

1 2 9 0



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Diana Patrícia Gonçalves Batista

**ADMINISTRAÇÃO DE ALERGÉNIOS DA PELE NA
PREVENÇÃO DA DOENÇA DE ALZHEIMER
AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada, orientada pela Professora Doutora Sónia Alexandra Pinto Ribeiro Silva Santos e Doutora Joana Bicker de Melo Alves Aparício, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Patrícia Gonçalves Batista

**ADMINISTRAÇÃO DE ALERGÉNIOS DA PELE NA
PREVENÇÃO DA DOENÇA DE ALZHEIMER
AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada, orientada pela Professora Doutora Sónia Alexandra Pinto Ribeiro Silva Santos e Doutora Joana Bicker de Melo Alves Aparício, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021

Agradecimentos

À Doutora Joana Bicker, à Professora Doutora Sónia Santos e à Professora Doutora Ana Fortuna pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos conhecimentos científicos partilhados, por toda a dedicação e pela constante disponibilidade, carinho e apoio prestados.

Aos colegas de laboratório que me acompanharam sempre com boa disposição e que me ajudaram no decorrer deste trabalho.

Aos meus pais por todo o apoio que me deram ao longo do meu percurso académico, nem sempre foi fácil, mas nunca duvidaram das minhas capacidades e sempre acreditaram em mim, sem vocês nada disto era possível.

Ao meu irmão e a todos os meus amigos pela amizade, motivação e apoio incondicional.

A todos muito obrigada!

Índice

Agradecimentos	5
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	10
Lista de Abreviaturas	11
Abstract	13
Resumo	15
1. Introdução	17
1.1 Doença de Alzheimer (DA)	17
1.1.1 Fatores de risco	18
1.1.2 Epidemiologia	21
1.1.3 Fisiopatologia	22
1.1.3.1 Hipótese da cascata amilóide	23
1.1.3.2 Hipótese da proteína tau	26
1.1.3.3 Hipótese colinérgica	27
1.1.3.4 Inflamação crónica	28
1.1.3.5 Nrf2	29
1.1.4 Farmacoterapia atual e futuras abordagens	31
1.2 Alergénios da pele e o seu papel na DA	33
1.2.1 Isoeugenol	34
1.2.1.1 Propriedades farmacocinéticas	35
2. Objetivos	37
2.1 Objetivos gerais	37
2.2 Objetivos específicos	37
3. Materiais e Métodos	39
3.1 Reagentes químicos	39
3.2 Instrumentação cromatográfica e condições cromatográficas	39
3.3 Soluções stock e soluções de fortificação	40
3.4 Padrões de calibração e controlos de qualidade (QCs)	41
3.5 Preparação das amostras e método de extração	42
3.6 Validação do método	42
3.6.1 Seletividade	42
3.6.2 Curva de calibração	43
3.6.3 Exatidão e precisão	43

3.6.4	Recuperação.....	44
3.6.5	<i>Carry-over</i>	44
3.6.6	Estabilidade.....	44
3.7	Estudo <i>in vivo</i>	45
3.7.1	Animais e ética.....	45
3.7.2	Estudo farmacocinético <i>in vivo</i>	46
3.7.3	Análise farmacocinética.....	46
4.	Resultados e Discussão	49
4.1	Desenvolvimento do método.....	49
4.1.1	Otimização da fase móvel e escolha do PI.....	49
4.1.2	Otimização do processo de extração.....	50
4.2	Seletividade.....	52
4.3	Curva de calibração e LLOQ.....	57
4.4	Exatidão e Precisão.....	64
4.5	Recuperação e <i>carry-over</i>	64
4.6	Estabilidade.....	66
4.7	Análise farmacocinética <i>in vivo</i>	67
5.	Conclusões	71
	Referências Bibliográficas	73

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura fisiológica do cérebro e dos neurónios no (a) cérebro saudável (b) cérebro com DA.....	23
Figura 2 – Esquema sobre as vias de processamento da APP.....	24
Figura 3 – Diagrama exemplificativo da cascata amilóide.....	26
Figura 4 – Proteína tau e os microtúbulos.....	27
Figura 5 – Papel das células da microglia no desenvolvimento da DA.....	29
Figura 6 – Mecanismos do Nrf2 após regulação negativa (A) e positiva (B).....	31
Figura 7 – Estrutura química do isoeugenol.....	34
Figura 8 – Esquema metabólico do isoeugenol.....	36
Figura 9 – Estrutura química do perampanel.....	39
Figura 10 – Cromatogramas representativos de amostras de matrizes biológicas brancas (plasma, cérebro e pulmão), submetidas aos processos de extração A e B.....	53
Figura 11 – Cromatogramas representativos de amostras LLOQ e ULOQ, nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão, após processo de extração A.....	54
Figura 12 – Cromatogramas representativos das extrações das amostras LLOQ e ULOQ, nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão, no processo de extração B (gama baixa).....	55
Figura 13 – Cromatogramas representativos das extrações das amostras LLOQ e ULOQ, nas matrizes biológicas de plasma e pulmão, no processo de extração B (gama alta).....	56
Figura 14 – Perfis de concentração-tempo, nas matrizes biológicas de plasma (A), cérebro (B) e pulmão (C), após administração IN de isoeugenol (100 mg/kg).....	68

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características físico-químicas do isoeugenol.....	35
Tabela 2 – Resumo das concentrações dos padrões de calibração e respectivas soluções de fortificação (entre []) utilizados com o método de extração A e B nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão.....	40
Tabela 3 – Tempo de retenção (Rt) e grau de lipofilia (LogP) de fármacos testados como padrão interno (PI).....	50
Tabela 4 – Erro relativo (%ER) obtido para cada fator de ponderação aplicado às gamas de calibração de dois processos de extração (A e B) nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão.....	58
Tabela 5 – Linearidade obtida para cada fator de ponderação aplicado às gamas de calibração de dois processos de extração (A e B) nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão.....	59
Tabela 6 – Parâmetros das curvas de calibração do isoeugenol nas matrizes biológicas em estudo.....	60
Tabela 7 – Determinação da precisão (% CV) e exatidão (% Bias) inter-dia no QCLLOQ (limite inferior de quantificação), QC1 (nível baixo), QC2 (nível médio) e QC3 (nível alto).....	62
Tabela 8 – Determinação da precisão (% CV) e exatidão (% Bias) intra-dia no QCLLOQ (limite inferior de quantificação), QC1 (nível baixo), QC2 (nível médio) e QC3 (nível alto).....	63
Tabela 9 – Recuperações relativas do isoeugenol para o QC1, QC2 e QC3 (n=5) em cada matriz biológica, com o processo de extração A e B.....	65
Tabela 10 – Estabilidade das amostras não processadas e processadas com o processo de extração B.....	66
Tabela 11 – Estabilidade das soluções de fortificação e stock.....	67
Tabela 12 – Parâmetros farmacocinéticos do isoeugenol em plasma, cérebro e pulmão, após administração IN (100 mg/kg) a murganhos.....	68

Lista de Abreviaturas

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AChEIs – Inibidores da acetilcolinesterase

ACN – Acetonitrilo

AGEs – Produtos de glicação avançada

ApoE – Apolipoproteína E

APP – Proteína precursora amilóide

ARE – Elementos de reação antioxidante

AUC_{extrap} – Área sob a curva concentração-tempo extrapolada

AUC_{inf} – Área sob a curva concentração-tempo desde o tempo zero até ao infinito

AUC_t – Área sob a curva concentração-tempo desde o tempo zero até à última concentração quantificável

BHE – Barreira hematoencefálica

C_{max} – Concentração máxima

CV – Coeficiente de variação

DA – Doença de Alzheimer

DAE – Doença de Alzheimer esporádica

DAF – Doença de Alzheimer familiar

DCV – Doenças cardiovasculares

DMF – Dimetilfumarato

ER – Erro relativo

FDA – Food and Drug Administration

GSK-3 β – Cinase 3 β da sintase do glicogénio

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

IL – Interleucinas

IN – Intranasal

IV – Intravenosa

K_{el} – Constante de eliminação

LLOQ – Limite inferior de quantificação

MeOH – Metanol

MMF – Monometilfumarato

NFT – Emaranhados neurofibrilares

NMDA – N-metil-D-aspartato

Nrf2 – Fator nuclear (eritróide-derivado 2)-tipo 2

OMS – Organização Mundial de Saúde

PG – Prostaglandinas

PI – Padrão interno

PLA2 – Fosfolipase A2

Placas A β – Placas β -amilóide

PS – Presenilina

QCs – Controlos de qualidade

ROS – Espécies reativas de oxigénio

Rt – Tempo de retenção

SNC – Sistema nervoso central

t_{1/2 α} – Tempo de semi-vida de distribuição

t_{1/2 β} – Tempo de semi-vida de eliminação

t_{max} – Tempo para atingir a concentração máxima

ULOQ – Limite superior de quantificação

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder, frequently associated with advancing age. Its global incidence has been increasing dramatically and significant efforts have been made to develop new methods of treatment. However, there are still no available treatments for all patients that effectively slow or block disease progression. Thus, the discovery of innovative therapeutic approaches for the prevention or treatment of AD is necessary. A skin allergen was identified as an activator of the transcription factor Nrf2, which is deficiently activated in AD. Thus, it is expected that Nrf2 activation may promote neuroprotective mechanisms, potentially beneficial for the treatment of AD.

The first objective of the present dissertation was the development and validation of a high-pressure liquid chromatography (HPLC) technique for the quantification of the skin allergen in mouse plasma, brain and lung. Then, the method was applied to determine the concentrations of the skin allergen following pharmacokinetic studies with intranasal (IN) administration (100 mg/kg).

Chromatographic analysis was performed by isocratic elution with a mobile phase composed of water:acetonitrile:methanol (65:35:5, v/v/v) at a flow rate of 1 mL/min. Analyte and internal standard extraction was achieved by protein precipitation with acetonitrile (1:2). Recoveries ranged from 87.1 – 97.1% (plasma), 75.4 – 81.9% (brain) and 77.5 – 79.0% (lung). Linearity was obtained in the concentration range of 0.07 – 7 µg/mL (low range) for plasma, brain and lung, and 7 – 140 µg/mL (high range) for plasma and lung. In the pharmacokinetic study, a fast absorption of the skin allergen was observed ($t_{max} = 5$ minutes in plasma), as well as a similarly fast distribution ($t_{max} = 5$ minutes in brain and lung) and elimination ($t_{1/2\beta} = 18.12$ minutes in plasma). Dose-normalized exposure in plasma by IN route ($AUC_{inf/dose} = 6.04 \mu\text{g min mL}^{-1} \text{ kg mg}^{-1}$) was identical to that of intravenous route ($AUC_{inf/dose} = 6.76 \mu\text{g min mL}^{-1} \text{ kg mg}^{-1}$).

Overall, the validated bioanalytical method demonstrated selectivity, linearity, sensitivity, accuracy and precision. In the future, additional studies with intravenous and oral administration are suggested, in order to characterize brain and lung exposure with these routes.

Keywords: Alzheimer's disease, bioanalytical method, intranasal administration, Nrf2, pharmacokinetic study, skin allergen.

Resumo

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa, frequentemente associada ao avanço da idade. Como a sua incidência tem vindo a aumentar drasticamente, têm sido realizados grandes esforços para desenvolver novos métodos de tratamento. No entanto, ainda não existem tratamentos disponíveis para todos os doentes, de forma a retardar ou bloquear a progressão da doença. Assim, torna-se necessária a descoberta de novas abordagens terapêuticas. A identificação de um alergénio da pele como ativador do fator de transcrição Nrf2, o qual se encontra deficientemente ativado na DA, fez com que se perspetivasse que a sua ativação possa promover mecanismos neuroprotetores potencialmente benéficos para o tratamento da doença.

O primeiro objetivo da presente tese foi o desenvolvimento e a validação de uma técnica analítica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para a quantificação do alergénio em plasma, cérebro e pulmão de murganho. De seguida, procedeu-se à aplicação do método bioanalítico para determinar as concentrações de alergénio em matrizes biológicas obtidas na sequência de estudos farmacocinéticos com administração intranasal (IN) (100 mg/kg).

A análise cromatográfica foi efetuada por eluição isocrática com uma fase móvel composta por água:acetonitrilo:metanol (65:35:5, v/v/v) a um fluxo de 1 mL/min. A extração do analito e do padrão interno consistiu em precipitação de proteínas com acetonitrilo (1:2). Atingiram-se recuperações entre 87,1 – 97,1% (plasma), 75,4 – 81,9% (cérebro) e 77,5 – 79,0% (pulmão) e obteve-se linearidade na gama de 0,07 – 7 µg/mL (gama baixa) em plasma, cérebro e pulmão, e 7 – 140 µg/mL (gama alta) em plasma e pulmão. No estudo farmacocinético, o alergénio da pele revelou uma rápida absorção ($t_{max} = 5$ minutos em plasma), bem como uma célere distribuição ($t_{max} = 5$ minutos em cérebro e pulmão) e eliminação ($t_{1/2\beta} = 18,12$ minutos). A exposição normalizada pela dose foi idêntica em plasma após administração IN ($AUC_{inf/dose} = 6,04 \mu\text{g min mL}^{-1} \text{ kg mg}^{-1}$) e intravenosa ($AUC_{inf/dose} = 6,76 \mu\text{g min mL}^{-1} \text{ kg mg}^{-1}$).

De forma geral, considera-se que o método bioanalítico desenvolvido demonstrou seletividade, linearidade, sensibilidade, exatidão e precisão. No futuro, sugerem-se estudos adicionais com administração oral e intravenosa para caracterizar a exposição cerebral e pulmonar com estas vias.

Palavras-chave: Administração intranasal, alergénio da pele, Doença de Alzheimer, estudo farmacocinético, Nrf2, método bioanalítico.

I. Introdução

I.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa, frequentemente associada ao avanço da idade e cujas manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas resultam da neurodegeneração do sistema nervoso central (SNC). Esta neurodegeneração leva a um declínio progressivo e irreversível das funções cognitivas, tais como memória, atenção, concentração, linguagem e capacidade de aprendizagem. Este declínio é muitas vezes acompanhado por distúrbios comportamentais, incluindo agressividade, depressão e alucinações. A isso acresce ainda uma perda de capacidade funcional que dificulta a realização das atividades quotidianas.^{1,2} A progressão desta doença varia de pessoa para pessoa, mas em última instância, acaba por levar a uma situação de dependência completa, ou à morte do doente.³

Existem cada vez mais estudos clínicos que apontam para alterações cognitivas muito subtis durante anos (ou até mesmo décadas) antes do diagnóstico de DA. Nesse período, os indivíduos permanecem assintomáticos, mas o processo fisiopatológico da doença está a progredir, nomeadamente em indivíduos com maior risco genético.⁴

Por esse motivo, considera-se que a DA se caracteriza primeiramente por uma fase inicial pré-clínica assintomática, de grau ligeiro, que pode durar vários anos. Nesta fase há uma leve perda de memória e alterações patológicas no córtex e hipocampo, onde se verifica a existência de marcadores amilóides anormais. No entanto, ainda não há qualquer tipo de deficiência funcional nas atividades de vida diárias ou sintomas clínicos da doença.^{4,5} Posteriormente, segue-se uma fase de pré-demência (défice cognitivo ligeiro), de grau ligeiro a moderado. Nesta etapa, a doença propaga-se em áreas do córtex cerebral, observam-se marcadores amilóides anormais e lesões neuronais, e começam a surgir sintomas como a perda de concentração e memória, alterações de humor frequentes, desorientação e depressão.^{4,5} Por fim, segue-se a fase de demência (DA grave) correspondente a um grau severo. A doença propaga-se em todas as áreas do córtex e são encontrados marcadores amilóides anormais, bem como lesões neuronais graves. Ocorre ainda deficiência funcional e cognitiva progressiva, que pode provocar a morte do doente.^{4,5}

As terapêuticas disponíveis na atualidade e os resultados de ensaios clínicos recentemente realizados (direcionados para as fases de pré-demência e demência) demonstraram ter um efeito limitado. Desta forma, crê-se que o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas aplicadas na fase pré-clínica da DA poderia ser mais eficaz. Dado que nesta fase

ainda não é observada deficiência cognitiva significativa, poderá haver maior probabilidade de conseguir prevenir ou modificar o curso da doença.⁵

Porém, um dos maiores entraves na DA é a ausência de biomarcadores específicos que indiquem que um indivíduo assintomático irá progredir para fase de sintomatologia clínica. Se fosse possível determinar o risco de desenvolver DA e o seu tempo de progressão numa fase pré-clínica, poder-se-ia encontrar uma terapêutica modificadora da doença eficaz.⁵

1.1.1. Fatores de risco

A DA é considerada uma doença multifatorial associada a fatores de risco diversificados tais como o envelhecimento, fatores genéticos, lesões cerebrais, doenças cardiovasculares (DCVs), obesidade, diabetes, doenças infecciosas e fatores ambientais (ex.: poluição atmosférica, exposição a metais, dieta e estilo de vida).^{1,6}

Um dos fatores de risco mais importantes na DA é o envelhecimento. De facto, esta doença raramente se manifesta em indivíduos mais jovens e a maioria dos casos (cerca de 94%) surge após os 65 anos de idade. O cérebro é um dos órgãos afetados, pois há redução do seu volume e peso, assim como perda de sinapses. Porém, algumas destas alterações também ocorrem no processo de envelhecimento normal (não associado a demência), o que torna mais difícil o diagnóstico da doença. Além disso, podem surgir várias outras patologias durante o envelhecimento, como a depressão e os distúrbios de sono, que também têm sido considerados fatores de risco modificáveis para prevenir ou atrasar o surgimento de DA.^{1,7,8,9,10,11}

Precisamente com base na idade de início da patologia, pode dividir-se a DA em dois tipos, doença de Alzheimer familiar (DAF) e doença de Alzheimer esporádica (DAE). A DAF corresponde a cerca de 1-6% dos casos. Nesta forma da doença há um ou mais membros da família, de diferentes gerações, a quem esta foi diagnosticada. A idade em que pode surgir varia dos 30 aos 65 anos. Mais comum do que a DAF é a DAE, que tem início tardio e surge depois dos 65 anos.¹

Neste contexto, importa realçar que os fatores genéticos também desempenham um papel importante no desenvolvimento de DA. A maioria dos casos de DAF é devida a mutações raras herdadas em genes dominantes da proteína precursora amilóide (APP), Presenilina-1 (PSEN-1), Presenilina-2 (PSEN-2) e apolipoproteína-E (ApoE).^{1,7,12}

A APP é uma proteína transmembranar do tipo I codificada pelo gene APP no cromossoma 21. É clivada pela α , β , e γ -secretases para libertar proteínas, nomeadamente o peptídeo amiloide β ou $A\beta$. Em indivíduos com DAF foram encontradas cerca de 30 mutações no gene APP, das quais 25 estão relacionadas com a DA. Estas mutações causam uma acumulação elevada de $A\beta$, com exceção de uma mutação protetora, a A673T, que diminui a secreção de $A\beta$ e apresenta assim, um papel protetor na DA. ^{1, 13, 14}

Os genes PSEN-1 e PSEN-2 estão localizados nos cromossomas 14 e 1, respetivamente, e são dominantes na DAF. As mutações no gene PSEN-1 são as mais comuns (estima-se que possam ser mais de 200), enquanto as mutações no gene PSEN-2 são mais raras (menos de 40 mutações identificadas). A PSEN-1 é uma proteína que ativa o complexo γ -secretase e desempenha um papel importante na produção de $A\beta$ pela APP. As mutações no gene PSEN-1 aumentam a produção da $A\beta_{42}$ (isoforma mais tóxica) em relação à produção da $A\beta_{40}$. As mutações PSEN-2 são raras, mas qualquer mutação na PSEN-2 pode ter um efeito grave na relação $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, pois provocam um aumento significativo na atividade da γ -secretase. ^{1, 15,}

16

A proteína ApoE é uma glicoproteína altamente expressa no fígado, nos astrócitos e na microglia. Tem um papel essencial na produção de mielina e na função cerebral normal. O gene da ApoE está localizado no cromossoma 19 e tem três isoformas, ApoE2, ApoE3 e ApoE4. A isoforma ApoE4 é um fator de risco forte para a DAF e para a DAE, enquanto que as isoformas ApoE2 e ApoE3 estão associadas a um risco menor e a um efeito protetor. A ApoE4 tem um papel importante na deposição da $A\beta$, e pode provocar danos vasculares cerebrais, como por exemplo, a angiopatia amilóide cerebral, usada como marcador para a DA. ^{1, 17}

Os fatores ambientais também apresentam risco para o desenvolvimento de DA. A poluição atmosférica é um fator relevante, pois verificou-se que indivíduos expostos a poluentes atmosféricos continham placas $A\beta$ no córtex frontal e proteína tau hiperfosforilada, havendo elevado risco de stress oxidativo, neuroinflamação e neurodegeneração. ^{1, 7, 18} A dieta também tem influência na patogénese da DA porque o processamento alimentar causa degradação de micronutrientes e formação de produtos tóxicos secundários, incluindo produtos finais de glicação avançada ou AGEs (do inglês *Advanced Glycation End products*). Os AGEs têm a capacidade de induzir stress oxidativo e inflamação, que pode levar ao declínio cognitivo e à progressão da DA. A desnutrição é outro fator de risco para a DA, visto que a deficiência de nutrientes como o folato, vitamina B12 e vitamina D pode desencadear uma diminuição da

função cognitiva.^{1, 7, 19} Por sua vez, os metais estão igualmente entre os fatores de risco ambientais envolvidos no desenvolvimento da DA, nomeadamente, o alumínio, chumbo e cádmio. O alumínio é utilizado significativamente na indústria alimentar, farmacêutica, de cosméticos, entre outras. Alguns estudos realizados em ratos e murganhos²⁰, demonstraram que o alumínio se acumula em áreas do córtex, hipocampo e cerebelo, após administração oral ou parentérica, e que pode provocar a desintegração, agregação e fosforilação da proteína tau.²⁰ O chumbo pode atravessar rapidamente a barreira hematoencefálica (BHE) e modificar a diferenciação neural e a sinaptogénese, causando danos cerebrais graves. O cádmio é um metal cancerígeno e solúvel em água, que também pode atravessar rapidamente a BHE e originar doenças neurológicas como a DA. Por fim, o consumo excessivo de álcool, o tabagismo, o sedentarismo e lesões físicas no cérebro (como a encefalopatia traumática crónica) também podem propiciar o desenvolvimento de DA.^{1, 7}

Os doentes com diagnóstico de DA têm normalmente outras co-morbilidades como DCVs, obesidade, diabetes ou doenças infecciosas.^{1, 7} Efetivamente, as DCVs são um dos fatores de risco mais importantes para a DA. Dentro deste grupo estão abrangidos o acidente vascular cerebral (AVC), a fibrilhação auricular, a insuficiência cardíaca, a doença coronária e a hipertensão arterial. A perda de tecido neuronal que ocorre durante um AVC vai promover um aumento do efeito neurodegenerativo, influenciando assim, a patogénese da DA. Por outro lado, a fibrilhação auricular causa embolias que podem provocar AVCs e conduzir a uma diminuição da memória e das funções cognitivas. Enquanto que na insuficiência cardíaca há um risco acrescido de hipóxia e danos neuronais, na doença coronária observa-se aterosclerose, hipoperfusão e embolias, as quais estão relacionadas com um aumento do risco de DA. Por último, a hipertensão também é um fator de risco para a DA, pois está associada ao espessamento e estreitamento das paredes dos vasos sanguíneos. Este efeito provoca uma redução do fluxo sanguíneo cerebral e, em casos crónicos, pode levar a edema cerebral.^{1, 7, 21,}

22

A obesidade pode facilitar o desenvolvimento de outras doenças como a diabetes tipo 2, DCVs e cancro, que estão identificadas como fatores de risco para a DA.^{1, 7} Num contexto de obesidade, ocorre o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo. Estas citocinas estimulam macrófagos e linfócitos que podem desencadear inflamação local e sistémica, promovendo assim, resistência à insulina e hiperglicemia. Na obesidade e diabetes, a inflamação cerebral estimula a ativação de células da microglia que leva a uma redução da plasticidade sináptica e a neurogénese insuficiente. As células da microglia podem afetar o substrato do recetor de insulina I (IRS-I, do inglês *Insulin Receptor Substrate-1*), bloqueando a

sinalização intracelular da insulina, que tem um papel importante na função neuronal. Por conseguinte, a alteração da ação da insulina pode resultar na acumulação de peptídeo A β e na redução da degradação da proteína tau. ^{1, 7, 23, 24}

Por fim, infeções crónicas do SNC, como por exemplo, pelo vírus do herpes simplex (HSV-1) e as infeções bacterianas crónicas, podem ser um dos fatores de risco para o desenvolvimento de DA, pois causam acumulação de placas A β e formação de emaranhados neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada (NFTs, do inglês *Neurofibrillary Tangles*). ^{1, 7, 25}

1.1.2. Epidemiologia

A incidência global de demência tem vindo a aumentar drasticamente nas últimas décadas. O aumento da esperança média de vida é um dos fatores mais relevantes que contribui para o agravamento do envelhecimento populacional e, assim, para o aumento do número de casos de demência. ³

Em 2021, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que haveria cerca de 55 milhões de pessoas com demência em todo o mundo, e que surgirão sensivelmente 10 milhões de novos casos a cada ano. As projeções indicam que o número de novos casos irá subir para 78 milhões em 2030 e 139 milhões em 2050. A forma mais comum de demência é a DA que representa 60-70% dos casos. ^{3,26}

Em Portugal, as estimativas da prevalência de demência indicam que, em 2018, havia aproximadamente 193.516 pessoas com demência, correspondendo a 1,88% da população total. Apesar de se prever uma diminuição da população no país nos próximos anos, antevê-se que o número de indivíduos com demência irá aumentar para 229.914 em 2025 (2,29% da população) e 346.905 em 2050 (3,82% da população). ²⁷

Atualmente, a OMS anunciou que a demência ocupa o sétimo lugar na taxa de mortalidade mundial em relação a outras doenças. Contudo, talvez tão relevante como a mortalidade atribuída à demência seja a morbilidade que lhe está associada. Neste sentido, estima-se que a demência contribua com mais de 11,9% dos anos vividos com incapacidade e dependência em pessoas acima dos 60 anos. ^{3,26}

Esta elevada morbilidade tem um impacto social e económico significativo, pois acarreta custos em assistência médica e social muito significativos que se refletem numa enorme sobrecarga para os sistemas nacionais de saúde, e também possuem um grande impacto na economia das famílias. ²⁸ As famílias e cuidadores de doentes com demência são sujeitas a elevados níveis de

stress, devido à pressão física, emocional e financeira, estando muito predispostos a sofrer de depressão e distúrbios de ansiedade. ²⁹

Globalmente, a demência tem maior impacto nas mulheres e 75% do número total de mortes corresponde ao género feminino. ²⁶ Além da doença ser mais prevalente no género feminino do que no género masculino, constata-se que os sintomas cognitivos e psiquiátricos são diferentes entre homens e mulheres. Por norma, as mulheres demonstram um declínio cognitivo mais acelerado e maior taxa de atrofia cerebral do que os homens, depois do diagnóstico de défice cognitivo ligeiro. Ainda não são conhecidas as causas que justificam estas diferenças entre os dois géneros, mas pensa-se que poderão estar parcialmente associadas à maior esperança média de vida das mulheres. ^{26,30, 31}

1.1.3. Fisiopatologia

Apesar de a etiologia da DA ainda ser desconhecida, as hipóteses atualmente avançadas para justificar o seu aparecimento são a hipótese da cascata amilóide, as modificações pós-transcrição da proteína tau, a hipótese colinérgica e a inflamação crónica. ^{1, 32}

A fisiopatologia da DA caracteriza-se por uma perda sináptica significativa e por morte neuronal observada no córtex cerebral e no hipocampo. A cascata metabólica amilóide e as modificações pós-transcrição da proteína tau são consideradas as hipóteses mais importantes na fisiopatologia da DA (Figura 1). Contudo, não são suficientes para explicar a diversidade de anormalidades bioquímicas e patológicas verificadas nesta doença. ³³

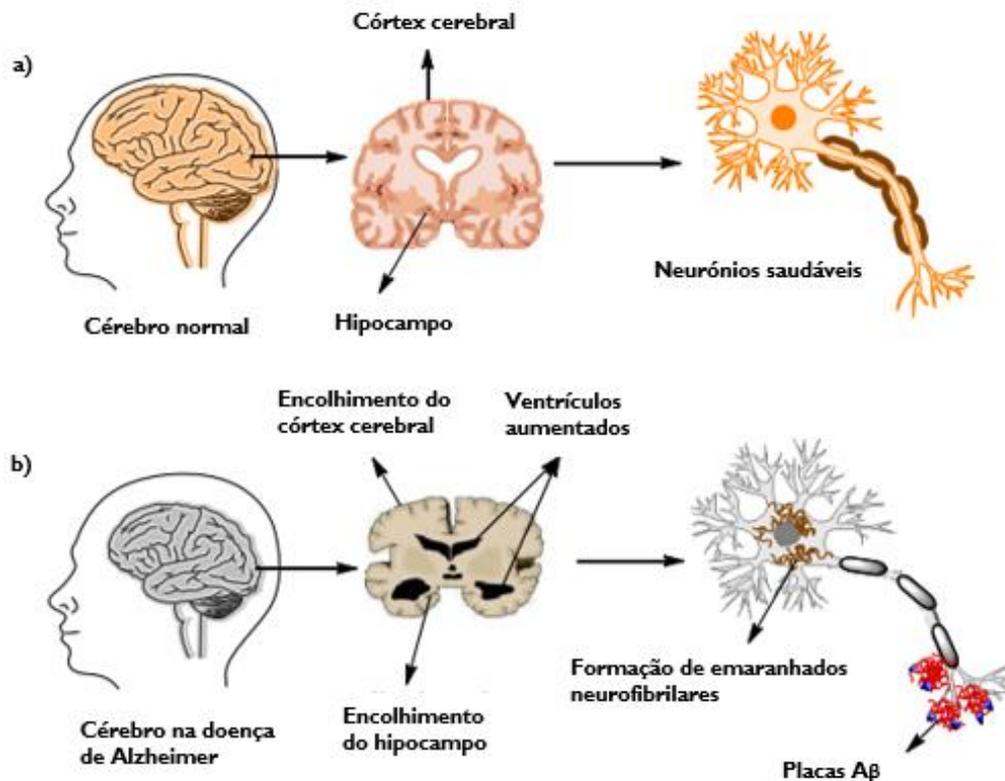


Figura 1 – Estrutura fisiológica do cérebro e dos neurónios no (a) cérebro saudável (b) cérebro com DA. Adaptado de ¹

As características neuroquímicas da DA incluem mutações da APP que resultam na produção, agregação e deposição do peptídeo A β no hipocampo, e na formação de NFTs. Os NFTs consistem na acumulação de proteína tau hiperfosforilada dentro de neurónios corticais, sob a forma de filamentos helicoidais. ³⁴ Adicionalmente, ocorre também diminuição de acetilcolina (ACh) e perda e disfunção de neurónios colinérgicos que culmina em morte neuronal, ativação de células da glia e neuroinflamação. ³²

1.1.3.1 Hipótese da cascata da amilóide

As placas A β são aglomerados do peptídeo A β resultantes da clivagem anormal da APP. Segundo a hipótese da cascata amilóide, a acumulação de placas A β desencadeia um conjunto de processos patológicos que incluem danos cerebrovasculares, perda de sinapses, ativação da microglia e astrócitos, e formação de NFTs que, por seu turno, promovem neurotoxicidade e disfunção cognitiva. ³⁵

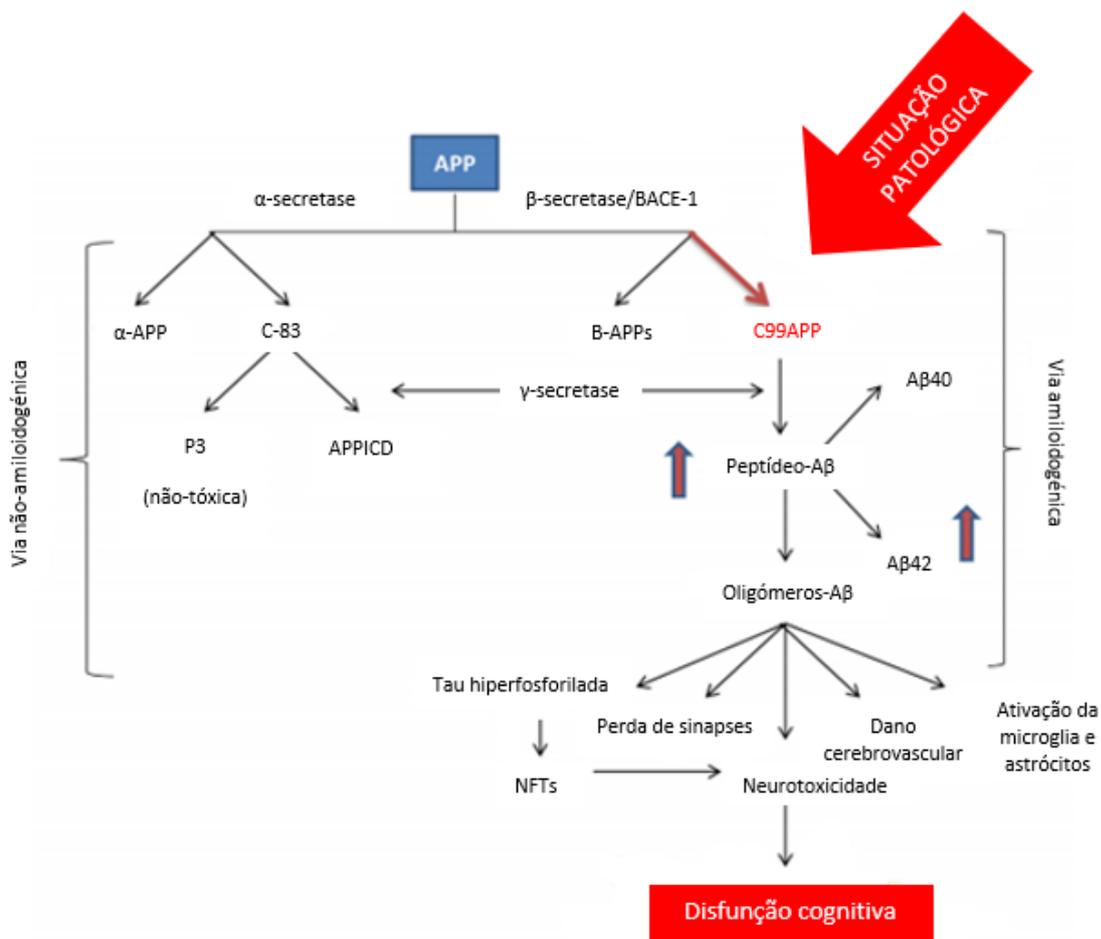


Figura 2 – Esquema sobre as vias de processamento da APP. Adaptado de ³⁶

α -APP - fragmento solúvel da clivagem não-amiloidogénica da APP; $A\beta$ - proteína amiloide; APP - proteína precursora amiloide; β -APPs - fragmento solúvel da clivagem amiloidogénica da APP; C83 - fragmento com 83 aminoácidos resultante da clivagem não-amiloidogénica da APP; C99 - fragmento com 99 aminoácidos resultante da clivagem amiloidogénica da APP; NFT - formação de emaranhados neurofibrilares; P3 - variante truncada da $A\beta$.

De acordo com a hipótese da cascata amiloide, a APP é maioritariamente processada pela β -secretase e γ -secretase (Figura 2), resultando num desequilíbrio entre a produção e a eliminação do peptídeo $A\beta$. ³⁶

A APP é processada por duas vias endógenas: a via não-amiloidogénica e a via amiloidogénica. Na via não-amiloidogénica, a α -secretase cliva um produto solúvel, a α -APP, que se pensa ter um papel neuroprotetor, assim como o C-83, que origina uma variante truncada da $A\beta$ (P3), não tóxica e não associada à DA (Figura 2). ³⁷

A via amiloidogénica envolve a β -secretase, mais precisamente a BACE-I (do inglês *Beta-site APP cleaving enzyme 1*). Esta enzima cliva o fragmento solúvel β -APPs e um fragmento com 99 aminoácidos conhecido como C99. O C99, após clivagem pela γ -secretase, origina o peptídeo $A\beta$ envolvido na DA. Esta proteína apresenta duas isoformas principais, uma isoforma com 40

aminoácidos (A β 40) e outra com 42 aminoácidos (A β 42) (Figura 2).³⁸ O peptídeo A β não é solúvel e por isso, agrega-se e forma placas, denominadas placas A β ou placas senis. A isoforma A β 42 é a mais tóxica e está presente na formação de placas A β .³⁶ As placas A β são capazes de bloquear rapidamente o mecanismo de formação de novas memórias pela alteração da plasticidade sináptica, originando distúrbios sinápticos e dendríticos. Estas perturbações alteram as redes neuronais corticais funcionais, levando a uma sub-regulação das mesmas e comprometendo anatomicamente e funcionalmente as áreas cerebrais interconectadas.³⁶

Como mencionado anteriormente, a DA tem duas formas distintas, a DAF e a DAE. Enquanto que as causas da vulnerabilidade neuronal na DAE ainda permanecem desconhecidas, os resultados de estudos feitos na DAF têm vindo a auxiliar a compreensão desta patologia.³⁵ A origem da DAF é atribuída a mutações nos genes APP, nomeadamente na PSEN-1 e PSEN-2. As mutações na PSEN-1 e PSEN-2 alteram o padrão de clivagem da γ -secretase, provocando assim, um aumento na produção da substância A β 42 em relação à produção da A β 40 (Figura 3).³⁵

Outro fator que intervém no processo de acumulação de A β , é a ApoE. A isoforma ApoE4 provoca a degeneração dos capilares cerebrais que mantêm a integridade da BHE e atua na deposição da A β (Figura 3).^{37,39} A ApoE4 inibe a clearance da A β no cérebro, prologando o seu tempo de semi-vida no fluido intersticial cerebral e inibindo a sua degradação enzimática, o que conduz a maior acumulação e neurotoxicidade.⁴⁰ Em contraste, as isoformas ApoE2 e ApoE3 têm vindo a demonstrar modificações favoráveis na patogénese da DA, nomeadamente uma diminuição de placas A β e NFTs, podendo exercer um papel protetor contra a doença.

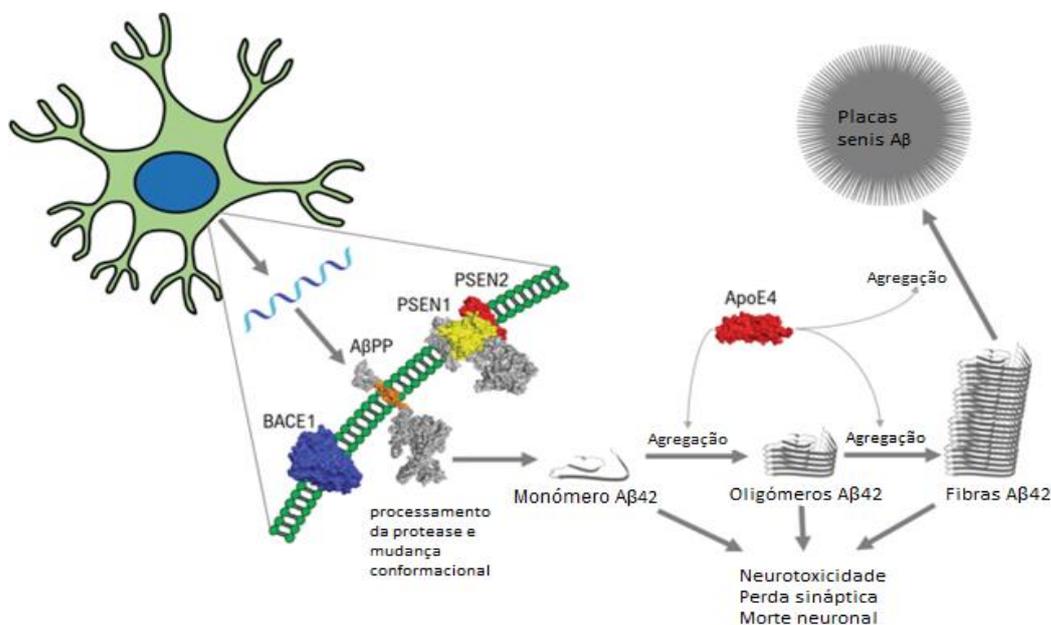


Figura 3 – Diagrama exemplificativo da cascata amilóide. Adaptado de ⁴¹

Aβ – proteína amilóide; APP – proteína precursora amilóide; ApoE4 – apolipoproteína-E 4; BACE1 – β-secretase 1; PSEN1 – presenilina-1; PSEN2 – presenilina-2.

1.1.3.2. Hipótese da proteína tau

Os microtúbulos são componentes essenciais da estrutura celular dos neurónios. Fazem parte do seu citoesqueleto e asseguram o transporte de nutrientes e outras substâncias desde o corpo celular até ao axónio. A proteína tau está associada aos microtúbulos neuronais e tem a função de os estabilizar em condições fisiológicas (Figura 4). ⁴² Esta proteína torna-se patológica quando sofre diferentes modificações a nível da pós-tradução, como a hiperfosforilação (Figura 4). Este processo tem por base uma desregulação das quinases e fosfatases que atuam sobre si. ⁴³ Na DA, a proteína tau pode ser fosforilada de forma anormal e esta hiperfosforilação dissemina-se para várias regiões do cérebro, afetando a comunicação entre os neurónios e provocando a sua neurodegeneração. Estima-se que esta proteína seja três a quatro vezes mais fosforilada no cérebro de doentes com DA do que no cérebro de indivíduos sem a patologia. ⁴³ Quando ocorre hiperfosforilação, a proteína tau dissocia-se dos microtúbulos e agrega-se sob a forma de filamentos helicoidais insolúveis que, por sua vez, formam os NFTs (Figura 4). Os microtúbulos despolimerizam e o sistema de transporte e comunicação dos neurónios é destruído. ⁴⁴

Apesar da relação temporal ainda não estar completamente estabelecida, alguns estudos científicos ⁴², sugerem que a hiperfosforilação da tau ocorre após a formação das placas Aβ. ⁴²

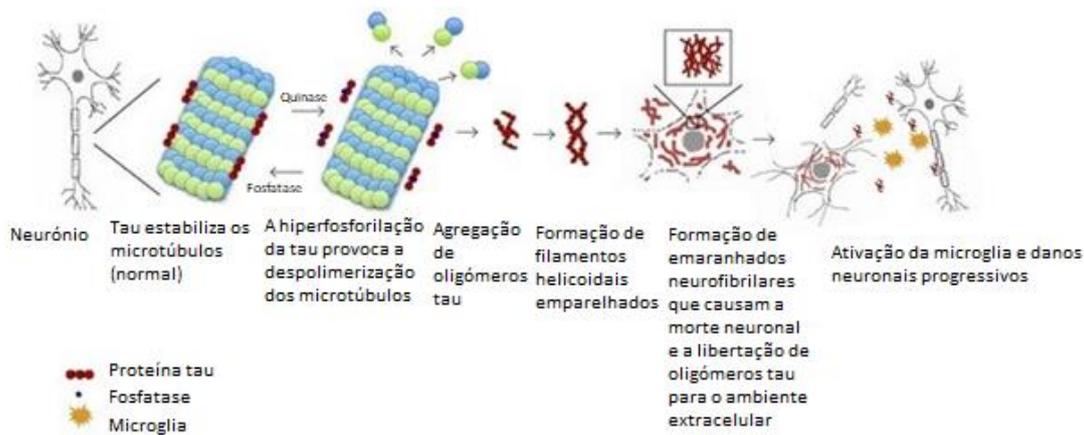


Figura 4 – Proteína tau e microtúbulos. Adaptado de ⁴⁵

1.1.3.3. Hipótese colinérgica

A ACh é um dos neurotransmissores cerebrais mais importantes, envolvida na aprendizagem e na memória. Porém, na DA é constatado um decréscimo dos níveis de ACh devido à degeneração de neurónios colinérgicos, o que despoleta alterações na função cognitiva e a perda de memória. ³⁵

Na hipótese colinérgica verifica-se que a neurotransmissão colinérgica é afetada pela formação de placas A β , por terem sido observadas interações entre o peptídeo A β e a acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise da ACh. ¹

Outro fator que justifica a hipótese colinérgica é a deficiência glutaminérgica em áreas corticais cerebrais afetadas pela DA. No entanto, esta deficiência não se prende apenas com o glutamato, mas também com um dos seus recetores ionotrópicos, o N-metil-D-aspartato (NMDA), que está continuamente submetido a ativação. Em situações de repouso, o recetor NMDA está ligado ao magnésio, mas quando ativado, promove a libertação de magnésio e a entrada de cálcio para dentro dos neurónios. Na DA, o glutamato acumula-se na fenda sináptica por diminuição dos locais de recaptção ou por anormalidades no seu transportador, e ativa constantemente o recetor NMDA. Esta ativação contínua leva a um influxo crónico de cálcio, induzindo um estado de hiperpolarização e consequente excitotoxicidade e morte neuronal. ⁴⁶

1.1.3.4. Inflamação crónica

As células da microglia e os astrócitos estão envolvidos na resposta imunológica e inflamatória induzida pelos danos que ocorrem a nível cerebral. As placas A β , os NFTs e os neurónios danificados desencadeiam uma resposta inflamatória. Esta inflamação é crónica, pois há uma ativação persistente da microglia, em que os seus efeitos destrutivos irão ser amplificados, agravando ainda mais a doença.^{32, 47}

Vários estudos^{32, 47}, em cérebros de doentes portadores de DA, comprovaram a presença de um elevado número de astrócitos reativos que podem libertar moléculas pró-inflamatórias, como interleucinas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, fatores de coagulação, fatores de complemento e proteases. Observou-se ainda uma elevada expressão de fosfolipase A2, que por sua vez, leva ao aumento da atividade da via inflamatória do ácido araquidónico.^{32, 47}

A ativação de células da microglia origina a libertação de moléculas potencialmente citotóxicas como citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigénio e proteases (Figura 5). As citocinas libertadas exacerbam a resposta inflamatória que irá potenciar a apoptose de neurónios e oligodendrócitos, originando citotoxicidade.^{32,47} Adicionalmente, as citocinas libertadas pela microglia estimulam o processo amiloidogénico nos astrócitos, com consequente formação e acumulação de A β (Figura 5).^{32, 47}

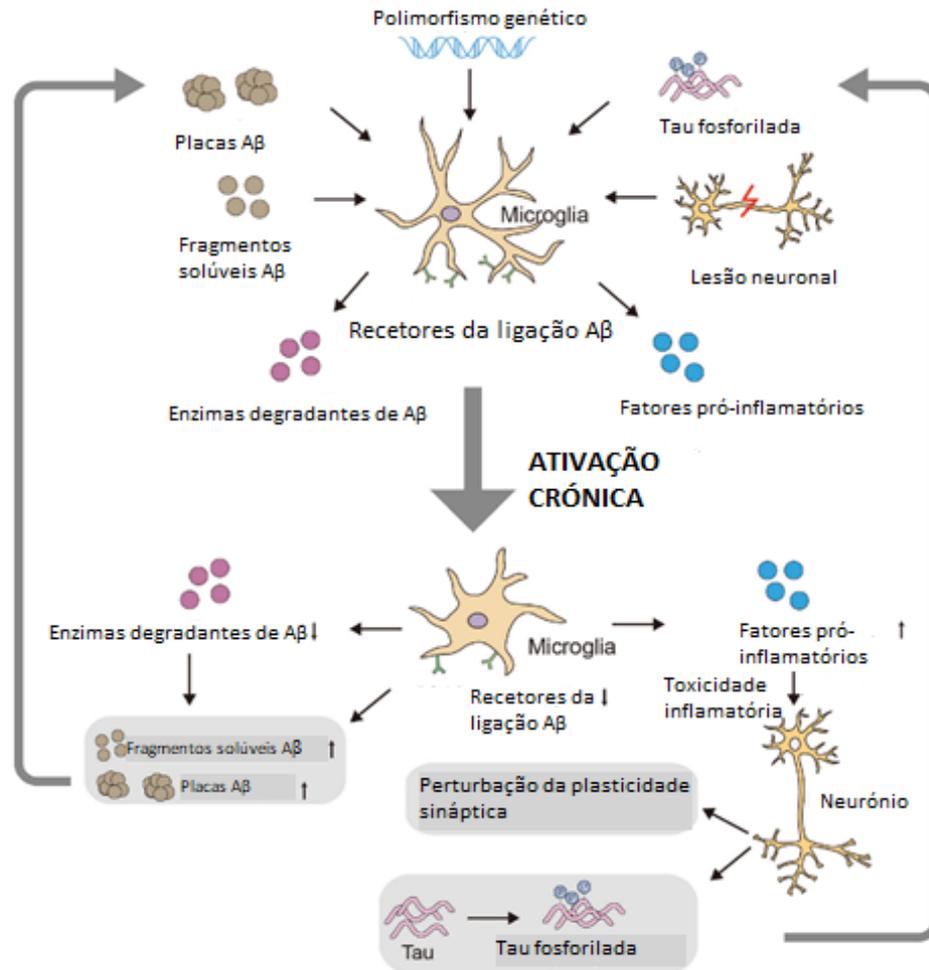


Figura 5 – Papel das células da microglia no desenvolvimento da DA. Adaptado de ⁴⁸

1.1.3.5. Nrf2

A DA pode ser desencadeada por múltiplos fatores patológicos que aumentam a formação de radicais livres ou de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), responsáveis pela promoção de stress oxidativo. A produção de ROS propicia a produção de Aβ e forma-se assim, uma cascata auto-amplificadora que leva à neurodegeneração. ⁴⁹

Em condições fisiológicas normais, a homeostase de ROS é controlada por uma rede celular antioxidante da qual faz parte o fator nuclear Nrf2 (do inglês *Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2*). O Nrf2 tem um papel importante na manutenção da homeostase celular e na regulação da resposta anti-inflamatória. No cérebro, este fator de transcrição é expresso nos neurónios e células da glia, e a diminuição da sua expressão está associada a um risco acrescido ou ao início precoce de DA. ⁵⁰

A regulação do Nrf2 é feita pela proteína Keap1 e por elementos de resposta antioxidante (AREs, do inglês *Antioxidant Response Elements*). Na ausência de inflamação, o Nrf2 encontra-

se majoritariamente no citosol e ligado à Keap1. A p38 MAPK, a proteína cinase 3β da sintase do glicogénio (GSK- 3β) e a ligação entre a Keap1 e o Nrf2, irão promover a degradação do Nrf2 por proteossomas. Adicionalmente, a p65 NF- κ B vai competir com o Nrf2 no núcleo, e provocará, desse modo, a desregulação da atividade transcricional (Figura 6, parte A).^{51, 52} Tem-se verificado que a GSK- 3β pode ter influência na deposição de A β e na hiperfosforilação da proteína tau. Por este motivo, pensa-se que a ligação entre a GSK- 3β e o Nrf2 possa ter um papel importante na patogénese da DA.^{51, 52}

Porém, num contexto de stress oxidativo, a Keap1 sofre alterações conformacionais que vão permitir a dissociação do Nrf2 e a ligação da p62. Esta ligação irá promover a degradação autofágica da Keap1 e a acumulação do Nrf2 (Figura 6, parte B). Por outro lado, as vias de sinalização associadas ao Nrf2 (PI3K, JNK e MAPK/ERK) vão permitir a sua fosforilação e transporte para o núcleo. De seguida, o Nrf2 vai ligar-se a AREs, e esta ligação irá ativar genes que codificam enzimas antioxidantes que vão prevenir a sua degradação (Figura 6, parte B).^{51, 52}

Durante a inflamação, o Nrf2 tenta suprimir as vias pro-inflamatórias através da libertação de mediadores anti-inflamatórios como a interleucina 10 (IL-10) e inibição de mediadores pro-inflamatórios como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a IL-6 e IL-1 β . Além disso, o Nrf2 também mostrou ter efeitos inibitórios sobre mediadores pro-apoptóticos como a Bax e Bad, e efeitos estimulantes sobre fatores anti-apoptóticos como a Bcl-2.⁵¹ Este efeito anti-apoptótico do Nrf2 também pode reduzir a perda de neurónios colinérgicos responsáveis pela produção de ACh, levando à minimização do declínio neurocognitivo.⁵⁰

Durante a DA, verifica-se que a via Nrf2/ARE está desregulada. Em fases iniciais da doença pode haver um aumento dos sistemas endógenos de defesa, mas em fases tardias há perda dos mecanismos naturais de proteção.^{49,51} Em modelos animais de DA, nomeadamente em murganhos 3xTg-AD e APP/PS1 AD, foram detetados níveis mais baixos de enzimas antioxidantes reguladas pelo Nrf2, o que sugere uma diminuição da ativação do Nrf2 e uma disfunção da via Nrf2/ARE.^{52, 53, 54} Além disso, em estudos com cérebro humano, observou-se uma diminuição dos níveis de Nrf2 e de enzimas antioxidantes no hipocampo de doentes com AD.^{52, 55, 56} Estes resultados indicam que a indução da via Nrf2/ARE pode vir a ser uma estratégia útil para o tratamento da DA, através da proteção contra a degeneração neuronal e cognitiva.^{49,51}

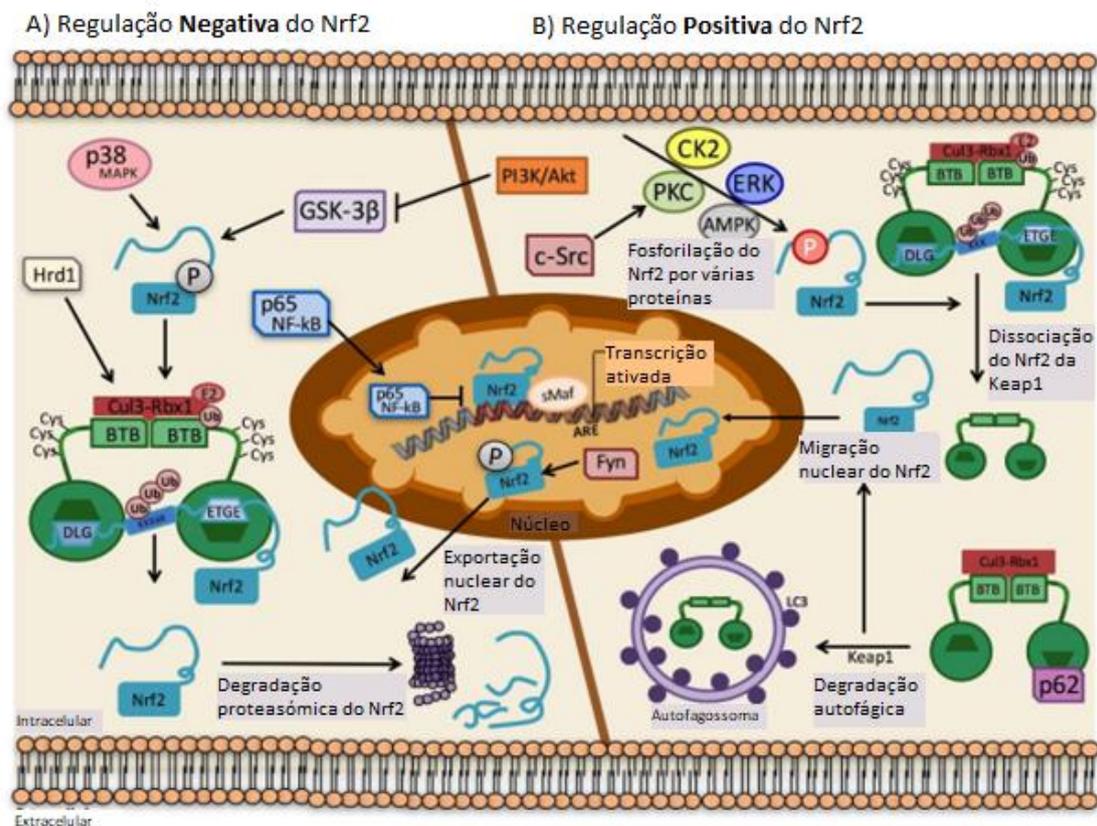


Figura 6 – Mecanismos do Nrf2 após regulação negativa (A) e positiva (B). Adaptado de ⁵²

1.1.4. Farmacoterapia atual e futuras abordagens

Atualmente são alvo de extensiva investigação, várias estratégias de tratamento que consigam modificar a progressão da DA. Apesar do aumento do número de doentes com DA, há apenas cinco opções terapêuticas disponíveis nos Estados Unidos da América, aprovadas para o tratamento da sintomatologia da doença. A 7 de junho de 2021, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o primeiro agente para modificação do curso da doença, o anticorpo monoclonal aducanumab, direcionado contra agregados solúveis e insolúveis de Aβ. O tratamento está indicado em doentes com défice cognitivo ligeiro ou demência leve, e presença confirmada de Aβ. ^{57, 58} A Agência Europeia do Medicamento (EMA) está ainda a avaliar a aprovação do aducanumab, tendo recebido a candidatura em outubro de 2020. ⁵⁹

Na União Europeia, estão aprovados quatro dos cinco fármacos aprovados pela FDA (com exceção do aducanumab), que consistem em três inibidores da acetilcolinesterase (AChEIs), designadamente o donepezilo, a galantamina e a rivastigmina, e um antagonista dos recetores de NMDA, a memantina. Em 2014, foi aprovada uma quinta opção de tratamento que consiste numa combinação de dose fixa de donepezilo com memantina para DA moderada a grave. Estas abordagens terapêuticas não modificam a progressão da doença, mas podem retardar

alguma perda de função cognitiva. A maioria dos agentes terapêuticos em desenvolvimento nos últimos 15 anos falhou e a DA está entre as doenças com menos tratamentos farmacológicos disponíveis.^{60,61}

Os AChEI podem reduzir o decréscimo dos níveis de ACh no cérebro dos doentes com DA, através da inibição da AChE, responsável pela degradação de ACh. Assim, os AChEIs aumentam a neurotransmissão colinérgica na fenda sináptica e adiam o declínio cognitivo, pelo menos durante o primeiro ano de tratamento. Os três AChEIs aprovados comprovaram o seu benefício ao retardar o declínio cognitivo, ajudando os doentes nas suas atividades quotidianas. Não foram relatadas diferenças significativas de eficácia entre os diferentes AChEIs. O donepezilo e a rivastigmina foram aprovados pela FDA para a DA ligeira, moderada e grave, enquanto a galantamina foi aprovada para a DA ligeira e moderada. Os efeitos adversos mais comuns devem-se à ação colinomimética dos AChEI sobre o trato gastrointestinal, como diarreia, náuseas e vômitos.^{62,60,63} Os AChEI aprovados apresentam características farmacocinéticas diferentes. A principal via de eliminação do donepezilo e galantamina é por metabolismo hepático, enquanto a rivastigmina é eliminada por metabolismo hepático e intestinal. O donepezilo e a galantamina inibem seletiva e reversivelmente a AChE, enquanto que a rivastigmina é um inibidor "pseudo-irreversível" da AChE e da butirilcolinesterase.^{62,60,63}

Por sua vez, a memantina é um antagonista dos recetores NMDA, não competitivo e de baixa afinidade, que impede a neurotransmissão glutamínica excessiva observada na DA. A sua principal via de eliminação é renal, e os efeitos adversos mais comuns são cefaleias, confusão e tonturas. Foi aprovada pela FDA para DA moderada e grave, quer como monoterapia quer em combinação com uma AChEI, pois têm mecanismos de ação complementares que podem fornecer benefícios adicionais. Esta combinação não apresentou qualquer aumento dos efeitos adversos.^{62,60,63}

A complexidade da DA sugere novas abordagens terapêuticas combinadas, de modo a atingir mais do que um alvo terapêutico em simultâneo. Estas terapias têm tido sucesso noutras doenças, como o cancro e o VIH, e podem vir a ser eficazes.⁶¹

Em 2019, foi aprovado na China um novo composto para o tratamento da DA ligeira a moderada, o oligomanato de sódio. Este composto é um oligossacarídeo oral derivado de algas marinhas. Apesar de o seu mecanismo de ação ainda não estar completamente esclarecido, foi demonstrado que recondiciona a microbiota intestinal e limita a contribuição da imunidade periférica alterada na DA. O oligomanato de sódio atravessa a BHE através de transportadores

como o GLUT-1, liga-se a múltiplas sub-regiões da A β e promove a inibição da formação de placas A β .⁶⁴

Em ensaios pré-clínicos e clínicos de novos compostos para a DA, encontram-se várias terapêuticas que visam diminuir a produção ou aumentar a eliminação de A β , ao passo que outras pretendem impedir a hiperfosforilação anormal da proteína tau ou promover a redução da expressão de ApoE4. Todavia, muitas destas novas moléculas não têm tido sucesso devido a efeitos adversos graves ou falta de eficácia. Através da investigação mais aprofundada da fisiopatologia da DA, nomeadamente de mecanismos associados a stress oxidativo e inflamação, foram também feitas várias tentativas para retardar a progressão da doença através de antioxidantes ou medicamentos anti-inflamatórios. No entanto, até à data, ainda não surgiu qualquer tratamento eficaz.⁶⁵

1.2. Alergénios da pele e o seu papel na DA

O dimetilfumarato (DMF) é um alérgénio da pele que tem sido estudado para o tratamento de doenças neurodegenerativas.⁶⁶ A formulação oral deste composto está aprovada para o tratamento de esclerose múltipla. Foi registado inicialmente com a designação BG-12 e é atualmente comercializado com o nome Tecfidera[®].⁶⁷

Alguns estudos referem que o DMF é um composto antioxidante, imunossupressor e neuroprotetor, pois reduz a neurodegeneração em todas as áreas hipocámpais e a ativação da microglia no hipocampo, diminuindo assim, o stress oxidativo e as perturbações da memória.^{66,68,69} Após administração oral, o DMF é rapidamente hidrolisado na mucosa intestinal e convertido no seu metabolito ativo, o monometilfumarato (MMF). No interior das células é feita uma hidrólise adicional deste metabolito em ácido fumárico que irá entrar no ciclo de ácido cítrico.⁷⁰ O MMF é estável e biologicamente ativo. Induz o fator de transcrição Nrf2 que como já anteriormente mencionado, vai ativar a expressão de várias enzimas antioxidantes. Segundo um estudo realizado num modelo de murganhos de taupatia⁶⁶, este alérgénio diminuiu a atividade da GSK-3 β que, por sua vez, diminui a fosforilação da proteína tau e a deposição de A β .⁶⁶ Adicionalmente, em estudos realizados em modelos de ratos para a DAE^{68,69}, o DMF demonstrou ter efeitos anti-inflamatórios, pois diminuiu a síntese de mediadores pró-inflamatórios como a isoforma induzida da sintase do óxido nítrico (iNOS), IL-1 β , TNF- α e IL-6, em células da microglia e astrócitos.⁶⁸ Preveniu ainda a perda de neurónios colinérgicos e a neurodegeneração no hipocampo.⁶⁹ Consequentemente, o DMF

parece revelar um efeito neuroprotetor em doenças neurodegenerativas, o que poderá ser útil para o tratamento da DA. ^{66,68,69}

1.2.1 Isoeugenol

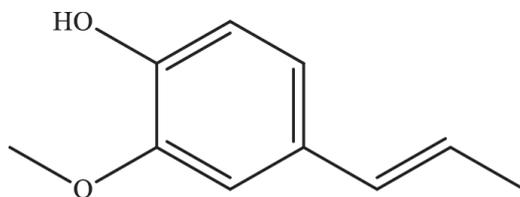


Figura 7 – Estrutura química do isoeugenol (2-metoxi-4-propenilfenol). ⁷¹

O isoeugenol (Figura 7) pertence a um grupo de compostos voláteis derivados de plantas, os fenilpropenos, biosintetizados a partir da fenilalanina. A dupla ligação nos fenilpropenos é assimétrica e dá origem aos isómeros *cis* e *trans*. Este composto é um isómero do eugenol, no qual o substituinte alil é substituído por um grupo prop-1-enil. Apresenta-se sob a forma de líquido oleoso, de cor amarela, com odor doce, picante e floral. O seu ponto de ebulição é de 266° C e o seu ponto de fusão é de -10° C. É pouco solúvel em água e miscível em etanol, éter e outros solventes orgânicos (Tabela 1). ^{72, 73, 74, 75}

Pode ser encontrado na natureza em óleos essenciais de plantas, como a ylang-ylang e devido à sua fragrância é frequentemente utilizado em vários produtos comercializados, como bebidas, comida, produtos de higiene/cosmética e limpeza. Porém, também é comercializado na forma de mistura racémica com os isómeros *cis* e *trans* na proporção 1:7, respetivamente, embora a forma que contém apenas o isómero *trans* também esteja disponível. Pode atuar como alergénio da pele e sensibilizante dermatológico. ^{72, 73, 74, 75}

Como anteriormente mencionado, os alergénios da pele poderão vir a ser uma estratégia terapêutica viável na DA, pois têm a capacidade de estimular o fator de transcrição Nrf2 que ativa as vias antioxidantes. Além de eficácia antioxidante, o isoeugenol tem vindo a mostrar ação antibacteriana e anti-inflamatória, mas são ainda escassos os estudos que exploram o seu potencial terapêutico. ^{73, 76, 77, 78, 79}

Segundo Topal F ⁸⁰, o isoeugenol apresentou excelentes efeitos inibitórios ($K_i = 16 \pm 3$ nM e $IC_{50} = 77$ nM) contra algumas enzimas metabólicas, nomeadamente a AChE. Tal como foi referido, os inibidores da AChE são úteis no tratamento de doenças neurológicas degenerativas como a DA. A inibição da AChE provoca o aumento da ACh, que promoverá a

neurotransmissão colinérgica. Este aumento da neurotransmissão colinérgica, aliada à ativação da via de transcrição Nrf2, poderá vir a revelar-se útil para o tratamento da DA.⁸⁰

Tabela I – Características físico-químicas do isoeugenol.⁷²

Isoeugenol	
Peso molecular	164,2 g/mol
Densidade	1,08 g/cm ³
LogP	3,04
pKa	9,88 (25°C)
Solubilidade	Álcool, éter e outros solventes orgânicos
Espectro UV	λ_{max} : 260 nm

LogP – coeficiente de partição octanol-água; pKa – constante de dissociação ácida; UV – ultravioleta.

1.2.1.1 Propriedades farmacocinéticas

Um estudo farmacocinético realizado por Badger *et al.* (2002) pretendia determinar a absorção, distribuição, metabolização e excreção do isoeugenol após administração oral (156 mg/kg) e intravenosa (IV; 15,6 mg/kg) a ratos Fischer 344.⁷³ Verificou-se que o isoeugenol foi absorvido, metabolizado e excretado rapidamente através da urina (85%) e fezes (10%).⁷³ Após a administração IV, este apresentou um $t_{1/2\beta}$ curto de 12 minutos, o que indica uma remoção rápida do sangue. Após administração oral, não foi detetado isoeugenol no sangue, o que sugere que o composto sofre uma distribuição acelerada para os tecidos e/ou é imediatamente eliminado.⁷³

De facto, a rápida eliminação do isoeugenol após administração IV e oral é atribuída à sua fácil conversão em metabolitos de fase II, nomeadamente sulfato e/ou conjugados glucuronido, que se formam devido ao grupo hidroxilo livre do isoeugenol.⁷³ Este grupo funcional faz com que o isoeugenol possa originar conjugados glucuronido ou sulfato sem ter de passar obrigatoriamente por metabolismo de fase I, o que simplifica a sua eliminação. Contudo, foram também propostas algumas reações de fase I que englobam hidroxilação do grupo metilo terminal para formar o 3-hidroxi-1-fenilpropeno; oxidação da ligação dupla para formar o 1,2-óxido correspondente; e *O*-desalquilação. A estas reações acresce uma outra via que consiste na oxidação direta com um único eletrão, originando um metabolito quinona-metídeo. Pensa-se que a formação deste metabolito é responsável pela sensibilização da pele despoletada pelo isoeugenol e eugenol, e que pode também estar na base de outras respostas tóxicas.^{75, 81} A

Figura 8 é uma representação esquemática da metabolização do isoeugenol por sulfatação direta e glucuronidação do grupo hidroxilo fenólico.⁸²

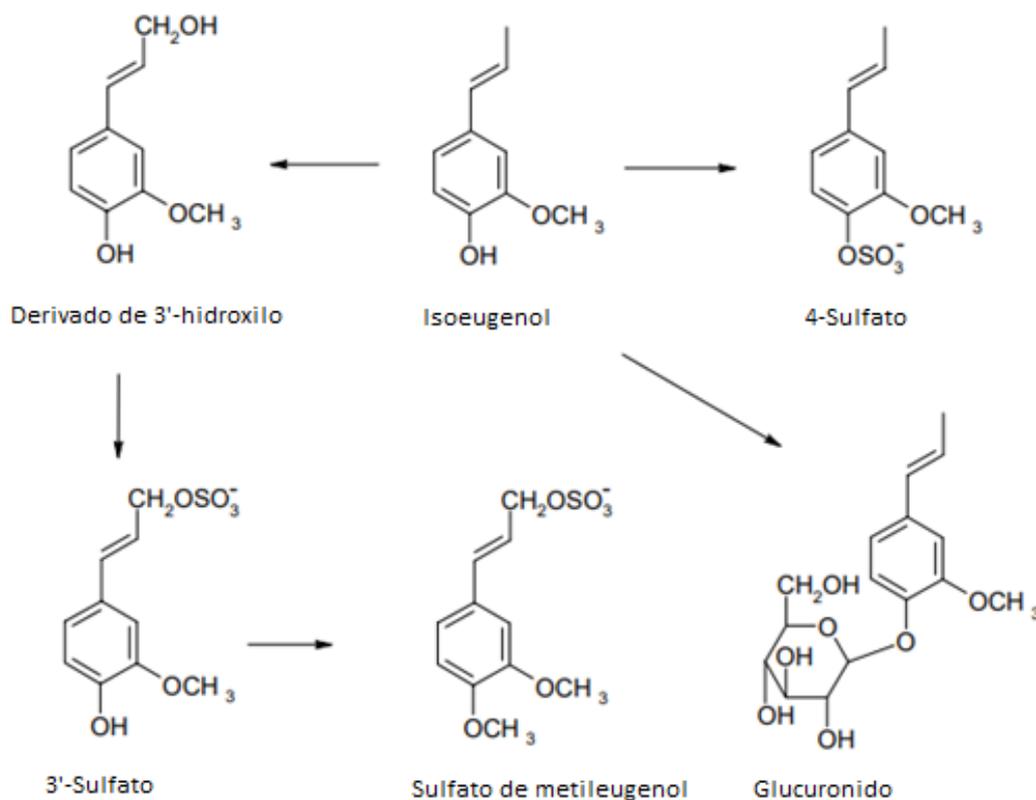


Figura 8 – Esquema metabólico do isoeugenol. Adaptado de⁸²

Os autores Hong *et al.* (2013) efetuaram um estudo toxicocinético com isoeugenol em ratos Fischer 344 e murganhos B6C3F1 de ambos os sexos.⁷⁴ O composto foi administrado por via IV [17 mg/kg (ratos); 35 mg/kg (murganhos)] e oral [17 mg/kg (ratos); 35 mg/kg (murganhos); 70 e 140 mg/kg (ratos e murganhos)] em dose única. O estudo revelou que após administração IV, o isoeugenol foi rapidamente eliminado da circulação sistêmica em ambas as espécies e sexos ($t_{1/2\beta}$ de 69,1-79,5 minutos em ratos macho ou fêmea; 102-118 minutos em murganhos macho ou fêmea). Mediante administração oral, constatou-se que o isoeugenol foi absorvido rapidamente, também em ambas as espécies e sexos [tempo para atingir a concentração máxima (t_{max}) de 2-20 minutos em ratos macho ou fêmea; 5-20 minutos em murganhos macho ou fêmea]. A biodisponibilidade absoluta foi significativamente maior em ratos fêmea (19%) do que em ratos macho (10%), mas não foi significativamente diferente entre os dois sexos nos murganhos (28% em murganhos macho vs. 31-32% em murganhos fêmea). De qualquer forma, verificou-se que a biodisponibilidade oral do isoeugenol foi geralmente baixa, tendo sido significativamente mais alta em murganhos do que em ratos.⁷⁴

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Nas últimas décadas têm sido realizados grandes esforços para aprofundar a compreensão da patogênese da DA e desenvolver novos métodos de tratamento. No entanto, ainda não estão disponíveis tratamentos para retardar ou bloquear a progressão da DA de maneira eficaz. As atuais intervenções farmacológicas passam pela potenciação da ação da ACh, inibição da via glutamatérgica responsável pela neurotoxicidade e a mais recente remoção de placas A β cerebrais, cujo benefício pode não ser extensível a todos os doentes.^{62, 58} Perante estes dados, é necessária a descoberta de novas abordagens terapêuticas com maior eficácia para a prevenção ou tratamento da DA.

A molécula objeto deste estudo é um alergénio da pele e um ativador do fator de transcrição Nrf2, o qual se encontra deficientemente ativado na DA. Assim, perspectiva-se que a ativação do Nrf2 possa promover a ação de mecanismos neuroprotetores potencialmente benéficos para o tratamento da DA.

2.2 Objetivos específicos

O primeiro objetivo específico do trabalho efetuado no âmbito desta tese foi desenvolver e validar uma técnica analítica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para a quantificação do isoeugenol em plasma, cérebro e pulmão de murganho. Todos estes procedimentos foram executados de acordo com *guidelines* internacionais sobre validação de métodos bioanalíticos^{83,84,85}.

O objetivo específico final passou pela aplicação prática do método bioanalítico para determinar as concentrações de isoeugenol nas matrizes biológicas de interesse, obtidas na sequência de estudos farmacocinéticos com administração intranasal (IN). Isso permitiu estimar os parâmetros farmacocinéticos do isoeugenol e inferir sobre a sua exposição sistémica e tecidual.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes químicos

O isoeugenol (98% mistura de *cis* e *trans*) e o perampanel (Figura 9), usado como padrão interno (PI) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA).

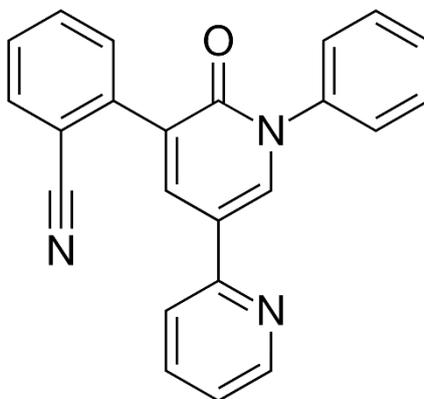


Figura 9 – Estrutura química do perampanel (PI).⁸⁶

O acetonitrilo (ACN) e metanol (MeOH) (grau de pureza para HPLC) foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido). A água ultra-pura (grau de HPLC, 18,2 mΩ.cm) foi obtida através de um aparelho de purificação de água Milli-Q, Sartorius Arium[®] Pro da Sartorius (Goettingen, Alemanha). A anestesia dos animais foi executada com ketamina (Imalgene 1000[®], 100 mg/ml) e xilazina (Vetaxilaze 20[®], 20 mg/ml) adquiridas comercialmente. A solução de cloreto de sódio 0,9% foi adquirida à B. Braun Medical (Queluz de Baixo, Portugal). Todos os restantes reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA) salvo indicação em contrário.

3.2 Instrumentação e condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada num instrumento de HPLC Shimadzu (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) constituído por uma unidade de distribuição de solventes (LC-20A), um sistema desgaseificador (DGU-20A5), um *autosampler* (SIL-20AHT), um forno de coluna (CTO10ASVP) e um detetor de fotódiodos (SPD-M20A). O sistema de HPLC e aquisição de dados foram controlados pelo software LCsolution (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão).

A coluna cromatográfica foi a LiChroCART[®] Purospher Star-C18 (55 x 4 mm; 3 μm de tamanho de partícula) da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha).

A separação cromatográfica foi feita por eluição isocrática. A fase móvel foi composta por água Milli-Q, ACN e MeOH (60:35:5, v/v/v) a um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do forno foi otimizada a 25°C e o tempo de corrida estabelecido foi de 8 minutos. O volume de injeção das amostras foi 20 µL e a deteção do isoeugenol e PI foi efetuada aos 258 nm.

3.3 Soluções stock e soluções de fortificação

Em primeiro lugar, importa referir que no âmbito da presente tese foram desenvolvidos e validados dois métodos de extração, A e B, para um dos quais foram ainda definidas duas gamas de calibração detalhadas em secções subsequentes (método B: gama baixa e gama alta). De forma a facilitar a compreensão da preparação das soluções de fortificação foi elaborada a Tabela 2.

Tabela 2 – Resumo das concentrações dos padrões de calibração e respetivas soluções de fortificação (entre []) utilizados com o método de extração A e B nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão.

Método de extração A										
Matriz	PI	P2	P3	P4	P5	P6	QCLOQ	QC1	QC2	QC3
Plasma	0,07	0,14	0,35	1,5	3,5	7	0,07	0,2	3	6
Pulmão	[0,7]	[1,4]	[3,5]	[15]	[35]	[70]	[0,7]	[2]	[30]	[60]
Cérebro	0,07 [0,7]	0,14 [1,4]	0,28 [2,8]	0,7 [7]	1,4 [14]	2,8 [28]	0,07 [0,7]	0,2 [2]	1 [10]	2,4 [24]
Método de extração B (gama baixa)										
Matriz	PI	P2	P3	P4	P5	P6	QCLOQ	QC1	QC2	QC3
Plasma	0,07	0,14	0,35	1,5	3,5	7	0,07	0,2	3	6
Cérebro	[0,7]	[1,4]	[3,5]	[15]	[35]	[70]	[0,7]	[2]	[30]	[60]
Pulmão										
Método de extração B (gama alta)										
Plasma	7	14	30	60	100	140	7	20	50	120
Pulmão	[70]	[140]	[300]	[600]	[1000]	[1400]	[70]	[200]	[500]	[1200]

Nota: As concentrações dos padrões e soluções de fortificação estão indicadas em µg/mL. QC - controlo de qualidade.

As soluções stock de isoeugenol (1 ou 2 mg/mL) foram preparadas através da diluição do composto com ACN puro. Estas soluções foram usadas diretamente para a preparação de soluções de fortificação ou diluídas para a preparação de soluções intermédias.

A solução *stock* de 1 mg/mL foi diluída em ACN para preparar soluções intermédias de 10 µg/mL e 100 µg/mL. A solução intermédia de 10 µg/mL foi utilizada para preparar as soluções de fortificação de 0,7, 1,4, 2, 2,8 e 3,5 µg/mL. Por sua vez, a solução intermédia de 100 µg/mL foi utilizada para preparar as soluções de fortificação de 7, 10, 14, 24 e 28 µg/mL (Tabela 2).

A solução *stock* de 1 mg/mL também foi utilizada diretamente para a preparação das soluções de fortificação de 15, 30, 35, 60, 70, 140, 200, 300, 500 e 600 µg/mL. Por fim, a solução *stock* de 2 mg/mL foi utilizada diretamente para a preparação das soluções de fortificação de 1000, 1200 e 1400 µg/mL (Tabela 2).

A solução *stock* de PI (1 mg/mL) foi dissolvida em DMSO e a sua respetiva solução de fortificação (60 µg/mL) foi preparada em ACN.

Todas as soluções *stock*, intermédias e de fortificação, foram armazenadas a 4°C e no escuro.

3.4 Padrões de calibração e controlos de qualidade (QCs)

Para a preparação dos padrões de calibração e controlos de qualidade (QCs) adicionaram-se 10 µL da respetiva solução de fortificação a 100 µL de matriz biológica branca (sem composto).

Como indicado na Tabela 2, os padrões de calibração no processo de extração A tiveram as concentrações nominais de 0,07, 0,14, 0,35, 1,5, 3,5 e 7 µg/mL para as matrizes de plasma e pulmão, e as concentrações nominais de 0,07, 0,14, 0,28, 0,7, 1,4 e 2,8 µg/mL para a matriz de cérebro. Com o método de extração B, os padrões de calibração tiveram as concentrações nominais de 0,07, 0,14, 0,35, 1,5, 3,5 e 7 µg/mL para a gama de calibração mais baixa, em todas as matrizes biológicas. As concentrações nominais para a gama de calibração mais alta foram 7, 14, 30, 60, 100, 140 µg/mL, validada nas matrizes de plasma e pulmão.

Os QCs foram divididos em 4 níveis de concentrações diferentes: QCLLOQ (limite inferior de quantificação), QC1 (nível baixo), QC2 (nível médio) e QC3 (nível alto). Os respetivos valores de concentrações para os QCs com o método de extração A foram 0,07, 0,2, 3 e 6 µg/mL para as amostras de plasma e pulmão, e 0,07, 0,2, 1 e 2,4 µg/mL para as amostras de cérebro (Tabela 2). Com o método de extração B, definiram-se valores de 0,07, 0,2, 3 e 6 µg/mL para a gama de calibração mais baixa e 7, 20, 50 e 120 µg/mL para gama de calibração mais alta (Tabela 2).

3.5 Preparação das amostras e métodos de extração

De modo a conseguir extrair o isoeugenol das matrizes biológicas com sucesso, efetuou-se a otimização de dois métodos de extração (A e B).

O método de extração A consistiu numa primeira etapa de precipitação de proteínas com ACN (1:2), seguida de evaporação e reconstituição do resíduo seco em fase móvel. Neste processo, as matrizes brancas de murganho (plasma, cérebro e pulmão) foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas (2 minutos; 13.400 rpm). Subsequentemente, procedeu-se à recolha de 100 µL de cada matriz, fortificados depois com 10 µL de solução de fortificação de isoeugenol e 10 µL de solução de fortificação de PI. Como referido acima, adicionaram-se 200 µL de ACN a fim de precipitar as proteínas plasmáticas. Agitou-se a mistura no vórtex durante 1 minuto e centrifugou-se (5 minutos; 13.400 rpm). O sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro e procedeu-se à sua evaporação numa placa a 50°C, sob um ligeiro fluxo de azoto. O resíduo sólido da evaporação foi reconstituído em 100 µL de fase móvel e agitado durante 1 minuto no vórtex. Recolheu-se a solução reconstituída para um eppendorf e centrifugou-se (2 minutos; 13.400 rpm). Por último, transferiram-se 80 µL para um vial e injetaram-se 20 µL no HPLC.

No método de extração B, realizou-se igualmente a recolha de 100 µL de cada matriz, fortificados com 10 µL de solução de fortificação de isoeugenol e 10 µL de solução de fortificação de PI. De forma idêntica ao procedimento anterior, adicionaram-se 200 µL de ACN para precipitar as proteínas plasmáticas. A mistura foi agitada no vórtex durante 1 minuto e centrifugada (5 minutos; 13.400 rpm). O sobrenadante resultante foi transferido para um eppendorf e transferiram-se 200 µL para um vial. No final, foram injetados 20 µL no instrumento de HPLC.

As amostras do estudo *in vivo* foram processadas da mesma forma que os padrões de calibração e QCs, segundo o método de extração B.

3.6 Validação do método

3.6.1 Seletividade

A seletividade consiste na capacidade de o método analítico diferenciar e medir a substância a analisar, na presença de substâncias que poderão atuar como interferentes. De acordo com as *guidelines* internacionais^{83,84,85}, a seletividade é avaliada em matrizes biológicas brancas (sem

adição do composto em estudo ou PI) de 6 fontes diferentes. Por isso, procedeu-se ao estudo de 6 amostras brancas de cada matriz (plasma, cérebro e pulmão).

Para a avaliação da seletividade não devem ser observados compostos interferentes nos tempos de retenção (Rts) do composto em estudo ou PI. Se isso se verificar, os compostos interferentes não devem de ter uma resposta superior a 20% do analito no LLOQ, nem mais de 5% no caso do PI.^{83,84,85}

3.6.2 Curva de calibração

As curvas de calibração foram preparadas nas matrizes biológicas em estudo (plasma, cérebro e pulmão). São constituídas por 6 padrões de calibração que devem incluir o LLOQ (padrão de calibração mais baixo) e o ULOQ (padrão de calibração mais alto). Uma validação completa implica 5 curvas de calibração independentes, ao longo de 5 dias.

O valor de exatidão das concentrações experimentais de cada padrão de calibração deve encontrar-se entre $\pm 15\%$ da concentração nominal, com exceção do LLOQ, para o qual se aceitam valores de $\pm 20\%$. Pelo menos 75% dos 6 padrões de calibração devem cumprir este critério.

Por ter surgido a necessidade de subir a gama de calibração em plasma e pulmão com o método de extração B, foi também realizada uma validação parcial. A validação parcial avalia modificações feitas a métodos bioanalíticos totalmente validados, incluindo neste caso, alterações na gama de calibração. Para tal, foram feitas 3 curvas de calibração independentes, em 3 dias. A validação parcial é aceitável se os parâmetros testados cumprirem os critérios impostos nas validações completas.^{83,84,85}

3.6.3 Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão intra e inter-dia foram determinadas através da análise de QCs (QCLLOQ, QC1, QC2 e QC3).

A precisão consiste na proximidade de valores individuais entre si, obtidos na mesma amostra. É determinada através do coeficiente de variação (CV), cujo critério de aceitação considera um CV (%) igual ou inferior a 15% para o QC1, QC2 e QC3, e igual ou inferior a 20% para o QCLLOQ.

A exatidão consiste na diferença entre as concentrações experimentais e as concentrações nominais (teóricas). É avaliada através da percentagem de *bias* (% *Bias*). O critério de aceitação considera a % *Bias* dentro de $\pm 15\%$ para o QCI, QC2 e QC3 e dentro de $\pm 20\%$ para o QCLLOQ.

A precisão e exatidão intra-dia e inter-dia foram determinadas através da análise de 5 réplicas de cada QC. Os QCs de precisão e exatidão intra-dia foram analisados no mesmo dia, enquanto os QCs de precisão e exatidão inter-dia foram analisados em 5 dias diferentes.^{83,84,85}

3.6.4 Recuperação

A recuperação é avaliada para assegurar que o método de extração do analito é eficiente e reprodutível.

A determinação da recuperação foi feita através da comparação entre as áreas de QCs submetidos ao processo de extração com as áreas de QCs (com as mesmas concentrações nominais) não submetidos ao processo de extração. Este procedimento foi repetido 5 vezes para os 3 níveis de concentração das amostras (QCI, QC2 e QC3).

As *guidelines* não definem valores mínimos de recuperação, mas estipulam que esta deve ser consistente e reprodutível.⁸⁴

3.6.5 Carry-over

O efeito de *carry-over* ocorre quando se observam alterações na concentração medida de um analito atribuídas à presença de um analito residual no instrumento analítico, proveniente de uma amostra anterior.

Para avaliar a existência de *carry-over*, foi feita a análise de uma amostra de matriz branca após o padrão de calibração mais alto (ULOQ). O *carry-over* não deve ser superior a 20% do LLOQ e 5% do PI.^{83,84,85}

3.6.6 Estabilidade

Os estudos de estabilidade são importantes para assegurar que as condições de preparação, análise e armazenamento das amostras biológicas, soluções stock e soluções de fortificação, não interferem com a concentração do composto a analisar. A avaliação da estabilidade foi

feita através da comparação de 5 réplicas de cada QCI e QC3. Estes QCs foram analisados ao tempo 0 e após exposição às condições de estabilidade estipuladas.

De forma a simular a preparação e armazenamento de amostras não submetidas a método de extração foi analisada a estabilidade de amostras não processadas. Neste contexto, determinou-se a estabilidade de amostras não processadas à temperatura ambiente durante 1h; a -80°C durante 10 dias (estabilidade a longo prazo); na presença de luz durante 1h; e após 2 ciclos de congelação-descongelação a -80°C.

Para determinar a estabilidade de amostras já submetidas a método de extração foi analisada a estabilidade de amostras processadas. Avaliou-se a estabilidade destas amostras para todas as matrizes biológicas à temperatura ambiente durante 2h e a 4°C durante 24h.

Foi igualmente efetuado o estudo da estabilidade das soluções de fortificação a 4°C durante 96h, bem como a estabilidade das soluções stock a 4°C durante 8 dias.

Os resultados obtidos com amostras sujeitas às condições de estabilidade acima referidas foram comparados com os resultados de amostras preparadas e analisadas de imediato (tempo 0). Consideram-se aceitáveis valores de estabilidade entre 85 e 115%.^{83,84,85}

3.7 Estudo *in vivo*

3.7.1 Animais e ética

Para se proceder à realização do estudo farmacocinético foram utilizados 24 murganhos macho da estirpe B6C3F1, com peso entre 25-30 g, fornecidos pelos Laboratórios Charles River (Écully, França). Os murganhos foram instalados no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob condições ambientais controladas (12 h ciclo luz/escuro; temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$; humidade relativa $55 \pm 5\%$). Antes dos procedimentos experimentais, os animais estiveram em aclimatização nas novas instalações durante pelo menos uma semana. Receberam uma dieta padrão para roedores (4RF21, Mucedola[®], Itália) e água da torneira *ad libitum*, antes e durante os procedimentos experimentais.

Todos os procedimentos experimentais com animais foram efetuados de acordo com a regulamentação internacional da Diretiva Europeia (2010) relativa à proteção de animais de laboratório utilizados para fins científicos (2010/63/UE) (Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia, 2010) e a lei portuguesa sobre o bem-estar dos animais (Decreto-Lei 113/2013). O projeto experimental aplicado foi aprovado pela Autoridade Nacional Portuguesa para a Saúde Animal, Fitossanidade e Segurança Alimentar (DGAV - Direção-Geral

de Alimentação e Veterinária) (Referência: 0421/000/000/2021) e pelo Órgão de Bem-Estar e Ética Animal (ORBEA) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (Referência interna: 01-2021). Foram feitos todos os esforços de modo a respeitar o princípio dos 3 R's e minimizar o número de animais utilizados e o seu sofrimento.

3.7.2 Estudo farmacocinético *in vivo*

Todos os murganhos receberam uma dose única e individual de uma solução de isoeugenol na dose 100 mg/kg por via IN. Para a preparação da solução, adicionaram-se 2,8 µL de isoeugenol a 12 µL de tampão fosfato estéril num eppendorf de 500 µL.

Antes da administração IN, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respetivamente), por via intraperitoneal, e mantidos num ambiente aquecido de forma a preservar a sua temperatura corporal.

A solução de isoeugenol foi administrada por via IN com um tubo de poliuretano (24 G, 19 mm) acoplado a uma seringa de 1 mL. A seringa foi introduzida a cerca de 1 cm da narina esquerda do animal, posicionado lateralmente.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 subgrupos (n=4) e sacrificados a 5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após administração. O sacrifício foi feito por deslocamento cervical seguido de decapitação. O sangue foi imediatamente recolhido para tubos heparinizados e centrifugado a 4°C a 3431 rpm, durante 10 minutos, de forma a obter os sobrenadantes de plasma. Os tecidos de interesse (cérebro e pulmões) foram removidos rapidamente, lavados com uma solução de cloreto de sódio 0,9% e pesados. Os tecidos foram homogeneizados em cloreto de sódio 0,9% (cérebro – 3 mL/g de tecido; pulmões – 4 mL/g de tecido) usando um homogeneizador de tecidos com pilão de teflon Thomas Scientific® (Nova Jérсия, EUA). Os homogeneizados de tecido foram centrifugados a 4800 rpm durante 15 minutos, a 4°C, e os sobrenadantes foram recolhidos.

Todas as amostras biológicas foram armazenadas a -80°C até ser feita a sua análise cromatográfica.

3.7.3 Análise farmacocinética

Os perfis concentração-tempo do isoeugenol após administração IN foram traçados nas matrizes de plasma, cérebro e pulmão e submetidos a análise farmacocinética, através do software WinNonlin, versão 5.2 (Pharsight Co, Mountain View, CA, EUA). Os parâmetros

farmacocinéticos foram determinados através das concentrações médias ($n=4$) obtidas em cada ponto temporal (5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos). Abrangem a concentração máxima (C_{max}) nas matrizes biológicas em estudo, o tempo para atingir a C_{max} (t_{max}), a área sob a curva concentração-tempo desde o tempo zero até à última concentração quantificável (AUC_t), a área sob a curva concentração-tempo desde o tempo zero até ao infinito (AUC_{inf}), calculada pela soma da AUC_t e o quociente entre a última concentração mensurável, a constante de eliminação (k_{el}). A determinação de k_{el} foi feita por regressão linear logarítmica do segmento terminal do perfil concentração-tempo. A estes parâmetros acresce o $t_{1/2\beta}$ e a área sob a curva concentração-tempo extrapolada (AUC_{extrap}) que traduz a exposição ao composto desde o último instante em que a concentração foi mensurável até ao infinito e que não deve exceder os 20%. Foram ainda calculados os rácios cérebro/plasma e pulmão /plasma, de forma a comparar a afinidade do isoeugenol para cada órgão em relação à sua exposição sistémica.

4. Resultados e Discussão

4.1 Desenvolvimento do método

4.1.1 Otimização da fase móvel e escolha do PI

O primeiro passo do desenvolvimento do método foi a otimização da fase móvel. Esta etapa é essencial para estabelecer condições cromatográficas adequadas que permitam obter uma boa separação entre o isoeugenol, PI e potenciais impurezas, bem como um tempo de corrida compatível com uma análise rápida das amostras. Como este método incidiu apenas sobre dois analitos, isoeugenol e respetivo PI, o sistema de eluição definido foi a eluição isocrática em vez da eluição por gradiente, que se torna mais útil quando se pretende separar e quantificar diversos compostos em simultâneo.

Inicialmente, foi testada uma fase móvel constituída por H₂O e ACN (50:50, v/v) mas o isoeugenol eluiu demasiado cedo, isto é, houve uma afinidade excessiva para a fase móvel e uma retenção insuficiente pela fase estacionária. Assim, de modo a aumentar o seu Rt, tornou-se a fase móvel menos apolar ao diminuir a percentagem de ACN. Testaram-se fases móveis compostas por H₂O/ACN (60:40, v/v), H₂O/ACN (65:35, v/v), H₂O/ACN (70:30, v/v) e H₂O/ACN/MeOH (60:35:5, v/v/v). Adicionou-se MeOH para tentar diminuir a percentagem de ACN na fase móvel sem a tornar demasiado polar. Com estas alterações, perspetivou-se que a afinidade do isoeugenol para a fase móvel iria ser menor e este seria mais retido pela fase estacionária.

Efetivamente, a fase móvel eleita foi composta por H₂O/ACN/MeOH (60:35:5, v/v/v) porque o isoeugenol apresentou uma melhor forma de pico (simétrico e afilado) e eluiu mais tarde (Rt = 3,5 minutos).

De seguida, procedeu-se à avaliação de 13 compostos como potenciais PIs (Tabela 3). Estes foram selecionados com base nas suas características físico-químicas, designadamente o grau de lipofilia, de forma a apresentarem um comportamento cromatográfico semelhante ao do analito, mas sem co-eluir com o mesmo.

Tabela 3 – Tempo de retenção (Rt) e grau de lipofilia (LogP) de fármacos testados como padrão interno (PI).

Compostos	LogP	Rt (min)
Cloranfenicol	1,1 ⁸⁷	1,12
Cetoprofeno	3,1 ⁸⁸	1,29
Carbamazepina	2,5 ⁸⁹	1,68
10,11- dihidrocarbamazepina	2,3 ⁹⁰	1,79
Quinidina	2,9 ⁹¹	4,14
Perampanel	3,4 ⁹²	6,05
Trazodona	2,8 ⁹³	6,57
Opicapone	3,4 ⁹⁴	ND
Verapamil	3,8 ⁹⁵	ND
Sertralina	4,8 ⁹⁶	ND
Atorvastatina	5,0 ⁹⁷	ND
Amitriptilina	5,0 ⁹⁸	ND
Loperamida	5,0 ⁹⁹	ND

ND - Não detetado.

Algumas moléculas não foram suficientemente retidas pela fase estacionária e eluíram demasiado cedo (ex.: cloranfenicol), enquanto outras co-eluíram com o isoeugenol (ex.: quinidina) ou interagiram de forma excessiva com a fase estacionária e não foram detetadas ao fim de 15 minutos de corrida (ex.: loperamida).

Por esse motivo, o composto que reuniu as melhores condições para ser escolhido como PI foi o perampanel, por apresentar um Rt adequado (Tabela 3) que permitiu conciliar a sua separação do isoeugenol e de impurezas, com um tempo de corrida que não compromete a rapidez da análise.

O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min e o tempo de corrida final foi de 8 minutos.

4.1.2 Otimização do processo de extração

Os processos de extração foram otimizados tendo por base alguma instabilidade do isoeugenol descrita na literatura, que fez com que estes fossem o mais simples possível e procurassem conjugar a eliminação de impurezas com uma recuperação reprodutível do analito.^{100, 101}

Os autores Ali *et al.* (2018) examinaram a estabilidade do isoeugenol a 5°C e 25°C, com e sem luz, durante um período de 6 meses.¹⁰¹ Constataram que o isoeugenol não foi detetado em amostras armazenadas a 25°C, com ou sem a presença de luz, após 30 dias de armazenamento.

Contudo, este apresentou uma boa estabilidade (101,1%) quando esteve sujeito a condições de baixa temperatura (5°C) e no escuro, pois foi detetado mesmo após 6 meses. A 5°C e com luz, foi possível quantificar isoeugenol (45%) após 4,5 meses de armazenamento, embora tenha ocorrido alguma degradação.¹⁰¹ Por sua vez, os autores Avonto *et al.* (2018) submeteram várias moléculas, entre as quais o isoeugenol, a fotodegradação forçada durante 3 meses.¹⁰⁰ O isoeugenol apresentou um aumento significativo do seu índice de reatividade, com a formação de espécies reativas.¹⁰⁰ Estes resultados estavam de acordo com os de Bertrand *et al.* (1997) que reportaram uma conversão do isoeugenol em espécies reativas por fotooxidação direta, incluindo o metabolito quinona-metídeo, referido na secção 1.2.1.1.⁸¹

Consequentemente, foram avaliadas algumas estratégias para evitar a potencial degradação do isoeugenol durante o processo de extração, nomeadamente a preparação das amostras a baixas temperaturas e na ausência de luz solar, bem como a inclusão de um agente antioxidante (ácido ascórbico). Para o efeito, adicionou-se ácido ascórbico (1,5 mM)¹⁰² às soluções stock e soluções de fortificação, e procedeu-se à preparação das amostras em gelo e sob luz infravermelha. Como a inclusão de ácido ascórbico não se revelou vantajosa, optou-se por continuar apenas com os procedimentos experimentais em gelo e na ausência de luz solar.

Tal como referido na secção 3.5, foram validados dois processos de extração, A e B, com o intuito de eliminar impurezas que pudessem interferir com a quantificação do isoeugenol (ou PI) e otimizar as suas recuperações. Começou-se por testar uma técnica de precipitação de proteínas com ACN (1:2), ou seja, a 100 µL plasma foram adicionados 200 µL de ACN. Em seguida, o sobrenadante resultante da precipitação de proteínas foi evaporado a 45°C sob azoto e o resíduo seco foi reconstituído em fase móvel. A evaporação tem a vantagem de permitir concentrar o analito e desse modo, aumentar a sensibilidade da técnica cromatográfica. Por sua vez, a reconstituição do resíduo seco com fase móvel assegura a manutenção da forma dos picos, do R_t e da reprodutibilidade entre injeções.

No entanto, com estas condições, verificou-se que os valores de recuperação do isoeugenol foram em média $54,6 \pm 6,74\%$ e o tempo de evaporação do sobrenadante foi demasiado longo (cerca de 35 minutos), o que tornava a técnica inexecutável. Assim, de forma a encurtar o tempo de evaporação, subiu-se a temperatura de evaporação para 60°C. Porém, apesar de o tempo de evaporação ter diminuído para 13 minutos, o que tornaria a preparação de amostras mais célere, a recuperação média diminuiu em relação à primeira técnica para $30,1 \pm 15,2\%$. Esse resultado poderá ser justificado por uma eventual degradação do isoeugenol a temperaturas mais altas, o que obrigou à procura de um compromisso entre o tempo e a temperatura de evaporação. Por esse motivo, reduziu-se a temperatura para 50°C e registou-

se um tempo de evaporação de aproximadamente 20 minutos. Adicionalmente, não se observaram impurezas e a recuperação média preliminar foi de $70,8 \pm 12,1\%$. Como descrito na secção 3.5, esta técnica designada processo de extração A, foi selecionada inicialmente para a validação da técnica cromatográfica de quantificação do isoeugenol em plasma, cérebro e pulmão de murganho.

Contudo, por razões detalhadas adiante, houve necessidade de otimizar um método de extração alternativo, designado processo de extração B. Neste processo de extração manteve-se a técnica de precipitação de proteínas com ACN (1:2), mas eliminou-se o passo de evaporação e reconstituição, tendo-se injetado no HPLC, o sobrenadante resultante da precipitação de proteínas. Como a proporção de ACN adicionado foi baixa (apenas 1:2), não se observaram alterações das formas dos picos, oscilações de R_t entre corridas ou a destabilização da coluna.

No final, o processo de extração B foi o processo eleito para o estudo *in vivo*, porque apresentou resultados mais satisfatórios não só a nível de recuperação, mas também de reprodutibilidade.

4.2 Seletividade

A separação cromatográfica do isoeugenol ($R_t \approx 3,5$ minutos) e do PI ($R_t \approx 6,05$ minutos) foi efetuada com sucesso. A isso acresce o facto de na análise de 6 amostras brancas de plasma, cérebro e pulmão, não se terem observado picos interferentes ao R_t dos analitos, podendo-se concluir que o método é seletivo. Nas Figuras 10, 11, 12 e 13 estão representados cromatogramas de matrizes biológicas brancas e de amostras LLOQ e ULOQ, submetidas aos processos de extração A e B (gama baixa e gama alta), respetivamente.

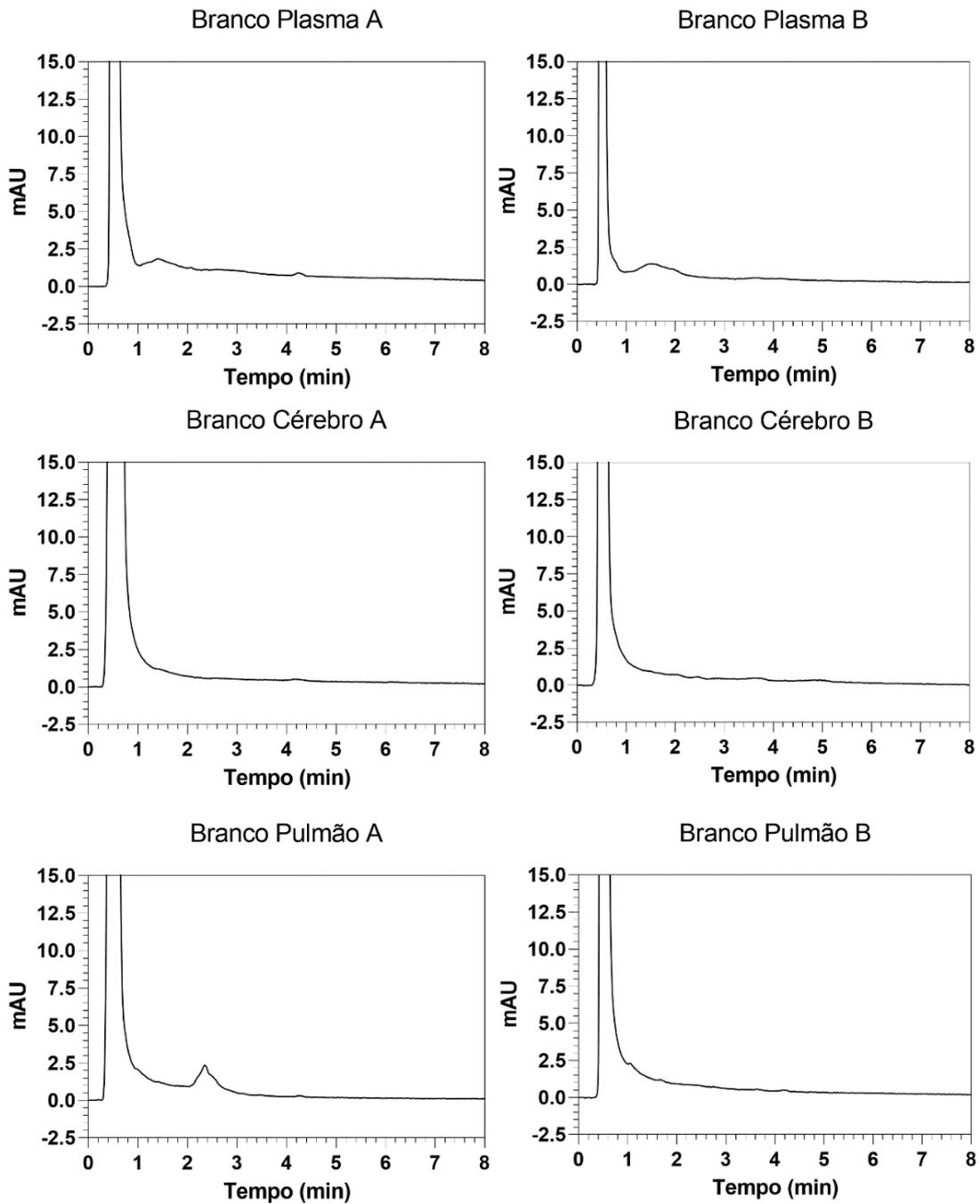


Figura 10 – Cromatogramas representativos de amostras de matrizes biológicas brancas (plasma, cérebro e pulmão), submetidas aos processos de extração A e B.

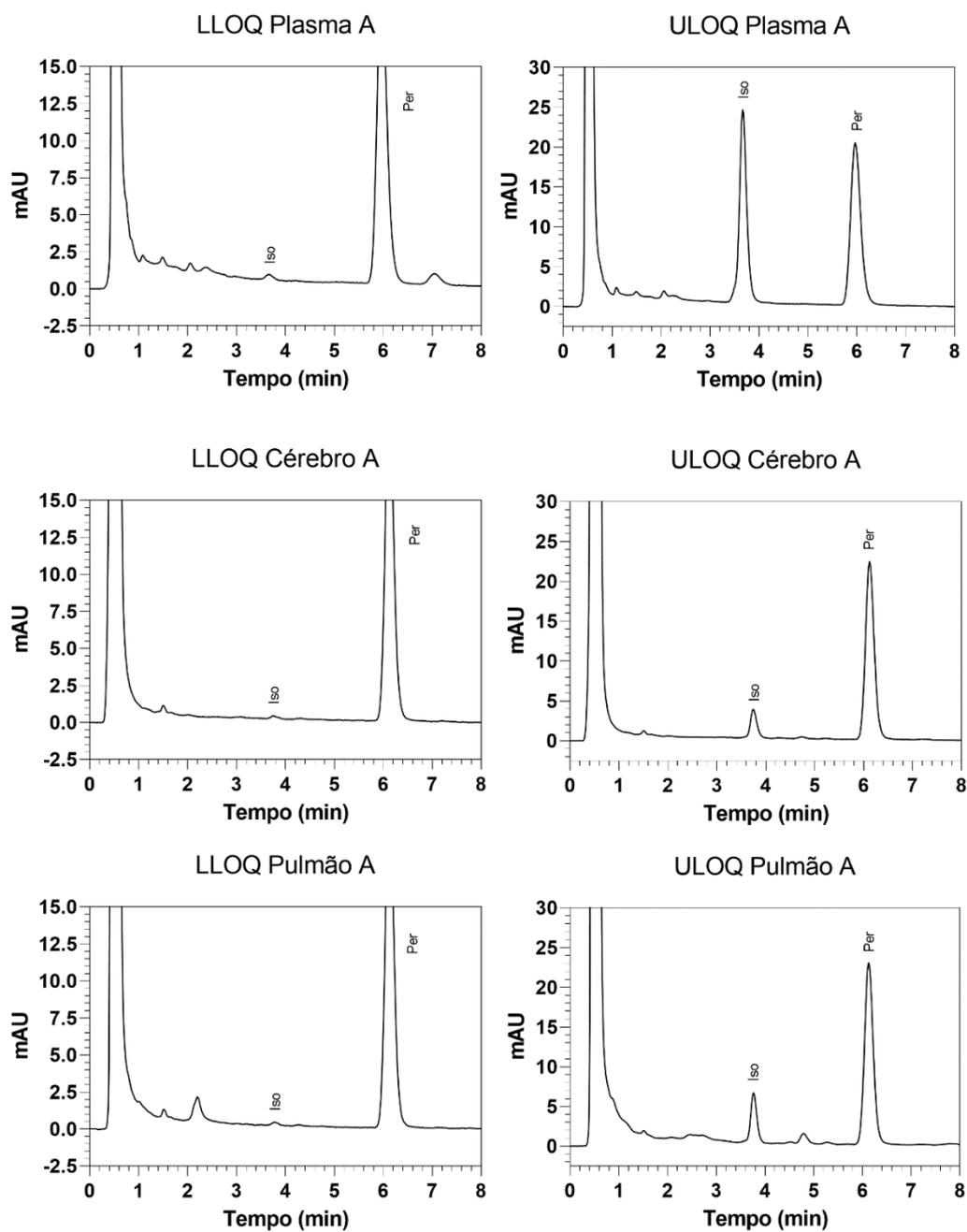


Figura II – Cromatogramas representivos de amostras LLOQ e ULOQ, nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão, após processo de extração A.

Iso – Isoeugenol; Per – Perampanel (PI).

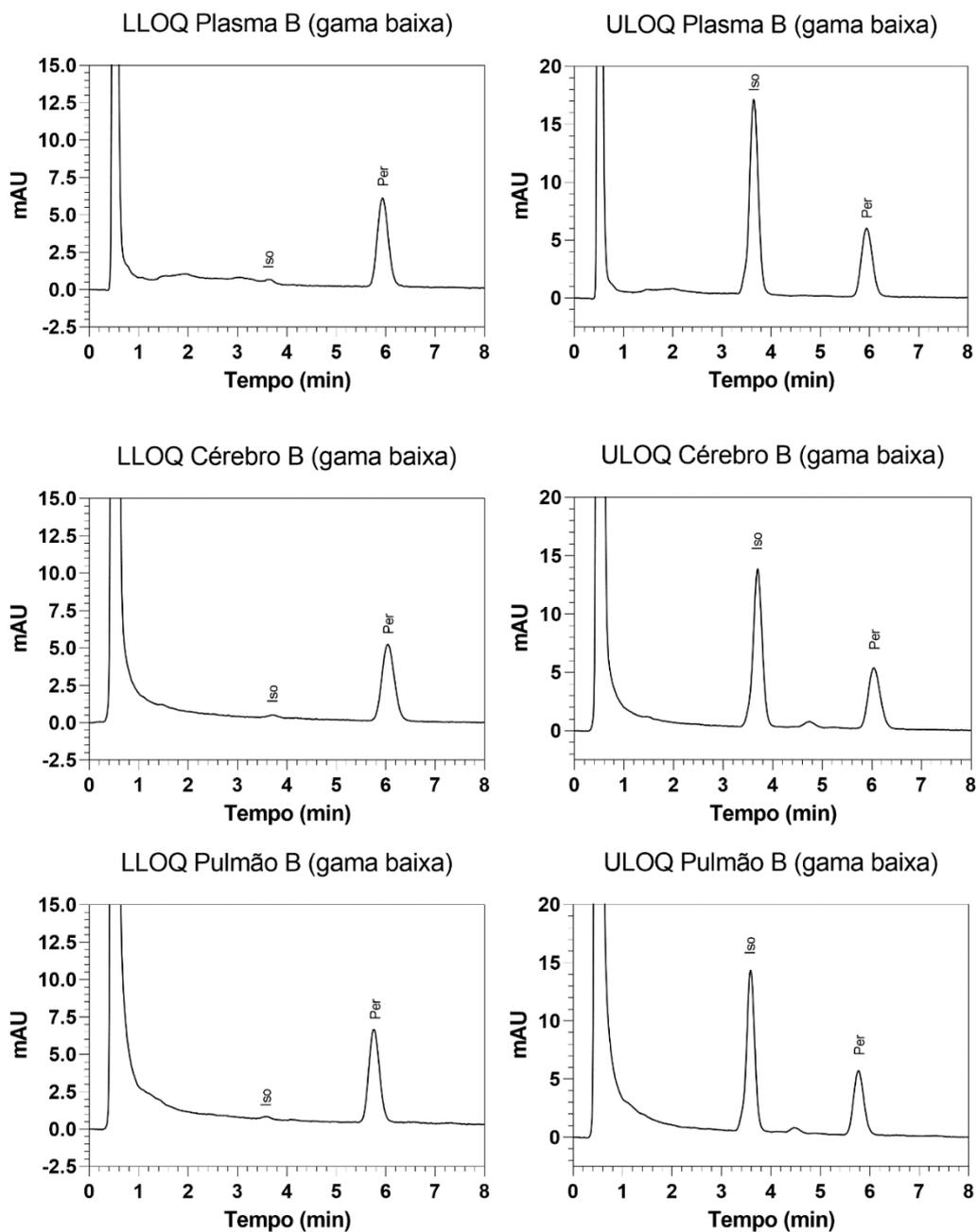


Figura 12 – Cromatogramas representativos das extrações das amostras LLOQ e ULOQ, nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão, no processo de extração B (gama baixa).

Iso – Isoeugenol; Per – Perampanel (PI).

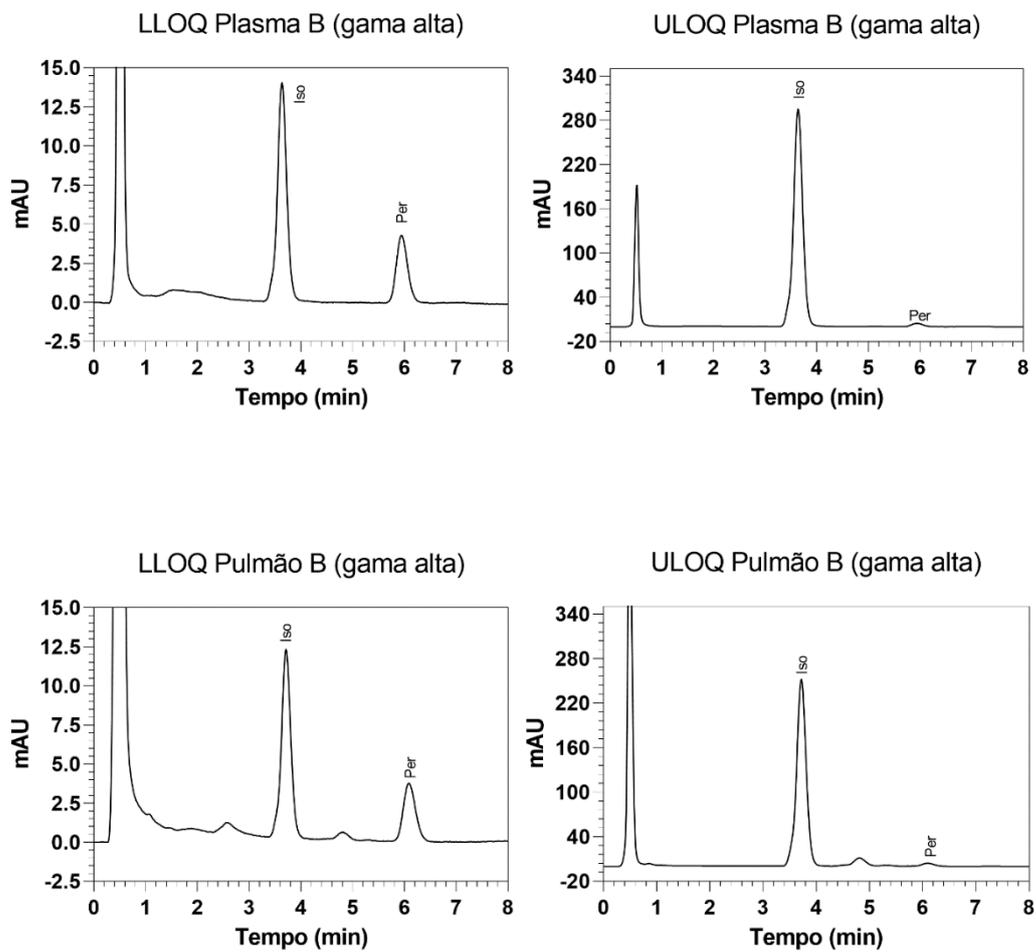


Figura 13 – Cromatogramas representativos das extrações das amostras LLOQ e ULOQ, nas matrizes biológicas de plasma e pulmão, no processo de extração B (gama alta).

Iso – Isoeugenol; Per – Perampanel (PI).

4.3 Curva de calibração e LLOQ

As concentrações das amostras biológicas são avaliadas através dos resultados de regressão obtidos a partir de curvas de calibração, sendo a regressão linear o modelo mais utilizado.¹⁰³ O método dos mínimos quadrados é um dos modelos de regressão linear mais comuns, mas só pode ser aplicado se se verificar homocedasticidade, ou seja, variâncias iguais ao longo da gama de calibração, avaliadas através da diferença entre os resíduos e os valores de concentração. Dada a amplitude das gamas de calibração utilizadas, tornou-se necessário verificar a presença de homocedasticidade através do teste F, um teste estatístico que avalia as diferenças entre o rácio das variâncias do padrão de calibração mais alto e mais baixo (F experimental). Quando as variâncias são estatisticamente diferentes e o valor de F experimental é mais elevado que o valor de F teórico, não se observa homocedasticidade e podem aplicar-se fatores de ponderação na regressão linear. Neste caso particular, o valor de F experimental foi superior ao valor de F teórico (15,98) em todas as matrizes biológicas, considerando um nível de significância α de 0,01 e 4 graus de liberdade (n-1). Assim, confirmou-se a existência de heterocedasticidade.

Efetivamente, observaram-se diferenças menores entre os resíduos e as concentrações teóricas nas concentrações menores, e diferenças maiores entre os resíduos e as concentrações teóricas nas concentrações maiores. Estes últimos, tendem a influenciar a linha de regressão, nomeadamente, a exatidão no extremo inferior da gama.¹⁰³

Para encontrar o fator de ponderação mais apropriado, foram avaliados o erro relativo (Tabela 4) e a linearidade (Tabela 5) com seis fatores distintos, nomeadamente $1/x^2$, $1/x$, $1/\sqrt{x}$, $1/y^2$, $1/y$ e $1/\sqrt{y}$.

Tabela 4 – Erro relativo (% ER) obtido para cada fator de ponderação aplicado às gamas de calibração de dois processos de extração (A e B) nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão.

Fatores de ponderação		% ER						
		Sem ponderação	$1/x^2$	$1/x$	$1/\sqrt{x}$	$1/y^2$	$1/y$	$1/\sqrt{y}$
Processo de extração A								
Gama 0,07 – 7 µg/mL	Plasma	1093,65	322,75	348,69	468,96	343,68	356,46	472,77
Gama 0,07 – 2,8 µg/mL	Cérebro	385,57	370,72	379,90	386,43	383,10	369,71	376,63
Gama 0,07 – 7 µg/mL	Pulmão	1006,74	969,74	960,43	986,36	1983,47	1419,66	1158,79
Processo de extração B								
Gama 0,07 – 7 µg/mL	Plasma	197,53	200,38	195,38	194,61	202,56	196,90	196,47
	Cérebro	140,57	117,86	117,57	117,86	118,87	118,59	117,61
	Pulmão	214,12	188,49	62,80	62,77	64,27	62,91	202,74
Gama 7 – 140 µg/mL	Plasma	69,80	44,81	45,98	50,91	44,19	45,74	50,52
	Pulmão	61,00	41,33	38,86	44,06	41,35	39,04	43,73

Tabela 5 – Linearidade obtida para cada fator de ponderação aplicado às gamas de calibração de dois processos de extração (A e B) nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão.

Linearidade (r)								
Fatores de ponderação		Sem ponderação	$1/x^2$	$1/x$	$1/\sqrt{x}$	$1/y^2$	$1/y$	$1/\sqrt{y}$
Processo de extração A								
Gama 0,07 – 7 $\mu\text{g/mL}$	Plasma	0,993	0,987	0,991	0,991	0,986	0,990	0,990
Gama 0,07 – 2,8 $\mu\text{g/mL}$	Cérebro	0,992	0,970	0,995	0,997	0,987	0,995	0,997
Gama 0,07 – 7 $\mu\text{g/mL}$	Pulmão	0,991	0,889	0,885	0,874	0,851	0,845	0,846
Processo de extração B								
Gama 0,07 – 7 $\mu\text{g/mL}$	Plasma	0,998	0,994	0,998	0,998	0,995	0,998	0,998
	Cérebro	0,998	0,998	0,999	0,999	0,998	0,999	0,999
	Pulmão	0,996	0,994	0,999	0,999	0,994	0,999	0,999
Gama 7 – 140 $\mu\text{g/mL}$	Plasma	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999
	Pulmão	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999

No processo de extração A, os menores valores de erro relativo para as três matrizes biológicas foram constatados para os fatores de ponderação $1/x^2$ e $1/x$. Porém, a linearidade foi superior com $1/x$, e por isso foi este o fator de ponderação escolhido.

Em relação ao processo de extração B, foram estabelecidas duas gamas de calibração, uma gama que abrange concentrações mais baixas (0,07-7 $\mu\text{g/mL}$) e outra gama aplicável a concentrações mais altas (7-140 $\mu\text{g/mL}$). Esta necessidade surgiu por se terem obtido valores de concentração acima do ULOQ (7 $\mu\text{g/mL}$) durante o estudo farmacocinético *in vivo*, nomeadamente, nas matrizes de plasma e de pulmão. Por conseguinte, foi necessário fazer uma validação parcial para estas duas matrizes biológicas com uma gama de calibração superior (7-140 $\mu\text{g/mL}$), de acordo com as *guidelines* internacionais.^{83,84,85} Na gama de calibração mais baixa, o fator de ponderação escolhido foi $1/\sqrt{x}$, enquanto na gama de calibração mais alta foi selecionado o fator de ponderação $1/x$, por apresentarem menor erro relativo e linearidade mais próxima de 1 (Tabela 4 e Tabela 5).

No que concerne às curvas de calibração, obteve-se linearidade em todas as gamas de concentração para todas as matrizes biológicas em estudo ($r^2 \geq 0,995$). As equações de regressão das curvas de calibração, e os coeficientes de determinação correspondentes a cada matriz biológica estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros das curvas de calibração do isoeugenol nas matrizes biológicas em estudo.

	Gama de concentrações	Matrizes biológicas	Equação de regressão	r^2
Processo de extração A	Gama 0,07 – 7 $\mu\text{g/mL}$	Plasma	$y = 0,1189x + 0,0013$	0,9956
		Pulmão	$y = 0,0524x + 0,0023$	0,9952
	Gama 0,07 – 2,8 $\mu\text{g/mL}$	Cérebro	$y = 0,0369x + 0,0039$	0,9960
Processo de extração B	Gama 0,07 – 7 $\mu\text{g/mL}$	Plasma	$y = 0,3265x + 0,0040$	0,9997
		Cérebro	$y = 0,2895x + 0,0062$	0,9999
		Pulmão	$y = 0,3017x - 0,0011$	0,9998
	Gama 7 – 140 $\mu\text{g/mL}$	Plasma	$y = 0,3635x + 0,0965$	0,9991
		Pulmão	$y = 0,3538x + 0,0401$	0,9991

A equação de regressão e o coeficiente de determinação (r^2) são determinados através da média de 5 curvas de calibração para os processos de extração A e B (gama baixa) e da média de 3 curvas de calibração para o processo de extração B (gama alta). A equação da curva de calibração é dada pela equação geral $y = mx + b$, onde y representa os rácios das áreas dos picos do isoeugenol em relação às áreas do PI e x representa a concentração de isoeugenol ($\mu\text{g/mL}$).

O valor definido como LLOQ foi 0,07 µg/mL para o processo de extração A e para o processo de extração B (gama de concentrações mais baixa) e 7 µg/mL para o processo de extração B (gama de concentrações mais alta). O LLOQ para os processos A e B (gama baixa) foi consideravelmente inferior ao de outras técnicas bioanalíticas de HPLC-UV descritas na literatura ^{104, 105}, para as quais apresentou um valor de 0,5 µg/mL. Com estes dados podemos confirmar a sensibilidade dos métodos cromatográficos desenvolvidos, mesmo tendo um processo de extração associado.

Os valores de exatidão (% *Bias*) inter-dia para o LLOQ variaram entre -2,95 a 9,55% (Tabela 7), enquanto os valores intra-dia variaram entre -3,75 a 4,84% (Tabela 8). Todos estiveram dentro do valor limite de aceitação ($\pm 20\%$ para o LLOQ). ^{83,84,85}

Por outro lado, os valores de precisão (% CV) inter-dia foram mais altos no processo de extração A (Tabela 7), no entanto, não excederam 17,55% para o LLOQ. No processo de extração B (gama baixa e alta) os valores para o LLOQ não foram superiores a 14,02% e a 2,63%, respectivamente (Tabela 7). Relativamente à precisão intra-dia os valores para o LLOQ não excederam 14,86% no processo de extração B e 8,61% no processo de extração A (Tabela 8). As percentagens obtidas estão dentro do limite de aceitação ($\leq 20\%$) para o LLOQ. ^{83,84,85}

Tabela 7 – Determinação da precisão (% CV) e exatidão (% *Bias*) inter-dia no QCLLOQ (limite inferior de quantificação), QCI (nível baixo), QC2 (nível médio) e QC3 (nível alto).

Inter-dia					
	Matrizes	Concentrações nominais (µg/mL)	Concentrações experimentais (µg/mL)	CV (%)	<i>Bias</i> (%)
Processo de extração A	Plasma	LLOQ (0,07)	0,070	17,55	-0,43
		QCI (0,2)	0,183	2,35	-8,55
		QC2 (3)	3,114	10,18	3,81
		QC3 (6)	5,832	13,66	-2,80
	Cérebro	LLOQ (0,07)	0,068	14,98	-2,95
		QCI (0,2)	0,203	9,66	1,69
		QC2 (1)	0,987	14,20	-1,27
		QC3 (2,4)	2,393	12,90	-0,30
	Pulmão	LLOQ (0,07)	0,074	7,09	5,72
		QCI (0,2)	0,207	6,52	3,32
		QC2 (3)	2,809	10,14	-6,35
		QC3 (6)	6,144	7,58	2,40
Processo de extração B (gama 0,07-7 µg/mL)	Plasma	LLOQ (0,07)	0,075	14,02	6,56
		QCI (0,2)	0,203	8,95	1,38
		QC2 (3)	3,106	5,02	3,54
		QC3 (6)	6,031	4,77	0,52
	Cérebro	LLOQ (0,07)	0,071	3,47	1,63
		QCI (0,2)	0,200	4,20	0,16
		QC2 (3)	3,027	5,91	0,90
		QC3 (6)	6,107	6,56	1,78
	Pulmão	LLOQ (0,07)	0,077	10,98	9,55
		QCI (0,2)	0,205	4,03	2,51
		QC2 (3)	3,067	4,04	2,24
		QC3 (6)	6,058	4,49	0,97
Processo de extração B (gama 7-140 µg/mL)	Plasma	LLOQ (7)	7,023	2,63	0,33
		QCI (20)	19,796	2,86	-1,02
		QC2 (50)	51,772	5,00	3,54
		QC3 (120)	119,591	3,77	-0,34
	Pulmão	LLOQ (7)	6,977	1,31	-0,33
		QCI (20)	19,778	4,07	-1,11
		QC2 (50)	51,630	1,72	3,26
		QC3 (120)	118,682	2,47	-1,10

Bias = desvio do valor nominal; CV = coeficiente de variação.

Tabela 8 - Determinação da precisão (% CV) e exatidão (% *Bias*) intra-dia no QCLLOQ (limite inferior de quantificação), QC1 (nível baixo), QC2 (nível médio) e QC3 (nível alto).

Intra-dia					
	Matrizes	Concentrações nominais (µg/mL)	Concentrações experimentais (µg/mL)	CV (%)	<i>Bias</i> (%)
Processo de extração A	Plasma	LLOQ (0,07)	0,071	3,09	1,39
		QC1 (0,2)	0,190	8,51	-5,16
		QC2 (3)	3,063	7,82	2,09
		QC3 (6)	5,802	3,84	-3,31
	Cérebro	LLOQ (0,07)	0,072	3,19	2,34
		QC1 (0,2)	0,217	2,30	8,46
		QC2 (1)	0,965	8,68	-3,54
		QC3 (2,4)	2,551	3,80	6,30
	Pulmão	LLOQ (0,07)	0,072	8,61	2,84
		QC1 (0,2)	0,199	4,09	-0,68
		QC2 (3)	3,200	6,79	6,65
		QC3 (6)	5,800	5,51	-3,34
Processo de extração B (gama 0,07-7 µg/mL)	Plasma	LLOQ (0,07)	0,067	7,61	-3,75
		QC1 (0,2)	0,202	3,94	0,85
		QC2 (3)	3,105	1,52	3,50
		QC3 (6)	6,130	0,69	2,17
	Cérebro	LLOQ (0,07)	0,069	9,44	-0,74
		QC1 (0,2)	0,198	6,44	-0,99
		QC2 (3)	3,004	0,86	0,13
		QC3 (6)	6,049	0,67	0,82
	Pulmão	LLOQ (0,07)	0,073	14,86	4,84
		QC1 (0,2)	0,212	5,96	6,00
		QC2 (3)	3,204	1,86	6,79
		QC3 (6)	6,188	0,92	3,13

Bias = desvio do valor nominal; CV = coeficiente de variação.

Existem técnicas bioanalíticas na literatura para a quantificação de isoeugenol que recorreram a cromatografia líquida ou gasosa acopladas a espectrometria de massa ¹⁰⁶ ¹⁰⁷. Porém, estes métodos são mais complexos e os equipamentos são dispendiosos e não estão disponíveis em todos os laboratórios. Foi ainda implementada uma técnica de cromatografia líquida associada a detecção fluorométrica ¹⁰⁸, mas mesmo assim, foram identificadas várias potenciais interferências.

Consequentemente, verifica-se que a técnica cromatográfica desenvolvida, associada ao método de extração eleito para quantificar amostras dos estudos *in vivo* (método B), apresenta várias vantagens além de seletividade e sensibilidade, pois pode ser aplicada em laboratórios

que não possuam equipamentos de deteção com espectrometria de massa, o que é benéfico a nível económico.

4.4 Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão são parâmetros essenciais para a qualidade de uma curva de calibração, à semelhança da linearidade. Os valores de precisão (% CV) e exatidão (% *Bias*) devem estar entre $\pm 15\%$ do valor nominal para o QCI, QC2 e QC3.^{83,84,85} Na Tabela 7, pode constatar-se que os valores de % CV inter-dia foram mais elevados com o processo de extração A, indo de 2,35 até 14,20%. Em contraste, para o processo B, observaram-se valores menores, entre 4,03 e 8,95% (Tabela 7). Para o % CV intra-dia, os valores não excederam 8,68% para o processo de extração A e os 6,44% para o processo B (Tabela 8). Todas as percentagens obtidas estão dentro do limite de aceitação definido pelas normas internacionais de validação.

^{83,84,85}

Os valores de % *Bias* inter-dia (Tabela 7) variaram entre -8,55 e 3,81% para o processo de extração A e 0,16 e 3,54% para o processo de extração B. Por sua vez, os valores intra-dia (Tabela 8) variaram entre -5,16 a 8,46% para o processo A e -0,99 e 6,79% para o processo B. Mesmo estando dentro do limite de aceitação, verificaram-se valores de % *Bias* mais elevados para o processo A do que para o processo B.

O processo de extração B foi o mais exato e preciso, pois todos os valores para % CV (inter e intra-dia) e % *Bias* (inter e intra-dia) foram menores em relação aos valores obtidos no processo de extração A.

No processo de extração B (gama alta), os valores inter-dia de % CV não excederam os 5,00% e os valores de % *Bias* não excederam os 3,54% (Tabela 7), estando assim, dentro do limite de aceitação definido.^{83,84,85}

4.5 Recuperação e *carry-over*

Como referido na secção 3.6.4, a recuperação foi avaliada através da comparação entre as áreas de QCs submetidos ao processo de extração com as áreas de QCs (com as mesmas concentrações nominais) não submetidos ao processo de extração. Este procedimento foi repetido 5 vezes para os 3 níveis de concentração das amostras (QCI, QC2 e QC3).

Com o processo de extração A, os valores médios de recuperação do QCI, QC2 e QC3 (Tabela 9), variaram de 29,8 a 37,4% no plasma, 12,7 a 14,2% no cérebro e 18,6 a 23,5% no

pulmão. No processo de extração B, os valores obtidos para a recuperação média variaram de 87,1 a 97,1% no plasma, 75,4 a 81,9% no cérebro e 77,5 a 79,0% no pulmão (Tabela 9).

Tabela 9 – Recuperações relativas do isoeugenol para o QC1, QC2 e QC3 (n=5) em cada matriz biológica, com o processo de extração A e B.

Processo de extração A									
Matrizes	Plasma			Cérebro			Pulmão		
Concentrações nominais (µg/mL)	QC1 (0,2)	QC2 (3)	QC3 (6)	QC1 (0,2)	QC2 (1)	QC3 (2,4)	QC1 (0,2)	QC2 (3)	QC3 (6)
Média (%) ± SD	29,8 ± 0,70	37,4 ± 3,81	35,2 ± 4,81	14,2 ± 1,37	12,7 ± 1,81	12,7 ± 1,64	19,2 ± 5,35	18,6 ± 2,73	23,5 ± 7,07
CV (%)	2,35	10,18	13,66	9,66	14,20	12,90	27,85	14,67	30,09
Processo de extração B									
Concentrações nominais (µg/mL)	QC1 (0,2)	QC2 (3)	QC3 (6)	QC1 (0,2)	QC2 (3)	QC3 (6)	QC1 (0,2)	QC2 (3)	QC3 (6)
Média (%) ± SD	97,1 ± 3,82	87,1 ± 1,32	92,4 ± 0,63	81,9 ± 3,44	75,4 ± 4,45	76,7 ± 5,03	77,5 ± 3,13	78,9 ± 3,19	79,0 ± 3,55
CV (%)	3,94	1,52	0,69	4,20	5,91	6,56	4,03	4,04	4,49

CV – coeficiente de variação; SD – Desvio padrão

Em relação aos valores de % CV (Tabela 9), estes variaram de 2,35 a 13,66% no plasma, 9,66 a 14,20% no cérebro e 14,67% a 30,09% no pulmão para o processo de extração A. Com o processo de extração B, os valores de % CV foram mais baixos e variaram de 0,69 a 3,94% no plasma, 4,20 a 6,56% no cérebro e 4,03 a 4,49% no pulmão (Tabela 9).

Os valores médios de recuperação do PI no método de extração A foram 100,3% para o plasma (% CV = 3,15%), 88,46% para o cérebro (% CV = 4,39%) e 106,3% para o pulmão (% CV = 3,65%). Com o método de extração B, foram 36,12% para o plasma (% CV = 9,1%), 37,08% para o cérebro (% CV = 9,9%) e 36,53% para o pulmão (% CV = 13,3%). Apesar de os valores de recuperação do PI terem sido mais elevados com o método de extração A, possivelmente devido ao passo da evaporação que permite concentrar os analitos, foi escolhido o método de extração B para análise das amostras dos estudos *in vivo*.

Este método de extração apresentou valores de recuperação média de isoeugenol significativamente mais altos e maior precisão dos valores de % CV em relação ao método A, justificando-se mais uma vez, a preferência pelo método B.

Finalmente, não foram observados picos interferentes em amostras de matriz branca após injeção do padrão de calibração mais alto (ULOQ). Assim, considera-se que não há efeito *carry-over*.

4.6 Estabilidade

A avaliação da estabilidade foi feita através da comparação de cinco réplicas de cada QCI e QC3 no tempo 0 e após exposição às condições de estabilidade estipuladas na secção 3.6.6. Segundo as *guidelines* internacionais, confirma-se a existência de estabilidade quando o valor obtido se encontra dentro do intervalo 85-115%.^{83,84,85}

Para verificar se o isoeugenol permaneceu inalterado durante todo o estudo, simulou-se o armazenamento de amostras biológicas não processadas, isto é, colhidas, mas não submetidas ao processo de extração. Adicionalmente, determinou-se a análise de amostras colhidas e submetidas ao processo de extração (processadas). Pelos motivos enumerados em secções prévias, a estabilidade foi apenas avaliada com o processo de extração B (Tabela 10).

Tabela 10 – Estabilidade das amostras não processadas e processadas com o processo de extração B.

		Amostras não processadas						
		Matrizes	Plasma		Cérebro		Pulmão	
		Concentrações nominais (µg/mL)	QCI (0,2)	QC3 (6)	QCI (0,2)	QC3 (6)	QCI (0,2)	QC3 (6)
Condições de estabilidade	1h, RT	96,49	98,73	93,78	102,03	68,35	89,43	
	2 ciclos, cong-descong (-80°C)	96,28	99,53	96,67	100,51	92,25	93,28	
	1h na presença de luz	93,45	98,29	103,32	100,06	95,24	99,96	
	Longo prazo, 10 dias (-80°C)	95,49	99,68	87,94	98,15	63,69	59,84	
	Longo prazo, 5 dias (-80°C)	-	-	-	-	92,71	99,15	
	Amostras processadas							
	2h, RT	97,52	99,34	96,12	100,72	96,88	100,06	
	24h, 4°C	96,02	105,01	105,84	112,94	106,18	116,15	

RT – temperatura ambiente; cong/descong – congelação/descongelação

As matrizes de plasma e cérebro demonstraram estabilidade em todas as condições testadas (Tabela 10). Contudo, na matriz de pulmão, não houve estabilidade nalgumas condições, nomeadamente nas amostras não processadas após 1h a temperatura ambiente e a longo prazo (10 dias a -80°C), bem como em amostras processadas, na condição 24h a 4°C (Tabela 10).

Como não houve estabilidade na matriz de pulmão a longo prazo (10 dias a -80°C), reduziu-se o tempo de armazenamento de 10 para 5 dias. Nestas condições, confirmou-se a existência de estabilidade (Tabela 10).

As soluções de fortificação apresentaram estabilidade pelo menos até 96h a 4°C, enquanto a solução stock foi estável durante 8 dias a 4°C (Tabela 11).

Tabela 11 – Estabilidade das soluções de fortificação e stock.

				Soluções de fortificação			
				Concentrações nominais (µg/mL)	QC1 (0,2)	QC3 (6)	
Condições de estabilidade	24h, 4°C			103,83	95,53		
	48h, 4°C			99,47	100,77		
	72h, 4°C			98,56	97,97		
	96h, 4°C			96,98	97,02		
	Solução stock						
					Concentrações nominais (µg/mL)	QC1 (0,2)	QC3 (6)
	8 dias, 4°C			98,20	98,12		

4.7 Estudo farmacocinético *in vivo*

A DA é uma doença neurodegenerativa e como tal, o acesso ao SNC é fundamental. A administração IN permite que os fármacos sejam transportados diretamente da cavidade nasal até ao cérebro, através das vias neuronais olfativas e trigeminais. Trata-se de um método rápido e simples para veicular fármacos, além de ser não invasivo e possibilita que moléculas de grande dimensão que não atravessam a BHE, tenham acesso ao SNC. Adicionalmente, evita uma metabolização gastrointestinal e efeito de primeira passagem hepático, permitindo a administração de doses mais baixas de fármaco que, por sua vez, reduzem uma potencial toxicidade.^{109, 110, 111}

Até ao momento, não foram ainda realizados estudos farmacocinéticos com administração IN de isoeugenol. Como mencionado na secção 1.2.1.1, os estudos concluídos até à data utilizaram as vias de administração oral e IV.^{73, 74} Após administração oral em dose única, o

isoeugenol apresentou uma biodisponibilidade muito baixa (10-32%) em murganhos e ratos de ambos os sexos ⁷⁴. Por sua vez, apesar de apresentar uma biodisponibilidade de 100%, a via de administração IV é invasiva. Consequentemente, efetuou-se o estudo farmacocinético com isoeugenol mediante administração IN (100 mg/kg) a murganhos.

Na Figura 14 estão descritos os perfis concentração-tempo do isoeugenol nas matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão, enquanto os parâmetros farmacocinéticos correspondentes estão representados na Tabela 12.

Figura 14 – Perfis de concentração-tempo, nas matrizes biológicas de plasma (A), cérebro (B) e pulmão (C), após administração IN de isoeugenol (100 mg/kg). Os resultados são apresentados como média \pm SEM de três a quatro animais por ponto (n=3-4).

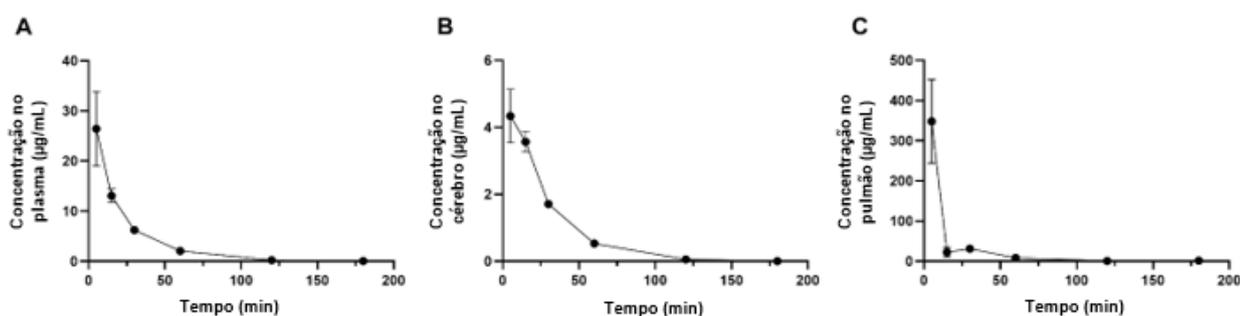


Tabela 12 – Parâmetros farmacocinéticos do isoeugenol em plasma, cérebro e pulmão, após administração IN (100 mg/kg) a murganhos.

Parâmetros farmacocinéticos ^a	Plasma	Cérebro	Pulmão
t_{max} (min)	5,00	5,00	5,00
C_{max} (µg/mL)	26,41	4,34 ^b	348,16 ^b
AUC_t (µg min/mL)	599,05	140,87 ^c	4030,85 ^c
AUC_{inf} (µg min/mL)	604,28	142,15 ^c	4091,75 ^c
AUC_{extrap} (%)	0,86	0,90	1,49
k_{el} (min ⁻¹)	0,038	0,039	0,022
$t_{1/2\beta}$ (min)	18,12	17,65	31,27
Rácios AUC_t			
$AUC_{cérebro/plasma}$	0,23	-	-
$AUC_{pulmão/plasma}$	6,73	-	-

a) Os parâmetros foram estimados utilizando os perfis médios de concentração-tempo obtidos a partir de três a quatro animais por ponto temporal (n = 3 - 4). b) Valores expressos em µg/g; c) Valores expressos em µg.min/g.

AUC_{extrap} - área sob a curva concentração-tempo extrapolada; AUC_{inf} - área sob a curva concentração-tempo desde o tempo zero até ao infinito; AUC_t - área sob a curva concentração-tempo desde o tempo zero até à última concentração quantificável; C_{max} - concentração máxima; k_{el} - constante de eliminação; $t_{1/2\beta}$, tempo de semi-vida de eliminação terminal; t_{max} , tempo para atingir a concentração máxima.

O t_{max} foi atingido aos 5 minutos no plasma, o que sugere uma rápida absorção do isoeugenol. Efetivamente, no que diz respeito à exposição sistêmica, observam-se semelhanças com estudos de Badger *et al.* (2002)⁷³ e Hong *et al.* (2013)⁷⁴, nomeadamente uma absorção rápida ($t_{max} = 2-20$ minutos após administração oral)⁷⁴ e a remoção rápida do sangue por distribuição para os tecidos ou eliminação. Apesar de não terem determinado os níveis de isoeugenol em cérebro e pulmão, Hong *et al.* (2013) inferiram que o isoeugenol se distribui de forma extensiva e célere para os tecidos através do baixo valor do tempo de semi-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$) de 7-10 minutos e do valor de volume de distribuição aparente em estado estacionário (V_{ss}) de 11-25,2 L/kg, após administração IV. Este valor excedeu o volume total de água corporal (0,668 L/kg), o que indicou uma distribuição extensiva do isoeugenol para os tecidos extravasculares.⁷⁴ Por sua vez, Badger *et al.* (2002) também sugerem uma distribuição acelerada para os tecidos e/ou a eliminação imediata do isoeugenol, o que justificaram com a sua ausência de deteção no sangue, após administração oral.⁷³ Estes resultados estão de acordo com os valores de t_{max} no cérebro e pulmão ($t_{max} = 5$ minutos) após administração IN, que demonstram que o isoeugenol atingiu estes tecidos rapidamente (Tabela 12). A distribuição acelerada do isoeugenol pode ser devida ao seu baixo peso molecular e lipofilia, que permitem que este se difunda rapidamente através das membranas das células dos vasos sanguíneos e outros tecidos. Tendo em conta as diferentes doses que foram utilizadas por Hong *et al.* (2013) após administração IV (35 mg/kg) e administração oral (35, 70 e 140 mg/kg) a murganhos⁷⁴, houve necessidade de normalizar a AUC em plasma pela dose, para poder comparar com a AUC obtida com administração IN do presente estudo (100 mg/kg). O valor da AUC normalizada após administração IN ($AUC_{inf}/dose = 6,04 \mu\text{g min mL}^{-1} \text{ kg mg}^{-1}$) foi idêntica ao valor de AUC normalizada após administração IV ($AUC_{inf}/dose = 6,76 \mu\text{g min mL}^{-1} \text{ kg mg}^{-1}$)⁷⁴. Em contraste, as AUC normalizadas obtidas com administração oral ($AUC_t/dose = 1,91, 1,68, 1,45 \mu\text{g min mL}^{-1} \text{ kg mg}^{-1}$)⁷⁴, foram inferiores à AUC normalizada do presente estudo ($AUC_t/dose = 5,99 \mu\text{g min mL}^{-1} \text{ kg mg}^{-1}$). Com isto, podemos constatar que a exposição sistêmica da via de administração IN foi semelhante à exposição sistêmica da via IV, e ambas foram superiores à via de administração oral.

Por sua vez, o valor de $t_{1/2\beta}$ no plasma (Tabela 12) aponta para uma rápida eliminação do isoeugenol, possivelmente causada pela sua conversão facilitada em metabolitos de fase II, que acelera a sua excreção sob a forma de glucuronido ou sulfato, como referido na secção 1.2.1.1.

Dado que ainda não existem dados disponíveis na literatura sobre a exposição cerebral e pulmonar com administração IV e oral^{73, 74}, não é possível comparar estas vias de

administração com os resultados obtidos em cérebro e pulmão após administração IN. Contudo, apenas para a via IN, foi possível detetar diferenças de exposição entre as três matrizes biológicas analisadas, já que o cérebro apresentou um valor menor de AUC_t em relação ao plasma, e o pulmão foi a matriz que apresentou a maior exposição (Tabela 12). De facto, os valores de C_{max} e AUC_t obtidos no pulmão foram muito superiores aos de outras matrizes biológicas, bem como os rácios pulmão-plasma (Tabela 12), o que sugere que poderá ter ocorrido passagem direta do isoeugenol para os pulmões após administração IN. Apesar de os $t_{1/2\beta}$ terem sido curtos, particularmente em plasma e cérebro (18,12 e 17,65 minutos, respetivamente) o $t_{1/2\beta}$ no pulmão foi mais longo (31,27 minutos) e a K_{el} foi mais baixa, evidenciando uma remoção mais lenta deste órgão (Tabela 12). Os valores de AUC_{extrap} foram todos inferiores a 20%, o que confirma que os tempos de amostragem foram adequados para uma boa estimativa de K_{el} e AUC_t e que os valores de AUC_{inf} são fiáveis (Tabela 12).

5. Conclusões

No âmbito da presente tese foi desenvolvida e validada uma técnica de HPLC com o objetivo de quantificar o isoeugenol em matrizes biológicas de plasma, cérebro e pulmão de murganho. Foram cumpridos os requisitos necessários para a validação de métodos bioanalíticos descritos em normas internacionais, como seletividade, linearidade, exatidão e precisão. Apesar de terem sido associados dois métodos de extração (A e B) a esta técnica, o método que reuniu melhores resultados e foi selecionado para os estudos *in vivo* foi o método B. De forma geral, considera-se que a técnica permite a análise de várias amostras de forma fiável, rápida e económica, podendo ser aplicada em laboratórios que não possuam equipamentos de deteção com espectrometria de massa.

De seguida, efetuou-se o estudo farmacocinético com administração de isoeugenol a murganhos por via IN. As concentrações de isoeugenol nas três matrizes biológicas foram estimadas com recurso à técnica de HPLC previamente validada.

Observou-se uma absorção rápida do isoeugenol, bem como uma distribuição e eliminação igualmente céleres. Entre as três matrizes biológicas analisadas, o pulmão foi a matriz que apresentou maior exposição após administração IN. Por conseguinte, poderá vir a ser necessário fazer uma avaliação histológica do tecido pulmonar para verificar potenciais alterações histopatológicas, em comparação com murganhos controlo (não tratados). Adicionalmente, também poderão ser efetuados estudos *in vitro* para avaliar a viabilidade de células de epitélio nasal e pulmonar após incubação com isoeugenol.

Como não há dados sobre a exposição cerebral e pulmonar além da via de administração IN, sugere-se efetuar futuramente estudos farmacocinéticos com as vias de administração IV e oral, de forma a poder determinar a exposição do isoeugenol nestas matrizes e comparar de forma mais aprofundada, o potencial das três vias de administração.

Por último, devido às diferenças nalguns parâmetros farmacocinéticos entre murganhos macho e fêmea de estudos anteriores⁷⁴, assim como à elevada prevalência de DA no sexo feminino^{26,30, 31}, sugere-se ainda a realização de estudos farmacocinéticos com administração IN de isoeugenol em murganhos fêmea.

Referências Bibliográficas

1. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer ' s Disease : *Molecules*. 2020;25(24):5789.
2. A Doença de Alzheimer | Associação Alzheimer Portugal. Accessed February 24, 2021. <https://alzheimerportugal.org/pt/text-0-9-30-14-a-doenca-de-alzheimer>
3. Duthey B. *Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and Other Dementias.*; 2013.
4. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2011;7(3):280-292. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.003
5. Vos SJB, Xiong C, Visser PJ, et al. Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: A longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*. 2013;12(10):957-965. doi:10.1016/S1474-4422(13)70194-7
6. Alzheimer's Association. 2019 ALZHEIMER'S DISEASE FACTS AND FIGURES. *Alzheimer's Dement Vol 15, Issue 3*. Published online 2019:321-387.
7. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2021;7(1):1-21. doi:10.1038/s41572-021-00269-y
8. Riedel BC, Thompson PM, Brinton RD. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;160:134-147. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.03.012
9. Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(10):565-581. doi:10.1038/s41582-019-0244-7
10. Dafsari FS, Jessen F. Depression—an underrecognized target for prevention of dementia in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*. 2020;10(1):1-13. doi:10.1038/s41398-020-0839-1
11. Minakawa EN, Wada K, Nagai Y. Sleep disturbance as a potential modifiable risk factor for alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):1-4. doi:10.3390/ijms20040803
12. Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genet Med*. 2016;18(5):421-430. doi:10.1038/gim.2015.117
13. Li NM, Liu KF, Qiu YJ, Zhang HH, Nakanishi H, Qing H. Mutations of beta-amyloid

precursor protein alter the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis. *Neural Regen Res.* 2019;14(4):658-665. doi:10.4103/1673-5374.247469

14. Tcw J, Goate AM. Genetics of β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(6):1-11. doi:10.1101/cshperspect.a024539
15. Cai Y, An SSA, Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging.* 2015;10:1163-1172. doi:10.2147/CIA.S85808
16. De Strooper B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* 2007;8(2):141-146. doi:10.1038/sj.embor.7400897
17. Giau V Van, Bagyinszky E, An SSA, Kim SY. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015;11:1723-1737. doi:10.2147/NDT.S84266
18. Moulton PV, Yang W. Air pollution, oxidative stress, and alzheimer's disease. *J Environ Public Health.* 2012;2012(x):1-6. doi:10.1155/2012/472751
19. Abate G, Marziano M, Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. Nutrition and AGE-ing: Focusing on Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/7039816
20. Duckett S. Aluminum and Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 1976;33(10):730-731. doi:10.1001/archneur.1976.00500100064025
21. Santos CY, Snyder PJ, Wu WC, Zhang M, Echeverria A, Alber J. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimer's Dement Diagnosis, Assess Dis Monit.* 2017;7:69-87. doi:10.1016/j.dadm.2017.01.005
22. de Bruijn RFAG, Ikram MA. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Med.* 2014;12(1):1-9. doi:10.1186/s12916-014-0130-5
23. Alford S, Patel D, Perakakis N, Mantzoros CS. Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obes Rev.* 2018;19(2):269-280. doi:10.1111/obr.12629
24. Pegueroles J, Jiménez A, Vilaplana E, et al. Obesity and Alzheimer's disease, does the obesity paradox really exist? A magnetic resonance imaging study. *Oncotarget.*

- 2018;9(78):34691-34698. doi:10.18632/oncotarget.26162
25. Sochocka M, Zwolińska K, Leszek J. The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(7):996-1009. doi:10.2174/1570159x15666170313122937
 26. Dementia. Accessed September 28, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
 27. Alzheimer Europe. Dementia in Europe Yearbook. Estimating the prevalence of dementia in Europe. Published online 2019:108.
 28. Santana I, Farinha F, Freitas S, Rodrigues V, Carvalho Á. Epidemiologia da Demência e da Doença de Alzheimer em Portugal: Estimativas da Prevalência e dos Encargos Financeiros com a Medicação. *Acta Med Port*. 2015;28(2):182. doi:10.20344/amp.6025
 29. Cuijpers P. Depressive disorders in caregivers of dementia patients: A systematic review. *Aging Ment Heal*. 2005;9(4):325-330. doi:10.1080/13607860500090078
 30. Mielke MM, Vemuri P, Rocca WA. Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: Assessing sex and gender differences. *Clin Epidemiol*. 2014;6(1):37-48. doi:10.2147/CLEP.S37929
 31. Ferretti MT, Iulita MF, Cavado E, et al. Sex differences in Alzheimer disease — The gateway to precision medicine. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(8):457-469. doi:10.1038/s41582-018-0032-9
 32. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's Dement*. 2016;12(6):719-732. doi:10.1016/j.jalz.2016.02.010
 33. Suzhen D, Yale D, Feng G, Yinghe H, Zheng Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Transl Neurodegener*. 2012;1(1):18. doi:10.1186/2047-9158-1-18
 34. Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2017;57(4):1171-1183. doi:10.3233/JAD-170045
 35. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:1-18. doi:10.1016/j.npep.2015.06.008
 36. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its

management: An update. *Pharmacol Reports*. 2015;67(2):195-203. doi:10.1016/j.pharep.2014.09.004

37. Dorey E, Chang N, Liu QY, Yang Z, Zhang W. Apolipoprotein E, amyloid-beta, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 2014;30(2):317-330. doi:10.1007/s12264-013-1422-z
38. Marzolo M-P, Bu G. Lipoprotein receptors and cholesterol in APP trafficking and proteolytic processing, implications for Alzheimer's disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(2):191-200. doi:10.1016/j.semcdb.2008.10.005
39. Montagne A, Nation DA, Sagare AP, et al. *APOE4 Leads to Blood-Brain Barrier Dysfunction Predicting Cognitive Decline*. 2020;581(7806):71-76. doi:10.1038/s41586-020-2247-3.APOE4
40. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, et al. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993;43(8):1467-1472. doi:10.1212/wnl.43.8.1467
41. Castellani RJ, Plascencia-Villa G, Perry G. The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation. *Lab Investig*. 2019;99(7):958-970. doi:10.1038/s41374-019-0231-z
42. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4(1). doi:10.1038/s41392-019-0063-8
43. Jouanne M, Rault S, Voisin-Chiret AS. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur J Med Chem*. 2017;139:153-167. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.070
44. Oboudiyat C, Glazer H, Isaacson RS, Seifan A, Greer C. Alzheimer ' s Disease. *Semin Neurol*. 2013;33:313-329.
45. Mokhtar SH, Bakhuraysah MM, Cram DS, Petratos S. The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: Communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. *Int J Alzheimers Dis*. 2013;2013:1-16. doi:10.1155/2013/910502
46. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018;141(7):1917-1933. doi:10.1093/brain/awy132

47. Cai Z, Hussain MD, Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci.* 2014;124(5):307-321. doi:10.3109/00207454.2013.833510
48. Su F, Bai F, Zhang Z. Inflammatory Cytokines and Alzheimer's Disease: A Review from the Perspective of Genetic Polymorphisms. *Neurosci Bull.* 2016;32(5):469-480. doi:10.1007/S12264-016-0055-4
49. Sun Y, Yang T, Leak RK, Chen J, Zhang F. Preventive and Protective Roles of Dietary Nrf2 Activators Against Central Nervous System Diseases. *CNS Neurol Disord - Drug Targets.* 2017;16(3):326-338. doi:10.2174/1871527316666170102120211
50. Osama A, Zhang J, Yao J, Yao X, Fang J. Nrf2: a dark horse in Alzheimer's disease treatment. *Ageing Res Rev.* 2020;64:101206. doi:10.1016/j.arr.2020.101206
51. S. Fakhri, M. Pesce, A. Patrino, S. Z. Moradi, A. Iranpanah, M. H. Farzaei ES-S. Attenuation of Nrf2/Keap1/ARE in Alzheimer's Disease by Plant Secondary Metabolites: A Mechanistic Review. *Mol 2020.* 2020;25:1-45.
52. Fão L, Mota SI, Rego AC. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res Rev.* 2019;54. doi:10.1016/j.arr.2019.100942
53. Mota SI, Costa RO, Ferreira IL, et al. Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2015;1852(7):1428-1441. doi:10.1016/j.bbadis.2015.03.015
54. Kanninen K, Malm TM, Jyrkkänen HK, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. *Mol Cell Neurosci.* 2008;39(3):302-313. doi:10.1016/j.mcn.2008.07.010
55. Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, et al. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66(1):75-85. doi:10.1097/nen.0b013e31802d6da9
56. Omar RA, Chyan YJ, Andorn AC, Poeggeler B, Robakis NK, Pappolla MA. Increased expression but reduced activity of antioxidant enzymes in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 1999;1(3):139-145. doi:10.3233/JAD-1999-1301
57. Dhillon S. Aducanumab: First Approval. *Drugs.* 2021;81(12):1437-1443. doi:10.1007/s40265-021-01569-z
58. Lalli G, Schott JM, Hardy J, De Strooper B. Aducanumab: a new phase in therapeutic

- development for Alzheimer's disease? *EMBO Mol Med.* 2021;13(8):2-4. doi:10.15252/emmm.202114781
59. Alzheimer Europe dá as boas-vindas à decisão da FDA de aprovar o aducanumab - Alzheimer Europe. Accessed October 13, 2021. <https://www.alzheimer-europe.org/News/Alzheimer-Europe/Monday-07-June-2021-Alzheimer-Europe-welcomes-FDA-decision-to-approve-aducanumab>
60. Naumenko AA, Gromova DO, Trofimova N V., Preobrazhenskaya IS. Alzheimer's disease: Diagnosis and treatment. *Nevrol Neiropsikhiatriya, Psikhosomatika.* 2016;8(4):91-97. doi:10.14412/2074-2711-2016-4-91-97
61. Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimer's Dis.* 2019;67(3):779-794. doi:10.3233/JAD-180766
62. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J Cent Nerv Syst Dis.* 2020;12:117957352090739. doi:10.1177/1179573520907397
63. Y.Y. Szeto J, J.G. Lewis S. Current Treatment Options for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(4):326-338. doi:10.2174/1570159x14666151208112754
64. Syed YY. Sodium Oligomannate: First Approval. *Drugs.* 2020;80(4):441-444. doi:10.1007/s40265-020-01268-1
65. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell.* 2012;148(6):1204-1222. doi:10.1016/j.cell.2012.02.040
66. Cuadrado A, Kügler S, Lastres-Becker I. Pharmacological targeting of GSK-3 and NRF2 provides neuroprotection in a preclinical model of tauopathy. *Redox Biol.* 2018;14:522-534. doi:10.1016/j.redox.2017.10.010
67. EMA. Anexo I - Resumo das Características do Medicamento - Tecdifera. Published online 2010:1-29. http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf
68. Majkutewicz I, Kurowska E, Podlacha M, et al. Age-dependent effects of dimethyl fumarate on cognitive and neuropathological features in the streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2018;1686:19-33.

doi:10.1016/j.brainres.2018.02.016

69. Majkutewicz I, Kurowska E, Podlacha M, et al. Dimethyl fumarate attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory impairment and hippocampal neurodegeneration in rats. *Behav Brain Res.* 2016;308:24-37. doi:10.1016/j.bbr.2016.04.012
70. Litjens NHR, Burggraaf J, Van Strijen E, et al. Pharmacokinetics of oral fumarates in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2004;58(4):429-432. doi:10.1111/j.1365-2125.2004.02145.x
71. Chemical structure of isoeugenol. | Download Scientific Diagram. Accessed March 2, 2021. https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-isoeugenol_fig1_332174567
72. Isoeugenol | C10H12O2 - PubChem. Accessed April 2, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoeugenol#section=Biochemical-Reactions>
73. Badger DA, Smith RL, Bao J, Kuester RK, Sipes IG. Disposition and metabolism of isoeugenol in the male Fischer 344 rat. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(12):1757-1765. doi:10.1016/S0278-6915(02)00183-7
74. Hong SP, Fuciarelli AF, Johnson JD, et al. Toxicokinetics of Isoeugenol in F344 rats and B6C3F1 mice. *Xenobiotica.* 2013;43(11):1010-1017. doi:10.3109/00498254.2013.790576
75. NTP Technical Report. On the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Isoeugenol in F344 / N Rats and B6C3F1 Mice. 2010;(10):196.
76. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB. Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2001;15(3):159-164. doi:10.1002/jbt.13
77. Krogsgård Nielsen C, Kjems J, Mygind T, et al. Antimicrobial effect of emulsion-encapsulated isoeugenol against biofilms of food pathogens and spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2017;242:7-12. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.002
78. C. K. Nielsen, G. Subbiahdoss, G. Zeng, Z. Salmi, J. Kjems, T. Mygind, T. Snabe RLM. Antibacterial isoeugenol coating on stainless steel and polyethylene surfaces prevents biofilm growth. 2018;124(1):179-187. doi:10.1111/jam.13634
79. Choi CY, Park KR, Lee JH, et al. Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide

synthase expression is mediated by down-regulation of NF- κ B, ERK1/2, and p38 kinase. *Eur J Pharmacol.* 2007;576(1-3):151-159. doi:10.1016/j.ejphar.2007.07.034

80. Topal F. Anticholinergic and antidiabetic effects of isoeugenol from clove (*Eugenia caryophyllata*) oil. *Int J Food Prop.* 2019;22(1):583-592. doi:10.1080/10942912.2019.1597882
81. Bertrand F, Basketter DA, Roberts DW, Lepoittevin JP. Skin sensitization to eugenol and isoeugenol in mice: Possible metabolic pathways involving ortho-quinone and quinone methide intermediates. *Chem Res Toxicol.* 1997;10(3):335-343. doi:10.1021/tx960087v
82. Human & Environmental Risk Assessment: Isoeugenol. *HERA Risk Assess.* 2005;(April):1-13.
83. ICH - International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation. March (2019):1-60.
84. FDA, Food and Drug Administration - Bioanalytical Method Validation Guidance for industry. May (2018):1-44.
85. EMA - Guideline on bioanalytical method validation. July (2011):1-23.
86. Perampanel structure - Wikipedia. Accessed September 9, 2021. https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Perampanel_structure.svg
87. Cloranfenicol | C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅ - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloramphenicol#section=Vapor-Pressure>
88. Cetoprofeno | C₁₆H₁₄O₃ - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ketoprofen#section=Chemical-and-Physical-Properties>
89. Carbamazepina | C₁₅H₁₂N₂O - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbamazepine#section=LogP>
90. 10,11-Diidrocarbamazepina | C₁₅H₁₄N₂O - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19099#section=Literature>
91. Quinidina | C₂₀H₂₄N₂O₂ - PubChem. Accessed October 9, 2021.

- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quinidine#section=LogP>
92. Perampanel | C₂₃H₁₅N₃O - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perampanel#section=Chemical-and-Physical-Properties>
 93. Trazodone | C₁₉H₂₂ClN₅O - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trazodone#section=LogP>
 94. Opicapone | C₁₅H₁₀Cl₂N₄O₆ - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Opicapone#section=Chemical-and-Physical-Properties>
 95. Verapamil | C₂₇H₃₈N₂O₄ - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Verapamil#section=Computed-Properties>
 96. Sertralina | C₁₇H₁₇Cl₂N - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sertraline#section=Chemical-and-Physical-Properties>
 97. Atorvastatina | C₃₃H₃₅FN₂O₅ - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atorvastatin#section=Chemical-and-Physical-Properties>
 98. Amitriptilina | C₂₀H₂₃N - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amitriptyline#section=Depositor-Supplied-Synonyms>
 99. Loperamida | C₂₉H₃₃ClN₂O₂ - PubChem. Accessed October 9, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Loperamide#section=Computed-Properties>
 100. Avonto C, Wang M, Chittiboyina AG, Vukmanovic S, Khan IA. Chemical stability and in chemico reactivity of 24 fragrance ingredients of concern for skin sensitization risk assessment. *Toxicol Vitr.* 2018;46:237-245. doi:10.1016/j.tiv.2017.09.007
 101. Ali A, Chong CH, Mah SH, Abdullah LC, Choong TSY, Chua BL. Impact of storage conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried piper betle extracts. *Molecules.* 2018;23(2):1-12. doi:10.3390/molecules23020484
 102. Wang CJ, Pao LH, Hsiong CH, Wu CY, Whang-Peng JJK, Hu OYP. Novel inhibition of

- cis/trans retinoic acid interconversion in biological fluids - An accurate method for determination of trans and 13-cis retinoic acid in biological fluids. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2003;796(2):283-291. doi:10.1016/S1570-0232(03)00572-5
103. Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2002;774(2):215-222. doi:10.1016/S1570-0232(02)00244-1
104. Soo Lim D, Min Choi S, Kim KB, et al. Determination of fragrance allergens and their dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) in 107 spray perfumes. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues.* 2018;81(22):1173-1185. doi:10.1080/15287394.2018.1543232
105. Villa C, Gambaro R, Mariani E, Dorato S. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;44(3 SPEC. ISS.):755-762. doi:10.1016/j.jpba.2007.03.020
106. Melles D, Vielhaber T, Baumann A, Zazzeroni R, Karst U. In chemico evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2013;913-914:106-112. doi:10.1016/j.jchromb.2012.12.004
107. Rastogi SC, Johansen JD. Significant exposures to isoeugenol derivatives in perfumes. *Contact Dermatitis.* 2008;58(5):278-281. doi:10.1111/j.1600-0536.2007.01283.x
108. Wisneski HH, Yates RL, Wenninger JA. Liquid chromatographic separation and fluorometric determination of cis- and trans-isoeugenol in perfumes, colognes, and toilet waters. *J Assoc Off Anal Chem.* 1988;71(4):818-820. doi:10.1093/jaoac/71.4.818
109. Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, Falcão A. Direct nose-to-brain delivery of lamotrigine following intranasal administration to mice. *Int J Pharm.* 2015;490(1-2):39-46. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.05.021
110. Hanson LR, Fine JM, Svitak AL, Faltese KA. Intranasal administration of CNS therapeutics to awake mice. *J Vis Exp.* 2013;(74):1-7. doi:10.3791/4440
111. Fortuna A, Alves G, Serralheiro A, Sousa J, Falcão A. Intranasal delivery of systemic-acting drugs: small-molecules and biomacromolecules. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;88(1):8-27. doi:10.1016/j.ejpb.2014.03.004

