



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Daniela Sofia Barros Monteiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Monitorização de Ascorbato e Glutamato no Cérebro com sensores eletroquímicos: aplicação no estudo da Doença de Huntington” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Isabel Fresco Folhas, do Dr. João Braga e Professor Doutor Nuno Ricardo Ferreira apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Fevereiro de 2019

Daniela Sofia Barros Monteiro


Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Monitorização de Ascorbato e Glutamato no Cérebro com sensores eletroquímicos: aplicação no estudo da Doença de Huntington” referentes a unidade curricular “Estágio Curricular”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Isabel Fresco Folhas, Dr. João Braga e Professor Doutor Nuno Ricardo Ferreira apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Fevereiro 2019

Eu, Daniela Sofia Barros Monteiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013131096, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Monitorização de Ascorbato e Glutamato no Cérebro com sensores eletroquímicos: aplicação no estudo da Doença de Huntington” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 5 de Fevereiro de 2019.


(Daniela Sofia Barros Monteiro)

Agradecimentos

Aos meus pais

Aos meus avós

À minha avó Celeste

À minha madrinha, ao Davide e à João

À Teresa e ao Henrique

À minha bisavó

À minha restante família

À minha afilhada Leonor

À Susana

Ao Francisco

Ao Rafael, à Cláudia, à Rita, ao Fábio, à Carolina e à Inês

Às minhas Joanas

À Margarida, à Beatriz e à Catarina

A todos os amigos que conheci em Coimbra e levo comigo p'ra vida

Ao Professor Dr. Nuno Ricardo Ferreira

À Dra. Isabel Folhas e ao Dr. João Braga

A todos vós, que me ajudaram a atingir os meus objetivos e sonhos, não tenho como vos agradecer por todo o apoio que me deram nesta fase memorável da minha vida.

A todos vós, muito obrigada.

“Happiness can be found even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”

- J. K. Rowling, Harry Potter and the prisoner of Azkaban

Abreviaturas

- AFR – *Ascorbate free radical* (radical livre de ascorbato)
- AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
- BPF – Boas Práticas Farmacêuticas
- BSA – Albumina bovina sérica (*Bovine serum albumin*)
- CAG – Citosina-Adenina-Guanina
- CFM – *Carbon Fiber Microelectrodes*
- CFS – Líquido cefalorraquidiano
- CNT – *Carbon NanoTubes*
- COE – Contraceção Oral de Emergência
- DA – Dopamina
- DCI – Denominação Comum Internacional
- DH – Doença de Huntington
- DHA – Ácido desidroascórbico
- DOPAC – Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
- EAATs – *Excitatory amino acid transporters*
- FCV – Voltametria Cíclica Rápida (*Fast Cyclic Voltammetry*)
- GLTI – Transportador do Glutamato I
- Glu – Glutamato
- GluOx – *Glutamate Oxidase*
- GluR – *Glutamate receptor*
- GMP – Good Manufacturing Practice
- GSH – Glutatião
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio
- HD – *Huntington Disease*
- HPLC-ECD – *High-Pressure Liquid Chromatography - Electrochemical detection*
- IT15 – *Interest Transcript 15*
- LC-MS-MS – *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*
- LEF – Laboratórios de Estudos Farmacêuticos
- MEA – *Microelectrode Arrays*
- MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
- MNSRM – Medicamentos Não Sujeito a Receita Médica
- mPD – 1,3 – fenilenodiamina (*m-Phenylenediamine*)
- mRNA – RNA mensageiro

MSNs – Neurónios espinhosos médios

NA – Noradrenalina

NMDA – N-metil D-Aspartato

PATs – *Palmytoil-acyl transferase*

Pt – Platina

RCM – Resumo das características do medicamento

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

RQP – Revisão de Qualidade do Produto

SVCT2 – Transportador da vitamina C dependente de sódio – 2

SWCNT – *Single-Wall Carbon NanoTubes*

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities e Threats* (Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças)

SWV – Voltametria de Onda Quadrada (*square wave voltammetry*)

VSOAC – Canais aniónicos orgânicos sensíveis ao volume

X• – Radicais livres oxidantes

Índice

Parte I - Relatório De Estágio Em Farmácia Comunitária

Resumo	5
Abstract	5
Introdução	6
Análise SWOT	7
1. Pontos Fortes (Strenghts)	7
1.1. Plano de Estágio.....	7
1.2. A equipa	8
1.3. Serviços Farmacêuticos.....	8
1.4. Preparação de Medicamentos Manipulados	9
1.5. Tarefas bem definidas para cada membro da equipa	9
1.6. VALORMED – Recolha de medicamentos.....	10
2. Pontos Fracos (Weaknesses)	10
2.1. Lacunas na formação em certas áreas científicas	10
2.2. Nervosismo e receio no atendimento ao público	11
2.3. Receitas Manuais	11
3. Oportunidades (Opportunities)	12
3.1. Formação	12
3.2. Oportunidade de trabalhar em diferentes horários.....	13
4. Ameaças (Threats)	13
4.1. Parafarmácias.....	13
4.2. Acesso a informação errada	13
Caso Clínico 1	14
Caso Clínico 2	14
Caso Clínico 3	15
Conclusão	16
Bibliografia	17

Parte II - Relatório De Estágio Em Indústria Farmacêutica

Resumo	19
Abstract	19

Introdução.....	20
FARMALABOR.....	21
MEDINFAR.....	21
Análise SWOT	22
1. Pontos Fortes	22
1.1. Integração no departamento e na empresa	22
1.2. Plano de estágio.....	22
1.3. Conhecimento e experiência adquiridos	23
1.4. Multidisciplinaridade da equipa.....	23
2. Pontos Fracos (Weaknesses)	23
2.1. Tempo reduzido de estágio	23
2.2. Trabalho rotineiro	24
3. Oportunidades	24
3.1. Constante otimização de procedimentos.....	24
3.2. Farmacêutico como profissional de saúde multifacetado	24
4. Ameaças	25
4.1. Equipa multidisciplinar	25
Conclusão	25
Bbliografia	26
<u>Parte III - Monitorização De Ascorbato E Glutamato No Cérebro Com Sensores Eletroquímicos: Aplicação No Estudo Da Doença De Huntington</u>	
Resumo.....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	30
1. Ascorbato	31
1.1. Propriedades físico-químicas e biológicas	32
1.2. Funções e distribuição de ascorbato no cérebro.....	32
1.2.1. Transporte do ascorbato para o cérebro	33
2. Propriedades do glutamato e sua função no cérebro	35
3. Relação do glutamato com o ascorbato	36
3.1. Heteroexchange	36
3.2. Outros mecanismos.....	37

4. Introdução à doença de Huntington	39
4.1. Sintomatologia associada à DH	39
4.1.1. Neuropatologia.....	40
4.2. Mecanismos de Neurodegeneração	40
4.2.1. Excitotoxicidade.....	40
5. Monitorização de ascorbato e glutamato no cérebro	42
5.1 Sensores eletroquímicos.....	42
5.1.1. Amperometria	43
5.1.2. Voltametria de onda quadrada (SWV).....	44
5.2. Medição/Monitorização do ascorbato em tempo real <i>in vivo</i>	44
5.3 Medição/Monitorização do glutamato em tempo real <i>in vivo</i>	49
5.4 Monitorização simultânea de ascorbato e glutamato <i>in vivo</i> em tempo real.....	51
Conclusão	53
Bibliografia	54

Parte I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Orientado por Dra. Isabel Fresco Folhas

Resumo

O estágio curricular é a etapa final da formação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Após adquirirmos a formação teórica e prática, fundamental para a realização das funções inerentes à profissão farmacêutica, temos a oportunidade de pôr estes ensinamentos em prática, contactando com a realidade do mercado de trabalho.

A farmácia comunitária é uma das vertentes em que o farmacêutico tem um papel mais relevante, sendo o único estágio curricular obrigatório.

Neste contexto, ingressei na Farmácia Isabel Folhas, onde aprendi o que é de facto ser farmacêutico comunitário e a importância desta profissão para a saúde pública.

Este relatório consiste numa análise *SWOT* da realização do meu estágio curricular em farmácia comunitária.

Palavras-chave: Relatório de estágio; Farmácia Comunitária; Farmácia Isabel Folhas.

Abstract

The curricular internship is the final step of the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences. After acquiring the theoretical and practical training, crucial for the accomplishment of the inherent roles of a pharmacist, we have the opportunity to put these knowledge in practice, by getting in contact with the reality of labor market.

The community pharmacy is one of the areas where the pharmacist takes a more relevant role, and is the only mandatory curricular internship.

In this context, I joined Farmácia Isabel Folhas, where I learned what a community pharmacy is and its importance in public health.

This report consists of a SWOT analysis of my curricular internship in community pharmacy.

Keywords: Internship report; Community pharmacy; Farmácia Isabel Folhas.

Introdução

A formação teórica e prática do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas é multidisciplinar e tem como objetivo a formação de profissionais competentes em todas as áreas ligadas ao medicamento e à saúde pública.

O estágio em farmácia comunitário permite-nos aplicar e consolidar todos os conhecimentos anteriormente adquiridos e mostra-nos que a formação de um farmacêutico não acaba com o término do curso, pois as inovações nas áreas da saúde e bem-estar são constantes.

Este estágio é uma preciosa aproximação à realidade do exercício laboral e permite-nos compreender a importância da intervenção farmacêutica na comunidade, através do contacto direto com o público e com suas necessidades.

O meu estágio em farmácia comunitária foi realizado na Farmácia Isabel Folhas, em Coimbra, tendo sido orientada pelo Dra. Isabel Fresco Folhas.

Esta farmácia foi fundada no bairro do Solum em 1969, com o nome Farmácia Solum.¹ Atualmente o seu espaço é quatro vezes maior do que o das instalações iniciais e possui dupla certificação NP EN ISO 9001 e BPF (Boas Práticas de Farmácia).¹

Este relatório é relativo ao estágio efetuado na farmácia comunitária, com a duração aproximada de quatro meses, e é apresentado sob a forma de análise *SWOT*, o que permite identificar e analisar os pontos fortes e fracos, as oportunidades e ameaças que pude observar ao longo do estágio.

Análise SWOT

I. Pontos Fortes (Strengths)

I.1. Plano de Estágio

Na sua atividade profissional diária, o farmacêutico comunitário tem diversas funções, com as quais o estagiário não está familiarizado. Na minha opinião, o plano de estágio é essencial para o sucesso neste estágio. Este deve contemplar uma sequência lógica de etapas, que durem o tempo necessário para que o estagiário as perceba e as realize corretamente.

Assim, iniciei o meu estágio na receção de encomendas e reservas. Esta fase foi fundamental, não só para aprender a maneira correta de rececionar e acondicionar os produtos, como também para começar a associar a Denominação Comum Internacional (DCI) dos princípios ativos ao seu medicamento de marca. Ao realizar esta tarefa tive também a oportunidade de aprender a trabalhar com o SIFARMA 2000[®] associado ao robot modular CUBE+, o que facilitou bastante este trabalho.

Aos poucos, fui começando a realizar outras tarefas como a arrumação e reposição de produtos, prazos de validade, gestão das reservas, devolução dos medicamentos não conformes e regularização das devoluções. Durante a arrumação e reposição de produtos pude aprender a organização e a disposição dos mesmos na farmácia. Todas estas tarefas são essenciais para a formação do estagiário, pois para além de facilitar e agilizar o atendimento e a dispensa, também o elucidada da importância do *backoffice* no funcionamento e gestão da farmácia.

Durante o tempo livre destas tarefas e numa fase posterior do meu estágio, observei os atendimentos ao público por parte dos farmacêuticos, o que me introduziu ao *front-office*, no qual aprendi como conduzir um atendimento, a postura a manter e o procedimento de dispensa no sistema SIFARMA 2000[®]. Esta fase foi uma oportunidade de compreender como o aconselhamento farmacêutico é essencial para a saúde das populações e de aprender o que aconselhar e como o devo fazer em diversas situações.

Após todas estas etapas procedi à preparação de manipulados, determinação de parâmetros bioquímicos e antropométricos e atendimento ao utente. Até adquirir autonomia nestas tarefas, fui sempre orientada e supervisionada, para garantir a excelência associada aos serviços desta farmácia. O atendimento ao público foi a fase que mais me desafiou, visto que a responsabilidade inerente a esta função é elevada e a inexperiência fez com que sentisse bastante pressão. Esta etapa pôs à prova todos os conhecimentos que

adquiri anteriormente, tanto no curso como no decorrer do estágio, e também evoluiu tanto o meu aconselhamento técnico-científico como o meu à vontade no contacto com o público.

1.2. A equipa

A equipa da Farmácia Isabel Folhas destaca-se pela simpatia e prestabilidade, mas principalmente pela extrema competência e profissionalismo.

No decorrer do meu estágio, sempre que tive questões e dificuldades senti um grande apoio e compreensão por parte de todos.

Tanto a Dra. Isabel Folhas, como a restante equipa, esclareceram-me as dúvidas que foram surgindo, ensinaram-me a maneira correta de executar as funções inerentes ao farmacêutico, explicaram-me os erros que cometi e como deveria proceder no futuro e auxiliaram-me em todos os atendimentos, em que a minha inexperiência, não me permitia prestar o serviço de excelência a que os utentes desta farmácia estão habituados.

Estes aspetos foram fulcrais no sucesso do meu estágio, pois estimularam a minha vontade de aprender e de fazer mais e melhor.

1.3. Serviços Farmacêuticos

Os serviços farmacêuticos passíveis de serem realizados na farmácia comunitária estão definidos por lei, na Portaria n.º 1429/2007 de 2 de novembro, como serviços de promoção da saúde e de bem-estar.¹ Estes abrangem: apoio domiciliário, administração de medicamentos, utilização de meios auxiliares de diagnóstico e terapêutica, administração de vacinas não-incluídas no plano nacional de vacinação, campanhas de informação, entre outros.²

A Farmácia Isabel Folhas disponibiliza variadíssimos serviços farmacêuticos à comunidade. Durante o meu período de estágio tive a oportunidade de realizar medição de parâmetros bioquímicos e fisiológicos tais como a pressão arterial, a glicémia e o colesterol total. Estes dois últimos realizam-se através de métodos espectrofotométricos com reações enzimáticas.

Estes serviços permitem um contacto mais próximo com o utente, o que facilita o seu acompanhamento farmacoterapêutico, uma avaliação da adesão à terapêutica e promove a confiança e fidelização deste.

1.4. Preparação de Medicamentos Manipulados

A preparação de medicamentos manipulados define-se por: preparação de medicamentos em pequena escala na farmácia, segundo as Boas Práticas Farmacêuticas (BPF) e as Boas Práticas de Preparação de Medicamentos Manipulados.³

Os medicamentos manipulados são classificados como Preparados Oficiais, medicamento preparado seguindo indicações da Farmacopeia ou compendiais, ou Fórmulas Magistrais, sendo preparados segundo uma receita médica que especifica o medicamento para um doente específico.⁴

Foi-me dada a oportunidade de preparar vaselina com enxofre a 6%, segundo as indicações solicitadas ao laboratório de estudos farmacêuticos (LEF). Este medicamento manipulado de aplicação tópica é utilizado no tratamento da escabiose. Todos os processos realizados foram supervisionados pela farmacêutica responsável e, posteriormente, verificados pela Diretora Técnica, a Dra. Isabel Folhas.

Observei ainda o registo dos movimentos das matérias-primas utilizadas, a rotulagem, a fórmula do cálculo do preço⁴, o acondicionamento e a dispensa do medicamento manipulado, onde foi fornecida toda a informação relevante ao utente, como a posologia/modo de utilização, o prazo de validade e as condições de conservação.

1.5. Tarefas bem definidas para cada membro da equipa

Na farmácia Isabel Folhas, as tarefas, nomeadamente receção de encomendas, formações, medicamentos manipulados, receituário e gestão de stocks, encontram-se divididas entre os vários colaboradores. Assim, existe um documento que define o responsável anual pelo controlo e supervisão daquela tarefa e também o responsável do mês por realizar a mesma. Isto permite rotatividade na execução das tarefas, o que torna o trabalho menos monótono e confere versatilidade a todos os elementos da equipa.

Durante o meu estágio foi muito importante saber quem estava responsável pelas tarefas que eu estava a realizar, pois quando surgia alguma dúvida ou precisava que verificassem o meu trabalho, ia ter, diretamente, com a responsável mensal da mesma.

As tarefas associadas à gestão das marcas de dermocosmética, estão também divididas por cada colaborador. Neste caso, cada funcionário está responsável pela gestão de stock, prazos de validade, organização da visita da promotora e ações de formação das marcas de dermocosmética que lhe foram atribuídas. O responsável de cada marca tem um conhecimento mais completo e específico acerca dos produtos da mesma, o que permite que qualquer dúvida acerca destes seja sanada rapidamente.

Assim, no decorrer do meu estágio, cada colaborador apresentou-me os produtos das marcas pelas quais estava responsável, logo pude compreender de uma forma mais plena e completa os produtos e em que situação poderia aconselhá-los.

1.6. VALORMED – Recolha de medicamentos

A VALORMED é uma sociedade sem fins lucrativos que tem a responsabilidade de gerir os resíduos de embalagens vazias e medicamentos fora de uso.⁵ Foi criada em 1999, com a finalidade de implementar um sistema autónomo para a recolha e tratamento dos resíduos medicamentosos, conduzindo-os a um processo de recolha e tratamento seguros.⁵ O tratamento destes resíduos de forma segura apresenta benefícios tanto a nível ambiental, como a nível da prevenção de possíveis problemas de saúde pública.⁵

Como agente de saúde pública, o foco principal do farmacêutico é o bem-estar do utente, da sociedade em geral e, conseqüentemente, do ambiente. Assim, é de extrema importância a participação das farmácias na recolha dos medicamentos fora de validade ou sem uso.

A farmácia Isabel Folhas está integrada neste projeto, o que me permitiu consciencializar os utentes para a entrega da sua medicação fora do prazo. Observei, também, que a adesão por parte dos utentes era elevada, devido ao excelente trabalho de todos os colaboradores na divulgação deste projeto.

2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

2.1. Lacunas na formação em certas áreas científicas

Dermocosmética, medicamentos de uso veterinário, puericultura, suplementos alimentares e produtos ortopédicos foram as áreas em que eu tive mais dificuldade de realizar um aconselhamento à altura das necessidades do utente, visto que existem lacunas na minha formação acerca destas áreas.

Na minha opinião, a disciplina Dermofarmácia e Cosmética não nos prepara, de forma plena, para o aconselhamento consciente e adequado deste tipo de produtos, que têm uma elevada procura. A falta de casos práticos fez com que o meu conhecimento acerca do aconselhamento destes produtos fosse mais superficial do que era esperado, e, conseqüentemente, houve necessidade de mais formação nesta área antes de proceder ao atendimento ao público.

O conhecimento adquirido em Preparações de Uso Veterinário acerca deste tipo de medicamentos não foi o suficiente, mesmo quando se tratava de patologias comuns, o que dificultou o aconselhamento deste tipo de medicamentos em diversas situações.

A puericultura, os suplementos alimentares e os produtos ortopédicos não fazem parte do extenso plano curricular de MICEF, o que é compreensível, porém sendo produtos vendidos na farmácia, senti a necessidade de aprofundar o meu conhecimento nestas áreas.

2.2. Nervosismo e receio no atendimento ao público

No início da fase de *front-office*, a inexperiência de atender ao público fez com que eu sentisse nervosismo, pois as inúmeras especificidades desta função, como protocolos, planos de participação especiais, entre outros, fazem com que o estagiário seja facilmente induzido em erro.

O receio e o cuidado acrescido no momento do aconselhamento e dispensa de medicamentos, provocou-me inúmeras dúvidas que precisavam de ser esclarecidas antes do fim da dispensa, pelo que o atendimento se tornou demorado e cansativo levando à impaciência do utente.

Com a ajuda de toda a equipa presente na Farmácia Isabel Folhas, este nervosismo e receio rapidamente se desvaneceu e passou a confiança em mim própria, o que me ajudou a desempenhar a minha função com o profissionalismo que aquela farmácia e equipa merecem.

2.3. Receitas Manuais

Apesar da maioria das prescrições atuais se realizar eletronicamente, existe ainda uma grande utilização das receitas manuais.

Atualmente as receitas manuais só podem ser prescritas em: (a) caso de falência do sistema informático; (b) inadaptação do prescriptor; (c) prescrição ao domicílio; (d) utilização de um número inferior a 40 receitas médicas por mês.⁶

Estas possuem regras de prescrição específicas tais como: (a) a presença obrigatória da vinheta do médico e, caso seja instituição, do local de prescrição; (b) a assinatura do prescriptor; (c) a data de prescrição; (d) a justificação da utilização da receita manual; (e) dados do utente.⁶

Na minha opinião, enquanto estagiária senti um grande nervosismo ao aviar receitas manuais, pois antes de proceder à dispensa tive de verificar todas as especificações referidas anteriormente, o que requer muita atenção e responsabilidade. Para além disso, a dificuldade na leitura da caligrafia do prescriptor e grande variedade de protocolos, despachos e regimes

de participação especiais, com os quais não estava familiarizada, tornaram o processo de atendimento moroso.

A elevada probabilidade de erro associada à minha inexperiência, fez com que, até me sentir mais confiante na realização desta tarefa, a atenção fosse, maioritariamente, dirigida à receita, prejudicando o atendimento e aconselhamento.

3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.1. Formação

O farmacêutico, como profissional de saúde, tem de estar atualizado acerca das inovações e mudanças que se interrelacionem com as suas funções. Assim, se a formação do farmacêutico tem de ser constante, a do estagiário, pela sua inexperiência, tem de ser intensiva.

No meu estágio tive a oportunidade de ter vários tipos de formação, tanto dentro como fora da farmácia.

Na farmácia, a Dra. Isabel Folhas testou os meus conhecimentos, questionando-me acerca de possíveis casos clínicos, com os quais eu me poderia deparar aquando do atendimento ao público, o que me preparou para fazer um ágil e correto aconselhamento farmacêutico.

Além disso, a Farmácia Isabel Folhas é constantemente visitada por delegados de informação médica que realizam ações de formação na farmácia, normalmente acerca de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e produtos de dermocosmética. Estas formações pretendem dar a conhecer produtos novos e/ou relembrar os restantes e, portanto, envolvem a apresentação das características dos produtos, a sua função, posologia e ainda possíveis aconselhamentos sobre a sua utilização. Estas formações são dadas a grupos pequenos de 2 ou 3 pessoas de cada vez, pois realizam-se durante o horário de expediente, o que se torna vantajoso, na medida em que é mais fácil colocar questões acerca do produto.

Fora da farmácia, participei em duas formações, a primeira acerca dos produtos de saúde oral da marca Elgydium® e a segunda acerca dos suplementos alimentares da marca Bioativo®. Estas ajudaram-me bastante a melhorar o meu aconselhamento e conhecimento acerca destes tipos de produtos.

3.2. Oportunidade de trabalhar em diferentes horários

Como importante agente de saúde pública, o farmacêutico tem de estar sempre presente para servir as populações.

A Dra. Isabel Folhas deu-me a oportunidade de contactar com a realidade de estagiar aos sábados de manhã e nas noites de serviço (até às 23h), o que foi fulcral para eu ter plena consciência do que é ser farmacêutico comunitário.

Os sábados de manhã foram marcados pela grande afluência de utentes, o que testou o meu poder de prestar um atendimento de excelência e sem erros, num menor espaço de tempo.

Durante as noites de serviço os utentes que se dirigiam à farmácia não eram os utentes habituais, mas sim os que procuravam a farmácia de serviço. Isto permitiu-me contactar com utentes que habitualmente não iriam a esta farmácia, dando-me a oportunidade de experienciar uma realidade diferente do dia-a-dia.

4. Ameaças (*Threats*)

4.1. Parafarmácias

Com a liberalização do comércio de certos produtos, que anteriormente estavam apenas disponíveis na farmácia comunitária, os utentes começaram a procurar a farmácia unicamente para procurar aconselhamento. Posteriormente estes adquirem o produto aconselhado noutros locais, como as parafarmácias, pois aí presumem que os preços são mais baixos.

Este cenário é bastante frustrante, visto que, o farmacêutico perde tempo a atender o utente o melhor possível e depois este não lhe dá o devido valor.

4.2. Acesso a informação errada

Atualmente, a população encontra-se cada vez mais informada, o que demonstra uma maior preocupação com a própria saúde, porém a informação que encontram na internet muitas vezes não é fidedigna.

O farmacêutico surge como profissional de saúde com a responsabilidade de selecionar e dispensar o produto mais indicado para o problema em questão, aconselhando o utente acerca de medidas farmacológicas e não-farmacológicas que possam ser benéficas, esclarecendo todas as possíveis questões e desmistificando as informações erradas a que o utente teve acesso.

Caso Clínico 1

Utente A do sexo feminino, com cerca de 35 anos, comparece na farmácia e pede contraceção oral de emergência (COE), alegando ter tido relações sexuais desprotegidas na noite anterior, com o parceiro habitual.

Após ser questionada acerca do uso de qualquer método contraceutivo, esta refere que toma a pilula Minigeste® (20 µg de etinilestradiol e 0,75 mg de gestodeno), mas afirma ter-se esquecido da toma desta durante dois dias consecutivos. Após um pequeno questionário, averigui que a utente estava na 3.^a semana da toma da pilula e que não era a primeira vez que teria ocorrido este esquecimento, porém nunca tinha passado mais de 12 horas da hora habitual da toma.

Segundo o resumo das características do medicamento (RCM) da pilula, se durante a 3.^a semana houver esquecimento da toma, e este for superior a 12 horas “o risco de redução da eficácia contracetiva é iminente devido à proximidade com o intervalo dos 7 dias em que não há toma de comprimido.”⁷

Tendo em contas as indicações do RCM e da Norma específica sobre a intervenção farmacêutica na Contraceção de Emergência⁸ e visto que a relação sexual tinha ocorrido a menos de 72 horas, recomendei a toma da Postinor® (toma única de 1,5 mg de levonorgestrel), um contraceutivo oral de emergência (COE).⁹

Esta utente referiu que nunca tinha tomado qualquer COE, assim procedi à explicação da posologia e adverti que se nas 4 horas seguintes ocorresse fenómenos de diarreia ou vómitos deveria ser repetida a toma.

Aconselhei o início ou o retomar imediato do método de contraceção, guiando-me pelas indicações da Norma específica sobre a intervenção farmacêutica na Contraceção de Emergência⁸, aconselhando ainda proteção adicional com preservativo, durante 7 dias após o uso do levonorgestrel.

Antes de finalizar o atendimento, adverti que o COE deve ser utilizado apenas em caso de emergência e não como método contraceutivo e aconselhei a utente a informar-se de métodos contraceuticos alternativos à pilula, na próxima consulta de ginecologia.

Caso Clínico 2

Utente B do sexo masculino, com cerca de 55 anos, chega a farmácia apresentando hematomas e inchaço na face e cortes superficiais na zona do nariz. Este afirma que caiu e que necessita de um produto que ajude a recuperação da face e a cicatrização dos cortes sem deixar marcas.

Assim, aconselhei a aplicação do gel de arnica da Urgo® na zona da face, 2 a 3 vezes ao dia, para aliviar o mal-estar resultante dos hematomas e da contusão, pois proporciona uma sensação refrescante imediata.¹⁰

De modo a tratar os cortes na face, aconselhei o creme Bepanthen® Plus visto que contém um anti-sético, a cloro-hexidina e um regenerador da pele, o dexpanthenol (ou provitamina B5).¹¹ A cloro-hexidina desinfeta sem arder e minimiza o risco por contaminação bacteriana, por sua vez o dexpanthenol regenera a pele e acelera a sua cicatrização.¹¹ Para além disso possui um efeito refrescante e calmante e, por ser incolor, permite o acompanhamento da evolução da cicatrização.¹¹ Expliquei ao utente que tinha de limpar bem os cortes antes de aplicar o creme Bepanthen® Plus e recomendei a aplicação deste creme várias vezes ao dia até à cicatrização total dos cortes.¹¹

Por fim, aconselhei a aplicação de gelo, durante 15 a 20 minutos a cada 2 horas, evitando o contato direto deste com a pele, na área da face afetada para diminuir o inchaço e o rubor.

Caso Clínico 3

Utente C do sexo feminino, com cerca de 25 anos, chega a farmácia queixando-se da reincidência do pé de atleta interdigital. Quando questionada acerca da última vez que teve pé de atleta, a utente respondeu que tinha sido há cerca de dois anos, visto que praticava natação regularmente na altura e voltou a praticar recentemente. Refere ainda que se esqueceu dos chinelos da última vez que praticou natação e que deve ter sido nessa ocasião que teve contato direto com o fungo.

Assim aconselhei Canesten® creme, que contém clotrimazol, pois este é um antifúngico utilizado no tratamento de infeções fúngicas na pele causadas por dermatófitos. Informei a utente que o creme deve ser aplicado duas a três vezes por dia, durante 3 a 4 semanas, em camada fina na zona a tratar, previamente lavada e seca.¹²

De seguida, como adjuvante no tratamento do Canesten® creme, aconselhei à utente a aplicação de Canesten® Pó Cutâneo nos dedos dos pés, duas a três vezes por dia durante 3 a 4 semanas, polvilhando também as meias e os sapatos usados, de forma a absorver a humidade e prevenir a reinfeção.¹³ Ressaltei também a importância de polvilhar todos os sapatos com o pó e de alternar o calçado.

Por fim, para a higiene dos pés, aconselhei à utente o uso de Cyteal®, devido a este ser uma solução de lavagem antisséptica. Esta pode ser utilizada como sabão líquido seguida de uma abundante lavagem com água.¹⁴

Relembrei ainda a importância da adesão a terapêutica e do uso de chinelos nos balneários e, até durante o banho para não contagiar as restantes pessoas.

Conclusão

O estágio curricular em farmácia comunitária permite aos estudantes, o contato direto com o mercado de trabalho numa das áreas em que o farmacêutico tem maior relevância.

Durante quatro meses aprofundei a minha formação na Farmácia Isabel Folhas, o que me tornou consciente dos desafios que vou enfrentar como futura profissional de saúde. Esta experiência enriquecedora permitiu-me compreender o nosso papel perante a população e as necessidades desta, assim como entendi melhor a gestão e funcionamento de uma farmácia.

Esta fase da minha vida termina com um sentimento de confiança e alegria por ter tido a oportunidade de estagiar na Farmácia Isabel Folhas, percebi que a formação prática que adquiri consolidou os meus conhecimentos e irá permitir-me entrar no mercado trabalho pronta para ser farmacêutica, especialista do medicamento e agente de saúde pública.

Por fim, gostaria de agradecer mais uma vez à Farmácia Isabel Folhas e a toda a sua equipa por fazerem com que o meu estágio tenha sido pautado por uma constante aprendizagem e evolução.

Bibliografia

1. **FARMÁCIA ISABEL FOLHAS - Quem Somos.** [Consultado a 20 de dezembro de 2018]. Disponível em: <https://www.farmaciaisabelfolhas.pt/index.php/sobre-nos/>
2. **Portaria n.º 1429/2007, de 2 de novembro** [Consultado a 31 de agosto de 2018]
3. **Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF)**, 3ª Edição, 2009 [Consultado a 31 de agosto de 2018] Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/boas_praticas_farmaceuticas_para_a_farmacia_comunitaria_2009_20853220715ab14785a01e8.pdf
4. **Medicamentos Manipulados** [Consultado a 31 de agosto de 2018] Disponível em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/inspecao/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>
5. **VALORMED - Quem Somos. 2006.** [Consultado a 20 de dezembro de 2018]. Disponível em: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
6. **Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde.** *Infarmed.* [Consultado a 20 de dezembro de 2018] Disponível em: <http://www2.acss.minsaude.pt/Portals/0/NormasTecnicasPrescricaoV2.pdf>
7. **RCM da Minigeste®** [Consultado a 30 de agosto de 2018] Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=5612&tipo_doc=rcm
8. **Norma específica sobre a intervenção farmacêutica na Contraceção de Emergência.** *Ordem dos Farmacêuticos.* [Consultado a 4 de setembro de 2018] Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_especifica_sobre_a_intervencao_farmaceutica_na_contracecao_de_emergencia_7929677925ab147ce85c39.pdf
9. **RCM da Postinor®** [Consultado a 30 de agosto de 2018] Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=39678&tipo_doc=rcm
10. **URGO ARNICA GEL®** [Consultado a 20 de dezembro de 2018] Disponível em: <http://www.urgo.com/urgo-arnica-gel/>
11. **Bepanthere® Plus Creme** [Consultado a 20 de dezembro de 2018] Disponível em: <http://www.bepanthere.pt/pt/gama-bepanthere/feridas/bepanthere-plus-creme/>
12. **Folheto Informativo do Canesten® creme** [Consultado a 1 de fevereiro de 2019] Disponível em: www.bayer.pt/static/documents/pdf/bhc-cc/Canesten_creme_FI_05-2010.pdf
13. **Folheto Informativo do Canesten® Pó** [Consultado a 1 de fevereiro de 2019] Disponível em: www.antifungicos.bayer.pt/static/documents/Canesten%20P%C3%B3_FI.pdf
14. **Folheto Informativo do Cyteal®** [Consultado a 1 de fevereiro de 2019] Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2286&tipo_doc=fi

Parte II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Orientado por Dr. João Braga

Resumo

O segundo semestre do quinto ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas contempla a unidade de “Estágio Curricular”, na qual o único estágio obrigatório é o de Farmácia Comunitária. Porém, como a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra tem como objetivo formar profissionais de saúde multifacetados, e que se destaquem dos restantes estudantes de Ciências Farmacêuticas quer a nível curricular quer a nível profissional, esta dá a oportunidade aos seus discentes de realizar estágio noutras áreas, como em Farmácia Hospitalar e/ou em Indústria Farmacêutica.

Para além da Farmácia Comunitária, tive a oportunidade de realizar um estágio na área da Indústria Farmacêutica, que permitiu alargar os meus horizontes e explorar outras vertentes do domínio farmacêutico.

Assim, integrei a equipa de Garantia de Qualidade da Farmalabor, a unidade industrial do grupo Medinfa.

Este relatório será então uma descrição desta experiência, apresentada sob a forma de análise SWOT, evidenciando os Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças no decorrer deste estágio.

Palavras-chave: Relatório de estágio; Indústria farmacêutica; Farmalabor; Garantia de Qualidade; Análise SWOT.

Abstract

The second semester of Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences has a Curricular Internship where Community Pharmacy is mandatory. However, since The Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra has as goal to shape polyvalent health professionals, and stand out in comparison to others universities both in a curricular and in a professional level. The Faculty gives its students the opportunity to take an internship in other areas such as Hospital Pharmacy and/or Pharmaceutical Industry.

In addition to the Community Pharmacy internship, I had the opportunity to take the Pharmaceutical Industry internship which allowed me to enlarge my horizons and explore other sides of the pharmaceutical domain.

Therefore, I entered Farmalabor's, an industrial unity of the Medinfa group, Quality Assurance team.

This report will be a description of this experience in SWOT analysis where there will be highlighted the Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats throughout the internship.

Keywords: Internship Report, Pharmaceutical Industry, Farmalabor, Quality Assurance, SWOT Analysis

Introdução

Nos dias de hoje, a profissão farmacêutica não é apenas um trabalho de boticário, existindo outras áreas de trabalho para o exercício profissional do farmacêutico, como por exemplo, a Indústria Farmacêutica.

A supervisão pela parte do farmacêutico assume um papel importantíssimo em todo o ciclo do medicamento, garantindo o conhecimento técnico-científico necessário para a sua produção e o respeito pelas boas práticas de fabrico (GMP).¹

A curiosidade pelo trabalho desempenhado pelo farmacêutico numa vertente que não a farmácia comunitária foi o que me levou a escolher a FARMALABOR como o sítio mais indicado para realização do meu estágio curricular em indústria. Esta empresa é uma unidade de fabrico de produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos alimentares do grupo MEDINFAR.²

A FARMALABOR é “um fabricante moderno, dinâmico, altamente competitivo, dotado de tecnologias de ponta e que oferece níveis de serviço referenciais” seguindo os princípios definidos pelas *Good Manufacturing Practice* (GMP), de modo a serem obtidos produtos com elevada qualidade.³

Neste estágio, sob a orientação do Dr. João Braga, tive a oportunidade de adquirir novas competências e conhecimentos, que consolidaram a formação obtida no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, nomeadamente nas unidades curriculares de “Gestão e Garantia da Qualidade”, “Assuntos Regulamentares do Medicamento” e “Tecnologia Farmacêutica I, II e III”.

O presente relatório resume os conhecimentos adquiridos e as atividades realizadas ao longo deste estágio curricular, através de uma análise *SWOT*. Neste tipo de análise focamos os Pontos Fortes (*Strengths*), as Fraquezas (*Weaknesses*), as Oportunidades (*Opportunities*) e por fim, as Ameaças (*Threats*).

FARMALABOR

A Farmalabor foi fundada em Coimbra, em 1962, com o nome de Euro-Labor, esta começou por se dedicar ao fabrico de medicamentos para uso exclusivo.²

Corria o ano de 1985, quando se iniciou a produção de medicamentos para clientes por esta indústria, o que tornou essencial a construção de uma nova unidade fabril, localizada na Zona Industrial de Condeixa, onde se encontra até à data atual.²

Em 2001, já com o nome de Farmalabor, foi adquirida pelo Grupo Português Medinfar.

A Farmalabor destina-se ao fabrico de produtos farmacêuticos, cosméticos e outros serviços relacionados com a atividade do sector farmacêutico, possuindo uma capacidade bruta anual de 50 milhões de unidades repartidas entre formulações sólidas, líquidas e pastosas não estéreis.²

A Farmalabor, é uma empresa certificada de acordo com as normas ISO 9001:2008 (Qualidade), ISO 14001:2004 (Ambiente) e OHSAS 18001 (Higiene e Segurança no Trabalho).²

MEDINFAR

A Medinfar é um grupo farmacêutico português, sediada em Lisboa, e engloba vários setores farmacêuticos, sendo eles: Farma; GP - Genéricos Portugueses; *Consumer Health*; Farmalabor; Medinfar Sorológico; e Dvine.²

O grupo foi fundado em 1970, e é especializado em investigação e desenvolvimento, no fabrico de produtos farmacêuticos, dermocosméticos e suplementos, e na respetiva distribuição e comercialização. O Grupo Medinfar é atualmente a 3ª maior empresa no top 5 de empresas portuguesas, sendo a empresa líder em Portugal na categoria de Saúde do Consumidor e Dermatologia. Este grupo encontra-se presente em mais de 50 países.²

Análise SWOT

I. Pontos Fortes (Strengths)

I.1. Integração no departamento e na empresa

Durante o meu primeiro dia de estágio na FARMALABOR, eu e os restantes estagiários fomos extremamente bem recebidos pela Dr.^a Isabel Ferreira, diretora dos recursos humanos da Medinfar/Farmalabor, que nos apresentou a história, evolução, dimensão no mercado e perspetivas de futuro desta empresa. Após uma pequena entrevista, foi-nos sugerida a área da indústria que deveríamos integrar de acordo com os nossos perfis, assim, e tendo em conta a opinião transmitida, escolhi o departamento de garantia de qualidade para realizar o meu estágio.

Posteriormente, a Dr.^a Sónia Heleno mostrou-nos as instalações da empresa ao mesmo tempo que nos apresentou, presencialmente, a todos os colaboradores dos departamentos.

Integrei, então, o departamento de garantia de qualidade, onde no decurso das minhas atividades diárias senti uma grande disponibilidade da parte de toda a equipa, tanto para o esclarecimento de qualquer dúvida, como para a transmissão de conhecimento e formação.

No decorrer do estágio notei uma integração por parte de todos, não só do departamento como do resto da empresa, o que fez com que me sentisse parte integrante da mesma.

I.2. Plano de estágio

Ter um plano de estágio definido, que contemple a duração de cada etapa deste percurso é de extrema importância. Assim, logo no início do meu estágio, o Dr. João Braga definiu todas as formações internas e tarefas que iríamos realizar.

Esta gestão logística do tempo permitiu-me: uma formação atempada acerca da segurança e saúde no trabalho, gestão ambiental e garantia da qualidade; e uma execução fluída e sem percalços das tarefas propostas. Em última instância, esta organização do nosso horário acabou por proporcionar disponibilidade para o contacto com áreas que inicialmente não se encontravam contempladas no plano original de estágio, como por exemplo, a da produção.

1.3. Conhecimento e experiência adquiridos

Com este estágio pude desenvolver e melhorar diversas valências quer em contexto profissional, quer em contexto académico. Não só aprofundei os conceitos anteriormente adquiridos ao longo do MICF, como também tive a oportunidade de desenvolver outras competências ao nível da garantia da qualidade, que me elucidaram da importância deste departamento no ciclo do medicamento.

É notório o inter-relacionamento entre os diversos departamentos da empresa, sendo que o trabalho desenvolvido pela garantia da qualidade se encontra em todas as fases do processo de fabrico.

A formação recebida referente aos registos de lotes de validação, instruções de fabrico, instruções de acondicionamento, revisão da qualidade de produto (RQP) e análise de risco, fez-me entender o quão regulamentada é esta área.

Uma das tarefas que me foi atribuída consistiu em rever instruções de fabrico e de acondicionamento, o que me elucidou sobre todas as fases do processo de fabrico e do controlo em processo tanto das formas sólidas como das líquidas e pastosas. Isto clarificou a minha perceção acerca da complexidade inerente à produção, que é sujeita a elevados padrões de qualidade.

1.4. Multidisciplinaridade da equipa

A diversidade da formação dos profissionais que ingressam as equipas na indústria farmacêutica faz com que a elaboração dos projetos seja abordada de diferentes perspetivas, culminando em melhores resultados.

Assim, a colaboração harmoniosa entre farmacêuticos, engenheiros e técnicos é uma mais-valia para a resolução de problemas e para a troca de ideias e conhecimentos subjacentes às mais diversas áreas, o que se prova crucial para o melhoramento dos processos.

2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

2.1. Tempo reduzido de estágio

No meu ponto de vista, a duração deste estágio revelou-se escassa, uma vez que considero que três meses não foram suficientes para um contacto exímio com a área da garantia da qualidade.

Visto que a garantia da qualidade é uma vertente que abarca uma variedade de tarefas muito extensa, e que requer uma vasta formação, a minha experiência foi apenas um vislumbre de toda a complexidade envolvida no trabalho feito neste departamento.

Não obstante, sinto-me grata e enriquecida quer a nível pessoal quer a nível profissional pela oportunidade que me foi concedida tanto pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, como pela FARMALABOR.

2.2. Trabalho rotineiro

Apesar do trabalho desenvolvido ter sido desafiante e me ter tornado uma profissional mais proativa e versátil para solucionar e agir eficientemente perante as tarefas apresentadas, considero que o trabalho que realizei não se mostrou suficientemente diversificado.

Consequentemente, foi perdido algum dinamismo, tendo este dado lugar à rotina, o que tornou o exercício laboral mais extenuante.

3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.1. Constante otimização de procedimentos

No período em que estive a estagiar nesta empresa, percebi que a evolução do mercado farmacêutico e das novas tecnologias exige uma otimização de processos e acompanhamento tecnológico, por parte da indústria.

A FARMALABOR está em constante procura de novas formas de inovar e atualizar os seus métodos de fabrico, para garantir a maior segurança possível, o menor custo de produção e uma presença relevante num mercado competitivo, como é o caso da indústria farmacêutica.

3.2. Farmacêutico como profissional de saúde multifacetado

Ter ingressado como estagiária no departamento de garantia de qualidade nesta indústria, fez de mim uma profissional mais completa e consciente, não só do medicamento em si, mas também de todos os aspetos e especificidades que o envolvem.

Ao contactar com os diversos departamentos em que os farmacêuticos se inserem, constatei que a nossa formação é, de facto, vasta e multivalente.

Por conseguinte, temos uma panóplia extensa de vertentes profissionais, na medida em que qualquer que seja o ramo farmacêutico escolhido para o exercício profissional, toda a experiência obtida demonstra-se sempre relevante.

4. Ameaças (*Threats*)

4.1. Equipa multidisciplinar

Apesar de ser vantajoso termos uma equipa multidisciplinar, pelas razões já referidas anteriormente, é perceptível que o farmacêutico é subvalorizado em certas áreas da indústria farmacêutica.

De facto, existem profissionais com outras formações a executar funções que poderiam, irrefutavelmente, ser desempenhadas por farmacêuticos, o que leva a uma diminuição da oferta de emprego para profissionais de saúde da nossa área de formação.

Conclusão

Nos três meses em que realizei o meu estágio curricular na Indústria Farmacêutica tive a oportunidade de expandir os meus conhecimentos e aptidões quanto às funções do farmacêutico como parte integrante e fundamental da industrialização do medicamento.

O trabalho realizado no decorrer deste estágio, permitiu-me desenvolver e melhorar algumas *soft skills*, como a comunicação, interação com outros profissionais e a minha postura face ao trabalho em equipa.

Além disso, consegui aperfeiçoar a minha fluidez e agilidade na língua inglesa, que considero de extrema utilidade neste setor, e também as minhas aptidões em relação às novas tecnologias, pois trabalhei com vários *softwares* no decurso destes três meses.

É importante referir que no final deste estágio me sinto preparada para enfrentar o mercado de trabalho na área de Indústria Farmacêutica, deixando aqui um agradecimento ao Dr. João Braga, à restante equipa do departamento de Garantia de Qualidade e à Farmalabor por me receberem de braços abertos e mostrarem disponibilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas e me apoiarem em todo o decorrer do meu estágio curricular em Indústria Farmacêutica.

Bibliografia

1. **Industria Farmacêutica na Ordem dos farmacêuticos** [Consultado em 31 de agosto de 2018] Disponível em: <https://ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/industria-farmaceutica/>
2. **FARMALABOR na MEDINFAR** [Consultado em 31 de agosto de 2018] Disponível em: <http://www.medinfar.pt/farmalabor/>
3. **COMISSÃO EUROPEIA. EudraLex – The Rules Governing Medicinal Products in the European Union: Good Manufacturing Practice**. Bruxelas, 2010. ISBN 145-338-415-4 (Volume 4, Capítulos 3, 5 e 6). [Consultado em 31 de agosto de 2018] Disponível em: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_pt

Parte III

MONITORIZAÇÃO DE ASCORBATO E GLUTAMATO NO CÉREBRO COM
SENSORES ELETROQUÍMICOS: APLICAÇÃO NO ESTUDO DA DOENÇA
DE HUNTINGTON

Orientado por Professor Doutor Nuno Ricardo Ferreira

Resumo

A Doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa em que se verifica a perda celular em várias regiões cerebrais. Por esta razão é necessário esclarecer quais as mudanças no funcionamento do cérebro, nomeadamente a nível da neurotransmissão na fenda sináptica, para mais facilmente se perceber quais as alterações que caracterizam esta doença a nível neuronal, conhecimento esse que irá possibilitar desenvolver uma terapêutica mais adequada e eficaz. Um dos possíveis mecanismos de neurodegeneração apontados na DH é a excitotoxicidade provocada por um deficiente *uptake* de glutamato pelos astrócitos e neurónios. Este baseia-se na evidência de que nesta doença os níveis de glutamato se encontram aumentados na fenda sináptica o que leva a uma ativação excessiva dos seus recetores NMDA presentes no neurónio pós-sináptico, o que provoca uma estimulação prolongada deste neurónio, o que pode levar à sua morte celular.

O ascorbato é conhecido pelas suas funções como antioxidante e cofator enzimático, porém esta substância tem outras funções de extrema importância nomeadamente a nível cerebral, como moduladora da força do sinal excitatório induzido pelo glutamato.

Nos astrócitos e neurónios, aquando do *uptake* de glutamato ocorre presumivelmente libertação de ascorbato, porém esta relação não está totalmente clarificada.

Para melhor compreender as dinâmicas de concentração destas moléculas nas diferentes regiões cerebrais são necessárias técnicas que permitam a sua monitorização em tempo real e com uma frequência de aquisição de sinal que permita observar variações rápidas. Neste sentido, o recurso a microelétrodos acoplados a técnicas eletroquímicas rápidas, apresentam-se como um método adequado para este fim, permitindo-nos medir as variações de concentração destas substâncias no espaço extracelular do cérebro com elevada resolução espacial e temporal e também perceber que substâncias induzem um aumento ou uma diminuição da concentração da molécula de interesse na fenda sináptica. Todas estas informações são de extrema importância, pois ao analisar e correlacionar estes dados podemos ter uma ideia mais clara do que realmente acontece durante a neurotransmissão, tanto em indivíduos saudáveis, como em indivíduos com a doença.

Os microelétrodos de fibra de carbono (CFMs) modificados com Nafion[®]/nanotubos de carbono (CNTs), usados na medição do ascorbato, e os biossensores baseados em microelétrodos de cerâmica (MEA), usados para a medição do glutamato, são resultado da necessidade do desenvolvimento dos sensores eletroquímicos, com o intuito destes apresentarem maior sensibilidade, seletividade e maior resolução temporal e espacial.

Palavras-chave: Glutamato; ascorbato; doença de Huntington; sensores eletroquímicos.

Abstract

Huntington's disease is a neurodegenerative condition, in which occurs degeneration of neuronal pathways and cell loss in various brain regions. Considering this, it is necessary to clarify the changes in brain function, particularly at the level of neurotransmission/neuromodulation in the synaptic cleft, that occurs in Huntington's Disease, to better understand this disease at a neuronal level, which will allow the development of more adequate and effective therapy. One of the possible mechanisms of neurodegeneration pointed in HD is the excitotoxicity caused by a deficient uptake of glutamate by astrocytes and neurons. This is based on the evidence that in this disease, glutamate levels are increased in the synaptic cleft, leading to an excessive activation of NMDA receptors, present in the postsynaptic neuron, and causes a prolonged stimulation of the post-synaptic neurons, and eventually leading to cell death.

Ascorbate is known for its antioxidants and enzymatic cofactor properties. However, this substance has other important functions, more specifically as a glutamate induced excitatory signal strength modulator.

In astrocytes and neurons, as glutamate uptake takes place, a release of ascorbate occurs. However, the precise mechanism regulating ascorbate release remains elusive.

In order to better understand the concentration dynamics of these molecules in different brain regions, techniques are required that allow their monitoring in real time and with a frequency of signal acquisition that allows to monitor rapid variations. Thus, the use of microelectrodes coupled with fast electrochemical techniques are a suitable method for this purpose, allowing the measure of the concentration variations of these substances in the cerebral extracellular space of the brain with high spatial and temporal resolution. In addition, the use of these electrochemical tools give insights on the effect of several substances modulate the increase or decrease of ascorbate and/or glutamate in the extracellular space. All this information is extremely important, because when analyzing and correlating these data we can have a better idea of the molecules dynamics during neurotransmission, both in healthy individuals and in individuals with the disease.

The carbon fiber microelectrodes (CFMs) modified with Nafion[®]/ carbon nanotubes (CNTs), used to measure ascorbate, and the ceramics-based microelectrodes (MEA), used to measure glutamate, are a result of the need to develop electrochemical sensors with the aim of having higher sensitivity, selectivity, temporal and spatial resolution.

Keywords: *Glutamate; ascorbate; Huntington's disease; electrochemical sensors.*

Introdução

O ascorbato tem papel importante nos processos neurofisiológicos do cérebro, sendo um poderoso antioxidante, um cofator enzimático, um modulador do metabolismo energético e também um modulador da sinalização glutamatérgica.¹

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central dos mamíferos e está associado a funções cerebrais, como cognição, memória e aprendizagem.¹

A relação entre estas duas substâncias é alvo de debate, porém há evidências de que as mudanças nos níveis de glutamato extracelular estão associadas às flutuações nos níveis de ascorbato extracelular, o que pode ocorrer por um mecanismo de *heteroexchange*. Este mecanismo baseia-se na teoria de que os transportadores de alta afinidade do glutamato têm a capacidade de captar glutamato e em simultâneo realizar o transporte de ascorbato para fora da célula.²

A desregulação de vias de sinalização dependentes de glutamato e ascorbato estão relacionadas com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como é um exemplo a DH.¹

Esta é a doença neurodegenerativa poliglutamínica mais estudada devido a sua prevalência no Ocidente Europeu e na América do Norte afetando 3 a 10 indivíduos em cada 100 mil.³ A DH é caracterizada por alterações psiquiátricas, demência progressiva, declínio cognitivo e perda de coordenação motora.³ Esta doença tem vindo a ser estudada ao longo dos anos, de modo a clarificar os seus mecanismos de neurodegeneração.

Os métodos eletroquímicos são ferramentas versáteis para detetar, monitorizar e medir várias espécies neuroquímicas.⁴ A utilização fácil e a flexibilidade na aplicação tornam estes métodos interessantes para o estudo destas substâncias em ambientes fisiológicos com elevada resolução temporal e espacial.⁴

Os microelctrodos acoplados a técnicas eletroquímicas rápidas têm sido utilizados para examinar eventos químicos com uma resolução temporal elevada, o que permitiu obter novas informações cinéticas e em tempo real acerca da exocitose e da libertação espontânea de neurotransmissores.⁴

Assim, nesta monografia para além de abordarmos o ascorbato, o glutamato, a relação entre eles e a possível relação com a doença de Huntington, iremos também debruçar-nos acerca do desenvolvimento de sensores eletroquímicos que nos permitam detetar e monitorizar estas substâncias *in vivo* em tempo real, com elevada seletividade, sensibilidade e resolução temporal e espacial.

I. Ascorbato

I.1. Propriedades físico-químicas e biológicas

O ácido ascórbico (ou vitamina C), em pH fisiológico, sofre desprotonação no grupo hidroxilo C3, formando o anião ascorbato.²

O ascorbato (**Figura 1**) é um anião monovalente, pois tem dois prótons dissociáveis com valores de pKa de 4,2 e 11,8.⁵

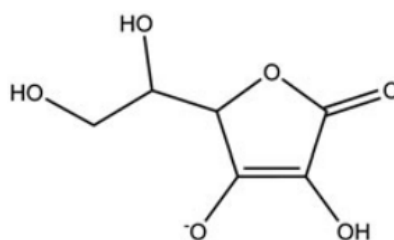


Figura 1 – Estrutura química do ascorbato. Adaptado de: REBEC ⁶

No fígado da maioria dos animais, ocorrem reações enzimáticas, que sintetizam ascorbato a partir de glucose. No caso do Homem, esta síntese não ocorre devido a uma deficiência enzimática, logo esta vitamina é obtida através da alimentação e da suplementação.⁶

O ascorbato desempenha múltiplas funções biológicas cruciais para o organismo humano, que derivam da sua capacidade de atuar como dador de eletrões e agente redutor.²

Esta substância tem um papel fulcral como antioxidante, pois neutraliza os radicais livres, produzidos no decorrer do metabolismo celular, evitando assim os efeitos nefastos destes no organismo. A maioria desses radicais livres tem um eletrão desemparelhado e, portanto, pode ser facilmente neutralizado pela oxidação do ascorbato.⁵

Outra função de grande relevância é a capacidade do ascorbato de atuar como cofator enzimático na síntese de catecolaminas, carnitina, colesterol, aminoácidos e certas hormonas peptídicas.⁷ Porém, a sua função mais conhecida como cofator é na hidroxilação da prolina e da lisina, aquando da síntese de colagénio (proteína do tecido conjuntivo que se deteriora no escorbuto).² Além disso, o ascorbato facilita a absorção do ferro pelo intestino e regula as propriedades ligação-ligando de certos recetores proteicos na membrana plasmática.²

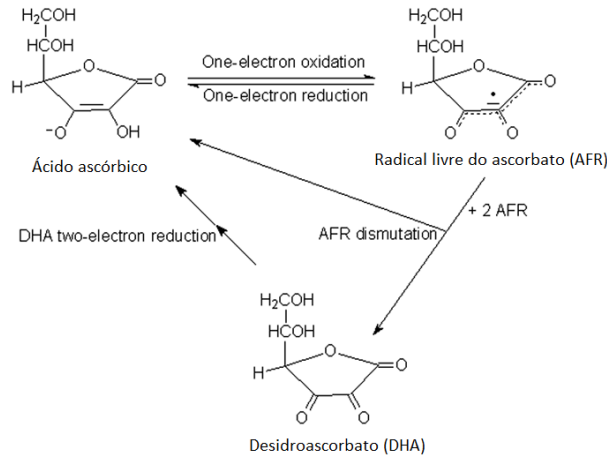


Figura 2 – Metabolismo do Ascorbato. Adaptado de: HARRISON and MAY ⁷

Apesar da facilidade com que o ascorbato é oxidado, *in vivo* este encontra-se principalmente na forma reduzida, pois existem múltiplos mecanismos de reciclagem desta substância.²

Na **Figura 2** podemos observar que quando o ascorbato é oxidado, forma-se o radical livre de ascorbato (AFR). Este é reduzido de volta a ascorbato, dentro das células, por redutases dependentes de NADH e NADPH, que têm elevada afinidade por baixas concentrações deste radical. Quando ocorre uma acumulação significativa de AFR em áreas não acessíveis a estas enzimas, ou se a concentração deste radical exceder a capacidade das redutases, duas moléculas do AFR sofrem desmutação, formando uma molécula de ácido ascórbico e uma de desidroascórbico (DHA).⁷

O DHA também pode ser reciclado por muitos mecanismos dentro das células, incluindo redução direta pelo glutatião (GSH) e redução enzimática por redutases dependentes de NADPH.⁷

1.2. Funções e distribuição de ascorbato no cérebro

No sistema nervoso central, o ascorbato intracelular tem funções de grande importância, tais como: proteção antioxidante, amidação peptídica, formação de mielina, potenciação sináptica, entre outras.⁸ Mais tarde nesta monografia vamos debruçar-nos acerca da sua função de moduladora da força do sinal excitatório induzido pelo glutamato e, consequentemente neuroprotetora em relação à excitotoxicidade deste neurotransmissor.⁵

A distribuição do ascorbato no cérebro é heterogénea. As concentrações mais altas são encontradas no prosencéfalo, enquanto que as mais baixas se encontram em estruturas do tronco cerebral.⁶

A concentração de ascorbato no fluido extracelular, também depende do estado comportamental, o qual a pode alterar drasticamente (e.g.: no corpo estriado a concentração de ascorbato pode variar em mais de 300 μM em poucos minutos).⁶

A concentração de ascorbato no líquido cefalorraquidiano (CFS) e nos neurónios é muito mais elevada do que a encontrada no plasma. No CFS esta varia entre 200-400 μM , nos neurónios este valor oscila entre 2-10 mM, já no plasma este valor não ultrapassa os 60 μM .⁷ Assim, excetuando o córtex adrenal e a glândula pituitária, o cérebro contém a maior concentração de ascorbato no corpo humano.²

Enquanto que o mecanismo de reciclagem intracelular auxilia na manutenção duma elevada concentração de ascorbato dentro das células, o transporte ativo dependente de sódio desta vitamina é necessário para manter o gradiente de concentração entre o plasma, o CSF e as células neuronais.⁷

1.2.1. Transporte do ascorbato para o cérebro

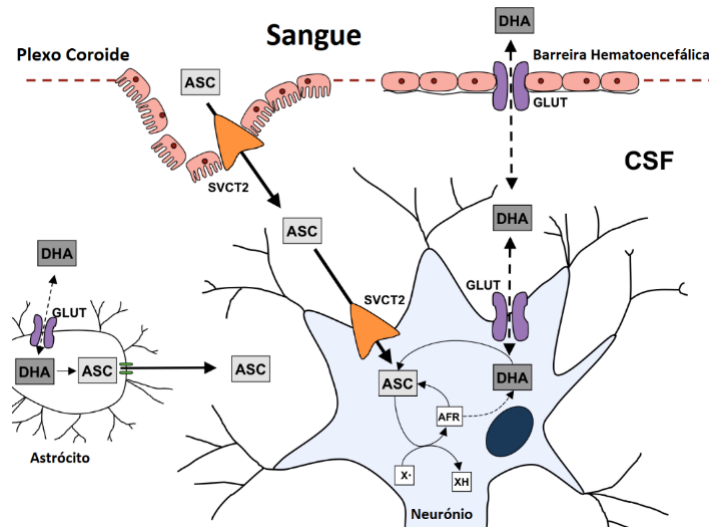
Como podemos observar na **Figura 3**, o ascorbato é transportado para o líquido cefalorraquidiano de duas formas distintas: a) por transporte ativo, através do transportador SVCT2 (transportador da vitamina C dependente de sódio – 2), no plexo coroide; b) na forma de DHA (forma oxidada do ascorbato⁷) por difusão facilitada, através dos transportadores da família dos GLUTs, presentes na barreira hematoencefálica.⁸

Da mesma forma, esta vitamina é transportada ativamente para os neurónios através dos SVCT2 e, na forma de DHA, através dos GLUTs.⁸

Dentro dos neurónios o ascorbato reduz os radicais livre oxidantes ($X\bullet$) formando radicais livres de ascorbato (AFR). Duas moléculas de AFR sofrem dismutação formando uma molécula de ascorbato e uma de DHA.⁸

Nas células da glia, o ascorbato entra na forma de DHA, através dos GLUTs.⁷

O DHA, presente nos neurónios e nas células da glia, é, rapidamente, reduzido a ascorbato.⁸



**Figura 3 - Absorção e metabolismo do Ascorbato no SNC. Adaptado de:
HARRISON and MAY ⁷**

Legenda: ASC, ascorbato; AFR, radicais livres de ascorbato; DHA, ácido desidroascórbico; CSF, líquido cefalorraquidiano; X• espécies de radicais livres oxidantes.

2. Propriedades do glutamato e sua função no cérebro

O glutamato (**Figura 4**) é o principal neurotransmissor excitatório do cérebro e, provavelmente está envolvido na maioria dos aspetos da função cerebral normal, incluindo cognição, memória e aprendizagem.⁹

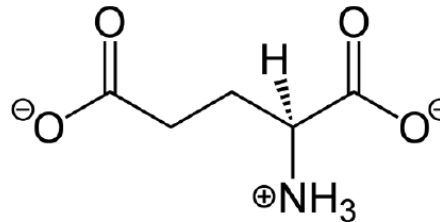


Figura 4 – Estrutura química do glutamato. Adaptado de: FERREIRA¹⁰

O glutamato estimula os seus recetores localizados na superfície das células que os expressam (como os neurónios e as células gliais), exercendo, assim o seu papel de sinalização.⁹ A extensão da estimulação do recetor é determinada pela concentração de glutamato no fluido extracelular circundante.⁹

Há dois tipos de recetores do glutamato: os ionotrópicos, que são constituídos por um canal iónico permeável a catiões, e os metabotrópicos, recetores acoplados à proteína G. Os recetores ionotrópicos foram subdivididos em três famílias os N-metil-D-aspartato (NMDA), os AMPA e os cainato.⁹

Os neurónios são extremamente sensíveis ao efeito excitatório do glutamato. Exemplo disso são as consequências nefastas da ativação prolongada dos recetores ionotrópicos, que passam por: convulsões epilépticas, aumento da suscetibilidade a danos neuronais e excitotoxicidade.⁶ Logo, é de extrema importância o controlo da concentração de glutamato a nível sináptico e extra-sináptico, para que a transferência de informação sináptica ocorra corretamente e haja manutenção da homeostase.⁶

Algum glutamato é removido da fenda sináptica por transportadores nos terminais pré-sinápticos, porém, os responsáveis pela maior parte da *clearance* desta substância são os astrócitos vizinhos. Estes possuem transportadores proteicos, denominados EAATs (“*excitatory amino acid transportes*”), nos quais ocorre o transporte do glutamato para dentro da célula, acompanhado por Na⁺ e H⁺, ao mesmo tempo que há depleção de K⁺. Há cinco tipos de transportadores EAAT: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT1), EAAT3, EAAT4 e EAAT5.⁶

3. Relação do glutamato com o ascorbato

Como anteriormente referido, o ascorbato entra nos neurónios e nas células gliais e, posteriormente, também é libertado destas células, mantendo assim a homeostase da concentração extracelular desta vitamina.⁷

Inúmeros estudos interligam a libertação do ascorbato com a transporte de glutamato, num ou mais transportadores específicos deste aminoácido, evidenciando assim a ação moduladora do ascorbato. Tanto a ativação das vias glutamatérgicas como a infusão direta de glutamato, iniciam este processo.⁷

3.1. *Heteroexchange*

Durante muito tempo, o modelo utilizado para explicar a relação entre a captação de glutamato e a libertação de ascorbato nas células neuronais, foi o “*heteroexchange*”.⁷

Este modelo assenta na teoria de que os transportadores de alta afinidade do glutamato têm a capacidade de o transportar tanto para dentro como para fora da célula. Assim, para além da recaptação do neurotransmissor, nessas proteínas transportadoras pode também ocorrer o transporte do próprio glutamato (*homoexchange*) ou de outra substância (*heteroexchange*) para fora da célula.²

O entendimento de que o ascorbato é libertado das células por *heteroexchange* no transportador do glutamato, foi desenvolvida com base numa série de ensaios, nos quais o efluxo de ascorbato foi medido em preparações tanto de homogenato sinaptossomal, como de tecido cerebral de rato.²

Mostrou-se que, tal como ocorre com os neurotransmissores, os estímulos despolarizantes promovem o efluxo de ascorbato. Porém, este processo parece não ocorrer por libertação vesicular, visto que é independente de Ca^{2+} , diferindo assim dos neurotransmissores.²

A pesquisa de sinaptossomas, preparados a partir de regiões do cérebro conhecidas por ter uma densa inervação glutamatérgica, revelou que o transportador do glutamato tem um papel crítico neste processo. A adição de L-glutamato (e não D-) aos sinaptossomas do córtex, do hipocampo e do estriado, propiciou a libertação de ascorbato, contudo este efeito foi bloqueado pela remoção de sódio. Logo, a captação de glutamato pelos seus transportadores de alta afinidade é estereosseletiva e dependente de Na^{+} .²

Para além disso, demonstrou-se também que a libertação de ascorbato induzida por glutamato não é afetada pelos antagonistas dos recetores de glutamato, mas é bloqueado

completamente por fármacos que impedem o funcionamento do transportador de glutamato.²

Coletivamente, estes resultados indicam que a captação de glutamato é acompanhada pelo transporte de ascorbato para fora da célula.²

3.2. Outros mecanismos

Outros mecanismos para além do *heteroexchange* têm sido propostos para explicar a libertação de ascorbato induzida por glutamato, uma vez que se demonstrou que o ascorbato não provoca libertação do glutamato radiomarcado nos sinaptossomas.⁷

Estudos acerca deste tema demonstraram que o transporte de glutamato e, conseqüentemente de Na⁺ para dentro da célula, provoca inchaço dos astrócitos de cultura primária.⁷

Segundo o grupo de investigação liderado por Wilson, esse inchaço dos astrócitos causa a libertação do ascorbato pelas células devido á abertura dos canais aniónicos orgânicos sensíveis ao volume (VSOAC).⁷

Subsequentemente, o mesmo grupo mostrou que a captação de glutamato pode ser dissociada da libertação de ascorbato nos astrócitos em cultura primária. Algumas das razões apontadas para justificar esta teoria são: tanto a captação do glutamato como o efluxo de ascorbato foi atenuado, pois o aumento de volume da célula foi prevenido pela sua cultura em meio hipertónico; os inibidores dos VSOAC bloquearam o efluxo de ascorbato, porém não tiveram qualquer efeito na absorção de glutamato; E finalmente, altas concentrações de ascorbato intracelular não aumentaram a absorção de glutamato, como seria de esperar no mecanismo da *heteroexchange*.⁷

Segundo REBEC (2013), alguns mecanismos de inter-relação entre a transmissão e transporte de glutamato e a libertação de ascorbato estão esquematizados na **Figura 5**.⁶

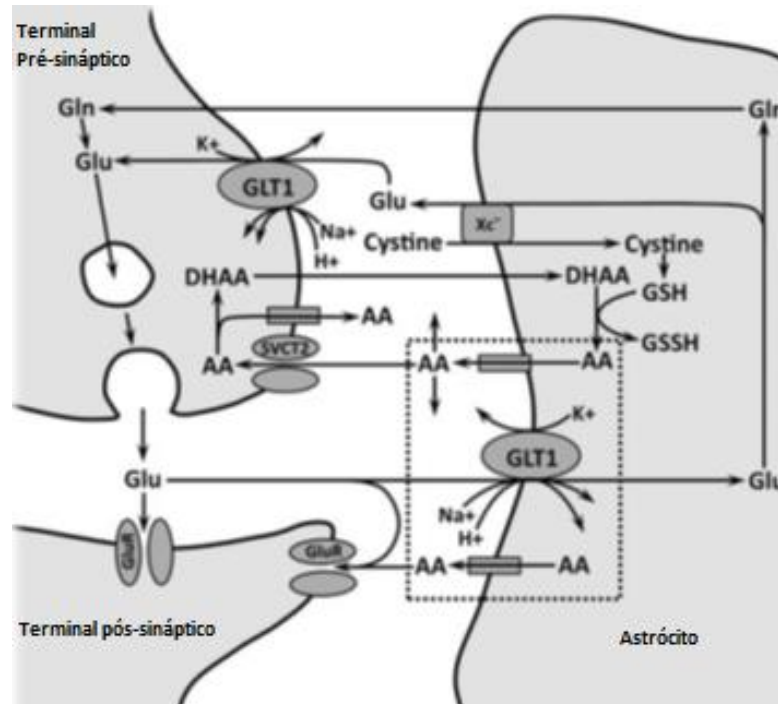


Figura 5 – Representação esquemática da relação entre a captação de glutamato e o ciclo de ascorbato numa sinapse tripartida envolvendo o terminal pré-sináptico, o neurónio pós-sináptica e um astrócito. Adaptado de: REBEC⁶

A libertação de glutamato (Glu) ativa os seus recetores (GluR) dentro e fora da fenda sináptica. Posteriormente este é recaptado pelo transportador de glutamato I (GLT1) no astrócito adjacente, o que constitui o mecanismo primário para manter a concentração extracelular de glutamato na faixa μM baixa. Isso promove a libertação de ascorbato, o que pode ocorrer por *heteroexchange* ou ativação de um mecanismo interveniente no astrócito.⁶

Na **Figura 5** os eventos dentro das linhas tracejadas indicam a relação presumida entre a absorção de glutamato pelo GLT1 e a libertação de ascorbato.⁶

O ascorbato extracelular ou é absorvido pelo SVCT2 no terminal pré-sináptico ou intervém na modulação da excitabilidade neuronal ao ligar-se aos GluR.⁶

Ainda não há certezas quanto às proteínas responsáveis pelo efluxo de ascorbato, mas presume-se que poderá incluir o próprio GLT1, a operação reversa de SVCT2 ou outra proteína⁶ como a VSOAC.

4. Introdução à doença de Huntington

A doença de Huntington (DH) é uma patologia neurodegenerativa e autossómica dominante, causada por uma expansão contínua de repetições do triplete CAG (citosina, adenina, guanina) no gene HD (do nome da doença em inglês- “*Huntington disease*”), especificamente no exão I, o que provoca uma transcrição incorreta da proteína huntingtina,³

O gene HD, também denominado *Interest Transcript 15 (IT15)*, localiza-se no braço curto do cromossoma 4 e é constituído por 67 exões. Quando ocorre a mutação da região codificante deste gene, a proteína huntingtina apresenta uma expansão de resíduos de glutamina alinhados consecutivamente no terminal amínico (NH₂-), 17 aminoácidos após a metionina iniciadora.³

Esta proteína mutante é expressa durante toda a vida, porém os primeiros sintomas da doença, normalmente só aparecem entre os 35 e os 50 anos de idade, este progridem ao longo de 15 a 20 anos e acabam por ser fatais.³

O número das repetições do triplete CAG está correlacionado com a manifestação da patologia, por exemplo: um individuo com menos de 35 repetições não apresenta sintomas, acima desse valor o individuo manifesta a doença. Alelos que contenham: 35 a 40 repetições CAG estão associados com formas mais tardias da doença, de 40 até 50 tripletos CAG dão origem à doença em adulto, enquanto que repetições maiores, originadas por alta instabilidade alélica na transmissão parental, são responsáveis pelos casos nos jovens e nas crianças, sendo mais severos e raros.³

4.1. Sintomatologia associada à DH

Quando a doença se manifesta no doente adulto, os sintomas são subtis como irritabilidade, depressão, dificuldade em resolver problemas e alterações motoras. Esta perda de coordenação dos movimentos voluntários é de progressão lenta.³

Há medida que a DH progride, os seus sintomas evoluem para demência, rigidez severa e bradicinesia (movimentos voluntários realizados pelos doentes são anormalmente lentos). A morte do doente, geralmente é associada a problemas respiratórios infecciosos e cardiovasculares.³

Nos jovens e nas crianças afetadas pela DH, a sintomatologia é diferente, apresentando rigidez, distonia e bradicinesia. Nas crianças também podem surgir ataques epilépticos.³

Para além destes sintomas, a maioria dos doentes sofre também de caquexia, alterações endócrinas e 10-25% destes exibem diabetes mellitus.³

4.1.1. Neuropatologia

A doença de Huntington provoca uma atrofia gradual do estriado cerebral.³

O estriado é composto maioritariamente por neurónios espinhosos médios (MSNs). Estes são responsáveis por receber informação de neurónios glutamatérgico do córtex cerebral, e transmiti-la aos núcleos dos gânglios de base.⁶ O estriado está estrategicamente posicionado para modular a saída de informação motora cerebral, tendo um papel fundamental na memória motora assim como na aprendizagem de repetição.⁶ A informação processada no estriado parece ser perturbada pela aglomeração e agregação da proteína huntingtina mutante.¹¹

A escala de VONSATTEL *et al.* (1985), baseada em padrões de degeneração estriatal em tecido cerebral *post-mortem*, permite avaliar os diferentes estádios patológicos e determinar a severidade da degeneração em doentes com DH. Esta escala de 5 graus (0-4), associados a diferentes graus de severidade neuropatológica, pode ser correlacionada com o número de repetições do CAG.³

A dimensão da atrofia estriatal correlaciona-se, não só com o número de repetições CAG, como também com a degeneração de estruturas cerebrais não-estriatais. Assim, no grau 1 e 2 as estruturas cerebrais não-estriadas estão preservadas enquanto que nos graus 3 e 4 estruturas cerebrais como por exemplo o tálamo e o cerebelo, encontram-se afetadas e atrofiadas. Nos casos mais graves a atrofia cerebral generalizada pode levar a uma perda de peso cerebral de 40%.³

4.2. Mecanismos de Neurodegeneração

A disfunção cerebral induzida pela proteína huntingtina mutante provoca degeneração de vias neuronais e perda celular no estriado, córtex cerebral e noutras regiões do cérebro.³ Mecanismos como excitotoxicidade, toxicidade dopaminérgica, desregulação metabólica, stress oxidativo, apoptose e autofagia estão relacionados com a patologia, apesar de muitas vezes não serem consequências diretas da proteína huntingtina.³ Estes mecanismos podem ocorrer simultaneamente e promover-se mutuamente, culminando na morte neuronal.³

Nesta monografia vamos debruçar-nos na implicação da excitotoxicidade na DH.

4.2.1. Excitotoxicidade

O estriado recebe *input* excitatório glutamatérgico de todo o córtex cerebral.³ A excitotoxicidade no corpo estriado ocorre devido à excessiva sinalização glutamatérgica.¹² Após a ativação crónica dos recetores NMDA pelo glutamato, a concentração intracelular

de Ca^{2+} aumenta, podendo conduzir: (a) à disfunção mitocondrial e à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio; (b) à ativação de proteases dependentes de Ca^{2+} ; (c) à indução do processo apoptótico. Estes eventos contribuem para a neurodegeneração progressiva observada no estriado dos doentes de Huntington.³

As mudanças na libertação, captação e sinalização pós-sináptica do glutamato promovem a ocorrência da excitotoxicidade.¹²

A avaliação de tecido cerebral de doentes com DH mostrou uma diminuição na quantidade de mRNA que codifica o EAAT2 e uma diminuição na expressão deste transportador no estriado e no córtex.⁶ A perda de EAAT2 não pode ser explicada pela perda de astrócitos visto que nesta doença pode ocorrer aumento deste tipo de células.⁶ Resultados semelhantes foram também evidenciado em ratos R6/2, nos quais o GLTI se encontra diminuído.⁶ Nestes a diminuição da captação de glutamato no estriado começa antes do início da perda da proteína GLTI. Estes resultados sugerem que a perda de funções do GLTI é um passo crítico na progressão da DH.⁶

A função do GLTI está dependente da palmitoilação pelas PATs (*“Palmytoil-acyl transferase”*), pois estas transferases regulam o processo de inserção das proteínas na membrana celular.⁶ A relação entre este processo e a DH passa pela interação da proteína huntingtina mutante com a HIP14 (uma das primeiras PATs a ser caracterizada).⁶ A alteração da atividade desta PAT reduz a palmitoilação do GLTI. A redução da atividade das PATs e também da captação de glutamato verificou-se em ratos YAC.⁶

Os mecanismos moleculares alterados pela proteína huntingtina mutante nos astrócitos estão associados à disfunção neuronal e ao desenvolvimento das alterações fenotípicas da DH.⁶

5. Monitorização de ascorbato e glutamato no cérebro

Como referido anteriormente, o ascorbato é um modulador da transmissão glutamatérgica, na medida em que há uma possível interligação entre a captação de glutamato e a libertação de ascorbato pelos astrócitos e neurónios.

Na DH, esta modulação fica comprometida devido a múltiplos mecanismos (que ainda se encontram em estudo) e esta disfunção pode ser um dos fenómenos apontados como responsáveis pela neurodegenerescência associada a esta doença.

Assim, a monitorização da dinâmica das concentrações extracelulares em tempo real destes compostos é muito importante, com intuito de clarificar a sua correlação e a relação destas com os mecanismos envolvidos na patologia.

De entre os vários métodos de análise usados para monitorização destes compostos no cérebro, realçam-se dois: microdiálise e deteção eletroquímica direta em tempo real.

No que respeita à microdiálise, esta envolve a colheita do fluido extracelular através de uma sonda equipada com uma membrana de diálise, na qual as pequenas moléculas são recuperadas deste fluido. As amostras resultantes desta técnica são analisadas utilizando métodos cromatográficos, ou mais recentemente, eletroforese capilar.⁴

Atualmente, esta metodologia apresenta ainda mais potencialidades pela possibilidade de acoplar a microdiálise a técnicas analíticas mais poderosas, tais como HPLC-ECD ou LC-MS-MS.¹

No entanto, a microdiálise apresenta algumas limitações como: uso de vários equipamentos, dano do tecido cerebral devido ao tamanho da sonda que varia entre 150 e 500 μm de diâmetro e 1 a 4 mm de comprimento, e resolução espacial e temporal baixas inadequada para detetar eventos sinápticos rápidos.¹

Neste sentido, o recurso a microelétrodos acoplados a técnicas eletroquímicas, como a voltametria ou amperometria, apresentam-se como uma alternativa complementar à microdiálise, uma vez que permitem ultrapassar muitas destas desvantagens.

5.1 Sensores eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos são uma ferramenta poderosa e simples de utilizar para monitorizar as substâncias com propriedades eletroquímicas no espaço extracelular, o que os torna extremamente úteis na área das neurociências.⁴

Estes são normalmente constituídos por elétrodos que são usados para medir a corrente resultante da oxidação de moléculas quando submetidas a uma voltagem específica

(amperometria), ou medir a intensidade de corrente de oxidação ou redução durante um varrimento de potencial (voltametria).⁶

Para isto acontecer, os eléctrodos têm de possuir uma superfície ou uma interface de modo a que se origine transferência de carga e/ou corrente suscetíveis de serem medidas, que são posteriormente correlacionadas com a concentração dos compostos presentes no meio.⁴

Para possibilitar a utilização de métodos eletroquímicos, GONON *et al.* desenvolveram o microeléctrodo de fibra de carbono (CFMs).⁴ Algumas das principais vantagens associadas à utilização de microeléctrodos para deteção em tempo real de compostos no cérebro são:

- Elevada resolução temporal: o uso de microeléctrodos associados a técnicas como, por exemplo, a amperometria permitem uma aquisição muito rápida de sinal, com uma frequência que pode ser inferior a 1 s, ao contrário da microdiálise, cuja frequência de aquisição ronda os minutos. Deste modo, é possível uma monitorização precisa das variações rápidas de concentração;¹⁰
- Elevada resolução espacial: dadas as pequenas dimensões dos microeléctrodos (menos de 100 µm), associadas à utilização da estereotaxia é possível ter uma elevada precisão na inserção dos microeléctrodos no tecido cerebral;¹⁰
- Menor dano do tecido cerebral possível, devido às reduzidas dimensões do microeléctrodo (menos de 100 µm), especialmente quando comparadas com as sondas de microdiálise.¹⁰

Para realizar as medições em tempo real das substâncias de interesse, os microeléctrodos têm de estar associados/acoplados a técnicas eletroquímicas rápidas como a amperometria, cronoamperometria e a voltametria cíclica rápida (FCV).¹³ De seguida, abordaremos as duas técnicas eletroquímicas mais relevantes para esta monografia, são elas: a amperometria e a voltametria de onda quadrada (SWV).

5.1.1. Amperometria

A amperometria de potencial constante é uma técnica eletroquímica simples muito usada para monitorizar certos eventos neuroquímicos rápidos.¹⁰

Esta técnica envolve a medição da corrente a um potencial fixo constante, permitindo que a corrente seja continuamente monitorizada, produzindo medições com a frequência de 1 ms.¹⁴

Esta técnica eletroquímica permite medições com alta sensibilidade de moléculas electroquimicamente ativas, pois como a tensão é constantemente aplicada ao eléctrodo de trabalho, após alguns minutos de estabilização a corrente de *background* não-faradaica

registada a partir do eléctrodo é baixa, melhorando assim a relação sinal ruído e permitindo obter limites de deteção/quantificação mais baixos e melhores sensibilidades. Além disso, com esta técnica a corrente é diretamente proporcional à concentração em todos os momentos.¹⁴

A amperometria de potencial constante tem a melhor resolução temporal dentro das técnicas eletroquímicas, porém possui a pior resolução química, sendo difícil distinguir as moléculas eletroativas presentes *in vivo*. Assim, é necessário realizar modificações na superfície do eléctrodo de trabalho, visto que, a existência de interferentes faz com que seja preciso melhorar a seletividade para a deteção do analito de interesse.¹⁰

5.1.2. Voltametria de onda quadrada (SWV)

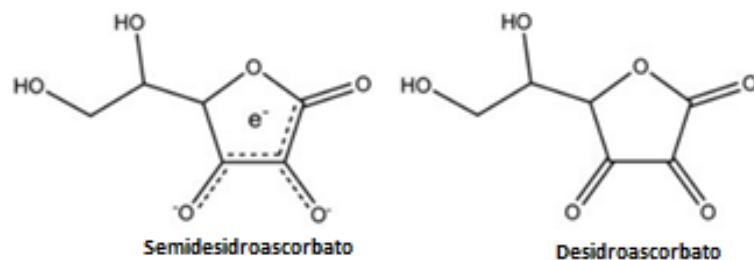
A voltametria baseia-se na medição da corrente resultante da aplicação de um potencial numa banda de voltagem suficientemente larga para assegurar a oxidação das moléculas relevantes.⁶ Assim esta técnica eletroquímica sustenta-se na habilidade de oxidação de diferentes moléculas a diferentes voltagens, conseguindo-se a sua separação.⁶

A SWV usa uma onda pulsátil; nesta técnica a corrente é medida duas vezes durante cada ciclo de onda quadrada, uma no final do impulso positivo e outra no final do impulso reverso (negativo). A diferença de corrente entre as duas medições é representada em relação à rampa de potencial.¹⁰ A SWV produz picos para processos faradaicos, onde a altura do pico é diretamente proporcional à concentração da espécie em solução.¹⁰

Uma das maiores vantagens desta técnica é a capacidade de realizar uma medição bastante mais rápida do que as técnicas de pulsos normais e diferenciais, pois a sua velocidade de varrimento pode ser inferior a 1 V/s.¹⁰

5.2. Medição/Monitorização do ascorbato em tempo real *in vivo*

Para além das características inerentes aos sensores, é necessário que as espécies químicas a detetar sejam também electroquimicamente ativas para poderem ser monitorizadas por métodos diretos. Neste sentido, a pH fisiológico, a oxidação do ascorbato envolve a perda de dois eletrões.¹³ Quando perde o primeiro eletrão, o ascorbato transforma-se num radical de oxigénio relativamente estável - semidesidroascorbato (radical ascorbil), e ao perder o segundo eletrão o radical ascorbil transforma-se em desidroascorbato (DHA) (**Figura 6**).⁶



**Figura 6 - Estruturas químicas dos produtos de oxidação do ascorbato.
Adaptado de: REBEC⁶**

A medição/deteção de ascorbato através de elétrodos de fibra de carbono simples ou “bare” apresenta algumas limitações entre as quais se destaca:

- A oxidação de ascorbato em “bare” elétrodos é totalmente irreversível e requer altos “overpotentials”, o que é consequência da lenta cinética de transferência de eletrões e da adsorção à superfície do elétrodo dos produtos de oxidação do ascorbato.¹³

- Nos elétrodos mais comuns (ex.: carbono, platina) o potencial de oxidação do ascorbato é muito próximo do das catecolaminas (ex: dopamina (DA)) e dos seus metabolitos (ex. ácido 3,4-dihidroxiifenilacético (DOPAC)). Por esta razão a sobreposição das correntes de oxidação é um problema grave, pois provoca interferências na medição do ascorbato.¹³ Assim, medições diretas de ascorbato por métodos eletroquímicos em meio biológico complexo, como tecido cerebral, requerem o uso de microelétrodos com alta seletividade para o ascorbato para diminuir a interferência dos compostos mencionados anteriormente.¹³

Uma das melhores estratégias experimentais para melhorar a seletividade dos CFMs para o ascorbato consiste na modificação das propriedades da sua superfície.¹³

De entre as diferentes abordagens descritas na literatura destaca-se a usada por FERREIRA et al., cuja modificação da superfície dos CFMs consistiu em revesti-los com nanotubos de carbono (CNTs) (**Figura 7**), dado que estes possuem propriedades químicas, eletrónicas, mecânicas e estruturais que fazem com que sejam frequentemente usados no fabrico quer de biossensores quer de sensores eletroquímicos.¹³ Estas propriedades são vantajosas na medição do ascorbato no cérebro de ratos, na medida em que conferem uma alta relação superfície-volume, uma promoção de reações de transferência de eletrões, um aumento da sensibilidade em relação a outros processos e uma diminuição de potenciais aditivos devido a outros componentes eletroativos.¹

Uma desvantagem dos CNTs consiste na sua insolubilidade na maioria dos solventes. Para contornar esta limitação, FERREIRA et al. utilizou Nafion[®] (polímero perfluorossulfonado) para obter suspensões relativamente estáveis. O uso de nanocompósitos de Nafion[®]/CNT

oferece uma excelente matriz devido a ser quimicamente inerte, termicamente estável, possuir resistência mecânica e boa biocompatibilidade.¹³

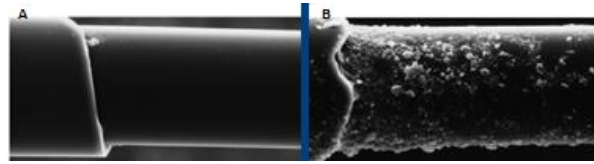


Figura 7 – Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento da superfície dos microelétrodos (A) Bare CFM; (B) CFM modificado com Nafion®/SWCNT.

Adaptado de: FERREIRA et al.¹³

Na **Figura 8A** pode observar-se uma mudança do pico do potencial de oxidação do ascorbato, determinado por SWV, de um valor positivo (+0,243 V) quando medido por um CFMs *bare* (linha tracejada) para um valor negativo (-0,044 V) quando medido com CFMs modificados com Nafion®/SWCNT (linha sólida). Esta mudança no pico de oxidação do ascorbato é consequência do forte efeito electrocatalítico dos CNTs na oxidação desta substância.¹³ Já na **Figura 8B** pode observar-se que o efeito electrocatalítico dos CNTs na oxidação da DA não é tão acentuado, visto que o desvio no valor do pico do potencial de oxidação não é tão elevado. No caso da DA o valor passou de +0,224 V quando medido com *bare* CFMs (linha tracejada) para +0,196 V quando medida com CMF/Nafion®/SWCNT (linha sólida). Conseguir esta diferenciação nos picos de potencial de oxidação do ascorbato e do DA é fundamental para aumentar a seletividade destes CFMs para o ascorbato.¹³

Posteriormente, FERREIRA et al. confirmou a alta seletividade destes microelétrodos modificados para medições de ascorbato, não só em relação à DA mas também aos restantes interferentes encontrados no espaço extracelular do cérebro (noradrenalina (NA), DOPAC).¹³

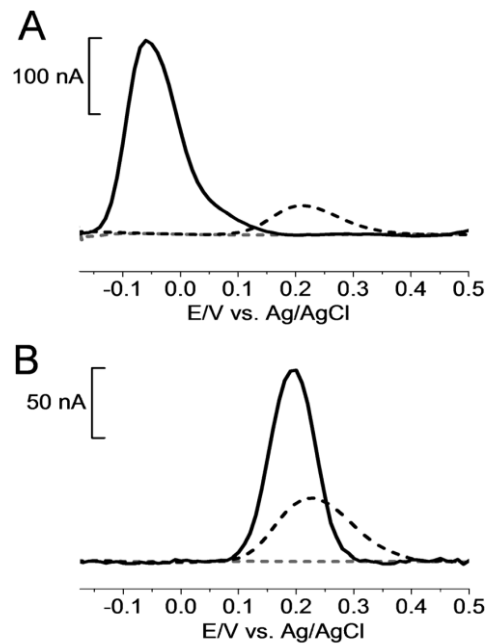


Figura 8 – (A) Pico do potencial de oxidação do ascorbato: (linha preta tracejada; 1 mM; $E_p = +0,243$ V) - medido com CFM *bare*; (linha contínua; 0,5 mM; $E_p = -0,044$ V) – medido com CFMs modificados com Nafion[®]/CNT. (B) Pico do potencial de oxidação da DA: (linha preta tracejada; 20 mM; $E_p = +0,224$ V) - medido com *bare* CFM; (linha contínua; 20 mM; $E_p = +0,196$ V) – medido com CFMs modificados com CNTs/Nafion[®]. Linha cinzenta tracejada representa a linha de base do eletrólito de suporte.

Adaptado de: FERREIRA et al.¹³

Um aspeto importante relacionado com a utilização destas ferramentas *in vivo* tem a ver com a incrustação biológica, que pode ocorrer devido a uma resposta inflamatória tecidual e à adsorção de macromoléculas, causando um fenómeno denominado de “*fouling*” e que se caracteriza por uma diminuição acentuada da sensibilidade dos microelctrodos (60 a 82% do valor inicial).¹ FERREIRA et al. avaliaram a extensão da deste fenómeno no sensor de nanocomposito, tendo realizado injeções locais de ascorbato exógeno (20 mM) aos 400 s, 2309 s e 6480 s após a inserção do microsensor no tecido cerebral. Os resultados mostraram que, mesmo ocorrendo uma perda de sensibilidade do elctrodo aquando da inserção *in vivo*, a sensibilidade dos microelctrodos modificados com nanocompositos se mantém estável durante o período temporal das experiências, tornando possível a quantificação de ascorbato através da realização de pós-calibrações dos mesmos.¹

Segundo FERREIRA et al., os CFM/Nafion[®]/SWCNT acoplados à amperometria permitem medições em tempo real, com alta seletividade, sensibilidade e resolução espaço-temporal, das dinâmicas de concentração do ascorbato extracelular basal no hipocampo de ratos após estimulação com glutamato.¹³

Na **Figura 9** podemos observar um registo amperométrico *in vivo* realizado com um microeléctrodo CFM/Nafion[®]/SWCNT, onde podemos observar a variação da concentração extracelular de ascorbato na região hipocampal CA1 do hipocampo de ratos, após a injeção local de glutamato 20 mM.¹³ A medição das correntes anódicas, com CMF/Nafion[®]/SWCNT, foi efetuada a um potencial muito baixo (+0,05 V) em função dos resultados obtidos para a oxidação de ascorbato por SWV, ilustrados na **Figura 8**.¹³

Também podemos observar (**Figura 9** – dentro dos quadrados) que foram realizados varrimentos em SWV, antes e depois da estimulação com glutamato, de modo a demonstrar que o sinal da corrente medido por amperometria foi derivado da oxidação do ascorbato.¹³

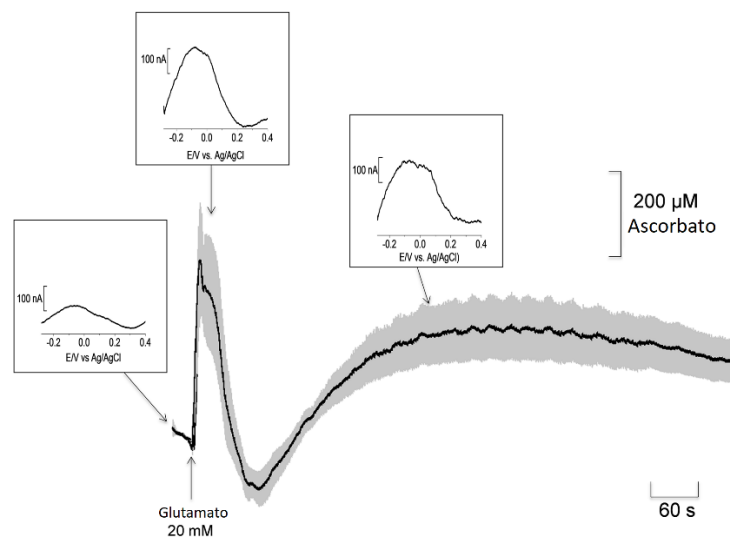


Figura 9 – Registo amperométrico da dinâmica do ascorbato no hipocampo de ratos *in vivo*, usando CFM/Nafion[®]/SWCNT, após estimulação com glutamato 20 mM. Dentro dos quadrados: SWV efetuados para cada fase de resposta. Adaptado de: FERREIRA et al.¹³

Como se pode observar na **Figura 9**, a estimulação do glutamato induziu um aumento rápido na corrente de oxidação do ascorbato, o que corresponde a uma mudança de cerca de 400 μM na concentração de ascorbato.¹³

Os resultados das medições realizadas por FERREIRA et al. corroboram que o efluxo de ascorbato no espaço extracelular do cérebro é evocado pelo glutamato, sendo que o seu processo de libertação poderá ocorrer mais provavelmente por um dos mecanismos abordados previamente (*heteroexchange*) ou pela abertura dos canais VSOAC causada pelo inchaço dos astrócitos.¹³

5.3 Medição/Monitorização do glutamato em tempo real *in vivo*

O glutamato não é um composto electroquimicamente ativo, como o ascorbato, pelo que para realizar medições da concentração cerebral deste neurotransmissor é necessário utilizar microbiossensores electroquímicos.¹⁰

A deteção de compostos não electroquimicamente ativos é realizada através da monitorização: **(a)** do consumo de um co-substrato pela enzima que reveste a superfície do eléctrodo, como o oxigénio; ou **(b)** da formação de um produto eletroativo, como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂).¹⁰

Nos microbiossensores, a superfície dos microeléctrodos é revestida com enzimas específicas para o analito de interesse.¹⁰ No caso do glutamato, a glutamato-oxidase (GluOx) é imobilizada na superfície dos microeléctrodos de cerâmica (MEAs), pois esta enzima converte o glutamato em H₂O₂, que é detetado por técnicas electroquímicas rápidas, como a amperometria.¹

Existem diferentes metodologias usadas para imobilizar a GluOx na superfície dos eléctrodos, porém deve escolher-se uma técnica que promova a interligação intermolecular e minimize a distorção da conformação enzimática.¹⁵

Segundo BURMEISTER *et al.*, uma vantagem do método “wet” em relação aos métodos que envolvem reticulação por vapor de enzimas secas ou reticulação direta de enzimas dissolvidas, é que este permite que as moléculas de enzima sejam imobilizadas numa conformação mais semelhante à da enzima “livre”, o que vai aumentar a seletividade desta para o glutamato.¹⁵ Este método consiste na aplicação da mistura de albumina bovina sérica (BSA) e glutaraldeído, na superfície do microeléctrodo, na secagem dos microeléctrodos e finalmente na adição das enzimas GluOx.¹⁵ Na imobilização enzimática, o glutaraldeído é utilizado como agente de reticulação¹⁵ e a BSA é incluída na matriz reticulada para proteger a atividade da enzimática da GluOx durante a imobilização.¹⁴

A seletividade é fundamental para os biossensores electroquímicos, especialmente na deteção direta *in vivo* no SNC, onde há várias substâncias neuroquímicas presentes e as calibrações *in situ* são impraticáveis ou impossíveis.¹⁵ Assim, para aumentar a seletividade das medições *in vivo*, os MEAs utilizados possuem vários meios, como o revestimento com camadas de exclusão e a utilização da “auto-referência” (*self-referencing*) para minimizar a potencial interferência de moléculas electroactivas.¹⁵ De referir que o método de auto-referência implica o revestimento de eléctrodos com a enzima ativa e outros apenas com a matriz mas sem a enzima proteica (sentinela), fazendo-se depois a subtração da corrente dos eléctrodos sentinela à corrente dos eléctrodos revestidos com a enzima. A subtração do sinal registado nos eléctrodos sentinela ao registado nos eléctrodos revestidos com GluOx permite

a verificação cruzada de sinais interferentes, o que melhora a seletividade do sinal, a relação sinal-ruído e o limite de deteção.¹ O revestimento dos MEAs com camadas de exclusão serve para bloquear ou minimizar a interferência de compostos electroquimicamente ativos indesejáveis, encontrados em altas concentrações no sistema nervoso central, como o ascorbato ou o DOPAC.¹⁴

A 1,3-fenilenodiamina (mPD) foi usada por FERREIRA *et al.*¹ para criar uma camada de exclusão de tamanho, permitindo assim que moléculas pequenas, como o H_2O_2 , atinjam a superfície ativa de platina (Pt), impedindo ao mesmo tempo que moléculas maiores, como o ascorbato, a DA e outros aminoácidos, atinjam os locais de medição e causem interferências.¹⁴

Os *arrays* de microbiossensores de glutamato, utilizados por FERREIRA *et al.*¹, eram constituídos por quatro eléctrodos de Pt idênticos, dos quais dois foram utilizados como sentinelas, (**Figura 10**).¹ Consequentemente, os *arrays* de microbiossensores de glutamato permitiram obter medições num modo de *self-referencing*, visto que os “*sentinel sites*” respondem aos interferentes (ex. ascorbato, DOPAC) de um modo semelhante aos locais revestidos com GluOx, porém não apresentam resposta ao glutamato.¹

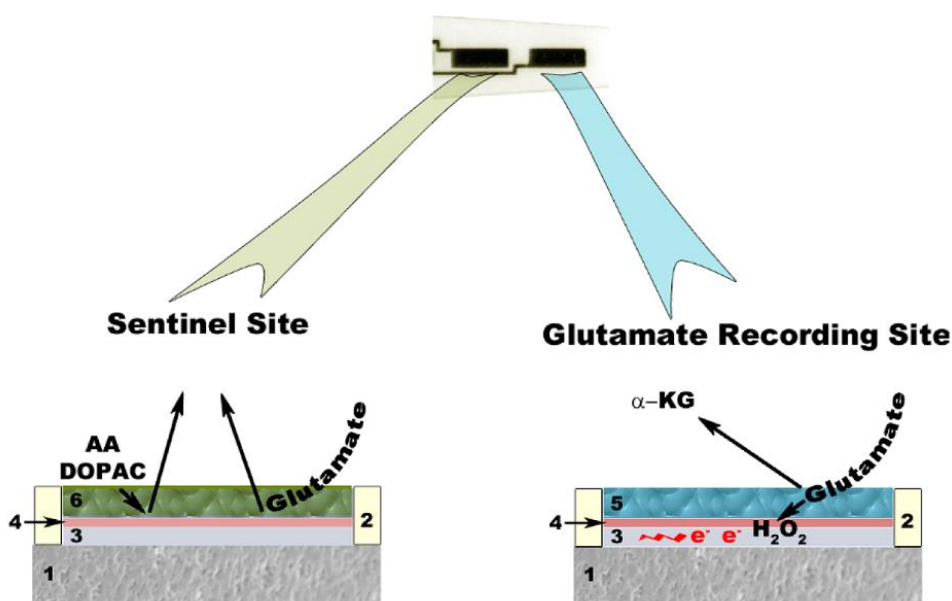


Figura 10 – Representação esquemática da constituição (camadas) e das funções do: eletrodo *sentinela* (à esquerda) e do eletrodo de registo do glutamato (à direita). 1- Substrato cerâmico; 2- poliimida; 3- eletrodo de Pt; 4- camada polimerizada de mPD; 5- matriz de GluOX; 6- matriz de BSA. Adaptado de: BURMEISTER *et al.*¹⁵

5.4 Monitorização simultânea de ascorbato e glutamato *in vivo* em tempo real

Para compreender melhor a interação dinâmica do ascorbato com o glutamato na sub-região CA1 do hipocampo de ratos, FERREIRA *et al.* recorreram à monitorização simultânea *in vivo* da mudança nas concentrações basais destes compostos, estimulada pela adição de KCl (cloreto de potássio) 70 mM ou glutamato 20 mM.¹

Esta monitorização foi realizada recorrendo a sensores eletroquímicos acoplados à amperometria, o que permitiu obter medições com elevada resolução temporal e espacial.¹ Assim, como mostra a **Figura 11**, FERREIRA *et al.* acoplaram CFMs modificados com Nafion®/SWCNT, para a quantificar o ascorbato¹³, arrays de microbiossensores de glutamato e uma micropipeta de vidro usada para a ejeção local de KCl 70 mM e glutamato 20 mM.¹⁵

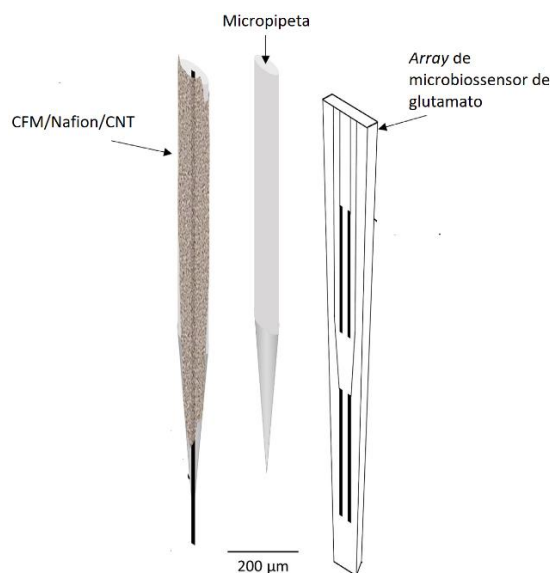


Figura 11 – Representação esquemática da junção numa matriz: do CFM/Nafion®/CNT, da micropipeta e do array de microbiossensor do glutamato (da esquerda para a direita). Adaptado de: FERREIRA *et al.*¹

Analisando os registos apresentados na **Figura 12 A e B**, podemos inferir que ambos os estímulos produziram aumentos transitórios na concentração de glutamato seguidos (cerca de 1 s de atraso) por aumentos na concentração de ascorbato.¹ Também podemos observar que o pico do sinal do ascorbato só ocorre aquando do termino do pico do sinal do glutamato.¹

Na **Figura 12A** podemos observar que, aquando da estimulação por KCl 70 mM, se obteve um pico de glutamato de cerca de 6 μM, e um pico de cerca de 100 μM de ascorbato.¹

As medições, aquando da estimulação por glutamato 20 mM, representadas na **Figura 12B** indicam um pico de glutamato de cerca de 65 μM e um pico de ascorbato de cerca de 400-500 μM .¹ Estes resultados evidenciam a existência de uma correlação entre a amplitude do pico e as concentrações de glutamato e ascorbato no espaço extracelular.¹

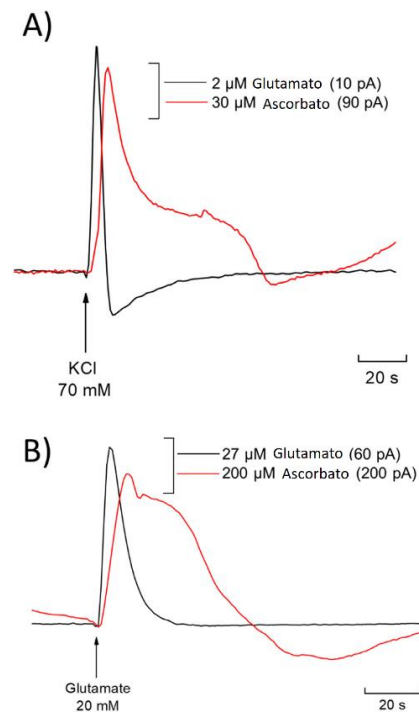


Figura 12 – Registos amperométricos *in vivo* e em simultâneo de glutamato (traço preto) e ascorbato (traço vermelho). (A) Na sub-região CA1 do hipocampo, aquando ejeção local de 25 nL KCl 70 mM. (B) Na sub-região DG, aquando da ejeção local de 25 nL de glutamato 20 mM. Adaptado de: FERREIRA et al.¹

Durante a experiência FERREIRA et al. confirmou a identidade química dos sinais de ascorbato medidos, através da obtenção de sucessivos voltamogramas de SWV. Esta confirmação é de extrema importância devido à possível interferência, provocada por outras substâncias presentes no meio extracelular do cérebro, no sinal de ascorbato medido.¹

Em conjunto, estes resultados suportam a noção da interação dinâmica entre a libertação de glutamato para o espaço extracelular e consequente libertação de ascorbato após estimulação glutamatérgica, sugerindo que o ascorbato desempenha um papel importante na modulação da sinalização glutamatérgica no cérebro, podendo a sua monitorização ser importante no estudo dos processos e vias de sinalização associadas a doenças neurodegenerativas como é o caso da DH.¹

Conclusão

Com a elaboração desta monografia, concluímos que a clarificação da relação dinâmica entre a sinalização do glutamato e as flutuações nos níveis de ascorbato extracelular é fulcral para perceber o seu papel na fisiopatologia do cérebro, nomeadamente em doenças neurodegenerativas como a DH. Assim, o desenvolvimento de sensores que permitem medições simultâneas *in vivo* do glutamato e do ascorbato, com alta resolução espaço-temporal, foi extremamente relevante.

Os CFMs modificados por um filme nanocompósito baseado em CNTs e Nafion, usados na medição de ascorbato, preenchem todos os critérios (tamanho, velocidade, seletividade e sensibilidade) necessários para quantificar e monitorizar *in vivo* a dinâmica espacial e temporal do ascorbato. Devido ao efeito electrocatalítico conferido pelos CNTs aos CFMs modificados foi possível reduzir as interferências provocadas, sobretudo pela DA e pelo DOPAC, nas medições do ascorbato, o que aumentou a seletividade destas.

Os *arrays* de microbiossensores de glutamato, constituídos por MEAs, acoplados à amperometria, permitem a medição do glutamato presente no espaço extracelular cerebral de ratos, com resolução temporal elevada e sem provocar danos significativos nos tecidos cerebrais do animal. A seletividade destes microbiossensores foi aumentada pelo seu revestimento com a camada de exclusão constituída por m-PD, pois esta foi altamente seletiva contra os principais interferentes (ascorbato e DA). Para além disso, a técnica de auto-referência permitiu a subtração do sinal registado nos elétrodos sentinela ao registado nos elétrodos de registo, sendo assim possível a verificação cruzada da seletividade do sensor numa escala de tempo segundo a segundo.

Verificou-se ainda que a combinação dos microbiossensores com os CFM revestidos com Nafion e SWCNT num *array* permitiu medições simultâneas *in vivo* e em tempo real da concentração de glutamato e de ascorbato no espaço extracelular do hipocampo de ratos anestesiados e da sua interação dinâmica. Todos os trabalhos experimentais que serviram de suporte a esta monografia foram realizados em ratos saudáveis. Futuramente, a aplicação destes sensores eletroquímicos na monitorização do ascorbato e do glutamato em ratos com doenças, como a DH, é de extrema importância para avaliar o papel destas substâncias nos mecanismos de neurodegeneração da doença. Finalmente, nesta perspetiva, o desenvolvimento destes sensores reveste-se de elevada importância para possibilitar a realização de medidas multiplexadas de ascorbato e glutamato e com elevada resolução temporal e espacial.

Bibliografia

1. FERREIRA, N. R., LEDO, A., LARANJINHA, J., GERHARDT, G. A. and BARBOSA, R. M. **Simultaneous measurements of ascorbate and glutamate in vivo in the rat brain using carbon fiber nanocomposite sensors and microbiosensor arrays.** *Bioelectrochemistry* 121, (2018) 142–150.
2. REBEC, G. V. and CHRISTOPHER PIERCE, R. **A vitamin as neuromodulator: Ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission.** *Prog. Neurobiol.* 43, (1994) 537–565.
3. GIL-MOHAPEL, J. M. and REGO, A. C. **Doença de huntington: Uma revisão dos aspectos fisiopatológicos.** *Rev. Neurociencias* 19, (2011) 724–734.
4. BORLAND, L. M. and MICHAEL, A. C. **An Introduction to Electrochemical Methods in Neuroscience.** in *Electrochemical Methods for Neuroscience* (2007). doi:NBK1845 [bookaccession]
5. REBEC, G. V. **From interferant anion to neuromodulator: Ascorbate oxidises its way to respectability.** in *Electrochemical Methods for Neuroscience* (2007). 149–166.
6. REBEC, G. V. **Dysregulation of Corticostriatal Ascorbate Release and Glutamate Uptake in Transgenic Models of Huntington’s Disease.** *Antioxid. Redox Signal.* 19, (2013) 2115–2128.
7. HARRISON, F. E. and MAY, J. M. **Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2.** *Free Radical Biology and Medicine* (2009) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.018
8. MAY, J. M. **Vitamin C transport and its role in the central nervous system.** 56, (2012) 85–103.
9. DANBOLT, N. C. **Glutamate uptake.** *Prog. Neurobiol.* 65, (2001) 1–105.
10. RICARDO, N. and FERREIRA, E. **The interplay of ascorbic acid, nitric oxide and nitrite in the brain and its role on the regulation of cerebral blood flow: an in vivo electrochemical study.** (2015).
11. REBEC, G. V. **Corticostriatal network dysfunction in Huntington’s disease:**

- Deficits in neural processing , glutamate transport , and ascorbate release.**
(2018) 281–291 doi:10.1111/cns.12828
12. SEPERS, M. D. and RAYMOND, L. A. **Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington’s disease.** *Drug Discovery Today* (2014) doi:10.1016/j.drudis.2014.02.006
 13. FERREIRA, N. R., SANTOS, R. M., LARANJINHA, J. and BARBOSA, R. M. **Real Time In Vivo Measurement of Ascorbate in the Brain Using Carbon Nanotube-Modified Microelectrodes.** *Electroanalysis* 25, (2013) 1757–1763.
 14. HASCUP, K. N., RUTHERFORD, E. C., QUINTERO, J. E., DAY, B. K., NICKELL, J. R., POMERLEAU, F., HUETTL, P., BURMEISTER, J. J. and GERHARDT, G. A. **Chapter 19 - Second-by-Second Measures of L-Glutamate and Other Neurotransmitters Using Enzyme-Based Microelectrode Arrays Principles of in Vivo Electrochemistry Enzyme-Based Multisite Microelectrode Arrays.** in *Electrochemical Methods for Neuroscience* (2007).
 15. BURMEISTER, J. J., DAVIS, V. A., QUINTERO, J. E., POMERLEAU, F., HUETTL, P. and GERHARDT, G. A. **Glutaraldehyde cross-linked glutamate oxidase coated microelectrode arrays: Selectivity and resting levels of glutamate in the CNS.** *ACS Chem. Neurosci.* (2013) doi:10.1021/cn4000555