlo A continha 1 mg de MIP, 1 mL de PBS 100 μM , pH 7 ou pH 8 e o controlo B continha 25 μL de enzima proteinase K e 1 mL de PBS 100 μM , pH 7 ou pH 8. Estas soluções foram incubadas a 37°C durante 24h. As soluções foram centrifugadas (1 min) e o sobrenadante foi decantado e analisado por espectroscopia de fluorescência. Para o MIP-4 utilizou-se o comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) 380 nm e o de emissão (λ_{emi}) 540 nm e para MIP-9 utilizou-se λ_{ex} 340 nm e λ_{emi} 470 nm. Os resultados estão apresentados na tabela 5. Os polímeros foram desidratados a 40 °C e determinou-se a massa. A estrutura do produto de degradação, depois de seco, foi analisada por FTIR (figura 25 e 26). Para o MIP-4 usou-se o PBS 100 μM , pH 7 e o MIP-9 PBS 100 μM , pH 8.

2.4.3 Ensaios de viabilidade celular

2.4.3.1 Manutenção e mudas das células MCF-7 (Carcinoma Mamário Humano)

Avaliou-se a quantidade de células com recurso a um microscópio invertido e por

observação da cor que o meio apresentava (este contém um indicador de pH que fica amarelo quando existem muitas células no meio), procedeu-se à remoção do meio e de seguida à aplicação de um protocolo de tripsinização (com o intuito de "descolar" as células aderentes do frasco de cultura) ao qual se expôs a cultura celular durante cerca de 2 min. Após aplicação do protocolo observaram-se as células novamente ao microscópio e adicionou-se cerca de 5 mL de meio de cultura fresco para inibir a ação da tripsina. O novo meio de cultura contendo as células foi então incubado numa incubadora de CO₂ de forma a manter as células num ambiente idêntico ao biológico e propício à sua multiplicação.

2.4.3.2 Preparação das culturas celulares em microplaca

As microplacas de 96 poços usadas foram então sujeitas às culturas celulares após estas serem (re)suspendidas e mantendo um ratio aproximado de 5000 células/poço. Procedendo-se então à sua incubação na incubadora de CO₂ durante 24 horas.

2.4.3.3 Preparação das soluções de diferentes concentrações dos MIPs/NIPs em estudo

Procedeu-se às diferentes diluições seriadas dos MIP/NIPs-9 (3,3; 10; 30 e 90 µg/mL). Para o donepezilo realizaram-se diluições de 2,2; 6,6; 20 e 60 µg/mL e diluições sucessivas de uma solução padrão para elaboração de uma curva de calibração (0; 0,0024; 0,00475; 0,0095; 0,019; 0,0375; 0,075; 0,15 e 0,3 µg/mL).

2.4.3.4 Exposição das células aos diferentes MIPs e NIPs

Expuseram-se as células a 100 µL dos diferentes MIP/NIPs (MIP-3, MIP-4, MIP-8, MIP-9 e seus respectivos NIPs) em quadruplicado nessas concentrações. Colocou-se ainda, em cada uma das microplacas de 96 poços, um controlo negativo (8 poços apenas com meio de cultura e as células lá aderentes) e o controlo positivo (8 poços com meio

de cultura e uma solução de SDS 0,5 % (10 µL de SDS 5 %) e as células aderentes).

2.4.3.5 Ensaio WST-8

Com recurso ao KIT WST-8 (Cayman Chemical Company) precedeu-se à adição de 10 µL da mistura WST-8 a cada poço com uma micropipeta multicanal. Misturou-se gentilmente durante 1 min num agitador orbital e incubou-se durante 1h a 37°C na incubadora de CO₂. Após incubação misturou-se suavemente durante 1 min no agitador orbital e mediu-se a absorvância a 450 nm.

2.4.3.6 Exposição a diacetato de fluoresceína

Preparou-se uma solução de trabalho de diacetato de fluoresceína (DAF) com concentração 2 µg/mL em tampão fosfato salino (PBS 100 µM, pH 7) e uma solução-mãe de 5 mg/mL de DAF em acetona, essa que foi diluída em PBS para obtenção dos padrões usados para elaboração de uma curva de calibração. Posteriormente retirou-se os meios de cultura das microplacas incubadas durante 24 horas e lavou-se uma vez os 96 poços com 100 µL de PBS (100 µM, pH 7). Adicionou-se 100 µL de solução de trabalho DAF com uma micropipeta multicanal e incubou-se 5 min a 37°C. Após incubação descartou-se a solução de trabalho DAF e lavaram-se as células uma vez com 100 µL de PBS (100 µM, pH 7).

2.4.3.7 Lise celular e medição da fluoresceína

Preparação de uma solução 0,5 % de Trítion-X-100 em PBS (100 µM, pH 7). Após a última lavagem do ponto 2.4.3.6 eliminou-se o PBS e adicionou-se 150 µL de Trítion-X-100 a 0,5% em PBS (100 µM, pH 7), procedeu-se à incubação durante 5 min a 37°C na incubadora de CO₂. Transferiu-se 50 µL de lisado para os poços vazios de uma microplaca de 96 poços branca e quantificou-se a intensidade de fluorescência da fluoresceína a λ_{ex} 485 nm e λ_{emi} 535 nm.

2.5 Ensaio de libertação *in vitro*:

2.5.1 Preparação das soluções de donepezilo em diferentes pHs 3, 5,5 e 7

O estudo de libertação *in vitro* foi realizado em três meios com pHs diferentes, 3, 5,5 e 7. Foram preparadas soluções de tampão citrato de sódio 100 mM pH 3, tampão fosfato salino (PBS) 100 mM pH 5,5 e PBS 100 mM pH 7.

As curvas de calibração foram preparadas para as três soluções de 360,0 mg/L de donepezilo•HCl nos diferentes tampões de pHs 3, 5,5 e 7, e a partir destas procedeu-se diluições sucessivas para a preparação das soluções padrão com as seguintes concentrações: 180,0, 90,0, 75,0, 50,0, 25,0, 12,5, 6,25 e 3,125 mg/L.

2.5.2 Carregamento dos MIPs com o donepezilo:

Pesou-se rigorosamente 25,0 mg de MIP/NIP para um microtubo de 2 mL e adicionou-se 1,7 ml da solução aquosa de donepezilo•HCl (400 mg/L) de diferentes pHs. Incubou-se a 37°C sob agitação durante 15 horas. Seguidamente, centrifugou-se a solução e decantou-se o sobrenadante e reservou-se. O MIP foi lavado com 500 µL de água, centrifugou-se e reservou-se. O doseamento do donepezilo•HCl no sobrenadante e na água de lavagem foi realizado através espectroscopia de UV-vis utilizando a curva de calibração. A determinação do donepezilo•HCl imobilizado no MIP foi realizado através da diferença das concentrações inicial e de sobrenadante. Guardou-se o MIP carregado para o estudo de libertação *in vitro*.

2.5.3 Ensaio de Libertação do Donepezilo

Ao microtubo contendo MIP/NIP carregado com o donepezilo•HCl adicionou-se 1,7 mL de solução (tampão citrato de sódio pH 3 ou PBS 100 mM pH 5,5 ou PBS 100 mM pH 7) e incubou-se a 37°C sob agitação durante meia hora. Centrifugou-se na microcentrifuga durante 2 min, decantou-se o sobrenadante e mediu-se a absorvância em

triplicados a 272 nm. Ao MIP/NIP sedimentado adicionou-se 1,7 mL da solução de tampão nova (tampão citrato de sódio pH 3 ou PBS 100 mM pH 5,5 ou PBS 100 mM pH 7), e voltou-se a incubar durante o período de 1 hora, voltou-se a centrifugar e a remover a sobrenadante para análise. Repetiu-se o mesmo procedimento durante 260 horas (10 dias). Os ensaios foram realizados em duplicados para os diferentes pHs. Os resultados estão apresentados nas figuras 30, 31 e 32.

3 Discussão e Tratamento de Resultados

O principal objetivo deste projeto de mestrado foi preparar um novo SEFs para o donepezilo, um dos fármacos aprovados pela FDA para o tratamento dos sintomas da DA, com intuito de proporcionar uma libertação controlada deste fármaco e conseqüentemente aumentar a sua eficácia terapêutica e reduzir os efeitos secundários proporcionando uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Este SEFs será à base de polímeros molecular impressos (MIPs), que serão construídos utilizando monómeros funcionais derivados de quercetina, um flavonóide com inúmeras propriedades biológicas, nomeadamente antioxidante, neuroprotetora e anti-colinesterásica [68]. Pretende-se que este SEFs possua propriedades anti-Alzheimer, nomeadamente antioxidante, neuroprotetora e anti-colinesterásicas, antes e/ou após a sua degradação por ação enzimática ou induzida por variação do pH, para além da libertação sustentada do fármaco.

3.1 Monómeros Funcionais Derivados de Quercetina

Primeiramente, foi necessário preparar os monómeros funcionais derivados de quercetina, para a síntese dos MIPs/NIPs. Os derivados designados foram 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (**3**) e a 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**5**) (Figura 10), os quais apresentam os grupos hidroxilos protegidos com acetilos e metilos, com o objetivo de fornecer alguma hidrofobicidade aos MIPs, de forma a ser mais fácil permear a barreira hematoencefálica.

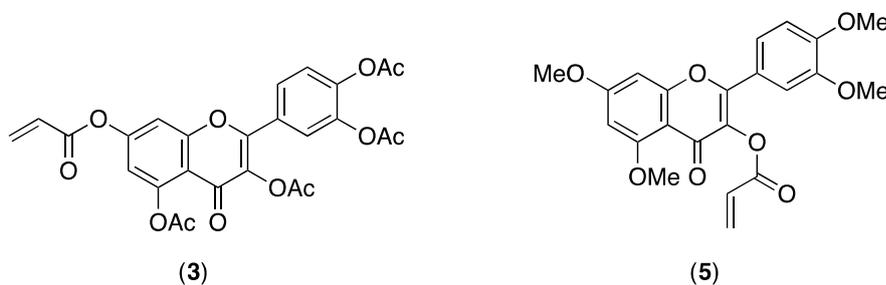
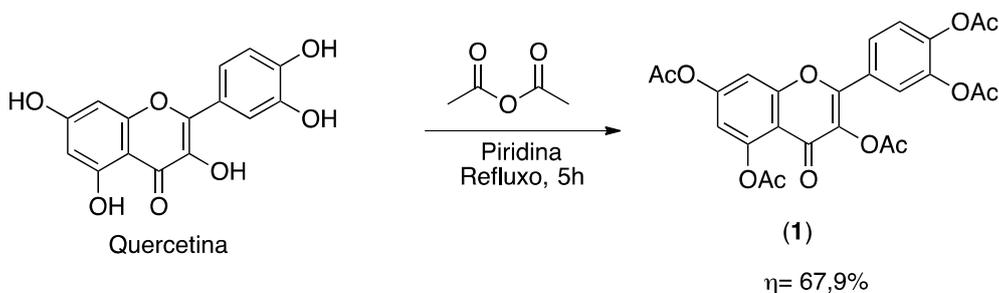


Figura 10. Estrutura dos monómeros funcionais derivados de quercetina: 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (**3**) e a 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**5**).

3.1.1 Síntese dos Derivados de Quercetina

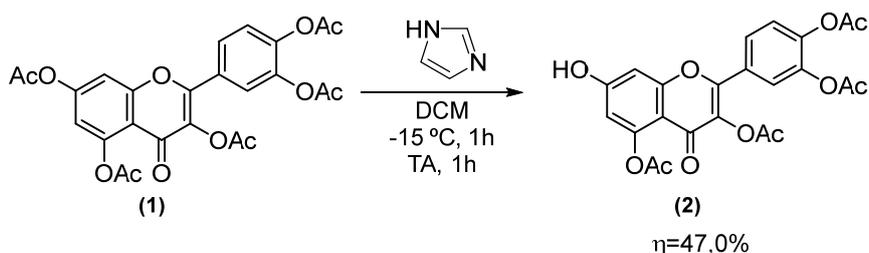
3.1.1.1 Síntese da 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (3)

O monómero funcional 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (**3**) foi sintetizado a partir da quercetina comercial através de 3 passos reacionais que consistem: 1) acetilação; 2) desacetilação seletiva; e 3) esterificação. O primeiro passo consistiu na acetilação dos cinco hidroxilos da quercetina utilizando o anidrido acético em meio básico (utilizou-se a piridina como solvente), sob refluxo com a temperatura controlada a 120°C durante 5h (Esquema 2) [72]. O 3',4',3,5,7-pentacetilquercetina (**1**) foi sintetizado com sucesso, com um rendimento de 67,9%, e a sua estrutura foi confirmada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C APT.



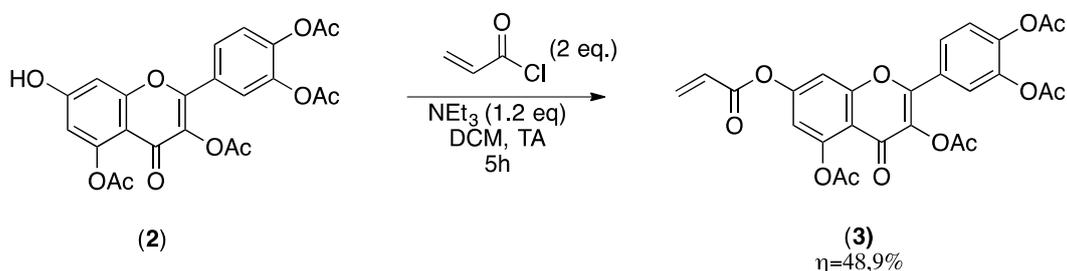
Esquema 2. Síntese de 3',4',3,5,7-pentacetilquercetina (**1**)

O segundo passo consistiu na desacetilação seletiva do grupo acetilo da posição 7 da quercetina. Reagiu-se o composto **1** com 2 eq. de imidazol em DCM à temperatura de -15°C, (Esquema 3) de acordo com o procedimento descrito por Mattarei *et al.* [72]. O produto **4** foi obtido com um rendimento de 47,0% após purificação por cromatografia em coluna. A estrutura do produto **4** foi confirmada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C APT.



Esquema 3. Síntese da 7-hidroxi-3',4',3,5-tetraacetylquercetina (2)

A reação de esterificação do 7-hidroxi-3',4',3,5-tetraacetylquercetina (2) ocorreu usando NEt_3 , que funcionou como base para desprotonar o grupo hidroxilo, formando um alcóxido que conseqüentemente ataca o cloreto de acrilóilo, formando o 7-acrilóxi-3',4',5,7-tetraacetylquercetina (3) com um rendimento de 48,9% (Esquema 4). Trata-se de uma substituição nucleofílica acílica ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$). A estrutura do produto obtido foi confirmada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C APT.



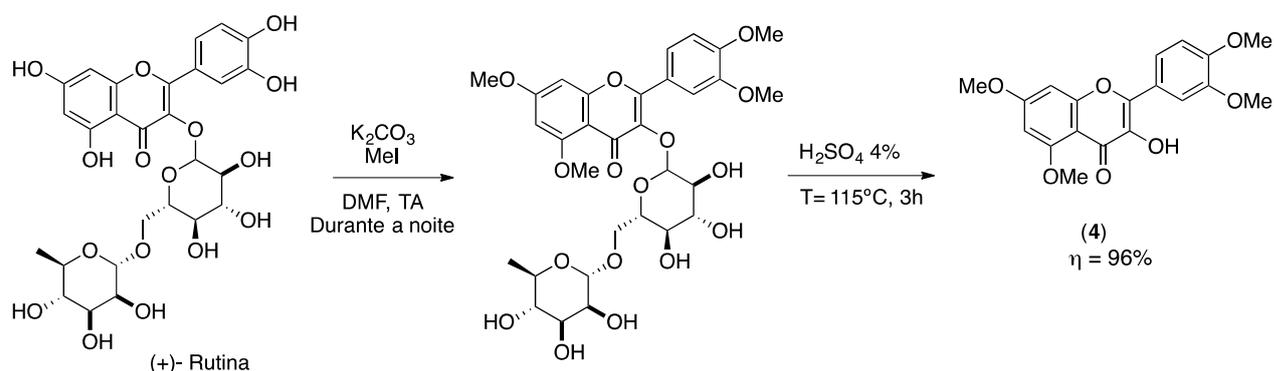
Esquema 4. Síntese da 7-acrilóxi-3',4',3,5-tetraacetylquercetina (3)

3.1.1.2 Síntese da 3-acrilóxi-3',4',5,7-tetraacetylquercetina (5)

A síntese do monómero funcional 3-acrilóxi-3',4',5,7-tetraacetylquercetina (5) foi realizada em duas etapas, a primeira consistiu na preparação do intermediário 3-hidroxi-3',4',5,7-tetraacetylquercetina (4), e a segunda envolveu uma reação de esterificação.

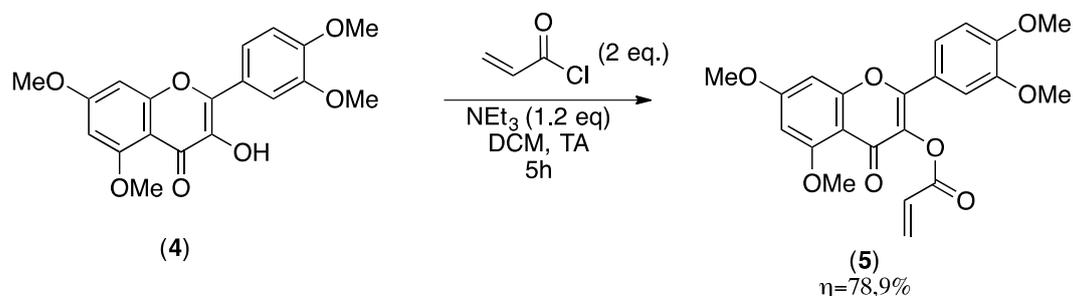
Para a síntese da 3-hidroxi-3',4',5,7-tetraacetylquercetina (4) utilizou-se o método descrito por Kajjout *et al.* [73] que consistiu na metilação da (+)-rutina através da desprotonação dos grupos hidroxilos com a base K_2CO_3 e subsequente ataque

nucleofílico ao iodometano (MeI) em DMF, formando assim a quercetina metilada (**4**) (Esquema 5). O mecanismo envolvido é uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). Seguidamente, ocorre a reação de hidrólise do grupo *O*-rutinosídeo em meio ácido usando uma solução metanólica ácida, obtendo-se o 3-hidroxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**4**) com um rendimento de 96,1%. Após caracterização por RMN de ¹H e de ¹³C confirmou-se a obtenção do produto pretendido puro, não tendo sido necessário qualquer tipo de purificação (Esquema 5).



Esquema 5. Síntese de 3-hidroxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**4**) a partir da (+)-rutina

A segunda etapa consistiu na reação de esterificação do 3-hidroxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**4**) ocorreu através da substituição nucleofílica acílica (S_NAc). Utilizou-se NEt₃, que funcionou como base para desprotonar o grupo hidroxilo, formando um alcóxido que conseqüente ataca o cloreto de acrilóilo, formando o 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**5**) com um rendimento de 78,9% (Esquema 6).



Esquema 6. Síntese de 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**5**)

3.1.2 Caracterização dos Monómeros funcionais:

A caracterização estrutural de todos os compostos sintetizados durante a realização desta dissertação de mestrado foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética de ^1H e ^{13}C APT (*attached proton test*) que atribui multiplicidade C-H em ^{13}C permitindo identificar os diferentes tipos de carbono da molécula (CH , CH_2 , CH_3 e CR_4). Os grupos metino (CH) e metilo (CH_3) aparecem no espectro para baixo, os carbonos quaternários (CR_4) e grupos metileno (CH_2) aparecem para cima [74]. Apenas discutiremos a caracterização estrutural dos dois monómeros funcionais, pois os intermediários já são conhecidos da literatura e os espectros obtidos apresentam o mesmo perfil.

3.1.2.1 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (3)

Confirmou-se a estrutura do 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (**3**) através da análise do espectro de RMN de ^1H (Anexos, Figura A1), os prótons referentes aos quatro metilos ($-\text{CH}_3$) dos grupos acetilos apresentam-se sob a forma de 3 singletos com desvios químicos (δ) entre 2,33 e 2,44 ppm, sendo que 2 singletos apresentam integração de 3H e outro com integração de 6H (ocorreu a sobreposição de dois metilos). Os sinais referentes aos 5 prótons característicos dos grupos CH da quercetina aparecem sob a forma de quatro dupletos ($\delta=6,92$ ppm com $J= 4,0$ Hz, $\delta=7,35$ ppm e $J= 8,0$ Hz, $\delta=7,4$ ppm e $J= 4,0$ Hz, $\delta=7,7$ ppm e $J=4,0$ Hz) e um duplo duplete (dd) com $\delta= 7,7$ ppm e $J=4,0$ Hz e $J=8,0$ Hz. Os sinais dos 3 prótons da ligação dupla do acrilato apresentam-se sob a forma de 3 dd, sendo que os dd referentes aos prótons do $-\text{CH}_2$ aparecem com $\delta=6,67$ ppm e $J=1,0$ Hz e $J=17,0$ Hz e $\delta= 6,11$ ppm $J= 1,0$ Hz e $J=10,0$ Hz, e o dd referente ao $-\text{CH}$ apresenta-se com $\delta= 6,32$ ppm, $J= 10,0$ Hz e $J=17,0$ Hz.

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C APT (Anexos, Figura A2) obtido para o monómero funcional 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (**3**) verificou-se que o composto sintetizado apresenta os CH característicos da quercetina e da ligação dupla, nos seguintes desvios químicos de 109,1, 114,0, 123,9, 124,1, 126,6 127,2 ppm. Os sinais dos carbonos dos 4 grupos $-\text{CH}_3$ referentes ao acetilo aparecem a 20,7, 20,8 (integração de 2), 21,2 ppm.

3.1.2.2 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (5)

Confirmou-se a estrutura do 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (5) através da análise do espectro de RMN de ^1H (Anexos, Figura A3), os prótons referentes aos quatro metilos ($-\text{CH}_3$) dos grupos metoxílicos apresentam-se sob a forma de 4 singuletos com desvios químicos entre 3,90 e 3,94 ppm. Os sinais referentes aos 5 prótons característicos dos grupos $-\text{CH}$ da quercetina aparecem sob a forma de quatro dupletos ($\delta=6,36$ ppm com $J= 2,4$ Hz, $\delta= 6,52$ ppm e $J= 2,3$ Hz, $\delta= 6,94$ ppm e $J= 8,6$ Hz, $\delta=7,37$ ppm e $J= 2,0$ Hz) e um duplo duplete (dd) com $\delta= 7,48$ ppm e $J= 2,1$ Hz e $J=8,5$ Hz. Os sinais dos 3 prótons da ligação dupla do acrilato apresentam-se sob a forma de 3 dd, sendo que os dd referentes aos prótons do $-\text{CH}_2$ aparecem com $\delta= 6,02$ ppm e $J=1,3$ Hz e $J=10,4$ Hz e $\delta= 6,63$ ppm e $J= 1,3$ Hz e $J=17,3$ Hz, e o dd referente ao $-\text{CH}$ apresenta-se com $\delta= 6,37$ ppm, $J= 10,5$ Hz e $J=17,3$ Hz.

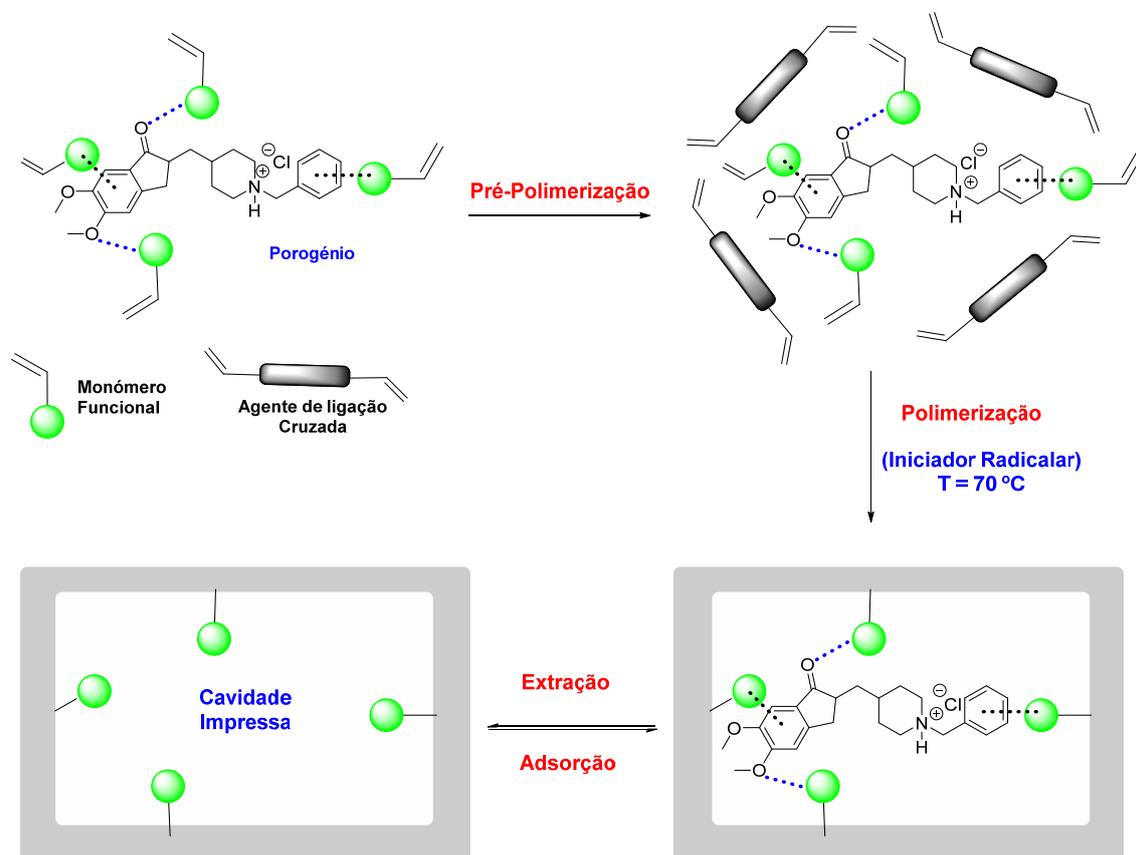
Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C APT (Anexos, Figura A4) obtido para o monómero funcional 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (5) verificou-se que a composto sintetizado apresenta os $-\text{CH}$ característicos da quercetina e da ligação dupla, nos seguintes desvios químicos de 92,7, 96,2, 110,9, 111,0, 121,8 e 127,3 ppm. Os sinais dos carbonos dos 4 grupos $-\text{CH}_3$ referentes ao metóxi aparecem a 55,9, 56,1, 56,1 e 56,4 ppm.

3.2 Preparação e Caracterização dos Polímeros Impressos Molecularmente

3.2.1 Síntese de Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs)

O principal objetivo deste projeto de mestrado foi a síntese dos MIPs utilizando como monómeros funcionais derivados de quercetina. Com os compostos (3) e (5) em mãos, procedeu-se à síntese dos MIPs/NIPs para o donepezilo. No esquema 7, está representado genericamente o processo de síntese de um MIP, que envolve a utilização de monómeros funcionais, agentes de ligação cruzada (*crosslinkers*), porogénio, iniciador radicalar e, obviamente, a molécula modelo, o donepezilo, que serve como molde. Este

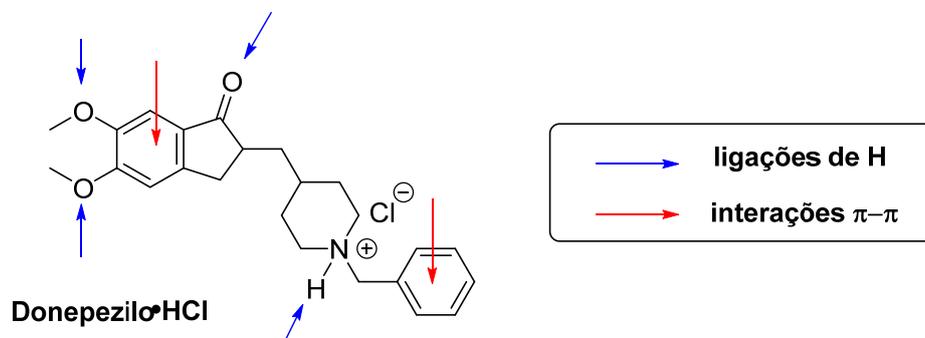
processo de síntese ocorre em três etapas, designadas como: a) pré-polimerização; b) polimerização; e c) extração.



Esquema 7. Esquema genérico para a síntese de polímeros molecularmente impressos (MIP) seletivo para o donepezilo.

A primeira etapa, a pré-polimerização, é uma das mais importantes para a formação das cavidades molecularmente impressas. Nesta etapa, ocorre a formação de um complexo entre a molécula modelo, o donepezilo, e os monómeros funcionais por meio de interações intermoleculares, como ligações de hidrogénio, interações $\pi-\pi$ e forças de Van der Waals. No caso do donepezilo, este pode atuar como aceitador de ligações de hidrogénio e estabelecer interações $\pi-\pi$ com sistemas aromáticos, como ilustrado no esquema 8. Nesta etapa, também é fundamental considerar o porogénio (solvente) a ser utilizado, pois ele deve ser capaz de dissolver todos os reagentes envolvidos na síntese sem, no entanto, apresentar forte tendência a formar interações

intermoleculares com o donepezilo. Isto é crucial para evitar interferências na formação do complexo entre o donepezilo e os monómeros funcionais.



Esquema 8. Potenciais interações entre o donepezilo•HCl e os monómeros funcionais.

A segunda etapa consiste na polimerização entre os monómeros funcionais e o *crosslinker*, permitindo a formação das cavidades impressas. Neste passo, utilizou-se a polimerização em *bulk* com um iniciador radicalar (AIBN) por iniciação térmica.

Por fim, a terceira etapa corresponde à extração da molécula modelo, o donepezilo, das cavidades impressas. Para isso, foi utilizada a extração por Soxhlet com solventes capazes de dissolver o donepezilo e, simultaneamente, remover os resíduos da síntese.

Na tentativa de encontrar o MIP com melhores propriedades de reconhecimento molecular, perfil de libertação otimizado e baixa toxicidade, diversos monómeros funcionais e *crosslinkers* foram utilizados na preparação de nove MIPs e dos respectivos NIPs (Figura 11). Como monómeros funcionais, foram utilizados ácido acrílico (**Ia**), acrilamida (**Ib**) e os compostos (**3**) e (**5**), em diferentes razões estequiométricas. Como *crosslinkers*, foram utilizados EGDMA e TMPTA. A composição dos diferentes MIPs e NIPs está representada na tabela 2.

Tabela 2. Constituição dos polímeros sintetizados MIPs/NIPs.

	<i>Monómero Ia-b (eq.)</i>	<i>Monómero 3 ou 5 (eq.)</i>	<i>Crosslinker (eq.)</i>	Massa do Polímero (mg)
MIP-1	Ia (4)	-	EGDMA (14)	305,0
NIP-1	Ia (4)	-	EGDMA (14)	188,0
MIP-2	Ia (4)	-	TMPTA (14)	-
NIP-2	Ia (4)	-	TMPTA (14)	-
MIP-3	Ia (3)	3 (1)	EGDMA (14)	301,0
NIP-3	Ia (3)	3 (1)	EGDMA (14)	290,0
MIP-4	Ib (1,7)	3 (2)	EGDMA (20)	444,0
NIP-4	Ib (1,7)	3 (2)	EGDMA (20)	984,0
MIP-5	Ib (1)	3 (2)	EGDMA (20)	560,0
NIP-5	Ib (1)	3 (2)	EGDMA (20)	131,0
MIP-6	Ia (3)	5 (1)	EGDMA (14)	519,0
NIP-6	Ia (3)	5 (1)	EGDMA (14)	546,0
MIP-7	Ia (2)	5 (2)	EGDMA (14)	310,0
NIP-7	Ia (2)	5 (2)	EGDMA (14)	359,0
MIP-8	Ia (3)	5 (1)	TMPTA (14)	494,0
NIP-8	Ia (3)	5 (1)	TMPTA (14)	272,0
MIP-9	Ia (2)	5 (2)	TMPTA (14)	762,0
NIP-9	Ia (2)	5 (2)	TMPTA (14)	515,0

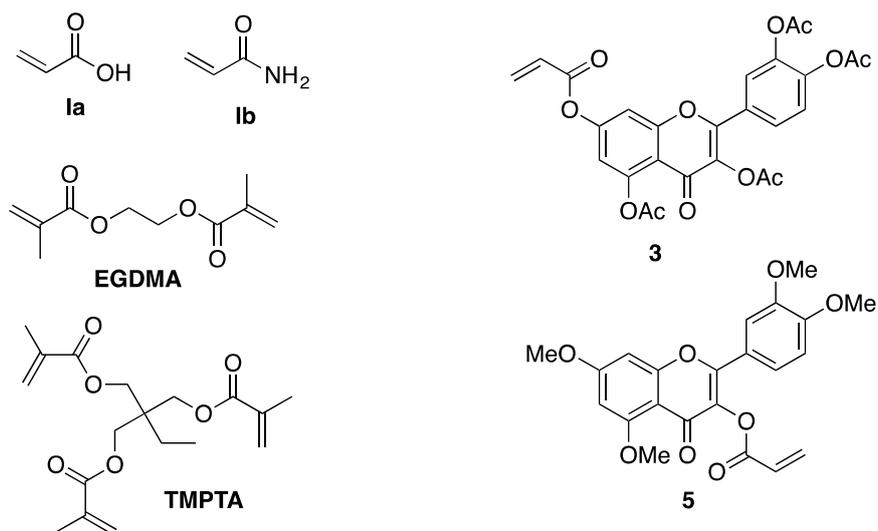


Figura 11. Estruturas dos monómeros funcionais e *crosslinkers* utilizados na síntese dos polímeros.

Os monómeros funcionais derivados da quercetina **3** e **5** possuem os grupos hidroxilo protegidos por acetilos e metilos, respetivamente, o que reduz sua capacidade de doar ligações de hidrogénio para a formação do complexo com a molécula modelo, o donepezilo. Para superar essa limitação, foi necessário combiná-los com monómeros comerciais que sejam bons doadores de ligações de hidrogénio, como é o caso do ácido acrílico **Ia** e da acrilamida **Ib**. Essa estratégia possibilita a formação de um complexo mais estável, favorecendo a criação de cavidades impressas com maior seletividade e eficiência.

Na preparação destes MIPs/NIPs, também foram utilizados dois *crosslinkers* diferentes, o EGDMA e o TMPTA, que se diferenciam na capacidade de estabelecer, respetivamente, duas e três ligações com os monómeros funcionais, permitindo a formação de cavidades mais robustas. Estudos computacionais previamente realizados pelo grupo de investigação, demonstraram que os *crosslinkers* têm um papel fundamental na etapa de pré-polimerização, pois permitem a estabilização do complexo formado entre molécula modelo e os monómeros funcionais [75].

Os diferentes polímeros foram sintetizados através da polimerização em *bulk*, um método já muito explorado pelo grupo de investigação [75, 76, 77]. Utilizou-se como porogénio a mistura de solventes acetonitrilo:DMSO:CHCl₃ (5:1:1) e o 2,2-Azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) como iniciador radicalar através do estímulo da temperatura (70°C). De acordo com a tabela 2, diferentes monómeros funcionais e proporções foram

utilizadas, sendo de 4 equivalentes relativamente ao donepezilo, e os *crosslinkers* foram usados nas quantidades de 14 ou 20 eqs.. Os polímeros foram obtidos sob a forma de blocos, tendo sido necessário ser pulverizados após a extração da molécula modelo com solventes polares, mistura de metanol:ácido acético (9:1) e metanol.

3.2.2 Caracterização físico-química- Composição química – FTIR-ATR

Os MIPs e respetivos NIPs preparados para o donepezilo foram caracterizados quanto à composição química por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR), permitindo a identificação dos principais grupos funcionais presentes nos polímeros. Os espectros encontram-se nas figuras 12 a 14.

Na figura 12 estão apresentados os espectros referentes aos MIPs e NIPs sem flavonóide (MIP/NIPs-1 e 2) preparados apenas com ácido acrílico **Ia**. Os espectros FTIR dos polímeros preparados à base da quercetina acetilada (monómero **3**) combinada com os monómeros comerciais **Ia** (MIP/NIP-3) e **Ib** (MIP/NIP-4) estão representados na figura 13. Os espectros FTIR apresentados na figura 14 referem a caracterização dos polímeros feitos a base do monómero **5**. Os MIP/NIPs-6 e 7 foram sintetizados com o *crosslinker* EGDMA e os MIP/NIPs-8 e 9 com TMPTA.

Os espectros apresentados nas figuras 12, 13 e 14 permitem observar que todos os polímeros (MIP/NIP-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9) apresentam bandas de estiramento da ligação C–O entre 1132 e 1258 cm^{-1} , indicando a presença de grupos funcionais éster e éter, provenientes dos monómeros ou dos agentes de reticulação EGDMA e TMPTA. As bandas de estiramento da ligação C–H alifática, observadas entre 2938–2962 cm^{-1} , confirmam a presença de cadeias alifáticas nas redes poliméricas. Por fim, a banda que surge na região de 1720–1728 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C=O, evidenciando a presença da função éster em todos os polímeros analisados.

Os MIP/NIP-3 e 4 apresentam, de forma particular, uma banda pouco acentuada a 3572 cm^{-1} , que pode estar associada ao estiramento das ligações O–H ou N–H, indicando a presença dos monómeros **Ia** e **Ib** nos MIP/NIP-3 e 4, respetivamente. Por sua vez, os MIP/NIP-6 a 9 também exibem uma banda de baixa intensidade a 3602 cm^{-1} ,

atribuída ao estiramento da ligação O–H, o que confirma a presença do monómero **Ia**. Além disso, observa-se uma banda a 1610 cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramento da ligação C=C, que sugere a presença de grupos acrilato livres e dos anéis aromáticos da quercetina na matriz polimérica.

Através da comparação dos espectros dos MIPs com os correspondentes NIPs, não se observam diferenças entre os mesmos, o que indica que os polímeros apresentam a mesma composição química. Compararam-se também os espectros dos polímeros com o do donepezilo e não se observou a presença deste na rede polimérica, o que confirma a sua extração total após a síntese.

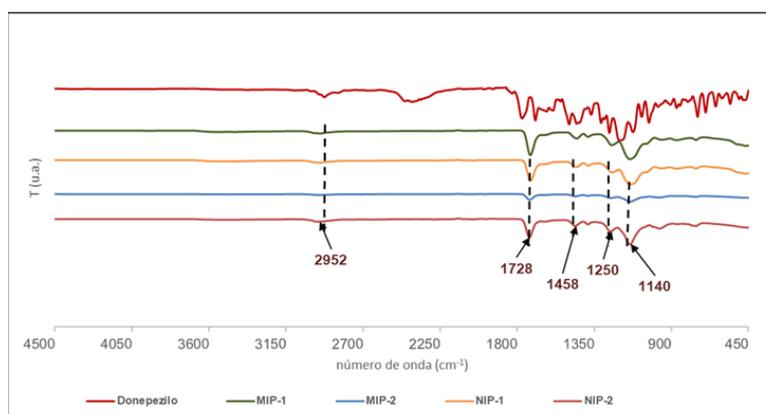


Figura 12. Espectros de FTIR do donepezilo e dos polímeros sintetizados com ácido acrílico **Ia** (MIP/NIP-1 e 2).

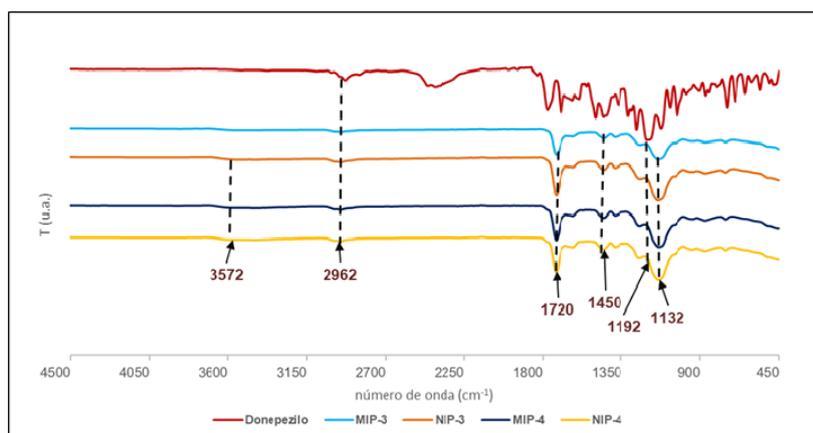


Figura 13. Espectros de FTIR do donepezilo e dos polímeros preparados com o monómero 3.

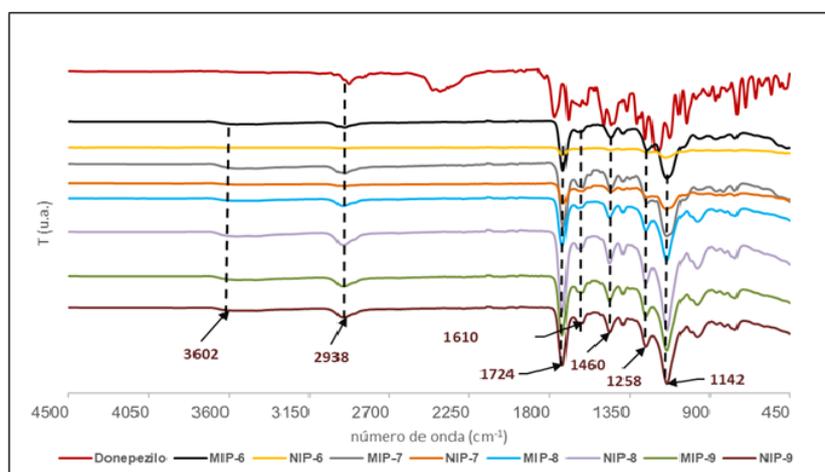


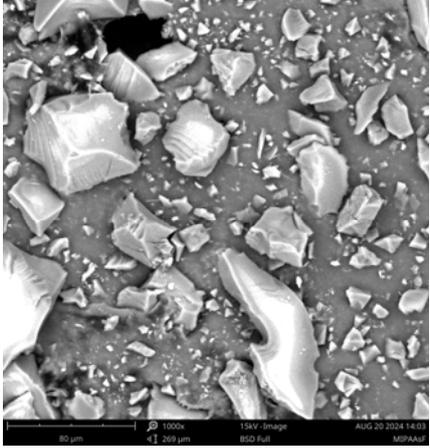
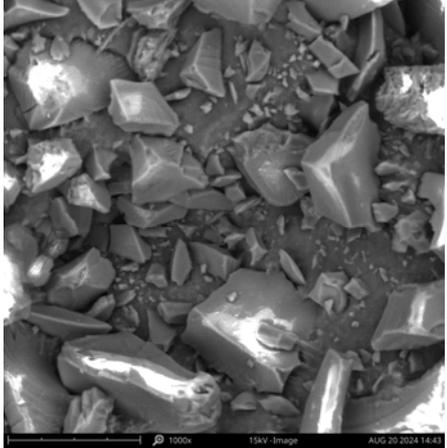
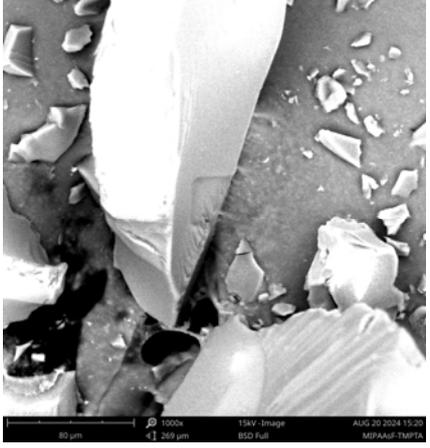
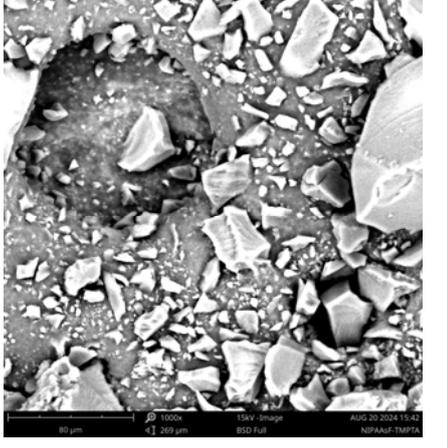
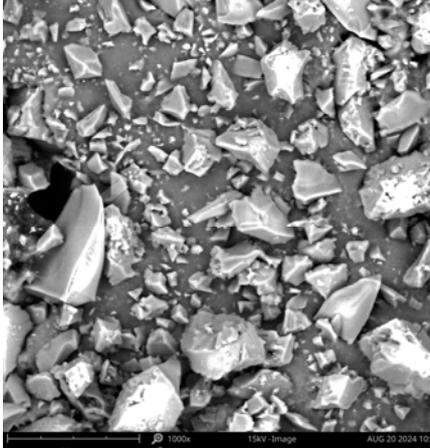
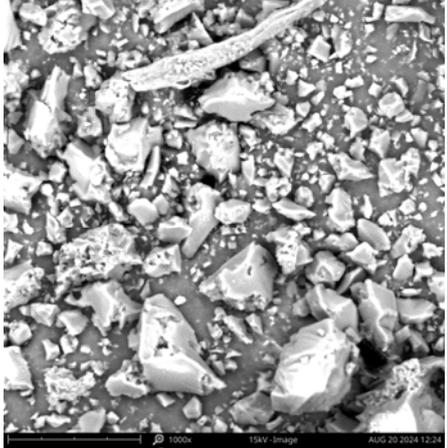
Figura 14. Espectros de FTIR do donepezilo e dos polímeros feitos a base do monómero 5. Os MIP/NIPs-6 e 7 com EGDMA e os MIP/NIPs-8 e 9 com TMPTA.

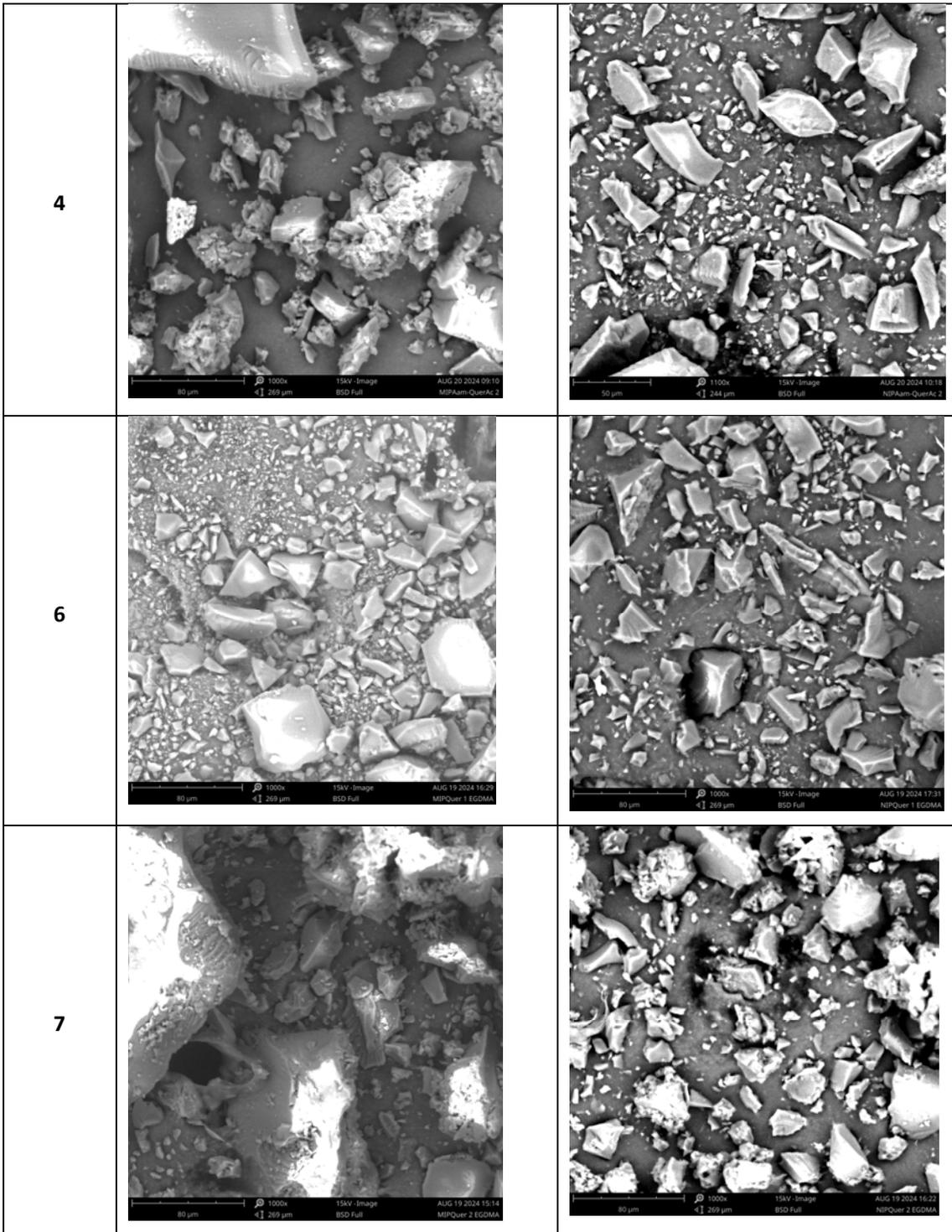
3.2.2.1 Morfologia - SEM

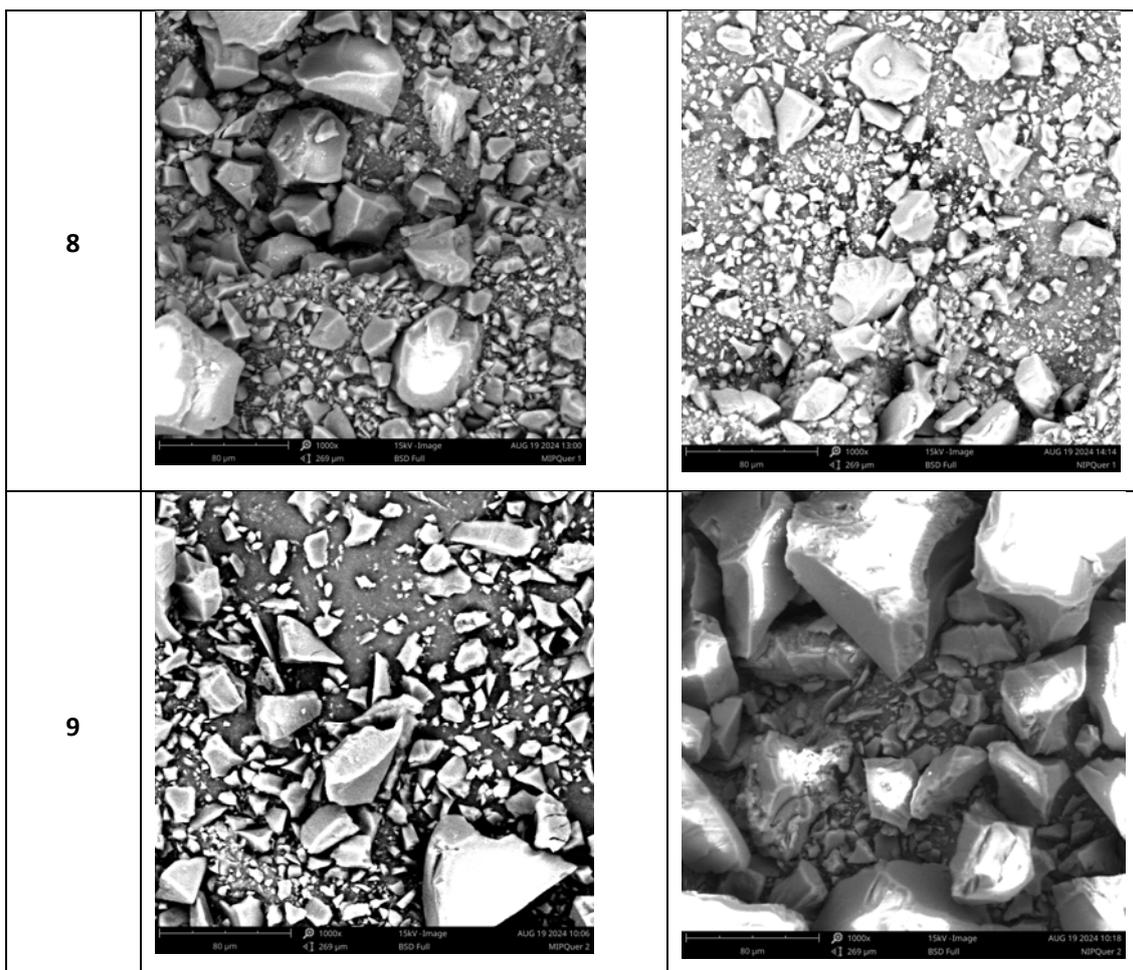
Oito dos nove MIPs e respectivos NIPs preparados neste projeto foram caracterizados quanto à sua morfologia por microscopia de varrimento eletrônica (SEM). As imagens de SEM, obtidas com ampliação de 1000x para cada um dos polímeros, estão apresentadas na tabela 3. Infelizmente, não foi possível adquirir imagens com ampliação maior devido a um problema técnico no equipamento SEM utilizado. Consequentemente, as informações obtidas a partir dessas imagens sobre a morfologia dos MIPs e seus

respetivos NIPs foram bastante limitadas e não permitiram tirar conclusões sobre o efeito da molécula modelo no processo de polimerização.

Tabela 3. Imagens de SEM dos polímeros preparados.

Polímero	MIP	NIP
1		
2		
3		





3.3 Ensaios de Reconhecimento Molecular

3.3.1 Identificação e Quantificação do Donepezilo

Os ensaios de reconhecimento molecular têm como finalidade avaliar a capacidade de retenção dos materiais poliméricos preparados (MIPs e NIPs) para a molécula modelo, o donepezilo. Primeiro, traçou-se uma recta de calibração para o donepezilo a partir de soluções padrão de concentração conhecida, com o objetivo de se dosar o donepezilo. Na figura 15, encontra-se o gráfico referente à curva de calibração, com a reta traçada segundo a equação: $y = 0,0321x - 0,0777$, com um $R^2 = 0,99973$.

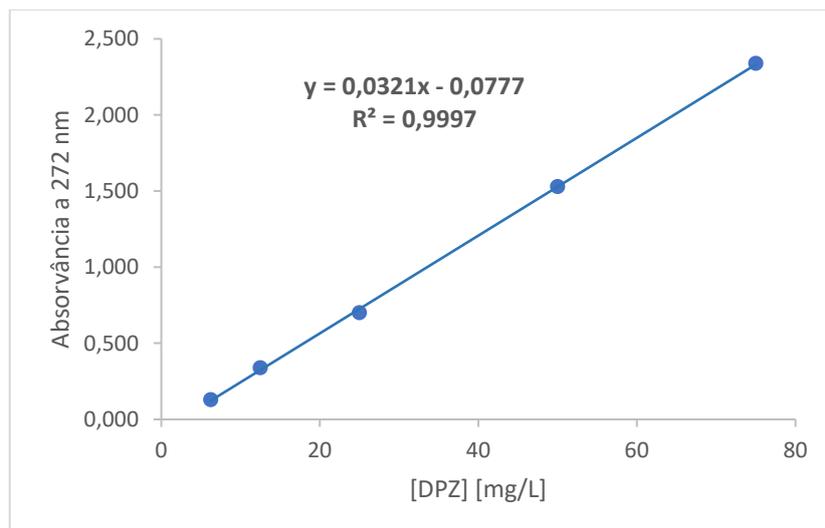


Figura 15. Curva de calibração de donepezilo a 272 nm.

3.3.2 Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular

A avaliação da capacidade de reconhecimento molecular dos MIPs e respectivos NIPs para o donepezilo foi realizada inicialmente para os MIP/NIP-1 e MIP/NIP-2. Foram testadas massas de 5, 10 e 25 mg de polímero, cada uma incubada com soluções aquosas de donepezilo·HCl em concentrações de 12,5, 25, 90 e/ou 180 mg/L, designadas como concentrações iniciais (C_0), por 30 minutos a 37°C. Em seguida, determinou-se a concentração no sobrenadante (C_s) por espectrofotometria de UV-Vis, utilizando a curva de calibração representada na Figura 16. A concentração adsorvida de equilíbrio (C_e), correspondente à quantidade adsorvida do composto, foi calculada pela fórmula (1):

$$C_e = C_0 - C_s \quad (1)$$

A capacidade de adsorção no equilíbrio (q_e) foi determinada pela fórmula 2:

$$q_e = (C_e \times V) / m \quad (2)$$

Onde V é o volume da solução em litros e m a massa do polímero em gramas.

Os resultados obtidos nos ensaios de reconhecimento molecular, apresentados nas figuras 16, 17, 18 e 19, evidenciam a capacidade diferenciada dos MIPs em relação aos NIPs na adsorção do donepezilo.

No caso do MIP e NIP-2 foi realizado um estudo do efeito da massa do polímero no reconhecimento/adsorção do donepezilo-HCl. Os MIP e NIP-2 foram estudados nas massas de 5, 10 e 25 mg, que foram incubadas com três soluções de donepezilo-HCl de concentrações 25, 90 e 180 mg/L, durante 30 minutos à T= 37°C, e as capacidades de adsorção encontram-se na figura 16.

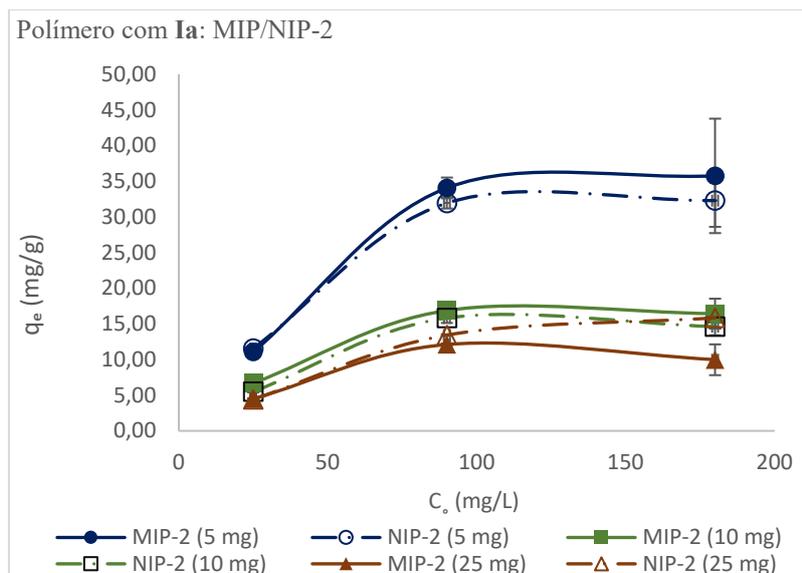


Figura 16. Avaliação da capacidade de adsorção do donepezilo nos MIP/NIP-2 (sem flavonóide).

Os resultados obtidos (Figura 16) indicam que a menor massa de polímero (5 mg) proporcionou maior capacidade de adsorção, atingindo um valor de q_e de aproximadamente 36 mg/g na maior concentração testada. As massas de 10 e 25 mg apresentaram valores de q_e muito semelhantes, sugerindo a saturação dos sítios de adsorção. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os MIPs e seus respectivos NIPs, o que pode indicar que, para esses sistemas, o reconhecimento seletivo ainda é limitado. Na síntese do polímero as interações específicas das ligações de hidrogénio entre o, ácido acrílico (Ia) e o donepezilo-HCl (Figura 17) favorecem a formação de cavidades com características específicas para a adsorção de donepezilo. Como resultado disto, o donepezilo é encapsulado de forma eficiente na matriz polimérica do MIP-2 e conseqüentemente, seria de esperar uma maior capacidade de adsorção. Em contrapartida, o NIP-2 (5 mg de polímero), que não contém esses sítios específicos,

apresenta valores de capacidade de adsorção muito semelhante. Esse fenômeno pode ser atribuído a interações inespecíficas entre o donepezilo e a matriz polimérica, reforçando a necessidade de um controle rigoroso na formulação dos polímeros para minimizar esses efeitos.

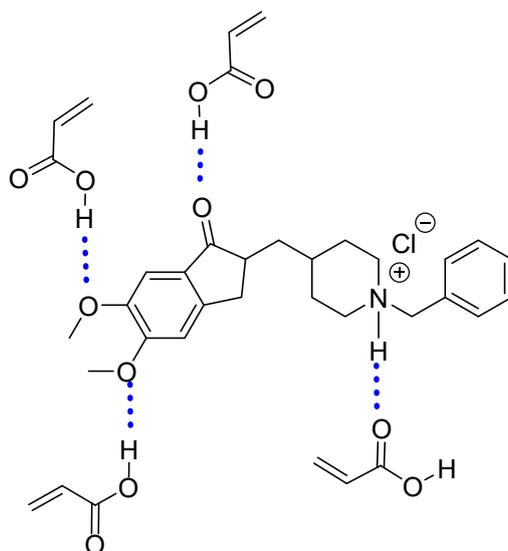


Figura 17. Potenciais interações por ligações de hidrogênio entre o ácido acrílico (**Ia**) e o donepezilo•HCl.

Os polímeros MIP/NIP-1 foram avaliados sob as mesmas condições experimentais, com 5 mg de polímero em soluções de donepezilo•HCl nas concentrações de 12,5, 25 e 90 mg/L (Figura 18). Nesse sistema, foram utilizados 4 eq. do monômero **Ia** e o agente de reticulação EGDMA. Os resultados (Figura 18) revelam uma adsorção de 24,35 mg/g para o MIP-1 e 16,2 mg/g para o NIP-1 (90 mg/L), indicando que o MIP apresenta maior capacidade de adsorção, sugerindo a formação de cavidades específicas. O MIP e NIP-2 apresentaram uma capacidade de adsorção maior, mas por outro lado são menos selectivos que o MIP-1, uma possível justificação pode ter sido pela utilização do EGDMA como agente de reticulação que pode ter contribuído para a rigidez e organização adequada da matriz, aumentando a seletividade do polímero.

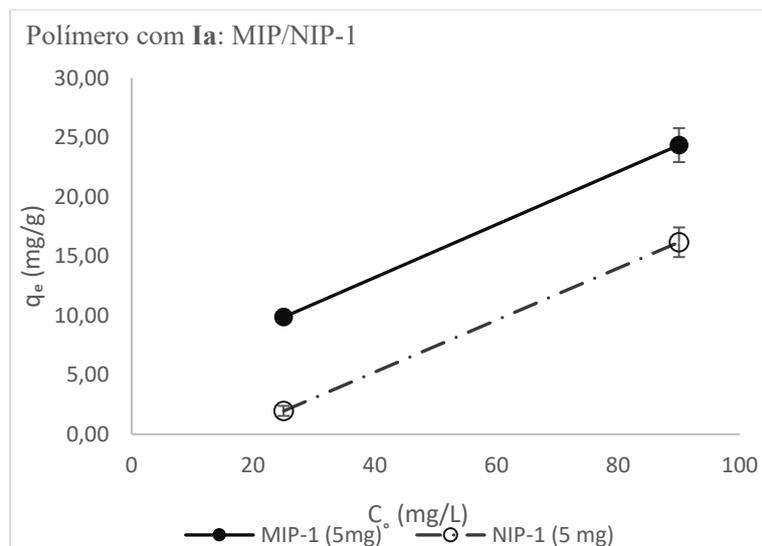


Figura 18. Avaliação da capacidade de adsorção do donepezilo nos MIP/NIP-1 (sem monómero à base de quercetina).

Os MIPs 3 e 4 foram sintetizados com o monómero **3** combinado com os monómeros **Ia** e **Ib**, nas razões de 1:3 e 2:2, respectivamente. Os ensaios foram realizados com 5 mg de polímero e incubados com soluções de donepezilo•HCl nas concentrações de 12,5, 25 e 90 mg/L, durante 30 min. à temperatura de 37 °C. A capacidade de adsorção obtida foi baixa (entre 17,1 e 19,7 mg/g para 90 mg/L), sem diferença significativa entre os MIPs e seus respectivos NIPs, o que indica falha na formação de cavidades impressas (Figura 19). A presença dos grupos acetilo no monómero **3** poderá também ter introduzido um efeito estéreo significativo, limitando a aproximação e o alinhamento adequado da molécula modelo. Este potencial impedimento espacial, aliada à reduzida capacidade doadora de ligações de hidrogénio, pode ter dificultado a formação de complexos estáveis, fundamentais para a formação das cavidades impressas.

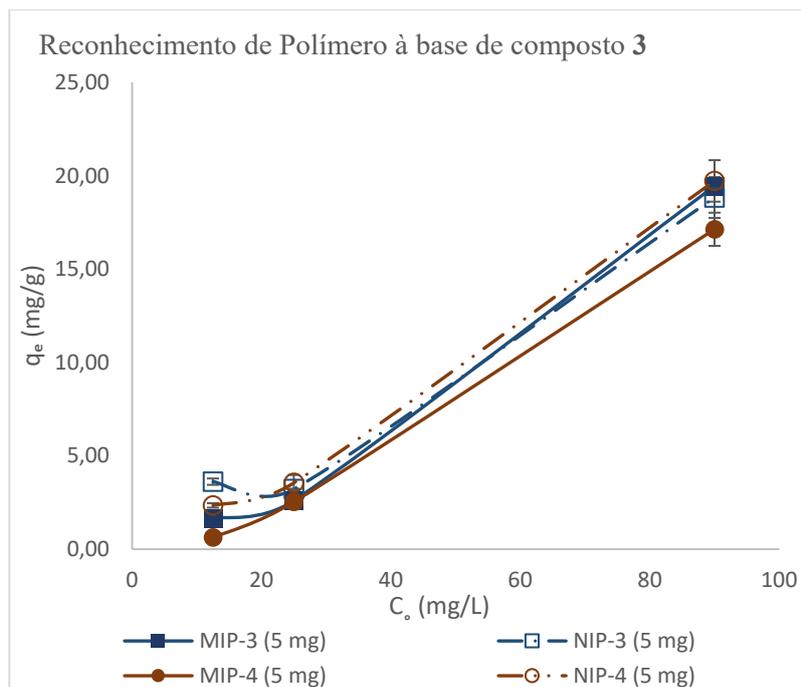


Figura 19. Avaliação da capacidade de adsorção do donepezilo nos MIPs/NIPs à base de composto 3.

Os MIPs e NIPs 6 a 9 foram sintetizados utilizando o composto 5 (quercetina metilada) e o ácido acrílico 1a como monómeros funcionais, nas razões estequiométricas de 1:3 e 2:2, para os MIPs/NIPs 6 e 7 e MIPs/NIPs 8 e 9, respectivamente. Para os MIPs e NIPs 6 e 7 foi utilizado o EGDMA como agente de ligação cruzada, enquanto nos MIPs e NIPs 8 e 9 se recorreu ao TMPTA. Na figura 20 estão representados os potenciais complexos formados entre os monómeros e o donepezilo, através de interações por ligações de hidrogénio e interações π - π .

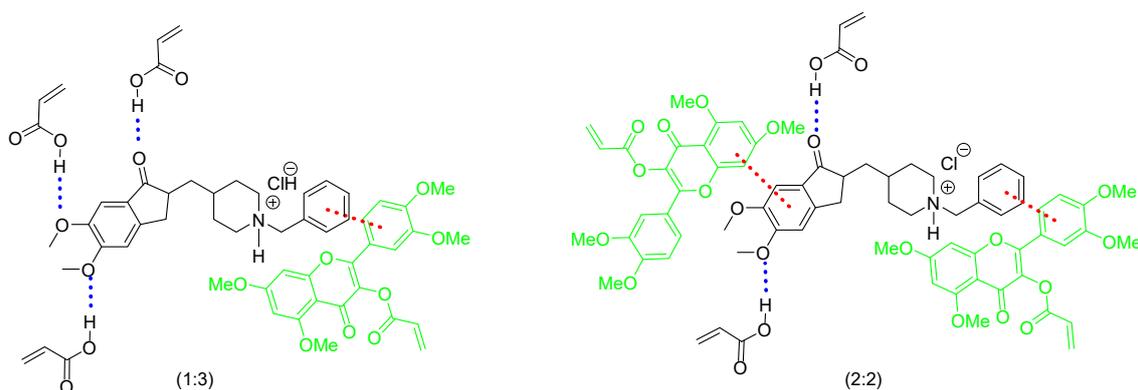


Figura 20. Potenciais complexos formados entre os monómeros **1a** e composto **5**.

Os ensaios de reconhecimento (Figura 21) com 90 mg/L de donepezilo•HCl, o MIP-6 apresentou adsorção de 25 mg/g, enquanto o MIP-7 alcançou 17 mg/g. Acredita-se que a maior quantidade de ácido acrílico (**1a**) no MIP-6 favoreceu a formação de complexos mais estáveis, porém, novamente, não houve diferença significativa entre MIP e NIP. Por outro lado, os MIPs 8 e 9 apresentaram capacidades de adsorção mais elevadas de 34,5 e 38,9 mg/g, respectivamente. A substituição do agente de reticulação por TMPTA parece ter contribuído para o aumento da afinidade e seletividade dos polímeros. Os resultados indicam que os MIPs 8 e 9 foram os sistemas com melhor desempenho, apresentando capacidades de adsorção ligeiramente superiores às de seus NIPs (cerca de 30,9 mg/g). O MIP-9 destacou-se como o mais seletivo, com uma diferença de retenção de aproximadamente 10 mg/g em relação ao seu NIP. O comportamento observado sugere que a eficiência de adsorção aumenta com o aumento da concentração inicial de donepezilo, até um ponto de saturação dos sítios de adsorção.

Estes resultados corroboram estudos anteriores que evidenciam a eficiência do *imprinting* molecular para fármacos específicos, demonstrando que a técnica pode ser uma estratégia promissora para aplicações em sistemas de liberação controlada e sensores biomiméticos [78, 79]. Apesar dos resultados, observou-se adsorção significativa em alguns NIPs, como o NIP-2 (5 mg) e os NIPs 3 a 7, o que evidencia a necessidade de aprimoramentos na formulação e síntese dos polímeros para minimizar as interações inespecíficas.

Investigações futuras devem considerar parâmetros como a escolha e proporção dos monómeros, tipo e quantidade de agente de reticulação, bem como o tempo e até mesmo o método de polimerização, a fim de aumentar a seletividade e a eficiência dos MIPs desenvolvidos.

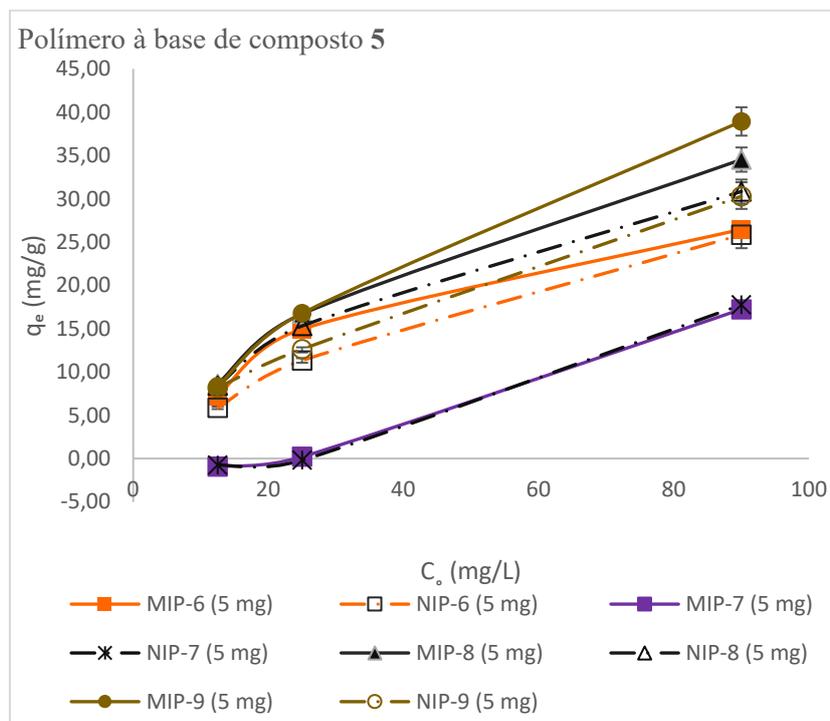


Figura 21. Avaliação da capacidade de adsorção do donepezilo nos MIPs/NIPs à base do composto 5.

3.4 Ensaios Biológicos

3.4.1 Avaliação do potencial inibitório de colinesterases pelos materiais preparados

Como um dos objetivos deste projeto foi que os monómeros à base de falvonóides, os próprios polímeros e os seus produtos de degradação possuíssem propriedades anticolinesterásicas, portanto os monómeros **3** e **5**, e alguns dos polímeros selecionados foram testados como potenciais inibidores das enzimas AChE e BuChE, cuja atividade enzimática foi avaliada através do método de Ellman. Primeiramente, avaliou-se a

inibição enzimática da *eeAChE* e *eqBuChE* pelo donepezilo, utilizando as condições anteriormente optimizadas pelo grupo de investigação [68]. Estudou-se a gama de concentrações de 0,3 - 312 nM (concentrações finais). Os gráficos dose-resposta (atividade enzimática vs Log [inibidor]) permitem definir os patamares de máximo e mínimo de inibição, apartir dos quais se calculam as percentagens de inibição. Os gráficos de inibição dose-resposta obtidos para cada enzima estão apresentados nas figuras 22 e 23. De forma a analisar devidamente os resultados dos novos materiais, utilizou-se o composto donepezilo como inibidor padrão, visto que é o fármaco que pretendemos entregar. Obtiveram-se os valores de concentração de donepezilo que inibem 50% da atividade enzimática (IC_{50}) de $60,97 \pm 0,62$ nM e $3,09 \pm 0,39$ μ M para a *eeAChE* e *eqBuChE*, respetivamente.

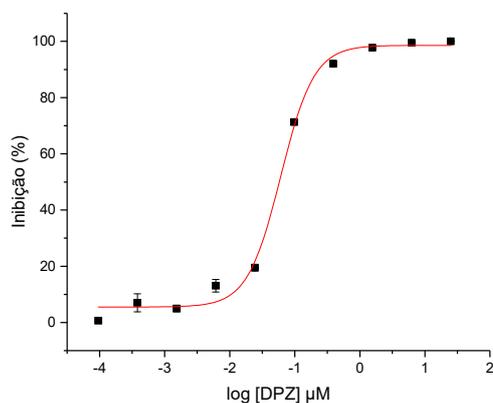


Figura 22. Curva de inibição dose-resposta para o donepezilo contra a *eeAChE* ($IC_{50} = 0,06097 \pm 0,00621$ μ M ou $60,97 \pm 0,62$ nM).

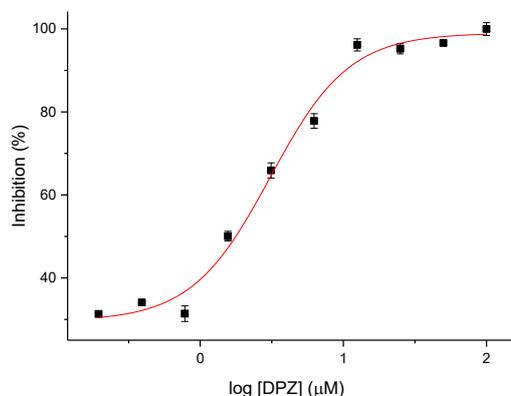


Figura 23. Curva de inibição dose-resposta para o donepezilo contra a *eqBuChE* ($IC_{50} = 3,09 \pm 0,39$ μ M).

Na tabela 4 são apresentados os resultados de percentagem de inibição das enzimas colinesterases (*eeAChE* e *eqBuChE*) pelo donepezilo, pelos compostos **3** e **5**, bem como pelos MIP e NIP-9, na forma livre e após encapsulação de donepezilo. Como esperado, o donepezilo à concentração de 100 μM apresentou inibição de 100% de ambas as enzimas, confirmando a sua eficácia reconhecida como inibidor da *eeAChE* e da *eqBuChE*.

Tabela 4. Inibição das colinesterases (*AChE* e *BuChE*) pelos polímeros não carregados e carregados com donepezilo e pelos monómeros funcionais. *eeAChE* ($\text{IC}_{50} = 0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$) e *eqBuChE* ($\text{IC}_{50} = 3,09 \pm 0,39 \mu\text{M}$).

Compostos/materiais	Concentração	Inibição (%)	
		<i>eeAChE</i>	<i>eqBuChE</i>
Donepezilo	100,0 μM	100,0 \pm 0,6	100,0 \pm 5,8
Composto 3	159,8 μM	1,0 \pm 4,5	24,7 \pm 3,9
Composto 5	200,0 μM	15,5 \pm 3,2	25,1 \pm 5,8
MIP-9	30,0 $\mu\text{g/mL}$	13,5 \pm 1,5	NI
NIP-9	30,0 $\mu\text{g/mL}$	5,1 \pm 3,3	NI
MIP-9+Dpz (0,7 μg)	30,0 $\mu\text{g/mL}$	52,2 \pm 0,7	NI
NIP-9+Dpz (0,6 μg)	30,0 $\mu\text{g/mL}$	51,7 \pm 1,8	NI
NI: Não inibe			

Por outro lado, os compostos **3** e **5**, testados nas concentrações de 159,8 e 200,0 μM , respetivamente, revelaram uma atividade inibitória bastante reduzida, especialmente contra a *eeAChE* (1,0% e 15,5%). O composto **5** demonstrou atividade inibitória ligeiramente superior em ambas as enzimas, particularmente na *eqBuChE* (25,1%), o que poderá indicar alguma afinidade seletiva, embora insuficiente para ser considerado eficaz.

Quanto aos MIP e NIP-9 sem donepezilo encapsulado, os resultados mostram baixa atividade contra a *eeAChE* (13,5% para MIP-9 e 5,1% para NIP-9) e ausência de inibição contra a *eqBuChE*. Estes dados confirmam que o próprio material polimérico, na ausência do fármaco, não apresenta atividade inibitória significativa.

Por sua vez, os MIP e NIP-9 carregados com 0,7 and 0,6 μg de donepezilo, respetivamente, demonstraram atividade inibitória significativa contra a *eeAChE* (aproximadamente 52%), ainda que inferior à do fármaco livre. Este resultado sugere

que o donepezilo foi eficientemente encapsulado nos polímeros e libertado em quantidade suficiente para exercer efeito biológico, validando o potencial dos MIPs como sistemas de entrega controlada. A ausência de inibição da eqBuChE nestes casos pode dever-se à quantidade do fármaco libertado não ter sido suficiente para inibir esta enzima, que tem um IC₅₀ superior comparativamente à eeAChE.

Importa ainda referir que os MIPs e NIPs 2, 3, 4 e 8 (sem donepezilo encapsulado), foram também testados à concentração de 30 µg/mL, e não apresentaram qualquer atividade inibitória.

3.4.2 Ensaios de Biodegradação

A degradação de polímeros é entendida como qualquer processo químico, físico ou bioquímico que leva à quebra de ligações covalentes na cadeia principal do polímero. Esse processo provoca mudanças irreversíveis nas propriedades do material, devido a alterações na sua estrutura química e à redução de seu peso molecular. Neste projeto de mestrado, um dos objetivos era desenvolver MIPs que pudessem degradar-se nos seus monómeros à base de flavonóides e simultaneamente permitir a libertação do donepezilo. Os MIPs selecionados para este ensaio foram os MIPs-4 e 9. O MIP-4 é composto pelo monómero **3**, que, supostamente, após a sua degradação, libertaria o composto **2**. No caso do MIP-9, este é constituído pelo monómero **5**, que, de forma análoga, libertaria o composto **4** após degradação. No entanto, devido à indisponibilidade deste último composto, optou-se por utilizar o monómero **5** como padrão. Primeiro, determinou-se os comprimentos de onda de emissão (λ_{emi}) e de excitação (λ_{ex}) para os compostos **2** e **5** a utilizar na espectroscopia de fluorescência. Para o composto **2**, 7-hidroxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina, utilizou-se o λ_{ex} 380 nm e λ_{emi} 540 nm. No caso composto **5**, utilizou-se λ_{ex} 340 nm e λ_{emi} 470 nm. Traçaram-se curvas de calibração para posteriormente serem utilizadas para o doseamento dos produtos de degradação provenientes dos respetivos ensaios de biodegradação. As curvas de calibração e as respetivas equações da recta para os compostos **2** e **5** encontram-se representadas nas figuras 24 e 25.

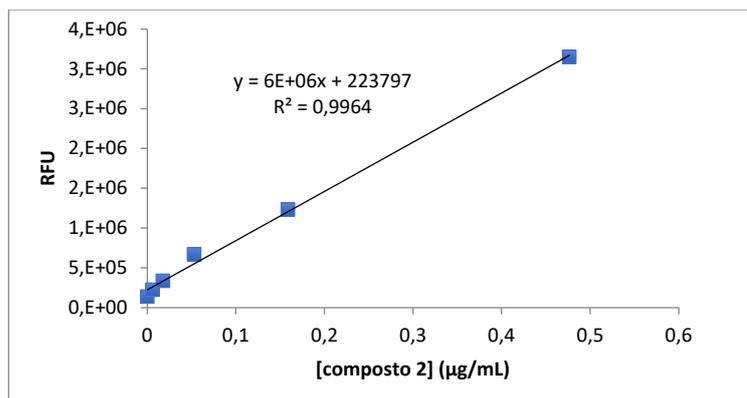


Figura 24. Curva de calibração do 7-hidroxil-3',4',3,5-tetracetilquercetina (2).

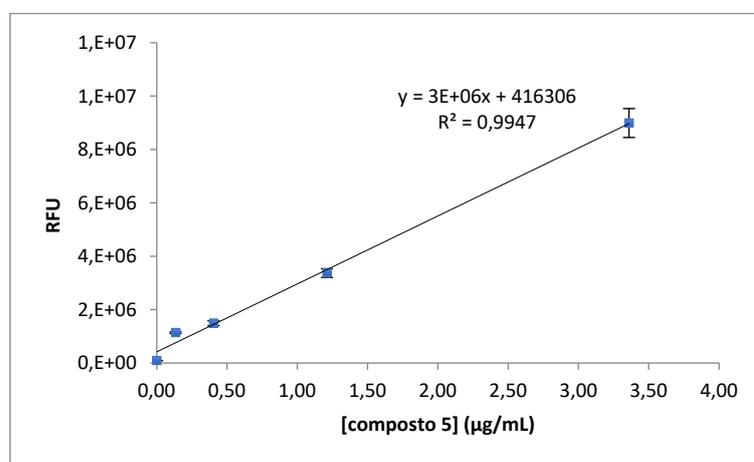


Figura 25. Curva de calibração do composto 3-aciloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (5).

A enzima utilizada nos ensaios de biodegradação dos MIPs mais promissores, MIP-4 e MIP-9, foi a proteinase K, é uma serino-protéase que possui elevada atividade enzimática, e é responsável pela clivagem de ligações peptídicas. Os MIPs selecionados foram incubados com a enzima a 37°C durante aproximadamente 24h, seguidamente os sobrenadantes contendo os produtos de degradação foram analisados por espectroscopia de fluorescência, e os resultados encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Resultados de ensaios de biodegradação dos MIPs nos respectivos monómeros.

Polímero	Massa (µg)	[composto 2] (µg/mL)	Polímero	Massa (µg)	[composto 5] (µg/mL)
MIP-4	1080,0	0,049±0,007	MIP-9	1000,0	3,575±0,136
	1060,0	0,159±0,022		1050,0	5,504±3,632
	1030,0	0,111±0,021		1090,0	2,575±0,095
Média		0,106±0,017	Média		3,075±0,707

Analisando os resultados obtidos, verificou-se que a degradação de ambos os polímeros foi baixa, uma vez que se observou uma reduzida concentração dos compostos **2** e **5** no sobrenadante. Estes resultados podem dever-se à enzima utilizada não ser a mais adequada e também ao tempo de incubação, que foi limitado.

Os MIPs-4 e 9, após os ensaios de degradação, foram analisados por espectroscopia FTIR-ATR e comparados com os respectivos MIPs antes dos ensaios. Os espectros encontram-se representados nas Figuras 26 e 27.

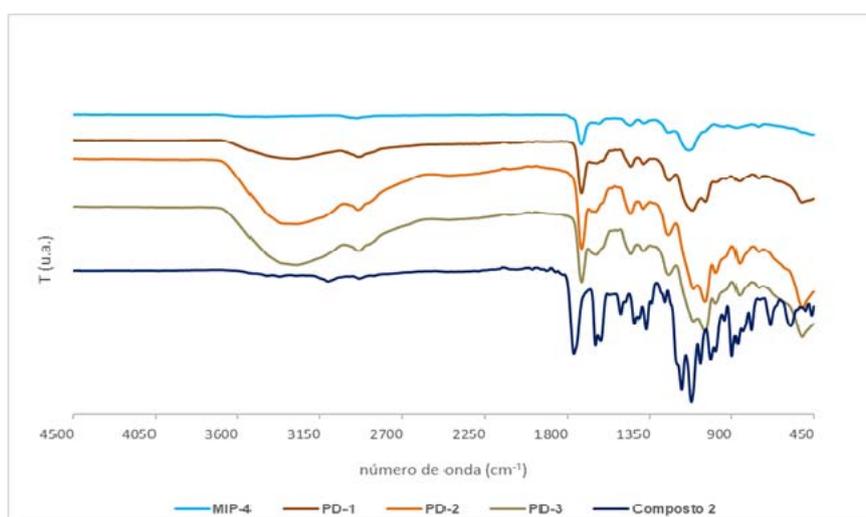


Figura 26. Espectros de FTIR do MIP-4 e e MIPs após o ensaio de degradação.

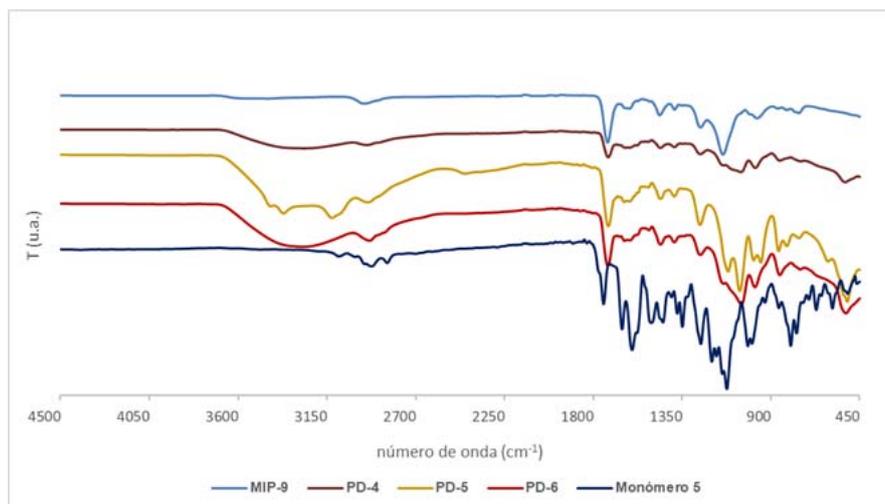


Figura 27. Espectros de FTIR do MIP-9 e MIPs após o ensaio de degradação.

Comparando os espectros dos polímeros degradados (PD-1 a 6) com os respetivos MIPs-4 e 9, verifica-se que os polímeros degradados apresentam um perfil espectral semelhante, não se tendo observado qualquer diferença significativa na composição química dos polímeros.

Os sobrenadantes obtidos após o ensaio de biodegradação foram avaliados quanto ao seu potencial de inibição das colinesterases, e não se observou efeito inibitório, estes resultados já seriam expectáveis, pois como vimos anteriormente os compostos **2** e **5** mostraram fraca inibição, por outro lado os produtos degradados estão numa concentração muito baixa para fornecer algum efeito inibitório.

3.4.3 Avaliação da citotoxicidade dos MIPs e NIPs mais promissores

Os ensaios de viabilidade celular são fundamentais para a avaliação da citotoxicidade dos polímeros mais promissores, nomeadamente os MIP-2 (sem monómero à base de flavonóide), MIP/NIP-3 e 4 (constituído pelo monómero 3) e MIP/NIP-8 e 9 (constituídos pelo monómero 5). Estes polímeros foram avaliados nas concentrações de 3,3; 10; 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$, utilizando-se a linha celular de cancro da mama humano MCF-7. Foram utilizados diferentes métodos para avaliação da viabilidade

celular, um deles dirigido à integridade metabólica e outro dirigido à integridade membranar.

3.4.3.1 Avaliação do efeito dos MIPs e NIPs na viabilidade metabólica celular

O método WST-8 foi utilizado para avaliar a viabilidade metabólica da linha celular. Este ensaio baseia-se na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem o composto WST-8, um sal de tetrazólio, originando formazano, que pode ser quantificado por espectrofotometria.

Os ensaios de viabilidade celular permitiram avaliar o potencial citotóxico dos polímeros MIP/NIP mais promissores desenvolvidos ao longo deste estudo. De acordo com os resultados obtidos (Figura 28), nenhum dos polímeros testados gera perda de viabilidade celular, na gama de concentrações avaliada (entre 3,3 e 90 $\mu\text{g/mL}$), com exceção da NIP 3 que induz perda de viabilidade de 53% na concentração mais alta avaliada. O MIP correspondente (MIP 3) não apresenta efeito citotóxico, portanto a toxicidade do NIP-3 não deve poder ser atribuída aos constituintes individuais, mas antes a outras propriedades intrínsecas do polímero (como adsorção de componentes do meio essenciais para a sobrevivência, por exemplo), não observadas nos outros materiais produzidos.

O efeito do donepezilo foi também avaliado (2.2 e 60 $\mu\text{g/mL}$) observando-se que não apresentou qualquer efeito citotóxico, o que confirma o seu perfil de segurança bem estabelecido, alinhado com a sua utilização clínica prolongada no tratamento da Doença de Alzheimer.

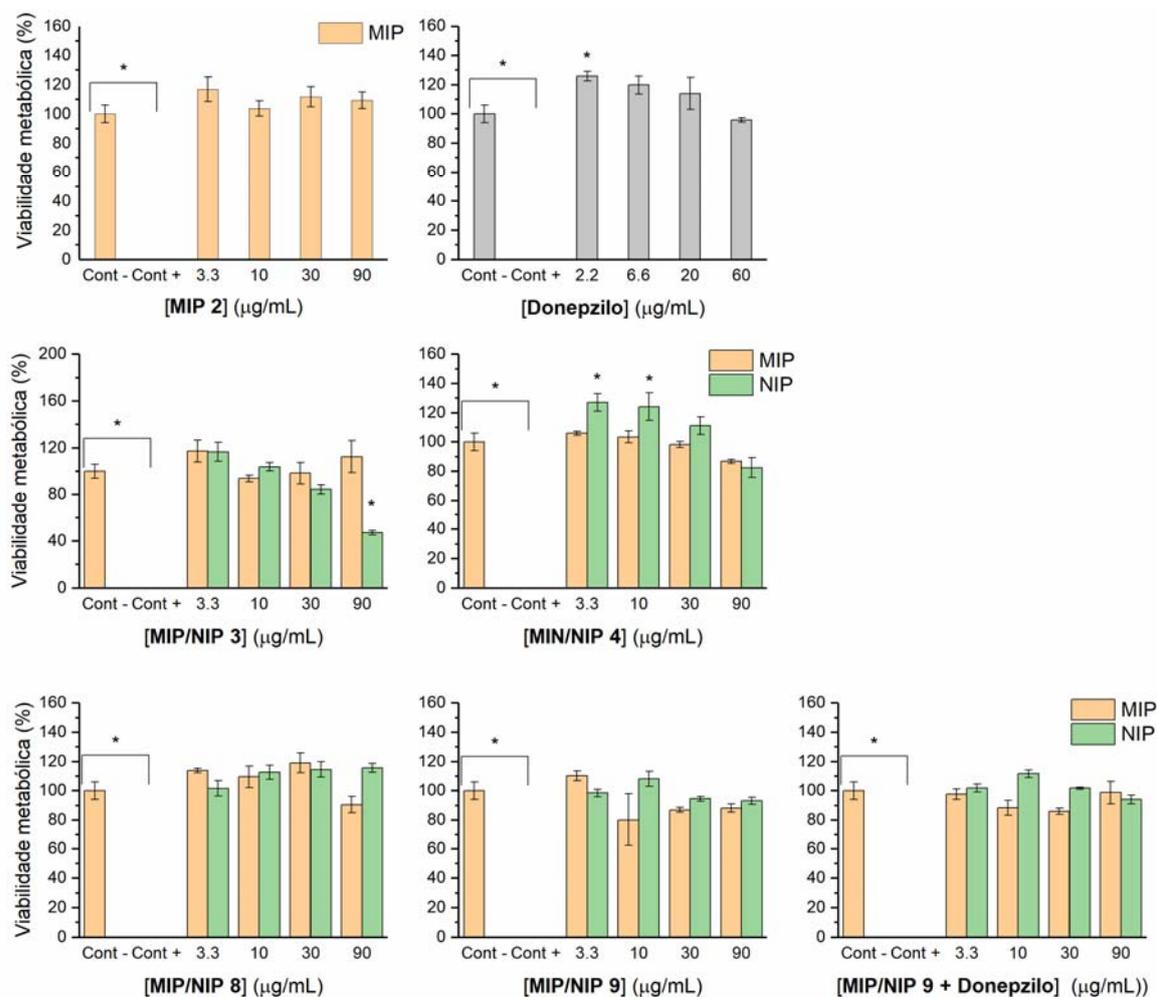


Figura 28. Estudo do efeito da ação de MIP/NIPs na viabilidade celular de células MCF-7, avaliada pelo método WST-8. Os resultados são expressos em % de viabilidade, calculados relativamente ao controlo negativo (ausência de estímulo) e controlo positivo (em que é usado SDS) e estão apresentados como média \pm EPM ($n \geq 4$). A análise estatística foi feita através do método de comparação de médias Tukey-Kramer, evidenciando-se as diferenças significativas ($p > 0.05$) relativamente ao controlo negativo.

Em suma, os resultados obtidos mostram que os vários compostos gerados, em particular os MIPs, não são citotóxicos nas concentrações testadas, à exceção do NIP-3. Portanto, todos os outros materiais são candidatos seguros e eficazes para futuras investigações.

3.4.3.2 Avaliação do efeito dos MIPs e NIPs na integridade membrana

O diacetato de fluoresceína (DAF) tem a capacidade de atravessar a membrana por difusão membrana devido à sua polaridade (DAF é apolar). Quando se encontra no interior da célula este é clivado por enzimas hidrolíticas a fluoresceína, que difere do DAF em alguns parâmetros, entre os quais na sua polaridade. Sendo a fluoresceína polar, fica retida no interior da célula, a não ser que esta não tenha a membrana celular viável. Assim, células com membranas íntegras, apresentam níveis de fluoresceína no seu interior superiores a células com viabilidade reduzida que contenham lesões membranares.

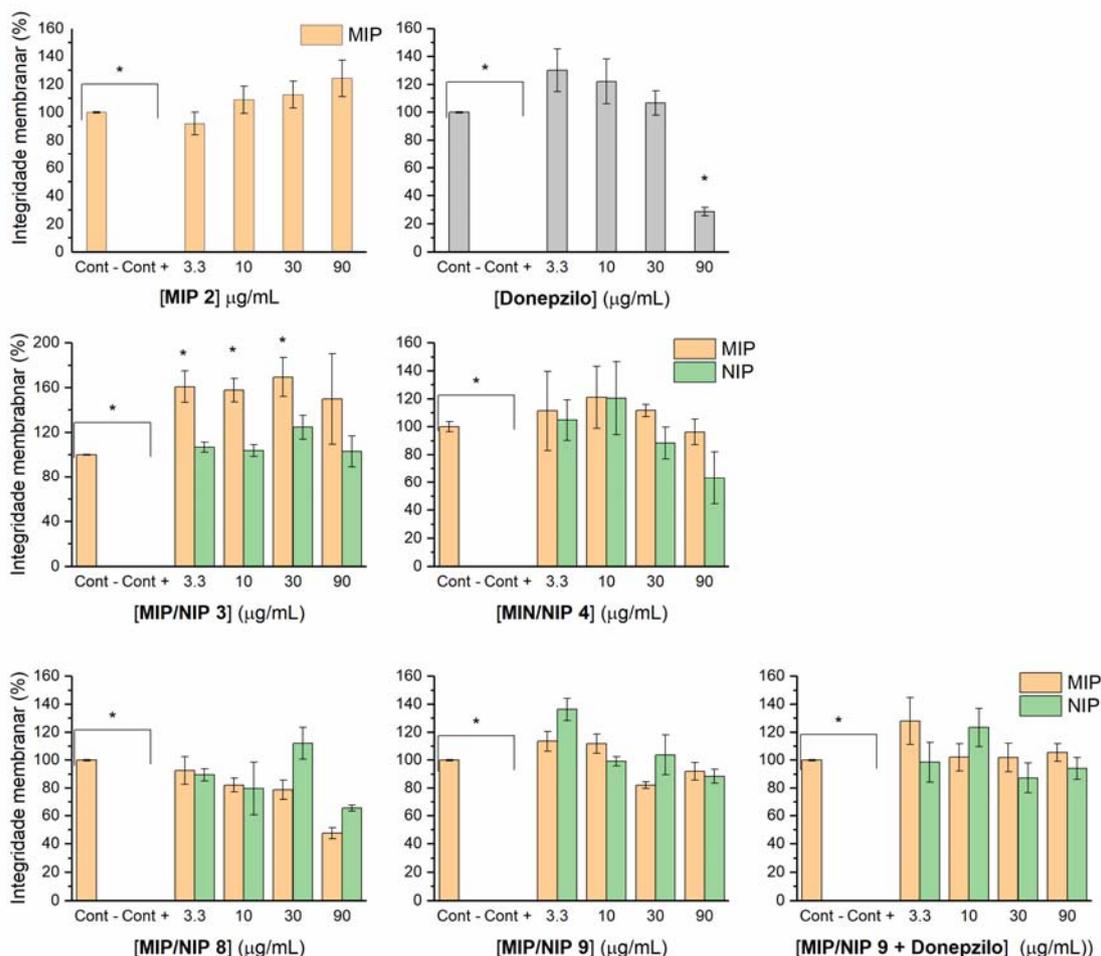


Figura 29. Estudo do efeito da ação de MIP/NIPs na integridade membrana de células MCF-7, avaliada pelo método DAF. Os resultados são expressos em % de viabilidade, calculados relativamente ao controlo negativo (ausência de estímulo) e controlo positivo (em que é usado SDS) e estão apresentados como média \pm EPM ($n \geq 4$). A análise estatística foi feita através do método de comparação de médias Tukey-Kramer, evidenciando-se as diferenças significativas ($p > 0.05$) relativamente ao controlo negativo.

Nos estudos realizados (Figura 29) pode observar-se que os compostos testados não afetaram negativamente a permeabilidade membranar. O polímero NIP-3, que apresentou redução da viabilidade celular na concentração 90 µg/mL, não parece exercer um efeito negativo sobre a integridade membranar, sendo outro o mecanismo pelo qual exerce os seus efeitos citotóxicos. Observa-se ainda que o donepezilo tem um efeito nefasto sobre a integridade membranar na concentração 90 µg/mL, uma concentração não avaliada no ensaio com WST-8.

Estes resultados apontam para uma elevada segurança dos polímeros produzidos, nas concentrações testadas e na linha celular que serviu de modelo a esta análise, permitindo apenas excluir das fases subsequentes de estudo o NIP 4.

Será relevante estudar ainda o potencial citotóxico noutras linhas celulares, em particulares em linhas de células não tumorais e neuronais.

3.5 Ensaios de Libertação do donepezilo *in Vitro*

Para os ensaios de libertação *in vitro*, seleccionou-se o MIP-9 e o respectivo NIP, uma vez que o MIP apresentou uma boa capacidade de retenção e selectividade comparativamente com o respectivo NIP. Os ensaios foram conduzidos em três meios distintos, com pH 3, 5,5 e 7, a fim de avaliar o perfil de libertação do donepezilo em condições de pH com interesse fisiológico. O carregamento dos polímeros foi realizado utilizando uma solução aquosa de donepezilo a 400 mg/L previamente preparada. Para isso, utilizou-se 25 mg de polímero que foram distribuídos em 12 tubos de eppendorf (6 tubos para MIP-9 e 6 tubos para NIP-9), aos quais foram adicionados 1,7 mL da solução de donepezilo com 400 mg/L, que seguidamente foram incubados numa incubadora rotativa a 37°C por 15,7 horas. A concentração de donepezilo adsorvida foi determinada através diferença da C_0 e C_s , a C_s e determinada através da curva de calibração traçada para o donepezilo nos tampões dos diferentes pHs, os resultados estão reportados na Tabela S1 (Anexos).

Na figura 30, encontra-se representado a cinética de libertação do donepezilo em meio ácido (tampão citrato de sódio, pH 3), os polímeros apresentaram uma libertação progressiva do fármaco, atingindo valores 46 e 39,6% para o MIP e NIP-9 respetivamente ao longo de 11 dias. Embora se esperasse que o MIP apresentasse uma libertação

ligeiramente mais sustentada devido à presença de sítios de reconhecimento molecular, observou-se que a libertação no MIP foi ligeiramente maior em relação ao NIP. Esse comportamento pode estar associado a fatores como a força da interação fármaco-polímero, pH do meio, a estrutura porosa do material e o grau de reticulação do polímero.

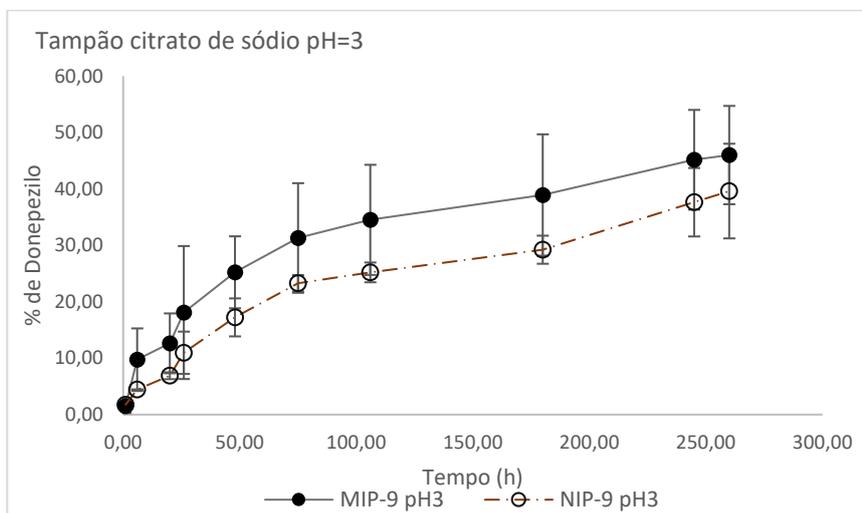


Figura 30. Cinética de libertação de donepezilo pelos polímeros (MIP/NIP-9) em tampão citrato de sódio pH=3 (n = 2). Mais de 50% de libertação em 11 dias.

Relativamente aos ensaios de libertação realizados em pH 5,5 (Figura 31), utilizando tampão PBS, a libertação de donepezilo foi menor, com valores inferiores a 50% no período avaliado. Esse resultado sugere que a interação entre o donepezilo e a matriz polimérica é mais forte neste pH intermédio entre os estudados, retardando a difusão do fármaco para o meio externo. A menor taxa de libertação também pode estar associada a um menor intumescimento do polímero nessa condição específica, de facto não foram realizados ensaios de intumescimento, que ajudassem a discutir estes resultados.

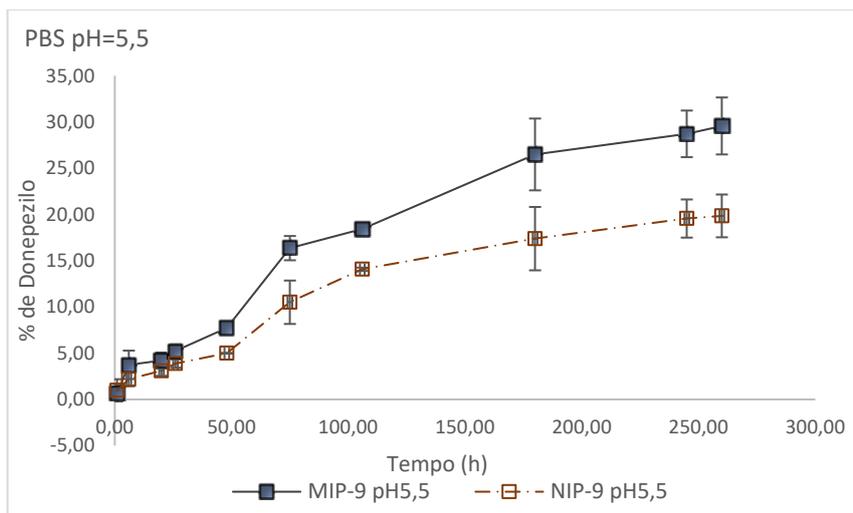


Figura 31. Cinética de liberação de donepezilo pelos polímeros (MIP-9/NIP-9) em PBS pH=5,5 (n = 2). Menos de 50% de liberação em 11 dias.

Por fim, nos ensaios realizados a pH 7 (Figura 32), o MIP-9 apresentou a maior taxa de liberação, com valores superiores a 97% em 11 dias, no entanto o NIP-9 teve uma liberação de apenas de 32%.

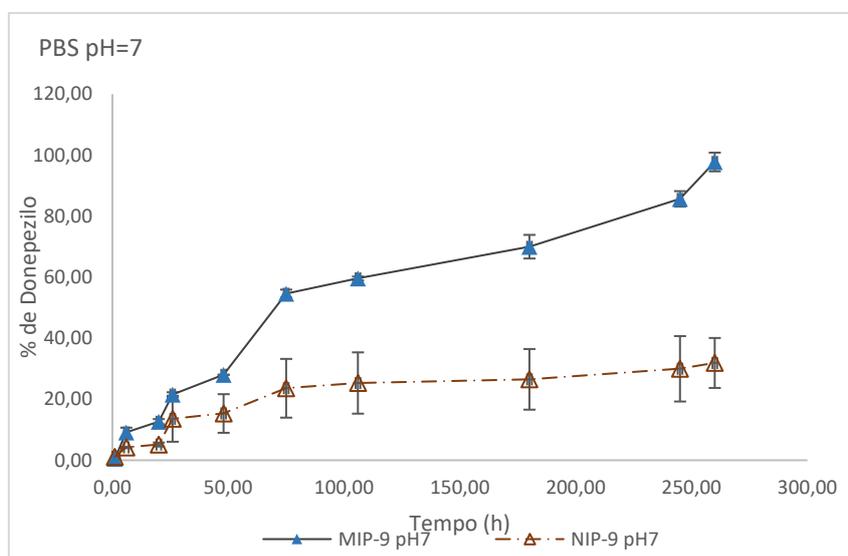


Figura 32. Cinética de liberação de donepezilo pelos polímeros (MIP/NIP-9) em PBS pH=7 (n = 2). No geral, os MIPs tiveram maior liberação em relação aos NIPs. Em 11 dias a liberação foi mais de 90%.

De maneira geral, os resultados indicam que os MIPs possuem um potencial promissor para a libertação controlada do donepezilo, mas apresentam um comportamento de libertação que deve ser investigado em maior detalhe.

Para entender o mecanismo de libertação do donepezilo através dos MIP e NIP, recorreu-se ao modelo de Korsmeyer-Peppas, que é descrito como um modelo de estudo de libertação de fármacos num sistema de libertação controlado. Este modelo foi desenvolvido por Korsmeyer e Peppas e permite relacionar a quantidade de fármaco libertado com o tempo decorrido. Se considerarmos um processo *sem efeito burst* e ausência de *lag time* o modelo é representado pela fórmula 3:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = kt^n \quad (3)$$

onde k é uma constante de difusão que leva em consideração as características geométricas e estruturais da forma de dosagem farmacêutica libertada, Q_t é a fração do fármaco libertado em um tempo t e Q_∞ é a quantidade total de fármaco libertado. O n é o expoente de libertação que descreve o mecanismo de libertação no sistema em estudo. Quando o valor de $n \leq 0,5$ tem-se uma difusão quase *Fickiana*. Nestes casos, o mecanismo de libertação é predominantemente por difusão. Se $n=1$ a equação correspondente à cinética de libertação é de primeira ordem e se $0,5 < n < 1$ o processo da transferência de massa obedece um modelo não-*Fickiano*, o que quer dizer que o processo envolve mais de um tipo de libertação e que Korsmeyer e Peppas designaram transporte anómalo [80].

Na versão logarítmica, a equação de Korsmeyer-Peppas é

$$\log(Q_t/Q_\infty) = n \log t + \log k \quad (4)$$

Esta expressão assume a forma de uma equação linear do tipo:

$$f(x) = nx + b \quad (5)$$

onde $f(x) = \log(Q_t/Q_\infty)$, $nx = n \log t$ e $b = \log k$. A partir da equação Korsmeyer-Peppas, determinou-se os valores de n e k bem como o factor de correlação dos polímeros nos três meios em estudo como mostra a tabela 6.

Tabela 6. Constante de Korsmeyer-Peppas em relação a libertação de donepezilo.

	pH3		pH5,5		pH7	
	MIP-9	NIP-9	MIP-9	NIP-9	MIP-9	NIP-9
<i>n</i>	0,51±0,003	0,52±0,032	0,62±0,102	0,65±0,229	0,70±0,103	0,52±0,022
<i>k</i>	0,062±0,001	0,05±0,005	0,03±0,016	0,03±0,030	0,02±0,013	0,06±0,002
<i>R</i> ²	0,90±0,108	0,97±0,001	0,91±0,037	0,89±0,094	0,93±0,055	0,94±0,043

Constata-se pelos dados da tabela 4 que em meio citrato de sódio (pH = 3) $n = 0,5$ e que, nos outros dois meios, $n > 0,5$.

Para muitos polímeros, a difusão não é descrita adequadamente pela lei de Fick. A justificação deste fenómeno consiste no facto de algumas substâncias provocarem um aumento do volume no polímero. Portanto, o efeito de difusão não-Fickiana pode ser motivado pela alteração da estrutura e do volume do polímero devido ao intumescimento, solubilidade e haver uma influência direta na mobilidade [81]. Por outro lado, o efeito anómalo pode ser um resultado das tensões e interações internas entre o polímero e o donepezilo contido nas cavidades influenciados pelo pH do meio. As interações entre o MIP e o donepezilo são maioritariamente interações do tipo ligações de hidrogénio. Nas cavidades impressas, a ionização vai depender do pH do meio e influenciar a ligação polímero-donepezilo que consequentemente afeta a libertação.

Os polímeros MIP e NIP-9 são parcialmente constituídos por acrilatos, os grupos funcionais presentes na matriz polimérica são grupos carboxilo (–COOH). Com o aumento do pH, ocorre a dissociação desses grupos. O pKa do ácido poliacrílico (PAA) é 4,5 [82], o que significa que, para valores de pH inferiores a 4,5, os grupos carboxilo nas cadeias do polímero permanecem maioritariamente não dissociados (por exemplo, a pH 3). A pH 4,5, a proporção de grupos –COOH e –COO⁻ é aproximadamente igual. À medida que o pH aumenta para valores acima de 4,5, o grau de dissociação do polieletrólito cresce rapidamente; a pH 7, estima-se que praticamente todos os grupos carboxílicos se encontrem ionizados. Estamos na presença de polímeros responsivos ao pH, o que facilita a compreensão do mecanismo de libertação do donepezilo em diferentes

condições de pH. Em meio ácido, a pH = 3 (tampão citrato de sódio), os polímeros encontram-se maioritariamente na forma não ionizada e o donepezilo (pK_a do donepezilo•HCl = 8,9) [36] encontra-se ionizado e protonado. Esta condição favorece a retenção do donepezilo nas cavidades impressas através de interações por ligações de hidrogénio e interações π - π com a matriz polimérica. Estas interações, embora contribuam para a estabilização do complexo, permitem uma mobilidade suficiente, facilitando, assim, a libertação do fármaco por um mecanismo de difusão controlada (modelo de Fick) (Figura 33a).

A libertação do donepezilo a pH = 5,5 segue um mecanismo de transporte anómalo, tendo-se verificado que o fármaco permanece mais retido na matriz polimérica do que no caso da libertação a pH = 3. A este pH, existe um equilíbrio entre as formas protonadas e não protonadas do polímero mas o donepezilo encontra-se ionizado e protonado. As interações estabelecidas entre o fármaco e o polímero são predominantemente do tipo ligações de hidrogénio, eletrostáticas e π - π (Figura 33b), as quais são significativamente mais fortes, resultando numa maior retenção do donepezilo na matriz polimérica. Consequentemente, a libertação do fármaco ocorre segundo um mecanismo de transporte anómalo.

A libertação do donepezilo pelos polímeros MIP e NIP-9 em pH = 7 revelou, curiosamente, dois tipos distintos de mecanismos: transporte não-Fickiano para o MIP e difusão controlada (modelo de Fick) para o NIP. A pH 7 predominam as formas ionizadas do polímero, enquanto o donepezilo se mantém maioritariamente na sua forma protonada e ionizado, apesar da proximidade entre o valor de pK_a do fármaco (8,9) e o pH do meio. Neste contexto, prevê-se que o donepezilo estabeleça principalmente interações eletrostáticas e π - π com o polímero (Figura 33c). No entanto, como a matriz polimérica apresenta cargas negativas, ocorre repulsão entre estas, promovendo a expansão da rede polimérica e facilitando a libertação do donepezilo. Como resultado, o fármaco é libertado praticamente na sua totalidade, seguindo um mecanismo de transporte não-Fickiano.

Uma possível justificação para a baixa taxa de libertação do donepezilo, bem como para o mecanismo de difusão controlada observado no caso do NIP-9, poderá residir no facto de este polímero possuir uma rede polimérica menos organizada e desprovida de cavidades impressas. Tal estrutura favorece a retenção do donepezilo por interações não

específicas, razão pela qual a expansão da matriz polimérica não contribui significativamente para a sua libertação.

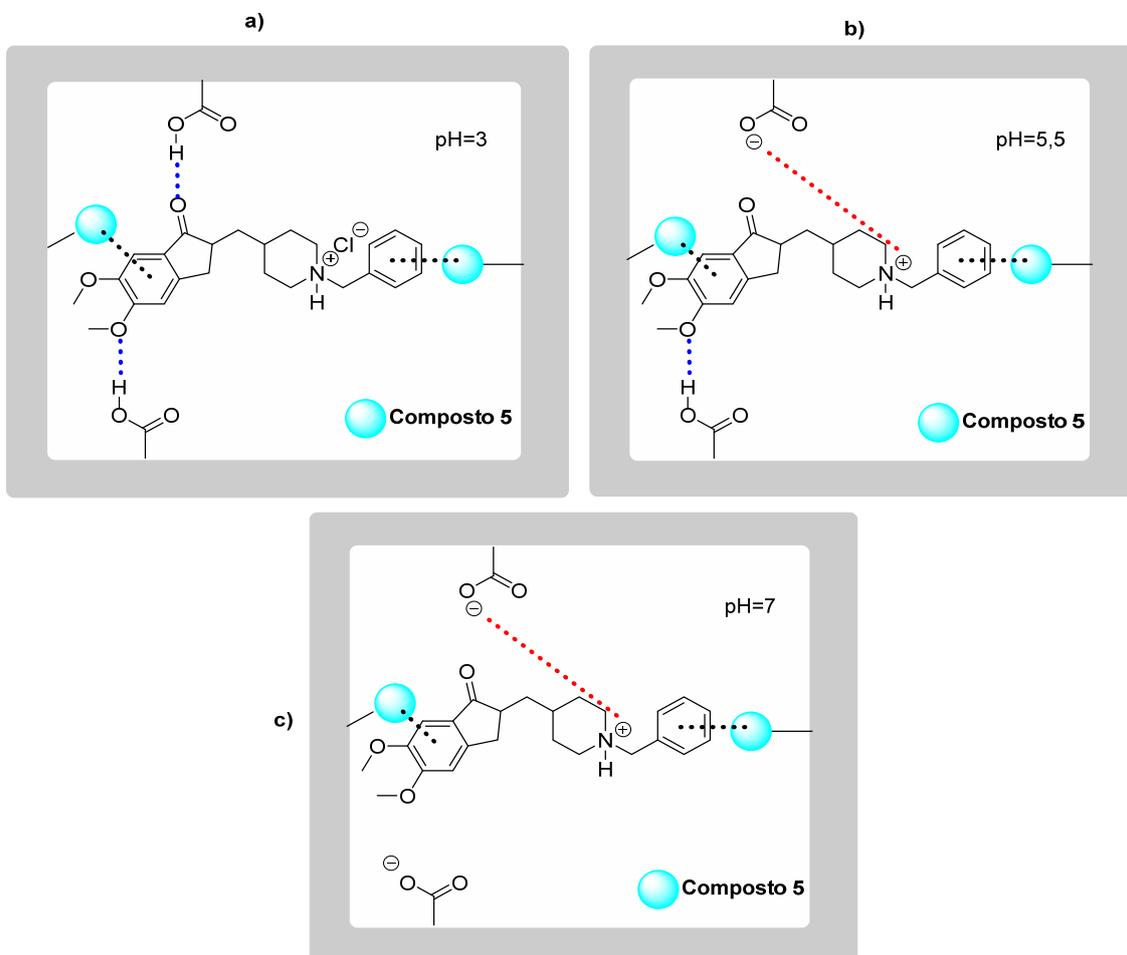


Figura 33. Potenciais interação estabelecidas entre o donepezilo e os grupos funcionais das cavidades impressas do MIP-9 em diferentes meios.

Os resultados obtidos demonstram que o MIP-9 apresenta comportamento distinto de libertação do donepezilo consoante as condições de pH, refletindo a influência da estrutura da matriz e da natureza das interações fármaco-polímero. Em particular, o MIP-9 revelou-se o sistema mais promissor, exibindo diversas características fundamentais para uma aplicação eficaz como sistema de entrega de fármacos. Este polímero mostrou-se sensível a variações de pH, sendo capaz de libertar o donepezilo de forma eficiente em meio fisiológico (pH 7,4), condição que simula o plasma sanguíneo. Tal comportamento

favorece a biodisponibilidade do fármaco e a sua chegada ao alvo molecular. Adicionalmente, observou-se uma liberação praticamente completa do fármaco, o que reforça o potencial do MIP-9 como matriz funcional em estratégias terapêuticas baseadas em liberação controlada.

4 Conclusão

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo sistema de entrega de fármacos, que consiste em partículas poliméricas molecularmente impressas à base de quercetina, para o donepezilo, um dos principais fármacos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer.

Foram sintetizados com sucesso dois monómeros funcionais, a 7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina **3** e 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina **5**, com rendimentos de 48,9% e 78,9%, respectivamente. As estruturas dos monómeros foram confirmadas por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C APT.

As partículas poliméricas molecularmente impressas foram preparadas utilizando os monómeros funcionais (7-acriloxi-3',4',3,5-tetracetilquercetina (**3**) e 3-acriloxi-3',4',5,7-tetrametilquercetina (**5**) combinados com ácido acrílico e acrilamida, nas proporções de (1:3 e 2:2), e foram utilizados dois *crosslinkers* diferentes, EGDMA e TMPTA. Essas partículas foram caracterizadas por espectroscopia de FTIR e microscopia de varrimento eletrônico (SEM) que confirmaram a sua constituição e morfologia. Nos estudos de reconhecimento para o donepezilo os MIPs apresentaram capacidade de adsorção de 39 mg/g, e quando avaliados em estudos de libertação controlada *in vitro* a diferentes (pHs 3, 5,5 e 7), demonstraram ter uma libertação até 97% após 4 dias a pH7.

As partículas mais promissoras foram avaliadas quando à sua capacidade inibitória das colinesterases, citotoxicidade, e degradação enzimática pela proteinase K. Observou-se que os MIPs não apresentaram citotoxicidade na linha celular e nas concentrações testadas, reforçando o seu potencial como SEFs para o donepezilo. A análise dos produtos de degradação dos MIPs e dos polímeros após o ensaio revelou que estes apresentaram muito baixa taxa de biodegradação, o que sugere a sua estabilidade em meio fisiológico. Adicionalmente verificou-se que estas partículas apresentaram uma fraca capacidade inibitória das colinesterases, mas o donepezilo libertado por elas mantém capacidade inibitória.

Apesar de serem resultados preliminares e que necessitam de mais estudos, de um modo geral pode-se concluir que os MIPs à base de quercetina são potenciais candidatos a SEFs para o tratamento da doença de Alzheimer.

5 Referências Bibliográficas

- [1] D. S. Nady, U. Bakowsky e S. A. Fahmy, “Recent advances in brain delivery of synthetic and natural nano therapeutics: Reviving hope for Alzheimer's disease patients,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **2023**, *89*, 105047.
- [2] H. Niu, I. Álvarez-Álvarez, F. Guillén-Grima e I. Aguinaga-Ontoso, “Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis,” *Neurología*, **2017**, *32*(8), 523-532.
- [3] M. M. Wen, N. S. El-Salamouni, W. M. El-Refaie, H. A. Hazzah, M. M. Ali, G. Tosi, R. M. Farid, M. J. Blanco-Prieto, N. Billa e A. S. Hanafy, “Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges,” *Journal of Controlled Release*, **2017**, *245*, 95-107.
- [4] J. Jia, C. Wei, S. Chen, F. Li, Y. Tang, W. Qin, L. Zhao, H. Jin, H. Xu, F. Wang, A. Zhou, X. Zuo, L. Wu, Y. Han, Y. Han, L. Huang, Q. Wang, D. Li, C. Chu, L. Shi, M. Gong, Y. Du, J. Zhang, J. Zhang, C. Zhou, J. Lv, Y. Lv, H. Xie, Y. Ji, F. Li, E. Yu, B. Luo, Y. Wang, S. Yang, Q. Qu, Q. Guo, F. Liang, J. Zhang, L. Tan, L. Shen, K. Zhang, J. Zhang, D. Peng, . M. Tang, P. Lv, B. Fang, L. Chu, L. Jia e S. Gauthier, “The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide,” *Alzheimer's & Dementia*, **2018**, *14*(4), 483-491.
- [5] S. Cunha, B. Forbes, J. M. S. Lobo e A. C. Silva, “Improving Drug Delivery for Alzheimer’s Disease Through Nose-to-Brain Delivery Using Nanoemulsions, Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and in situ Hydrogels,” *International Journal of Nanomedicine*, **2021**, *16*, 4373-4390.
- [6] F. Amenta, L. Parnetti, V. Gallai e V. Gallai, “Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches?,” *Mechanisms of Ageing and Development*, **2001**, *122*(16), 2025-2040.
- [7] G. Marucci, M. Buccioni, D. D. Ben, C. Lambertucci, R. Volpini e F. Amenta, “Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease,” *Neuropharmacology*, **2021**, *190*, 108352.
- [8] M. Bilal, M. Barani, F. Sabir, A. Rahdar e G. Z. Kyzas, “Nanomaterials for the treatment and diagnosis of Alzheimer’s disease: An overview,” *Elsevier*, **2020**, *20*, 100251.
- [9] R. A. Bekdash, “The Cholinergic System, the Adrenergic System and the Neuropathology of Alzheimer’s Disease,” *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, *22*, 1273.
- [10] G. L. Wenk, “Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment,” *The Journal of clinical psychiatry*, **2006**, *67*, 3-7.
- [11] P. Sharma, P. Srivastava, A. Seth, P. N. Tripathi, A. G. Banerjee e S. K. Shrivastava, “Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer’s disease and potential therapeutic strategies,” *Progress in Neurobiology*, **2019**, *174*, 53-89.

- [12] G. D. Stanciu, A. Luca, R. N. Rusu, V. Bild, S. I. Beschea Chiriac, C. Solcan, W. Bild e D. C. Ababei, "Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement," *Biomolecules*, **2019**, *10*, 40.
- [13] A. Kumar, A. Singh e Ekavali, "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update," *Pharmacological Reports*, **2015**, *67*, 195-203.
- [14] A. Sanabria-Castro, I. Alvarado-Echeverría e C. Monge-Bonilla, "Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update," *Annals of Neurosciences*, **2017**, *24*, 46-54.
- [15] M. Yamada, T. Chiba, J. Sasabe, H. Tajima, T. Niikura, K. Terashita, S. Aiso, Y. Kita, M. Matsuoka e I. Nishimoto, "Implanted cannula-mediated repetitive administration of A β 25–35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory," *Behavioural Brain Research*, **2005**, *164*, 139-146.
- [16] W. Danysz e C. G. Parsons, "Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections," *British Journal of Pharmacology*, **2012**, *167*, 324-352.
- [17] A. D. Falco, D. S. Cukierman, R. A. Hauser-Davis e N. A. Rey, "Alzheimer's disease: etiological hypotheses and treatment perspectives," *Química Nova*, **2015**, *39*, 63-80.
- [18] D. A. Butterfield e C. B. Pocernich, "The Glutamatergic System and Alzheimer's Disease Therapeutic Implications," *CNS Drugs*, **2003**, *17*, 641-652.
- [19] D. Akkaya, G. Seyhan, S. Sari e B. Barut, "In vitro and in silico investigation of FDA-approved drugs to be repurposed against Alzheimer's disease," *Drug Development Research*, **2024**, *85*, 22184.
- [20] M. Amidfar, G. Z. Réus, J. Quevedo e Y.-K. Kim, "The role of memantine in the treatment of major depressive disorder: Clinical efficacy and mechanisms of action," *European Journal of Pharmacology*, **2018**, *827*, 103-111.
- [21] R. Cacabelos, "Pharmacogenetic considerations when prescribing cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease," *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **2020**, *16*, 673-701.
- [22] S. H. Kim, N. Kandiah, J. Hsu, C. Suthisisang, C. Udommongkol e A. Dash, "Beyond symptomatic effects: potential of donepezil as a neuroprotective agent and disease modifier in Alzheimer's disease," *British Journal of Pharmacology*, **2017**, *174*, 4224-4232.
- [23] J. Zhang, J. Cheng e H. Yang, "Effects of Rivastigmine on Brain Functional Networks in Patients With Alzheimer Disease Based on the Graph Theory," *Clinical Neuropharmacology*, **2021**, *44*, 9-16.
- [24] A. Maelicke, M. Samochocki, R. Jostock, A. Fehrenbacher, J. Ludwig, E. X. Albuquerque e M. Zerlin, "Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease," *Biological Psychiatry*, **2001**, *49*, 279-288.

- [25] S. Kavanagh, M. Gaudig, B. Van Baelen, M. Adami, A. Delgado, C. Guzman, E. Jedenius e B. Schäuble, “Galantamine and behavior in Alzheimer disease: analysis of four trials,” *Acta Neurologica Scandinavica*, **2011**, *124*, 302-308.
- [26] J. Coyle e P. Kershaw, “Galantamine, a cholinesterase inhibitor that allosterically modulates nicotinic receptors: effects on the course of Alzheimer’s disease,” *Biological Psychiatry*, **2001**, *49*, 289-299.
- [27] T. Kishi, S. Matsunaga, K. Oya, I. Nomura, T. Ikuta e N. Iwata, “Memantine for Alzheimer’s Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis,” *Journal of Alzheimer’s Disease*, **2017**, *60*, 401-425.
- [28] A. P. Singh, A. Biswas, A. Shukla e P. Maiti, “Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles,” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **2019**, *4*, 33.
- [29] A. Association, “Alzheimer’s Disease Facts and Figures,” **2024**, (<https://www.alz.org/getmedia/76e51bb6-c003-4d84-8019-e0779d8c4e8d/alzheimers-factsand-figures.pdf>).
- [30] M. Agrawal, S. Saraf, S. Saraf, S. K. Dubey, A. Puri, R. J. Patel, Ajazuddin, V. Ravichandiran, U. S. Murty e A. Alexander, “Recent strategies and advances in the fabrication of nano lipid carriers and their application towards brain targeting,” *Journal of Controlled Release*, **2020**, *321*, 372-415.
- [31] W. Barnabas, “Drug targeting strategies into the brain for treating neurological diseases,” **2019**, *311*, 133-146.
- [32] R. Liu e A. Poma, “Advances in Molecularly Imprinted Polymers as Drug Delivery Systems,” *Molecules*, **2021**, *26*, 3589.
- [33] S. Shah, N. Rangaraj, K. Laxmikeshav e S. Sampathi, ““Nanogels as drug carriers – Introduction, chemical aspects, release mechanisms and potential applications”,” *International Journal of Pharmaceutics*, **2020**, *581*, 119268.
- [34] S. A. Zaidi, “Molecular imprinting: A useful approach for drug delivery,” *Materials Science for Energy Technologies*, **2020**, 72-77.
- [35] K. Hemmati, R. Sahraei e M. Ghaemy, “Synthesis and characterization of a novel magnetic molecularly imprinted polymer with incorporated graphene oxide for drug delivery,” *Polymer*, **2016**, *101*, 257-268.
- [36] S. Al Harthi, S. E. Alavi, M. A. Radwan, M. M. El Khatib e I. A. AlSarrah, “Nasal delivery of donepezil HCl-loaded hydrogels for the treatment of Alzheimer’s disease,” **2019**, *9*, 9563.
- [37] A. L. M. Ruela, E. C. de Figueiredo, M. B. de Araújo, F. C. Carvalho e G. R. Pereira, “Molecularly imprinted microparticles in lipid-based formulations for sustained release of donepezil,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2016**, *93*, 114-122.

- [38] L. Andersson, B. Sellergren e K. Mosbach, "Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers," *Tetrahedron Letters*, **1984**, 25, 5211-5214.
- [39] C. Alexander, H. S. Andersson, L. I. Andersson, R. J. Ansell, N. Kirsch, I. A. Nicholls, J. O'Mahony e M. J. Whitcombe, "Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003.," *Journal of molecular recognition : JMR*, **2006**, 19, 106-80.
- [40] L. Chen, S. Xu e J. Li, "Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications," *Chemical Society Reviews*, **2011**, 40, 2922.
- [41] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu e J. Li, "Molecular imprinting: perspectives and applications," *Chemical Society Reviews*, **2016**, 45, 2137-2211.
- [42] S. Shoravi, G. Olsson, B. Karlsson e I. Nicholls, "On the Influence of Crosslinker on Template Complexation in Molecularly Imprinted Polymers: A Computational Study of Prepolymerization Mixture Events with Correlations to Template-Polymer Recognition Behavior and NMR Spectroscopic Studies," *International Journal of Molecular Sciences*, **2014**, 15, 10622-10634.
- [43] M. Boukadida, N. Jaoued-Grayaa, A. Anene, Y. Chevalier e S. Hbaieb, "Effect of cross-linking agents on the adsorption of histamine on molecularly imprinted polyacrylamide," *Polymer*, **2023**, 268, 125724.
- [44] L. A. Tom, N. A. Schneck e C. Walter, "Improving the imprinting effect by optimizing template:monomer:cross-linker ratios in a molecularly imprinted polymer for sulfadimethoxine," *Journal of Chromatography B*, **2012**, 909, 61-64.
- [45] C. Uzun, M. Hassnisaber, M. Şen e O. Güven, "Enhancement and control of cross-linking of dimethylaminoethyl methacrylate irradiated at low dose rate in the presence of ethylene glycol dimethacrylate," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **2003**, 208, 242-246.
- [46] F. Canfarotta, A. Waters, R. Sadler, P. McGill, A. Guerreiro, D. Papkovsky, K. Haupt e S. Piletsky, "Biocompatibility and internalization of molecularly imprinted nanoparticles," *Nano Research*, **2016**, 9, 3463-3477.
- [47] J. Wackerlig e R. Schirhagl, "Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: A Review," *Analytical Chemistry*, **2016**, 88, 250-261.
- [48] L. R. Bezerra, M. d. Oliveira, M. d. C. Gonzaga, R. Furtado e C. Alves, "Polímeros Molecularmente Impressos: um referencial teórico," em *Educação e Pesquisa em Química*, E. C. Digital, Ed., **2022**, 157-176.
- [49] T. Otsu, "Iniferter concept and living radical polymerization," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2000**, 38, 2121-2136.

- [50] N. Martins, E. P. Carreiro, M. Simões, M. J. Cabrita, A. J. Burke e R. Garcia, “An emerging approach for the targeting analysis of dimethoate in olive oil: The role of molecularly imprinted polymers based on photo-iniferter induced “living” radical polymerization,” *Reactive and Functional Polymers*, **2015**, *86*, 37-46.
- [51] A. Gomes, E. Fernandes, J. Lima, L. Mira e M. Corvo, “Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids,” *Current Medicinal Chemistry*, **2008**, *15*, 1586-1605.
- [52] S. M. Borghi, S. S. Mizokami, F. A. Pinho-Ribeiro, V. Fattori, J. Crespigio, J. T. Clemente-Napimoga, M. H. Napimoga, D. L. Pitol, J. P. Issa, S. Y. Fukada, R. Casagrande e W. A. Verri, “The flavonoid quercetin inhibits titanium dioxide (TiO₂)-induced chronic arthritis in mice,” *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **2018**, *53*, 81-95.
- [53] C. R. Ferraz, T. T. Carvalho, M. F. Manchope, N. A. Artero, F. S. Rasquel-Oliveira, V. Fattori, R. Casagrande e W. A. Verri, “Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development,” *Molecules*, **2020**, *25*, 762.
- [54] G. Carullo, A. Ahmed, O. Spiga, A. Brizzi, S. Saponara, F. Fusi e F. Aiello, “A multitarget semi-synthetic derivative of the flavonoid morin with improved in vitro vasorelaxant activity: Role of CaV1.2 and KCa1.1 channels,” *Biochemical Pharmacology*, **2021**, *185*, 114429.
- [55] C. He, Y. Pan, X. Ji e H. Wang, “Antioxidants: Introduction,” em *Antioxidant Polymers*, Wiley, Ed., **2012**, 1-21.
- [56] A. Hannan, B. Akhtar, A. Sharif, F. Anjum, I. Pasha, A. Khan, M. F. Akhtar e A. Saleem, “Quercetin-loaded chitosan nanoparticles ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats by regulating anti-oxidant enzymes and downregulating pro- and inflammatory cytokines,” *Inflammopharmacology*, **2023**, *31*, 287-300.
- [57] P. Iacopini, M. Baldi, P. Storchi e L. Sebastiani, “Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions,” *Journal of Food Composition and Analysis*, **2008**, *21*, 589-598.
- [58] K. C. Heim, “Natural Polyphenol and Flavonoid Polymers,” *Antioxidant Polymers*, **2012**, 23-53.
- [59] F. Khan, K. Niaz, F. Maqbool, F. Ismail Hassan, M. Abdollahi, K. Nagulapalli Venkata, S. Nabavi e A. Bishayee, “Molecular Targets Underlying the Anticancer Effects of Quercetin: An Update,” *Nutrients*, **2016**, *8*, 529.
- [60] R. Vidya Priyadarsini, R. Senthil Murugan, S. Maitreyi, K. Ramalingam, D. Karunagaran e S. Nagini, “The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-κB inhibition,” *European Journal of Pharmacology*, **2012**, *649*, 84-91.

- [61] H. Khan, H. Ullah, M. Aschner, W. S. Cheang e E. K. Akkol, “Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer’s Disease,” *Biomolecules*, **2019**, 10, 59.
- [62] Y. Shimmyo, T. Kihara, A. Akaike, T. Niidome e H. Sugimoto, “Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **2008**, 1780, 819-825.
- [63] A. K. Grewal, T. G. Singh, D. Sharma, V. Sharma, M. Singh, M. H. Rahman, A. Najda, M. Walasek-Janusz, M. Kamel, G. M. Albadrani, M. F. Akhtar, A. Saleem e M. Abdel-Daim, “Mechanistic insights and perspectives involved in neuroprotective action of quercetin,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2021**, 140, 111729.
- [64] I. Infarmed, “Saiba mais sobre ciclo de vida de um medicamento,” Infarmed, 2 8 2008. [Online]. Available: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1228470/SaibaMaisSobre2.pdf/f2d5dcac-d7bf-406c-af28-61bed660f3db?version=1.1>.
- [65] T. Riss, A. Niles, R. Moravec, N. Karassina e J. Vidugiriene, *Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells*, S. Markossian, A. Grossman, H. Baskir., **2019**.
- [66] B. Rotman e B. W. Papermaster, “Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1966**, 55, 134-141.
- [67] E. P. Carreiro, C. M. Gastalho, S. Ernesto, A. R. Costa, C. M. Antunes e A. J. Burke, “Synthesis and Antiproliferative Activity of Novel Quercetin-1,2,3-Triazole Hybrids using the 1,3-Dipolar Cycloaddition (Click) Reaction,” *Synthesis*, **2022**, 54, 4272-4284.
- [68] E. P. Carreiro, A. R. Costa, C. M. Antunes, S. Ernesto, F. Pinto, B. Rodrigues e A. J. Burke, “Quercetin-1,2,3-Triazole Hybrids as Multifunctional Anti-Alzheimer’s Agents,” *Molecules*, **2023**, 28, 7495.
- [69] M. Marques, J. Nunes, B. Ustymenko, L. Fialho, L. Martins, A. J. Burke, C. Filho, A. C. Craveiro, A. R. Costa, S. Branco e C. M. Antunes, “cEpiderm, a Canine Skin Analog Suitable for In Vivo Testing Replacement,” *BioChem*, **2022**, 2, 215-220.
- [70] E. P. Carreiro, A. R. Costa, M. M. Cordeiro, R. Martins, T. O. Pires, M. Saraiva, C. M. Antunes e A. J. Burke, “Novel hydroxyamides and amides containing d -glucopyranose or d -fructose units: Biological assays in MCF-7 and MDST8 cell lines,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2016**, 26, 1039-1043.
- [71] G. L. Ellman, K. Courtney, V. Andres e R. M. Featherstone, “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,” *Biochemical Pharmacology*, **1961**, 7, 88-95.
- [72] A. Mattarei, L. Biasutto, F. Rastrelli, S. Garbisa, E. Marotta, M. Zoratti e C. Paradisi, “Regioselective O-Derivatization of Quercetin via Ester Intermediates. An Improved Synthesis

of Rhamnetin and Development of a New Mitochondriotropic Derivative,” *Molecules*, **2010**, *15*, 4722-4736.

- [73] M. Kajjout e C. Rolando, “Regiospecific synthesis of quercetin O- β -d-glucosylated and O- β -d-glucuronidated isomers,” *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 4731-4741.
- [74] A. M. d. R. Gonsalves e T. M. Y. D. P. e. Melo, *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*, Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, **2007**.
- [75] N. Martins, E. P. Carreiro, A. Locati, J. P. P. Ramalho, M. J. Cabrita, A. J. Burke e R. Garcia, “Design and development of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of deltamethrin in olive oil: An integrated computational-assisted approach,” *Journal of Chromatography A*, **2015**, *1409*, 1-10.
- [76] R. Garcia, N. Martins, E. P. Carreiro, M. Simões, M. M. L. R. Carrott, P. J. M. Carrott, A. J. Burke e M. J. Cabrita, “Development of a selective sorbent for the solid-phase extraction of terbuthylazine in olive oil samples: A molecular imprinting strategy,” *Journal of Separation Science*, **2015**, *38*, 1204-1212.
- [77] R. Garcia, E. P. Carreiro, J. P. Prates Ramalho, A. J. Burke, J. C. Lima, M. D. Gomes da Silva, A. M. Costa Freitas e M. J. Cabrita, “A photoswitchable “host-guest” approach for the selective enrichment of dimethoate from olive oil,” *Analytica Chimica Acta*, **2018**, *1035*, 60-69.
- [78] K. Rostamizadeh, M. Vahedpour e S. Bozorgi, “Synthesis, characterization and evaluation of computationally designed nanoparticles of molecular imprinted polymers as drug delivery systems,” *International Journal of Pharmaceutics*, **2012**, *424*, 67-75.
- [79] E. C. Figueiredo, C. L. Seabra, T. V. Mendes, M. A. Rosa, C. D. L. N. Pinho, D. M. de Oliveira Figueiredo, V. B. Boralli, M. K. A. Junior e M. E. T. de Lima, “Molecularly imprinted nanoparticles as drug carriers to the brain,” *Journal of Materials Science*, **2023**, *58*, 17578-17593.
- [80] V. Galván-Romero, F. Gonzalez-Salazar, K. Vargas-Berrones, L. E. Alcantara-Quintana, F. Martinez-Gutierrez, S. Zarazua-Guzman e R. Flores-Ramírez, “Development and evaluation of ciprofloxacin local controlled release materials based on molecularly imprinted polymers,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2024**, *195*, 114178.
- [81] J. Crank, *The mathematics of diffusion*, Second Edition ed., England: Oxford University Press, **1975**.
- [82] M. Wiśniewska, T. Urban, E. Grządka, V. I. Zarko e V. M. Gun’ko, “Comparison of adsorption affinity of polyacrylic acid for surfaces of mixed silica–alumina,” *Colloid and Polymer Science*, **2014**, *292*, 699-705.

6 Anexos

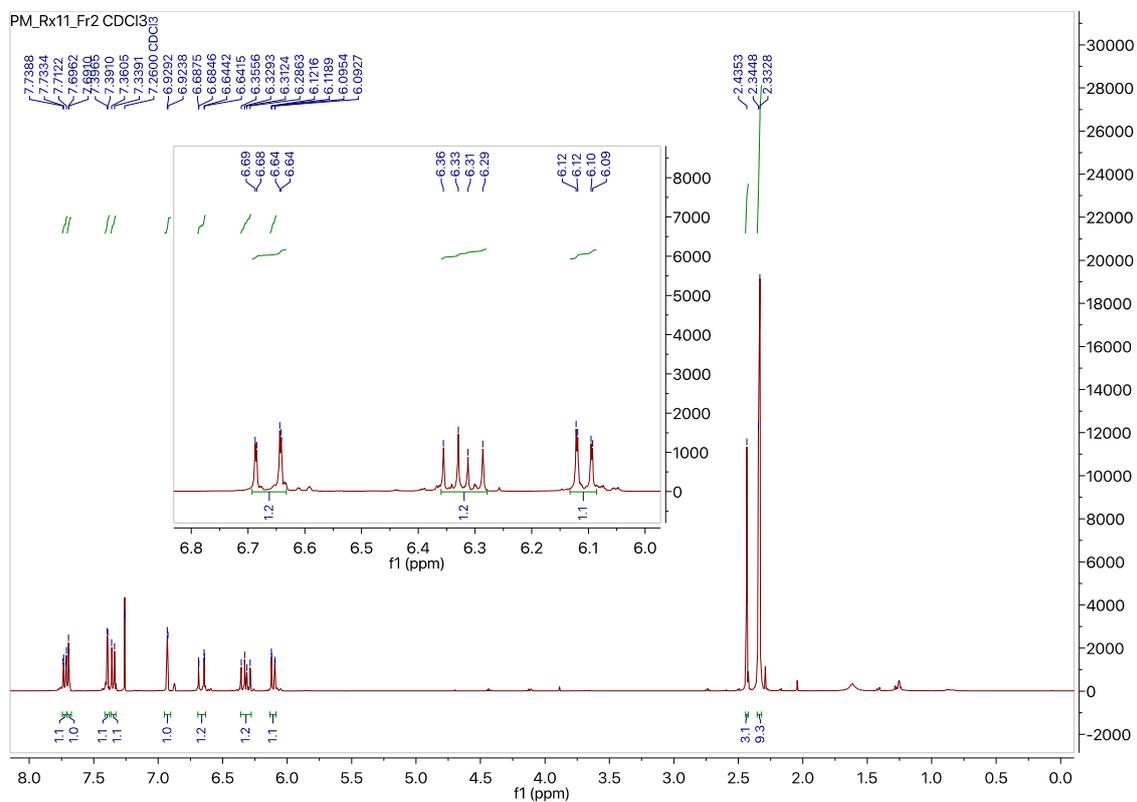


Figura 1A. Espectro de ^1H RMN do composto 3.

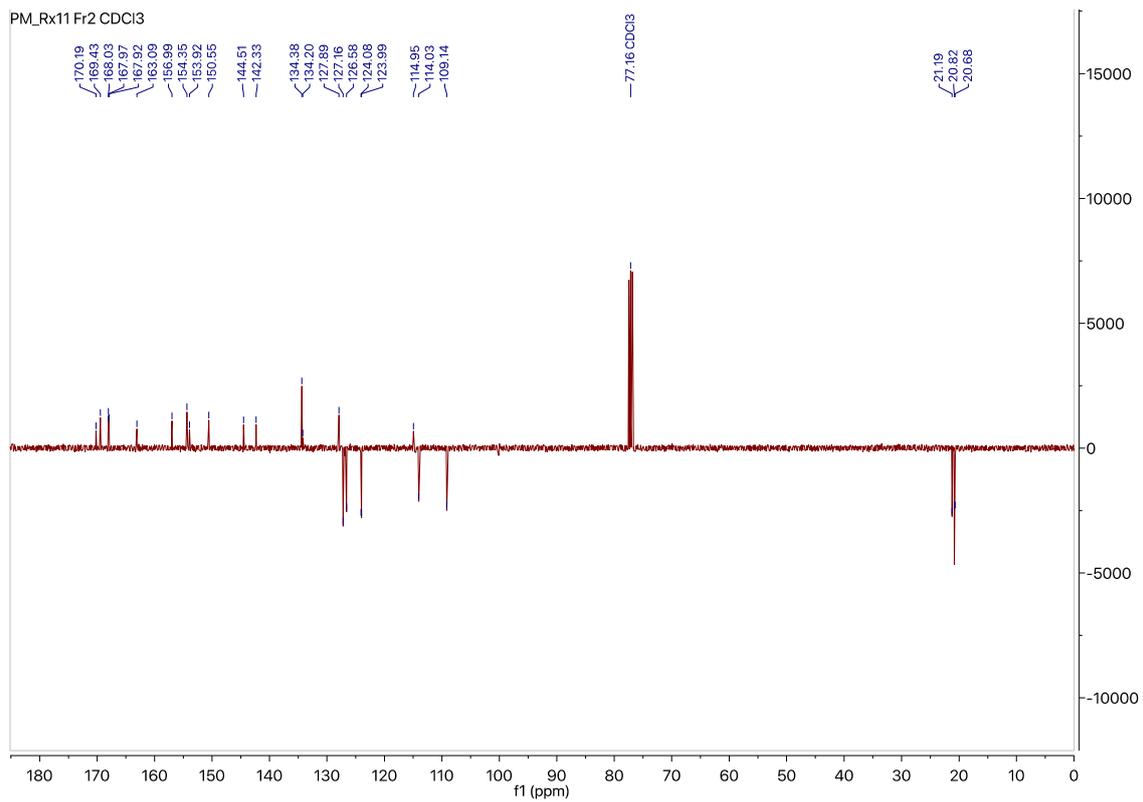


Figura 2A. Espectro de ^{13}C APT RMN do composto **3**.

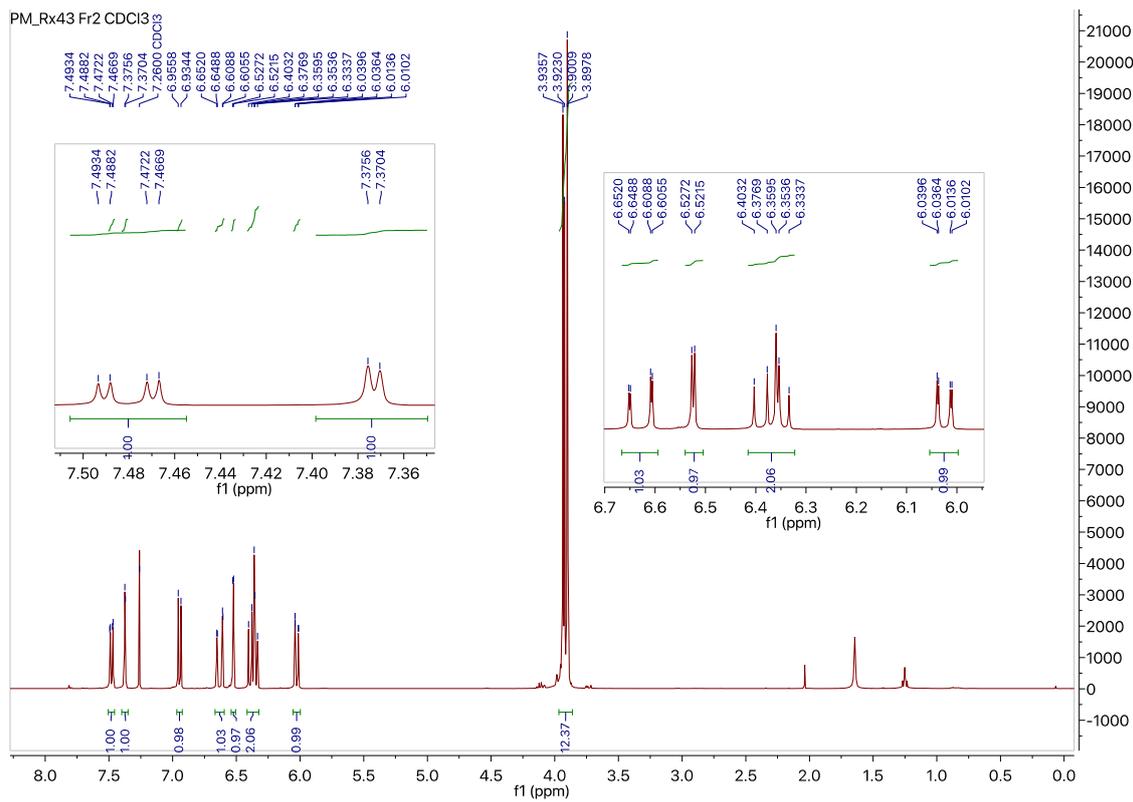


Figura 3A. Espectro de ^1H RMN do composto 5.

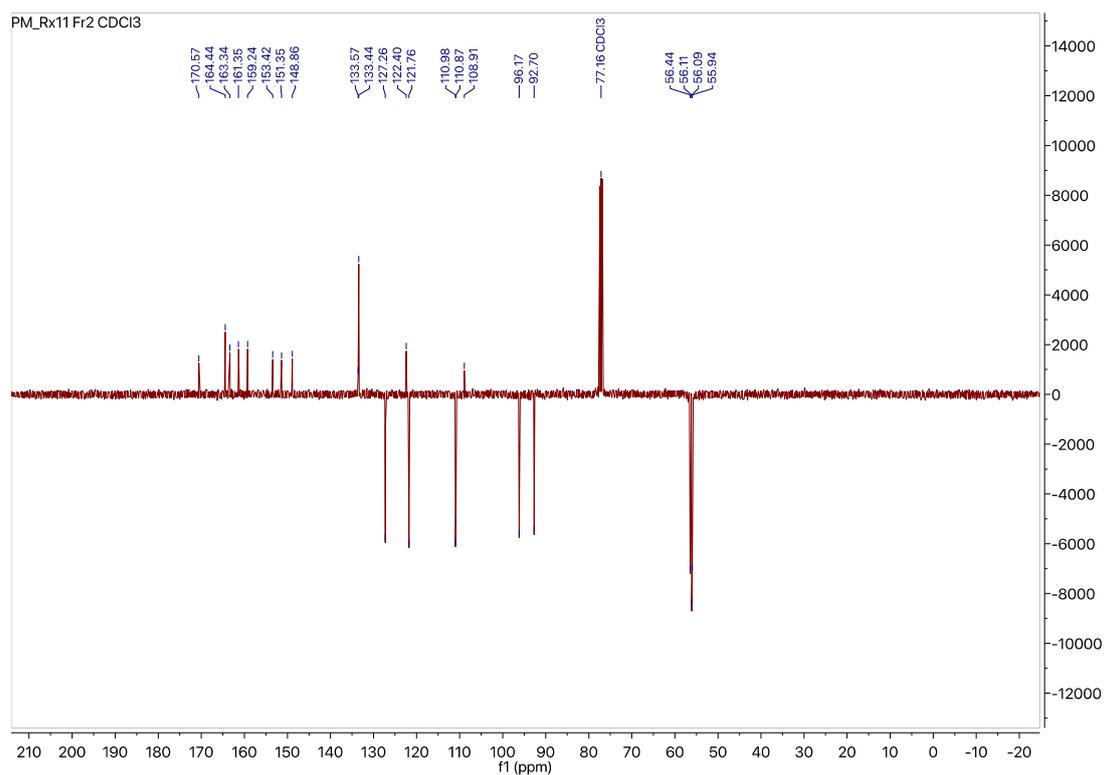


Figura 4A. Espectro de ^{13}C APT RMN do composto 5.

Tabela S1. Quantidade de donepezilo adsorvida nos MIP/NIPs estudados nos ensaios de liberação.

pH	Polímero	Massa do Polímero (mg)	Tempo de Incubação de carregamento (h)	[Donepezilo] carregado (mg/L)	Massa de Donepezilo carregado (mg)
3	MIP 9 – Réplica 1	25,2	22	356,96±0,92	0,607
3	MIP 9 – Réplica 2	25,2	22	318,67±1,34	0,542
3	NIP 9 – Réplica 1	25,0	22	324,24±2,33	0,551
3	NIP 9 – Réplica 2	25,2	22	246,56±1,91	0,419
5,5	MIP - 9 Réplica 1	25,2	15,7	352,14±0,80	0,599
5,5	MIP 9 – Réplica 2	25,2	22	351,26±0,77	0,597
5,5	NIP 9 – Réplica 1	25,0	15,7	310,09±2,12	0,527
5,5	NIP 9 – Réplica 2	25,2	22	323,58±5,98	0,550
7	MIP 9 – Réplica 1	25,2	22	345,64±0,74	0,588
7	MIP 9 – Réplica 2	25,2	22	351,72±0,51	0,598
7	NIP 9 – Réplica 1	25,0	22	324,21±1,22	0,551
7	NIP 9 – Réplica 2	25,0	22	320,82±1,13	0,545